

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Sub-Dirección de Investigación y Estudios de Postgrado
Maestría en Microbiología Médica

DETECCION DE ANTICUERPOS PARA LEGIONELLA PNEUMOPHILA
EN PACIENTES DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO

JOSE E. GONZALEZ

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A

DR. SERGIO A. MARTINEZ GARCIA

MONTERREY, N. L.

OCTUBRE 1984

M
6658
M
984
3





1020071163

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

SUBDIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POSTGRADO
MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA MEDICA

DETECCION DE ANTICUERPOS PARA LEGIONELLA PNEUMOPHILA
EN PACIENTES DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO JOSE E. GON-
ZALEZ.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA

DR. SERGIO A. MARTINEZ GARCIA.

MONTERREY, N.L.

OCTUBRE 1984

TM
Z 6658
FM
+
113



159659

El presente trabajo se llevó a cabo en el departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de:

Q.F.B. MSc. DSc. Manuel Rodríguez Quintanilla.

Financiado por el fideicomiso para el apoyo complementario de la investigación científica en la Universidad Autónoma de Nuevo León. Gobierno del Estado - CONACYT.

Agradezco:

**A la Universidad Autónoma de Nuevo León,
A la Facultad de Medicina,
Al Departamento de Microbiología,
A todos y cada uno de sus integrantes,
A mis profesores,
Al Departamento de Estadística, y a todas
las personas que directa o indirectamente
colaboraron en la realización de éste traba
bajo.**

INDICE

Introducción	pag. 1
Material y Metodo	pag. 9
Resultados	pag. 12
Discusión	pag. 15
Resumen	pag. 21
Bibliografía	pag. 22
Apéndice Estadístico	pag. 28

INTRODUCCION

Existen muchas bacterias de conocida patogenicidad para el hombre que son capaces de producir serias enfermedades y la muerte, en ocasiones por encontrarse en reservorios de lo más insospechado, - pudiendo pasar desapercibidas y producir brotes epidemiológicos.

Se reconoce que Legionella pneumophila tiene - capacidad de producir enfermedad pulmonar y también atacar a otros órganos y tejidos (1,2,3,5). A la enfermedad producida se le llama Legionelosis y puede alcanzar grandes proporciones en cuanto a brotes epidémicos con un alto índice de mortalidad, el cual asciende a un 15-20% (2,4).

En Estados Unidos de Norteamérica, éste padecimiento llamó en poco tiempo la atención de muchos - investigadores (4), lo que convirtió a la Legionelosis en una entidad nosológica de gran importancia - en la patología respiratoria y desde entonces ha pasado a formar parte del grupo de enfermedades que - se tienen que reportar rutinariamente para su con--trol estadístico e informativo.

La investigación de ésta enfermedad se inició formalmente cuando del 21 al 24 de Julio de 1976, -

la Legión Estadounidense de Pensilvania hizo su con
vención anual en el Hotel Bellevue Stratford de la
ciudad de Filadelfia donde asistieron cerca de 4500
miembros delegados. Durante el siguiente mes, un -
brote repentino de neumonía y otras enfermedades -
respiratorias febriles afectó a 221 de las personas
que asistieron a la convención; habían estado en el
hotel o pasado cerca de él. Treinta y cuatro murie-
ron. La causa de la enfermedad de los Legionarios,
como se llamó la afección, permaneció desconocida -
hasta cinco meses después cuando Mc Dade (6), utiliz
ando técnicas para el estudio de rickettsias, señal
ó el aislamiento de un bacilo delgado, gram negativ
o del tejido pulmonar de pacientes que habían muert
o de ésta enfermedad. Las muestras de suero sanguin
o pareadas y almacenadas en el Centro de Control
de Enfermedades de Atlanta, Gerogia, E.U.A. revela-
ron que el mismo microorganismo o alguno antigénicam
ente similar, causó un brote de neumonía en 1965 -
en un hospital de Washington D.C. (7), y un brote -
de síndrome respiratorio febril y neumonía en 1968
en el edificio del Departamento de la Salud en Pon-
tiac, Michigan, E.U.A. (2).

En 1978 Morris (8), aisló la bacteria de divers

sas muestras del medio ambiente junto con investigaciones de brotes ese año. Se pensó que las torres de enfriamiento del aire acondicionado y los condensadores para evaporación habían sido la fuente de diseminación en los brotes de Pontiac y Memphis en -- 1968 y de Atlanta en 1978 (9,10). Más tarde ésto se comprobó cuando se aisló la bacteria de dichos si- - tios y de otros más (8,9).

Del 13 al 15 de Noviembre de 1978 se llevó a cabo el Simposio Internacional de la Enfermedad de los Legionarios en el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Georgia, E.U.A. (11). En dicha reunión Brenner y colaboradores (12), propusieron denominar al microorganismo Legionella pneumophila, especie Nova, de la familia Legionelaceae y se informó que en 1974 se había aislado una bacteria que se comprobó era idéntica a Legionella pneumophila (13).

Son reconocidos dos tipos de infección clínica: La primera es la forma neumónica, de incubación prolongada (dos a diez días), denominada Enfermedad de los Legionarios, que ocurre en forma esporádica o en brotes epidémicos y puede ser mortal (6,14); La se-- gunda es la forma no neumónica, de incubación corta (veinte a cuarenta y ocho horas, máximo treinta y --

seis), llamada Fiebre de Pontiac la cual solo se ha observado en epidemias, al parecer no es mortal y cura espontaneamente.

La infección ataca preferentemente a pacientes - adultos (2), en comparación con los infantes (14, - 15). Existen factores predisponentes de tipo ocupacional (10,16,17); los viajeros (12); el tabaquismo y el alcoholismo también son factores de riesgo (14, 19,20). La coincidencia de neoplasias en enfermos ó que reciben medicación inmunosupresora es también - factor de riesgo para una enfermedad de tipo nosoco mial (20,21,22), se han observado casos en recepto- res de transplante renal (14,21,23), entidades que se presentan en nuestro medio.

El microorganismo es un bacilo flagelado, que se tiñe como gram negativo, de tamaño variable de-- pendiendo del medio de cultivo en que se desarrolle. Aunque se han encontrado formas más largas (filamen^u tosas), típicamente mide 0.5 a 0.7 micrometros de - ancho por 2 a 20 micrometros de largo; es aerobio, no forma esporas, crece mejor en un pH de 6.9 a 7.0 (2). Las pruebas bioquímicas han comprobado que se trata de un microorganismo catalasa positivo, debil^u mente oxidasa positivo, no reduce los nitratos a ni^u

tritos, tampoco fermenta carbohidratos, ni degrada la urea, aunque puede utilizar el almidón (24). El microorganismo produce también una beta lactamasa - (25). Recientemente en 1981 Hebert (26), del Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Georgia, E.-U.A. dió a conocer que la prueba de hidrólisis del hipurato (que es positiva para Legionella pneumophila) puede ser usada como criterio para diferenciar esta bacteria y sus especies de entre microorganismos parecidos a Legionella. La caracterización lleva la siguiente secuencia:

1.- Morfología colonial.

2.- Morfología microscópica:

a).- Tinción de Gram.

b).- Tinción de Sudán negro.

c).- Tinción de Giménez.

d).- Tinción para flagelos (Leifson modificada ó la tinción de plata para flagelos).

3.- Identificación preliminar:

a).- Requerimiento de L-cisteina.

b).- Producción de pigmento café en agar Feeley-Gorman.

c).- Fluorescencia amarilla en agar Feeley-Gorman.

4.- Identificación definitiva:

- a).- Prueba de anticuerpos fluorescentes para de
mostrar la presencia de la bacteria.
- b).- Cromatografía gas líquido.
- c).- Hibridización de DNA (24).

Legionella pneumophila se ha obtenido de secreciones respiratorias, líquido pleural, tejido pulmonar, sangre, placenta, fuentes del medio ambiente incluyendo la tierra riberña, agua potable, de arroyos, lagos, condensadores de evaporación y torres de enfriamiento de los aparatos de aire acondicionado (2). Se han demostrado anticuerpos en diversos animales - (27).

Hasta ahora se reconocen seis serogrupos de Legionella pneumophila, que agrupan a siete especies, el quinto y el sexto grupo se caracterizaron en 1980 (28,29,30). La cepa tipo de Legionella pneumophila - es la Filadelfia 1 (12). El microorganismo se transmite por la vía aérea y no se ha demostrado el contagio de persona a persona (3).

Helms y colaboradores (31), en 1980 y Bettelheim y los suyos (32), en 1982 hicieron un estudio - para determinar la prevalencia de anticuerpos contra Legionella pneumophila entre la población sana de Io

wa, E.U.A. y en Nueva Zelanda respectivamente encontrando un alto porcentaje de seropositividad en ambos grupos. Además de Estados Unidos de Norteamérica se han observado casos esporádicos en Canadá, Australia Inglaterra, Suiza, Israel, España, Alemania y Países Bajos (2,3). Cabe esperar que se identifiquen más casos a medida que aumente la posibilidad de diagnosticar la Legionelosis (2).

El diagnóstico serológico de la Legionelosis ha incluido a la mayoría de los procedimientos convencionales, pero los anticuerpos fluorescentes han demostrado ser de gran utilidad (33). Actualmente es el procedimiento rutinario que utiliza el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, en E.U.A. laboratorio de referencia a quien se le solicitó información y recomienda dicha prueba para la determinación de anticuerpos en suero de pacientes en lo que a Legionelosis respecta por su alta sensibilidad y especificidad (24).

Numerosos datos sugieren que ésta bacteria puede estar ampliamente distribuída en la naturaleza -- (3). Tomando en cuenta que se ha encontrado prácticamente en cualquier medio y que en el hombre se han demostrado anticuerpos contra ella, sería obligado -

pensar que puede estar infectando a nuestros enfermos. Es importante reconocer que esta bacteria puede producir un elevado índice de incapacidad en los afectados y consecuentemente producir cuantiosas pérdidas en lo que a salud y bienestar se refiere.

La búsqueda de anticuerpos en población general ó en enfermos para Legionella pneumophila dará una idea de la prevalencia de esta infección en población de la zona norte de nuestro país. Por lo tanto, el objetivo de éste trabajo sería doble: por una parte determinar en la población general representada por sus sueros sanguíneos, la proporción de aquellos que resultaran con anticuerpos para L. pneumophila y sus respectivos títulos, obteniendo así una imagen de la prevalencia de la infección clínica o subclínica de ésta enfermedad. Por otra parte, como se colectaron sueros de pacientes con cuadros neumónicos diversos además de los individuos normales, se querrá ensayar la hipótesis de si el grupo de individuos con neumo-patías tiene títulos de anticuerpos en mayor proporción y más altos.

MATERIAL Y METODOS

Sueros sanguíneos: Los sueros fueron tomados de 250 individuos. 200 voluntarios que acudieron al -- servicio de Banco de Sangre del Hospital José E. González, y de 50 pacientes que fueron internados en -- los servicios de Neumología y Cuidados Intensivos -- del mismo Hospital y que cursaron con cuadros respiratorios, algunos fallecieron con diagnóstico final de neumonía. La mayoría (80%) de los voluntarios y pacientes radican en el área metropolitana de Monterrey y el resto (20%) en municipios circunvecinos.

El rango de edades fué de 18 a 82 años: 182 personas fueron del sexo masculino y 68 personas del sexo femenino. Ninguno de los voluntarios presentaba sintomatología alguna al momento de la toma de la -- muestra. Conversaciones con clínicos locales y análisis de cuestionario revelaron una prevalencia habitual de padecimientos respiratorios en el área metropolitana, seis meses antes de la toma de muestra.

La sangre fué colectada asépticamente con jeringas desechables, y se colocaron seguidamente en tubos de ensayo para ser centrifugados. El suero fué tomado con una pipeta Pasteur y cada una de las muestras fué almacenada en alicuotas de 1 ml. a una tem-

peratura de -14°C . Los sueros sanguíneos fueron ensayados cinco meses después.

La técnica que se decidió utilizar para demostrar y cuantificar los anticuerpos fué la de inmunofluorescencia indirecta descrita por Wilkinson y colaboradores (24).

El antígeno usado fué una suspensión polivalente de Legionella pneumophila (serogrupos del 1 al 4), proporcionado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Georgia, E.U.A. por cortesía de la Dra. O.A. Wilkinson.

La suspensión mixta de L. pneumophila muerta - por calor fue colocada en forma de frotis dentro de doce círculos delineados con lápiz diamantado en portaobjetos usando una pipeta. Los portaobjetos se dejaron secar al aire durante 30 minutos a temperatura de laboratorio y se fijaron con acetona por inundación durante 15 minutos, dejándolo secar al aire durante otros 15 minutos.

El suero sanguíneo fué diluido 1:16 en una solución al 3% normal de saco vitelino de pollo y subsecuentemente fueron hechas diluciones de los testigos por duplicado, en solución amortiguadora de fosfatos a un pH de 7.6.

Se usó como reactivo de inmunofluorescencia indirecta, una inmunoglobulina de conejo antihumana ligada a isotiocianato de fluoresceína, proporcionada también por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Georgia, E.U.A. El suero sanguíneo a ensayar fué inicialmente probado desde la dilución 1:16 a 1:256.

Especímenes con títulos igual o mayores de 1:256 serían una vez más diluidos para obtener el título final.

Un suero testigo polivalente para L. pneumophila fué incluido rutinariamente cuando se examinaron los sueros al igual que un suero testigo negativo y un frotis negativo con solución salina como único -- reactivo.

Los portaobjetos fueron examinados por medio de un microscopio Leitz usando una luz incidente procedente de una lámpara de mercurio a vapor de 50 watts Leitz SM.

Se determinó el tamaño de muestra por el método de inferencia estimada puntual, con una confiabilidad de 95% ($z=1.96$) y un error permitido de 7.57%.

RESULTADOS

La distribución y el título de anticuerpos fluorescentes para el antígeno tipo polivalente, serogrupos 1 al 4 de Legionella pneumophila en la población estudiada se muestra en la tabla No. 1.

Un total de 250 sueros sanguíneos fueron examinados encontrando ocho muestras positivas que corresponde al 3.2% de nuestro tamaño de muestra. La titulación de anticuerpos fluorescentes se distribuyó de la siguiente manera: títulos de 1:32, tres muestras (37.5%); títulos 1:64, cuatro muestras (50%); títulos de 1:128, una muestra (12.5%). El mayor porcentaje de positividad en las muestras ensayadas correspondió a la titulación de 1:64, o sea la mitad de las muestras positivas.

Como se señala en la tabla No. 2, la prevalencia de títulos de 1:128, en el sexo masculino fué del 20% y en el femenino 0%. En individuos de 40 años o mayores, la frecuencia en el sexo masculino fué mayor (50%), que para mujeres en el mismo rango de edad. Sólo se encontró seropositividad en mujeres de 45 años ó más.

Los individuos más jóvenes y más viejos con un título de anticuerpos de 1:32 o mayor, fueron un va-

Datos estadísticos obtenidos de la muestra:

	sexo masculino	sexo femenino
Media Aritmética (\bar{X})	41 años	43.9 años
Desviación Típica (S)	16.45	16.52
Varianza (S^2)	270.66	272.81

DISCUSION

En la población urbana la frecuencia de anticuerpos en suero sanguíneo para Legionella pneumophila con título de 1:128, ha sido del 12.5% del total de nuestro universo; en contraste con lugares asociados a epidemias de Legionelosis, donde dicha titulación ocurre más frecuentemente y ha sido encontrada hasta en el 19% de los sueros sanguíneos (6,18,19,23,24,35). La prevalencia de títulos de anticuerpos fluorescentes para L. pneumophila de 1:128 en el suero sanguíneo del hombre es igual al rango tomando como parámetro para indicar infección epidémica pasada con Legionella pneumophila (31), explicación poco convincente en nuestro caso por la falta de datos respecto al papel epidemiológico de la Legionelosis en nuestro país; así como tomando en cuenta el criterio de otros investigadores (2,11), que para determinar enfermedad en una sola toma de suero sanguíneo se requiere un título de 1:256 o más en pacientes con padecimiento respiratorio agudo (31).

Evidencia serológica para la infección con Legionella pneumophila ha sido encontrada en varios de los grupos de edades de ésta población estudiada y en conjunto, la prevalencia de anticuerpos es simi-

lar a la de otros estudios, tanto para el sexo masculino como para el femenino. Resulta interesante que en nuestro estudio la frecuencia de títulos de 1:128 está inclinada en favor del sexo masculino y en edad mayor a los 40 años, datos que coinciden con los informes de otras investigaciones así como que la titulación disminuye paralelamente en poblaciones de menor edad (2,11).

Llama la atención la comparación con otro estudio en la que en una totalidad de 1143 muestras de suero sanguíneo la prevalencia de seropositividad no varió con la edad o sexo (36). Este estudio coincide con el nuestro en dos de tres aspectos; primero: la prevalencia de títulos de anticuerpos para Legionella pneumophila de 1:128 fué relativamente alta -- 12.5% comparado con la estimación hecha por Helms y colaboradores (31); segundo: el suero sanguíneo fué obtenido de un grupo de población urbana más bien -- que de la población rural y tercero: el suero fué obtenido de personas mayores de 46 años excluyendo individuos jóvenes. Aquí radica nuestra diferencia -- porque nosotros tomamos en cuenta cualquier edad, lo que quizá nos llevó a diferir en los resultados respecto a la frecuencia.

Legionella pneumophila reside en el suelo, en animales y en el agua (37), y puede ser diseminada en áreas rurales y zonas agrícolas. Este ambiente ha probado ser un modo de transmisión de la infección ya que la seropositividad a la inmunofluorescencia es mayor en la comunidad rural y aumenta en individuos con padecimientos respiratorios agudos.

La hipótesis ha sido aprobada, es decir que existe seropositividad entre la población escogida. Dado que en México no se conocía de ningún estudio relacionado con éste padecimiento ahora deberá descartarse como una posibilidad diagnóstica dentro de las neumonías "atípicas" que en nuestro medio parecen ser inferiores al 10%. Para la confirmación de los datos seroepidemiológicos de nuestro estudio será necesario aumentar el tamaño de la muestra e incrementar el muestreo del medio rural para dar mayor soporte a nuestra hipótesis; sin embargo es evidente por los resultados obtenidos, que Legionella pneumophila convive en nuestro medio.

Finalmente concluimos, que en el grupo de sueros sanguíneos de pacientes con patología respiratoria que estudiamos no existe relación alguna con la Legionelosis clínica o subclínica.

TABLA No. 1

Frecuencia de títulos de anticuerpos fluorescentes para Legionella pneumophila.

Antígeno polivalente serogrupos 1 a 4

	No. de pacientes	Porcentaje
Negativos	242	96.8
Título		
1:32 o menor	3	1.2
1:64	4	1.6
1:128	1	0.4
1:256	-	-

TABLA No. 2

Frecuencia por sexo y edad con títulos de anticuerpos fluorescentes para Legionella pneumophila de --
1:128

Edad en años	Positivo con	No. de pacientes
	título 1:128	examinados (%)
	Hombres	Mujeres
Menor de 40	0/3 (-)	-
Mayor de 40	1/2 (50)	0/3 (-)
Total	1/5 (20)	0/3 (-)

TABLA No. 3

Relación de título sexo y edad con el lugar de residencia.

Título	Edad-Hombres	Edad-Mujeres	%
1:32	21*	60*	37.5
	22*		
1:64	28**	48**	50.0
	41**	45**	
1:128	46**	-	12.5
Total 5		3 = 8	3.2

* Residentes en municipios circunvecinos.

** Residentes en el área metropolitana de Monterrey, N.L.

RESUMEN

Se determinó la prevalencia de anticuerpos para Legionella pneumophila por la técnica de inmunofluorescencia indirecta en un grupo de 250 individuos. - Cincuenta de ellos cursaban con cuadros neumónicos y estuvieron internados en los servicios de Neumología y cuidados intensivos del Hospital Universitario José E. González de la ciudad de Monterrey, N.L.; 200 voluntarios que acudieron a la unidad de Banco de -- Sangre a solicitar algún servicio encontrándose en a parente buen estado de salud.

El límite normal superior de anticuerpos (1:64) fué encontrado en el 50% de las muestras seropositivas, usando un antígeno polivalente serogrupos 1 a 4 de Legionella pneumophila.

Fueron encontrados títulos de 1:128 en el 12.5% de las muestras positivas, evidenciando mayor prevalencia de anticuerpos en individuos del sexo masculino y mayores de 40 años en comparación con las mujeres en el mismo rango de edad. No se encontró seropositividad en la población que mostraba patología -- pulmonar.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Carrington, C.B.; Pathology of Legionnaires Disease. Ann. Intern. Med. 90:496-499, 1979.
- 2.- Cordes, L.G.; Fraser, D.W.: Legionellosis. Clin. Med. de N.A. 3:389-411, 1980.
- 3.- Eickhoff, T.C.:Epidemiology of Legionnaires Disease. Ann. Intern. Med. 90:499-502, 1979.
- 4.- Dull, H.B.: Introduction. Ann. Intern. Med. 90:491, 1979.
- 5.- Watts, J.C.; Hicklin, M.D.; Thomason, B.M.; Callaway, C.S. and Levine, A.J.: Fatal pneumonia caused by Legionella pneumophila serogrupo 3: Demonstration of the bacilli in extratoracic organs. Ann. Intern. Med. 92:186-188, 1980.
- 6.- Mc. Dade, J.E.; Shepard, C.C.; Fraser, D.W. et al. Legionnaires Disease isolation of a bacterium and demonstration of this role in other respiratory disease. New Engl. J. Med. 297:1197-1203, 1977.
- 7.- Thacker, S.B.; Bennett, J.V.; Tsai, T.F. et al.: An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by the Legionnaires Disease bacteria. J. Infect. Dis. 138:512-519, 1978.
- 8.- Morris G.K. et al.: Isolation of the Legionnai--

- res Disease Bacterium from environmental Samples. Ann. Intern. Med. 90:664-666, 1979.
- 9.- Dondonero, T.J.; Rendtorf, R.C.; Mallison, G.F.; Weeks, R.M.; Levi, J.S.; Wong, E.W.; and Schaffner, W.: An Outbreak of Legionnaires Disease Associated with a contaminated air-condition-cooling tower. N. Eng. J. Med. 302:365-370, 1980.
- 10.- Fraser, D.W.; Deubner, D.C.; Hill, D.L.; and Gillian D.K.: Non pneumonic, short incubation period Legionellosis (Pontiac fever) in men who - cleaned a steam turbine condenser. Science 205: 690-691, 1979.
- 11.- National Institute of Allergy and Infections Disease, and the World Health Organization: International Symposium on Legionnaires Disease. Ann. Intern. Med. 90:491-707, 1979.
- 12.- Bernner, D.J.; Steigertwalt, A.G.; McDade, J.E.: Classification of the Legionnaires Disease Bacterium: Legionella pneumophila, genus novum, -- species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. Ann. Intern. Med. 90:656-658, 1979.
- 13.- McDade, J.C.; Brenner, D.J. and Bozeman, F.M.: Legionnaires Disease Bacterium isolated in 1947. Ann. Intern. Med. 90:659-661, 1979.

- 14.- Fraser, D.W.; Tsai, T.F.; Oresntein, W. et al.:
Legionnaires Disease: Description of an epide--
mic of pneumonia. New Eng. J. Med. 297:1189- -
1197, 1979.
- 15.- Rian, M.E.; Froitt, F.S. et al.: Legionnaires -
Disease in child with cancer. Pediatrics. 64:
951-953, 1979.
- 16.- Saravolatz, L.; Arking, L.; Wentwort, B. and --
Quinn, E.: Prevalence of antibodies on the Le--
gionnaires Disease Bacterium in hospital emplo--
yers. Ann. Intern. Med. 90:601-603, 1979.
- 17.- Miller, L.F.: Cooling towers and evaporative --
condensers. Ann. Intern. Med. 90:667-670, 1979.
- 18.- Grist, N.R.; Reid, D.; Najera, A.R.: Legionnai--
res Disease and the traveller. Ann. Intern. --
Med. 90:563-564, 1979.
- 19.- Broome, C.U.; Goings, S.A.; Thaker, S.B.; Vogt,
R.C.; Beaty, H.N.; Fraser, D.W.: The Vermont e-
pidemic of Legionnaires Disease. Ann. Intern. -
Med. 90:573-577, 1979.
- 20.- Storch, G.; Baine, W.B.; Fraser, D.W. et al.: -
Sporadic community acquired Legionnaires Disea-
se in the U.S. Ann. Intern. Med. 90:596-600, -
1979.

- 21.- Book, B.U.; Kirby, B.D.: Legionnaires Disease - in renal transplants recipient. Lancet 1:410- - 413, 1978.
- 22.- Cohen, M.L.; Broome, C.B.; Paris, A.L.; Martin, W.T. and Allen, J.R.: Fatal nosocomial Legionnaires Disease Clinical and epidemiologic characteristics. Ann. Intern. Med. 90:611-613, 1979.
- 23.- Marks, J.S.; Tsai, T.D.; Martone, W.J. and col.: Nosocomial Legionnaires Disease in Columbus - - Ohio. Ann. Intern. Med. 90:565-569, 1979.
- 24.- Weaver, R.E. and Feeley, J.G.: Cultural and Biochemical characterization of the Legionnaires - Disease bacteria. Legionnaires: The bacterium - and methodology. C.D.C. Atlanta, Georgia. pp. 19-25, 1979.
- 25.- Inseberg, H.D.: Microbiology of Legionnaires Disease bacteria. Ann. Intern. Med. 90:502-505, 1979.
- 26.- Hebert, G.A.: Hippurate Hydrolysis by Legionella pneumophila. J. Clin. Microbiol. 13:240-242, 1981.
- 27.- Collins, M.T.; Cho, S.N. and Reif, J.S.: Prevalence of antibodies to Legionella pneumophila - in animal populations. J. Clin. Microbiol. 15:

- 130-136, 1982.
- 28.- England, A.C.; McKinney, R.M.; Skaly, P. and --
Gorman, G.W.: A fifth serogroup of Legionella -
pneumophila. Ann. Intern. Med. 93:58-59, 1980.
- 29.- McKinney, R.M.; Wilkinson, H.W.; Sommers, H.M.
and cols.: Legionella pneumophila serogroup six.
Isolation from cases of Legionellosis, identifi-
cation by immunofluorescence staining and immu-
nologic response to infection. J. Clin. Micro-
biol. 12:395-401, 1980.
- 30.- U.S. Department of Health and Human Service, C.
D.C. Public Health Service. Legionellae update
of Legionella species. pp. 1, 1981.
- 31.- Helms, C.M.; Renner, E.D.; Viner, J.P.; Hierhol-
ser, W.C.; Wintermeyer, L.A. and Johnson, W.T.
Indirect immunofluorescence antibodies to Le--
gionella pneumophila: Frequency in a rural co--
mmunity. J. Clin. Microbiol. 12:326-328, 1980.
- 32.- Bettelheim, K.A.; Metcalfe, R.V. and Sillars, H.
Levels of antibodies against Legionella pneumo-
phila serotype 1 in healthy populations in five
areas in New Zealand. J. Clin. Microbiol. 16: -
555-557, 1982.
- 33.- Wilkinson, H.W.; Cruce, D.D.; Broome, C.V.: Va-

- Validation of Legionella pneumophila indirect immunofluorescence assay with epidemic sera. J. Clin. Microbiol. 13:139-146, 1981.
- 34.- Dondonero, T.J.; Clegg, H.W.; Tsai, T.F.; Weeks R.M.; Duncan, E.; Strickler, J.; Chapman, C. -- and cols.: Legionnaires Disease in Kingsport Tennessee. Ann. Intern. Med. 90:569-573, 1979.
- 35.- Politi, B.D.; Fraser, D.W.; Mallison, T.V.; Nohatt, J.V. and cols.: A mayor focus of Legionnaires Disease in Bloomington, Indiana. Ann. Intern. Med. 90:587-591, 1979.
- 36.- Storch, G.; Hayes, P.S.; Hill, D.L. and Baine, W.B. Prevalence of antibodies to Legionella pneumophila in middle-aged and elderly. Am. J. Infect. Dis. 140:784-787, 1979.
- 37.- Cherrey, W.B.; Pittman, B.; Harris, P.P.; Herbert, G.A.; Thomason, B.M.; Thacher, L. and Weaver, R.E.: Detection of Legionnaires Disease bacteria by direct immunofluorescent staining. J. Clin. Microbiol. 8:329-338, 1978.

APENDICE ESTADISTICO

DETERMINACION DEL TAMAÑO DE MUESTRA:

Para determinar cuantas muestras de suero sanguíneo se debieron examinar para que el total de muestras positivas fueran representativas del tamaño de muestra se utilizó la Inferencia Estimada Puntual.

$$n = \frac{(p) (q) Z^2}{E^2}$$

n = Tamaño de muestra

p = Proporción de títulos positivos

q = Proporción de títulos negativos

Z = Confiabilidad 95% (Z = 1.96)

E = Error permitido 7.57%

$$n = \frac{(.052) (.948) (1.96)^2}{(.00757)^2} = 250$$

Se tubieron que examinar 250 muestras de suero sanguíneo, por lo tanto las ocho muestras positivas son representativas de las 250 primeras (tamaño de muestra).

DATOS OBTENIDOS DE LA MUESTRA:

Sexo masculino: \bar{X} = 41.00 años (media aritmética)

S = 16.45 (desviación típica)

S² = 270.66 (varianza)

Sexo femenino: $\bar{X} = 43.90$ años

$S = 16.52$

$S^2 = 272.81$

FIJACION DE LA HIPOTESIS:

Prueba de hipótesis: Grandes muestras con diferencias de media.

1.- Fijación de la hipótesis:

H_0 (hipótesis nula): μ_1 es igual a μ_2 , o sea que los dos grupos comparados (hombres y mujeres) son iguales y entonces las diferencias son debidas al azar.

H_1 (hipótesis alternativa): μ_1 es igual a μ_2 , o sea que los dos grupos comparados son diferentes y aquí las diferencias son significativas.

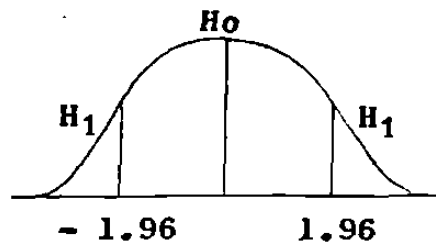
2.- Obtención de las diferencias en términos de Z:

$$Z = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

\bar{X} = media aritmética.
 S = desviación típica.
 n = tamaño de muestra.

3.- Comparar la Z con la tabla de distribución normal y determinar si se encuentra en área de H_0 ó de H_1 .

Al 95% de confiabilidad Z vale 1.96.



Con una confiabilidad de 95% queremos saber si hay diferencia entre los dos grupos estudiados -- (hombres y mujeres).

$$Z = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}} \quad Z = \frac{41 - 43.9}{\sqrt{\frac{16.45}{182} + \frac{16.52}{68}}}$$

$$Z = \frac{- 2.9}{\sqrt{0.090 + 0.242}} \quad Z = \frac{- 2.9}{\sqrt{0.332}}$$

$$Z = \frac{- 2.9}{0.576} = -5.034$$

Se acepta H_1 , por lo tanto los dos grupos -- comparados son diferentes y las diferencias son -- significativas.

