



REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

www.elsevier.es/ram



ORIGINAL

Enfermedad del legionario en Argentina: evolución de la estrategia diagnóstica en el laboratorio

Lucía Cipolla, Florencia Rocca, Rita Armitano, Beatriz López y Mónica Prieto*

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS Dr. Carlos Malbrán, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Recibido el 18 de abril de 2022; aceptado el 18 de octubre de 2022

PALABRAS CLAVE

Enfermedad del legionario;
Legionelosis;
Neumonía atípica;
Diagnóstico
sindrómico

Resumen La enfermedad del legionario (EL) es una neumonía aguda grave, que ocurre esporádicamente o como epidemias, y que, generalmente, requiere hospitalización. El objetivo de este trabajo fue describir la experiencia en el abordaje diagnóstico de laboratorio de la EL en Argentina durante el período 2016-2021. Se analizaron 168 especímenes clínicos correspondientes a 93 casos de neumonía con sospecha de EL. Las pruebas de laboratorio incluyeron la determinación del antígeno soluble de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 en orina, la detección de ADN de *Legionella* spp. en secreciones respiratorias bajas, por métodos moleculares convencionales y comerciales de tipo sindrómico, y el cultivo en medio selectivo. Se confirmó EL en 12 pacientes. El antígeno urinario confirmó el diagnóstico de 8 de ellos. Se recuperó *L. pneumophila* mediante el cultivo del material respiratorio de 6 pacientes que correspondieron a casos de neumonía asociada a cuidados de la salud y que fueron previamente diagnosticados por el método molecular comercial. La mitad de ellos no presentó antigenuria detectable. En un único paciente no hubo antigenuria detectable ni recuperación de *Legionella* en cultivo, y la confirmación de EL se basó en la detección de ADN de *Legionella* spp. por PCR en secreción respiratoria y el vínculo epidemiológico con otro caso de EL confirmado por cultivo. La detección del antígeno urinario es la prueba diagnóstica de primera línea. Sin embargo, la incorporación de métodos moleculares complementarios ha demostrado evitar falsos negativos y contribuir a un mejor conocimiento de la verdadera incidencia de la enfermedad.

© 2022 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Legionnaires' disease;
Legionellosis;
Atypical pneumonia;
Syndromic diagnosis

Legionnaires' disease in Argentina: Evolution of the laboratory diagnostic strategy

Abstract Legionnaires' disease (LD) is severe acute pneumonia that occurs in sporadic or epidemic form, and generally requires hospitalization. The objective of this work was to describe the experience in the LD laboratory diagnostic approach in Argentina during the period

* Autora para correspondencia.

Correo electrónico: pmaprieto@gmail.com (M. Prieto).

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.10.001>

0325-7541/© 2022 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: L. Cipolla, F. Rocca, R. Armitano et al., Enfermedad del legionario en Argentina: evolución de la estrategia diagnóstica en el laboratorio, Revista Argentina de Microbiología, <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.10.001>

2016–2021. The laboratory analyzed 168 clinical specimens from 93 cases of suspected LD pneumonia. Laboratory tests included the detection of the soluble antigen of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in urine sample, detection of DNA of *Legionella* spp. in lower respiratory secretions by conventional and commercial molecular methods and isolation in selective medium. LD was confirmed in 12 patients. The urinary antigen allowed the diagnosis for 8 patients. *L. pneumophila* was isolated from the respiratory material of 6 patients suffering from health care-associated pneumonia, who had been previously diagnosed using the commercial molecular method. Fifty percent of these cases did not show detectable urinary antigen. A single patient did not show neither detectable antigenuria nor isolation of *Legionella* from the respiratory sample and was diagnosed as a confirmed case of LD by the detection of DNA of *Legionella* spp. by PCR directly from the respiratory secretion and the epidemiological link with another case of confirmed LD by culture. Urinary antigen detection is the first-line diagnostic test. However, the incorporation of complementary molecular methods has proved to avoid false negatives and contributed to a better understanding of the true incidence of the disease.

© 2022 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La enfermedad del legionario (EL) fue descrita en 1976 después de un importante brote de neumonía grave entre los asistentes a una convención de la Legión Americana en Filadelfia, Pensilvania, en donde se registraron 182 casos que derivaron en 29 muertes y la hospitalización de 147 personas¹⁴. En 1977, un equipo del *Centers for Disease Control and Prevention* de Atlanta, Estados Unidos, aisló el agente etiológico responsable del brote²³, y, en 1979, aquel fue identificado como un bacilo gram negativo de cultivo exigente, que se clasificó como un nuevo género y se denominó *Legionella pneumophila*⁴. Actualmente, el género *Legionella* incluye 63 especies y 70 serogrupos (<https://www.bacterio.net>); *L. pneumophila* serogrupos 1 es el agente causal de legionelosis más prevalente y virulento⁹.

El principal reservorio de *Legionella* es el agua y los ambientes hídricos. Numerosos estudios ambientales demostraron la presencia de varias especies de *Legionella*, incluyendo las especies patógenas en humanos, en ecosistemas acuáticos naturales y en fuentes artificiales de aguas templadas, como sistemas de plomería, calentadores, humidificadoras, spas y torres de refrigeración^{8,25}. El término «legionelosis» abarca todas las formas de enfermedades humanas causadas por *Legionella* y se asocia con 3 entidades clínicas y epidemiológicamente distintas: la EL, la fiebre de Pontiac y la legionelosis extrapulmonar¹⁰. La forma más común es la EL, una neumonía aguda de gravedad, que ocurre esporádicamente o como epidemias, y que requiere hospitalización. Esta entidad no se puede distinguir fácilmente de otras formas de neumonía adquirida en la comunidad a partir de las características clínicas o radiológicas ni de estudios de laboratorio inespecíficos⁸. La tasa de mortalidad por EL suele oscilar entre el 5 y el 10%, con un promedio del 12%¹⁸.

Uno de los determinantes de la evolución de la enfermedad más importantes es la rapidez en el diagnóstico,

para comenzar un tratamiento antibiótico dirigido. *Legionella* es un patógeno intracelular, por lo que los antibióticos de primera línea para el tratamiento de la legionelosis son azitromicina, doxiciclina o levofloxacina⁸.

La EL es una enfermedad subdiagnosticada debido a la gran cantidad de patógenos que causan síntomas similares y a la complejidad del diagnóstico en el laboratorio. Tradicionalmente, las pruebas de laboratorio para la confirmación de un caso sospechoso incluyen la detección del antígeno urinario de *L. pneumophila* serogrupos 1, el hallazgo de *Legionella* sp. por cultivo o la cuadruplicación del título de anticuerpos totales contra *L. pneumophila* serogrupos 1 en muestras de suero de fase aguda y fase convaleciente. Sin embargo, durante las últimas 2 décadas, los algoritmos diagnósticos han incorporado en forma creciente las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos de *Legionella* sp.^{6,8,19}.

El propósito de este trabajo es informar sobre la experiencia adquirida en el abordaje diagnóstico de laboratorio de la EL en Argentina durante el período 2016-2021.

Materiales y métodos

El Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) recibe demanda de diagnóstico de EL desde distintos centros de salud del país, públicos y privados. Los instructivos para el envío de muestras y las fichas de derivación se encuentran disponibles en línea en el sitio oficial de la citada institución. Las muestras clínicas que se consideraron aptas para realizar el diagnóstico fueron secreciones respiratorias bajas, tejido, orina y sueros pareados de la fase aguda y la convaleciente. Los sueros fueron analizados para demostrar seroconversión en el título de inmunoglobulinas totales contra *Legionella pneumophila* solo en aquellos casos en los que no se pudo disponer de muestra respiratoria o en los que la prueba de antígeno urinario resultó negativa y existía una fuerte sospecha clínica y epidemiológica. No se consideraron aptas para

el diagnóstico de EL muestras respiratorias altas, muestras de sangre ni un único suero.

En el período 2016-2021, el LNR recibió 168 especímenes clínicos aptos correspondientes a 93 casos de neumonía con sospecha de EL (orinas: $n = 88$; muestras respiratorias: $n = 37$; sueros: $n = 43$). El 54% ($n = 20$) de las muestras respiratorias fueron lavado broncoalveolar (LBA); el 27% ($n = 10$), esputo; y el 19% ($n = 7$) restante fueron aspirado traqueal y líquido pleural.

Se dispuso solo de muestras de orina en 42 pacientes; de orina y material respiratorio en 31; de orina y sueros pareados en 15; y de sueros de fase aguda y fase convaleciente en 5.

Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud³, los casos de EL fueron clasificados como casos adquiridos en la comunidad, casos asociados a cuidados de la salud y casos asociados a viajes, de acuerdo con la información recibida en las fichas de derivación.

Las muestras de orina fueron recolectadas en contenedores estériles, sin agregado de preservantes. Las muestras enviadas al laboratorio en el mismo día de su recolección se mantuvieron a temperatura ambiente; las derivadas 24 h después de la toma se mantuvieron y remitieron refrigeradas. La detección del antígeno urinario de *L. pneumophila* serogrupo 1 se realizó por inmunocromatografía con el equipo Binax Now[®] (Abbott), según las recomendaciones del fabricante.

Las muestras respiratorias fueron recolectadas en recipientes estériles y refrigeradas a 4°C, hasta el envío al laboratorio. Cuando el volumen de las secreciones respiratorias remitidas fue mayor de 1000 µl, se realizó cultivo y amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos para *Legionella* spp., según lo descrito en el manual de procedimientos del laboratorio²⁹. Para los casos que mostraron antigenuria positiva, si el volumen de la secreción respiratoria fue menor de 1000 µl, se priorizó la muestra para cultivo. Cuando la detección de antígeno urinario no dio un resultado positivo o no se había remitido muestra de orina, la muestra respiratoria se priorizó para la extracción de ADN y posterior PCR.

La extracción y purificación de ADN se realizó con el equipo comercial QIAamp[®] DNA minikit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. Cada proceso de extracción incluyó como control negativo una muestra de agua destilada estéril, para detectar falsos positivos por posible contaminación de los reactivos comerciales¹³. El control positivo fue un extracto obtenido por el método de lisis alcalina²⁹ a partir de un cultivo puro de la cepa *L. pneumophila* ATCC 33152. Para la amplificación de ADN de *Legionella* spp. por PCR convencional, se utilizaron las condiciones descritas por Jarraud et al.¹⁹ y los cebadores JFP (5'-AGGGTTGATAGGTTAAGAGC-3') y JRP (5'-CCAACAGCTAGTTGACATCG-3'), que amplifican una porción de 386 pares de bases del gen 16S ARNr de *Legionella* spp. Se incluyó la amplificación del gen de la beta-globina humana como control de presencia de inhibidores de PCR²⁴. A partir de 2019, el LNR incorporó el método molecular comercial FilmArray pneumonia panel[®] (FilmArray PP, BioFire Diagnostics), validado por la *Food and Drug Administration* (FDA) en 2018 para las muestras de LBA, líquido pleural y esputo. Este método no solo es más rápido, sino que requiere apenas

200 µl de muestra respiratoria, sin proceso previo de extracción y purificación manual de los ácidos nucleicos. Cuando se detectó ADN de *L. pneumophila*, la muestra respiratoria fue inmediatamente cultivada. Cuando no se detectó ADN de *L. pneumophila* por este método molecular comercial, se realizó la extracción de ADN y la amplificación del fragmento del gen 16S ARNr descrita anteriormente.

Las muestras respiratorias fueron sembradas, sin dilución previa, en agar de carbón tamponado y extracto de levadura suplementado con L-cisteína y hierro (medio BCYE) e incubadas a 35 ± 2 °C en 2,5% de CO₂ hasta 10 días. Las placas de BCYE fueron preparadas dentro de las 24 h anteriores a la siembra a partir del medio *Legionella* agar base (BD Difco[®]), adicionando el suplemento de enriquecimiento *Legionella* agar enrichment (BD Difco[®]), según las instrucciones del fabricante. El control de calidad de cada lote de placas de medio BCYE se efectuó con las cepas *L. pneumophila* ATCC 33215 y *Legionella micdadei* ATCC 33216.

Las muestras no estériles, como el esputo, también se cultivaron en agar tripticasa de soja con sangre de carnero al 5%, para evaluar el desarrollo de la microbiota oral. En casos de desarrollo abundante de microbiota acompañante, se realizó un pretratamiento ácido de la muestra según lo descrito en el manual de procedimientos²⁹, y se cultivó nuevamente en agar BCYE. Las colonias obtenidas en agar BCYE fueron identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF MS (Microflex[®], Bruker Daltonics) por el método directo, según las recomendaciones del fabricante, utilizando la base de datos Biotyper[®] v 3.1.66 (Bruker Daltonics) para la interpretación de los resultados.

Los aislados identificados como *Legionella* spp. por MALDI-TOF MS fueron confirmados por secuenciación parcial del gen *mip*, según el protocolo descrito por Jarraud et al.¹⁹, utilizando el kit comercial BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems) y el secuenciador ABI PRISM[®] 377 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). El análisis de la secuencia se realizó mediante el algoritmo BLAST en la base de datos del GenBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

La determinación de inmunoglobulinas totales contra *L. pneumophila* serogrupo 1 se efectuó por inmunofluorescencia indirecta con el equipo comercial Legionella IFA (Focus Diagnostics). Se consideró un título de 1:16 en la primera muestra de suero (correspondiente a la fase aguda de la enfermedad) como evidencia de exposición y un título igual o mayor de 1:128 en la segunda muestra de suero (correspondiente a la fase convaleciente) como evidencia de seroconversión, según las instrucciones del fabricante²⁹.

Resultados

El principal método de prueba para la detección de EL fue el antígeno urinario, empleado en 88 (95%) pacientes. Se realizó cultivo de muestras respiratorias bajas en 26 (28%) pacientes y PCR en 24 (26%) pacientes. Se confirmó EL en 12 (13%) pacientes.

Solo en un paciente de los 42 casos sospechosos cuyo único material remitido fue muestra de orina se pudo confirmar EL mediante la detección del antígeno urinario.

De 31 pacientes se dispuso de muestras de orina y materiales respiratorios, y se detectó antigenuria en 7 pacientes.

Tabla 1 Casos de enfermedad del legionario confirmados por el Laboratorio Nacional de Referencia, 2016-2021

Paciente	Año	Categoría epidemiológica	Especímenes analizados	Pruebas de laboratorio
1	2016	Adquirida en la comunidad	Orina	Antígeno urinario positivo
2	2016	Adquirida en la comunidad	Orina LBA	Antígeno urinario positivo Cultivo negativo PCR negativa ^a
3	2017	Adquirida en la comunidad	Orina LBA	Antígeno urinario positivo Cultivo negativo
4	2017	Adquirida en la comunidad	Orina LBA	Antígeno urinario positivo Cultivo negativo
5	2017	Asociada a viaje	Orina LBA	Antígeno urinario positivo PCR negativa ^a
6	2019	Asociada a cuidados de la salud	Orina Líquido pleural	Antígeno urinario negativo Cultivo: <i>L. pneumophila</i> PCR positiva ^b
7	2020	Asociada a cuidados de la salud	Orina LBA	Antígeno urinario positivo Cultivo: <i>L. pneumophila</i> PCR: positiva ^b
8	2020	Asociada a cuidados de la salud	Orina LBA	Antígeno urinario negativo Cultivo: <i>L. pneumophila</i> PCR: positiva ^b
9	2020	Asociada a cuidados de la salud	Orina LBA	Antígeno urinario negativo Cultivo: negativo PCR: positiva ^{a,b}
10	2020	Asociada a cuidados de la salud	Orina LBA	Antígeno urinario positivo Cultivo: <i>L. pneumophila</i> PCR: positiva ^{a,b}
11	2021	Asociada a cuidados de la salud	Orina LBA	Antígeno urinario positivo Cultivo: <i>L. pneumophila</i> PCR: positiva ^b
12	2021	Asociada a cuidados de la salud	Orina LBA	Antígeno urinario negativo Cultivo: <i>L. pneumophila</i> PCR: positiva ^b

LBA: lavado broncoalveolar.

^a PCR convencional gen 16S ARNr (método *in house*).^b FilmArray pneumonia panel[®] (FilmArray PP, BioFire Diagnostics).

Las muestras respiratorias de 6 de ellos se cultivaron y se aisló *Legionella pneumophila* de 3 pacientes. Las muestras respiratorias de los 24 casos restantes, que no presentaron antigenuria detectable, fueron analizadas mediante PCR convencional o FilmArray pneumonia panel[®] (2019 en adelante), o ambos. Se detectó ADN de *L. pneumophila* por PCR comercial en secreciones respiratorias de 4 pacientes y además se recuperó *L. pneumophila* por cultivo en 3 de ellos.

No se confirmó EL en ninguno de los casos en los que se remitieron muestras de orina y sueros pareados ($n=15$) o sueros pareados únicamente ($n=5$).

Como se señaló, a partir de 2019, el LNR reemplazó la PCR convencional por el método FilmArray pneumonia panel[®], con el que se estudiaron 14 muestras respiratorias. Se obtuvo un resultado positivo para *L. pneumophila* en muestras de 5 pacientes. Los 9 casos negativos por el panel sindrómico no mostraron amplificación de ADN de *Legionella* sp. por PCR convencional.

La clasificación epidemiológica y las pruebas de laboratorio realizadas en los 12 casos de EL confirmados se resumen en la [tabla 1](#).

Se recuperó *L. pneumophila* en cultivo a partir de material respiratorio de 6 pacientes correspondientes a casos de neumonía grave asociada a cuidados de la salud, definida según los criterios descritos por la Organización Mundial de la Salud³. Estos casos fueron diagnosticados a las 48-72 h desde la aparición de los síntomas por los laboratorios de los hospitales que incorporaron el método molecular comercial FilmArray pneumonia panel[®] (FilmArray PP, BioFire Diagnostics), lo cual permitió la rápida derivación de los materiales respiratorios para el cultivo. El 50% de dichos casos no presentó antigenuria detectable.

Las muestras en las cuales se obtuvo crecimiento monomicrobiano de *L. pneumophila* fueron LBA ($n=4$), líquido pleural ($n=1$), esputo ($n=1$) y aspirado traqueal ($n=1$); las 3 últimas correspondieron a un mismo paciente. Se obtuvo desarrollo mixto de *L. pneumophila* y *Staphylococcus*



Figura 1 Colonias de *Legionella pneumophila* en agar BCYE a los 4 días de incubación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en 2,5% de CO_2 .

epidermidis a partir del LBA de un paciente. Las colonias desarrollaron en agar BCYE a los 3-5 días de incubación. El aspecto de las colonias puede observarse en la [figura 1](#). La identificación por MALDI-TOF MS mostró valores de *score* mayores de 2,3 para *L. pneumophila* subespecie *pneumophila* en todos los aislados. La secuenciación parcial del gen *mip* confirmó la identificación como *L. pneumophila*.

Cuatro casos de neumonías adquiridas en la comunidad fueron confirmados mediante detección del antígeno urinario. Se recibieron materiales respiratorios de 3 de esos pacientes, y debido a que los casos habían sido confirmados como EL por antigenuria positiva, se priorizaron las muestras para el cultivo. Sin embargo, no fue posible recuperar *Legionella* sp. en ninguno de los especímenes clínicos.

Un paciente ([tabla 1](#), paciente 9) fue confirmado como caso de EL mediante la detección de ADN de *Legionella* spp. y de *L. pneumophila* por PCR convencional y por el panel molecular comercial, respectivamente, aunque no fue demostrada la presencia del antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1 en orina, ni se obtuvo desarrollo de *Legionella* spp. en cultivo. Sin embargo, el caso estaba epidemiológicamente relacionado con el paciente 8, que tampoco mostró antigenuria, pero del cual se recuperó *L. pneumophila* por cultivo del material respiratorio. El paciente 5 correspondió a un caso asociado a viaje y fue confirmado por detección de antígeno urinario. El volumen de la muestra respiratoria de dicho paciente fue insuficiente para realizar el cultivo debido a que el equipo médico solicitó el diagnóstico diferencial de varios patógenos, de modo que se priorizó la extracción de ácidos nucleicos para PCR.

Discusión

La incidencia exacta de la legionelosis en el mundo es desconocida, principalmente porque los países difieren en la consistencia de sus sistemas de vigilancia, los métodos de diagnóstico utilizados y el nivel de notificación. Durante las

últimas 2 décadas, la incidencia de la EL en los Estados Unidos aumentó más de 5 veces, y ha llegado a tasas de 3 casos por cada 100.000 habitantes en 2018. Sin embargo, se considera que la EL está aún muy subdiagnosticada y se estima que el número real de casos es de más de 50.000 por año⁵. En la Unión Europea, la tasa de notificación entre los países es heterogénea, pero la tasa general en 2019 fue 2,2 casos por 100.000 habitantes, con la tasa más alta notificada por Eslovenia (9,4 casos por 100.000 habitantes)¹².

En Latinoamérica, la información es escasa. En un estudio prospectivo multicéntrico realizado durante un período de 18 meses (2005-2006) en Santiago, Chile, que incluyó casos de neumonía grave adquirida en la comunidad, la incidencia de *Legionella pneumophila* fue del 8,6%, con lo que ocupó el segundo lugar como agente etiológico, detrás de *Streptococcus pneumoniae*. El método diagnóstico utilizado en ese estudio fue la detección de antígeno urinario por inmunocromatografía¹. En un estudio prospectivo sobre neumonías adquiridas en la comunidad llevado a cabo en un hospital universitario de Brasil durante 12 meses, los investigadores informaron una incidencia del 5,1% de neumonía por *L. pneumophila*. Los métodos diagnósticos utilizados fueron la determinación de antígeno urinario y la seroconversión por inmunofluorescencia indirecta⁷.

El primer estudio sobre neumonías adquiridas en la comunidad de Argentina que incluyó la investigación de legionelosis se realizó en un hospital universitario; el período estudiado fue de 12 meses (1997-1998) y se informó una incidencia de *L. pneumophila* del 3,5%. Los métodos diagnósticos utilizados fueron la determinación de antígeno urinario y la seroconversión por inmunofluorescencia indirecta²². En 2013 se documentó el primer brote intrahospitalario de EL en una unidad de cuidados intensivos de un hospital de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Dicho brote involucró, principalmente, al personal que trabajaba en esa unidad. Se detectaron 14 casos sospechosos, de los cuales solo 5 fueron confirmados por seroconversión en el LNR. Todos los casos presentaron resultados negativos para el antígeno urinario⁹.

Para mejorar la detección de casos de EL es muy importante utilizar más de una prueba diagnóstica. La detección del antígeno urinario es la prueba de primera línea, pero solo detecta *L. pneumophila* serogrupo 1²⁰. Las pruebas comerciales de amplificación de ácidos nucleicos fueron validadas recientemente para el diagnóstico de la legionelosis²⁷. En la actualidad, el uso de paneles sindrómicos comerciales —cada vez más accesibles para los laboratorios de microbiología clínica de presupuesto moderado— es una herramienta sensible para la detección de casos de legionelosis temprana y complementa la información brindada por la prueba del antígeno urinario, que es el método más utilizado y de menor costo.

El aislamiento de *Legionella* mediante el cultivo en BCYE de los especímenes de las vías respiratorias bajas sigue siendo el estándar de oro para diagnosticar la EL, ya que permite la detección de todas las especies del género *Legionella* y posibilita la realización de estudios genómicos para establecer vínculos epidemiológicos. Sin embargo, es técnicamente exigente y la sensibilidad varía entre el 20 y el 80%¹⁹. Se analizaron mediante cultivo 10 muestras respiratorias de los 12 casos de EL identificados en este análisis: *L. pneumophila* fue aislada de 6 pacientes, lo que representa

una tasa de recuperación en cultivo del 60%. Estos pacientes habían sido tempranamente diagnosticados por el método de PCR comercial FilmArray pneumonia panel® (FilmArray PP, BioFire Diagnostics) a las 24-48 h del inicio de los síntomas. La obtención de muestras respiratorias al principio del curso de la enfermedad, así como la rápida derivación al laboratorio de referencia, sin procesos de congelamiento-descongelamiento, pudo haber contribuido al mejoramiento de la recuperación en cultivo.

Confiar únicamente en el antígeno urinario puede dar lugar a un marcado subdiagnóstico de la enfermedad. Un estudio multicéntrico realizado en Bélgica mostró que el 44,4% de los resultados de antigenuria parecían falsos negativos y se reclasificaron como EL según los resultados obtenidos por PCR²⁶.

La prevalencia de *L. pneumophila* serogrupo 1 a nivel global podría estar sobreestimada, dado que la prueba diagnóstica más ampliamente utilizada es la determinación del antígeno urinario y, aunque algunos fabricantes afirman confidencialmente que se pueden detectar otros serogrupos debido a la reactividad cruzada, la sensibilidad para *L. pneumophila* que no son del serogrupo 1 es muy variable y, generalmente, mucho más baja⁸. Además, la detección del antígeno urinario es más sensible en infecciones por *L. pneumophila* serogrupo 1 que reacciona con los anticuerpos Mab3/1 del panel de Dresde¹⁶, pero la sensibilidad disminuye hasta un 40% en los pacientes con infección por *L. pneumophila* serogrupo 1 del subgrupo MAb3/1 negativo³.

En un estudio europeo multicéntrico en el cual se analizaron 1.335 casos de legionelosis, se confirmó la prevalencia de cepas de *L. pneumophila* MAb3/1 (67%) con respecto a cepas MAb3/1 negativas (12%). No obstante, la mayoría de las infecciones nosocomiales estuvieron asociadas a cepas MAb3/1 negativas¹⁷. En nuestro estudio, los casos 6, 8, 9 y 12 (tabla 1) habrían sido clasificados como negativos si el diagnóstico se hubiese basado únicamente en la detección del antígeno urinario. Asimismo, la EL no puede considerarse descartada en los 47 pacientes en los que se hizo una única determinación (antígeno urinario, 42 pacientes; seroconversión, 5 pacientes). Por lo tanto, si bien el antígeno urinario es la prueba de primera línea, es importante transmitir al médico el concepto de que no debería descartarse la enfermedad solo con un resultado negativo de antigenuria si no se han incluido otras pruebas diagnósticas complementarias. Un resultado falso negativo, principalmente en casos asociados a cuidados de la salud, tiene un elevado impacto, ya que demora la alerta epidemiológica para la búsqueda de la fuente de infección y la pronta intervención para el control de la enfermedad, de forma tal de prevenir nuevos casos en una población vulnerable, como la hospitalizada.

La definición de «caso confirmado de EL» requiere un resultado positivo de alguna de las siguientes pruebas: antígeno urinario de *L. pneumophila* serogrupo 1, aislamiento de *Legionella* sp. o evidencia serológica de seroconversión^{6,11}. Sin embargo, países como los Estados Unidos, Australia y el Reino Unido modificaron recientemente la definición de «caso» incluyendo entre las pruebas confirmatorias la detección de cualquier especie de *Legionella* a partir de secreciones de las vías respiratorias inferiores, tejido pulmonar, líquido pleural o sitio extrapulmonar mediante una prueba de amplificación de ácidos nucleicos validada^{2,5,28}.

En Argentina, la legionelosis no está incorporada aún en el listado de enfermedades de notificación obligatoria; sin embargo, es un evento bajo vigilancia en el Sistema Integrado de Información Sanitaria Argentino (<https://sisa.msal.gov.ar>). Este informe sobre la evolución del abordaje diagnóstico de la EL en Argentina puso en evidencia el impacto de los métodos de amplificación de ácidos nucleicos incorporados a la rutina diagnóstica en el laboratorio de microbiología hospitalario a partir de 2019. La pronta confirmación y notificación de los casos asociados a cuidados de la salud permitió una rápida investigación epidemiológica por parte de los equipos de control de infecciones y las autoridades sanitarias, y la realización de estudios ambientales para detectar la fuente y aplicar medidas de contingencia, a fin de evitar más casos. También puso en evidencia la necesidad de contar con una normativa nacional para el control de *Legionella* en aguas, que promueva la implementación de programas de gestión del agua en los entornos de riesgo, como el hospitalario, para prevenir casos de EL al identificar y abordar las condiciones que podrían provocar el desarrollo y la propagación de la bacteria. En el mundo, la mayoría de los brotes identificados de EL ocurrieron en edificios con grandes sistemas de agua, como hoteles, centros de cuidados a largo plazo y hospitales⁸. *Legionella* se multiplica con mayor facilidad en los sistemas de agua que no están bien mantenidos y en agua tibia¹⁵.

Recientemente, un grupo de investigadores argentinos realizaron un estudio para detectar por cultivo la presencia de *Legionella* spp. en depósitos domiciliarios de agua potable de la ciudad de Resistencia, Chaco. Recuperaron *Legionella* spp. en el 34,9% de las muestras estudiadas y confirmaron la presencia de *L. pneumophila* en el 94% de los cultivos positivos obtenidos²¹. Estos hallazgos contribuyeron a demostrar el riesgo potencial de legionelosis en los hogares y marcan la necesidad de maximizar los esfuerzos por mejorar el diagnóstico de las infecciones respiratorias agudas para las cuales no se detecta un agente etiológico frecuente²¹.

Dado que, actualmente, no existe ninguna prueba que permita la detección de todas las especies de *Legionella* asociadas a infecciones humanas con un alto grado de sensibilidad y especificidad, se recomienda el examen de diferentes tipos de muestras, con varias pruebas en paralelo^{6,8,11}.

Es importante considerar la EL entre los diagnósticos diferenciales en casos de neumonías adquiridas en la comunidad con fracaso terapéutico; neumonías graves, particularmente aquellas que requieren cuidados intensivos; pacientes inmunodeprimidos con neumonía; neumonías asociadas a cuidados de la salud y neumonías en individuos con antecedentes de viajes. La incorporación de métodos diagnósticos moleculares complementarios al antígeno urinario debe ser seriamente considerada en el laboratorio de microbiología clínica, para evitar falsos negativos y conocer la verdadera incidencia de la enfermedad.

Financiación

El estudio es parte de la actividad de vigilancia del Laboratorio Nacional de Referencia y es financiado con presupuesto del Gobierno Nacional.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Bibliografía

1. Arancibia F, Cortes CP, Valdés M, Cerda J, Hernández A, Soto L, Torres A. Importance of *Legionella pneumophila* in the etiology of severe community-acquired pneumonia in Santiago, Chile. *Chest*. 2014;145:290–6.
2. Australian Government, Department of Health, Legionella laboratory case definition (LCD). [Internet]. Australia; 2019 [actualizado 15 Jul 2021; citado 26 Jun 2022]. Disponible en: <https://www1.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/cda-pubs-annlrpt-nndssar.htm>.
3. Bartram J, Chartier Y, Lee JV, Pond K, Surman-Lee S. *Legionella* and the prevention of legionellosis. Geneva, Switzerland: World Health Organization Press; 2007.
4. Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann Intern Med*. 1979;90:656–8.
5. Cassell K, Davis JL, Berkelman R. Legionnaires' disease in the time of COVID-19. *Pneumonia*. 2021;13:2.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Legionnaires disease case definitions. [Internet]. USA: CDC; 2019 [consultado 18 Abr 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/legionella/health-depts/surv-reporting/case-definitions.html>.
7. Chedid MB, Ilha DO, Chedid MF, Dalcin PR, Buzzetti M, Jaconi Saraiva P, Griza D, Menna Barreto SS. Community-acquired pneumonia by *Legionella pneumophila* serogroups 1-6 in Brazil. *Respir Med*. 2005;99:966–75.
8. Cunha BA, Burillo A, Bouza E. Legionnaires' disease. *Lancet*. 2016;387:376–85.
9. Dirección de Epidemiología de la Provincia de Buenos Aires - Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires. Brote de enfermedad respiratoria aguda grave por *Legionella* spp. en Hospital Nuestra Sra. del Carmen de la localidad de Carmen de Areco [Internet]. 2013 [consultado 18 Abr 2022]. Disponible en: <https://docplayer.es/6445631-Brote-de-enfermedad-respiratoria-aguda-grave-por-legionella-spp-en-hospital-nuestra-sra-del-carmen-de-la-localidad-de-carmen-de-areco.html>.
10. Edelstein PH, Roy CR. Legionnaires' disease and Pontiac Fever. En: Bennet JE, Dolin R, Blaser MJ, editores. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 8th ed. Pennsylvania: Elsevier; 2015. p. 2633–44.
11. European Centre for Disease Prevention and Control. EU case definitions. [Internet]. EU; 2018 [citado 26 Jun 2022]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/surveillance-and-disease-data/eu-case-definitions>.
12. European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. En: ECDC. Annual epidemiological report for 2019. [Internet]. Stockholm: ECDC; 2021 [citado 26 Jun 2022]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report-2019>.
13. Evans GE, Murdoch DR, Anderson TP, Potter HC, George PM, Chambers ST. Contamination of Qiagen DNA extraction kits with *Legionella* DNA. *J Clin Microbiol*. 2003;41:3452–3.
14. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GF, Martin SM, McDade JE, Shepard CC, Brachman PS. Legionnaires' disease: Description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med*. 1977;297:1189–97.
15. Garrison LE, Kunz JM, Cooley LA, Moore MR, Lucas C, Schrag S, Whitney CG. Vital signs: Deficiencies in environmental control identified in outbreaks of Legionnaires' disease—North America, 2000–2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65:576–84.
16. Helbig JH, Kurtz JB, Pastoris MC, Pelaz C, Lück PC. Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: Possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *J Clin Microbiol*. 1997;35:2841–5.
17. Helbig JH, Jacobs E, Lück C. *Legionella pneumophila* urinary antigen subtyping using monoclonal antibodies as a tool for epidemiological investigations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31:1673–7.
18. Herwaldt LA, Marra AR. *Legionella*: A reemerging pathogen. *Curr Opin Infect Dis*. 2018;31:325–33.
19. Jarraud S, Descours G, Ginevra C, Lina G, Etienne J. Identification of *Legionella* in clinical samples. *Methods Mol Biol*. 2013;954:27–56.
20. Jodra Sánchez S, Barrueco Ferrero M. Neumonía por *Legionella*, ¿cuándo solicitar la antigenuria en orina? *Med Clin*. 2016;146:394–6.
21. Losch S, Deluca D, Medina G, Yarros M, Weber A, Merino L. Presencia de especies de *Legionella* en reservorios domiciliarios de agua de Resistencia Chaco, Argentina. *Rev Argent Salud Pública*. 2019;10:19–25 [consultado 20 Abr 2022]. Disponible en: <https://rasp.msal.gov.ar/index.php/rasp/article/view/482>.
22. Luna CM, Famiglietti A, Absi R, Videla AJ, Nogueira FJ, Fuenzalida AD, Geneé RJ. Community-acquired pneumonia: Etiology, epidemiology, and outcome at a teaching hospital in Argentina. *Chest*. 2000;118:1344–54.
23. McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR. Legionnaires' disease: Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med*. 1977;297:1197–203.
24. Millar B, Moore J, Mallon P, Xu J, Crowe M, McClurg R, Raoult D, Earle J, Hone R, Murphy P. Molecular diagnosis of infective endocarditis—a new Duke's criterion. *Scand J Infect Dis*. 2001;33:673–80.
25. Mouchtouri VA, Goutziana G, Kremastinou J, Hadjichristodoulou C. *Legionella* species colonization in cooling towers: Risk factors and assessment of control measures. *Am J Infect Control*. 2010;38:50–5.
26. Muyldermans A, Descheemaeker P, Boel A, Desmet S, van Gasse N, Reynders M, National Expert Committee on Infectious Serology. What is the risk of missing legionellosis relying on urinary antigen testing solely? A retrospective Belgian multicenter study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39:729–34.
27. Poole S, Clark TW. Rapid syndromic molecular testing in pneumonia: The current landscape and future potential. *J Infect*. 2020;80:1–7.
28. Public Health England Legionnaires' disease case definitions [Internet]. England. [actualizado 6 Feb 2020; citado 26 Jun 2022]. Disponible en: <https://www.gov.uk/government/publications/legionnaires-disease-clinical-case-definitions/legionnaires-disease-case-definitions>.
29. Prieto M, Cipolla L, Rocca F, Armitano R. Legionellosis. Manual de procedimientos para el diagnóstico microbiológico. Buenos Aires: ANLIS Dr. C. G. Malbrán; 2021 [consultado 20 Abr 2022]. Disponible en: <http://sgc.anlis.gob.ar/handle/123456789/2392>.