



Original

Baja mortalidad en un brote de enfermedad del legionario: correlación con el estudio de citopatogenicidad

Joaquín Gómez^a, Josep Mòdol^b, Marian García-Núñez^b, Víctor Baños^a, Manuel Lorenzo^c, María Luisa Pedro-Botet^b, Tomás Hernández^d, José Antonio Herrero^a, Joaquín Ruiz^e y Miquel Sabrià^{b,*}

^a Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Virgen de la Arrixaca, Universidad de Murcia, Murcia, España

^b Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

^c Servicio de Neumología, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, España

^d Servicio de Urgencias, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, España

^e Servicio de Microbiología, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 10 de diciembre de 2008

Aceptado el 6 de mayo de 2009

Palabras clave:

Legionella

Neumonía adquirida en la comunidad

Enfermedad del legionario

Prueba de citopatogenicidad

Electroforesis en campo pulsante

RESUMEN

Fundamento y objetivo: En el año 2001 tuvo lugar en Murcia un brote de enfermedad del legionario (EL) con una de las tasas de mortalidad más bajas conocidas. Los objetivos de este estudio fueron describir la presentación clínica y los resultados de los estudios molecular y de virulencia de los aislamientos clínicos de *Legionella* para correlacionar la baja mortalidad de la serie con la virulencia de la cepa.

Pacientes y método: Estudio prospectivo y descriptivo de un brote de EL en un subgrupo de 86 pacientes. Se analizan datos demográficos, factores de riesgo y evolución clínica. Se ha practicado subtipificación molecular mediante electroforesis en campo pulsátil y estudio de citopatogenicidad de los aislamientos clínicos y se han comparado con los de aislamientos procedentes de otros brotes.

Resultados: La edad media fue de 58,2 años, con predominio del sexo masculino (77,9%). El tabaquismo fue el factor de riesgo más frecuente (71,7%). El 70,2% de los pacientes presentaba enfermedades de base. Las manifestaciones clínicas, los datos de laboratorio y la radiología fueron compatibles con un cuadro de neumonía atípica. La mortalidad fue del 3,2%. Todos los aislamientos clínicos de *Legionella pneumophila* mostraron el mismo subtipo molecular. En el estudio de citopatogenicidad, las cepas de *Legionella* procedentes del brote se incluyeron dentro del grupo de menor virulencia.

Conclusiones: En este subgrupo de pacientes predominaron el sexo masculino, el tabaquismo, la presentación clínica compatible con neumonía atípica y la baja mortalidad. La baja virulencia de este genotipo molecular de *L. pneumophila* podría ser causante, en parte, de la baja mortalidad observada en el brote de Murcia.

© 2008 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Low mortality rate in an outbreak of Legionnaires' disease: Correlation with the cytopathogenicity study

ABSTRACT

Background: In 2001 an outbreak of Legionnaires' diseases occurred in Murcia, Spain, with one of the lowest known rates of associated mortality. We describe the clinical data of a subgroup of patients, and present the results from molecular and virulence studies to correlate the lower mortality of the overall series with the strain virulence.

Patients and methods: A subgroup of 86 patients from the outbreak of Legionnaires'disease was prospectively included. Demographic, risk factors and clinical evolution data were obtained. Moreover, we performed a pulsed field gel electrophoresis and cytopathogenicity assay of the Murcia outbreak that were compared with other unrelated *Legionella* isolates.

Results: Sixty-nine (77.9%) patients were males. The mean age of the patients was 58.2 years (range: 32–87). Smoking was the most frequent risk factor in 62 patients (71.7%) and 61 patients (70.2%) had underlying diseases. Clinical, laboratory and radiological manifestations were compatible with the atypical pneumonia syndrome. The mortality rate was 3.2%. All the clinical *L. pneumophila* isolates analyzed by PFGE showed the same subtype. When analyzing these strains together with other *Legionella* strains, they were included in the group with lower virulence in the cytopathogenicity study.

Keywords:

Legionella

Community-acquired pneumonia

Legionnaires' disease

Cytotoxicity assay

PFGE

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: msabria.germanstrias@gencat.cat (M. Sabrià).

Conclusions: The most outstanding data in this subgroup of patients were: male-sex, smoking, atypical clinical manifestations and low mortality. The low virulence of this molecular genotype of *L. pneumophila* may be responsible, in part, for the low mortality observed in the outbreak in Murcia.

© 2008 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Desde que *Legionella* se identificó por primera vez en 1976 en el brote acontecido durante la Convención de la Legión Americana en Filadelfia, EE. UU.¹, el microorganismo se ha implicado como causa común de neumonía adquirida en la comunidad (NAC) y en el ámbito hospitalario. La *Legionella* se considera causante del 2 al 6% de los casos de NAC^{2,3}, pero en estudios recientes y con el uso sistemático de la detección del antígeno de *Legionella* en orina, este porcentaje se eleva hasta el 14%^{4,5}. Esta técnica ha permitido también incrementar el diagnóstico de casos leves de enfermedad del legionario (EL) en los brotes más recientes y, en consecuencia, ha contribuido a ampliar el conocimiento de esta enfermedad⁶. Por este motivo, los factores de riesgo, las manifestaciones clínicas y el pronóstico han variado desde las primeras series publicadas hasta los estudios más recientes. El pronóstico de la EL ha mejorado en los últimos años, con una mortalidad del 4,6 al 11,2% en los últimos brotes descritos⁷. En los pacientes immunocompetentes, ésta se sitúa por debajo del 5%, mientras que en los pacientes inmunodeprimidos alcanza cifras del 25 al 50%⁷⁻⁹. El diagnóstico precoz, la rapidez en la administración del tratamiento y la situación inmunológica previa de los pacientes son las principales variables asociadas al pronóstico. No obstante, se han observado también diferentes grados de virulencia en las cepas de *Legionella*, en las que el subtipo MAB2 es el causante de la mayoría de casos de EL⁷. Las pruebas de citopatogenicidad pueden determinar la capacidad de *Legionella pneumophila* para infectar y crecer en los macrófagos alveolares y permiten distinguir entre cepas virulentas y no virulentas. En un estudio previo se estandarizó una prueba de citopatogenicidad y se demostraron los diferentes grados de virulencia de 22 aislamientos ambientales de *Legionella*¹⁰.

En julio de 2001 tuvo lugar en Murcia un brote explosivo de EL con más de 800 casos sospechosos comunicados, en el que ha sido el mayor brote de legionelosis adquirida en la comunidad comunicado en el mundo, y con una de las tasas de mortalidad más bajas jamás vistas. Diferentes aspectos clínicos y epidemiológicos de este brote se han descrito previamente¹¹.

Un subgrupo de pacientes pertenecientes a este brote atendidos en el Hospital Virgen Arrixaca de Murcia se estudió prospectivamente. Con la hipótesis de que la baja mortalidad del brote de EL podría deberse en parte a una virulencia disminuida de la cepa, se ha procedido al estudio de la citopatogenicidad del subtipo clínico de *Legionella* implicado y se ha comparado con el de cepas procedentes de otros brotes y de estudios ambientales.

Pacientes y método

Pacientes

Entre el 14 de agosto y el 14 de octubre de 2001 consultaron por neumonía 341 pacientes al Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia. En 100 de los casos se diagnosticó EL. Se incluyen en este estudio a los 86 pacientes de los que se pudo completar el seguimiento.

Definiciones y diagnóstico microbiológico

Se definió como caso a toda persona con signos clínicos de neumonía y con al menos un resultado positivo en las siguientes pruebas: a) aislamiento de *Legionella* en muestra respiratoria; b) detección de antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1 en la orina, o c) un incremento de al menos 4 veces en los títulos de anticuerpos hasta 1/128 o superior en las muestras de suero emparejadas.

La detección del antígeno urinario de *L. pneumophila* serogrupo 1 por enzimoinmunoanálisis o inmunoensayo fue positivo en todos los casos. *L. pneumophila* se aisló del espuma de 13 pacientes. Se observó seroconversión entre las 4 y las 6 semanas siguientes en 82 pacientes. Se diagnosticó a algunos pacientes mediante varios métodos.

Variables clínicas estudiadas

Se estudiaron las siguientes variables: a) edad y sexo; b) factores de riesgo: tabaquismo, abuso de alcohol, enfermedades de base como bronquitis crónica, cardiopatía, diabetes mellitus, cirrosis hepática y neoplasia; c) datos clínicos, analíticos y radiológicos en el inicio, y d) tiempo hasta la apirexia, complicaciones y evolución hacia curación, muerte o recurrencia. Los pacientes se valoraron al mes y a los 6 meses de alta hospitalaria.

Cepas bacterianas y subtipificación molecular

Se incluyeron 13 aislamientos clínicos de *L. pneumophila* serogrupo 1 procedentes del brote de Murcia. Se estudiaron también 15 aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1 procedentes de otros brotes y un aislamiento ambiental de *Legionella bozemani* no asociado a ningún brote. La subtipificación molecular se realizó mediante electroforesis en campo pulsátil según descripción previa¹².

Cepas bacterianas y prueba de citopatogenicidad

Se incluyeron 2 aislamientos clínicos de *L. pneumophila* serogrupo 1 correspondientes al brote de Murcia que exhibían el mismo subtipo de ácido desoxirribonucleico (ADN) cromosómico y 3 aislamientos clínicos de *L. pneumophila* serogrupo 1 pertenecientes a diferentes brotes y que exhibían diferentes subtipos de ADN cromosómico.

Para la prueba de citopatogenicidad, los aislamientos de *L. pneumophila* se cultivaron en agar BCYE-α durante 72 h y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI-1640 libre de antibiótico según descripción previa¹⁰.

La citopatogenicidad relativa de las cepas se determinó mediante el índice de efecto citopático (ECP) en un 50%. El ECP₅₀ se definió como el número mínimo de bacterias necesario para producir un ECP en el 50% de las monocapas de células U937 infectadas tras un período de incubación de 72 h.

Grupos de citopatogenicidad

En un estudio previo se analizó la citopatogenicidad de 22 cepas ambientales de *L. pneumophila* y se definieron 5 grupos de

citopatogenicidad (el grupo I fue el de mayor citopatogenicidad y el grupo V el de menor virulencia)¹⁰. Se han incorporado los datos de citopatogenicidad de los aislamientos clínicos del presente estudio en el modelo previamente descrito.

Resultados

Datos clínicos y evolutivos del grupo estudiado

En los 86 pacientes estudiados predominaron los varones (77,9%) y la media de edad fue de 58,2 años (extremos: 32 a 87). Los factores de riesgo más frecuentemente observados fueron el tabaquismo (71,8%) y el alcoholismo (17,6%). Sesenta y un pacientes (70,9%) presentaban enfermedades de base, principalmente cardiovasculares (41,5%), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (25,9%), diabetes mellitus (15,5%) y neoplasias (14,2%).

El tiempo desde el inicio de los síntomas hasta la consulta al hospital fue inferior a 3 días en el 48,2% de los pacientes, de 4 a 7 días en el 50% de los pacientes y superior a 7 días en el 1,8% de los pacientes.

La presentación clínica más habitual incluyó fiebre elevada ($>39^{\circ}\text{C}$) en 59 casos (68,5%), tos no productiva en 41 casos (48%), cefalea en 40 casos (44%), síntomas gastrointestinales en 30 casos (35%) y mialgias en 24 casos (26%). Con respecto a la analítica, cabe destacar un recuento leucocítico normal en 51 casos (62%), una elevación de la velocidad de sedimentación globular ($>50\text{ mm}$) (83,1%), una elevación de la proteína C reactiva ($>10\text{ mg/l}$) (83,1%), una hiponatremia ($<130\text{ mEq/l}$) (55,7%) y una elevación de la aminotransferasa glutámicoxalacética o de la aminotransferasa glutámico pirúvica (44%). La gasometría arterial mostró una presión de oxígeno inferior a 60 mmHg en 39 casos (41,5%). La radiografía de tórax mostró un infiltrado unilateral en 72 casos (84,6%) y bilateral en 14 casos (15,3%).

Los pacientes alcanzaron la apirexia a las 62,6 h. Los controles radiológicos demostraron la desaparición del infiltrado a las 4 semanas en 66 casos (76,7%) y en el resto (23,3%) a las 8 semanas. La prueba de detección de antígeno urinario de *Legionella* fue negativa en todos los casos a los 3 meses.

En la tabla 1 se resume la evolución de los pacientes. Se observaron complicaciones en 10 casos (11,6%). La más frecuente fue la aparición de derrame pleural (8,1%). Dos pacientes precisaron de ventilación mecánica y 3 pacientes con neoplasia diseminada fallecieron (3,4%).

Subtipificación molecular

Todos los aislamientos clínicos analizados procedentes del brote de Murcia mostraron el mismo patrón molecular (fig. 1). Este patrón fue distinto del obtenido en el análisis de las demás cepas clínicas y ambientales procedentes de otros brotes y de la cepa ambiental no asociada a ningún brote.

Tabla 1
Evolución de los pacientes

	n (%)
Tiempo medio hasta apirexia en horas [intervalo]	62,6 [24–408]
Complicaciones clínicas y radiológicas	10 (11,6)
Derrame pleural	7 (8,1)
Atelectasia	1 (1,2)
Ventilación mecánica	2 (2,3)
Mortalidad	3 (3,4)
Recurrencia	2 (2,3)
Estancia hospitalaria en días [intervalo]	6 [2–13]

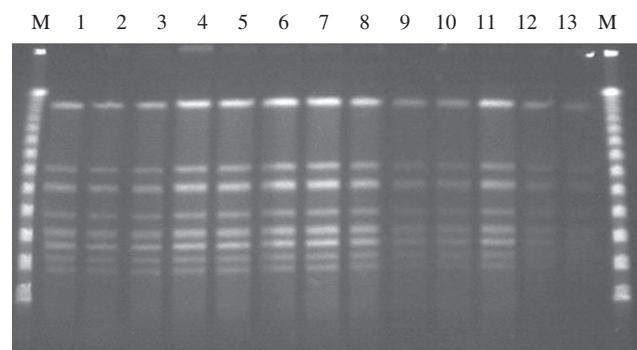


Figura 1. Electroforesis en campo pulsátil de los aislamientos de *Legionella pneumophila*. Líneas 1 a 13: cepas clínicas de 13 pacientes del brote de Murcia. Línea M: marcador de peso molecular fago λ .

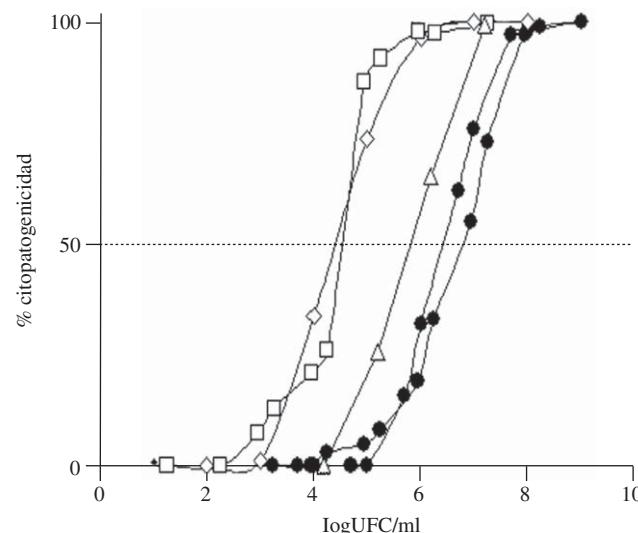


Figura 2. Cinética de citopatogenicidad de los diferentes aislamientos de *Legionella pneumophila*. Puntos negros: aislamientos clínicos procedentes del brote de Murcia. Cuadrados, rombos y triángulos blancos: aislamientos clínicos procedentes de otros brotes. UFC: unidades formadoras de colonias.

Prueba de citopatogenicidad

Los aislamientos clínicos fueron capaces de infectar y crecer intracelularmente en los macrófagos. El ECP₅₀ medio de los aislamientos del brote de Murcia fue de 6,6 log unidades formadoras de colonias (UFC)/ml (intervalo de confianza [IC] del 95%: 4,08 a 9,16) y de los correspondientes a los otros brotes de 4,9 log UFC/ml (IC del 95%: 2,74 a 7,06) (fig. 2).

Al incluir las cepas en el modelo de citopatogenicidad, las del brote de Murcia se hallaron dentro del grupo V, aquéllas con menor citopatogenicidad, y las procedentes de los otros brotes se hallaron dentro de los grupos III y IV (fig. 3).

Discusión

Se presentan los datos clínicos y evolutivos correspondientes a un subgrupo de pacientes de un brote de EL y los datos moleculares y de citopatogenicidad de cepas de *L. pneumophila* aisladas en éstos. Los resultados de este estudio muestran que los pacientes fueron más frecuentemente varones, fumadores y

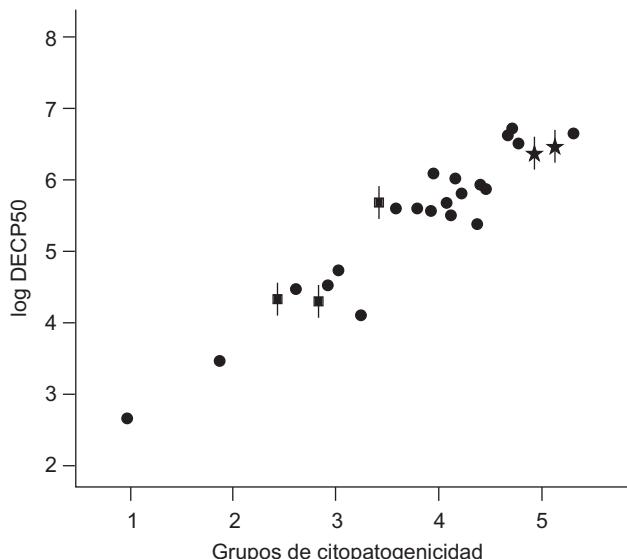


Figura 3. Grupos de citopatogenicidad: las estrellas corresponden a las cepas del brote de Murcia, los cuadrados corresponden a las cepas causantes de otros brotes y los puntos corresponden a aislamientos ambientales de 22 centros hospitalarios¹⁰.

tenían una alta prevalencia de enfermedades subyacentes. Los 13 aislamientos analizados mostraron un único subtipo molecular. El perfil molecular de la cepa de *L. pneumophila* serogrupo 1, que se halló en las torres de refrigeración de un hospital del centro de la ciudad, a pesar de no estar incluido en este estudio, coincidió con el observado en los casos clínicos¹¹. El subtipo de *L. pneumophila* aislado expresó una citopatogenicidad muy disminuida. Estos hallazgos pueden justificar la baja tasa de mortalidad comunicada en el brote de Murcia¹¹ y en este subgrupo de pacientes.

La mortalidad de la EL en España ha experimentado una clara disminución en los últimos años^{13–15}. Si en el año 1993 ésta se situaba en el 35%, en el 2004 ha pasado a ser del 5,6%¹⁵. Además, la mortalidad de la EL en los brotes acostumbra a ser inferior a la de los casos esporádicos, y en España se sitúa alrededor del 5%¹⁵. El brote de EL de Murcia tuvo una mortalidad global todavía menor, y muy inferior a la esperable.

Los pacientes de esta serie presentaban algunas características que en trabajos previos se habían asociado a un mal pronóstico. En más de la mitad de los casos se había retrasado la consulta al hospital 4 o más días. En un estudio anterior se demostró que el retraso hasta la hospitalización y en el inicio de un tratamiento antibiótico adecuado para *Legionella* es el factor más relevante asociado a mortalidad en la EL¹⁶. Estos pacientes presentaban de forma mayoritaria enfermedades de base, esencialmente cardiovasculares, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y diabetes mellitus. Los enfermos con neumonía grave por *Legionella* que presentan enfermedades cardiovasculares tienen un riesgo de fallecer 7 veces superior¹⁷. Además, la mayoría de estos pacientes presentaban hiponatremia intensa. En un estudio prospectivo que incluyó a 84 enfermos con neumonía grave por *Legionella* que requirieron ingreso en unidades de cuidados intensivos, la hiponatremia (<136 mEq/l) junto con una puntuación en la escala APACHE (*acute physiology and chronic health evaluation scoring system* ‘sistema de puntuación para la evaluación de la salud con datos fisiológicos agudos y crónicos’) superior a 15 al ingreso se mostraron como los factores más relevantes asociados a mortalidad¹⁷. Casi la mitad de estos pacientes presentaba insuficiencia respiratoria al ingreso. La insuficiencia respiratoria es un factor independiente asociado a mortalidad en la neumonía por *Legionella* e incrementa 9 veces el riesgo de muerte¹⁸.

La baja mortalidad del brote de EL probablemente se debió a la rápida detección del brote, a la disponibilidad de la determinación del antígeno urinario de *Legionella* y al inicio precoz de tratamiento antibiótico efectivo. Sin embargo, la mortalidad fue menor a la esperada a tenor de las características clínicas antes descritas. Es de destacar que un brote con una mortalidad global inferior al 1%¹¹ muestra un perfil de virulencia muy disminuido en la prueba de citopatogenicidad.

Una de las limitaciones del presente trabajo es que el escaso número de cepas clínicas analizadas en la prueba de citopatogenicidad no ha permitido establecer diferencias significativas. Al confirmarse la existencia de un único perfil molecular, se decidió estudiar la citopatogenicidad de tan sólo 2 aislamientos clínicos.

En los últimos años se han analizado las cepas de *Legionella* atribuidas a diferentes brotes mediante el análisis de citopatogenicidad y se ha diseñado el modelo predictivo que se ha comunicado previamente¹⁰. La cepa de *L. pneumophila* causante del brote de Murcia se incluye dentro del grupo de menor virulencia. Es decir, la citopatogenicidad de la cepa de *Legionella* analizada se correspondió con la evolución clínica de los pacientes del brote.

Probablemente, el interés fundamental del estudio de la citopatogenicidad de *Legionella* está en la valoración del riesgo en situaciones de colonización de sistemas de distribución de agua de hospitales y edificios complejos, pero en otras situaciones, como en la de este trabajo, puede ayudar a comprender la baja mortalidad de un brote de EL.

Bibliografía

- Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, et al. *Legionnaires' disease: Description of an epidemic of pneumonia*. N Engl J Med. 1977;297:1189–97.
- Fang GD, Fine M, Orloff J, Arisumi D, Yu VL, Kapoor W, et al. New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multicenter study of 359 cases. Medicine (Baltimore). 1990;69:307–16.
- Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF. Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. Arch Intern Med. 1994;154:2417–22.
- Sopena N, Sabria M, Pedro-Botet ML, Manterola JM, Matas L, Domínguez J, et al. Prospective study of community-acquired pneumonia of bacterial origin in adults. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999;18:852–8.
- Vergis EN, Indorf A, File TM, Phillips J, Bates J, Tan J, et al. Azithromycin vs Cefuroxime plus erythromycin for empirical treatment of community-acquired pneumonia in hospitalized patients. Arch Intern Med. 2000;160:1294–300.
- Sabria M, Campins M. Legionnaires' disease: Update on epidemiology and management options. Am J Respir Med. 2003;2:235–43.
- Edelstein P, Cianciotto N. *Legionella*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 6.º ed. Nueva York: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 2711–25.
- Fernández JA, López P, Orozco D, Merino J. Clinical study of an outbreak of Legionnaire's disease in Alcoy, Southeastern Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002;21:729–35.
- Pedro-Botet ML, Sabria M, Sopena N, García-Núñez M, Domínguez MJ, Reynaga E, et al. Legionnaires' disease and HIV infection. Chest. 2003;124:543–7.
- García-Núñez M, Pedro-Botet ML, Ragull S, Sopena N, Morera J, Rey-Joly C, et al. Cytopathogenicity and molecular subtyping of *Legionella pneumophila* environmental isolates from 17 hospitals. Epidemiol Infect. 2009;137:188–93.
- García Fulgueira A, Navarro C, Fenoll D, García J, P. González D, Jiménez-Buñuelas T, et al. *Legionella* disease outbreak in Murcia-Spain. Emerging Infect Dis. 2003;9:915–21.
- Sabria M, García-Núñez M, Pedro-Botet ML, Sopena N, Gimeno JM, Reynaga E, et al. Presence and chromosomal subtyping of *Legionella* species in potable water systems in 20 hospitals of Catalonia, Spain. Infect Control Hosp Epidemiol. 2001;22:673–6.
- Olalla PG, Gracia J, Rius C, Cayllà JA, Pañella H, Villabí JR, et al. Brote comunitario de neumonía por *Legionella pneumophila*: importancia del control de las torres de refrigeración en los centros sanitarios. Enferm Infect Microbiol Clin. 2008;26:15–22.
- Jericó C, Nogués X, Santos MJ, Félez M, Garcés JM, Mariñosa M, et al. Brote epidémico de neumonía comunitaria por *Legionella pneumophila* en Barcelona: «el brote de la Barceloneta». Efecto del diagnóstico y tratamiento precoz. Rev Clin Esp. 2004;204:70–4.

15. Domínguez A, Álvarez J, Sabrià M, Carmona G, Torner N, Oviedo M, et al. Factors influencing the case-fatality rate of Legionnaires' disease. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009;13:407–12.
16. Heath CH, Grove DI, Looke DF. Delay in appropriate therapy of *Legionella* pneumonia associated with increase mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996;15:286–90.
17. El Ebiary M, Sarmiento X, Torres A, Nogué S, Mesalles E, Boda M, et al. Prognostic factors of severe *Legionella* pneumonia requiring admisión to ICU. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:1467–72.
18. Benito JR, Montej JM, Cancelo L, Zalacaín R, López R, Fernández J, et al. Neumonía comunitaria por *Legionella pneumophila* serogrupo 1. Estudio de 97 casos. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2003;21:394–400.