

Legionella: biología y ecología Análisis microbiológico de muestras de agua

J. A. Galán Torres¹, J. Castro Urda², H. Aguinaga Zapata³, A. Serrano Valín⁴, M.^a E. Boluda Garrido⁴,
R. Doncel Jiménez⁴

Sanid. mil. 2007; 63 (3): 227-230

LA BACTERIA

Un importante acontecimiento para el mundo de la microbiología tuvo lugar en enero de 1977, con el descubrimiento de una nueva bacteria responsable de una enfermedad respiratoria humana.

El año anterior tuvo lugar un brote epidémico de neumonía en el hotel Bellevue-Stratford de la ciudad de Filadelfia (USA) que afectó a 182 participantes de una convención anual de la Legión Americana celebrada entre el 21 y 24 de julio de 1976. Los estudios realizados por D. W. Fraser y J. E. McDade llevaron al aislamiento de una bacteria, no conocida hasta entonces (se observó por primera vez en una preparación de bazo de un cobaya inoculado con tejido pulmonar de un enfermo fallecido víctima de la enfermedad), a la que se denominó *Legionella pneumophila* (Brenner y cols. 1979), de la que hoy se consideran tres subespecies.

El agente causal no fue descubierto en el curso de un clásico aislamiento de bacterias, sino a través de un procedimiento diseñado para el aislamiento de rickettsias. Estos microorganismos, aunque similares a las bacterias, tienen la particularidad de que no crecen en medios de cultivo sintéticos sino que necesitan desarrollarse sobre organismos vivos (artrópodos, cobayos, embrión de pollo, etc). La relación causal se realizó investigando la presencia, en el suero de pacientes de la enfermedad de los legionarios, de anticuerpos específicos para el microorganismo aislado. Al principio no se sabía si se trataba de una rickettsia o de una bacteria, ya que además era incapaz de crecer en una extensa gama de medios de cultivo.

Robert E. Weaver, del CDC de Atlanta, encontró un medio bacteriológico en el cual podía crecer este bacilo. Era un medio similar al que se utilizó para aislar el gonococo. Se preparó por adición de un 1% de hemoglobina (hierro) y otro 1% de un suplemento comercial (Isovitale X, que contiene abundante cantidad del aminoácido cisteína) a un medio estándar (agar de Mueller-Hinton).

Cuando Weaver inoculó este medio con una suspensión concentrada de material procedente de un saco vitelino infectado se observó, tras algunos días de incubación, que habían aparecido varias colonias bacterianas sobre el medio de cultivo. El bacilo aislado no era pues una rickettsia sino una bacteria.

La prueba definitiva de que este organismo era una nueva especie se obtuvo cuando D. J. Brenner, A. G. Steigerwalt y otros investigadores del CDC, compararon el material genético de la bacteria

de Filadelfia con el de otras bacterias por medio de técnicas de hibridación de su ADN.

Como ocurre con muchas otras bacterias telúricas, el estudio sistemático ha permitido el descubrimiento de diversas especies. Desde entonces se han identificado unas 42 especies de *Legionella* de las que al menos 20 tienen poder patógeno humano. Los 15 serogrupos de la especie *L. pneumophila* tienen importancia epidemiológica, aunque es el serogrupo 1 el más importante, seguido del 4 y 6.

La legionelosis es un buen ejemplo de enfermedad infecciosa emergente, se presenta como dos entidades clínicas distintas: una forma neumónica, asociada a una importante morbilidad y mortalidad y que comprende la mayoría de los casos diagnosticados actualmente (legionelosis), y una forma sin afectación pulmonar, de resolución espontánea y rápida que cursa de manera inespecífica ó pseudogripal (fiebre de Pontiac).

La transmisión ocurre a través de la inhalación de aerosoles (dispersión de gotas de agua en el aire) ó por aspiración de agua contaminada con esta bacteria. Se han comunicado casos de infección tras el lavado de heridas con agua contaminada. El hombre es un hospedador ocasional de la bacteria ya que no es necesario para la replicación ni supervivencia del microorganismo. No se ha demostrado la transmisión de persona a persona. No se ha documentado la existencia de reservorios animales.

Diversos aspectos hacen de las legionelas microorganismos de gran interés, como son sus características microbiológicas, la interacción con los protozoos de vida libre en su hábitat acuático y, por último, su capacidad patógena mediante mecanismo invasor y, probablemente, por un mecanismo inmunitario (fiebre de Pontiac).

Las legionelas tienen la estructura característica de los bacilos gramnegativos, con un tamaño que oscila entre 0,3 y 0,9 µm de ancho por 1,5 a 5 µm de largo; en los tejidos se pueden presentar en forma cocoide o bacilar, y en algunos cultivos son pleomórficos y pueden presentar formas muy alargadas. Son móviles (excepto una especie, *L. oakridgensis*) gracias a uno o más flagelos polares o subpolares y se ha podido demostrar la existencia de fimbrias y de una estructura polisacárida ácida extracelular.

La coloración de Gram es muy tenue, sobre todo cuando el colorante de contraste es la safranina. Se tiñe bien (de color rojo) por el método de Giménez y las técnicas de plata (método de impregnación con plata de Dieterle modificado). No son ácido-alcohol resistentes, aunque la especie *L. micdadei* aparece en muestras clínicas o de tejidos como débilmente teñida por la coloración de Ziehl-Neelsen, sin embargo pierde estas características en resiembra posteriores.

El lipopolisacárido de la membrana externa de la pared presenta características diferenciales con respecto al de las enterobacte-

¹ Teniente Coronel Veterinario. Jefe de Servicio.

² Capitán Veterinario. Jefe Sección Análisis Clínicos.

³ Licenciada en farmacia.

⁴ Técnicos analistas.

Servicio de Microbiología, Higiene y Sanidad Ambiental.

Centro Militar de Veterinaria de la Defensa.

Darío Gazapo, 3 - 28024 Madrid.

rias, tanto en aspectos bioquímicos, ya que es muy rico en ácidos grasos ramificados, inusuales en las bacterias gramnegativas, como en la actividad endotóxica. No obstante, al igual que en otras bacterias gramnegativas, es antigénico. Se desconoce hasta qué punto estos aspectos estructurales que hacen referencia al liposacárido pueden tener relación con las propiedades tintoriales mencionadas a continuación y la notable resistencia al calor y a los ácidos de estos microorganismos, características que se han utilizado para la descontaminación de las muestras clínicas.

Aunque la bacteria crece bien en ambiente aerobio, se ha comprobado que una concentración de 2,5-4% de CO₂ en la atmósfera de incubación favorece el crecimiento. Estas bacterias son capaces de sobrevivir en el interior de los macrófagos en el tejido pulmonar. En ocasiones se ha considerado la microaspiración de agua contaminada para justificar algunos casos nosocomiales.

Cuando las gotas que contienen la bacteria son de tamaño menor de 5 micras se produce una situación de riesgo de infección, ya que son gotas que pueden penetrar en las vías respiratorias alcanzando los pulmones y además pueden permanecer suspendidas en el aire y ser transportadas a kilómetros de distancia.

Muchos agentes infecciosos que provocan epidemias de neumonía, no se propagan de persona a persona, lo hacen a través del aire a partir de un nicho ecológico característico en un medio ambiente no humano. Un ejemplo común es el hongo *Histoplasma capsulatum*. Vive en el suelo y provoca la enfermedad cuando se inhala el polvillo que él contamina. Parecía, pues, probable desde un principio que *L. pneumophila* se desarrollara en un ambiente inorgánico. Esta hipótesis se confirmó con estudios de laboratorio que mostraban que la bacteria podía sobrevivir (aunque aparentemente sin proliferar) durante más de un año en agua corriente.

Un brote en 1965, localizado en un hospital y diagnosticado retrospectivamente, sugirió que *L. pneumophila* podía vivir en el suelo. El verano de ese año se había excavado el terreno en varios puntos del centro para la instalación de un nuevo sistema de riego del césped. Se pudo observar que eran principalmente los pacientes cuyas camas se hallaban próximas a las ventanas y en los edificios cercanos a la excavación quienes contrajeron la enfermedad. Los casos se presentaban agrupados en el tiempo, apareciendo un brote a los cinco o seis días después de cada excavación, lo que sugería que el polvo contaminado que se levantaba en los trabajos se había diseminado hasta infectar a las enfermos a través del aire.

El agua es el mayor reservorio de legionelas y la bacteria se encuentra ampliamente repartida en el medio ambiente. En agua fresca puede aislarse hasta en un 40% por cultivo y hasta el 80% por PCR.

Esta bacteria, como ya se ha indicado, requiere una combinación determinada de nutrientes (cisteína, sales de hierro, etc), para su crecimiento en el laboratorio; estos requerimientos nutricionales parece estar en contradicción con la amplia distribución de las legionelas en ambientes acuáticos, donde raramente se encuentran estos nutrientes.

Legionella es un huésped natural de protozoos de agua dulce, capaz de producir infección humana como consecuencia de la intervención que el hombre ha hecho en los medios acuáticos, lo que probablemente ha provocado una alteración entre la bacteria y el medio natural. Desde los reservorios naturales (ríos, lagos, fuentes, tierra húmeda, lodos, etc) la bacteria pasa a colonizar los sistemas de abastecimiento de agua. La existencia de agua a una temperatu-

ra adecuada (entre 25°C y 45°C) y la existencia de nutrientes son factores que favorecen la multiplicación.

Ya en 1980 se describió la capacidad de *Legionella* para crecer intracelularmente e infectar algunas especies de amebas. En la actualidad se sabe que esta bacteria sobrevive y se multiplica en muchas especies de protozoos y que esta relación podría jugar un papel importante tanto en la supervivencia como en la epidemiología del microorganismo.

Determinadas instalaciones con inadecuada construcción o mantenimiento deficiente favorecen el estancamiento del agua y la acumulación de lodos y materia orgánica, donde *Legionella* puede sobrevivir en asociación con otros microorganismos (protozoos: *Acanthamoeba* y *Naegleria* y otras 12 especies, dos especies de protozoos ciliados; otras bacterias y algas), formando una superficie sólida/acuosa que se designa biocapa. Algunos estudios indican que las legionellas no pueden multiplicarse en ausencia de protozoos, de manera que estos actuarían como hospedadores naturales de la bacteria.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

El cultivo de la bacteria es la técnica de referencia para el análisis de las muestras de agua.

La Norma Internacional de la *International Organization for Standardization*, ISO 11731:1998(E), describe un método de cultivo para el aislamiento de organismos de *Legionella* y estimación de su número en muestras ambientales. Habitualmente se realiza un procedimiento de concentración de la muestra.

Nuestro Laboratorio está acreditado por el Ministerio de Defensa (BVQI) para la realización de esta técnica según la norma anteriormente citada.

Las fases del método son las siguientes:

- Concentración de cada muestra 100 veces, por centrifugación o filtración (fig. 1).
- Descontaminación mediante tratamiento con calor (50°C durante 30 minutos) o tratamiento ácido (pH 2,2 durante 5 minutos).
- Siembra en medios de cultivo específicos e incubación a 36°C en aerobiosis o en atmósfera de 2-4% CO₂, durante al menos 10 días, revisando los cultivos cada 48 horas (fig. 2).



Fig. 1. Rampa de filtración por vacío.



Fig. 2. Placas de cultivo preparadas para incubación.

- En aquellas colonias sospechosas de pertenecer al género *Legionella* se comprobará su requerimiento de L-cisteína para crecer, y se identificarán en especie y serogrupo mediante reacción serológica con antisueros específicos.
- Se identificarán 5 o 6 colonias por muestra de agua por si existieran varios tipos de *Legionella*.



Fig. 3. Colonias de *Legionella* en medio GVPC.

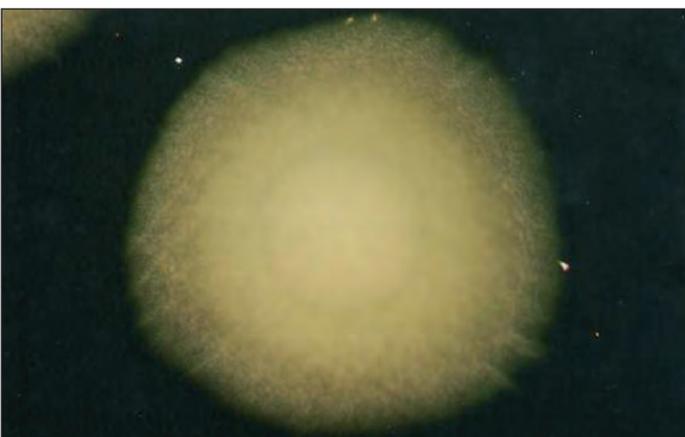


Fig. 4. Colonia de *Legionella*.(6x).

- **Medios de cultivo y procedimiento**
 - Inoculación del medio selectivo con glicina, vancomicina, polimixina B y cicloheximida (GVPC).
 - Inoculación del medio selectivo (GVPC) con 0,1 ml del concentrado.
 - Inoculación del medio selectivo (GVPC) con 0,1 ml del concentrado tratado con calor.
 - Inoculación del medio selectivo (GVPC) con 0,1 ml del concentrado tratado con buffer ácido.
 - Incubación.
 - Examen de las placas
 - Confirmación de presuntas colonias de *Legionella* (figs. 3 y 4).
 - Subcultivo en medio no selectivo de «Buffered Charcoal Yeast Extract agar medium» (BCYE).
 - Subcultivo en medio sin cisteína (BCYE-Cys).
 - *Legionella*, al contrario de la gran mayoría de las bacterias de interés clínico, no crece en medio de agar sangre.

– **Seroaglutinación en látex** (figs. 5 y 6) para discriminación de:

- *Legionella pneumophila* serogrupo 1
- *Legionella pneumophila* serogrupo 2-14
- Otras especies de *Legionella*

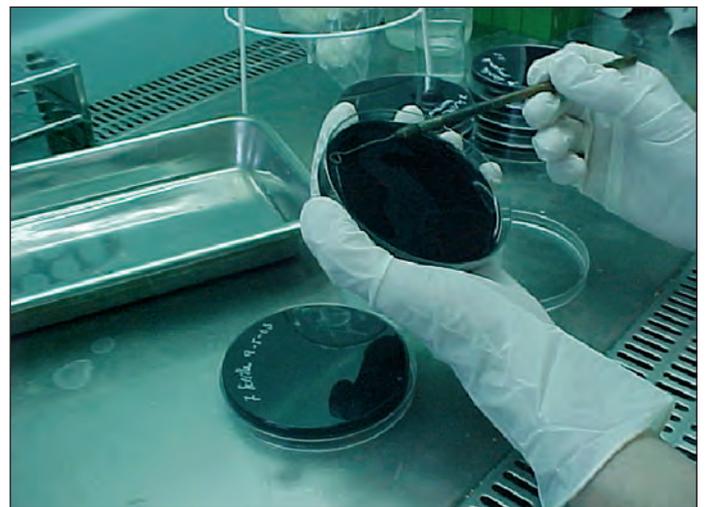


Fig. 5. Selección de colonias.

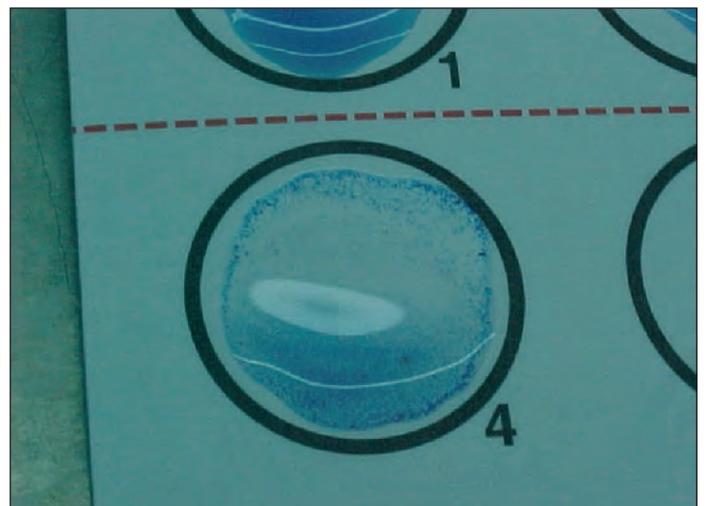


Fig. 6. Seroaglutinación en látex.

– **Obtención y expresión de los resultados:**

Se *obtendrá* el resultado a partir de los siguientes datos:

- Volumen de agua filtrado expresado en ml = Vf
- Volumen del concentrado expresado en ml = Vc
- Volumen del concentrado sembrado en la placa expresado en ml = Vp

• Número de unidades formadoras colonias* de *Legionella* = N

• UFC/L = número de unidades formadoras de colonias por

litro de agua.

$$\bullet \frac{Vc \cdot 1000}{Vp \cdot Vf} \cdot N = \text{UFC/L}$$

• Se *expresará* el resultado de la siguiente manera: «Análisis según Norma ISO 11731: 1998(E)».

• Si no se confirma la existencia de ninguna colonia perteneciente al género *Legionella*: «No se detecta en el volumen de agua analizado»

• Si se confirma la existencia de una o varias colonias pertenecientes al género *Legionella*, se obtiene el número de UFC/L según la fórmula anterior y se realiza una confirmación por aglutinación en látex, discriminando especie y serogrupo en su caso: «(Número) UFC/L de *Legionella* (especie) (serogrupo) en el volumen de agua analizado». Si no se puede confirmar por aglutinación: «(Número) UFC/L de presunta *Legionella* en el volumen de agua analizado».

• La identificación definitiva se realiza en centros especializados con diversas pruebas, entre las que se incluyen la detección de los ácidos grasos y de las quinonas mediante técnicas cromatográficas. La identificación también puede efectuarse por métodos genéticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Evaluación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la determinación de *Legionella* en muestras ambientales. Trabajo monográfico. Servicio de Microbiología. CEMILVETDEF. Dic. 2002.
- ISO 11731. Calidad del agua. Detección y Recuento de *Legionella*. 2001.
- *Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation*. Clinical Microbiology Reviews, July 2002, p. 506-526.
- *Legionella*. El microorganismo. Medicina Clínica. Vol. 119. Suplem. 2-2002, p. 9-13.
- Legionelosis. Investigación y Ciencia. Prensa Científica, S.A. n.º 39 diciembre 1979, p.48-59.
- Legionelosis. Medicina Clínica. Vol. 119. Suplem. 2-2002, p. 1-3.
- M.º de Sanidad y Consumo. Real Decreto 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico- sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. (BOE 171 de 18-07-03).
- Orden Ministerial 87/2004, de 31 de marzo, sobre la inspección de instalaciones para la prevención y control de la legionelosis en el Ministerio de Defensa BOD. 82 de 28-04-04.
- The Gammaproteobacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Volume two. Springer. 2005, p. 212-236.

(*) En la placa de GVPC que presente mayor número de colonias de *Legionella*.