



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

Facultad de Ciencias
Programa de Maestría en Microbiología

**Presencia de *Legionella pneumophila* en sistemas
hídricos hospitalarios y su asociación con casos
relacionados en la Atención y el Cuidado de la
Salud. Una revisión durante los últimos 10 años**

Diana Carolina Ortiz Jiménez

Bogotá D.C., Colombia
Abril de 2021

Contenido

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. Objetivos.....	10
2.1 Objetivo General.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3. Materiales y Métodos.....	11
3.1 Estrategia de Búsqueda.....	11
3.2 Selección de Estudios.....	15
3.3 Extracción de Datos.....	15
4. RESULTADOS.....	16
4.1 Aspectos microbiológicos de <i>Legionella pneumophila</i>	16
4.1.1 Factores de Virulencia de <i>L. pneumophila</i>	17
4.1.2 Ciclos de vida de <i>L. pneumophila</i>	25
4.1.3 Biopelículas de <i>L. pneumophila</i>	31
4.2 Pruebas Diagnósticas para <i>Legionella pneumophila</i>	34
4.2.1 Antígeno urinario.....	34
4.2.2 Diagnóstico de <i>L. pneumophila</i> por cultivo.....	35
4.2.3 Diagnóstico de <i>L. pneumophila</i> por pruebas moleculares.....	35
4.2.4 Diagnóstico de <i>L. pneumophila</i> por Antígeno Fluorescente Directo.....	36
4.3 <i>L. pneumophila</i> en sistemas de aguas artificiales.....	37
4.3.1 Transmisión comunitaria:.....	38
4.3.2 Transmisión por sistemas de agua hospitalarios:.....	38
4.4 Enfermedades Asociadas a <i>L. pneumophila</i>	40
4.4.1 Enfermedad del Legionario.....	40
4.4.2 Fiebre de Pontiac.....	41
4.4.3 Brotes Comunitarios causados por <i>L. pneumophila</i>	42
4.4.4 Brotes causados por <i>L. pneumophila</i> en Instituciones Hospitalarias asociados al Cuidado de la Salud.....	43
4.4.5 Presencia de <i>L. pneumophila</i> en Sistemas Hídricos Hospitalarios.....	49
4.5 Normatividad para el control de <i>L. pneumophila</i>	51
4.5.1 Normatividad Internacional para el control de <i>L. pneumophila</i>	51
4.5.2 Normatividad Nacional para el control de <i>L. pneumophila</i> en Sistemas de agua:.....	55
4.6 Estrategias para la prevención de infección por <i>L. pneumophila</i> en hospitales.....	56
5. Conclusiones.....	59

6. Anexos.....	62
6.1 Anexo 1 Diagrama de flujo Prisma	62

Lista de figuras

Figura 1 Ciclo de Vida Intracelular de *L. pneumophila*. Adaptado y tomado de (Swart & Hilbi, 2020). En la figura se ilustra el procedimiento que lleva a cabo *L. pneumophila* en su ciclo de vida intracelular que consiste en los siguientes pasos: 1. Unión de la bacteria a la célula hospedera por medio de receptores específicos; 2. Fagocitosis de la Bacteria a la célula hospedera; 3a. Formación de Vacuola que Contiene Legionella (VCL), al inhibir la vía fagolisosómica por reclutamiento y retención de vesículas marcadas con Lípidos de Fosfoinosítidol; 3b. producción de proteínas efectoras que interactúan con los lípidos de fosfoinosítidol (SidC), quinasas (LepB), fosfatasa (SidP) o fosfolipasas (VipD) para bloquear las quinasas del hospedero; 3c. Remodelación por reclutamiento del retículo endoplásmico (RE) y vesículas del aparato de Golgi con la membrana vacuolar, favoreciendo la replicación dentro de la Vacuola; 4. Paso de la bacteria al citosol de la célula hospedera y salida de esta. 28

Figura 2. Bloqueo de Lípidos de Fosfoinosítidol de la célula hospedera, mediado por proteínas efectoras de *L. pneumophila*. Tomado y Adapto de (Swart & Hilbi, 2020). El Sistema de Secreción Tipo IVB (T4SSB), secreta proteínas efectoras al citosol de la célula hospedera bloqueando las vesículas con Lípidos de Fosfoinosítidol que se encuentran marcando la Vacuola que Contiene Legionella VCL, mediante: 1. Unión directa de efectores a Lípidos de Fosfoinosítidol (SidC, SidM, AnkX, LidA, RidL, SetA, LtpM); 2. Actuando como Lípidos de Fosfoinosítidol de fosfatasa bacterianas (SidF, SidP), Fosfoinosítidol quinasas (LepB, LegA5) o fosfolipasas (VipD, PlcC, LpdA); 3. Reclutando Fosfoinosítidol fosfatasa o quinasas eucariotas. 29

Figura 3 Formación de Biopelículas por *L. pneumophila*. Tomado y Adaptado de (Abdel-Nour et al., 2013). En esta figura se muestran las condiciones específicas que emplea *L. pneumophila* para la formación de Biopelículas 1. *L. pneumophila* se replica dentro de protozoos ambientales. Señales de *Quorum* presentes en el ambiente; así como, la presencia de otras amebas y de otras especies bacterianas, promueve la captación de *L. pneumophila* dentro de hospederos ambientales. 2. La producción y colonización de biopelículas por parte de *L. pneumophila*, se puede presentar después de la replicación dentro de los hospederos protozoarios o independientemente de esta. Señales ambientales hacen que la bacteria cambie metabólicamente y favorezcan la formación de biopelículas. 3. Se reconocen especies bacterianas que juegan un papel antagónico en la formación de biopelículas, por parte de *L. pneumophila* y existen especies bacterianas que se consideran especies permisivas y permiten incorporar al patógeno dentro de las biopelículas. 4. Surfactantes que restringen la entrada a la biopelícula de otras especies de *Legionella*. 5. Cationes divalentes favorecen la colonización de *L. pneumophila* a la biopelícula; nanopartículas dificultan la colonización de *L. pneumophila* a la biopelícula. 33

Lista de tablas

Tabla 1. Resultados de Búsqueda en bases de datos de 2010 a 2021	14
Tabla 2 Principales Factores de Virulencia <i>L. pneumophila</i> y su función	19
Tabla 3 Porcentaje de Sensibilidad y Especificidad de Métodos diagnósticos para <i>L. pneumophila</i>	36
Tabla 4. Brotes Asociados a la Atención y al Cuidado de la Salud	45
Tabla 5 Presencia de <i>L. pneumophila</i> en Instituciones hospitalarias.....	49
Tabla 6 Principales Documentos presentados por la OMS para Información, Orientación, Evaluación y Gestión del Riesgo sobre <i>Legionella</i>	52

1. INTRODUCCIÓN

El primer brote de neumonía causada por *Legionella* se presentó en 1976, durante la convención de la legión americana en Filadelfia, Pensilvania en el hotel Bellevue Stratford; entre los 4.000 asistentes, se presentaron 221 casos y 34 de estos fueron mortales, en ese momento no se conocía el agente y solo se sospechó la propagación de la bacteria por aire (Fraser et al., 1977). Desde entonces se han reportado 164 brotes, con 6877 casos, 358 fallecidos y 24 países involucrados (Legionella DB).

Dentro de los casos reportados, se resalta la Legionelosis nosocomial, siendo un tema de preocupación mundial, ya que en varios países los episodios presentados se han asociado con la atención médica y con la presencia de la bacteria en sistemas de distribución de agua caliente en Instituciones hospitalarias, encontrando colonización en un 90% por parte del patógeno (Barna et al., 2015); además, se considera que la presencia de la bacteria en los ductos de agua es un factor de riesgo importante para adquirir un tipo de neumonía grave, que genera una morbilidad significativa y una tasa de mortalidad del 8 al 12% (Cargnelli et al., 2016). Estos datos plantean la necesidad de adoptar medidas de control ambiental que prevengan la aparición de la bacteria y contribuyan al control de infecciones en instituciones hospitalarias; sin embargo, en Colombia existen pocos estudios de la incidencia del patógeno en sistemas hídricos, donde es importante relacionarlo como fuente de Enfermedad Asociada a la Atención y al Cuidado de la Salud

Expuestas las razones anteriores, el objetivo de este trabajo es realizar una búsqueda bibliográfica de la presencia de *Legionella pneumophila* en sistemas hídricos hospitalarios y su asociación con casos relacionados en la atención y el cuidado de la salud durante los últimos 10 años, para comprender el comportamiento del microorganismo a nivel hospitalario y conocer las medidas de contención realizadas que evitan las infecciones intrahospitalarias por parte del patógeno.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Establecer la importancia de *Legionella pneumophila* en sistemas hídricos hospitalarios, su asociación con casos relacionados en la atención y el cuidado de la salud; así como las medidas de contención realizadas para evitar el desarrollo del patógeno en estas instalaciones, durante los años 2010 y 2021, mediante una revisión bibliográfica para contribuir en el conocimiento del control de infecciones a nivel hospitalario.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Examinar la presencia de *Legionella pneumophila* en artículos científicos publicados durante los años 2010 y 2021, en sistemas hídricos hospitalarios.
- 2- Identificar en bases de datos, publicaciones relacionadas con casos de infecciones intrahospitalarias por *Legionella pneumophila*.
- 3- Enunciar las medidas de control realizadas en entidades hospitalarias para contener la presencia de *Legionella pneumophila* causante de infecciones nosocomiales

3. Materiales y Métodos

3.1 Estrategia de Búsqueda

El proceso de búsqueda de información se realizó utilizando varias bases de datos electrónicas y selección de artículos, así como páginas webs de organizaciones de control de enfermedades.

Dentro de las fuentes de información se incluyen, páginas webs de Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Organización Mundial de la Salud (OMS) y LegionellaDB.

Se ha incluido en la revisión publicaciones entre 2010 y 2021, referentes a brotes asociados con la Atención y el Cuidado de la Salud en Instituciones hospitalarias, así como, la presencia de la bacteria en Sistemas de Suministro de agua de Entidades hospitalarias; sin embargo, se revisaron estudios anteriores para complementar información del patógeno.

Las bases de datos consultadas son:

- PubMed
- Elsevier
- ProQuest
- Ebsco
- Google académico
- Lilacs

Se utilizó el operador AND, para relacionar conceptos en inglés y español. En español se empleó el descriptor Decs (Descriptores de la Ciencia de la Salud) para encontrar las palabras claves de este trabajo en español.

Las palabras claves empleadas son: *Legionella pneumophila*, brotes de enfermedades, sistemas de agua, Enfermedad del Legionario, patogénesis y epidemiología.

Los descriptores obtenidos en inglés mediante el descriptor MeSH son los siguientes: *Legionella pneumophila*, legionellosis, disease outbreaks, water supply, Delivery of health care, standards therapeutics.

- En **PubMed**: con la palabra clave *Legionella pneumophila* y estableciendo un período de tiempo entre el año 2010 y la actualidad, se obtuvieron un total de 1.725 artículos, con la palabra legionellosis 544, con *Legionella pneumophila* AND Disease Outbreaks 125, con *Legionella pneumophila* AND water supply 136, *Legionella pneumophila* AND Delivery of health care 7 resultados, *Legionella pneumophila* AND epidemiology 31 artículos, *Legionella pneumophila* AND standards 33 artículos, *legionella* AND guideline 3 artículos.
- En **Elsevier (ScienceDirect)** con la palabra clave *Legionella pneumophila* y condicionando la búsqueda desde el año 2010 hasta la fecha, se encontraron 2.998 resultados, con la palabra Legionellosis se encontraron 566 artículos.
- En **ProQuest**: con la palabra *Legionella pneumophila* y restringiendo la búsqueda a los últimos 10 años, se encontraron 2.945 resultados, con la palabra Legionellosis durante los últimos 10 años 582 resultados, con *Legionella pneumophila* AND Disease Outbreaks 779 artículos, con *Legionella pneumophila* AND water supply 479, con *Legionella pneumophila* AND epidemiology 944.
- En **Ebsco**: con la palabra *Legionella pneumophila* y seleccionando la búsqueda en los últimos 10 años, se encontraron 2.885 artículos, con la palabra Legionellosis durante los últimos 10 años se encontraron 1.930 artículos, con *Legionella pneumophila* AND Disease Outbreaks 332, con *Legionella pneumophila* AND water supply 244, con *Legionella pneumophila* AND epidemiology 463, *Legionella pneumophila* AND standards 199.
- En **Google Académico**: con la palabra *Legionella pneumophila* y condicionando la búsqueda a los últimos 10 años, se encontraron 21.400 artículos, con la palabra Legionellosis 8.900 resultados, con *Legionella pneumophila* AND patogénesis 14.100 artículos, con *Legionella pneumophila* AND pathogenesis 17.300 artículos, con *Legionella pneumophila* AND epidemiología 1.300 artículos, *Legionella pneumophila* AND epidemiology 12.700 referencias, con *Legionella pneumophila* AND therapeutics 17.800 artículos, con *Legionella pneumophila* AND prevención 3.060 artículos, con *Legionella pneumophila* AND prevention 28.400 artículos, con el término *Legionella pneumophila* AND personal de la salud 1.540

artículos, con *Legionella pneumophila* AND terapéutica 5.130 artículos, con el término *Legionella pneumophila* AND water 40.900 referencias, *Legionella pneumophila* AND agua, 3.220 artículos, con *Legionella pneumophila* AND disease outbreaks 21.600 artículos, con *Legionella pneumophila* AND brotes de enfermedades 1.520 artículos, con *Legionella pneumophila* AND health legislation 2.200 artículos, con *Legionella pneumophila* AND legislación sanitaria 635 artículos.

- En **Lilacs**: con la palabra *Legionella pneumophila* y seleccionando la búsqueda para los últimos 10 años, se encontraron 31 referencias, con legionelosis 31 artículos, con legionelosis 32 artículos, con *Legionella pneumophila* AND epidemiology 24 referencias, *Legionella pneumophila* AND prevention 7 artículos, *Legionella pneumophila* AND pathogenesis 20 artículos, con *Legionella pneumophila* AND water 19 artículos, *Legionella pneumophila* AND therapeutics 1 artículos, *Legionella pneumophila* AND disease outbreaks 20 artículos, con *Legionella pneumophila* AND brotes de enfermedades 11 artículos.

En la tabla 1, se resumen los datos informados anteriormente:

Tabla 1. Resultados de Búsqueda en bases de datos de 2010 a 2021

Bases de Datos	PubMed	Elsevier	ProQuest	Ebsco	Google académico	Lilacs	TOTAL
Término							
<i>Legionella pneumophila</i>	1.725	2.998	2.945	2.885	21.400	47	32.000
<i>Legionellosis</i>	544	566	582	1.930	8.900	31	12.553
<i>Legionelosis</i>	-	-	-	-	-	32	32
<i>Legionella pneumophila</i> AND Disease Outbreaks	125	-	779	332	21.600	20	22.856
<i>Legionella pneumophila</i> AND water supply	136	-	479	244	-	-	859
<i>Legionella pneumophila</i> AND Delivery health care	7	-	-	-	-	-	7
<i>Legionella pneumophila</i> AND epidemiology	31	-	944	463	12.700	24	14.162
<i>Legionella pneumophila</i> AND standars	33	-	-	199	-	-	232
<i>Legionella pneumophila</i> AND guideline	3	-	-	-	-	-	3
<i>Legionella pneumophila</i> AND patogenesis	-	-	-	-	14.100	20	14.120
<i>Legionella pneumophila</i> AND pathogenesis	-	-	-	-	17.300	20	17320
<i>Legionella pneumophila</i> AND epidemiología	-	-	-	-	1.300	-	1.300
<i>Legionella pneumophila</i> AND therapeutics	-	-	-	-	17.800	1	17.801
<i>Legionella pneumophila</i> AND prevención	-	-	-	-	3.060	-	3060
<i>Legionella pneumophila</i> AND prevention	-	-	-	-	28.400	-	28.400
<i>Legionella pneumophila</i> AND brotes de enfermedades	-	-	-	-	1.520	11	1.531
<i>Legionella pneumophila</i> AND agua	-	-	-	-	40.900	-	40.900
<i>Legionella pneumophila</i> AND water					3.220	19	3.239

3.2 Selección de Estudios

Para el desarrollo de este trabajo, se seleccionaron estudios en inglés y español, que hayan sido publicados en revistas médicas y científicas de calidad contrastada y rigor científico.

3.3 Extracción de Datos

De todos los artículos revisados, se seleccionaron aquellos que cumplieran con los criterios de inclusión definidos, es decir, los que aparecían con el texto completo publicados entre el año 2010 y 2021 y que contenían información sobre brotes, agua y legislación sanitaria. Por el contrario, se excluyeron los artículos que no estaban completos y que no concordaban con los términos comentados anteriormente. Por medio del Diagrama de Flujo Prisma se resumen los resultados finales. (Anexo 1)

4. RESULTADOS

4.1 Aspectos microbiológicos de *Legionella pneumophila*

Legionella pneumophila (*L. pneumophila*), es una bacteria aerobia estricta, morfológicamente se observa como bacilos gram negativos, se desarrolla en un rango de temperatura comprendida entre 20°C y 42°C (Kooij et al., 2016), pero clínicamente tiene una temperatura óptima de crecimiento de 35°C (Manske & Hilbi, 2014), es inactiva a temperatura por debajo de 20°C y no puede sobrevivir en agua con temperaturas superiores a 60°C (Springston & Yocavitch, 2017). Es catalasa positiva, ureasa negativa, heterotrófica, quimiorganotrófica y móviles en algunos estadios de su ciclo de vida, cuando son móviles presentan uno o dos flagelos polares. Esta bacteria utiliza carbono y aminoácidos, como cisteína, arginina, isoleucina, leucina, treonina, valina y metionina (Manske & Hilbi, 2014) para obtener energía, no oxidan ni fermentan carbohidratos, requieren L-cisteína, HCL y sales de hierro para su crecimiento, (Coetzee et al., 2012). Es importante resaltar que el hierro es esencial para el crecimiento bacteriano, debido a que es un cofactor de enzimas del metabolismo central, siendo un nutriente esencial para *L. pneumophila* (Manske & Hilbi, 2014).

L. pneumophila pertenece a la familia *Legionellaceae*, los estudios taxonómicos han demostrado que la familia *Legionellaceae*, incluida dentro de la clase Gamma proteobacterias, se compone de cuatro géneros: *Legionella*, *Fluoribacter*, *Tatlockia* y *Sarcobium*. El primero incluye más de 50 especies y más de 70 serogrupos. Actualmente se conocen más de 60 especies y *L. pneumophila* comprende 16 serogrupos diferentes. Las principales especies del género *Legionella* son: *Legionella adelaidensis*, *Legionella brunensis*, *Legionella bozemanii*, *Legionella feeleeii*, *Legionella dumoffii*, *Legionella wadsworthii*, *Legionella anisa*, *Legionella longbeachae*, *Legionella micdadei*, *Legionella pneumophila* Serogrupo 1 al 16, *Legionella pneumophila* Subsp. Fraseri, *Legionella pneumophila* Subsp. Pascullei, *Legionella pneumophila* Subsp. *Pneumophila* (ncbi, n.d.).

Se reconoce a *L. pneumophila* como la causa más común de legionelosis a nivel mundial, aproximadamente el 70% de infecciones por *Legionella* están causadas por *L. pneumophila* serogrupo 1, el 20-30% por otros serogrupos (principalmente el 6) y el 5-10% por otras especies de *Legionella* distintas de *L. pneumophila*, de las cuales las más frecuentemente implicadas en infecciones son *L. micdadei* (60%), *L. bozemanii* (15%), *L. dumoffii* (10%) y *L. longbeachae* (5%) (N. et al., 2019). En Europa, durante los años 2008 a 2017 se presentaron un total de 4884 casos de legionelosis, de los cuales 4738 (97%) fueron causados por *L. pneumophila*, 48 casos (1%) por *L. longbeachae* y 17 casos (0.3%) por *L. bozemanii*. En

Estados Unidos durante 2016 y 2017, hubo 382 casos de legionelosis, de los cuales 230 (60%) fueron por *L. pneumophila*, 7 casos (1,8%) por *L. micdadei* y 139 casos (36%) de origen desconocido. Este comportamiento es similar en Japón y en Australia donde *L. pneumophila* se reportó como causante de la enfermedad en un 98% y 46% respectivamente; mientras que en Nueva Zelanda entre 2010 y 2019 se presentaron 1684 casos de legionelosis y en 902 casos (54%) se reportó a *L. longbeachae*, pasando a un segundo lugar los casos de la enfermedad causados por *L. pneumophila*, 314 casos (19%) (Chambers et al., 2021).

L. pneumophila es un microorganismo ubicuo, se encuentra naturalmente en medios acuáticos como arroyos, ríos, estanques, lagos y piscinas termales; así mismo, está presente en suelo húmedo y lodo. Tiene la capacidad de sobrevivir durante largos períodos en ambientes húmedos, soporta un rango de pH de 5.0 a 8.5 (Borella et al., 2005) y resiste a la cloración, por esta razón al ingresar a los suministros de agua artificial puede proliferar en ambientes térmicos como torres de enfriamiento de aire acondicionado, sistemas térmicos de agua caliente, duchas, grifos, spas de hidromasajes, respiradores y ventiladores mecánicos, entre otros (Burillo et al., 2017).

L. pneumophila permanece en el medio ambiente como bacterias planctónicas de vida libre o formando parte de biopelículas monoespecies o en asociación con otras bacterias, amebas y ciliados, sobre superficies de los sistemas de agua en los que sobrevive y persiste al evadir los efectos de biocidas y la acción del cloro (Abu Khweek & Amer, 2018).

4.1.1 Factores de Virulencia de *L. pneumophila*.

L. pneumophila posee diferentes factores de virulencia para sobrevivir en el ambiente, invadir potenciales hospederos, incluidos los macrófagos alveolares, y replicarse dentro de ellos, a continuación, en la tabla 1 se presentan los principales factores, resaltando su función en los diferentes procesos.

Tabla 2 Principales Factores de Virulencia *L. pneumophila* y su función

PAPEL RELACIONADO	FACTOR DE VIRULENCIA	GEN INVOLUCRADO	FUNCIÓN	REFERENCIAS
Determinantes de la Envoltura Celular	Vesículas de Membrana Externa	<i>tol-pal</i>	Es un sistema de secreción de la bacteria que transportan proteínas, adhesinas, toxinas, enzimas y LPS de la bacteria. Las vesículas son reconocidas y absorbidas por las células eucariotas, al administrar factores patógenos facilitan la adherencia e invasión de <i>Legionella</i> .	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (AU - Jung et al., 2017) (Jäger et al., 2015)
	Lipopolisacárido	<i>Locus LPS</i>	<p>Induce la secreción de citocinas proinflamatorias de células monocíticas humanas.</p> <p>Está conformado por la cadena específica de antígeno O, la región central y el componente de lípido A. El antígeno O permite la clasificación de serogrupo específico de <i>L. pneumophila</i>. La cadena O y el núcleo constituyen la región de polisacárido del LPS, mientras que el lípido A representa la parte de la molécula que ancla el LPS en la membrana externa.</p> <p>La estructura química de LPS se diferencia de las otras bacterias gram negativas en que su Lípido A, está formado por ácidos grasos ramificados y de cadena larga estructurales. Esta es la razón para la débil actividad endotóxica de la molécula asociada a la baja afinidad por el receptor CD14 en macrófagos. El lípido A es muy hidrófobo y presenta una cadena específica de antígeno O, que consiste en ácido legionamínico homopolimérico.</p> <p>El LPS tiene la utilidad adicional de ser empleado como componente del antígeno urinario detectado en las pruebas de diagnóstico.</p>	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (Shevchuk et al., 2011) (Cianciotto, 2001). (Shevchuk et al., 2011). (Lück & Helbig, 2013) (Kowalczyk et al., 2021)
	Lipoproteína Asociada a Peptidoglicano (PAL)	<i>pplA</i> y <i>pplB</i>	Activar macrófagos a través de un mecanismo dependiente de TLR2 que induce la producción de citocinas y la expresión de moléculas coestimuladoras y CMH I/II.	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015)

	, fosfolipasa A/Lisofosfolipasa A	<i>plaB</i>	Promueve la replicación de <i>L. pneumophila</i> en los pulmones y diseminación a bazo. Forma parte de una subfamilia de enzimas lipolíticas que utiliza una tríada catalítica de Ser-85, Asp-203 e His-251 para la hidrólisis eficaz de sustratos de fosfolípidos.	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (Kuhle et al., 2014)
	Mip, potenciador infectividad a macrófagos	<i>mip</i>	Es una proteína de 24 KDa expuesta en la superficie, tiene actividad de propil-prolina-isomerasa. Este grupo de proteínas constituyen una superfamilia de proteínas que se divide en tres clases estructurales: Ciclofilinas, Parvulinas y proteínas de unión a FK506; todos los miembros de esta super familia tienen la capacidad de convertir enlaces peptidil-propilo de <i>cis</i> a <i>trans</i> o viceversa. Mip asociada a la superficie facilita el establecimiento del ciclo de infección intracelular al unirse a través de su dominio PPIasa al colágeno IV en la matriz extracelular y, por lo tanto, contribuye a la transmigración de las bacterias a través de una barrera formada por células epiteliales.	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (Moosavian et al., 2019) (Rasch et al., 2019)
Unión y Entrada de <i>L. pneumophila</i> en la célula hospedadora	EnhC, entrada mejorada	<i>enhC</i>	Conserva la integridad de la pared celular, favoreciendo el crecimiento intracelular de <i>L. pneumophila</i> al regular la degradación del peptidoglicano para controlar la producción de ligandos por receptores de reconocimientos de patrones y evadir el reconocimiento inmune innato.	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (M. Liu et al., 2012)(Y. Liu et al., 2017)
	Lcl, proteína similar al colágeno	<i>lpg</i>	Una adhesina que desempeñar un papel doble en el ciclo de vida de <i>L. pneumophila</i> , mediante la promoción de condiciones en las que las bacterias pueden agregarse y también infectar amebas, aumentando la capacidad para replicarse y diseminarse en el medio ambiente. Participa tanto en la producción de biopelículas como en la adherencia a las células humanas. Optimiza la invasión y expresión de citocinas y el reclutamiento de mitocondrias a VCL recién conformada.	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (Abdel-Nour et al., 2014)
	Hsp60		Favorece la fagocitosis de <i>L. pneumophila</i> , esta proteína mejora la invasión de células epiteliales y produce expresión de citocina provenientes de los macrófagos.	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015)

	MOMP, principal proteína de la membrana externa	<i>ompS</i>	Tiene función de porina y actúa como receptor del sistema inmune innato del complemento mejorando la fagocitosis por las células monocíticas humanas. Permite la adherencia y replicación intracelular, favorece la formación de biopelículas, hace transferencia de genes.	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (Shevchuk et al., 2011)
	Pili tipo IV	<i>pilB-E, pilM-Q</i>	Ayuda a la entrada de <i>L. pneumophila</i> en macrófagos, interviene en el tráfico de la vacuola de <i>L. pneumophila</i>	(Dietrich et al., 2001; Zhan & Chao-Hui Hu, 2015)
	LpnE	<i>lpnE</i>	Es una proteína que contienen repeticiones de tetratricopéptido. La repetición es un motivo de ~34 residuos de aminoácidos asociados con interacciones proteína-proteína en eucariotas y procariotas, favoreciendo la unión de <i>L. pneumophila</i> a las células que invade	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (Bandyopadhyay et al., 2012)
	RtxA, repeticiones en toxina estructural	<i>rtxA</i>	Pertenece a un subconjunto de Sistema de Secreción T1, proteína de fusión de membrana asociada con la adherencia, la formación de poros, la citotoxicidad y la entrada en las células huésped. Participa en la supervivencia y el tráfico intracelular.	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (C. L. Brown et al., 2020)
	LadC	<i>ladC</i>	Una adenilato ciclasa Adherencia a macrófagos, replicación intracelular, modificación putativa de funciones proteicas a través de cAMP	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015)
Sistema de Secreción IV (T4SS), Se han definido tres clases principales de este Sistema T4SS, que corresponden a: T4SSA, T4SSB y T4SS asociado a	RavK	<i>dot/icm</i> tipo IVB	Se ubica en el citoesqueleto de la célula hospedera y reduce la abundancia de filamentos de actina en el ciclo de vida intracelular de este patógeno.	(Y. Liu et al., 2017) (Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (Misch, 2016)
	GTPasas de la familia Rab	<i>dot/icm</i> tipo IVB	Grupo de proteínas involucradas en la maduración del fagosoma y unión de proteínas Rab específicas a los organelos intracelulares.	(Mondino et al., 2020)

<p>islas genómicas (T4SS-GI), de estos tres el más importante es el T4SSB</p>	<p>24 genes agrupados en dos regiones del cromosoma están involucrados en el Sistema Dot/Icm, este sistema participa en la entrada y salida de bacterias a la célula hospedera, evita la apoptosis de la célula hospedera y es indispensable para la replicación intracelular.</p> <p>Este Sistema de Secreción T4SS está ubicado en la superficie de la bacteria y está compuesto por un núcleo estructural, conformado por cinco proteínas: tres de ellas se encuentran asociadas a la membrana externa, estas son: DotC, DotD y DotH y dos proteínas de la membrana interna, las cuales son: DotF y DotG, el complejo central es bioquímicamente estable y su función es servir como conducto de transporte, que abarca las membranas bacterianas internas y externas.</p>		<p>(Hubber & Roy, 2010) (Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (Arslan-Aydoğdu & Kimiran, 2018) (Kubori & Nagai, 2019)</p>	
<p>Sistema de Secreción Tipo II (T2SS)</p>	<p>Está implicado en la virulencia y en la adquisición de alimentos del microorganismo, favorece el movimiento superficial de la bacteria, transporta y libera toxinas y proteasas. De esta manera promueve la infección intracelular de las células epiteliales pulmonares, amortigua la secreción de citocinas de los macrófagos y de epitelios infectados.</p> <p>Está conformado por más de 25 proteínas, entre las que se incluyen varias enzimas fosfolipasas A y C, proteasas, una ribonucleasa (RNasa), actividades de fosfatasa ácida, alcalina y una quitinasa., demostrando que este sistema</p>		<p>(Arslan-Aydoğdu & Kimiran, 2018; Hilbi et al., 2010) (Arslan-Aydoğdu & Kimiran, 2018; Hilbi et al., 2010; Zhan & Chao-Hui Hu, 2015)</p>	
<p>Inhibición de la Acidificación de VCL</p>	<p>SidK</p>		<p>Se une a la subunidad reguladora de la ATPasa vacuolar de la célula hospedera, inhibiendo la hidrólisis de ATP y la traslocación de protones</p>	<p>(Mondino et al., 2020)</p>
	<p>WipB</p>		<p>Es una fosfatasa dirigida a los lisosomas, que se localiza en compartimentos lisosomales positivos, interactuando con la ATPasa vacuolar de la célula hospedera y reprimiendo su actividad.</p>	<p>(Mondino et al., 2020)</p>
<p>Interacción con el Retículo Endoplásmico y formación de VCL</p>	<p>Arf1, Sar1, Rab1</p>		<p>Regulan los procesos de transporte vesicular y de membrana del hospedero, reclutando vesículas derivadas del Retículo Endoplásmico a la membrana de la VCL</p>	<p>(Mondino et al., 2020)</p>
	<p>RalF</p>		<p>Factor de Intercambio de nucleótidos de guanina que activa y recluta Arf1 a la membrana de VCL</p>	<p>(Mondino et al., 2020)</p>
	<p>SidM (DrrA)</p>		<p>Estimula la fusión de membranas del Retículo Endoplásmico con la VCL. También media la activación de Rab1, otra proteína efectora que lleva a cabo reclutamiento de vesículas.</p>	<p>(Mondino et al., 2020) (Arasaki et al., 2018)</p>
	<p>LseA</p>		<p>Media fusión de membranas asociadas al Aparato de Golgi</p>	<p>(Mondino et al., 2020)</p>
	<p>Ceg9</p>	<p><i>lpg0246</i></p>	<p>Tráfico de Vesículas</p>	<p>(Hubber & Roy, 2010)</p>

Intervención de Vesículas	VipA	<i>lpg0390</i>	Tráfico de Vesículas	(Hubber & Roy, 2010)
	AnkX/AnkN/LegA8	<i>lpg0695</i>	Tráfico de Vesículas	(Hubber & Roy, 2010)
	Ceg19	<i>lpg1121</i>	Tráfico de Vesículas	(Hubber & Roy, 2010)
	LegC3	<i>lpg1701</i>	Tráfico de Vesículas	(Hubber & Roy, 2010)
	YlfB/LegC2	<i>lpg1884</i>	Tráfico de Vesículas	(Hubber & Roy, 2010)
	SetA	<i>lpg1978</i>	Tráfico de Vesículas	(Hubber & Roy, 2010)
	MavE	<i>mavE</i>	Indispensable para la biogénesis del fagosoma y la evasión lisosomal	(Vaughn et al., 2021)
Ubiquitinación y vías apoptóticas	AnkB/Cag27/LegAU13	<i>lpg2144</i>	Ubiquitinación	(Hubber & Roy, 2010)
	SidF	<i>lpg2584</i>	Antiapoptosis	(Hubber & Roy, 2010)
Absorción de hierro	LbtA	<i>lbtA</i>	Síntesis de legiobactina	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (Cianciotto, 2015)
	LbtB	<i>lbtB</i>	Exportación de sideróforo	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (Cianciotto, 2015)
	LbtU	<i>lbtU</i>	Utilización de legiobactina	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (Cianciotto, 2015)
	LbtC	<i>lbtC</i>	Regulación de la absorción de hierro	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (Cianciotto, 2015)
	Cyc4	<i>ciclo</i>	Secreción de legiobactina	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (Cianciotto, 2015)
	LbtA	<i>lbtA</i>	Síntesis de legiobactina	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (Cianciotto, 2015)
	LbtB	<i>lbtB</i>	Exportación de sideróforo	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (Cianciotto, 2015)
	FeoB	<i>feoB</i>	Transportador de hierro, juega un papel importante en la captación de hierro por parte de <i>L. pneumophila</i>	(Zhan & Chao-Hui Hu, 2015) (Fonseca & Swanson, 2014) (Cianciotto, 2015)

Recuperación y asimilación de hierro del ambiente	MavN		Mediante esta Proteína Efectora altamente conservada, la bacteria obtiene el hierro intracelularmente de los macrófagos.	(Christenson et al., 2019) (Cianciotto, 2015)
	Legiobactina Sideróforo	<i>lbtA lbtB</i>	Absorción de hierro	(Burnside et al., 2015; Christenson et al., 2019) (Cianciotto, 2015)
	Enzima Reductasa Férrica		Adquisición de hierro	(Christenson et al., 2019) (Cianciotto, 2015)
Movimiento de la bacteria	Flagelos	<i>flaA</i>	<p>Son importantes para alcanzar nuevas células hospederas mediante desplazamiento en el medio hasta captar un nuevo hospedero.</p> <p>Esta forma flagelar se presenta después que la bacteria se ha replicado intracelular en la VCL y que la cantidad de nutrientes es mínima.</p> <p>Las formas flageladas son resistentes al estrés, altamente virulentas e infecciosas, están en pausa metabólica y son incapaces de replicarse.</p> <p>El flagelo está conformado por un cuerpo basal, una estructura de gancho y un filamento. Para su ensamble es necesario que las proteínas necesarias sean exportadas fuera de la célula mediante el Sistema de Secreción tipo III (T3SS), el cuerpo basal consta de una varilla, tres anillos correspondientes a membrana/supramembrana, Peptidoglicano y Lipopolisacárido y un complejo denominado MotAB, que corresponde a un motor que provee de energía para la rotación del flagelo</p>	(Appelt & Heuner, 2017; Dietrich et al., 2001)
	Regulón flagelar		Regulación de la expresión de genes flagelares	(Appelt & Heuner, 2017)
	factor sigma flagelar FliA y FlaR		Factores reguladores a nivel Transcripcional para el gen <i>flaA</i>	(Dietrich et al., 2001)

4.1.2 Ciclos de vida de *L. pneumophila*

L. pneumophila, siendo un patógeno intracelular obligado y oportunista emplea células hospederas como nicho replicativo en humanos y protozoarios. En los humanos se replica dentro de los macrófagos alveolares lo que conlleva a la neumonía (A. Best & Kwaik, 2018) y en hospederos protozoarios emplea diferentes filos, en los que se incluyen Ciliophora (protozoos ciliados) y Amoebozoa (amebas), de este filo se han reportado hospederos del género *Acanthamoeba* las especies, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba hatchetii*, *Acanthamoeba jacobsi*, *Acanthamoeba lenticulata*, *Acanthamoeba palestinensis*, *Acanthamoeba polyphaga*; del género *Naegleria*, las especies *Naegleria australiensis*, *Naegleria fowleri*, *Naegleria gruberi*, *Naegleria lovaniensis*, *Naegleria pagei*; el género *Echinamoeba sp.* y *Vermamoeba vermiformis* (Boamah et al., 2017). Adicionalmente, existen reportes de algunos nematodos, como *Caenorhabditis elegans* (Hilbi et al., 2011). En los hospederos protozoarios se réplica dentro del citosol o dentro de una vacuola (A. Best & Kwaik, 2018), obteniendo de ellos las fuentes de nutrición y protección en los ambientes adversos (Mekour et al., 2013).

L. pneumophila presenta un ciclo de vida bifásico que le permite adaptarse a las condiciones ambientales para la supervivencia, la replicación y la transmisión. Este ciclo está compuesto por una fase replicativa intracelular y una transmisiva extracelular (Ge et al., 2019).

La fase replicativa intracelular se presenta después que la bacteria ha perdurado en el ambiente y ha sobrevivido a medios hostiles (Oliva et al., 2018). Para llevar a cabo la replicación intracelular tanto en los protistas como en los macrófagos alveolares, *L. pneumophila* emplea mecanismos análogos de replicación y es necesario que la bacteria establezca un nicho replicativo dentro de sus hospederos para que se dé la replicación intracelular; esto se consigue por la formación de una Vacuola que Contiene *Legionella* (VCL), dentro de esta vacuola la regulación genética y el metabolismo bacteriano se regula con base en la disponibilidad de nutrientes, si existen suficientes nutrimentos como los aminoácidos, la bacteria es capaz de proliferar y diferenciarse (A. M. Best & Kwaik, 2020). Para que la VCL se pueda originar, es necesario que actúe el Sistema de Translocación / secreción Dot/Icm tipo IV (T4SS) presente en la bacteria; este es un sistema de efectores traslocados que se activan sobre el hospedero una vez la bacteria se encuentra intracelularmente. Las proteínas efectoras actúan modificando varias de las actividades del hospedero, permitiendo el crecimiento bacteriano (Zhu & Luo, 2016).

Algunas de las funciones de estas proteínas efectoras están centradas en prevenir la fusión de lisosomas, reclutar vesículas derivadas del retículo endoplásmico del hospedero a la VCL, evadir la respuesta inmune innata y modular diversos procesos del hospedero, favoreciendo la supervivencia intracelular y la replicación de *L. pneumophila*. Cabe mencionar, que varias de estas proteínas efectoras las ha obtenido la bacteria a partir de hospederos eucariotas, a través de transferencia horizontal de genes entre reinos; estos efectores de tipo eucariota le permiten a

Legionella manipular los procesos del hospedero para establecer su nicho replicativo (A. M. Best & Kwaik, 2020; Copenhaver et al., 2014; Misch, 2016).

En el ciclo de vida, se considera a las amebas como un sistema de colaboración similar a “caballos de troya” o “sistema de entrenamiento”, ya que frente a las condiciones hostiles se crea una asociación importante que permite la presencia continua de la bacteria en el medio ambiente; entre más tiempo permanece la bacteria dentro del protozoo aumenta la resistencia de *Legionella* a las condiciones adversas, tales como fluctuaciones de temperatura, osmolaridad, pH y exposición a agentes oxidantes, de esta forma contribuyen a su supervivencia en el medio ambiente (Molmeret et al., 2005).

Los protistas son fuente de energía y carbono para *Legionella pneumophila*, debido a que la bacteria depende nutricionalmente de los aminoácidos del hospedero, específicamente la serina y la cisteína, que se emplean para generar piruvato y este a su vez como suministro para el ciclo del ácido tricarbóxico, principal vía metabólica para la producción de energía. La glucosa se usa muy poco a través de la glucólisis y se metaboliza a través de la vía de *Entner-Doudoroff* (A. Best & Kwaik, 2018).

El ciclo de replicación intracelular se lleva a cabo en varios pasos tal como lo muestra la figura 3. En el primer paso la bacteria flagelada se une a la célula hospedera; existen receptores específicos para cada célula hospedera, por ejemplo, la lectina Gal/GalNAc es específica para *Vermamoeba vermiformis* y la lectina de unión a la manosa (LMB) es específica para *Acanthamoeba castellanii*, en humanos, los receptores para monocitos corresponden al complemento; además los pilis ayudan a la adhesión en los macrófagos. Seguido a la unión con la célula hospedera, *L. pneumophila* empieza a internarse en el hospedero, a través de la translocación de efectores de proteínas en el citosol por medio del sistema de secreción tipo IV Dot/Icm (T4SS). La fagocitosis de la bacteria se realiza por los mecanismos convencionales, aunque se ha observado una forma única de entrada, llamada fagocitosis en espiral (A. Best & Kwaik, 2018). Este proceso en *L. pneumophila*, se basa en la polimerización de actina mediada por fosfatidilinositol (PI3K); además las coroninas (Proteínas de unión a actina), se reúnen transitoriamente a la copa fagocítica de las células hospederas permitiendo la fagocitosis, también en este proceso participa un efector traslocado de la bacteria denominado (SdeA / LaiA) (Chauhan & Shames, 2021)

Seguido a esto, el patógeno inhibe la vía fagolisosómica y fabrica un espacio especializado llamado Vacuola que Contiene *Legionella* (VCL) (Schunder et al., 2014), en este compartimento se lleva a cabo la replicación bacteriana, esta VCL resiste a la acidificación (Oliva et al., 2018) debido a que bloquea la ATPasa vacuolar de la célula hospedera, se liberan dos efectores SidK y WipB (Mondino et al., 2020). En la VCL la bacteria resiste a la falta de nutrientes, los cambios de temperatura, el estrés oxidativo, entre otros mecanismos de defensa del hospedero (Oliva et al., 2018). La VCL se comunica con varias vías de tráfico de vesículas, entre las que se encuentran las rutas endosómica, secretora y retrograda, a su vez está formada por gran cantidad de proteína efectoras que la bacteria secreta y que se dirigen a lípidos y proteínas del hospedero, allí juegan un papel muy importante los lípidos de fosfoinosítido que en células eucariotas son determinantes de la

identidad de los organelos, la dinámica de la membrana y el tráfico de las vesículas. Es así como *L. pneumophila* en la célula hospedera modula a los lípidos de fosfoinosítido para favorecerse, mediante el reclutamiento de vesículas decoradas de fosfoinosítido, esto se da gracias a la producción de efectores que interactúan con lípidos de fosfoinosítido como fosfatasa, quinasas, fosfolipasas y alteración de las enzimas metabolizadoras de lípidos de fosfoinosítido del hospedero, al inhibir la vía fagolisosómica por reclutamiento y retención de vesículas marcadas con Lípidos de Fosfoinosítido, producción de proteínas efectoras que interactúan con los lípidos de fosfoinosítido (SidC), quinasas (LepB), fosfatasas (SidP) o fosfolipasas (VipD) para bloquear las quinasas del hospedero como se observa en la figura 3. Posterior a la formación y maduración de la VCL, esta se acopla con el Retículo Endoplásmico, gracias a varias GTPasas como Arf, las familias Rab, Ran y Rap que regulan la formación de la VCL y la replicación intracelular, así como, otras GTPasas implicadas en la fusión de membranas. La GTPasa Atlastin3 (AtI3 / Sey1), que está presente en los túbulos del retículo endoplásmico, cataliza fusiones de retículo endoplásmico homotípicas, favoreciendo el remodelamiento del retículo endoplásmico alrededor de la VCL (Swart & Hilbi, 2020), así como, el reclutamiento de vesículas del aparato de Golgi con la membrana vacuolar (Isberg et al., 2009). Esta modificación es importante para evitar la fusión con los lisosomas (A. Best & Kwaik, 2018). En este momento también actúa el Sistema de Secreción Tipo 4 (T4SS) reclutando mitocondrias a la VCL y a través de la proteína efectora LegG1 induce la fragmentación mitocondrial, interrumpiendo la respiración mitocondrial y favoreciendo la replicación intracelular de la bacteria (Chauhan & Shames, 2021). En este momento sucede el tercer paso donde *Legionella pneumophila* empieza a replicarse rápidamente con un tiempo de generación aproximadamente de una hora (Schunder et al., 2014).

El cuarto paso se presenta cuando *Legionella pneumophila* se ha replicado bastante y escapa al citosol del hospedero (A. Best & Kwaik, 2018). La bacteria se replica de manera exponencial en la célula hospedera hasta que haya condiciones suficientes de nutrientes, cuando la nutrición en el hospedero se vuelve limitante (Schunder et al., 2014), se dispara una alarma bacteriana que induce a una transición de la fase replicativa intracelular a la fase transmisiva (A. Best & Kwaik, 2018). La disminución de aminoácidos conlleva a la síntesis y acumulación de guanosina 3,5-bispirofosfato (ppGpp), que lleva al inicio de la fase transmisiva, esta transición está regulada por los factores sigma RpoS y FliA, la proteína activadora LetE y el sistema de dos componentes LetA / S. La señalización LetA / S da como resultado la regulación positiva de dos pequeños ARN no codificantes, RsmY y RsmZ, que ayudan en el cambio de fase al reprimir el represor global CsrA. En este momento el patógeno sale del hospedero, tanto en macrófagos como en protozoos formando poros en su membrana ayudado por el sistema (T4SS) y produciendo necrosis celular. Una vez ha salido del hospedero, la bacteria se dispersa en el medio ambiente, estableciendo nuevamente la infección en una nueva célula hospedera, que le proporciona un nicho intracelular protector favorable para la replicación (Chauhan & Shames, 2021).

La transformación entre las fases replicativa y transmisiva está dirigida por cambios transcriptómicos. En la fase de replicación, los genes encargados del metabolismo, la asimilación de aminoácidos, de azúcares, la división celular y biosíntesis de procesos se regulan positivamente,

por el contrario, durante la fase transmisiva, los genes relacionados con la entrada a la célula hospedera, factores de virulencia, flagelos y pilis tipo IV, proteínas de entrada mejorada (Enh) y proteínas reguladoras cíclicas-di-GMP están reguladas positivamente (Chauhan & Shames, 2021). Durante este estado coloniza nichos ambientales extremos como lagos de agua dulce con temperaturas de 0°C, así mismo ambientes extremadamente ácidos y fuentes de agua con temperatura superior a 60°C, también puede propagarse planctónicamente en ambientes de agua como un microorganismo de vida libre o puede asociarse en biopelículas; no se multiplica en estos ambientes (Oliva et al., 2018).

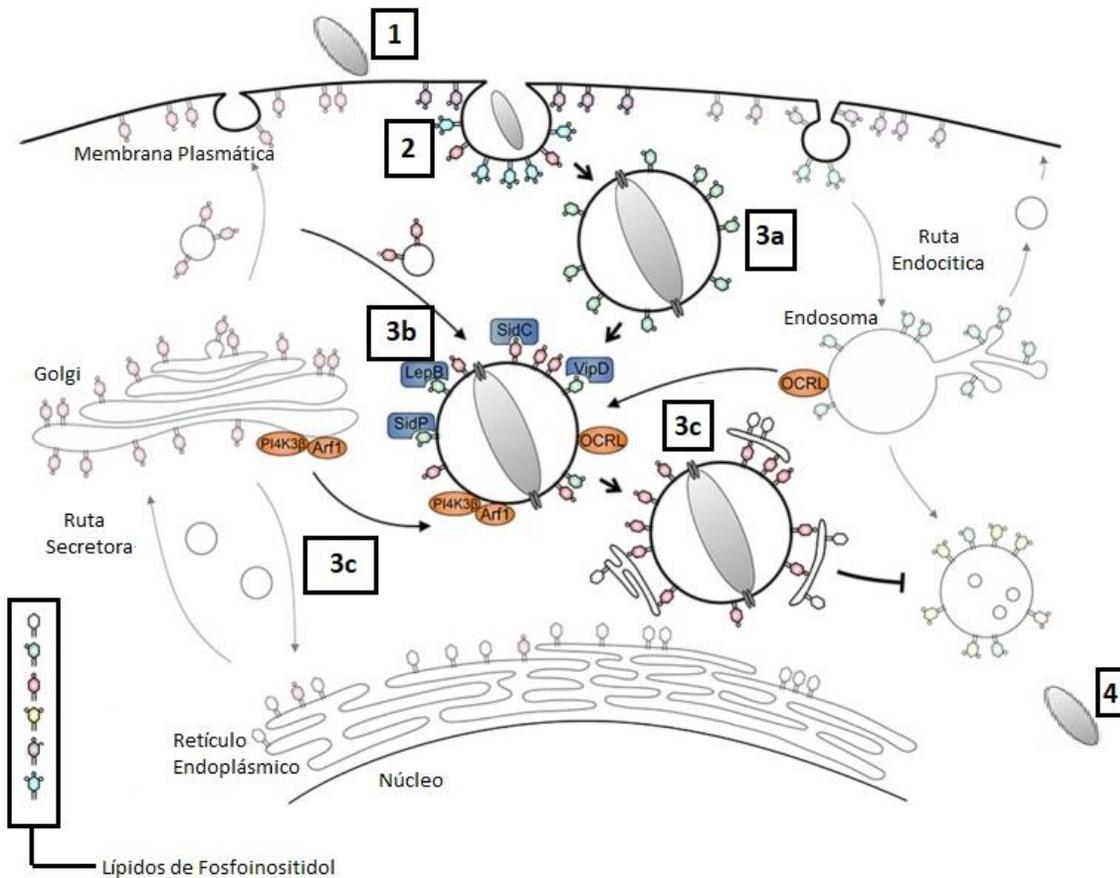


Figura 1 Ciclo de Vida Intracelular de *L. pneumophila*. Adaptado y tomado de (Swart & Hilbi, 2020). En la figura se ilustra el procedimiento que lleva a cabo *L. pneumophila* en su ciclo de vida intracelular que consiste en los siguientes pasos: 1. Unión de la bacteria a la célula hospedera por medio de receptores específicos; 2. Fagocitosis de la Bacteria a la célula hospedera; 3a. Formación de Vacuola que Contiene Legionella (VCL), al inhibir la vía fagolisosómica por reclutamiento y retención de vesículas marcadas con Lípidos de Fosfoinosítido; 3b. producción de proteínas efectoras que interactúan con los lípidos de fosfoinosítido (SidC), quinasas (LepB), fosfatasa (SidP) o fosfolipasas (VipD) para bloquear las quinasas del hospedero; 3c. Remodelación por reclutamiento del retículo endoplásmico (RE) y vesículas del aparato de Golgi con la membrana vacuolar, favoreciendo la replicación dentro de la Vacuola; 4. Paso de la bacteria al citosol de la célula hospedera y salida de esta.

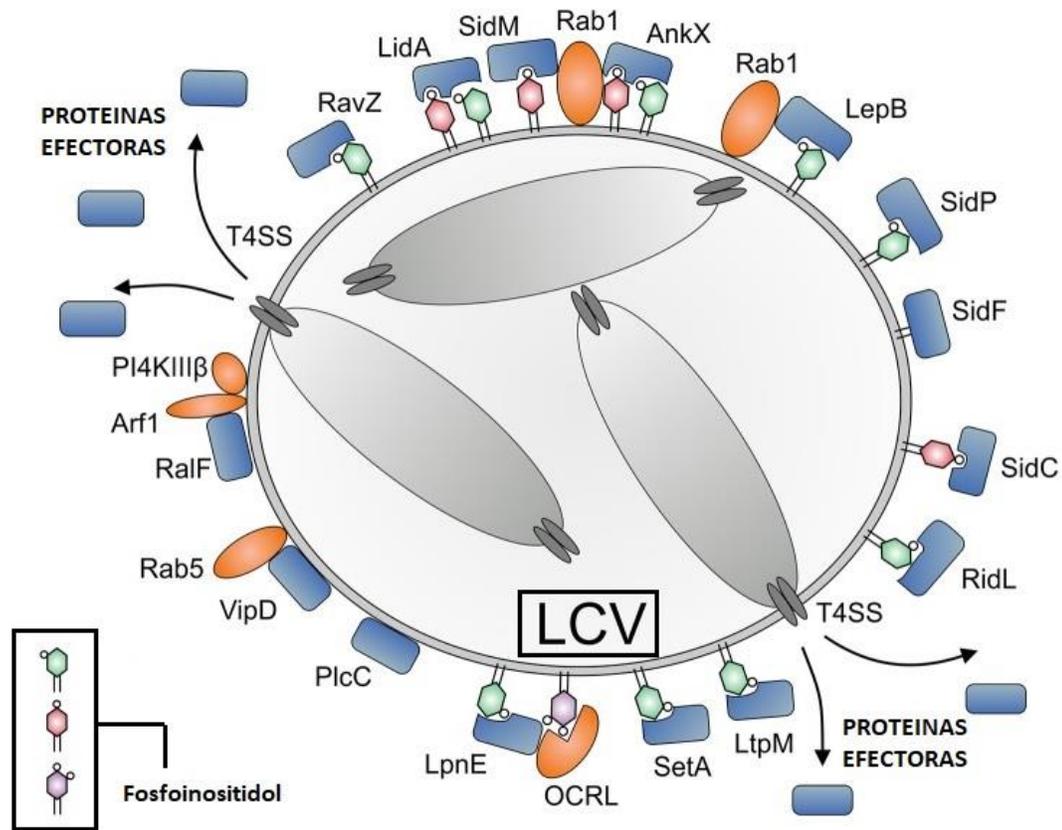


Figura 2. Bloqueo de Lípidos de Fosfoinosítido de la célula hospedera, mediado por proteínas efectoras de *L. pneumophila*. Tomado y Adapto de (Swart & Hilbi, 2020). El Sistema de Secreción Tipo IVB (T4SSB), secreta proteínas efectoras al citosol de la célula hospedera bloqueando las vesículas con Lípidos de Fosfoinosítido que se encuentran marcando la Vacuola que Contiene Legionella VCL, mediante: 1. Unión directa de efectores a Lípidos de Fosfoinosítido (SidC, SidM, AnkX, LidA, RidL, SetA, LtpM); 2. Actuando como Lípidos de Fosfoinosítido de fosfatasa bacterianas (SidF, SidP), Fosfoinosítido quinasas (LepB, LegA5) o fosfolipasas (VipD, PlcC, LpdA); 3. Reclutando Fosfoinosítido fosfatasa eucariotas.

En este punto donde la bacteria se encuentra en la fase transmisiva extracelular y es liberada de la ameba, permaneciendo en el ambiente, es el momento en que puede ocurrir la infección en humanos. La bacteria llega al hombre por inhalación de aerosoles contaminados con *Legionella pneumophila*, pasa al pulmón, donde es fagocitada por los macrófagos en donde es capaz de multiplicarse activamente (Oliva et al., 2018). Y allí dentro de los macrófagos alveolares se lleva a cabo el mismo ciclo replicativo que sucede en los protozoos.

Una vez la bacteria alcanza los alvéolos pulmonares, se activan diferentes mecanismos de respuesta inmune innata para tratar de controlar la infección, esta corresponde a la primera línea de defensa contra la bacteria en las fases iniciales de la infección. El Sistema Inmune Innato reconoce a *L. pneumophila* a través de los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR), estos PRR, reconocen los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP), estos PAMP,

corresponden a componentes de la bacteria esenciales para su supervivencia (Park et al., 2017). Durante la infección pulmonar el sistema inmune innato detecta al patógeno por los PRR como receptores tipo Toll (TLR) en las superficies celulares, en endosomas y en oligomerización de unión a nucleótidos receptores tipo NOD (NLR) y a través de sensores de ácido nucleico citosólico (A. S. Brown et al., 2017). Específicamente TLR 2 reconoce los componentes de la pared celular de *L. pneumophila* y contribuye a la producción de mediadores proinflamatorios, tales como, TNF α y varias citocinas (Naujoks et al., 2018) y quimiocinas; tanto, las citocinas como las quimioquinas son proteínas solubles de señalización producidas por muchas células del sistema inmune como neutrófilos, monocitos, macrófagos, células B y células T, su función principal es actuar como moduladores y mediadores en entornos localizados regulando respuestas inmunes, existen diferentes familias de citocinas dentro de las cuales se encuentran las interleuquinas (IL) (Stenzen & Poschenrieder, 2015). Estas citocinas reclutan neutrófilos y monocitos que contribuyen a que se sintetice IL-12 e IFN γ en máximas concentraciones, promoviendo el control eficaz de la infección bacteriana (Casson et al., 2017). TLR 5 reconoce la flagelina de la bacteria y TLR 9 detecta el ADN de *L. pneumophila* presente en endo-fagosomas; en cuanto a los receptores tipo NLR, particularmente, NOD 1 y NOD 2, detectan el peptidoglicano de la bacteria, activando citocinas durante la infección por *L. pneumophila*; otros NLR importantes, implicados en detectar al patógeno se encuentran NAIP5, NLRC4 y NLRP3, estos NLR conforman complejos multiproteicos llamados inflamomas (Naujoks et al., 2018).

Los inflamomas son un grupo de complejos proteicos que constan de una molécula sensora del inflamoma, la proteína adaptadora ASC y la caspasa 1, la formación de inflamomas resulta por la acción de varias sustancias originadas durante infecciones, daños tisulares o desequilibrios metabólicos (Latz et al., 2013); por ejemplo, *L. pneumophila* forma un inflamoma intracelularmente en el macrófago cuando el sistema T4SS induce a la detección de flagelina de la bacteria, esta flagelina se une a NAIP5 y se oligomeriza con NLRC4, a su vez, NLRC4 interactúa directamente con la Caspasa 1 sin reclutar ASC, hay producción de Interleuquina 1 β (IL-1 β), Interleuquina 18 (IL18) conllevando a muerte celular piroptótica (Copenhaver et al., 2014; Krakauer, 2019; Naujoks et al., 2018).

Los macrófagos alveolares infectados con *L. pneumophila* al liberar IL-1 α e IL-1 β activan a macrófagos transeúntes no infectados y neutrófilos mediante el receptor de IL-1 (IL1R), se liberaran más citocinas y quimiocinas proinflamatorias que desencadenan el reclutamiento continuo de neutrófilos (Barry et al., 2013) que producirán Especies Reactivas de Oxígeno y otras Citocinas como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) (Copenhaver et al., 2014). El papel que desempeña el TNF es acidificar los lisosomas, permitiendo que se fusionen con La VCL y se logre la eliminación de la bacteria, el TNF también es producida por los monocitos reclutados (Naujoks et al., 2018). Otro factor importante en la eliminación efectiva de *L. pneumophila* es el Interferón Gamma ITF γ , producido por macrófagos infectados, células Natural Killer (NK) y células T. Este factor actúa sobre células monocíticas activando su actividad bactericida (A. S. Brown et al., 2017), mediante estrés oxidativo, remodelación nutricional y xenofagia, además, El gen 1 de

respuesta inmune estimulado por interferón (IRG1) restringe a la bacteria por la producción de ácido itacónico (Chauhan & Shames, 2021).

4.1.3 Biopelículas de *L. pneumophila*

Las biopelículas corresponden a comunidades organizadas de bacterias que coexisten dentro de una matriz extracelular de origen propio, compuesta por polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN (Magana et al., 2018). Las biopelículas se pueden desarrollar tanto en interfaces sólido-agua, conocidas como biopelículas asociadas al sustrato, como en interfaces agua-aire, conocidas como biopelículas flotantes. Es importante resaltar que, a partir de biopelículas flotantes se pueden originar aerosoles capaces de transmitir a distancias considerables a los microorganismos presentes en la biopelícula, incluidos los patógenos. En términos generales el proceso de formación de biopelículas se da en tres pasos: 1. Adhesión bacteriana a un sustrato; 2. Maduración de la Biopelícula; 3. Desprendimiento de la Biopelícula, seguido de dispersión en el medio ambiente (Declerck, 2010); sin embargo, en *L. pneumophila* se tienen en cuenta unas condiciones específicas que se mencionan a continuación y se muestran en la figura 4:

- *L. pneumophila* se replica dentro de protozoos ambientales. Señales de *Quorum Sensing* (QS) presentes en el ambiente; así como, la presencia de otras amebas y de otras especies bacterianas, promueve la captación de *L. pneumophila* dentro de hospederos ambientales.
- La producción y colonización de biopelículas por parte de *L. pneumophila*, se puede presentar después de la replicación dentro de los hospederos protozoarios o independientemente de esta. Así mismo, las señales ambientales hacen que la bacteria cambie metabólicamente y favorezcan la formación de biopelículas.
- Se reconocen especies bacterianas que juegan un papel antagónico en la formación de biopelículas, por parte de *L. pneumophila*, como *Pseudomonas aeruginosa*; en contraste, existen especies bacterianas como *Klebsiella pneumoniae*, que se consideran especies permisivas que permiten incorporar al patógeno dentro de las biopelículas.
- *L. pneumophila* produce sustancias tóxicas como biosurfactantes que restringen la entrada a la biopelícula de otras especies de *Legionella*.
- Se estableció que los cationes divalentes favorecen la colonización de *L. pneumophila* a la biopelícula; sin embargo, la presencia de nanopartículas dificultan esa colonización por parte del patógeno (Abdel-Nour et al., 2013).

El papel fundamental de estas biopelículas, ya sea en biopelículas ambientales o de sistemas de aguas artificiales, es permitir que *L. pneumophila* persista en el medio ambiente, ya que estas biopelículas

proporcionan refugio y nutrientes, lo que representa un nicho ecológico adecuado para la persistencia de la bacteria (Berjeaud et al., 2016).

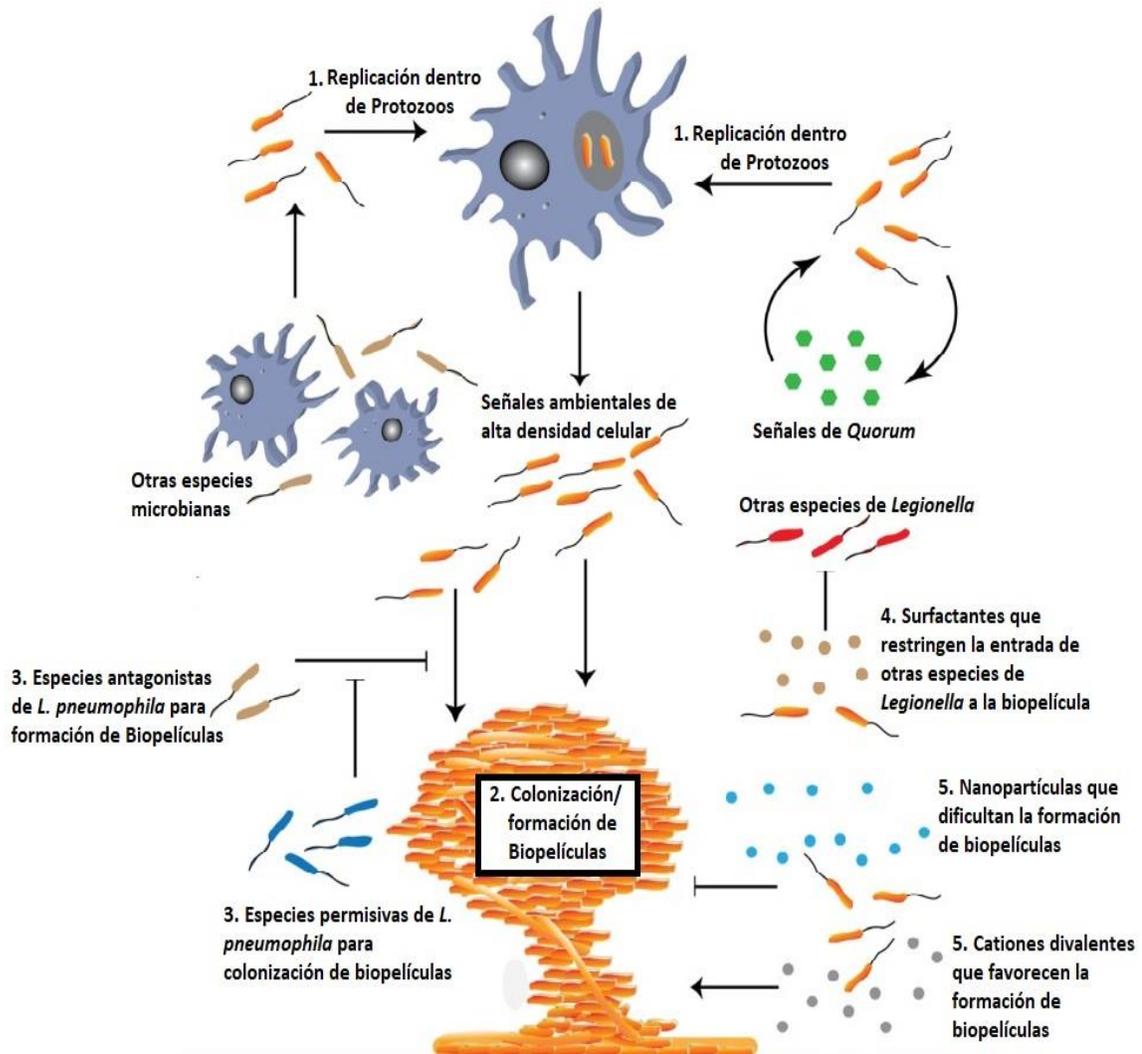


Figura 3 Formación de Biopelículas por *L. pneumophila*. Tomado y Adaptado de (Abdel-Nour et al., 2013). En esta figura se muestran las condiciones específicas que emplea *L. pneumophila* para la formación de Biopelículas 1. *L. pneumophila* se replica dentro de protozoos ambientales. Señales de Quorum Sensing presentes en el ambiente; así como, la presencia de otras amebas y de otras especies bacterianas, promueve la captación de *L. pneumophila* dentro de hospederos ambientales. 2. La producción y colonización de biopelículas por parte de *L. pneumophila*, se puede presentar después de la replicación dentro de los hospederos protozoarios o independientemente de esta. Señales ambientales hacen que la bacteria cambie metabólicamente y favorezcan la formación de biopelículas. 3. Se reconocen especies bacterianas que juegan un papel antagónico en la formación de biopelículas, por parte de *L. pneumophila* y existen especies bacterianas que se consideran especies permisivas y permiten incorporar al patógeno dentro de las biopelículas. 4. Surfactantes que restringen la entrada a la biopelícula de otras especies de *Legionella*. 5. Cationes divalentes favorecen la colonización de *L. pneumophila* a la biopelícula; nanopartículas dificultan la colonización de *L. pneumophila* a la biopelícula.

La formación de estas biopelículas está mediada por el sistema de comunicación bacteriana QS (Abdel-Nour et al., 2013), este sistema corresponde a la comunicación entre bacterias a través de pequeñas moléculas orgánicas difusibles, donde coordinan su comportamiento grupal; este fenómeno se inicia cuando se alcanza una concentración umbral “el Quorum” de la molécula de señalización y las moléculas químicas llamadas “autoinductores” median la detección del Quorum (Hochstrasser & Hilbi, 2017). Con respecto a lo anterior, *L. pneumophila* emplea el autoinductor LAI-1 (3-hydroxypentadecano-4-1), producido y detectado por el Sistema de Detección de Quorum de *Legionella* (Lqs); este sistema comprende el autoinductor Sintasa LqsA, las quinasas sensoras homólogas LqsS y el regulador de respuesta LqsR (Abu Khweek & Amer, 2018).

Aunque *L. pneumophila* puede producir biopelículas de monoespecies, es más típico que este incluida en biopelículas de múltiples especies; en estas últimas pueden estar involucradas varias especies de amebas, incluidas *Hartmannella vermiformis* y *Acanthamoebae castellanii*, que desempeñan un papel fundamental en el desarrollo y replicación de la bacteria (Abdel-Nour et al., 2013), y promoviendo en gran medida el crecimiento de *L. pneumophila* dentro de las biopelículas (Stewart et al., 2012). Así mismo, *L. pneumophila* es capaz de crecer sobre restos de amebas muertas; además, la bacteria puede adherirse a los protozoos en biopelículas flotantes en ausencia de superficies abióticas disponibles (Abdel-Nour et al., 2013). Por otra parte, en las biopelículas de múltiples especies, la supervivencia de *L. pneumophila* puede verse afectada por la presencia de otras especies bacterianas, es así como Stewart y colaboradores en el año 2012, demostraron que *L. pneumophila*, es capaz de persistir en una biopelícula formada por *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium sp* o *Pseudomonas fluorescens* (Stewart et al., 2012); en contraste, determinaron que *Pseudomonas aeruginosa* al producir Lactonas Acilhomoserinas (AHL) previene la colonización de *L. pneumophila* en biopelículas, ya que estas enzimas están involucradas en los circuitos de “Quorum Sensing” (Rémy et al., 2020); así que AHL de *P. aeruginosa* regulan negativamente la producción de la Proteína Similar al Colágeno de *Legionella* (Lcl) que es esencial para la formación de biopelículas en *L. pneumophila* (Abdel-Nour et al., 2013).

4.2 Pruebas Diagnósticas para *Legionella pneumophila*

En la actualidad para el diagnóstico de *Legionella sp.* existen diversas técnicas que se basan en la identificación de antígenos bacterianos, anticuerpos o métodos moleculares. Las principales características de estos métodos se describen a continuación.

4.2.1 Antígeno urinario

La evaluación del antígeno urinario de *L. pneumophila* es una de las pruebas empleadas con mayor frecuencia, corresponde a una técnica independiente de cultivo y es considerada una prueba de diagnóstico de primera línea (Burillo et al., 2017). Este método se fundamenta en la detección de antígeno soluble urinario, específicamente reconoce el Lipopolisacárido presente en la pared celular de *L. pneumophila* serogrupo 1 (Lp1)(Jarraud et al., 2013). Esta prueba tiene un porcentaje de sensibilidad de 56% a 99% y una especificidad mayor del 99% (Burillo et al., 2017). La prueba se

vuelve positiva después de 48 a 72 horas de la aparición de los síntomas y permanece positivo después de varias semanas (Jarraud et al., 2013). Como desventaja que presenta esta técnica es la imposibilidad de detectar otros antígenos diferentes al Lp1 (Tronel & Hartemann, 2009). Como ventaja se resalta la detección rápida de antígeno urinario, en pocos minutos, facilidad de realización; además, de no requerir equipos de laboratorio automatizados (Beraud et al., 2015).

4.2.2 Diagnóstico de *L. pneumophila* por cultivo

Dentro de las pruebas diagnósticas para la detección de *L. pneumophila* se encuentra el aislamiento del microorganismo en medio de cultivo selectivo de extracto de levadura de carbón amortiguado (BCYE), considerándose este método el estándar de oro en el diagnóstico del patógeno (Mojtahedi et al., 2019). Este método presenta una sensibilidad del 10 - 80%, sin embargo, es una prueba larga, ya que la detección del microorganismo ocurre hacia los 7 días (Tronel & Hartemann, 2009). A pesar de ser considerada la prueba de oro, el cultivo bacteriano presenta desventajas frente a los otros métodos, como el tiempo de incubación para el crecimiento del patógeno y la dificultad de recuperar el microorganismo cuando el paciente tiene instaurada una terapia antimicrobiana (Mojtahedi et al., 2019). En cuanto a la especificidad de la prueba, esta es de 99%. Lo positivo de este método es que tiene la capacidad de recuperar todos los serogrupos y especies conocidos. Existen dos formulaciones de agar BCYE para aislamiento clínico; está el medio BCYE suplementado con polimixina B, anisomicina, vancomicina y púrpura de bromocresol y colorante azul de bromotimol, el colorante colorea las colonias de *Legionella*, permitiendo así una identificación fenotípica fácil y los antibióticos suprimen la flora acompañante. Y la otra formulación del medio de cultivo esta suplementado con polimixina B, anisomicina y cefamandol (Pierre et al., 2017).

En Colombia, no es una técnica empleada de manera rutinaria debido a que el medio de cultivo no está disponible comercialmente, requiriendo importación y validación con cepas ATCC.

4.2.3 Diagnóstico de *L. pneumophila* por pruebas moleculares

Recientemente se han evaluado las técnicas moleculares como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y qPCR (Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real o cuantitativa) como método diagnóstico con el fin de implementar una técnica de diagnóstico molecular, que pueda detectar al patógeno en las fases iniciales de la enfermedad (Mojtahedi et al., 2019).

La PCR que corresponde a una técnica de amplificación enzimática específica de ADN *in vitro* (Kralik & Ricchi, 2017), este procedimiento se lleva a cabo en varios ciclos que comprende desnaturalización de ADN, reconocimiento de cebadores y extensión. Dentro de la utilización de esta técnica, se desarrolló un acontecimiento importante y significativo, que consistió en la introducción de la PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR) (Kralik & Ricchi, 2017) en los años 1991 y 1992 (Higuchi et al., 1992). Esta técnica tiene un principio matemático mediante un proceso exponencial en el que el número de moléculas de ADN se duplica teóricamente después de cada ciclo y está basada en el monitoreo en tiempo real de la amplificación del ADN que se encuentra marcado con fluorescencia, esta fluorescencia se mide después de cada ciclo y la intensidad de la señal fluorescente refleja la cantidad momentánea de amplicones

de ADN en la muestra en ese momento específico. Para visualizar en tiempo real los fragmentos de ADN amplificados se puede emplear colorantes de ADN fluorescentes no específicos y sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorescencia (Kralik & Ricchi, 2017)

Existen pruebas comerciales disponibles de PCR y qPCR para muestras respiratorias, estas pruebas comerciales presentan sensibilidades que varían del 17% al 100% y especificidades que varían del 95% al 100%. (Pierre et al., 2017). Se presenta una ventaja frente a los resultados del cultivo y los métodos de diagnóstico molecular, esto puede deberse a que los métodos de diagnóstico molecular pueden reconocer todas las bacterias, vivas o muertas, pero en el método de cultivo, solo se pueden detectar células viables. Otra razón obedece al hecho que el cultivo necesita una amplia concentración de bacterias para su aislamiento; por el contrario, los métodos moleculares pueden detectar la presencia de incluso una bacteria, con ello se contribuye a una detección rápida y un tratamiento más eficiente (Divan Khosroshahi et al., 2015)

4.2.4 Diagnóstico de *L. pneumophila* por Antígeno Fluorescente Directo

Este método realiza detección directa de la bacteria, mediante anticuerpos fluorescentes directos (Blyth et al., 2009), emplea anticuerpos monoclonales o policlonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) contra *L. pneumophila* (Sethi et al., 2007). Presenta una sensibilidad aproximadamente del 70% y una especificidad cercana al 99% (Pierre et al., 2017).

En la siguiente tabla se presenta resumidos los porcentajes de Sensibilidad y Especificidad publicados en la literatura para las pruebas diagnósticas empleadas en *L. pneumophila*.

Tabla 3 Porcentaje de Sensibilidad y Especificidad de Métodos diagnósticos para *L. pneumophila*.

Método Diagnóstico	Muestra	% Sensibilidad	% Especificidad	Referencias
Cultivo en medio BCYE	Espuito	5 - 70%	99 %	(Tronel & Hartemann, 2009) (Pierre et al., 2017)
	Lavado Broncoalveolar o Aspirado Broncoalveolar	30 -90%	100%	
	Biopsia de Pulmón	90 – 99%	100%	
	Sangre	10 – 30%	100%	
Antígeno Urinario	Orina	56% - 99%	especificidad mayor del 99%	(Burillo et al., 2017)
PCR y qPCR	Muestra Respiratoria	85% - 92%	94% al 99%	(Pierre et al., 2017)
	Orina o Suero	33% - 70%	98%	
Antígeno Fluorescente Directo	Espuito y Lavado Broncoalveolar	25% - 70%	95% - 99%	(Pierre et al., 2017)

	Biopsia Pulmonar	80% - 90%	99%	
--	------------------	-----------	-----	--

4.3 *L. pneumophila* en sistemas de aguas artificiales

Los sistemas de distribución de agua potable que incluyen líneas y dispositivos de agua caliente, fría, calentadores de agua, duchas, grifos y filtros, se caracterizan por proveer un ambiente húmedo, cálido, periódicamente estancado y con poca cantidad de desinfectante residual; las condiciones ideales para el crecimiento de *Legionella pneumophila* (Wang et al., 2017).

Teniendo en cuenta que *L. pneumophila* coloniza los sistemas de agua artificiales generados por el hombre, deben ser consideradas fuentes potenciales de contagio a nivel comunitario y son la fuente más importante para transmitir la bacteria a nivel hospitalario, causando un tipo de neumonía nosocomial (David et al., 2017).

Adicionalmente, la capacidad de *L. pneumophila* para formar biopelículas, le permite a la bacteria sobrevivir, persistir y propagarse sobre las superficies internas de los ductos de agua, siendo de importancia para la salud pública a nivel hospitalario, debido a que varios brotes presentados se han asociado a la presencia de la bacteria en estos conductos, incluso después de ser sometidos a tratamientos químicos o físicos (Abu Khweek & Amer, 2018). Un ejemplo de la persistencia del patógeno a pesar de aplicar métodos de desinfección química y térmica se presenta en un estudio publicado en el año 2016 en Canadá; el estudio se origina a partir de un brote nosocomial presentado en una entidad hospitalaria. Se evidencio la presencia de la bacteria en un sistema de agua caliente aun cuando esta contenía niveles protectores de cobre, para eliminar al patógeno se aplicó una desinfección por pasteurización a dos sistemas de agua por separado, el sistema número uno se trató una sola vez a 70°C por 30 minutos y el sistema número dos se trató con calor por dos veces, cada tratamiento fue aplicado con una semana de diferencia. Se evidencio por medio de cultivo, que la presencia de *L. pneumophila* se redujo significativamente en el sistema número uno; sin embargo en el sistema número dos no se observó disminución a pesar de mantener el lavado semanal, reducir la longitud de las tuberías y mantener la temperatura del agua por encima de 55°C, finalmente los bajos niveles de *L. pneumophila* no pudieron eliminarse (Bédard, Boppe, et al., 2016).

Para el año 2015 en Estados Unidos, empleando los datos de Vigilancia Nacional, se encontró una notificación de 2.809 casos confirmados de Enfermedad del Legionario, de los cuales 85 casos (3%) se definieron como casos definitivos asociados con la atención médica y 468 (17%) como posibles casos asociados con la atención médica, el 75,88% se presentó en personas con edades superiores a 60 años y la exposición ocurrió en 15 hospitales y 57 centros de cuidado de largo plazo; además, la tasa de letalidad asociada con la atención médica fue del 25% para pacientes con Enfermedad del Legionario confirmada y del 10% para los pacientes con posible Enfermedad del Legionario.

Estas tasas demuestran la importancia de implementar Programas de Gestión del Riesgo para Control y Prevención del patógeno en instituciones hospitalarias (Soda et al., 2017).

4.3.1 Transmisión comunitaria:

La enfermedad adquirida en la comunidad generalmente es esporádica y no está asociada a brotes; dentro de las principales fuentes de transmisión comunitaria se incluye el agua potable residencial, los sistemas de aguas de grandes edificios y las torres de enfriamiento, fugas de agua de los sistemas de aire acondicionado de los vehículos, líneas de flotación de unidades dentales y agua potable de oficinas (Orkis et al., 2018), la exposición en spas con hidromasajes, duchas, grifos, bañeras y piscinas (Roig et al., 2003). Se considera que la incidencia de la enfermedad es mayor en verano y está relacionado al uso continuo de aires acondicionados (Prussin et al., 2018). En la revisión sistemática publicada en el año 2018, sobre los casos de Legionelosis o brotes asociados con entornos de agua utilizados con fines recreativos, entre los que se incluyeron piscinas, spas, aguas termales, jacuzzis y balnearios naturales; incluyo las publicaciones del 1 de enero de 1977 al 31 de mayo de 2018; se encontraron 42 eventos, de los cuales 25 correspondieron a brotes y 17 a casos esporádicos. Durante este periodo se informaron 1079 casos, correspondiendo el 57,5% a Fiebre de Pontiac sin registro de muertes y el 42,5% correspondieron a Enfermedad del Legionario, con una tasa de letalidad del 6,3%; esto datos evidencian que las fuentes de agua representan una fuente potencial en la infección por *Legionella* (Leoni et al., 2018).

Un estudio publicado en el año 2017 en Corea del Sur describe el caso de una mujer de 58 años con diabetes y diagnosticada con neumonía asociada a la Comunidad. La paciente fue ingresada a la Unidad de Cuidados Intensivos para ventilación mecánica por deterioro de su estado de salud. La prueba de antígeno urinario practicada arrojó un resultado positivo y las pruebas realizadas para patógenos respiratorios dieron resultados negativos. La investigación ambiental para determinar la fuente de infección y establecer medidas preventivas, demostraron la colonización de *L. pneumophila* serogrupo 1 en el circuito de agua caliente del edificio y en grifos de agua caliente de la vivienda; estos hallazgos confirman que los sistemas de agua comunitaria colonizados con la bacteria pueden ser una fuente de transmisión (Ryu et al., 2017).

En Latinoamérica, se evidenció la presencia de especies de *Legionella* en reservorios domiciliarios de agua potable en Chaco, Argentina. En este estudio se tomaron 46 muestras de agua de diferentes puntos de la ciudad, por técnicas de cultivo y técnicas moleculares de PCR, se aislaron cepas de *Legionella sp.* por cultivo en 16 muestras (34,9%) y técnica de PCR se identificó a *L. pneumophila* en 15 muestras (Losch et al., 2019).

4.3.2 Transmisión por sistemas de agua hospitalarios:

Los sistemas de agua de las instituciones hospitalarias pueden contaminarse con *Legionella pneumophila*, estos sistemas incluyen grifos, duchas, torres de enfriamiento; así mismo, puede colonizar fuentes inusuales como burbujeadores para oxigenoterapia, incubadoras pediátricas,

equipos dentales (Laganà et al., 2019), humidificadores, dispositivos respiratorios, nebulizadores que se han llenado o lavado con agua de grifo (Jinna & Gaikwad, 2018a), broncoscopios en los cuales se emplean protocolos de limpieza con agua de grifo (Mitchell et al., 1997). Otra fuente reportada de contaminación intrahospitalaria por *L. pneumophila* son los calentadores de toallas a vapor; en varias instituciones hospitalarias estos instrumentos son empleados para secar toallas utilizadas en la limpieza corporal de los pacientes (Higa et al., 2012). Todas estas fuentes de contaminación pueden generar infección en los pacientes por aspiración de agua contaminada o inhalación directa de aerosoles (Jinna & Gaikwad, 2018b).

Diferentes investigaciones han evidenciado la presencia de *L. pneumophila* en sistemas de agua hospitalarios; en un estudio realizado en Japón se aisló *Legionella sp.* de grifos y lavavajillas conectados a griferías contaminadas, se determinó que los lavavajillas contaminados eran el reservorio potencial para la propagación de *Legionella* en el centro de salud (Yoshida et al., 2018). Otro estudio realizado en el Reino Unido demostró que los aislamientos ambientales de *L. pneumophila* provenientes de instituciones hospitalarias podían crecer en un modelo celular empleado para investigación biomédica, las células U937 similares a los macrófagos humanos, produciendo un efecto citopático significativo, lo que puede considerarse un riesgo potencial para la adquisición de la Enfermedad del Legionario en un hospital (Garcia-Nuñez et al., 2009).

Otro estudio realizado en Polonia demostró que, los conductos de agua caliente hospitalarios se encuentran colonizados con *Legionella*, a lo largo de siete años y a pesar de haber sido sometidos a desinfectantes químicos como el dióxido de cloro y choque térmico. En este estudio, durante un período de tiempo comprendido entre 2004 a 2011 se recolectaron 134 muestras ambientales de dos hospitales, los sistemas de agua de estos hospitales se desinfectaron con dióxido de cloro y en uno solo de ellos se aplicó choque térmico, siendo persistente la presencia de la bacteria; además, este estudio afirma que no controlar la temperatura, tanto de agua fría como caliente, constituye un factor importante en la aparición y proliferación de la bacteria; con relación a lo anterior, en estos sistemas de agua la temperatura óptima de agua caliente debe ser mayor a 55°C y la temperatura del agua fría debe ser menor a 20°C (Pancer et al., 2013).

El riesgo de adquirir la enfermedad intrahospitalariamente aumenta si el patógeno se encuentra colonizando los sistemas de aguas de las unidades críticas en los centros hospitalarios, como Unidades de Cuidados Intensivos, Unidades de Hematología-Oncología, Unidades de cardiología, hemodiálisis, neumología. Por lo anterior, es importante realizar evaluación periódica de la presencia de la bacteria en clínicas y hospitales para evitar la exposición del microorganismo a pacientes y profesionales de la salud (Laganà et al., 2019). Se sugieren diferentes estrategias para prevenir la neumonía por *L. pneumophila* adquirida en entidades hospitalarias, entre las que se encuentran el monitoreo ambiental del patógeno periódicamente en suministros de agua y la vigilancia activa de la bacteria clínicamente en pacientes con neumonía (Ditomaso et al., 2014).

En Colombia, en la ciudad de Medellín en el año 2011, se reportaron dos casos de neumonía adquirida hospitalariamente causados por *L. pneumophila*. Se trató de dos pacientes con Leucemia

Linfoblástica en tratamiento con quimioterapia, quienes tuvieron positiva la prueba de antígeno urinario (Betáncur-jiménez et al., 2011).

4.4 Enfermedades Asociadas a *L. pneumophila*

Las infecciones en humanos provocadas por el género *Legionella*, generalmente se presentan por la especie *pneumophila*; de acuerdo a un estudio en colaboración internacional realizado de la Enfermedad de Legionario adquirida en la comunidad, se ha evidenciado que *L. pneumophila* es responsable de la mayoría de los casos 91,5%, seguido de *Legionella longbeachae* con un 3,9%, y *Legionella bozemanii* con un 2,4%, los otros casos se debieron a *Legionella micdadei*, *Legionella feeleeii*, *Legionella dumoffii*, *Legionella wadsworthii* y *Legionella anisa*, las otras especies de *Legionella* rara vez causan enfermedad en humano (Yu et al., 2002); otro estudio realizado en el año 2013, donde se evaluaron 215 pacientes con neumonía adquirida en la comunidad causadas por especies de *Legionella*, se confirmó que la especie *pneumophila* es la principal especie causante de enfermedad; de los 215 pacientes estudiados, 214 presentaron neumonía por *L. pneumophila* serogrupo 1 y tan solo un paciente presentó neumonía por *L. longbeachae* y el 7,4% de los casos el origen de la neumonía se asoció a viajes (Viasus et al., 2013).

En humanos *L. pneumophila* coloniza principalmente los alvéolos pulmonares, luego de la inhalación del patógeno en forma de aerosol, estos aerosoles son producidos a partir de fuentes de aguas contaminadas, incluidas duchas, grifos, jacuzzis, piscinas y torres de enfriamiento de aires acondicionados, la inhalación ocurre cuando las partículas aerolizadas ingresan al tracto respiratorio con tamaños de aerosol inferior a 10 micras, tamaño necesario para la instalación alveolar (Prussin et al., 2018). Al llegar al pulmón, *L. pneumophila* es fagocitada por los macrófagos alveolares, allí se replica activamente y da origen a un cuadro clínico de neumonía muy grave llamada *enfermedad del legionario*. Al ser este patógeno un microorganismo oportunista afecta principalmente a personas inmunodeprimidas, personas con enfermedades pulmonares crónicas, adultos mayores y fumadores. Aproximadamente 20 de las 58 especies conocidas de este género son capaces de producir enfermedad en humanos, considerándose *L. pneumophila* serogrupo 1 el responsable del 85% de los casos de la enfermedad (Oliva et al., 2018).

La infección por *L. pneumophila* tiene dos presentaciones clínicas; una corresponde a la *enfermedad del Legionario*, un tipo de neumonía grave con falla multisistémica y la segunda presentación corresponde a *fiebre de Pontiac*, mostrando un cuadro clínico similar a la gripe autolimitada, en otros casos, pacientes con *L. pneumophila* presentan cuadros completamente asintomáticos (Fields et al., 2002). A continuación, se presentarán los aspectos más importantes de la presentación clínica de la enfermedad.

4.4.1 Enfermedad del Legionario

La enfermedad del Legionario se presenta como una neumonía atípica, tiene un período de incubación de 2 a 14 días y en ella se observan síntomas como dolor de cabeza, mialgia, astenia, anorexia, fiebre,

diarrea, náuseas, vómito, dolor abdominal y tos que produce esputo purulento; por otro lado, en algunos pacientes, también se pueden evidenciar manifestaciones no respiratorias como esplenomegalia, pericarditis, miocarditis, endocarditis y artritis (Cunha, 2010). En pacientes inmunosuprimidos la mayor presentación clínica es la neumonía que puede diseminarse fuera del pulmón y generar tasas mayores de mortalidad en estos pacientes comparado con la mortalidad evidenciada en pacientes inmunocompetentes. Existen varios factores de riesgo para la presentación de la enfermedad, entre los que se incluyen, enfermedad pulmonar crónica, tabaquismo, adulto mayor a 50 años, tratamiento con glucocorticoides, neoplasias hematológicas y pacientes en quimioterapia (Cunha et al., 2016).

Se han reportado casos inusuales de la Enfermedad de Legionario, es así, como en el año 2014 se reportaron 2 casos de Legionelosis en neonatos asociados a la aspiración de agua contaminada empleada en hospitales para realizar fórmulas lácteas infantiles, al realizar el análisis molecular de las muestras respiratorias de los neonatos y de las muestras ambientales tomadas de los dispensadores de agua, se obtuvieron resultados idénticos con secuencias iguales (Wei et al., 2014). Otro caso publicado en el año 2017, donde se presenta una niña de ocho días de nacida, con parto a término, quien nació bajo la supervisión de una partera en su hogar en una bañera de hidromasaje, presentó neumonía en lóbulo superior derecho, fue necesario ingresarla a la Unidad de Cuidados Intensivos por insuficiencia multiorgánica, necesidad de intubación, anomalías hematológicas e inestabilidad hemodinámica. Los cultivos realizados a la paciente resultaron positivos para *L. pneumophila* serotipo 6; sin embargo, no fue posible analizar el agua de la bañera ya que se eliminó el agua antes de realizar análisis microbiológico (Barton et al., 2017).

Por otra parte, en el año 2015, en Houston, Texas, se analizaron 33 casos de Legionelosis presentados en pacientes con cáncer durante los años 2002 a 2014. El patógeno se identificó a partir de broncoscopia y una sola muestra se identificó a partir de análisis de secuenciación del gen RNAr 16S, en 15 muestras se identificó *L. pneumophila* subespecie *pneumophila*, en 3 muestras *L. pneumophila* subespecie *fraseri*, en 4 muestras *L. donaldsonii*, en 3 muestras *L. micdadei*, y las siguientes especies una por muestra de *L. bozemaniae*, *L. feeleii*, *L. gormanii*, *L. longbeachae*, *L. maceachernii*, *L. parisiensis*, *L. sainthelensi* y *L. sp* D5382. Todos los pacientes desarrollaron neumonía y tan solo uno fue asintomático; estos resultados evidencian que diferentes especies pueden provocar infección en pacientes con cáncer, sin embargo, *L. pneumophila* es quien produce la enfermedad en una mayor proporción (Han et al., 2015).

4.4.2 Fiebre de Pontiac

La Fiebre de Pontiac, es la segunda presentación clínica de la infección causada por *Legionella*. Este tipo de infección evidencia una sintomatología leve y no está asociado con neumonía (Euser et al., 2010); se adquiere de la misma manera que la enfermedad del Legionario, por inhalación de aerosoles contaminados con *L. pneumophila*. El cuadro clínico que presenta es muy similar a una gripe, con fiebre, mialgia, artralgia, astenia, dolor de cabeza, tos, náuseas, dolor de garganta, dolores torácicos, vómitos y diarrea, generalmente los pacientes se recuperan de dos a cinco días sin tratamiento. Por tener una presentación benigna en ocasiones puede pasar inadvertida y no diagnosticarse; además, no se encuentra asociada a factores predisponentes como edad, sexo

tabaquismo. No presenta complicaciones y no se han reportado casos de mortalidad (Tossa et al., 2006)

4.4.3 Brotes Comunitarios causados por *L. pneumophila*

Desde el primer brote causado por *L. pneumophila* presentado en el año 1976 en Filadelfia-Estados Unidos, durante una convención de legionarios (Fraser et al., 1977), se han reportado varios casos de brotes a nivel mundial. De acuerdo con datos reportados en **LegionellaDB**, la primera base de datos en línea especializada en brotes de Legionella, donde se analizan metadatos revisados por pares de PubMed y SCOPUS, los cuales son publicados luego de ser curados (Gonçalves et al., 2021), se han presentado 164 brotes en 24 países originados en diferentes lugares y asociados a varias fuentes de infección (LegionellaDB, n.d.).

De acuerdo con una revisión de 136 brotes presentados en Estados Unidos durante los años 2006 a 2017, 115 correspondieron a Enfermedad de Legionario, 4 a Fiebre de Pontiac y 17 se presentaron como brotes mixtos de Enfermedad de Legionario y Fiebre de Pontiac, como fuentes relacionadas con la aparición de los brotes se establece a las torres de enfriamiento, piscinas y spas (Hamilton et al., 2018). Se estima que en Estados Unidos entre 8.000 y 18.000 personas son hospitalizadas por legionelosis y aproximadamente del 5% al 30% de los casos presentan mortalidad; además se resalta que en la década del 2000 se presentó un aumento significativo en los casos de 1.110 en el año 2000 a 4.202 en el año 2011; así mismo, la incidencia aumentó de 0.39 por 100.000 habitantes en el año 2000 a 1.36 por 100.000 habitantes en el año 2011 (Farnham et al., 2014).

En lo que respecta a Europa entre los años 2011 y 2015 29 países reportaron 30.532 casos de enfermedad de Legionario al Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades; del total de casos reportados el 92.3% como casos confirmados y el 7.7% como casos probables; así mismo, durante este período la tasa por edad de todos los casos aumento de 0.97 casos por 100.000 habitantes en 2011 a 1.30 casos por 100.000 habitantes en el año 2015. Lo que representa un aumento en promedio anual de 0.09 casos por 100.000 habitantes y aproximadamente el 70% de los casos se adquirieron en la comunidad, el 19.9% como asociados a viajes, el 7.3% como atención médica y el 80% de las personas enfermas con edad de 50 años o mayores. De la misma manera, del total de los casos reportados se conoció el desenlace clínico de 23.164 casos, de los cuales el 9.3% presentaron mortalidad. En cuanto al índice general de letalidad se evidenció una disminución de manera constante del 10.5% en 2011 al 8.1% en el año 2015 (Beauté, 2017).

4.4.4 Brotes causados por *L. pneumophila* en Instituciones Hospitalarias asociados al Cuidado de la Salud

Se relacionan los brotes presentados a nivel hospitalario y que de acuerdo con el estudio de caso se asociaron a la Atención y al Cuidado de la Salud; además, se describe la fuente de contaminación asociada al brote, así como la especie de *Legionella* identificada en la tabla 3.

Se describen 12 casos presentados de 2010 a 2018, a nivel mundial, 7 de ellos se originaron en Estados Unidos, 2 en Europa, 1 en Canadá, 1 en Australia y a nivel latinoamericano un caso reportado en Colombia.

En Colombia, en el año 2011, en la ciudad de Medellín, se reportaron dos casos de neumonía adquirida intrahospitalariamente por *L. pneumophila* serogrupo 1, en dos pacientes con Leucemia, resultando positivo la prueba de antígeno urinario (Betáncur-jiménez et al., 2011). Por otra parte, en el año 2017, se publicó un estudio observacional retrospectivo, donde a través de datos registrados en el sistema de registros de salud personal (*Registro Individual de Prestación de Servicios*, RIPS), en el período comprendido entre 2009 y 2013, se estimaron las tasas brutas y ajustadas de incidencia (casos/100.000 habitantes) (Patiño-Barbosa et al., 2017).

Tabla 4. Brotes Asociados a la Atención y al Cuidado de la Salud

AÑO	LUGAR	FUENTE DE INFECCIÓN	DESCRIPCIÓN	AISLAMIENTO	ACCIONES TOMADAS	BIBLIOGRAFIA
2010	Wisconsin, Estados Unidos	Fuente de agua decorativa de Institución hospitalaria	En un hospital ocho pacientes desarrollaron enfermedad del legionario confirmada por laboratorio, seis de estos pacientes estuvieron expuestos a una fuente de agua decorativa de pared.	Aislamiento Clínico: <i>Lp1</i> - Aislamiento ambiental: <i>Lp1</i>	Limpieza de instalaciones, recomendaciones para evitar tener fuentes decorativas en Instituciones hospitalarias,	(Haupt et al., 2012)
2010	Eslovenia, Liubliana	Sistema de suministro de agua	En un hogar de ancianos, se diagnosticaron 10 pacientes con Enfermedad de Legionario identificándose <i>L. pneumophila</i> serogrupo 1, serogrupo 2-14; además se tomaron 64 muestras ambientales resultando 51 positivas para el patógeno.	Aislamiento Clínico: <i>Lp1</i> – serogrupos 2-14 ST23 Aislamiento ambiental: <i>Lp1</i> ST23	No descritas en la publicación	(Skaza et al., 2012)
2011	Colombia, Medellín	Asociado a la Atención y al Cuidado de la Salud	Se presentaron 2 casos de neumonía por <i>L. pneumophila</i> serogrupo 1, en una Clínica Hemato-oncológica en Medellín, en pacientes con Leucemia, resultado positivo en la prueba de antígeno urinario.	Aislamiento Clínico: <i>Lp1</i>	No descritas en la publicación	(Betáncur-jiménez et al., 2011)
2011 - 2012	Pensilvania, Estados Unidos	Sistema de Agua Hospitalario	Se identificaron 5 casos de Enfermedad de Legionario confirmados como asociados con el Cuidado y Atención de la Salud y 17 definidos como casos	Aislamiento Clínico: <i>Lp1</i> - Secuencia: ST1359	Cerramiento de Instalaciones, Sobrecalentamiento,	(Demirjian et al., 2015)

			probables. De los 25 puntos muestreados de agua potable de la Institución hospitalaria, en 23 se aisló. Estudios moleculares mostraron que 11 aislamientos ambientales eran idénticos a 3 aislamientos clínicos. Los niveles de cobre y plata de las muestras de agua eran óptimos para evitar el crecimiento del patógeno; sin embargo, la bacteria fue capaz de crecer allí.	Aislamiento ambiental: <i>Lp1-L. anisa-</i> Secuencia: ST1359	Hipercloración, Instalación de un goteo de cloro	
2012	Pittsburg, Pensilvania, Estados Unidos	Sistema de Agua Hospitalarios	Brote en un centro asistencial de veteranos asociado con la Atención de Salud, se recolectaron un total de 42 muestras entre agua e hisopados de grifos, resultando positivo para <i>L. pneumophila</i> en 22 muestras de agua y en 12 muestras de hisopos; por otra parte, se aisló en 2 muestras de agua y en 2 muestras de hisopo <i>Legionella pneumophila</i> .	Aislamiento Clínico: <i>L. pneumophila</i> Aislamiento ambiental: <i>L. pneumophila</i> y <i>Legionella pneumophila</i>	No referenciadas en la publicación.	(Decker et al., 2018)
2013	Ohio, Estados Unidos	Torre de Enfriamiento que utiliza un sistema automatizado de suministro de biocidas	En un centro de atención de largo plazo, se identificaron 39 casos de Enfermedad de Legionario y 6 de estos casos resultaron mortales.	Aislamiento Clínico: <i>Lp1</i> - Secuencia: ST222 Aislamiento ambiental: <i>Lp1</i> - Secuencia: ST222	No referenciadas en la publicación	(Quinn et al., 2015)

2013	Brisbane, Australia	Sistema de Agua Caliente de Institución Hospitalaria	Brote en Institución Hospitalaria, donde se identificaron dos pacientes positivos por cultivo para <i>L. pneumophila</i> . En el estudio ambiental se recuperó al patógeno de siete puntos del Sistema de Agua Caliente. La tipificación molecular demostró asociación entre aislamientos clínicos y ambientales.	Aislamiento Clínico: <i>Lp1</i> - Secuencia: ST1 Aislamiento ambiental: <i>Lp1</i> - Secuencia: ST1	No referenciadas en la publicación	(Graham et al., 2014)
2013 - 2015	Pittsburgh, Estados Unidos	Asociado a la Atención y Cuidado de la Salud	En un centro de atención de veteranos, se presentaron 1579 casos de neumonía, siendo <i>L. pneumophila</i> el 1% de los casos de neumonía y el 0,46% neumonía asociada a la Atención en Salud	No estudiado	No referenciadas en la publicación	(Decker et al., 2016)
2014	Alabama, Estados Unidos	Sistema de Agua Potable de la Unidad Hemato-Oncológica	En una Unidad Hemato Oncológica en un período de 12 semanas se identificaron 10 casos de Legionelosis; 6 fueron casos confirmados y 4 casos probables. En el estudio ambiental se mostraron 10 sitios diferentes de la unidad y en 9 se aisló <i>L. pneumophila</i> .	Aislamiento Clínico: <i>Lp1</i> - Secuencia: ST36 Aislamiento ambiental: <i>Lp1-Lp13</i> -Secuencia: ST36	No referenciadas en la publicación	(Francois Watkins et al., 2017)
2014	Sherbrooke -Canada	Sistema de Agua Caliente de Institución Hospitalaria	Se presentaron 2 casos de Legionelosis asociados a la Atención y al Cuidado de la Salud en una Institución Hospitalaria Universitaria de atención terciaria. Se hizo búsqueda de <i>L. pneumophila</i> en el Sistema de Agua Caliente hospitalario; se identificó al patógeno en grifos, en baños y lavados, así como en el intercambiador de calor para precalentar el agua caliente del hospital.	Aislamiento Clínico: <i>Lp5</i> - Secuencia: ST1427 Aislamiento ambiental: <i>Lp5</i> Secuencia: ST1427	No referenciadas en la publicación	(Bédard, Lévesque, et al., 2016)

2014 - 2015	Michigan, Estados Unidos	Sistema de Agua hospitalaria	Durante el período de 2014 y 2015, se presentaron 2 brotes en el condado de Genesee, se compararon secuencias de genoma completo de 10 aislamientos clínicos y 103 aislamientos de agua. Los aislamientos pertenecientes a 1 clado, que incluyeron 3 aislamientos clínicos, 3 aislamientos de muestras de aguas hospitalarias y un aislamiento de muestra de agua de una residencia.	Aislamiento Clínico: <i>Lp1</i> - Secuencia: ST1 Aislamiento ambiental hospitalario: <i>Lp6</i> Secuencia: ST2518	No referenciadas en la publicación	(Strains et al., 2019)
2018	España, San Sebastián	Grifo de la habitación del paciente	Paciente de 66 años fue internado en el hospital por pérdida progresiva de fuerza, en el mes de abril desarrollo un cuadro clínico agudo respiratorio, requiriendo ventilación mecánica. Se realizaron pruebas para Legionella, resultando positivo el antígeno urinario, la PCR multiplex realizada al esputo y al aspirado traqueal detecto <i>Legionella sp.</i> El cultivo resulto negativo. El estudio ambiental del caso revelo la presencia de la bacteria en el grifo de la habitación, donde se alojó el paciente.	Aislamiento Clínico: <i>Legionella sp</i> Aislamiento ambiental hospitalario: <i>Lp3</i> Secuencia: ST1341	No referenciadas en la publicación	(Vicente et al., 2019)

4.4.5 Presencia de *L. pneumophila* en Sistemas Hídricos Hospitalarios

Se describen en la Tabla No. 4, tres casos de 2015 a 2019, de la presencia del patógeno en sistemas hídricos hospitalarios a nivel mundial, dos de ellos reportados en Polonia y otro reportado en Canadá.

Tabla 5 Presencia de *L. pneumophila* en Instituciones hospitalarias.

AÑO	LUGAR	FUENTE DE INFECCIÓN	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA	BIBLIOGRAFIA
2015	Lublin, Polonia	Sistema de Agua caliente hospitalaria	En entidades hospitalarias se analizaron 168 muestras, provenientes de 12 hospitales, de las cuales en 132 muestras se recuperó el patógeno correspondiendo a un 78,57%. De acuerdo con las leyes Polacas "Sobre la calidad de agua destinada al consumo humano", el número de bacterias del género <i>Legionella</i> debe ser inferior a 100 UFC en 100 mL de muestra de agua; Teniendo en cuenta lo anterior, los hallazgos encontrados en hospitales evidencian que en 4 Instituciones hospitalarias se encuentra la bacteria, pero se cumple con el mínimo establecido en la norma, en 7 de ellas se halló la bacteria con un recuento de 100-1000 UFC en 100 mL de muestra de agua y en una única entidad hospitalaria se halló en rango alto, es decir, mayor a 1000 UFC en 100 mL de muestra de agua, se identificó la bacteria en unidades de cuidado intensivo y en unidades de quimioterapia. Cabe resaltar que, de acuerdo con la normatividad vigente en este país, en entidades hospitalarias donde se	Únicamente se realizaron cultivos.	(Sikora et al., 2015)

			atienden pacientes inmunosuprimidos el recuento de UFC de la bacteria debe ser cero.		
2015	Polonia, Varsovia	Sistema de Agua Caliente Hospitalaria	<p>Durante siete años se recolectaron 134 muestras ambientales de dos hospitales y se evaluó la presencia de la bacteria en los sistemas de agua, a pesar de realizar procedimientos de desinfección.</p> <p>Este estudio, muestra la colonización permanente por Legionella en las dos entidades hospitalarias a pesar de aplicar desinfección por dióxido de cloro en ambos hospitales y en uno de ellos adicionalmente se desinfecto con choque térmico.</p>	<p>Secuencias detectadas en el hospital A: ST835 Sg6, ST114 Sg6,</p> <p>Secuencias detectadas en el hospital B: ST1, ST87, ST114, ST992</p>	(Pancer et al., 2013)
2019	Montreal, Canadá	Sistema de Agua Caliente hospitalaria	Se evaluó el sistema de agua caliente hospitalaria, se tomaron muestras de manera sucesiva, de grifo, tubería intermedia y tubería principal de flujo ascendente. 32 muestras resultaron positivas para el patógeno. Se realizó Tipificación Basada en Secuencia (SBT), identificando dos tipos de secuencia; la secuencia ST378 (sg4/10), se detectó en el 91% de las muestras y la secuencia ST154 (sg1) se detectó en el 41% de las muestras y ambos ST se identificaron de manera simultánea en las muestras en un 34%. Todos los ST detectados evidenciaron tolerancia comparable a la exposición al cobre (0,8-5 mg/L) y a la temperatura (55°C,1h).	<p>ST378 (sg4/10)</p> <p>ST154 (sg1)</p>	(Bédard et al., 2019)

4.5 Normatividad para el control de *L. pneumophila*

Debido a que *L. pneumophila* es capaz de colonizar los Sistemas Hídricos y formar biopelículas para persistir en estos ambientes, a nivel mundial se han creado e implementado diferentes normativas que proporcionan pautas para contener el crecimiento y desarrollo del patógeno con el propósito de evitar brotes a nivel comunitario y hospitalario al generarse aerolización en estos ambientes.

A continuación, se describen las principales regulaciones desarrolladas a nivel Internacional y nacional, algunas son recomendaciones para seguir y otras son exigencias para la Gestión del Riesgo del Patógeno.

4.5.1 Normatividad Internacional para el control de *L. pneumophila*

Existen diferentes regulaciones a nivel mundial, para el control y prevención de *L. pneumophila* en los sistemas de agua; a continuación, se describirán las principales normatividades que se llevan a cabo en diferentes países para prevenir el establecimiento de la bacteria en estos sistemas con el fin de evitar el desarrollo de brotes:

- Organización Mundial de la Salud (OMS): La OMS proporciona información y orientación sobre la evaluación y gestión de *Legionella* en siete documentos principales, los cuales están relacionados en la tabla 4. Estos documentos hacen una revisión del estado actual sobre el impacto de *Legionella* en la salud; además proporcionan una descripción general de las fuentes de contagio, la ecología de la bacteria y su identificación en el laboratorio; por otra parte, estos documentos proveen orientación sobre la evaluación de gestión del riesgo asociados con ambientes potencialmente peligrosos; así mismo los documentos identifican medidas necesarias para prevenir y controlar adecuadamente el riesgo de exposición a *Legionella* en ambientes particulares y proporciona recomendaciones acerca de las temperaturas adecuadas en las cuales debe permanecer el agua, siendo favorable mantener el agua fría por debajo de 25°C y de ser posible por debajo de 20°C. En cuanto a la temperatura del agua caliente la OMS no brinda información cuantitativa; sin embargo enfatiza en la importancia de controlar la producción y proliferación de aerosoles que contengan la bacteria (Kenhove et al., 2019).

A continuación, se describen los documentos publicados por la Organización Mundial de la Salud referentes con el control y prevención de Legionelosis:

Tabla 6 Principales Documentos presentados por la OMS para Información, Orientación, Evaluación y Gestión del Riesgo sobre *Legionella*

Documentos OMS para <i>Legionella</i>	Descripción de la norma	Referencia
Epidemiología, Prevención y Control de la Legionelosis	Presentación clínica de la infección por <i>Legionella</i> , epidemiología general, vigilancia y reportes, Prevención y Control.	("Epidemiology, Prevention and Control of Legionellosis: Memorandum from a WHO Meeting.," 1990)
"Normas de Vigilancia Recomendadas"	Documento referente para todas las enfermedades transmisibles y síndromes asociados con programas de control de la OMS.	(World Health Organization. WHO, n.d.-f)
"Directrices para la calidad del agua potable"	Regulaciones del agua y la salud; formulaciones de políticas para el desarrollo de estándares nacionales, incluye orientación sobre la garantía de la seguridad microbiana del agua	(World Health Organization. WHO, n.d.-c)
"Revisión de la normativa sanitaria internacional"	Finalidad y alcance: prevenir la propagación internacional de enfermedades, controlar su propagación y restringir el riesgo para la Salud Pública. Señala la obligación de los estados para instalar capacidades mínimas en cuanto a Salud Pública.	(World Health Organization. WHO, n.d.-e)
"Directrices para entornos seguros de agua recreativa"	Revisión y evaluación de los peligros para la salud asociados con las aguas de recreo, su seguimiento y evaluación; Actividades disponibles para su control a través de la educación de usuarios, buen diseño, construcción, buen funcionamiento y gestión.	(World Health Organization. WHO, n.d.-d)
"Guía para el saneamiento de buques"	Presenta la importancia de aplicar medidas de control adecuadas en buques, para controlar los peligros que puedan surgir en los barcos, así mismo, brinda un marco para la formulación de políticas y la toma de decisiones locales.	(World Health Organization. WHO, n.d.-a)
"Legionella y la prevención de Legionelosis"	Descripción completa y general de las fuentes, la ecología y la identificación de laboratorio de <i>Legionella</i> . Proporciona orientación sobre la evaluación y gestión de riesgos asociados con entornos potencialmente peligrosos, como torres de	(World Health Organization. WHO, n.d.-b)

	enfriamiento, piscinas y baños de spa. Medidas para prevenir, o controlar adecuadamente, el riesgo de exposición a la bacteria <i>Legionella</i> para cada ambiente en particular.	
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

- Unión Europea: La unión Europea desde el año 1986 conformo el grupo de trabajo europeo para las infecciones por *Legionella*, este grupo es coordinado y administrado por el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades en Suecia (*European Working Group for Legionella Infections. The European Working Group for Legionella Infections*, n.d.). Todas las pautas técnicas dadas por este grupo apoyan a todos los estados miembros de la comisión europea (*European Working Group for Legionella Infections. Technical Guidelines for the Investigation, Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires' Disease*, n.d.) y proporciona medidas para instalaciones de agua fría y caliente; además este grupo suministra información para limitar la infección basado en los siguientes principios: Plan de evaluación y gestión de riesgos en combinación con mediciones periódicas, monitoreo constante de la temperatura de los tanques de almacenamiento de agua para evitar el crecimiento de *L. pneumophila* y por último evitar el estancamiento de aguas en ciertas partes del sistema, previniendo la proliferación de la bacteria (Kenhove et al., 2019).

Con relación a lo anterior, en el ámbito internacional se destaca la norma Española NTP 538 "*Legionelosis: medidas de prevención y control en instalaciones de suministro de agua*", esta norma es una guía de buenas prácticas. Por otra parte, España cuenta con la norma UNE 10030 IN "*Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de la Legionella en instalaciones*"; el objetivo de esta norma es ofrecer criterios para la prevención de la contaminación de instalaciones y equipos por *Legionella pneumophila*; así mismo para el control de su multiplicación ambiental con el fin de limitar el riesgo de exposición a este agente.

- Estados Unidos: A nivel gubernamental existen 2 centros que establecen lineamientos para el control del patógeno, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM) (Kenhove et al., 2019); El CDC, determina directrices para prevención y reacción ante brotes (*Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities*, n.d.); así mismo, este Centro cuenta con una herramienta digital para implementar normas en la industria llamada "Kit de herramientas: Desarrollo de un programa de gestión del agua para reducir el crecimiento de la *Legionella* y la propagación de los edificios (Prevention, n.d.). Por otra parte, la ASTM, presenta la Guía D5952-08 "*Guía Estándar para la inspección de sistemas de agua para Legionella y la investigación de posibles brotes de legionelosis*". Esta guía da pautas frente a: posible contaminación con *Legionella* en diferentes Sistemas de Agua e identificación de uno o más casos de enfermedad de

Legionarios o fiebre de Pontiac; sin embargo, esta guía no presenta recomendaciones para limitar la multiplicación de la bacteria en los Sistemas de Agua, ni sugiere métodos de desinfección a fuentes de exposición humana, ni lineamientos para prevenir las infecciones asociadas a la atención en salud (International, n.d.).

En el año 2017, los centros de Servicios de Medicare y Medicaid (CMS), publicaron una petición que exige que todos los hospitales certificados realicen pruebas de agua potable; por otra parte, la Sociedad Americana de Calefacción, Industria de Ingenieros de Refrigeración y Aire Acondicionado (ASHRAE), establece normas y directrices a nivel industrial, con su directriz ASHRAE 12-2000 denominada “Minimizando el riesgo de legionelosis asociado con la construcción de sistemas de agua”, brinda lineamientos ambientales y operativos específicos para minimizar el riesgo de infección por *Legionella* en los sistemas de agua de construcción (Heating, n.d.-a)

Dentro de este contexto, la ASHRAE y el Instituto Americano de Estándares Nacionales (ANSI), en el año 2015, lanzaron un estándar 188-2015 llamado “Legionelosis gestión de riesgos para la construcción de sistemas de agua”, este estándar proporciona requisitos mínimos de gestión del riesgo de legionelosis para el diseño, construcción, puesta en marcha, operación, mantenimiento, reparación, reemplazo y expansión de edificios nuevos y existentes, sus sistemas y componentes de agua; así mismo, este estándar describe las condiciones ambientales que favorecen el crecimiento de la bacteria y un sistema de gestión de riesgo para ser implementado (Heating, n.d.-b).

- Asia: En el continente asiático, se puede mencionar que en China hay un código de práctica para sistemas de aire acondicionado refrigerados por agua; a su vez, existe un código denominado “Código de prácticas para la prevención de la enfermedad del legionario”, que se lleva a cabo específicamente en Hong Kong. La última edición revisada de este código proporciona estrategias para la prevención de la enfermedad del legionario, precauciones para los sistemas de calor y suministro de agua fría, siendo posible adaptar a partir de este código sugerencias para el diseño, operación, mantenimiento y manejo adecuado de instalaciones con el fin de evitar la propagación de *L. pneumophila*. Este código determina que el tanque de almacenamiento del sistema de agua caliente deberá operar a 60°C o más y en todas las tuberías de distribución antes de la válvula mezcladora o salida de grifo deben mantener la temperatura del agua a 50°C; además en salas de hospitales pediátricos, geriátricos, psiquiátricos, las salidas de agua caliente no deberá ser superior a 43°C (Kenhove et al., 2019). En Singapur, el Instituto de Epidemiología Ambiental, publicó el “Código de prácticas para el Control de la bacteria *Legionella* en torres de enfriamiento”; el propósito de este código es proporcionar pautas para la prevención y el control con el fin de evitar su aparición y minimizar el riesgo de brotes, no se mencionan niveles críticos de concentración de la bacteria, (Epidemiology, n.d.).
- Oceanía: En cuanto a este continente existen guías tanto para Nueva Zelanda como para Australia. En Nueva Zelanda existe una guía creada por el ministerio de salud denominada:

“Prevención de la Legionelosis en Nueva Zelanda: pautas para el control de la bacteria *Legionella*”, este lineamiento tiene como objetivo sensibilizar acerca de los peligros asociados con *Legionella*, mejorar posibles fuentes de contaminación con la bacteria, mejorar su notificación e investigación de casos de Legionelosis; así mismo, proporciona información actualizada, asesoría y orientación para mitigar el riesgo de contaminación en torres de refrigeración y Sistemas de distribución de agua fría y caliente (Health, n.d.). En cuanto a Australia, existen en total 25 guías, códigos y regulaciones, descritas desde el año 1988, actualizadas en el año 1999 y a partir del año 2004, un código de prácticas para el control de la enfermedad del Legionario (Kenhove et al., 2019); además, existe una guía para desarrollar planes de gestión de riesgos para sistemas de torres de enfriamiento, diseñada básicamente para la industria, proporcionando bases para controlar el crecimiento de la bacteria en torres de enfriamiento (Services, 2001)

- África: En el continente Africano, únicamente Sudáfrica cuenta con “Regulaciones para agentes biológicos peligrosos”, en las cuales se encuentra incluida *Legionella*, cabe resaltar que esta guía es genérica y aplicable a todas las entidades biológicas peligrosas sin dar pautas específicas para *Legionella* (Kenhove et al., 2019).
- Suramérica: En cuanto América del Sur, se cuenta con registro que, en Brasil, *Legionella* no es una enfermedad de notificación obligatoria. La bacteria *Legionella*, está incluida en la ley Federal 6.938/81; esta ley ambiental afirma que en los casos de infección por el patógeno, serán responsables las partes involucradas de tomar medidas para prevenir su proliferación (Kenhove et al., 2019). En Colombia existe la Norma Técnica Colombiana GTC 257 “Guía para la Prevención y Control de la Proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones”, esta guía se abordará más ampliamente a continuación.

4.5.2 Normatividad Nacional para el control de *L. pneumophila* en Sistemas de agua:

En Colombia, desde el año 2015 existe la Guía Técnica Colombiana GTC 257:2015 “Guía para la Prevención y Control de la Proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones”; esta guía corresponde a una adopción modificada de UNE 100030 IN:2005. La norma colombiana brinda diferentes criterios y acciones necesarias que ayudaran a la prevención y control de la multiplicación del patógeno, teniendo en cuenta ciertas instalaciones y equipos, contribuyendo a que la enfermedad causada por la bacteria no se extienda de manera epidémica dentro del territorio. La norma no determina los límites de crecimiento bacteriano para *L. pneumophila*; sin embargo, dictamina y estipula medidas preventivas para diferentes sistemas de agua y tipos de instalación. En esta norma tampoco se determinan las acciones a seguir cuando se presenten casos de Legionelosis, pues esto les compete a las autoridades sanitarias.

Esta norma presenta generalidades de la bacteria, penetración de esta en los circuitos de agua, su multiplicación en el agua, modo de dispersión del agua contaminada con las bacterias en el aire,

exposición a varios individuos; además, presenta las instalaciones de mayor riesgo entre las que se encuentran torres de refrigeración, condensadores evaporativos, instalaciones de agua caliente para uso sanitario con volumen de acumulación mediana y grande, piscinas, tinas o bañeras de agua climatizada con agitación y dentro de las instalaciones de menor riesgo se encuentran, instalaciones interiores de agua fría para consumo humano, instalaciones de agua caliente sanitaria de bajo volumen de acumulación y equipos de enfriamiento.

La Guía Técnica Colombiana presenta acciones preventivas basadas en dos tipos de actuaciones; una corresponde a las acciones encaminadas a reducir la probabilidad de multiplicación de la bacteria en la que incluye las condiciones de diseño, limpieza y desinfección; y la otra está dirigida al control de aerosoles. Con respecto a las condiciones que debe seguir el agua caliente sanitaria con depósito de acumulación de edificios, hospitales, clínicas, hoteles, residencias, balnearios, viviendas, cuarteles, cárceles y complejos turísticos; la temperatura de distribución de esta debe ser superior a 50°C y que la temperatura de almacenamiento debe ser en todo momento igual a 50°C; a parte, el sistema de calentamiento debe ser capaz de elevar la temperatura del agua hasta 70°C o más para su desinfección.

4.6 Estrategias para la prevención de infección por *L. pneumophila* en hospitales

Dentro de las medidas de control ambiental para la prevención de infección por *L. pneumophila*, se destaca la estrategia de limpieza de los suministros de agua y tanques de almacenamiento; y métodos de desinfección químicos y térmicos. Los métodos químicos se basan en la aplicación de desinfectantes de iones metálicos (cobre y plata), agentes oxidantes que contienen compuestos halógenos como cloro, yodo, bromo, dióxido de cloro, cloraminas e hidantoínas halogenadas. Otros agentes oxidantes como ozono y peróxido de hidrógeno; agentes no oxidantes como cetonas heterocíclicas, guanidinas, tiocarbamatos, aldehídos, aminas, tiocianatos, amidas y glicoles halogenados. Es importante resaltar que son más efectivos los agentes oxidantes que los no oxidantes (Lim & Kim, 2002). Aunque estos métodos son muy efectivos en el control y contención del patógeno, también pueden llegar a presentar algunas desventajas; específicamente el dióxido de cloro, aunque es un método muy útil en la eliminación del patógeno y las biopelículas que forma, presenta la desventaja de corroer las tuberías de hierro fundido; mientras que los métodos de cloración continua del agua pueden provocar sabores y olores desagradables, así como irritación de la piel, los ojos, y las membranas mucosas, adicionalmente el cloro es corrosivo y acorta la vida útil de las tuberías de metal (Springston & Yocavitch, 2017).

Se han desarrollado nuevas formulaciones para el control de *Legionella pneumophila* en las redes de agua caliente de entidades hospitalarias, una de estas estrategias está basada en la limpieza con peróxido de hidrógeno y sales de plata, donde se demostró que el efecto a largo plazo de este desinfectante ayuda a la contención del patógeno (Girolamini et al., 2019). Otro sistema de control

se basa en la desinfección de los sistemas de agua caliente mediante la aplicación de monocloramina, resultando ser un desinfectante químico confiable en la eliminación de la bacteria (Coniglio et al., 2018).

Otra de las medidas empleadas, son los tratamientos a través de choque térmico manteniendo una temperatura constante entre 55°C a 60°C y desinfección con dióxido de cloro, desinfectantes a base de cloro, limpieza y reemplazo de duchas y grifos (Montagna et al., 2018). Otro método empleado en la desinfección térmica del patógeno es la pasteurización, basada en el sobrecalentamiento y enjuague; en este procedimiento se eleva la temperatura del agua caliente entre 71°C y 77°C, para que en las salidas de agua se alcance una temperatura de por lo menos 65°C, seguido a esto las salidas deben enjuagarse a esta temperatura durante 10 y 30 minutos; el método de pasteurización se selecciona preferiblemente sobre otros métodos por no necesitar un equipo adicional o especial y se puede implementar rápidamente (Whiley et al., 2017); desafortunadamente, este método proporciona mejoras a corto plazo, dado que *L. pneumophila* puede recolonizar los sistemas de agua rápidamente en semanas o meses después del tratamiento (Springston & Yocavitch, 2017).

Un método físico empleado en el control de *L. pneumophila* es la filtración en punto de uso (POU), este método está diseñado para tratar cantidades pequeñas de agua, generalmente están conectados a grifos, existen diferentes sistemas de filtración entre los que se incluyen la ultrafiltración, la microfiltración, nanofiltración y ósmosis inversa, este sistema debe ser impulsado por presión o vacío y debe ser capaz de eliminar partículas mayores a 1 micrómetro (Springston & Yocavitch, 2017). Este método es útil como medida de desinfección secundaria en pro de disminuir la transmisión de *L. pneumophila* que pueda persistir a pesar del uso de otros tratamientos físicos y químicos, su vida útil es corta y la obstrucción de la membrana han limitado su uso. En un estudio publicado en el año 2014, se evaluaron los filtros colocados en grifos en un centro médico de cáncer del noroeste de Pensilvania, cinco lavados estaban equipados con los filtros y 5 lavados que carecían de ellos fueron utilizados como controles, se recolectó agua caliente a través de estos grifos durante 17 semanas en búsqueda de *Legionella*. Durante las primeras 12 semanas no hubo recuperación de la bacteria y en la semana 13 hubo crecimiento de 1 UFC/mL únicamente en uno de los puntos, en las siguientes semanas no se presentó desarrollo del patógeno hasta completar las 17 semanas, por otra parte, los grifos utilizados como controles presentaron crecimiento de la bacteria desde la semana 5 hasta la semana 17 con recuentos de UFC en promedio de 292,4/mL y con recuentos que van desde 1-10 UFC/mL a 1150 UFC/mL, estos resultados evidencian que los filtros en punto de uso son efectivos en la eliminación de la bacteria, ya que se mostró una disminución estadísticamente significativa de la presencia de la bacteria en aquellos grifos que contenían los filtros, comparados con los grifos que no tenían el filtro empleados como controles (Baron et al., 2014); Otro estudio llevado a cabo en un Centro de Cuidados Intensivos en la ciudad de Ontario, Canadá, donde se evaluaron nuevos filtros para grifos y duchas clasificados para uso de 62 días, se recolectaron semanalmente muestras de agua caliente durante 12 semanas y se buscó la presencia de *Legionella*, se utilizaron como controles 5 grifos y 5 duchas, los resultados obtenidos demuestran que los grifos de control tuvieron una positividad para la bacteria significativamente mayor que los grifos filtrados (60% vs 0%), estos estudios donde se evalúa la

efectividad de los filtros demuestran que este método es útil para prevenir la Enfermedad del Legionario en centros de atención médica (Parkinson et al., 2020).

La Luz Ultravioleta es otro método físico empleado en la desinfección de los Sistemas de Agua (Lim & Kim, 2002), el cual ha resultado ser efectivo en el control de *L. pneumophila*, un estudio que evaluó la eficacia de la irradiación ultravioleta en agua hospitalaria colonizada con el patógeno, en este estudio se insertó un sistema de lámpara UV en una tubería de agua caliente, se recolectaron muestras durante cuatro meses antes y después del tratamiento con luz UV de la unidad donde estaba presente la lámpara y de puntos distales, encontrando que la irradiación fue efectiva inmediatamente después de la desinfección, los resultados mostraron < a 10 UFC/L, este estudio demuestra que este método físico es efectivo en la eliminación del patógeno, pero debe ser combinado con otro método de desinfección para lograr eliminar totalmente el patógeno y evitar la recolonización y formación de biopelículas en los sistemas de agua (Franzin et al., 2002).

5. Conclusiones

Este trabajo incluyó la revisión de 156 artículos en inglés y español, publicados en las bases de datos PubMed, Elsevier, ProQuest, Ebsco, Google académico y Lilacs, que cumplieran con los criterios de inclusión de contener información de texto completo sobre brotes, brotes asociados con la Atención y el Cuidado de la Salud, presencia de la bacteria en sistemas de agua hospitalaria, normatividad sanitaria y que fueron publicados del año 2010 al año 2021; además, se incluye información de páginas webs de Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Organización Mundial de la Salud (OMS) y LegionellaDB, adicionalmente, se revisaron estudios anteriores para complementar información del patógeno.

De acuerdo con la revisión realizada, *L. pneumophila*, es una bacteria aerobia estricta, cuyo hábitat natural corresponde a fuentes de aguas naturales, pero también puede estar presente en sistemas de aguas artificiales como torres de enfriamiento, piscinas, jacuzzis, sistemas de agua caliente de grandes edificios y hospitales, en estos lugares puede encontrarse libre de manera planctónica o asociada a biopelículas; además puede soportar temperaturas entre 20°C y 42°C. Esta bacteria se caracteriza por poseer un ciclo de vida bifásico, el cual comprende una fase replicativa que se presenta cuando esta intracelularmente en sus células hospederas naturales, protozoos ciliados, amebas del género *Acanthamoeba* y algunos nemátodos y en sus células hospederas accidentales los macrófagos alveolares en humanos. La otra fase de su ciclo de vida es la fase transmisiva, donde la bacteria no se replica, pero permanece viable hasta que encuentre otro hospedero susceptible de parasitar. *L. pneumophila*, cuenta con factores de virulencia ampliamente desarrollados que le permiten adaptarse en cada una de las etapas de su ciclo bifásico, entre los que cabe mencionar, flagelos, pilis, proteínas de membrana, Lipopolisacárido, Sistemas de Secreción Tipo II (TSS2) y Tipo IV (TSS4).

Por otra parte, *L. pneumophila*, es capaz de producir enfermedad en humanos de manera accidental, cuando está presente en fuentes de agua tanto naturales como artificiales se aeroliza y esos aerosoles contaminados con la bacteria son inhalados por los humanos, llegando hasta el macrófago alveolar en los pulmones. Este patógeno, produce dos entidades clínicas, la primera corresponde a la *Enfermedad de Legionario* o *Legionelosis*, una enfermedad pulmonar caracterizada por un cuadro de neumonía atípica, que se presenta generalmente en pacientes con factores de riesgo asociados como ser mayor a 50 años, tabaquismo, sufrir de enfermedad obstructiva crónica, cursar con tratamientos de glucocorticoides, sufrir de algún tipo de cáncer y

en pacientes inmunosuprimidos la enfermedad puede avanzar fuera del pulmón. La segunda entidad clínica corresponde a *Fiebre de Pontiac*, que se caracteriza por ser un cuadro similar al estado gripal que generalmente es autolimitado.

La capacidad que posee *L. pneumophila* de producir enfermedad ha dado origen a varios brotes asociados a la comunidad o relacionados con la Atención y el Cuidado de la Salud. Los casos denominados como brotes reportados en la comunidad tienen origen en 1976 en Filadelfia, Estados Unidos, durante la convención de la Legión Americana, de allí adquiere el nombre de *Enfermedad del Legionario*; desde ese momento se han reportado varios brotes a nivel mundial estableciendo como fuente de infección, torres de enfriamiento, piscinas, spas, aguas de acueductos municipales, sistemas de agua de edificaciones residenciales u hoteles. En cuanto, a los casos concernientes con brotes presentados en la Atención y el Cuidado de la Salud, de acuerdo con la revisión realizada durante los últimos diez años, se evidencia que en este período se presentaron a nivel mundial 11 brotes en Instituciones hospitalarias asociados a la Atención y al Cuidado de la Salud, en nueve de ellos, se determinó que la fuente de la enfermedad estuvo relacionada con el Sistema de Agua Hospitalaria, en uno de ellos la causa se debió a una torre de enfriamiento que suministraba biocidas y en otro no se detectó la fuente, pero los pacientes de un centro de veteranos desarrollaron la enfermedad estando alojados en la institución hospitalaria.

Adicional a lo anterior, se buscó en la literatura, publicaciones referentes a la presencia del patógeno en sistemas de aguas hospitalarias, encontrando tres publicaciones, que coincidieron en hallar *L. pneumophila* en el Sistema de Agua Caliente de estas edificaciones. Las publicaciones en las bases de datos consultadas evidencian que los brotes presentados en Instituciones hospitalarias, así como la búsqueda activa del patógeno en Sistemas de Agua hospitalaria se centra a nivel de Estados Unidos, Asia y Europa. En Latinoamérica, en países diferentes a Colombia no hay registros del patógeno a nivel hospitalario ni como un microorganismo causante de brotes.

En Colombia, de acuerdo, a la búsqueda realizada en las bases de datos consultadas, se encuentra un reporte de caso del año 2011, en una clínica hemato-oncológica de la Ciudad de Medellín, donde dos pacientes con Leucemia desarrollan neumonía asociada a la Atención y al Cuidado de la Salud, resultando positivo la prueba de antígeno urinario. Por otra parte, en la consulta realizada, no se evidencia búsqueda activa del patógeno en los sistemas de agua de Instituciones hospitalarias.

Teniendo en cuenta, que *L. pneumophila*, está presente en los Sistemas de Aguas comunitarias u hospitalarias y que este hecho puede conducir a una condición clínica, causando enfermedad, lleva a establecerse una Normatividad en diferentes países para el control del patógeno en estos sistemas y a desarrollar medidas de control para contener la presencia de la bacteria. En cuanto a la normatividad se destacan los documentos elaborados por la OMS, la norma española NTP 538 y la norma UNE 10030, los lineamientos para el control del patógeno del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM).

En Colombia, existe la Guía Técnica Colombiana GTC 257 “*Guía para la Prevención y Control de la Proliferación y diseminación de Legionella en instalaciones*”; esta norma brinda diferentes criterios y acciones necesarias que ayudaran a la prevención y control de la multiplicación del patógeno.

En cuanto a las medidas de control para contener la presencia de la bacteria se cuentan con métodos químicos, físicos y la combinación entre estos, los métodos químicos se basan en la aplicación de sustancias químicas entre las que se incluyen iones metálicos de cobre y plata, agentes oxidantes a base de cloro, yodo, bromo, dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno y monocloramida a las líneas de distribución de agua principales y auxiliares. En cuanto a los métodos físicos, se relacionan con la aplicación de pasteurización, filtración en punto de uso y luz ultravioleta a estos sistemas. Por último, la combinación de estos dos métodos se basa en realizar choque térmico, elevando la temperatura entre 55°C a 60°C y seguido a ello aplicar Dióxido de cloro.

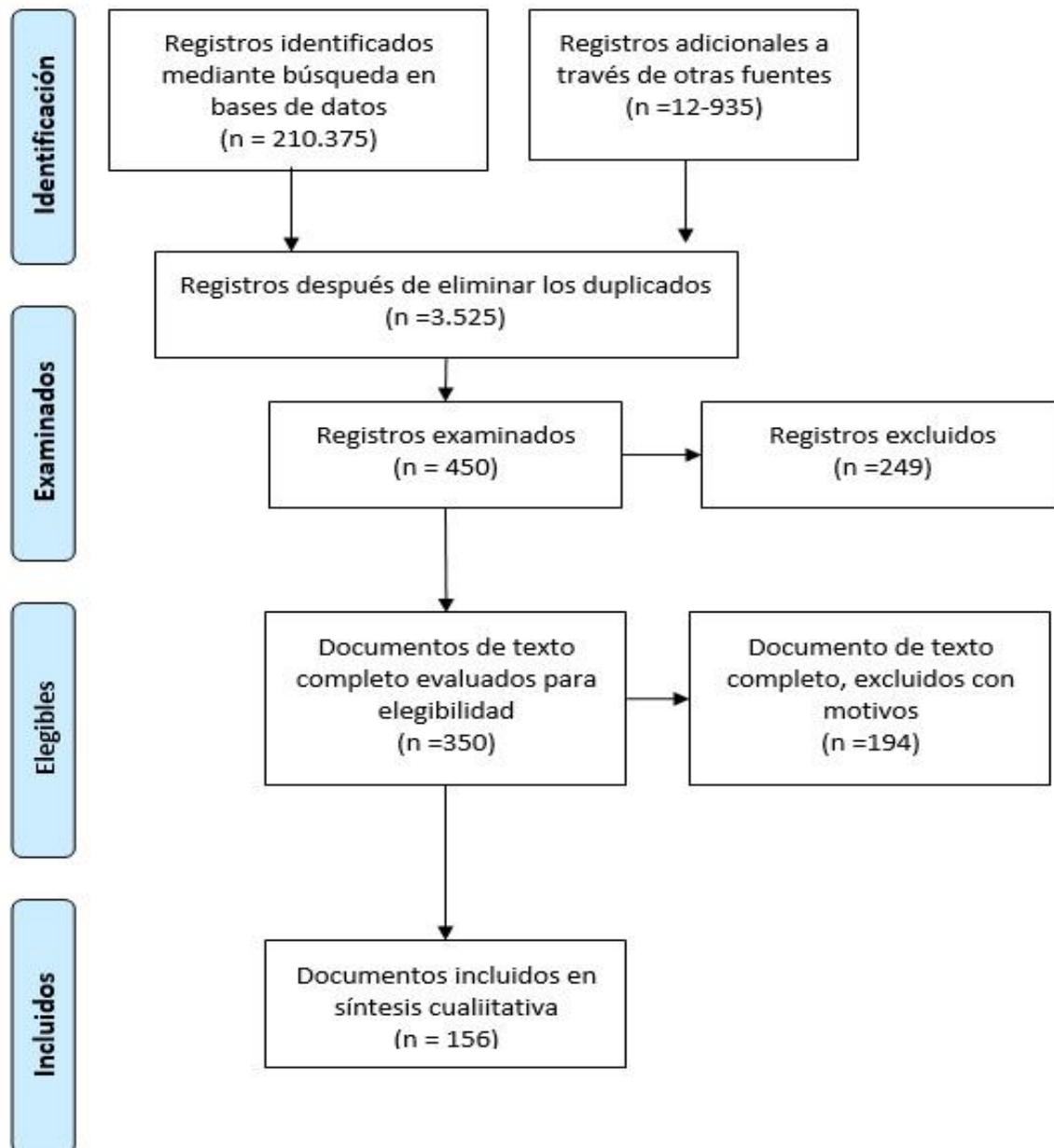
En Colombia existe un subregistro de la presencia del patógeno, es por ello que a nivel hospitalario es importante realizar una búsqueda activa de *L. pneumophila*, tanto en pacientes con cuadros clínicos de neumonía como en Sistemas de Agua Caliente, ya que como se ha descrito anteriormente, esta bacteria puede estar presente en los suministros de agua y ser responsable de casos graves de neumonía nosocomial, especialmente en pacientes alojados en Unidades de Cuidado Crítico y unidades hematooncológicas. El estudio de la presencia de este microorganismo en entidades clínicas debería llevar a la toma de medidas de contención que ayuden a controlar el riesgo de Infecciones Intrahospitalarias.

6. Anexos

6.1 Anexo 1 Diagrama de flujo Prisma



PRISMA 2009 Flow Diagram



Referencias

- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D. E., & Guyard, C. (2013). Biofilms: The stronghold of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(11), 21660–21675. <https://doi.org/10.3390/ijms141121660>
- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Prashar, A., Rao, C., Ginevra, C., Jarraud, S., Low, D. E., Ensminger, A. W., Terebiznik, M. R., & Guyard, C. (2014). The *Legionella pneumophila* collagen-like protein mediates sedimentation, autoaggregation, and pathogen-phagocyte interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(4), 1441–1454. <https://doi.org/10.1128/AEM.03254-13>
- Abu Khweek, A., & Amer, A. O. (2018). Factors mediating environmental biofilm formation by *Legionella pneumophila*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*(FEB), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00038>
- Appelt, S., & Heuner, K. (2017). The flagellar regulon of *Legionella*-A review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*(OCT), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00454>
- Arasaki, K., Kimura, H., Tagaya, M., & Roy, C. R. (2018). *Legionella* remodels the plasma membrane-derived vacuole by utilizing exocyst components as tethers. *Journal of Cell Biology*, *217*(11), 3863–3872. <https://doi.org/10.1083/jcb.201801208>
- Arslan-Aydoğdu, E. Ö., & Kimiran, A. (2018). An investigation of virulence factors of *Legionella pneumophila* environmental isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, *49*(1), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.03.012>
- AU - Jung, A. L., AU - Hoffmann, K., AU - Herkt, C. E., AU - Schulz, C., AU - Bertrams, W., & AU - Schmeck, B. (2017). *Legionella pneumophila* Outer Membrane Vesicles: Isolation and Analysis of Their Pro-inflammatory Potential on Macrophages. *JoVE*, *120*, e55146. <https://doi.org/doi:10.3791/55146>
- Bandyopadhyay, P., Sumer, E. U., Jayakumar, D., Liu, S., Xiao, H., & Steinman, H. M. (2012). Implication of proteins containing tetratricopeptide repeats in conditional virulence phenotypes of *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology*, *194*(14), 3579–3588. <https://doi.org/10.1128/JB.00399-12>
- Barna, Z., Kádár, M., Kálmán, E., Róka, E., Szax, A. S., & Vargha, M. (2015). *Legionella* prevalence and risk of legionellosis in hungarian hospitals. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, *62*(4), 477–499. <https://doi.org/10.1556/030.62.2015.4.11>
- Baron, J. L., Peters, T., Shafer, R., MacMurray, B., & Stout, J. E. (2014). Field evaluation of a new

-
- point-of-use faucet filter for preventing exposure to Legionella and other waterborne pathogens in health care facilities. *American Journal of Infection Control*, 42(11), 1193–1196. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.08.002>
- Barry, K. C., Fontana, M. F., Portman, J. L., Dugan, A. S., & Vance, R. E. (2013). IL-1 α Signaling Initiates the Inflammatory Response to Virulent Legionella pneumophila In Vivo. *The Journal of Immunology*, 190(12), 6329–6339. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300100>
- Barton, M., McKelvie, B., Campigotto, A., & Mullooney, T. (2017). Legionellosis following water birth in a hot tub in a Canadian neonate. *Cmaj*, 189(42), E1311–E1313. <https://doi.org/10.1503/cmaj.170711>
- Beauté, J. (2017). Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. *Eurosurveillance*, 22(27), 1–8. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.27.30566>
- Bédard, E., Boppe, I., Kouamé, S., Martin, P., Pinsonneault, L., Valiquette, L., Racine, J., & Prévost, M. (2016). Combination of heat shock and enhanced thermal regime to control the growth of a persistent Legionella pneumophila strain. *Pathogens*, 5(2), 13–18. <https://doi.org/10.3390/pathogens5020035>
- Bédard, E., Lévesque, S., Martin, P., Pinsonneault, L., Paranjape, K., Lalancette, C., Dolcé, C. É., Villion, M., Valiquette, L., Faucher, S. P., & Prévost, M. (2016). Energy Conservation and the Promotion of Legionella pneumophila Growth: The Probable Role of Heat Exchangers in a Nosocomial Outbreak. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 37(12), 1475–1480. <https://doi.org/10.1017/ice.2016.205>
- Bédard, E., Paranjape, K., Lalancette, C., Villion, M., Quach, C., Laferrière, C., Faucher, S. P., & Prévost, M. (2019). Legionella pneumophila levels and sequence-type distribution in hospital hot water samples from faucets to connecting pipes. *Water Research*, 156, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.019>
- Beraud, L., Gervasoni, K., Freydiere, A. M., Descours, G., Ranc, A. G., Vandenesch, F., Lina, G., Gaia, V., & Jarraud, S. (2015). Comparison of Sofia Legionella FIA and BinaxNOW® Legionella urinary antigen card in two national reference centers. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(9), 1803–1807. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2415-9>
- Berjeaud, J. M., Chevalier, S., Schlüsselhuber, M., Portier, E., Loiseau, C., Aucher, W., Lesouhaitier, O., & Verdon, J. (2016). Legionella pneumophila: The paradox of a highly sensitive opportunistic waterborne pathogen able to persist in the environment. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00486>
- Best, A., & Kwai, Y. A. (2018). Evolution of the arsenal of Legionella pneumophila effectors to modulate protist hosts. *MBio*, 9(5), 1–16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01313-18>
- Best, A. M., & Kwai, Y. A. (2020). Immunity of metazoan hosts by Legionella pneumophila. *21(1)*, 1–28. <https://doi.org/10.1111/cmi.12971>. Evasion
- Betáncur-jiménez, C. A., Lema, M., & Arcila, G. (2011). Neumonía por Legionella en pacientes con leucemia. Presentación de dos casos. *CES Medicina*, 25(2), 213–219.
- Blyth, C. C., Adams, D. N., & Chen, S. C. A. (2009). Diagnostic and typing methods for investigating

- Legionella infection. *New South Wales Public Health Bulletin*, 20(9–10), 157–161. <https://doi.org/10.1071/nb08062>
- Boamah, D. K., Zhou, G., Ensminger, A. W., & O'Connor, T. J. (2017). From many hosts, one accidental pathogen: The diverse protozoan hosts of Legionella. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(NOV). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00477>
- Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M., & Messi, P. (2005). Water ecology of Legionella and protozoan: Environmental and public health perspectives. *Biotechnology Annual Review*, 11(SUPPL.), 355–380. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11011-4](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11011-4)
- Brown, A. S., Yang, C., Hartland, E. L., & van Driel, I. R. (2017). The regulation of acute immune responses to the bacterial lung pathogen Legionella pneumophila. *Journal of Leukocyte Biology*, 101(4), 875–886. <https://doi.org/10.1189/jlb.4mr0816-340r>
- Brown, C. L., Garner, E., Jospin, G., Coil, D. A., Schwake, D. O., Eisen, J. A., Mukhopadhyay, B., & Pruden, A. J. (2020). Whole genome sequence analysis reveals the broad distribution of the RtxA type 1 secretion system and four novel putative type 1 secretion systems throughout the Legionella genus. *PLoS One*, 15(1), e0223033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223033>
- Burillo, A., Pedro-Botet, M. L., & Bouza, E. (2017). Microbiology and Epidemiology of Legionnaire's Disease. *Infectious Disease Clinics of North America*, 31(1), 7–27. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.10.002>
- Burnside, D. M., Wu, Y., Shafaie, S., & Cianciotto, N. P. (2015). The Legionella pneumophila siderophore legiobactin is a polycarboxylate that is identical in structure to rhizoferrin. *Infection and Immunity*, 83(10), 3937–3945. <https://doi.org/10.1128/IAI.00808-15>
- Cargnelli, S., Powis, J., & Tsang, J. L. Y. (2016). Legionella pneumonia in the Niagara Region, Ontario, Canada: a case series. *Journal of Medical Case Reports*, 10(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13256-016-1105-2>
- Casson, C. N., Doerner, J. L., Copenhaver, A. M., Ramirez, J., Holmgren, A. M., Boyer, M. A., Siddarthan, I. J., Rouhanifard, S. H., Raj, A., & Shin, S. (2017). Neutrophils and Ly6Chimonocytes collaborate in generating an optimal cytokine response that protects against pulmonary Legionella pneumophila infection. *PLoS Pathogens*, 13(4), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006309>
- Centers for Disease Control and Prevention. *Guidelines for environmental infection control in health-care facilities*. (n.d.).
- Chambers, S. T., Slow, S., Scott-thomas, A., & Murdoch, D. R. (2021). Legionellosis caused by non-legionella pneumophila species, with a focus on legionella longbeachae. *Microorganisms*, 9(2), 1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020291>
- Chauhan, D., & Shames, S. R. (2021). Pathogenicity and Virulence of Legionella : Intracellular replication and host response. *Virulence*, 12(1), 1122–1144. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1903199>
- Christenson, E. T., Isaac, D. T., Yoshida, K., Lipo, E., Kim, J. S., Ghirlando, R., Isberg, R. R., & Banerjee,

-
- A. (2019). The iron-regulated vacuolar *Legionella pneumophila* MavN protein is a transition-metal transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(36), 17775–17784. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902806116>
- Cianciotto, N. P. (2001). Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(5), 331–343. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00139>
- Cianciotto, N. P. (2015). An update on iron acquisition by *Legionella pneumophila*: new pathways for siderophore uptake and ferric iron reduction. *Future Microbiology*, 10(5), 841–851. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.21>
- Coetzee, N., Duggal, H., Hawker, J., Ibbotson, S., Harrison, T. G., Phin, N., Laza-Stanca, V., Johnston, R., Iqbal, Z., Rehman, Y., Knapper, E., Robinson, S., & Aigbogun, N. (2012). An outbreak of Legionnaires' disease associated with a display spa pool in retail premises, Stoke-on-Trent, United Kingdom, July 2012. *Eurosurveillance*, 17(37). <https://doi.org/10.2807/ese.17.37.20271-en>
- Coniglio, M. A., Ferrante, M., & Yassin, M. H. (2018). Preventing healthcare-associated legionellosis: Results after 3 years of continuous disinfection of hot water with monochloramine and an effective water safety plan. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(8). <https://doi.org/10.3390/ijerph15081594>
- Copenhaver, A. M., Casson, C. N., Nguyen, H. T., Fung, T. C., Duda, M. M., Roy, C. R., & Shin, S. (2014). *Alveolar Macrophages and Neutrophils Are the Primary Reservoirs for Legionella pneumophila and Mediate Cytosolic Surveillance of Type IV*. 82(10), 4325–4336. <https://doi.org/10.1128/IAI.01891-14>
- Cunha, B. A. (2010). Legionnaires' Disease: Clinical Differentiation from Typical and Other Atypical Pneumonias. *Infectious Disease Clinics of North America*, 24(1), 73–105. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.10.014>
- Cunha, B. A., Burillo, A., & Bouza, E. (2016). Legionnaires' disease. *The Lancet*, 387(10016), 376–385. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60078-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60078-2)
- David, S., Afshar, B., Mentasti, M., Ginevra, C., Podglajen, I., Harris, S. R., Chalker, V. J., Jarraud, S., Harrison, T. G., & Parkhill, J. (2017). Seeding and establishment of legionella pneumophila in hospitals: Implications for genomic investigations of nosocomial legionnaires' disease. *Clinical Infectious Diseases*, 64(9), 1251–1259. <https://doi.org/10.1093/cid/cix153>
- Decker, B. K., Harris, P. L., Muder, R. R., Hong, J. H., Singh, N., Sonel, A. F., & Clancy, C. J. (2016). Improving the diagnosis of legionella pneumonia within a healthcare system through a systematic consultation and testing program. *Annals of the American Thoracic Society*, 13(8), 1289–1293. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201510-715BC>
- Decker, B. K., Harris, P. L., Toy, D. L., Muder, R. R., Sonel, A. F., & Clancy, C. J. (2018). Water cultures are more sensitive than swab cultures for the detection of environmental legionella. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 39(1), 108–110. <https://doi.org/10.1017/ice.2017.235>
- Declerck, P. (2010). Biofilms: The environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology*, 12(3), 557–566. <https://doi.org/10.1111/j.1462->

2920.2009.02025.x

- Demirjian, A., Lucas, C. E., Garrison, L. E., Kozak-Muiznieks, N. A., States, S., Brown, E. W., Wortham, J. M., Beaudoin, A., Casey, M. L., Marriott, C., Ludwig, A. M., Sonel, A. F., Muder, R. R., & Hicks, L. A. (2015). The importance of clinical surveillance in detecting legionnaires' disease outbreaks: A large outbreak in a hospital with a legionella disinfection system - Pennsylvania, 2011-2012. *Clinical Infectious Diseases*, 60(11), 1596–1602. <https://doi.org/10.1093/cid/civ153>
- Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B. C., Hacker, J., & Steinert, M. (2001). Flagellum of Legionella pneumophila positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infection and Immunity*, 69(4), 2116–2122. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2116-2122.2001>
- Ditommaso, S., Giacomuzzi, M., Rivera, S. R. A., Raso, R., Ferrero, P., & Zotti, C. M. (2014). Virulence of Legionella pneumophila strains isolated from hospital water system and healthcare-associated Legionnaires' disease in Northern Italy between 2004 and 2009. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-483>
- Divan Khosroshahi, N., Farivar, T. N., & Johari, P. (2015). Identification of Legionella Pneumophila in intubated patients with TaqMan real time PCR. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(3), 3–6. <https://doi.org/10.5812/jjm.15094>
- Epidemiology, prevention and control of legionellosis: memorandum from a WHO meeting. (1990). *Bulletin of the World Health Organization*, 68(2), 155–164. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2194686>
- Epidemiology, I. of E. (n.d.). *Code of practice for the control of Legionella bacteria in cooling towers*. <https://www.nea.gov.sg/docs/default-source/resource/practices-/code-of-practice-for-control-of-legionella-bacteria-in-cooling-towers.pdf>
- European Working Group for Legionella Infections. *Technical Guidelines for the Investigation, Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires' Disease*. (n.d.).
- European Working Group for Legionella Infections. *The European Working Group for Legionella Infections*. (n.d.). <http://old.iss.it/binary/publ/publi/05-C2.1115128370.pdf>
- Euser, S. M., Pelgrim, M., & Den Boer, J. W. (2010). Legionnaires' disease and Pontiac fever after using a private outdoor whirlpool spa. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 42(11–12), 910–916. <https://doi.org/10.3109/00365548.2010.509331>
- Farnham, A., Alleyne, L., Cimini, D., & Balter, S. (2014). Legionnaires' disease incidence and risk factors, New York, New York, USA, 2002-2011. *Emerging Infectious Diseases*, 20(11), 1795–1802. <https://doi.org/10.3201/eid2011.131872>
- Fields, B. S., Benson, R. F., & Besser, R. E. (2002). Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 506–526. <https://doi.org/DOI:10.1128/CMR.15.3.506-526.2002>
- Fonseca, M. V., & Swanson, M. S. (2014). Nutrient salvaging and metabolism by the intracellular pathogen Legionella pneumophila. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(FEB), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00012>

-
- Francois Watkins, L. K., Toews, K. A. E., Harris, A. M., Davidson, S., Ayers-Millsap, S., Lucas, C. E., Hubbard, B. C., Kozak-Muiznieks, N. A., Khan, E., & Kutty, P. K. (2017). Lessons from an Outbreak of Legionnaires' Disease on a Hematology-Oncology Unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, *38*(3), 306–313. <https://doi.org/10.1017/ice.2016.281>
- Franzin, L., Cabodi, D., & Fantino, C. (2002). Evaluation of the efficacy of ultraviolet irradiation for disinfection of hospital water contaminated by Legionella. *Journal of Hospital Infection*, *51*(4), 269–274. <https://doi.org/10.1053/jhin.2002.1245>
- Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W., Parkin, W. E., Beecham, H. J., Sharrar, R. G., Harris, J., Mallison, G. F., Martin, S. M., Mcdade, J. E., Shepard, C. C., & Brachman, P. S. (1977). Legionnaires' Disease: Description of an Epidemic of Pneumonia. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJM197712012972201>
- Garcia-Nuñez, M., Pedro-Botet, M. L., Ragull, S., Sopena, N., Morera, J., Rey-Joly, C., & Sabria, M. (2009). Cytopathogenicity and molecular subtyping of Legionella pneumophila environmental isolates from 17 hospitals. *Epidemiology and Infection*, *137*(2), 188–193. <https://doi.org/10.1017/S0950268808000691>
- Ge, Z. H., Long, Q. S., Yuan, P. B., Pan, X., Shen, D., & Lu, Y. J. (2019). The Temporal Expression of Global Regulator Protein CsrA Is Dually Regulated by ClpP During the Biphasic Life Cycle of Legionella pneumophila. *Frontiers in Microbiology*, *10*(November), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02495>
- Girolamini, L., Dormi, A., Pellati, T., Somaroli, P., Montanari, D., Costa, A., Savelli, F., Martelli, A., Grottola, A., Fregni Serpini, G., & Cristino, S. (2019). Advances in legionella control by a new formulation of hydrogen peroxide and silver salts in a hospital hot water network. *Pathogens*, *8*(4), 1–21. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040209>
- Gonçalves, I. G., Fernandes, H. S., Melo, A., Sousa, S. F., Simões, L. C., & Simões, M. (2021). LegionellaDB – A Database on Legionella Outbreaks. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.015>
- Graham, R. M. A., Doyle, C. J., & Jennison, A. V. (2014). Real-time investigation of a Legionella pneumophila outbreak using whole genome sequencing. *Epidemiology and Infection*, *142*(11), 2347–2351. <https://doi.org/10.1017/S0950268814000375>
- Hamilton, K. A., Prussin, A. J., Ahmed, W., & Haas, C. N. (2018). Outbreaks of Legionnaires' Disease and Pontiac Fever 2006-2017. *Current Environmental Health Reports*, *5*(2), 263–271. <https://doi.org/10.1007/s40572-018-0201-4>
- Han, X. Y., Ihegword, A., Evans, S. E., Zhang, J., Li, L., Cao, H., Tarrand, J. J., & El-Kweifi, O. (2015). Microbiological and clinical studies of legionellosis in 33 patients with cancer. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(7), 2180–2187. <https://doi.org/10.1128/JCM.00380-15>
- Haupt, T. E., Heffernan, R. T., Kazmierczak, J. J., Nehls-Lowe, H., Rheineck, B., Powell, C., Leonhardt, K. K., Chitnis, A. S., & Davis, J. P. (2012). An Outbreak of Legionnaires Disease Associated with a Decorative Water Wall Fountain in a Hospital. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *33*(2), 185–191. <https://doi.org/10.1086/663711>

- Health, M. of. (n.d.). *The prevention of legionellosis in New Zealand: guidelines for the control of Legionella bacteria*. <https://www.health.govt.nz/publication/prevention-legionellosis-new-zealand-guidelines-control-legionella-bacteria>
- Heating, A. S. of. (n.d.-a). *Refrigerating and Air-Conditioning Engineers. Guideline 12-2000—Minimizing the risk of legionellosis associated with building water systems*. https://www.techstreet.com/ashrae/standards/guideline-12-2000-minimizing-the-risk-of-legionellosis-associated-with-building-water-systems?product_id=232891
- Heating, A. S. of. (n.d.-b). *Refrigerating and Air-Conditioning Engineers. Legionellosis: risk management for building water systems*. <https://www.ashrae.org/technical-resources/bookstore/ansi-ashrae-standard188-2018-legionellosis-risk-management-for-building-water-systems>.
- Higa, F., Koide, M., Haroon, A., Haranaga, S., Yamashiro, T., Tateyama, M., & Fujita, J. (2012). Legionella pneumophila contamination in a steam towel warmer in a hospital setting. *Journal of Hospital Infection*, 80(3), 259–261. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.12.011>
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Bio/Technology*, 10(4), 413–417. <https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>
- Hilbi, H., Hoffmann, C., & Harrison, C. F. (2011). Legionella spp. outdoors: Colonization, communication and persistence. *Environmental Microbiology Reports*, 3(3), 286–296. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00247.x>
- Hilbi, H., Jarraud, S., Hartland, E., & Buchrieser, C. (2010). Update on Legionnaires' disease: Pathogenesis, epidemiology, detection and control: MicroMeeting. *Molecular Microbiology*, 76(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07086.x>
- Hochstrasser, R., & Hilbi, H. (2017). Intra-species and inter-kingdom signaling of Legionella pneumophila. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00079>
- Hubber, A., & Roy, C. R. (2010). Modulation of host cell function by legionella pneumophila type IV effectors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26, 261–283. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104034>
- International, A. (n.d.). *Standard guide for the inspection of water systems for Legionella and the investigation of possible outbreaks of legionellosis (Legionnaires' disease or Pontiac fever)*.
- Isberg, R. R., O'Connor, T. J., & Heidtman, M. (2009). The Legionella pneumophila replication vacuole: Making a cosy niche inside host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 13–24. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1967>
- Jäger, J., Keese, S., Roessle, M., Steinert, M., & Schromm, A. B. (2015). Fusion of Legionella pneumophila outer membrane vesicles with eukaryotic membrane systems is a mechanism to deliver pathogen factors to host cell membranes. *Cellular Microbiology*, 17(5), 607–620. <https://doi.org/10.1111/cmi.12392>
- Jarraud, S., Descours, G., Ginevra, C., Lina, G., & Etienne, J. (2013). *Identification of Legionella in*

Clinical Samples (C. Buchrieser & H. Hilbi (Eds.); Vol. 954, Issue Ld, pp. 27–56). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-161-5_2

Jinna, S., & Gaikwad, U. (2018a). Environmental surveillance of *Legionella pneumophila* in distal water supplies of a hospital for early identification & prevention of hospital-acquired legionellosis. *Indian Journal of Medical Research*, 147(6), 611. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_527_17

Jinna, S., & Gaikwad, U. (2018b). Environmental surveillance of *Legionella pneumophila* in distal water supplies of a hospital for early identification & prevention of hospital-acquired legionellosis. *Indian Journal of Medical Research*, 147(6), 611. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_527_17

Kenhove, E. Van, Dinne, K., Janssens, A., & Laverge, J. (2019). American Journal of Infection Control Overview and comparison of *Legionella* regulations worldwide. *AJIC: American Journal of Infection Control*, 47(8), 968–978. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2018.10.006>

Kooij, D. Van Der, Brouwer-hanzens, A. J., Veenendaal, H. R., & Wullings, B. A. (2016). 62 in Buffered Yeast Extract Broth and Biofilms Exposed to Flowing Tap Water at Temperatures of 38 ° C to 42 ° C. *82(22)*, 6691–6701. <https://doi.org/10.1128/AEM.01107-16>.Editor

Kowalczyk, B., Chmiel, E., & Palusinska-Szys, M. (2021). The Role of Lipids in *Legionella*-Host Interaction. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1487. <https://doi.org/10.3390/ijms22031487>

Krakauer, T. (2019). Inflammasomes, autophagy, and cell death: The trinity of innate host defense against intracellular bacteria. *Mediators of Inflammation*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2471215>

Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>

Kubori, T., & Nagai, H. (2019). Isolation of the Dot/Icm Type IV Secretion System Core Complex from *Legionella pneumophila*. In *Aristotle's Poetics* (Vol. 1921, pp. 241–247). Harvard University Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9048-1_15

Kuhle, K., Krausze, J., Curth, U., Rössle, M., Heuner, K., Lang, C., & Flieger, A. (2014). Oligomerization inhibits *Legionella pneumophila* PlaB phospholipase A activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(27), 18657–18666. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.573196>

Laganà, P., Facciola, A., Palermo, R., & Delia, S. (2019). Environmental surveillance of legionellosis within an Italian university hospital—results of 15 years of analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(7). <https://doi.org/10.3390/ijerph16071103>

Latz, E., Xiao, T. S., & Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology*, 13(6), 397–411. <https://doi.org/10.1038/nri3452>

LegionellaDB. (n.d.). *No Title*. <https://legionelladb.biosim.pt/>

Leoni, E., Catalani, F., Marini, S., & Dallolio, L. (2018). Legionellosis associated with recreational

- waters: A systematic review of cases and outbreaks in swimming pools, spa pools, and similar environments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(8), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijerph15081612>
- Lim, S. J., & Kim, C. (2002). Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 243(1–2), 135–146. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00269-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00269-7)
- Liu, M., Haenssler, E., Uehara, T., Losick, V. P., Park, J. T., & Isberg, R. R. (2012). The Legionella pneumophila EnhC protein interferes with immunostimulatory muramyl peptide production to evade innate immunity. *Cell Host & Microbe*, 12(2), 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.06.004>
- Liu, Y., Zhu, W., Tan, Y., Nakayasu, E. S., Staiger, C. J., & Luo, Z. Q. (2017). A Legionella Effector Disrupts Host Cytoskeletal Structure by Cleaving Actin. *PLoS Pathogens*, 13(1), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006186>
- Losch, L. S., Deluca, G. D., Medina, M. G., Yarros, A., Weber, M., & Merino, L. A. (2019). Presencia de especies de Legionella en reservorios domiciliarios de agua de Resistencia Chaco, Argentina. *Rev Argentina de Salud Pública*, 19–25.
- Lück, C., & Helbig, J. H. (2013). *Characterization of Legionella Lipopolysaccharide* (Vol. 954, pp. 381–390). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-161-5_24
- Magana, M., Sereti, C., Ioannidis, A., Mitchell, C. A., Ball, A. R., Magiorkinis, E., Chatzipanagiotou, S., Hamblin, M. R., Hadjifrangiskou, M., & Tegos, G. P. (2018). Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(3), 1–49. <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-16>
- Manske, C., & Hilbi, H. (2014). Metabolism of the vacuolar pathogen Legionella and implications for virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(SEP), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00125>
- Mekkour, Driss, Tai, & Cohen. (2013). Legionella pneumophila: An Environmental Organism and Accidental Pathogen. *International Journal of Science and Technology*, 2(2), 187–196.
- Misch, E. A. (2016). Legionella: Virulence factors and host response. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 29(3), 280–286. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000268>
- Mitchell, D. H., Hicks, L. J., Chiew, R., Montanaro, J. C., & Chen, S. C. (1997). Pseudoepidemic of Legionella pneumophila serogroup 6 associated with contaminated bronchoscopes. *Journal of Hospital Infection*, 37(1), 19–23. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(97\)90069-4](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(97)90069-4)
- Mojtahedi, S. Y., Rahbarimanesh, A., Noorbakhsh, S., Shokri, H., Jamali-Moghadam-Siyahkali, S., & Izadi, A. (2019). Urinary antigene and PCR can both be used to detect Legionella pneumophila in childrens hospital-acquired pneumonia. *European Journal of Translational Myology*, 29(2), 112–117. <https://doi.org/10.4081/ejtm.2019.8120>
- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., & Abu Kwaik, Y. (2005). Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1),

20–28. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.20-28.2005>

- Mondino, S., Schmidt, S., Rolando, M., Escoll, P., Gomez-Valero, L., & Buchrieser, C. (2020). Legionnaires' Disease: State of the Art Knowledge of Pathogenesis Mechanisms of Legionella. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15, 439–466. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032742>
- Montagna, M. T., De Giglio, O., Napoli, C., Diella, G., Rutigliano, S., Agodi, A., Auxilia, F., Baldovin, T., Bisetto, F., Arnoldo, L., Brusaferrero, S., Busetto, M., Calagreti, G., Casini, B., Cristina, M. L., Di Luzio, R., Fiorio, M., Formoso, M., Liguori, G., ... Pasquarella, C. (2018). Control and prevention measures for legionellosis in hospitals: A cross-sectional survey in Italy. *Environmental Research*, 166(March), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.05.030>
- Moosavian, M., Moradzadeh, M., Ghadiri, A., & Saki, M. (2019). Isolation and Identification of Legionella spp. in environmental water sources based on macrophage infectivity potentiator (mip) gene sequencing in southwest Iran. *AIMS Microbiology*, 5(3), 223–231. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2019.3.223>
- N., J., M., M., M., S., & M., R. (2019). Legionella and legionnaires' disease: An overview. *Journal of Acute Disease*, 8(6), 221–232. <https://doi.org/10.4103/2221-6189.272853>
- Naujoks, J., Lippmann, J., Suttorp, N., & Opitz, B. (2018). Innate sensing and cell-autonomous resistance pathways in Legionella pneumophila infection. *International Journal of Medical Microbiology*, 308(1), 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.10.004>
- ncbi. (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=446>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=446>
- Oliva, G., Sahr, T., & Buchrieser, C. (2018). The life cycle of L. pneumophila: Cellular differentiation is linked to virulence and metabolism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(JAN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00003>
- Orkis, L. T., Harrison, L. H., Mertz, K. J., Brooks, M. M., Bibby, K. J., & Stout, J. E. (2018). Environmental sources of community-acquired legionnaires' disease: A review. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(5), 764–774. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.04.013>
- Pancer, K., Matuszewska, R., Bartosik, M., Kacperski, K., & Krogulska, B. (2013). Persistent colonization of 2 hospital water supplies by L. pneumophila strains through 7 years - Sequence-based typing and serotyping as useful tools for complex risk analysis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20(4), 687–694.
- Park, B., Park, G., Kim, J., Lim, S. A., & Lee, K. M. (2017). Innate immunity against Legionella pneumophila during pulmonary infections in mice. *Archives of Pharmacal Research*, 40(2), 131–145. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0859-9>
- Parkinson, J., Baron, J. L., Hall, B., Bos, H., Racine, P., Wagener, M. M., & Stout, J. E. (2020). Point-of-use filters for prevention of health care-acquired Legionnaires' disease: Field evaluation of a new filter product and literature review. *American Journal of Infection Control*, 48(2), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.09.006>

- Patiño-Barbosa, A. M., Gil-Restrepo, A. F., Restrepo-Montoya, V., Villamil-Gomez, W. E., Cardona-Ospina, J. A., & Rodriguez-Morales, A. J. (2017). Is Legionellosis Present and Important in Colombia? An Analyses of Cases from 2009 to 2013. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.1123>
- Pierre, D. M., Baron, J., Yu, V. L., & Stout, J. E. (2017). Diagnostic testing for Legionnaires' disease. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *16*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0229-6>
- Prevention, C. for D. C. and. (n.d.). *Toolkit: developing a water management program to reduce Legionella growth and spread in buildings*. <https://www.cdc.gov/legionella/wmp/toolkit/index.html>
- Prussin, A. J., Schwake, D. O., & Marr, L. C. (2018). *of Legionella in the Built Environment*. 684–695. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2017.06.024>.Ten
- Quinn, C., Demirjian, A., Watkins, L. F., Tomczyk, S., Lucas, C., Brown, E., Kozak-Muiznieks, N., Benitez, A., Garrison, L. E., Kunz, J., Brewer, S., Eitniear, S., & DiOrio, M. (2015). Legionnaires' Disease Outbreak at a Long-Term Care Facility Caused by a Cooling Tower Using an Automated Disinfection System--Ohio, 2013. *Journal of Environmental Health*, *78*(5), 8–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26738313>
- Rasch, J., Ünal, C. M., Klages, A., Karsli, Ü., Heinsohn, N., Brouwer, R. M. H. J., Richter, M., Dellmann, A., & Steinert, M. (2019). Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerases Mip and PpiB of Legionella pneumophila Contribute to Surface Translocation, Growth at Suboptimal Temperature, and Infection. *Infection and Immunity*, *87*(1). <https://doi.org/10.1128/IAI.00939-17>
- Rémy, B., Plener, L., Decloquement, P., Armstrong, N., Elias, M., Daudé, D., & Chabrière, É. (2020). Lactonase Specificity Is Key to Quorum Quenching in Pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in Microbiology*, *11*(April), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00762>
- Roig, J., Sabria, M., & Pedro-Botet, M. L. (2003). Legionella spp.: community acquired and nosocomial infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *16*(2), 145–151. <https://doi.org/10.1097/00001432-200304000-00011>
- Ryu, S., Yang, K., & Chun, B. C. (2017). Community-acquired Legionnaires' disease in a newly constructed apartment building. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, *50*(4), 274–277. <https://doi.org/10.3961/jpmp.17.066>
- Schunder, E., Gillmaier, N., Kutzner, E., Herrmann, V., Lautner, M., Heuner, K., & Eisenreich, W. (2014). Amino acid uptake and metabolism of Legionella pneumophila hosted by Acanthamoeba castellanii. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(30), 21040–21054. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.570085>
- Services, V. G. D. of H. (2001). *A guide to developing risk management plans for cooling tower systems*. Melbourne, Victoria, Australia. <https://silo.tips/download/a-guide-to-developing-risk-management-plans-for-cooling-tower-systems>
- Sethi, S., Gore, M. T., & Sethi, K. K. (2007). Increased sensitivity of a direct fluorescent antibody test for Legionella pneumophila in bronchoalveolar lavage samples by immunomagnetic

-
- separation based on BioMags. *Journal of Microbiological Methods*, 70(2), 328–335. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.05.006>
- Shevchuk, O., Jäger, J., & Steinert, M. (2011). Virulence properties of the Legionella pneumophila cell envelope. *Frontiers in Microbiology*, 2(APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00074>
- Sikora, A., Wójtowicz-Bobin, M., Koziół-Montewka, M., Magryś, A., & Gładysz, I. (2015). Prevalence of Legionella pneumophila in water distribution systems in hospitals and public buildings of the Lublin region of eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(2), 195–201. <https://doi.org/10.5604/12321966.1152064>
- Skaza, A. T., Beskovnik, L., Storman, A., Kese, D., & Ursic, S. (2012). Epidemiological investigation of a legionellosis outbreak in a Slovenian nursing home, August 2010. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 44(4), 263–269. <https://doi.org/10.3109/00365548.2011.635313>
- Soda, E. A., Barskey, A. E., Shah, P. P., Schrag, S., Whitney, C. G., Arduino, M. J., Reddy, S. C., Kunz, J. M., Hunter, C. M., Raphael, B. H., & Cooley, L. A. (2017). Vital Signs: Health Care–Associated Legionnaires’ Disease Surveillance Data From 20 States and a Large Metropolitan Area—United States, 2015. *American Journal of Transplantation*, 17(8), 2215–2220. <https://doi.org/10.1111/ajt.14407>
- Springston, J. P., & Yocavitch, L. (2017). Existence and control of Legionella bacteria in building water systems: A review. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 14(2), 124–134. <https://doi.org/10.1080/15459624.2016.1229481>
- Stenzen, J. A., & Poschenrieder, A. J. (2015). Bioanalytical chemistry of cytokines – A review. *Analytica Chimica Acta*, 853(1), 95–115. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.10.009>
- Stewart, C. R., Muthye, V., & Cianciotto, N. P. (2012). Legionella pneumophila Persists within Biofilms Formed by Klebsiella pneumoniae, Flavobacterium sp., and Pseudomonas fluorescens under Dynamic Flow Conditions. *PLoS ONE*, 7(11), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050560>
- Strains, C., Garner, E., Brown, C. L., Schwake, D. O., Rhoads, W. J., Arango-argoty, G., Zhang, L., Jospin, G., Coil, D. A., Eisen, J. A., Edwards, M. A., & Pruden, A. (2019). Comparison of Whole-Genome Sequences of Legionella pneumophila in Tap Water and. 25(11), 2013–2020.
- Swart, A. L., & Hilbi, H. (2020). Phosphoinositides and the Fate of Legionella in Phagocytes. *Frontiers in Immunology*, 11(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00025>
- Tossa, P., Deloge-Abarkan, M., Zmirou-Navier, D., Hartemann, P., & Mathieu, L. (2006). Pontiac fever: An operational definition for epidemiological studies. *BMC Public Health*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-6-112>
- Tronel, H., & Hartemann, P. (2009). Overview of diagnostic and detection methods for legionellosis and Legionella spp. *Letters in Applied Microbiology*, 48(6), 653–656. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02570.x>
- Vaughn, B., Voth, K., Price, C. T., Jones, S., Ozanic, M., Santic, M., Cygler, M., & Abu Kwaik, Y. (2021). An Indispensable Role for the MavE Effector of Legionella pneumophila in Lysosomal Evasion.

- MBio*, 12(1), e03458-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.03458-20>
- Viasus, D., Di Yacovo, S., Garcia-Vidal, C., Verdaguer, R., Manresa, F., Dorca, J., Gudiol, F., & Carratalà, J. (2013). Community-acquired legionella pneumophila pneumonia: A single-center experience with 214 hospitalized sporadic cases over 15 years. *Medicine (United States)*, 92(1), 51–60. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e31827f6104>
- Vicente, D., Marimón, J. M., Lanzeta, I., Martin, T., & Cilla, G. (2019). *Fatal Case of Nosocomial*. 25(11), 2097–2099.
- Wang, H., Bédard, E., Prévost, M., Camper, A. K., Hill, V. R., & Pruden, A. (2017). Methodological approaches for monitoring opportunistic pathogens in premise plumbing: A review. *Water Research*, 117(12), 68–86. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.046>
- Wei, S. H., Chou, P., Tseng, L. R., Lin, H. C., Wang, J. H., Sheu, J. N., Liu, M. T., Liu, F. C., Wu, H. H., Lin, M. C., Ko, C. F., Lin, H. Y., Kao, P. H., Hwang, K. P., Hsu, Y. L., Kuo, T. L., & Chiang, C. S. (2014). Nosocomial Neonatal Legionellosis Associated with Water In Infant Formula, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases*, 20(11), 1921–1924. <https://doi.org/10.3201/eid2011.140542>
- Whiley, H., Bentham, R., & Brown, M. H. (2017). Legionella persistence in manufactured water systems: Pasteurization potentially selecting for thermal tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01330>
- World Health Organization. WHO. (n.d.-a). *International Health Regulations Guide to Ship Sanitation* Third Edition. https://www.who.int/water_sanitation_health/gdwqrevision/gss_draft.pdf
- World Health Organization. WHO. (n.d.-b). *Legionella and the prevention of legionellosis*. https://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf
- World Health Organization. WHO. (n.d.-c). *World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality*. 3rd Ed. Vol. 1. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204411/9789241547611_eng.pdf;jsessionid=8B015A9D1D071B6D4F0311CD5201D51D?sequence=1
- World Health Organization. WHO. (n.d.-d). *World Health Organization. Guidelines for safe recreational water environments*. Vol 2. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43336/9241546808_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- World Health Organization. WHO. (n.d.-e). *World Health Organization. Revision of the International Health Regulations*. <https://www.who.int/csr/ihr/WHA58-en.pdf>
- World Health Organization. WHO. (n.d.-f). *World Health Organization. WHO recommended surveillance Standards*. 2nd ed. Available. 2nd Ed. <https://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/whocdscsr992.pdf>
- Yoshida, M., Furuya, N., Hosokawa, N., Kanamori, H., Kaku, M., Koide, M., Higa, F., & Fujita, J. (2018). Legionella pneumophila contamination of hospital dishwashers. *American Journal of Infection Control*, 46(8), 943–945. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2018.01.024>

-
- Yu, V. L., Plouffe, J., Castellani, M., Stout, J., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Heath, C., Paterson, D., & Cheresky, A. (2002). DISTRIBUTION OF LEGIONELLA SPECIES AND SEROGROUPS ISOLATED BY CULTURE IN PATIENTS WITH SPORADIC COMMUNITY-ACQUIRED LEGIONELLOSIS: AN INTERNATIONAL COLLABORATIVE SURVEY. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 11(4), 258. <https://doi.org/10.1097/00019048-200205000-00039>
- Zhan, X.-Y., & Chao-Hui Hu, Q.-Y. Z. (2015). *iMedPub Journals Legionella Pathogenesis and Virulence Factors Abstract Virulence factors that related to Legionella cell envelope Legionella virulence factors and patho-*. 1–16.
- Zhu, W., & Luo, Z. Q. (2016). Cell biology and immunology lessons taught by Legionella pneumophila. *Science China Life Sciences*, 59(1), 3–10. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4945-x>

