

El laboratorio de microbiología clínica en el brote de *Legionella* spp. en la comarca de Alcoy: rentabilidad de las diferentes técnicas diagnósticas

Pilar López^a, Avelina Chinchilla^a, Mariano Andreu^b, Carmen Pelaz^c y José Sastre^a

^a Unidad de Microbiología. Hospital Virgen de los Lirios. Alcoy. ^b Laboratorio de Serología. Hospital General de Alicante.

^c Laboratorio de *Legionella*. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.

FUNDAMENTO. La rentabilidad de diferentes técnicas de laboratorio en el diagnóstico de *Legionella* spp. en muestras clínicas varía según el contexto epidemiológico. En este trabajo se evalúa la utilidad de los métodos de laboratorio en un brote aparecido en la comarca de Alcoy (Alicante).

MATERIAL Y MÉTODOS. Se estudian 222 casos comunitarios de infección por *Legionella pneumophila* serogrupo I, subtipo Pontiac-Knoxville, genotipos I y II, diagnosticados por el laboratorio de Microbiología, en el periodo comprendido entre enero de 1999 y diciembre del año 2000, correspondientes a pacientes residentes en la comarca de Alcoy (Alicante). Las técnicas empleadas han sido la detección directa de antígeno en muestras respiratorias por inmunofluorescencia, la detección directa de antígeno en orina, el cultivo y la serología.

RESULTADOS. El antígeno en orina permitió diagnosticar 201 casos (90,5%). La inmunofluorescencia directa dio una alta tasa de resultados falsamente positivos (n=24). El cultivo fue esencial para confirmar la etiología del brote (25 cepas de esputos de 22 enfermos). La serología complementó al resto de técnicas y ayudó a diagnosticar retrospectivamente a 21 enfermos (9%) en los que el resto de pruebas no se solicitaron o resultaron negativas.

CONCLUSIONES. El diagnóstico rápido es esencial para la evaluación de los pacientes y para el control de los brotes epidémicos, a lo que ayuda en gran medida la detección de antígeno urinario, pero debe ser complementado por otras técnicas. El cultivo de las muestras respiratorias y posterior tipado de las cepas permite establecer de forma certera la etiología y ayuda a precisar la/s fuente/s de la infección. La serología complementó el diagnóstico en el 9% de casos.

Palabras clave: *Legionella pneumophila*, brote comunitario, técnicas diagnósticas.

The role of the clinical microbiology laboratory during the outbreak of *Legionella* spp., in the municipality of Alcoy: the effectiveness of different diagnosis methods

BACKGROUND. The effectiveness of the different laboratory test methods to diagnose *Legionella* spp. in clinical specimens varies according to the epidemiological context. In this study, the usefulness of the laboratory methods used for an outbreak that occurred in the municipality of Alcoy (Alicante, Spain) are evaluated.

MATERIALS AND METHODS. 222 community-acquired cases of infection caused by *Legionella pneumophila* serogroup 1, subtype Pontiac-Knoxville, genotypes I and II were studied, that had been diagnosed by the Microbiology laboratory from January 1999 to December 2000, corresponding to patients residing in the municipality of Alcoy (Alicante). The methods used were direct antigen detection in respiratory specimens by immunofluorescence, direct antigen detection in urine, cultures and serology.

RESULTS. The detection of the antigen in urine diagnosed 201 cases (90,5%). Direct immunofluorescence provided a high number of false positives (n=24). A culture was essential to confirm the etiology of the outbreak (25 sputum) strains from 22 patients). Serology complemented the other methods and helped to retrospectively diagnose 21 patients (9%) when the other tests were not carried out or when they provided negative results.

CONCLUSIONS. A rapid diagnosis is essential to evaluate the patients and to control epidemical outbreaks, and the detection of the urinary antigen is very useful, but should be complemented with other methods. The culture of the respiratory specimens and the subsequent typing of the strains means that the etiology can be established with certainty and this helps to determine the source(s) of the infection. Serology complemented the diagnosis in 9% of the cases.

Key words: *Legionella pneumophila*, community-acquired outbreak, diagnosis methods.

Introducción

La neumonía por *Legionella* spp. se diagnostica cada vez con mayor frecuencia gracias a las técnicas diagnósticas de las que actualmente disponemos¹. Los métodos

Correspondencia: Dra. P. López García.
Recaredo de los Ríos 37, 3º izqda.
03500 Alicante.
Correo electrónico: lopez_pilgar@teleline.es

Manuscrito recibido el 8-5-2001; aceptado el 19-6-2001.

Enferm Infecc Microbiol Clin 2001; 19: 435-438

tradicionales (inmunofluorescencia directa y cultivo¹ de secreciones respiratorias, así como la serología) dejan por diagnosticar un buen número de casos, y es por ello una etiología tradicionalmente infravalorada, siendo especialmente problemático su diagnóstico en aquellos pacientes con dificultades para la expectoración y en niños de corta edad. Debido a todas estas consideraciones incorporamos a nuestro laboratorio la detección del antígeno de *Legionella* spp. en orina, técnica que nos ha permitido diagnosticar etiológicamente un gran número de casos.

Material y métodos

A partir del mes de septiembre de 1999 aumentó la incidencia de pacientes que acuden a urgencias por cuadros febriles inespecíficos y por neumonía. El servicio de Microbiología registró un aumento de resultados positivos de antígeno de *Legionella* spp. en orina, por lo que de forma multidisciplinaria (Urgencias, Medicina Interna, Neumología y Microbiología) se elaboró un protocolo diagnóstico terapéutico por el que a todo paciente con sintomatología o radiología sospechosa se le solicitan las pruebas diagnósticas oportunas, así como se inicia tratamiento empírico hasta la obtención de los resultados de las pruebas diagnósticas.

La definición de caso confirmado se consideró si cumplía alguno de los siguientes requisitos: a) aislamiento de *Legionella* spp. en la muestras respiratorias, b) antígeno de *Legionella* spp. en orina positivo y c) seroconversión frente a *Legionella* spp.

Antígeno de *Legionella* en orina

A finales del año 1998 y tras la revisión pertinente de la bibliografía disponible¹⁻³, nos planteamos incorporar a nuestra rutina de trabajo la técnica del antígeno de *Legionella* spp. en orina. La técnica se instauró primero mediante la técnica de ELISA (Binax) y posteriormente mediante inmunocromatografía (BINAX-NOW). En todos los casos se procesó la orina hirviéndola durante 5 minutos y centrifugándola a 3.000 rpm durante 15 minutos.

Finalmente se procedió al ultrafiltrado del sobrenadante mediante MINICON (AMICON) concentrando la orina (x25-x50).

Inmunofluorescencia directa

Para la determinación de la inmunofluorescencia directa (IFD) en secreciones respiratorias se utilizó MONOFLUO *Legionella pneumophila* IFA Test (kit Sanofi-Pasteur), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron en su totalidad esputos, en los que no se realizó ningún proceso de criba previa.

Cultivo

Los aislados humanos fueron cultivados en medios BCYE y BCYE con vancomicina y colistina (Beckton-Dickinson) y la identificación se basó en criterios habituales⁴. La mayoría de aislados fueron remitidos al Instituto Carlos III de Majadahonda para serogrupo, subtipado (mediante panel internacional de anticuerpos monoclonales) y genotipado mediante la técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) y PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis*).

Serología

Se remitieron al laboratorio de Serología del Hospital General de Alicante, en donde se estudiaron los sueros mediante enzimoimmunoensayo (EIA) (Vircell, Minilyser). Se consideró como criterio de confirmación la seroconversión.

Incluimos también como positivos a aquellos sueros únicos que además tenían el antígeno en orina positivo.

Resultados

Antígeno en orina

La incidencia estacional de los casos, a lo largo de los años 1999 y 2000, fue como se indica en las figuras 1 y 2.

En 201 enfermos el antígeno resultó positivo. En un enfermo diagnosticado por cultivo de brucelosis, el antígeno resultó positivo, no quedando aclarada la significación de este resultado en el contexto epidemiológico de legionelosis en que se encontraba la comarca. Lo mismo sucedió con otros dos enfermos diagnosticados mediante hemocultivo de neumonía por *Streptococcus pneumoniae*.

Valoramos estos casos como falsos positivos, sin la certeza de su auténtica significación.

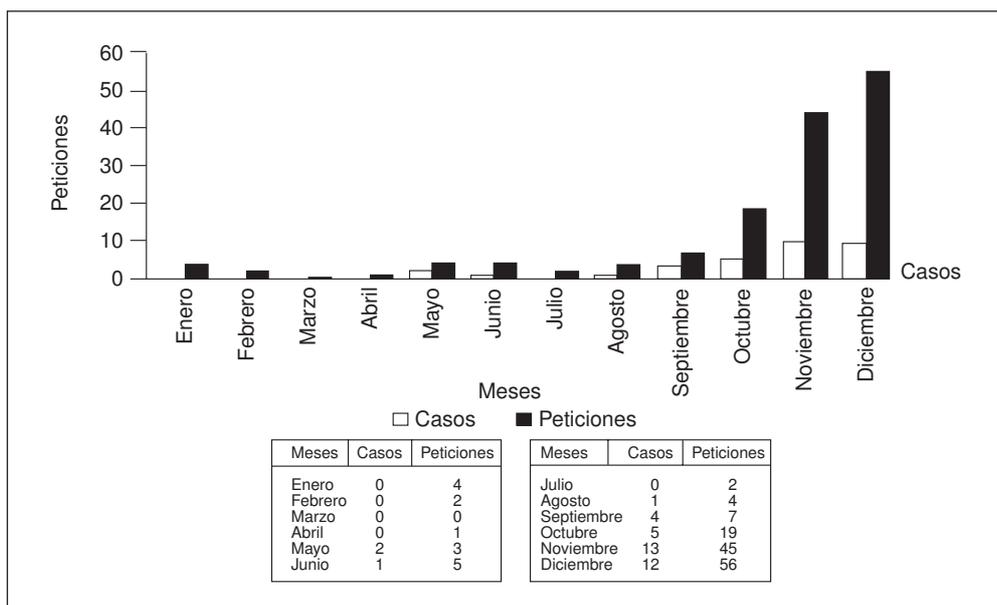


Figura 1. Distribución de los casos de *Legionella* con antígeno positivo en orina durante el año 1999.

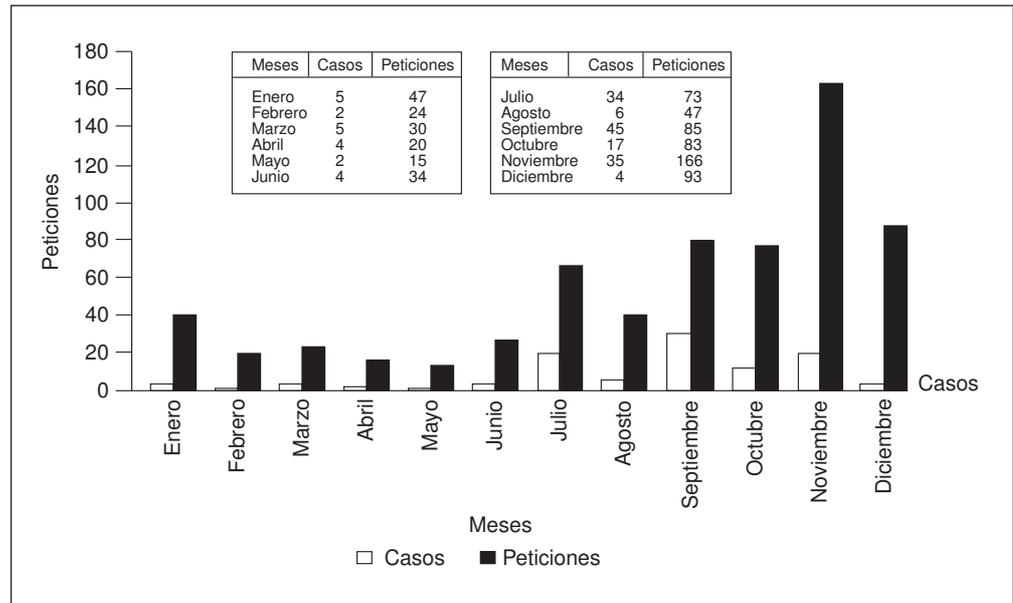


Figura 2. Distribución de los casos de *Legionella* con antígeno positivo en orina durante el año 2000.

Un total de ocho casos fueron considerados como falsos negativos del antígeno. Éstos correspondieron a dos enfermos con cultivo de *Legionella* spp. positivo y antígeno negativo; y seis enfermos en los que se produjo seroconversión, con antígeno negativo.

Desconocemos si en esos casos se trató de auténticos falsos negativos o de precocidad al realizar la técnica.

Como dato significativo concluimos este apartado señalando que si no hubiéramos realizado el antígeno en orina se habrían diagnosticado un máximo de 22 enfermos por cultivo y 65 enfermos por serología; sumando el número de enfermos diagnosticados mediante la conjunción de ambas técnicas hubiéramos obtenido un máximo de 61 enfermos (27,4%). Es decir, en 161 pacientes no se habría precisado el diagnóstico etiológico de su infección respiratoria.

Inmunofluorescencia directa

La inmunofluorescencia resultó positiva en 13 pacientes en los que además el antígeno y/o cultivo también fueron positivos. En cuanto a la rapidez que esta técnica oferta, en la mayoría de los casos el diagnóstico ya se había realizado mediante detección de antígeno en orina, y dada la alta tasa de falsos positivos de la inmunofluorescencia, ante un positivo con antígeno negativo, se dudaba de su especificidad.

Los casos considerados como falsos positivos fueron 24, en los que se descartó el diagnóstico de legionelosis por aislar otro patógeno o por considerar que se trataba de reacciones cruzadas con bacilos gramnegativos no fermentadores que crecieron en el esputo, atribuyéndose los cuadros presentados por estos enfermos a otros diagnósticos.

Cultivo

De los 222 pacientes con diagnóstico confirmado por alguna técnica microbiológica, sólo se remitieron 102 muestras de esputo para cultivo. La mayoría de estas muestras se obtuvieron a las 24-76 horas de iniciado el tratamiento específico. Obtuvimos 25 cultivos positivos, correspondientes a 22 pacientes. Todos los aislados resultaron ser

Legionella pneumophila serogrupo I. De los 22 enfermos diagnosticados por cultivo, 2 presentaron antígeno negativo, y 4 serología positiva, no habiéndose solicitado la serología o siendo ésta negativa en el resto de casos.

Un total de 18 aislados fueron remitidos al centro de referencia (CDR) Instituto Carlos III, para serogrupo, subtipado y genotipado (AFLP)^{5,6}. La identificación mediante panel internacional de anticuerpos monoclonales permitió establecer la identidad del microorganismo: todas las cepas resultaron ser del serogrupo I; todas, excepto una, pertenecían al subgrupo Pontiac - Knoxville. La única cepa no Knoxville correspondía a una paciente que residía a 20 km de Alcoy, excluyéndose este caso del brote. Mediante la tipificación molecular con el método AFLP y PFGE se estableció un patrón genotípico con dos variantes I y II, y dos subvariantes (IIa y IIb), que se agruparon temporalmente de la siguiente forma: hasta octubre de 2000 todas las cepas correspondieron al genotipo I y desde octubre hasta diciembre de 2000 al genotipo II. Ello puede hacernos pensar que el brote se ha podido presentar secuencialmente en forma de dos o más subbrotes que se han ido sucediendo y cuya fuente podría ser diferente.

Serología

De los 222 pacientes diagnosticados por medio de antígeno y/o cultivo, y/o serología, en 65 se produjo seroconversión o título único positivo, diagnosticándose sólo por serología en 21 casos, por no haberse solicitado otras pruebas, o por resultar éstas negativas. De los 222 pacientes diagnosticados por diferentes metodologías, se cursó la petición serológica en 92 pacientes, y en 33 de ellos (35,8%) se cursó un único suero.

La tabla 1 refleja la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de las diferentes técnicas. Comparadas con la bibliografía⁴ la sensibilidad de la inmunofluorescencia directa y del cultivo son menores debido tal vez al escaso número de muestras remitidas y a la mala calidad de estos esputos de enfermos en tratamiento.

Considerado el grupo de cultivos de *Legionella* spp. positivos como prueba de referencia la sensibilidad de la inmunofluorescencia directa fue del 24%, la sensibilidad del antígeno en orina del 88% y la sensibilidad de la serología del 28%.

Discusión

El antígeno en orina influyó decisivamente en la detección del brote⁷. La orina es una muestra de fácil obtención, y el antígeno persiste positivo a pesar del tratamiento. La técnica supera en sensibilidad y especificidad a la inmunofluorescencia y su precio es aceptable en el diagnóstico de una enfermedad con repercusiones graves por falta de diagnóstico y retardo en el inicio del tratamiento. Según estudios recientes, se dispone de pruebas capaces de detectar gran parte de serogrupos de *L. pneumophila* y otras legionellas^{1,8}.

A 20 de las orinas positivas se les realizó además la técnica directamente sobre orina no concentrada, siendo 9 de ellas negativas y 11 positivas. Es decir, si no se hubiera concentrado la orina, el 45% de este grupo de muestras positivas, habrían resultado falsamente negativas.

El problema de discernir entre persistencia de antígeno positivo o reinfección se nos planteó en un enfermo inmunodeprimido. En la bibliografía⁹ se describen casos de reinfección.

Respecto a la inmunofluorescencia cabe reseñar que tan sólo se realizó a 102 pacientes del total de los casos diagnosticados. Fue positiva en 13 enfermos; de éstos en 11 ya se había realizado un diagnóstico precoz mediante el antígeno en orina. El elevado número de falsos positivos (n=24) es a nuestro juicio inaceptable para una técnica cuya filosofía se basa en el diagnóstico rápido y certero de una infección grave y potencialmente fatal, debiéndose tal vez reservar para muestras respiratorias de calidad.

El obtener aislados humanos permitió asegurar la etiología del brote y disponer de cepas para comparar con las posibles fuentes ambientales⁷.

La tasa de serologías negativas podría responder en parte a peticiones únicas, o prematuras y/o a que la enfermedad respiratoria con o sin neumonía puede no producir seroconversión¹⁰. Además, en algún caso, el inicio precoz de la terapia oportuna podría explicar la falta de seroconversión. Por otro lado, en el grupo de pacientes con cultivo positivo, la serología no fue cursada en el 50% de los mismos.

Este brote destaca por su magnitud temporal y numérica.

El estudio microbiológico de las muestras clínicas muestra de forma rápida y concluyente la etiología del brote, lo que permite en un alto porcentaje de casos una evolución favorable.

En muchos de los brotes revisados en la bibliografía el diagnóstico es serológico, con escaso número de aislados. Por ello se debe insistir en la necesidad de realizar el cultivo de muestras respiratorias, que permite además comparar el aislado con las cepas ambientales (en caso de obtenerse éstas) y establecer así la fuente de la infección. Es aconsejable el envío de los aislados a un centro de referencia para su fenotipado y genotipado¹¹.

El antígeno en orina es un método de diagnóstico rápido, sensible y específico, cuyo precio parece razonable. Es aconsejable concentrar la orina para obtener una mayor sensibilidad de la técnica.

Tabla 1. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de las diferentes técnicas (%)

	IDF	Cultivo	Antígeno orina	Serología
S	12,7	24,5	96,0	70
E	92	100	99,5	98
VPP	35	100	98,5	73
VPN	76	82,5	98,8	93

S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; IDF: inmunofluorescencia directa.

La letalidad estimada en los brotes comunitarios es del 5%. El mejorar el rendimiento en cuanto al diagnóstico etiológico ha permitido observar un cambio de patrón epidemiológico al diagnosticarse la enfermedad en mayor proporción que antes en personas más jóvenes sin enfermedad asociada. Todo ello podría explicar la baja tasa de letalidad registrada.

El laboratorio de Microbiología clínica es una herramienta básica para el diagnóstico de la legionelosis y constituye un eslabón clave en la vigilancia activa epidemiológica.

Agradecimiento

Agradecemos especialmente el asesoramiento del Dr. J. A. Domínguez del servicio de Microbiología del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona; al Dr. J.L. Pérez por su opinión crítica. También agradecemos a Doña M. Ángeles Molla el entusiasmo mostrado en las realizaciones de las primeras determinaciones del antígeno en orina. Por último resaltar el enorme esfuerzo y trabajo adicional que este brote ha supuesto para todos los profesionales implicados, especialmente para el personal de Microbiología.

Bibliografía

- Domínguez JA, Galí N, Pedrosa P, Fargas A, Padilla e, Manterola JM, et al. Comparison of the Binax Legionella Urinary Antigen in both Concentrated and Nonconcentrated Urine samples. *J Clin Microbiol* 1998; 36(9): 2.718-2.722.
- Kazandjian D, Rchiew GG. Rapid diagnosis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 infection with the Binax enzyme immunoassay urinary antigen test. *J Clin Microbiol* 1997; 35(4): 954-956.
- Domínguez JA, Matas L, Manterola JM, Blavia R, Sopena N, Belda FJ, et al. Comparison of radioimmunoassay and enzyme immunoassay kits for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6): 1.627-1.629.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology* (7th ed.). American Society for Microbiology 1999; 578-579.
- Pelaz C. Legionellae isolated from clinical and environmental samples in Spain (1983-1990): monoclonal typing of *legionella pneumophila* serogroup I isolates. *Epidemiol Infect* 1992; 108: 397-402.
- Pelaz C, Ibáñez A, Martín Bourgon C. El estudio del brote de Alcalá de Henares como ejemplo del papel de un laboratorio de Referencia. *Boletín nº 10 Instituto de Salud Carlos III. Nov-Dic 96*.
- Wever PC, Yzerman EP, Kuijper EJ, Speelman P, Dankert J. Rapid diagnosis of Legionnaires' disease using an immunochromatographic assay for *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine during an outbreak in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 2000; 38(7): 2.738-2.739.
- Benson RF, Tang PW, Fields BS. Evaluation of the Binax and Biotest urinary antigen kits for detection of legionnaires' disease due to multiple serogroups and species of *Legionella*. *J Clin Microbiol* 2000; 38(7): 2.763-2.765.
- Schindel C, Siepmann U, Han S-R, Ullmann AJ, Mayer E, Fischer T, et al. Persistent *Legionella* Infection in a patient after Bone Marrow Transplantation. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11): 4.294-4.295.
- Mc Whinney PH, Ragunathan PL, Rowbotham TJ. Failure to produce detectable antibodies to *Legionella pneumophila* by an immunocompetent adult. *J Infect* 2000; 41(1): 91-92.
- Pelaz C, Martín-Bourgon C. Characterization of clinical and environmental isolates of *Legionella* associated with outbreaks and study of the infection sources. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993; 11(7): 359-365.