



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Identificación de *Legionella pneumophila* por PCR en
agua de uso doméstico en la ciudad de México y su área
metropolitana

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Angélica González Urbina

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. ARTURO CALDERÓN VEGA



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, porque a través de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, me brindaron una excelente formación académica.

A quienes dedicaron su tiempo a la revisión de este trabajo: Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras, Dr. Eric Monroy Pérez, Biol. Blanca Nieves Martínez Rodríguez, especialmente a la Dra. Elvia Manuela Gallegos Neyra y a mi director de tesis el M. C. Arturo Calderón Vega.

A mis padres y hermanos, por brindarme siempre su apoyo e impulsarme a seguir adelante y por acompañarme a lo largo de toda esta travesía.

A mi familia, a mi pequeño Ian y a mi compañero de vida Sergio, por la paciencia, el cariño y apoyo que me brindan.

A mi amiga Alma por estar siempre y en todo momento.

A mi amiga y compañera de laboratorio por compartirme parte de tus muestras.

A quienes pasaron de ser compañeros a ser mis amigos y parte de mi familia, por todas las experiencias vividas a lo largo de nuestro paso como orgullosos estudiantes de Biología.

A todos los que directa e indirectamente me ayudaron a llegar hasta aquí.

Dedicado al gran regalo que me dio la vida, mi hijo Ian.

“Tal vez aún no he llegado, pero hoy estoy más cerca que ayer”.

CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
1. Taxonomía de <i>Legionella pneumophila</i>	3
1.1 Especies y serogrupos de <i>Legionella</i> spp	3
1.2 Características morfológicas y fisiológicas de <i>Legionella</i> spp	5
1.3 Ecología de <i>Legionella</i> spp	6
1.3.1 Asociación de <i>Legionella pneumophila</i> con amebas de vida libre.....	8
1.3.2 Asociación de <i>Legionella pneumophila</i> con biopelículas.....	10
1.4 Sistema de secreción tipo IV <i>dot/icm</i>	12
1.5 Transmisión de la infección por <i>Legionella pneumophila</i>	15
1.6 Ciclo de vida de <i>Legionella</i> spp.....	15
1.7 Cuadro clínico de la legionelosis y fiebre de Pontiac	18
1.8 Métodos de detección de <i>Legionella</i> spp	19
1.8.1 Cultivo	19
1.8.2 Métodos moleculares	19
1.9 Tratamiento de las infecciones por <i>Legionella</i> spp.....	20
3. ANTECEDENTES	21
4. JUSTIFICACIÓN	23
5. OBJETIVOS	24
1. Objetivo general	24
2. Objetivos particulares	24
6. MATERIAL Y MÉTODOS	25
1. Área de estudio	25
2. Recolecta de las muestras	25
3. Registro de los parámetros fisicoquímicos	25
4. Concentración de bacterias por centrifugación	26
5. Descontaminación por tratamiento ácido	26
6. Cultivo de la muestra en agar específico BCYE	26

7. Examinación de los cultivos de <i>Legionella</i> spp	26
8. Identificación molecular de <i>Legionella pneumophila</i>	26
8.1 Extracción y purificación del ADN bacteriano	26
8.2 PCR y PCR anidado.....	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
1. Aislamiento e identificación de <i>Legionella</i> spp	29
1.1 Parámetros fisicoquímicos	32
1.1.1 Temperatura del agua	33
1.1.2 pH.....	35
1.1.3 Conductividad.....	36
2. Identificación molecular de <i>Legionella pneumophila</i> mediante PCR	39
8. CONCLUSIONES	47
9. LITERATURA CONSULTADA	48

CONTENIDO DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía de <i>Legionella pneumophila</i>	3
Cuadro 2. Especies y serogrupos del género <i>Legionella</i> y su relación con casos clínicos (WHO, 2007)	4
Cuadro 3. Proteínas que conforman el sistema de secreción <i>dot/icm</i> y su posible función dentro de éste (Isberg <i>et al.</i> , 2009).....	14
Cuadro 4. Relación del total de muestras recolectadas según su origen, así como el total de aislados de <i>Legionella</i> spp.	29
Cuadro 5. Relación de muestras positivas para <i>Legionella</i> spp. y las identificadas a nivel de especie.....	40

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía de <i>Legionella pneumophila</i>	6
Figura 2. Desarrollo de <i>Legionella</i> en función de la temperatura	7
Figura 3. Trofozoítos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> infectados con <i>Legionella pneumophila</i>	9
Figura 4. Estructura del sistema de secreción tipo IV de <i>Legionella pneumophila</i>	13
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Legionella</i> en amebas y macrófagos humanos (WHO, 2007)	16
Figura 6. Aislados de <i>Legionella</i> spp. en agar específico BCYE obtenidos a partir de las muestras de agua recolectadas	32
Figura 7. Temperaturas registradas para cada una de las muestras recolectadas agrupadas según su origen	34
Figura 8. Registros de pH tomados para cada una de las muestras agrupadas según su origen	35
Figura 9. Conductividad (mS/cm ³) registrada para cada una de las muestras tomadas agrupadas según su origen.	36
Figura 10. Modelo conceptual para la exposición a <i>Legionella</i> por la inhalación de aerosoles desprendidos de la ducha.....	39
Figura 11. Porcentaje de muestras según su origen, donde se identificó a <i>Legionella pneumophila</i>	41
Figura 12. Amplificación de fragmentos de ADN de las cepas de catálogo: <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC® 33152™ y <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> ATCC® 33153™	42
Figura 13. Identificación de <i>L. penumophila</i> a partir de las muestras de agua recolectadas	43

I. RESUMEN

Las bacterias del género *Legionella* son consideradas bacterias ambientales, ya que su hábitat natural son las aguas superficiales como lagos, ríos y estanques, donde se encuentran formando parte de la flora bacteriana. Desde estos reservorios naturales la bacteria pasa a colonizar los sistemas de abastecimiento de agua, y a través de la red de distribución se incorpora a los sistemas de agua doméstica. La infección por *Legionella* ocurre cuando el agua contaminada por el microorganismo es aerolizada e inhalada por un huésped susceptible; las duchas, generalmente producen una gran cantidad de aerosoles, reconociéndose como una fuente importante de infección.

La especie *Legionella pneumophila* es la más representativa del género, presenta como característica biológica importante su capacidad de infectar, crecer y reproducirse intracelularmente en protozoos y amebas de vida libre. La presencia de éste patógeno en el agua constituye un importante riesgo para salud, por lo que es necesario disponer de un método eficaz y sensible que permita su identificación y vigilancia.

Se analizaron un total de 96 muestras de diversos contenedores de agua potable de la Ciudad de México y a su área metropolitana como: regaderas, cisternas, tinacos, etc., con el objetivo de identificar a la bacteria *Legionella pneumophila*, mediante la amplificación de regiones específicas del gen *mip*, utilizando diferentes secuencias de primers.

Del total de muestras de agua recolectadas, se logró identificar a *Legionella pneumophila* en 11 muestras, la mayoría provenía de muestras de agua de regadera.

2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de los legionarios o legionelosis fue descrita en 1976, luego de un brote epidémico de neumonía en personas que asistieron a una convención de la Legión Americana en Filadelfia, E. U., la enfermedad afectó a 221 personas, de las cuales 34 (15 %) murieron (Fraser *et al.*, 1977 y EPA, 1999). La fuente de infección durante la convención de los legionarios fue encontrada más tarde, el sistema de aire acondicionado en el vestíbulo del hotel, había sido el responsable del brote epidémico (Kuiper, 2006).

El microorganismo causal de la enfermedad, se logró aislar en muestras de tejido pulmonar de cuatro pacientes fallecidos, mediante su inoculación intraperitoneal en roedores utilizando protocolos de aislamiento para *Rickettsias*. Al examinar el bazo e hígado de los roedores infectados, se consiguió observar por primera vez al microorganismo responsable, éste era una bacteria Gram - negativa en forma de bacilo. Asimismo, mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) se demostró, que el 90 % de los pacientes del brote epidémico de neumonía en Filadelfia, habían desarrollado anticuerpos frente a este microorganismo (McDade *et al.*, 1977).

El agente causal fue denominado *Legionella pneumophila*, el nombre de *Legionella* en honor a los legionarios estadounidenses afectados y *pneumophila*, del vocablo griego *pneumo* - pulmón y *philos* - amante, amante del pulmón (EPA, 1999 y García, 2009).

Los seres humanos pueden verse afectados por *Legionella* en dos formas: 1) la enfermedad del legionario, que se presenta como una neumonía, y es potencialmente fatal y 2) la fiebre de Pontiac, una infección autolimitada, similar a la influenza (Lopardo *et al.*, 2002). Sin embargo, en el 95 % de los pacientes infectados por *Legionella* se presenta un cuadro de neumonía (EPA, 1999).

Posterior a la búsqueda de *L. pneumophila*, se realizaron investigaciones adicionales para determinar si anteriormente se habían producido brotes de legionelosis. La investigación reveló cinco nuevos brotes a causa de este microorganismo. El primero ocurrió en 1965, en el Hospital St. Elizabeth en Washington D. C., 81 pacientes se enfermaron de neumonía y 14 de ellos fallecieron. El segundo brote de neumonía se produjo en 1973 en Benidorm, España, y el tercero se originó en 1974, en el mismo hotel de Filadelfia donde se produjo el brote de 1976. Por otro lado, se presentaron dos brotes de fiebre de Pontiac, el primero ocurrido en Pontiac, Michigan en 1968 y el segundo en 1973 en James River, Virginia. A parte de estos brotes, se detectaron casos esporádicos de legionelosis en 1943, 1947 y 1959 (EPA, 1999).

Actualmente, la identificación de la bacteria causante de la enfermedad del legionario y de la fiebre de Pontiac, así como los aspectos epidemiológicos y el espectro clínico de estas enfermedades se encuentran bien establecidos.

1. Taxonomía de *Legionella pneumophila*

Desde que la enfermedad del legionario fue reconocida, la caracterización de las cepas aisladas de pacientes ha llevado a la creación de un nuevo género de bacterias (Brenner *et al.*, 1979).

En el primer Simposio Internacional sobre la Enfermedad del Legionario, que se celebró en 1978, la bacteria causante del brote de neumonía en 1976, recibió el nombre de *Legionella pneumophila* y se convirtió además en el miembro de la nueva familia Legionellaceae (Cuadro 1) (Brenner, 1986).

Cuadro 1. Taxonomía de *Legionella pneumophila*

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Legionellales

Familia: Legionellaceae

Género: *Legionella*

Especie: *Legionella pneumophila*

Cuando se clasificó a *L. pneumophila*, ésta era la única especie del género *Legionella* (Brenner *et al.*, 1979). Desde entonces, se han descrito diferentes bacterias con características fenotípicas similares, llevando a la descripción de un gran número de especies con una variedad de serogrupos dentro del género *Legionella* (García, 2009).

1.1 Especies y serogrupos de *Legionella* spp.

Actualmente el género *Legionella* tiene por lo menos 50 especies que comprenden 70 serogrupos distintos (Cuadro 2), el estudio del ambiente ha permitido el descubrimiento de nuevas especies y es muy probable que el número de especies, subespecies y serogrupos de *Legionella* continúe en aumento. *Legionella pneumophila* es la especie más representativa, siendo la primera en describirse contando con 16 serogrupos; *L. pneumophila* serogrupo 1, es el causante más común de legionelosis así como el serogrupo más frecuente en el ambiente (Bartlett *et al.*, 1983); otras especies también pueden causar la

enfermedad, particularmente en casos nosocomiales, sin embargo, no todas las especies del género *Legionella* causan la patología (WHO, 2007).

Cuadro 2. Especies y serogrupos del género *Legionella* y su relación con casos clínicos (WHO, 2007).

Especie	Serogrupos	Asociación con casos clínicos	Referencia
<i>L. adelaidensis</i>		Negativo	Benson <i>et al.</i> , 1996; Benson y Fields, 1998
<i>L. anisa</i>		Positivo	Bornstein <i>et al.</i> , 1989; Fenstersheib <i>et al.</i> , 1990; Thacker <i>et al.</i> , 1990
<i>L. beliardensis</i>		Negativo	Lo Presti <i>et al.</i> , 2001
<i>L. birminghamensis</i>		Positivo	Wilkinson <i>et al.</i> , 1987
<i>L. bozemanii</i>	2	Positivo	Boldur <i>et al.</i> , 1985; Bornstein <i>et al.</i> , 1987; Bazovska y Spalekova, 1994
<i>L. brunensis</i>		Negativo	Wilkinson <i>et al.</i> , 1988
<i>L. busanensis</i>		Negativo	Park <i>et al.</i> , 2003
<i>L. cherrii</i>		Negativo	Brenner <i>et al.</i> , 1985; Edelstein y Edelstein, 1989
<i>L. cincinnatiensis</i>		Positivo	Thacker <i>et al.</i> , 1988a; Jernigan <i>et al.</i> , 1994; Spieker <i>et al.</i> , 1998
<i>L. drozanskii</i>		Negativo	Adeleke <i>et al.</i> , 2001
<i>L. dumoffii</i>		Positivo	Edelstein y Pryor, 1985; Fang, Yu y Vickers, 1989
<i>L. drancourtii</i>		Negativo	La Scola <i>et al.</i> , 2004
<i>L. erythra</i>	2	Positivo	Brenner <i>et al.</i> , 1985; Saunders, Doshi y Harrison, 1992; Fields, Benson y Besser, 2002
<i>L. fairfieldensis</i>		Negativo	Thacker <i>et al.</i> , 1991
<i>L. fallonii</i>		Negativo	Adeleke <i>et al.</i> , 2001
<i>L. feeleeii</i>		Positivo	Herwaldt <i>et al.</i> , 1984
<i>L. geestiana</i>		Negativo	Dennis <i>et al.</i> , 1993
<i>L. genomospecies</i>	1	Negativo	Benson <i>et al.</i> , 1996
<i>L. gormanii</i>		Positivo	Lode <i>et al.</i> , 1987; Griffith <i>et al.</i> , 1988
<i>L. gratiana</i>		Negativo	Bornstein <i>et al.</i> , 1989
<i>L. gresilensis</i>		Negativo	Lo Presti <i>et al.</i> , 2001
<i>L. hackeliae</i>	2	Positivo	Wilkinson <i>et al.</i> , 1985; Brenner <i>et al.</i> , 1985
<i>L. israelensis</i>		Negativo	Bercovier <i>et al.</i> , 1986; Sonesson <i>et al.</i> , 1994
<i>L. jamestowniensis</i>		Negativo	Wilkinson <i>et al.</i> , 1990; Brenner <i>et al.</i> , 1985
<i>L. jordanis</i>		Positivo	Cherry <i>et al.</i> , 1982; Thacker <i>et al.</i> , 1988
<i>L. lansingensis</i>		Positivo	Thacker <i>et al.</i> , 1992
<i>L. londiniensis</i>	2	Negativo	Dennis <i>et al.</i> , 1993
<i>L. longbeachae</i>	2	Positivo	McKinney <i>et al.</i> , 1981; Boldur <i>et al.</i> , 1985; Cheresky y Bettelheim, 1985; Birtles <i>et al.</i> , 1996
<i>L. lytica</i> (comb. nov.)		Negativo	Birtles <i>et al.</i> , 1996

<i>L. maceachernii</i>		Positivo	Brenner <i>et al.</i> , 1985; Merrell <i>et al.</i> , 1991
<i>L. micdadei</i>		Positivo	Hebert <i>et al.</i> , 1980
<i>L. moravica</i>		Negativo	Wilkinson <i>et al.</i> , 1988
<i>L. nautarum</i>		Negativo	Dennis <i>et al.</i> , 1993
<i>L. oakridgensis</i>		Positivo	Orrison <i>et al.</i> , 1983; Tang, Toma y MacMillan, 1985
<i>L. parisiensis</i>		Positivo	Lo Presti <i>et al.</i> , 1997
<i>L. pneumophila</i>	16	Positivo	Brenner <i>et al.</i> , 1985; Yu, 2000
<i>L. quateirensis</i>		Negativo	Dennis <i>et al.</i> , 1993
<i>L. quinlivanii</i>	2	Negativo	Benson <i>et al.</i> , 1989; Birtles <i>et al.</i> , 1991; Wilkinson <i>et al.</i> , 1990
<i>L. rowbothamii</i>		Negativo	Adeleke <i>et al.</i> , 2001
<i>L. rubrilucens</i>		Negativo	Brenner <i>et al.</i> , 1985; Saunders, Doshi y Harrison, 1992
<i>L. sainthelensi</i>	2	Positivo	Benson <i>et al.</i> , 1990
<i>L. santicrucis</i>		Negativo	Brenner <i>et al.</i> , 1985; Lee <i>et al.</i> , 1993
<i>L. shakespearei</i>		Negativo	Verma <i>et al.</i> , 1992
<i>L. spiritensis</i>	2	Negativo	Brenner <i>et al.</i> , 1985; Harrison <i>et al.</i> , 1988
<i>L. steigerwaltii</i>		Negativo	Brenner <i>et al.</i> , 1985; Edelstein y Edelstein, 1989
<i>L. taurinensis</i>		Negativo	Lo Presti <i>et al.</i> , 1999
<i>L. tusconensis</i>		Positivo	Thacker <i>et al.</i> , 1989
<i>L. wadsworthii</i>		Positivo	Edelstein, 1982
<i>L. waltersii</i>		Negativo	Benson <i>et al.</i> , 1996
<i>L. worsleiensis</i>		Negativo	Dennis <i>et al.</i> , 1993

1.2 Características morfológicas y fisiológicas de *Legionella* spp.

Legionella pneumophila, es un patógeno intracelular facultativo, como miembro de la familia Legionellaceae pertenece a la subdivisión gamma-2 de las proteobacterias (Declerck, 2009), son microorganismos en forma de bacilo, Gram-negativos, contienen una gran proporción de fosfolípidos en su membrana, hecho que dificulta su tinción por el método de Gram, pudiéndose utilizar para su identificación diversas técnicas de fluorescencia y alternativamente la tinción de Giménez (García, 2009).

Son microorganismos no fermentativos, sin cápsula, no esporulados, aerobios estrictos, microaerofílicos, que miden de 0.3 a 0.9 μm de ancho y de 1.5 a 2.0 μm de longitud dependiendo del tiempo del cultivo (EPA, 1999). La mayoría presentan movilidad a través de uno o más flagelos polares (Fig. 1-A), cuando se encuentra al organismo en la fase post-exponencial de crecimiento (Vogel e Isberg, 1999).

Desde el punto de vista bioquímico, las especies del género *Legionella* son quimiorganotróficos, poco sacarolíticos y, en general, con características metabólicas poco activas. Son oxidasa variable, catalasa positiva débil; algunas especies son capaces de producir pigmentos fluorescentes. En contraste con otras bacterias acuáticas, utilizan los aminoácidos y otros compuestos orgánicos como el almidón, como principal fuente de carbono y energía, por esta razón los medios de cultivo convencionales resultan inapropiados para su aislamiento (Pine, 1979).

En condiciones de laboratorio, la mayoría de las especies de *Legionella* necesitan para el crecimiento en su aislamiento primario sales férricas y L-cisteína, ésta representa un ingrediente esencial para el cultivo, mientras que los iones de hierro conjuntamente con cetoácidos facilitan su desarrollo. El medio de cultivo "Buffered Charcoal Yeast Extract" (BCYE), es el medio primario para el cultivo y aislamiento de la bacteria, donde son necesarios de 3-10 días para visualizar el crecimiento bacteriano (Fig. 1-B) (Fields *et al.*, 2002).

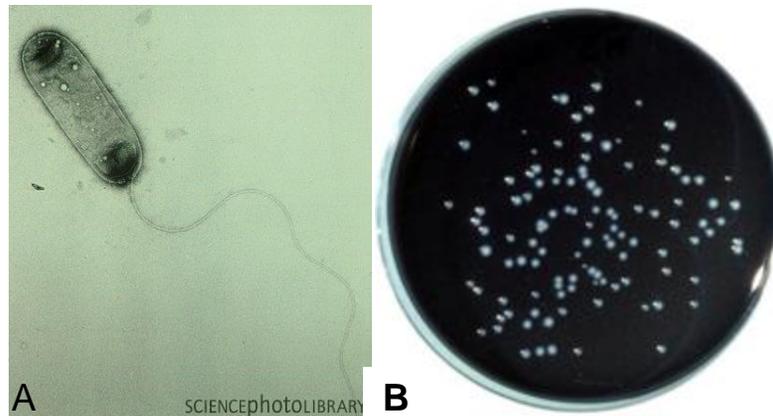


Figura1. A) Micrografía de *Legionella pneumophila*, donde se muestra la presencia de un flagelo polar. B) Crecimiento de bacterias del género *Legionella* en agar BCYE.

1.3 Ecología de *Legionella* spp.

Las bacterias del género *Legionella* son capaces de sobrevivir en un amplio ámbito de condiciones fisicoquímicas, soportando un pH de 5.0 a 9.2 (Declerck, 2009), sin embargo, Sheehan y colaboradores (2005) detectaron cuatro especies de *Legionella* en un ambiente extremadamente ácido con un pH de 2.7.

En cuanto a la temperatura, *Legionella* se multiplica en un ámbito de entre 20 a 45 °C, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 35 a 37 °C (Fig. 2); las aguas termales, donde la temperatura generalmente oscila entre los 35 a 40 °C, han sido reconocidas como fuentes importantes de legionelosis (Declerck, 2009),

varios autores han identificado que la ocurrencia de *Legionella* depende de la temperatura del agua, sin embargo, sigue existiendo el problema de determinar la temperatura adecuada para la inactivación de *Legionella* dentro de los sistemas de agua caliente. La influencia de la temperatura se ha visto implicada no sólo en la supervivencia, sino también en la virulencia de *Legionella* (Hubrá, 2009).

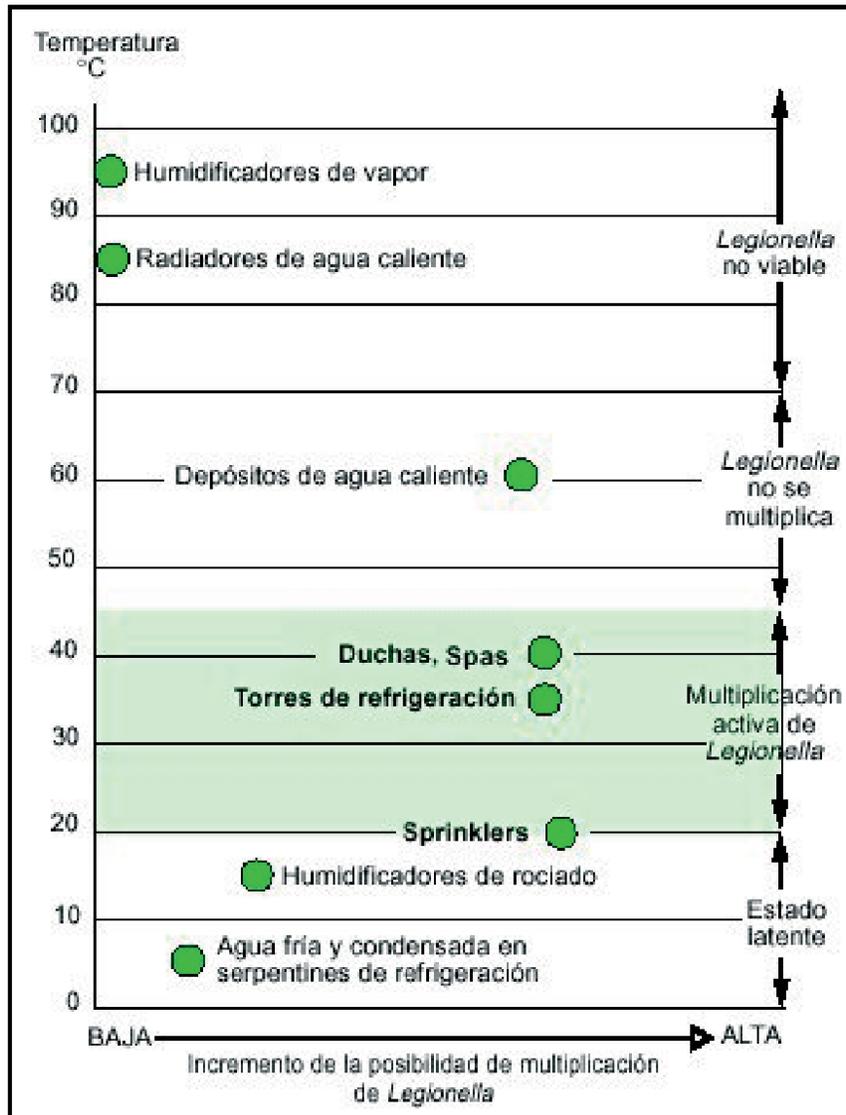


Figura 2. Desarrollo de *Legionella* en función de la temperatura.

Legionella es considerada una bacteria ambiental (Atlas, 1999), ya que su hábitat natural son las aguas superficiales como lagos, ríos y estanques, donde se encuentra formando parte de la flora bacteriana. Desde estos reservorios naturales la bacteria pasa a colonizar los sistemas de abastecimiento de las

ciudades, y a través de la red de distribución de agua, se incorpora a los sistemas de agua doméstica (fría o caliente) u otros que requieran agua para su funcionamiento y puedan generar aerosoles (García, 2009).

Al principio, parecía contradictorio que *Legionella* tuviera requerimientos complejos para los medios de cultivo artificiales de laboratorio y por otro lado sobreviviera y se multiplicara en el agua, sin embargo, en los ambientes que *Legionella* coloniza hay nutrientes para los protozoos y bacterias con los que vive en asociación, y que con una temperatura adecuada, la bacteria puede multiplicarse hasta alcanzar niveles infectantes para el hombre (Rowbotham, 1980).

La omnipresencia de *Legionella* en los sistemas de agua potable representa una preocupación potencial para la salud, especialmente para las personas inmunodeprimidas, tanto en los países en desarrollo, como en los industrializados (Storey *et al.*, 2004).

1.3.1 Asociación de *Legionella pneumophila* con amebas de vida libre

En los ambientes acuáticos, *Legionella pneumophila* es omnipresente (Molmeret *et al.*, 2008), presentando como característica biológica importante, su capacidad de infectar, crecer y reproducirse intracelularmente en protozoos y amebas de vida libre (Fig. 3) (Barbaree, 1986). Se ha demostrado que *L. pneumophila* puede infectar por lo menos a 14 diferentes especies de amebas, dentro de las que destacan: *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia* y *Naegleria*, y dos especies de protozoos ciliados *Tetrahymena* y *Cyclidium* (Fields *et al.*, 2002), en algunos casos las amebas utilizan a *Legionella* como una fuente de alimento, situación que este organismo aprovecha para sobrevivir y replicarse dentro de las vacuolas de la ameba durante períodos prolongados (Atlas, 1999).

Rowbotham (1980), fue el primero en reportar el crecimiento de *L. pneumophila* en *Acanthamoeba* y *Naegleria*, y posteriormente caracterizó el ciclo de vida de la bacteria en las amebas basado en observaciones realizadas por microscopía de luz. Señaló que las bacterias entran a los trofozoítos, donde inician su multiplicación y presentan movilidad dentro de la célula huésped. Rowbotham también observó que la bacteria podía salir de la célula huésped después de la lisis o mantenerse dentro de una ameba enquistada.

La distribución y densidad de la bacteria patógena en el ambiente puede estar sujeta a variaciones de acuerdo a la composición y evolución de la población amebiana; debido a esto se ha llegado a considerar que las amebas de vida libre son los reservorios naturales de éste patógeno (Dey *et al.*, 2008), por lo tanto, la capacidad de *Legionella* para sobrevivir y crecer dentro de los protozoos se ha

implicado en la selección de cepas virulentas de bacterias adecuadas para causar enfermedades humanas, lo que representa un importante riesgo para la salud (Lau y Ashbolt, 2008).

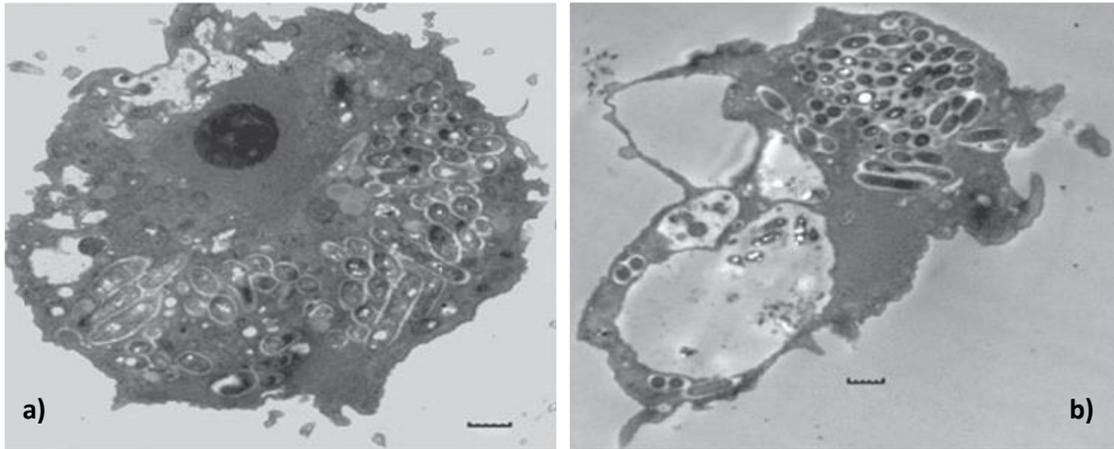


Figura 3. Trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* infectados con *Legionella pneumophila*. La multiplicación intracelular de *L. pneumophila* cepa AA100 en *A. polyphaga* fue examinada mediante microscopía. Se muestran los trofozoítos infectados después de 18 **(a)** y 48 horas **(b)** (Lau y Ashbolt, 2008).

Durante los brotes de legionelosis, en los cuerpos de agua implicados se encuentra un número significativo de amebas de vida libre y, además, un gran número de especies de *Legionella* están presentes cuando las concentraciones de amebas son elevadas (Barbaree *et al.*, 1986).

La multiplicación intracelular de *L. pneumophila* en protozoos como *Acanthamoeba polyphaga* requieren del sistema de secreción *dot/icm* para la biogénesis del fagosoma y la replicación intracelular. Los genes del sistema de secreción tipo IV *dot /icm* se cree que codifican proteínas implicadas en la translocación de moléculas efectoras en la célula huésped que evitan que las bacterias mueran dentro de éstas, por lo que se considera que la interacción entre *L. pneumophila* y los protozoos es fundamental para la patogenia y la ecología de ésta bacteria (Molmeret *et al.*, 2008).

Cabe señalar que las amebas de vida libre tienen muchas características en común con los macrófagos alveolares. Se ha postulado que las interacciones evolutivas entre bacterias y amebas promueven la adquisición y expresión de genes que confieren resistencia a los mecanismos bactericidas de los fagocitos de mamíferos (Lau y Ashbolt, 2008).

Se ha demostrado que en cultivos de amebas con *L. pneumophila*, la bacteria manifiesta un dramático aumento de su resistencia a condiciones ambientales

adversas tales como la fluctuación en la temperatura, la osmolaridad, pH, y la exposición a agentes oxidantes, lo que puede facilitar la supervivencia de las bacterias en el ambiente (Kwaik *et al.*, 1997); *Legionella pneumophila* también puede sobrevivir dentro de los quistes de las amebas, ofreciendo a la bacteria resistencia a los agentes físicos y bioquímicos utilizados en la erradicación bacteriana (Barker *et al.*, 1995).

Los cultivos planctónicos de *L. pneumophila* resuspendidos en agua, son susceptibles a una concentración 2 mg de cloro libre residual, sin embargo, *L. pneumophila* contenida en los quistes de *A. polyphaga* sobrevive a una concentración de 50 mg de cloro libre residual por 18 horas (Miyamoto *et al.*, 2000). La presencia de desinfectantes puede ayudar a la selección de cepas de *Legionella* que prefieren crecer y persistir dentro de las amebas y por lo tanto tener el potencial de ser patógenas (Storey *et al.*, 2004).

Muchas estrategias han sido utilizadas para erradicar a *L. pneumophila*, éstas incluyen: químicos, pesticidas biológicos tales como el cloro, el recalentamiento del agua, y la radiación ultravioleta. Dichas intervenciones han tenido éxito por cortos períodos de tiempo, sin embargo, después las bacterias vuelven a aparecer en estas fuentes (Kool *et al.*, 1999). Por lo tanto, la erradicación de *L. pneumophila* del ambiente requiere un tratamiento continuo del agua con agentes tales como iones monoclóramina o plata-cobre, además del mantenimiento de la temperatura del agua por encima de los 55 °C (Darelid *et al.*, 2002).

Es probable que la erradicación de las bacterias del ambiente deba empezar por la prevención de infecciones por protozoos, una parte integral del ciclo de infección de *L. pneumophila*, ya que tras su liberación de los protozoos, las bacterias muestran un aumento dramático en su infectividad a células de mamíferos *in vitro* (Cirillo *et al.*, 1994). Además, se ha demostrado que las bacterias encontradas dentro de *Hartmannella vermiformis* son dramáticamente más infecciosas y altamente letales en ratones (Brieland *et al.*, 1997).

1.3.2 Asociación de *Legionella pneumophila* con biopelículas

Legionella pneumophila, es un habitante común de ambientes de agua dulce naturales y antropogénicos, donde reside formando parte de las biopelículas. Las biopelículas se definen como complejos naturales de microorganismos (bacterias, algas, hongos y protozoos), que involucran una multitud de interacciones tróficas (Donlan y Costerton, 2002), dichas interacciones se forman como un mecanismo para resistir condiciones adversas, tales como: nutrientes limitados, temperaturas extremas, y exposición a biocidas; su formación tiende a ser mayor en zonas de bajo caudal de agua y donde el agua se estanca. Se ha demostrado que una serie

de estructuras y factores de la célula bacteriana son fundamentales para la formación de la biopelícula, estos son: flagelos, factor quórum, polisacáridos y pili (Cianciotto *et al.*, 2006).

Los materiales de los sistemas de agua potable también afectan el crecimiento de las biopelículas. Algunos materiales de plomería apoyan o mejoran la formación de biopelículas por lo tanto la proliferación de microorganismos, incluyendo a *Legionella* spp. Las biopelículas se desarrollan no sólo en la interface sólido-agua (biopelículas asociadas a un sustrato), sino también en la interface agua-aire (biopelícula flotante). La perturbación de la superficie del agua puede llevar a la liberación de aerosoles procedentes de la biopelícula flotante, permitiendo la transmisión y dispersión de los patógenos asociados a partir de las biopelículas (Jennings *et al.*, 2003).

Las comunidades microbianas de las biopelículas se caracterizan por ser células que se unen a un sustrato o fase límite y entre sí por medio de una matriz de producción propia de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) (Donlan y Costerton, 2002), las cuales proporcionan estructura, estabilidad, nutrientes y protección (Cianciotto *et al.*, 2006). Debido a su carácter dinámico, las comunidades de la biopelícula pueden cambiar en el tiempo y el espacio, proporcionando una mayor supervivencia y crecimiento de los microorganismos asociados. Por esta razón, es fácil comprender que en la mayoría de los ambientes naturales las biopelículas sean el estilo de vida microbiana predominante (Watnick y Kolter, 2000).

En general, hay tres fases distintas en el ciclo de vida de la biopelícula de bacterias: 1) fijación bacteriana a un sustrato, 2) maduración de la biopelícula, 3) separación de la biopelícula y posterior dispersión de la bacteria en el ambiente (Donlan, 2002).

En las biopelículas de varias especies, donde la competencia de las bacterias por el alimento es elevada, es conveniente tener más de una manera de adquirir los nutrientes necesarios para el crecimiento. En el caso de *L. pneumophila*, existen dos maneras distintas. En primer lugar, los nutrientes pueden ser entregados por el ambiente de la misma biopelícula. Numerosas publicaciones muestran que *L. pneumophila* es capaz de obtener los nutrientes directamente de otros microorganismos vivos, como las algas y algunas bacterias heterótrofas. En segundo lugar, *L. pneumophila* es capaz de infectar y replicarse dentro de protozoos. Durante su estancia en el medio intracelular, péptidos y proteínas del huésped infectado se degradan y se utilizan como una fuente de nutrientes (Declerck, 2009).

La disponibilidad de nutrientes complejos en las biopelículas ha llevado a algunos investigadores a proponer que las biopelículas apoyan la supervivencia y multiplicación de *L. pneumophila* fuera de una célula huésped, ya que, las bacterias adheridas a las superficies y las partículas dentro de éste sistema son más resistentes a los tratamientos por pesticidas biológicos, permitiendo la proliferación de patógenos potenciales (Lau y Ashbolt, 2008).

Para poder desprenderse de la comunidad de la biopelícula, *L. pneumophila* puede infectar a alguna ameba como *Naegleria* sp., que posee una etapa adicional flagelada por lo cual nadará fuera de la biopelícula cuando las condiciones ambientales se vuelven desfavorables, por ejemplo, cuando haya deficiencia de nutrientes. En segundo lugar, mediante la liberación de vesículas de tamaño respirable (<5 µm), cada una con 20 a 200 UFC de *L. pneumophila*. Tales vesículas consiguen incorporarse fácilmente en los aerosoles, con lo cual *L. pneumophila* viaja a distancias considerables (Berk *et al.*, 1998).

La presencia de las biopelículas es por lo tanto, un factor importante para la supervivencia y el crecimiento de *L. pneumophila* en los sistemas de agua, por lo que la prevención en la formación de biopelículas es una importante medida de control contra la proliferación de éste microorganismo, ya que una vez establecidas, son difíciles de eliminar de los sistemas de tuberías (Cianciotto *et al.*, 2006).

1.4 Sistema de secreción tipo IV *dot/icm*

Para establecer una exitosa interacción patógeno-huésped, las proteínas de virulencia del patógeno deben ser transportadas a la superficie bacteriana, al medio extracelular o directamente a la célula huésped. Éste es un reto para las bacterias Gramnegativas porque las proteínas secretadas tienen que cruzar la membrana interna y externa (DeBuck *et al.*, 2007); como estrategia, un gran número de patógenos poseen sistemas especializados de secreción que se utilizan para entregar proteínas efectoras en las células huésped, modulando así su función. En las bacterias Gramnegativas, estos sistemas de secreción especializados incluyen sistemas de secreción tipo III (T3SSs) y sistemas de secreción tipo IV (T4SSs). El T4SSs juega un papel importante para la virulencia de varios patógenos incluyendo a *L. pneumophila* (LeBlanc y Vogel, 2008).

El sistema de secreción tipo IV de *L. pneumophila* está codificado por 26 genes necesarios para evitar la vía endocítica, designados como: *dot* (defecto en el tráfico de orgánulos) / *icm* (multiplicación intracelular) y se encuentran en dos regiones del genoma de *L. pneumophila* denominados región I y II (Sexton y Vogel, 2002); la región I contiene siete genes (*icmV*, *W* y *X*, y *dotA*, *B*, *C*, y *D*) y la

región II contiene 18 genes (icmB, C, D, E, F, G,H, J,K, L, M,N,O, P, Q,R, S y T) (Segal *et al.*,2005), se ha demostrado que estos genes son específicamente necesarios para el crecimiento intracelular de *L. pneumophila* en macrófagos humanos y en amebas (Segal *et al.*,1999).

El sistema *dot/icm* es una estructura multiproteica que forma un canal que abarca la membrana interna y externa de la bacteria (Fig. 4) (Coers *et al.*, 1999). *Legionella pneumophila*, utiliza el sistema de secreción *dot/icm* para exportar un gran número de proteínas hacia las células hospederas, lo que le permite sobrevivir y replicarse dentro de estas células (Vincent y Vogel, 2008), siendo el sistema *dot/icm* absolutamente necesario para la virulencia de *L. pneumophila* (Segal *et al.*, 1999).

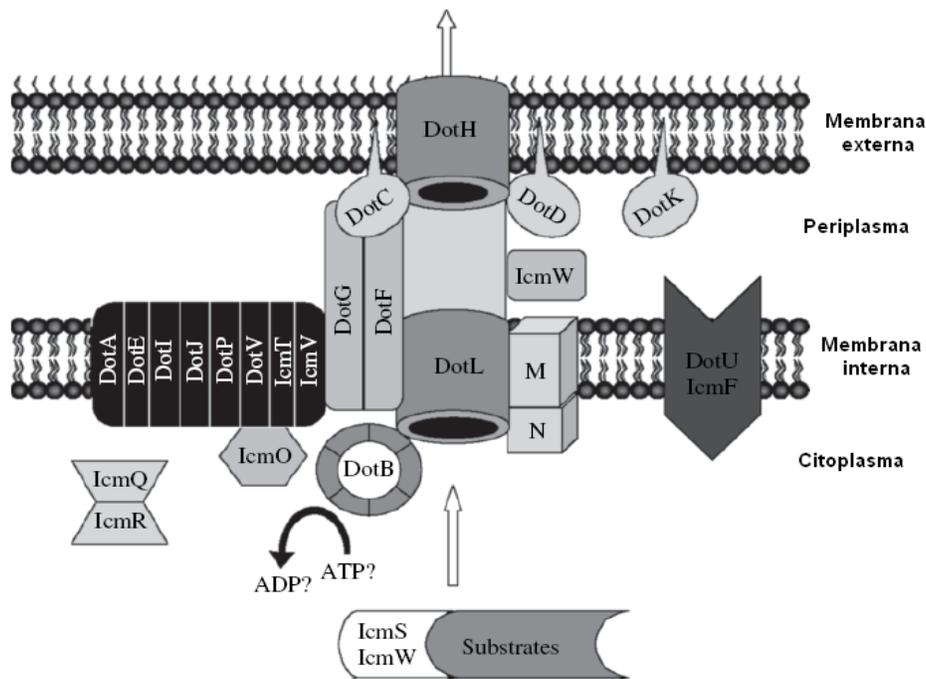


Figura 4. Estructura del sistema de secreción tipo IV de *Legionella pneumophila*.

Aunque muchos de los componentes del *dot/icm* no han sido ampliamente caracterizados, varios de ellos ya se han examinado para revelar su localización y función en la formación del aparato de secreción (Cuadro 3) (Isberg *et al.*, 2009).

Cuadro 3. Proteínas que conforman el sistema de secreción *dot/icm* y su posible función dentro de éste (Isberg *et al.*, 2009).

Proteína	Comentario y/o función
Reconocimiento de sustrato	
IcmS	Reconocimiento de sustrato; presentación a translocón.
IcmW	Reconocimiento de sustrato; presentación a translocón.
LvgA	Reconocimiento de sustrato; presentación a translocón.
<i>ATPasa de unión</i>	
DotL (también conocido como IcmO)	ATPasa; podrían unirse directamente a los sustratos.
DotM (también conocido como IcmP)	ATPasa componente.
DotN (también conocido como IcmJ)	Probable componente de ATPasa.
Componentes básicos	
DotC	Supuesta lipoproteína de membrana externa.
DotD	Supuesta lipoproteína; localizada en la membrana externa.
DotF	Interactúa con los sustratos; podría ser un importante componente de los canales.
DotG (también conocido como IcmE)	Componente principal del canal.
DotH (también conocido como IcmK)	Podría ser un canal de membrana externa.
<i>Determinantes básicos de estabilidad</i>	
DotU (también conocido como IcmH)	Proteína de membrana interna.
IcmF	Proteína de membrana interna.
Componentes citoplasmáticos	
IcmQ	Molécula formadora de poros.
IcmR	Acompañante de IcmQ.
DotB	ATPasa; podría desmontar el translocón.
DotO (también conocido como IcmB)	Citoplasma; proteína de membrana interna
Membrana interna o componentes periplásmicos de función desconocida	
DotA	Proteína politópica grande de membrana interna.
DotE (también conocido como IcmC)	Similar a DotV.
DotI (también conocido como IcmL)	Proteína de membrana interna.
DotJ (también conocido como IcmM)	Proteína prevista de membrana interna.
DotK (también conocido como IcmN)	Proteína prevista de membrana interna.
DotP (también conocido como IcmD)	Proteína prevista de membrana interna.
DotV	Proteína prevista de membrana interna.
IcmT	Proteína de membrana interna
IcmV	Proteína prevista de membrana interna.
IcmX	Periplásmica

El sistema de secreción tipo IV *dot/icm* es crítico para la capacidad de *L. pneumophila* para sobrevivir y replicarse dentro de las células de mamíferos. Zink y colaboradores (2002) demostraron que un defecto en el sistema de secreción *dot/icm* disminuye la capacidad de *L. pneumophila* para replicarse dentro de los

macrófagos y suprime la actividad de formación de poros, concluyendo que el sistema de secreción tipo IV es esencial para la inducción de la apoptosis y es el único sistema responsable de este proceso. Así, además del papel del sistema de secreción *dot/icm* en el tráfico endosomal, la replicación intracelular y la exportación de la toxina formadora de poros también es esencial para la inducción de la apoptosis.

1.5 Transmisión de la infección por *Legionella pneumophila*

La infección por *L. pneumophila*, se adquiere a través del ambiente, cuando el agua que contiene al microorganismo es aerosolizada en pequeñas gotas e inhalada por un huésped susceptible (Lopardo *et al.*, 2002). En personas susceptibles (principalmente pacientes inmuno-comprometidos o ancianos), la infección inicial puede llevar a una neumonía atípica conocida como enfermedad del legionario o a una leve enfermedad del aparato respiratorio llamada fiebre de Pontiac, la transmisión de persona a persona no ha sido documentada.

Se han rastreado brotes de infección por *Legionella pneumophila*, a través de los aerosoles desprendidos de: torres de refrigeración, bañeras de hidromasaje y spas, fuentes, máquinas de hielo, rociadores de vegetales y duchas. Estos brotes se han producido en hogares, oficinas, hoteles, hospitales, entre otros lugares. Pequeñas torres de refrigeración, en particular, cuando se encienden tras un período de no utilización, han sido implicados en brotes importantes de legionelosis (Atlas, 1999).

1.6 Ciclo de vida de *Legionella* spp.

Los ciclos de vida nos dicen mucho sobre la historia natural de un organismo vivo. Ellos son una síntesis de años de evolución, adaptación, especialización y supervivencia en la naturaleza. Desde el punto de vista de las enfermedades infecciosas, los ciclos de vida pueden proporcionar pistas para comprender los mecanismos de la patogénesis de un parásito en particular. En el caso de *L. pneumophila* las amebas son los huéspedes primarios naturales, y constituyen el eje central alrededor del cual gira el ciclo de vida de *L. pneumophila* (Garduño, 2008).

Varias observaciones sugieren que el género *Legionella* es antiguo y muy bien adaptado a las amebas. Lo más probable, es que los miembros del género *Legionella* (incluida *L. pneumophila*) en primer lugar "aprendieron" cómo llegar a ser parásitos intracelulares a través de frecuentes encuentros con amebas y desde entonces han evolucionado para establecer un amplio espectro de relaciones (Molmeret *et al.*, 2005).

El ciclo de vida de *Legionella* ha sido caracterizado en protozoos y macrófagos humanos. Una serie de experimentos realizados por Horwitz y Silverstein (1980), determinaron la vía básica de entrada para *L. pneumophila* en las células fagocíticas. Estos estudios establecieron que la bacteria penetra por inhalación en los pulmones afectando principalmente a los alvéolos y bronquiólos terminales, donde las cepas virulentas y no virulentas de *L. pneumophila* son fagocitadas por los macrófagos alveolares. Una vez dentro de los macrófagos alveolares, que son los más importantes para la replicación de *Legionella*, comienza la formación de una vacuola especializada llamada fagosoma, que recluta mitocondrias y se rodea del retículo endoplasmático rugoso (RER), aun no se ha descrito el papel que desempeña el RER durante esta parte de la enfermedad; éste sistema de fagocitosis utilizado por *L. pneumophila*, se denomina fagocitosis enrollada. Sin embargo, sólo las cepas virulentas pueden multiplicarse dentro de los fagosomas (Horwitz, 1993), éstos no se fusionan con los lisosomas (organelos encargadas de eliminar determinadas partículas tóxicas en el macrófago) eludiendo así los mecanismos microbicidas. Esto conduce a la muerte de los macrófagos y la liberación de grandes cantidades de bacterias de la célula. La bacteria puede luego infectar a otros macrófagos, amplificando así la concentración de bacterias en los pulmones (Fig. 5) (WHO, 2007).

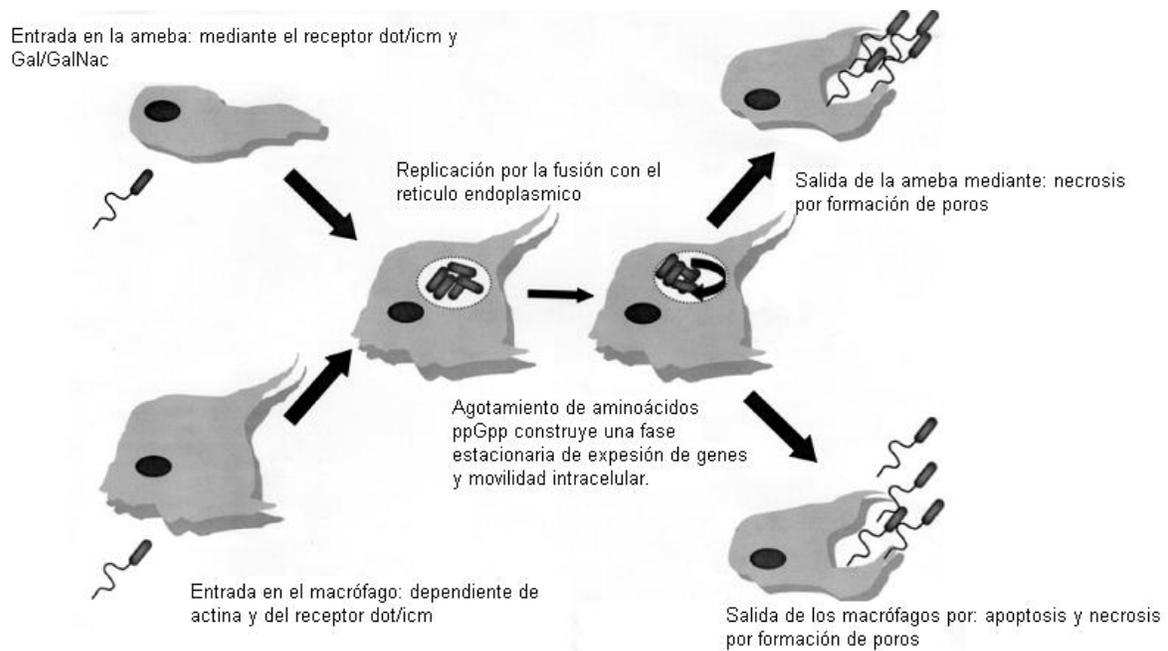


Figura 5. Ciclo de vida de *Legionella* en amebas y macrófagos humanos (WHO, 2007).

La unión de *L. pneumophila* a los macrófagos se ve potenciada por la presencia del factor de virulencia denominado “gen potenciador de la infectividad a macrófagos” (gen *mip*), el cual es necesario para una multiplicación bacteriana óptima dentro de los macrófagos alveolares humanos (Riboldi-Tunncliffe *et al.*, 2001). El gen *mip* codifica una proteína de 24 kDa, ésta proteína varía en tamaño de 232 a 251 aminoácidos, es una proteína de membrana externa importante en el ciclo intracelular de *Legionella*, sin embargo, su papel exacto no está claro (Ratcliff *et al.*, 1998)

La proteína *mip* exhibe actividad de peptidilprolilcic / transisomerasa (PPIase) y pertenece a la familia de enzimas de proteínas de unión FK506 (FKBP), sin embargo, la exacta función de las proteínas *mip in vivo* aún no se ha establecido (Köhler *et al.*, 2003). Una comparación de estructuras primarias y estudios cristalográficos muestran que las proteínas *mip* tienen un dominio N-terminal y C-terminal. El dominio N-terminal es responsable de la dimerización, y el dominio C-terminal se une a FK506 y activa el sitio PPIasa. La estructura cristalina también revela que el N-terminal y C-terminal están conectados por una larga alfa-hélice (DebRoy *et al.*, 2006); esta proteína se encuentra presente en los 14 serogrupos de *L. pneumophila* (Riffard *et al.*, 1996).

Se cree que la proteína *mip* es un factor de virulencia que facilita la entrada de *Legionella* en amebas y macrófagos, ya que las cepas que no tienen esta proteína mostraron una disminución de 80 veces en su infectividad (Lindsay *et al.*, 1994). También se han llevado a cabo experimentos con cepas de *L. pneumophila* con y sin gen *mip*, los resultados revelaron que el gen *mip* es necesario para los procesos de supervivencia temprana de *L. pneumophila* en protozoos, en el macrófago- línea celular U937, y en los macrófagos alveolares humanos, hay evidencia de que las mutaciones nulas en los genes *mip* de *L. pneumophila* reducen fuertemente la supervivencia intracelular de la bacteria en las células eucariotas (Cianciotto y Fields, 1992 y Wintermeyer *et al.*, 1995).

El gen *mip* parece ser genéticamente estable, sin evidencia de recombinación homóloga, por lo tanto el gen *mip*, puede comportarse como un gen de limpieza, en consecuencia se sugiere que el gen *mip* es una diana ideal para un esquema de clasificación, con resultados que pueden ser más selectivos en la identificación de especies y más resistentes a la variación clonal dentro de cada especie. Incluso puede ser posible discriminar entre serogrupos cuando estén presentes o demostrar intraspecies de distintos grupos clonales (Ratcliff *et al.*, 1998).

Wilson y colaboradores (2003), confirmaron la utilidad del gen *mip* como diana para la identificación de *Legionella pneumophila* por PCR en tiempo real, ya que el

gen *mip* tiene suficiente variabilidad en su secuencia entre las especies de *Legionella* para permitirse la detección específica de *L. pneumophila*.

1.7 Cuadro clínico de la legionelosis y fiebre de Pontiac

La enfermedad por *Legionella pneumophila* puede presentarse como dos síndromes distintos: la enfermedad del legionario (o legionelosis), que se presenta como una neumonía y es potencialmente fatal, o la fiebre de Pontiac, cuando se presenta como enfermedad autolimitada y ésta no se asocia a neumonía. La población más susceptible son los ancianos y los pacientes inmunocomprometidos (Lopardo *et al.*, 2002).

La enfermedad del legionario es a menudo inicialmente caracterizada por anorexia, malestar y letargo; los pacientes también pueden desarrollar una tos leve. Alrededor de la mitad de los pacientes presentan formación de esputo con pus; y aproximadamente un tercio, esputo con estrías de sangre o tos con sangre (hemoptisis). Otro síntoma que se presenta es dolor en el pecho que puede ser: pleurítico (es decir, que implican una infección del revestimiento del pulmón) o no pleurítico, éste síntoma es prominente en el 30 % de los pacientes, y puede ser confundido con coágulos de sangre en los pulmones cuando se asocia con hemoptisis. Los síntomas gastrointestinales son importantes, con más de la mitad de los pacientes con diarrea acuosa, y entre el 10 al 30 % sufren náuseas, vómitos y dolores abdominales. La fiebre está presente en casi todos los casos, y la fiebre asociada con escalofríos por lo general se desarrolla durante el primer día (Mülazimoglu y Yu, 2001).

Casi la mitad de los pacientes sufren trastornos relacionados con el sistema nervioso, tales como: confusión, delirio, depresión, desorientación y alucinaciones. Estos trastornos pueden ocurrir en las primeras semanas de la enfermedad. El examen físico puede revelar temblor fino u ordinario de las extremidades, reflejos hiperactivos, ausencia de reflejos tendinosos profundos, y signos de disfunción cerebral. El período de incubación de la enfermedad del legionario es de 2 a 10 días, aunque puede extenderse incluso más de 10 días (WHO, 2004).

A pesar de varios signos y síntomas clínicos que se han descrito como característicos de la legionelosis, hay una considerable superposición de los síntomas de la enfermedad del legionario. Esta superposición hace que sea difícil desarrollar una lista de características para el diagnóstico de cada paciente infectado (Roig y Rello, 2003).

Por otro lado la fiebre de Pontiac es una enfermedad aguda, autolimitada, enfermedad de tipo gripal sin neumonía. A diferencia de la enfermedad del

legionario, la fiebre de Pontiac tiene una tasa de ataque alta, que afecta hasta el 95 % de los individuos expuestos (Glick *et al.*, 1978). Los síntomas principales son: astenia (pérdida de fuerza), cansancio, tos seca, fiebre alta y dolor muscular, mialgia (dolor de cabeza), artralgia (dolor en las articulaciones) y disnea (dificultad para respirar). Entre los síntomas gastrointestinales están: diarrea, náuseas y vómitos en una pequeña proporción de personas. La recuperación dentro de una semana es habitual, el período de incubación es de 24 a 48 horas. El tratamiento es de soporte y dirigido a aliviar los síntomas, las complicaciones ocurren rara vez (WHO, 2007).

Aún no está claro por qué la exposición a *L. pneumophila* puede dar lugar a dos síndromes clínica y epidemiológicamente distintos. Una teoría es que la fiebre de Pontiac es causada por una hipersensibilidad a un componente de la bacteria (Rowbotham, 1980). Otra hipótesis es que los aerosoles contienen células muertas de *Legionella* y pueden causar la enfermedad (Miller *et al.*, 1993). De acuerdo con una tercera teoría, la enfermedad es causada por una endotoxina producida por la bacteria, añadiendo además el estado de inmunosupresión del huésped infectado (Fields *et al.*, 2001).

1.8 Métodos de detección de *Legionella* spp.

Los métodos de detección para *Legionella* en muestras de agua incluyen el cultivo e identificación de la bacteria, mediante métodos inmunológicos y/o métodos moleculares. Para todos ellos debe optimizarse el procedimiento de detección, incluyendo la toma de la muestra que será diseñada en función de la finalidad del análisis (García, 2009).

1.8.1 Cultivo

El método primario de aislamiento para los organismos del género *Legionella* es el agar específico BCYE, este medio está basado en el empleo de carbón, extracto de levadura, L- cisteína y pirofosfato férrico. En estos medios de cultivo selectivos las colonias aparecen de los 3 a 4 días de incubación, son pequeñas, grisáceas-azuladas y brillantes; la identificación precisa se hace sometiendo estas colonias a pruebas específicas de género y especie (CDC, 2005).

1.8.2 Métodos moleculares

En los últimos años se han desarrollado métodos moleculares de PCR para detectar especies del género *Legionella* en muestras ambientales, se han descrito distintas sensibilidades y especificidades, que varían según el origen de la muestra, el procedimiento utilizado, el gen diana escogido (16S ribosomal, 5S

ribosomal y/o el gen *mip*), la medida del fragmento de ADN amplificado y el tipo de PCR que se utilice.

Entre los principales inconvenientes que presenta el uso de ésta técnica destaca, la gran cantidad de inhibidores de la PCR que pueden encontrarse en las muestras ambientales, sin embargo, hay que tener en cuenta que desde el punto de vista de salud pública, son importantes herramientas de reconocimiento, ya que, el aislamiento y cuantificación de las cepas bacterianas procedentes de instalaciones asociadas a la infección en humanos, permite la realización de estudios posteriores para identificar los puntos más contaminados y orientar los tratamientos de los puntos colonizados.

1.9 Tratamiento de las infecciones por *Legionella* spp.

En el brote original de 1976, a las personas infectadas por *Legionella* se les administró el macrólido eritromicina, teniendo una tasa de mortalidad más baja que aquellos pacientes a los que les fueron administrados otro tipo de antibióticos (Fraser *et al.*, 1977).

Estudios realizados para evaluar el efecto de ciertos macrólidos ha revelado que la azitromicina, tiene un efecto bactericida en cerdos de guinea y macrófagos alveolares, teniendo además un efecto post-antibacterial, mientras que la eritromicina tuvo un efecto bacteriostático y no mostro ningún efecto post-antibacterial, utilizándose los mismos modelos experimentales. Estas observaciones se han confirmado en ensayos clínicos en los que 20 de 21 de los pacientes tratados con azitromicina se curaron, siendo éste antibiótico uno de los más eficaces frente a *Legionella* (Marrie, 2008).

Hasta el momento, sólo unos pocos estudios clínicos sobre el tratamiento con antibióticos para la enfermedad del legionario se han completado, por lo que la evidencia de las recomendaciones de tratamiento es limitada (WHO, 2007).

El tratamiento debe iniciarse lo más precozmente posible, ya que el retraso en su administración se asocia a un peor pronóstico. La duración del tratamiento depende del antibiótico, el grado de inmunodepresión, la continua presencia de infección y el curso clínico del paciente (García, 2009).

3. ANTECEDENTES

Bej y colaboradores (1990), utilizaron la PCR y sondas genéticas para detectar células viables de *Legionella pneumophila*, investigando células expuestas a biocidas y a temperaturas elevadas. Usaron como diana el gen *mip*, con los primers *Lmip920* y *Lmip1548*, codificando una secuencia de 650 pb. Determinando que la exposición al hipoclorito causa en las células un estado viable pero no cultivable, amplificando mediante PCR solo las células viables.

Bernarder y colaboradores (1997), diseñaron un método de PCR anidado utilizando cebadores del gen *mip* de *Legionella pneumophila*. El método fue probado en cultivos puros de cepas clínicas de la *Legionella* y otras bacterias. Las muestras clínicas de lavado broncoalveolar, líquido bronquial y esputo de pacientes que sufrían de legionelosis y muestras de pacientes que habían sufrido de neumonía también fueron probadas.

Pascual y colaboradores (2001), realizaron un estudio para el muestreo de microorganismos transportados por el aire, como es el caso de *L. pneumophila*. Se tomaron un total de 64 muestras de plantas de agua residual, una planta química y un edificio de oficinas, todas las muestras se analizaron mediante cultivo y por PCR anidado, utilizando como primers externos: *Lmip920* y *Lmip1548*, y como cebadores internos: *Lmip976* y *Lmip1427*, que amplifican una región interna del gen *mip* de 471 pb. Los resultados mostraron ejemplares positivos para *L. pneumophila* tanto por cultivo como por PCR.

Nintasen y colaboradores (2007), identificaron a *L. pneumophila* mediante PCR utilizando como diana al gen *mip*, determinando que en comparación con los métodos de cultivo la tasa de detección de la bacteria mediante PCR fue relativamente elevada, teniendo la prueba alta especificidad, eficiencia y fidelidad de amplificación, concluyendo que la PCR es un método que puede permitir la identificación rápida y eficaz de la bacteria en el agua.

Yong y colaboradores (2010), mencionan que las recientes secuencias del genoma de *Legionella* han abierto cientos de posibilidades para el desarrollo de nuevas dianas moleculares para su detección y diagnóstico, por ello, utilizaron las secuencias de primers *lpg0774* que amplifican un fragmento que se asocia al serogrupo 1 de la especie y a la biosíntesis del lipopolisacárido (LPS) obteniéndose marcas de ADN en 156 pb y para el *lpg1905* un fragmento de 529 pb que se asocia a la mejora de la replicación intracelular de *L. pneumophila*.

Marín y Montes (1990), publicaron el informe de un caso de neumonía en el Estado de México. Se trataba de un paciente masculino que ingresó al Hospital de

Especialidades del Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios (ISSEMYM) de Toluca de Lerdo, con una neumonía intersticial atípica, reportándose tinción de Giménez positiva para *L. pneumophila*.

Torrijos y colaboradores (1995), reportaron el segundo caso de neumonía para México en el estado de Guerrero, se trataba de una paciente previamente sana en la que se diagnosticó una neumonía secundaria producida por *L. pneumophila*.

En enero de 2011 el CDC, emitió una alerta sanitaria hacia los viajeros internacionales para extremar sus precauciones, tras detectarse en el hotel Wyndham Cozumel Resort and Spa, en la Isla de Cozumel, México, un brote de legionelosis que afectó a turistas americanos. También se informó que desde mayo de 2008, se habían tenido un total de nueve confirmaciones de casos de la enfermedad por *Legionella* entre turistas provenientes de Estados Unidos y Holanda quienes estuvieron en esos hoteles. Basado en esos hallazgos se inició una investigación sanitaria pública en abril de 2010, donde fueron recomendadas las desinfecciones de los sistemas de agua potable del hotel. Aunque esas medidas fueron tomadas para la desinfección en cada hotel del sistema de agua potable, en diciembre de ese mismo año, el CDC fue notificado de otros nueve casos de legionelosis asociados con este hotel (Consulado de Estados Unidos, 2011).

4. JUSTIFICACIÓN

En México se han reportado solo dos casos con diagnóstico clínico de neumonía por *Legionella*, sin pruebas de laboratorio confirmatorias y ninguno por aislamiento del agente causal, estos fueron del Estado de México y Guerrero. En contraste, el European Working Group for Legionella Infections (EWGLI), una organización no gubernamental que hace vigilancia epidemiológica de los casos de legionelosis que ocurren en Europa desde 1987, asocia 46 casos ocurridos en turistas con su estancia en México entre 1990 y 2005 (Sapian, 2006).

Recientemente, en el año 2010, se reportó un brote de legionelosis en turistas que se hospedaron en un hotel en Cozumel, Quintana Roo, emitiéndose una alerta de prevención para posibles nuevos contagios.

Es por ello que se hace necesaria la investigación de la presencia de ésta bacteria en nuestro país, para iniciar las medidas que permitan controlar su aparición (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2005); por lo cual es importante disponer de un método eficaz y sensible que permita la vigilancia de este patógeno. Muchos de esos métodos utilizan herramientas de biología molecular como la PCR, por su costo y facilidad para llevar a cabo los análisis de identificación de *Legionella pneumophila*, sin embargo, en muchos análisis por PCR hay falta de sensibilidad, y en algunos casos de especificidad, para identificar a la bacteria (Bernander *et al.*, 1997). En este contexto, el uso de iniciadores bien diseñados que amplifiquen secciones específicas de *L. pneumophila*, evitan que se presenten problemas de falta o errónea amplificación de dichas secuencias específicas.

5. OBJETIVOS

General

Amplificar regiones específicas del gen *mip* utilizando diferentes secuencias de primers para identificar bacterias de la especie *Legionella pneumophila*.

Particulares

Establecer cuáles son las secuencias de primers más eficientes para la identificación de *Legionella pneumophila*.

Detectar la presencia de la especie *Legionella pneumophila* en agua de uso doméstico en la Ciudad de México y su área metropolitana.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Área de estudio

Las muestras de agua fueron obtenidas a partir de cuerpos de agua, dispositivos y contenedores de agua potable: regaderas, tinacos, cisternas, pozos, una alberca y de agua embotellada, las muestras se recolectaron de la zona norte del estado de México y dos delegaciones del Distrito Federal. Las muestras fueron recolectadas al azar, tomando en cuenta la capacidad de trabajo del Laboratorio de Investigación en Patógenos Emergentes de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y Educación (UIICSE) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Se obtuvieron muestras de agua potable de los municipios: Naucalpan de Juárez, Tlalnepantla de Baz, Atizapán de Zaragoza, Ecatepec de Morelos, Coacalco de Berriozábal, Cuautitlán Izcalli, Ixtapaluca y de las delegaciones: Gustavo A. Madero y Azcapotzalco, del Distrito Federal.

2. Recolecta de las muestras

Se recolectaron un total de 96 muestras de distintos cuerpos de agua, dispositivos y contenedores de agua potable: 35 muestras de regaderas, 24 de cisternas, 21 de tinacos, dos de pozos, una de alberca y 13 de agua embotellada, las muestras se recolectaron en tubos de polipropileno estériles de boca ancha de 50 ml las cuales fueron procesadas de acuerdo a Procedures for the Recovery of *Legionella* from the Environment (CDC, 2005).

El agua de regadera, se tomó quitando la cabeza de la ducha, para extraer con un hisopo una muestra de ésta, el hisopo se sumergió en 3-5 ml de la misma agua tomada para evitar que la muestra se seque durante el transporte.

Todas las muestras de agua fueron transportadas al Laboratorio de Investigación en Patógenos Emergentes de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y Educación (UIICSE) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

3. Registro de los parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos fueron registrados *in situ* para cada una de las muestras, la temperatura del agua (°C) fue medida con un termómetro digital Itawa, el pH y conductividad (mS/cm³) se midieron con un instrumento pH EC 98130 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI).

4. Concentración de bacterias por centrifugación

Después de dos semanas de incubación a 37 °C, los tubos con la muestra de agua fueron centrifugados a 3000 X G durante 30 minutos. Posterior a la centrifugación, se eliminó el sobrenadante dejando aproximadamente 1 ml de la muestra con el sedimento, el cual se procesó por tratamiento ácido (CDC, 2005).

5. Descontaminación por tratamiento ácido

Para el agua con altas concentraciones de bacterias, es necesario utilizar un procedimiento selectivo para reducir el número de bacterias que no sean del género *Legionella* antes de que éstas sean cultivadas, para lo cual el tratamiento ácido se utiliza con este fin. Las bacterias del género *Legionella* son resistentes al bajar el pH y al exponerlas brevemente a temperaturas altas, en comparación con otro tipo de bacterias de agua dulce.

Se agregó 1 ml de solución ácida a cada uno de los tubos que contenían el concentrado de la centrifugación anterior y se mezcló. Posteriormente se dejó reposar la suspensión acidificada durante 30 minutos a temperatura ambiente.

6. Cultivo de la muestra en agar específico BCYE

Posteriormente se colocó 0.1 ml de la suspensión acidificada, en placas de agar específico BCYE marca “Difco” para el crecimiento de bacterias del género *Legionella*. A estas placas se les agregó L-cisteína y se incubaron los cultivos a 37 °C durante 72-96 horas.

7. Examinación de los cultivos de *Legionella* spp

Los cultivos se examinaron después de 72 a 96 horas de incubación. Posterior a ello, se debieron reconocer colonias pequeñas, de color blanco brillante o aperlado, convexas, redondas, con alguna marca de fluorescencia.

8. Identificación molecular de *Legionella pneumophila*

8.1 Extracción y purificación del ADN bacteriano

Se llevó a cabo la extracción y purificación del ADN bacteriano de las cepas de catálogo: *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC® 33152™ y *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC® 33153™, utilizando un kit “QIAGEN” manejando el protocolo para la extracción y purificación de ADN de bacterias Gram-negativas.

Además se realizó la extracción y purificación del ADN bacteriano de los cultivos identificados por morfología colonial como pertenecientes al género *Legionella*.

8.2 PCR Y PCR anidado

Para la identificación de *Legionella pneumophila* se utilizó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para buscar y amplificar regiones específicas de esta especie utilizando diferentes secuencias de primers, la amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System9700, PE Applied Biosystems; posteriormente se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % para ser visualizado en un transiluminador de rayos UV.

Se utilizaron los iniciadores: *Lmip*L920 (5´-GCTACAGACAAGGATAAGTTG-3´) y el *Lmip*R1548 (5´-GTTTTGTATGACTTTAATTCA-3´) diseñados por Bej y colaboradores (1990), los cuales amplifican el gen *mip* específico de *Legionella pneumophila* en un fragmento de 650 pb. En un volumen de reacción de 50 µl, se mezclaron 25 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega) que contiene: 3 mM MgCl₂, 2X Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8.5), 400 µM de dNTP y 1.25 u GoTaq® DNA Polimerasa, además de 5 µl de cada primer, 10 µl de ADN templado y 5 µl de agua libre de nucleasas para ajustar al volumen final.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Extensión final
94 °C - 5 min	94 °C - 15 segundos	35 CICLOS 50 °C - 15 segundos	72 °C - 30 segundos	72 °C - 6 min

Así mismo se realizó la amplificación de una región interna del gen *mip* mediante un PCR anidado utilizando como primers externos: *Lmip*L920 y *Lmip*R1548 (Bej *et al.*, 1990) bajo las condiciones antes descritas.

Como primers internos: *Lmip*976 (5´-TAAAAATCAAGGCATAGATG-3´) y *Lmip*1427 (5´-AGACCTGAGGGAACATAAAT-3´) utilizados por Pascual y colaboradores (2001), para la detección de un fragmento de 471 pb. En un volumen de reacción de 50 µl, se mezclaron 25 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 5 µl de cada primer, 4 µl del producto amplificado en el primer PCR y 11 µl de agua libre de nucleasas para ajustar al volumen final.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineación 30 CICLOS	Extensión	Extensión final
95 °C - 5 min	95 °C - 30 segundos	55 °C - 30 segundos	72 °C –1 min	72 °C - 5 min

Para un segundo PCR anidado se utilizaron los mismos primers externos: *LmipL920* y *LmipR1548* (Bej *et al.*, 1990) utilizando las condiciones antes descritas y como primers internos: *Lmip1021* (5'- CATGCAAGACGCTATGAGTG-3') y *Lmip1392* (5'- CAAGTTGATCCAGCTGGCAT-3') utilizados por Bernander y colaboradores (1997) los cuales originan un fragmento de 403 pb. En un volumen de reacción de 50 µl, se mezclaron 25 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 5 µl de cada primer, 4 µl del producto amplificado en el primer PCR y 11 µl de agua libre de nucleasas para ajustar al volumen final.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineación 30 CICLOS	Extensión	Extensión final
95 °C - 5 min	95 °C - 30 segundos	55 °C - 30 segundos	72 °C –1 min	72 °C - 5 min

Finalmente se utilizaron los primers: *lpg0774* forward (5'-TGCTAACAACCACTATCCCAA-3') y reverse (5'-GTTTCAATAAAAGCGTGCTCCT-3') que amplifican un fragmento de 156 pb. Y los primers: *lpg1905* forward (5'-TTGCCTAAACTCACCACAGAA-3') y reverse (5'-ATGCCGCCCAAATATACC-3') para obtener un fragmento de 529 pb (Yong *et al.*, 2010), para ambos casos se utilizaron las mismas condiciones; en un volumen de reacción de 50 µl, se mezclaron 25 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 5 µl de cada primer, 10 µl de ADN templado y 5 µl de agua libre de nucleasas para ajustar al volumen final.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineación 35 CICLOS	Extensión	Extensión final
95 °C - 4 min	95 °C –1 min	57.5 °C –1 min	72 °C – 1 min	72 °C - 5 min

Todos los productos obtenidos mediante la PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1.5 % y visualizados en un transiluminador Cole Palmer.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Aislamiento e identificación de *Legionella* spp.

Para el presente estudio se recolectaron un total de 96 muestras de distintos cuerpos de agua, dispositivos y contenedores de agua potable de la ciudad de México y su área metropolitana: 35 muestras de regaderas, 24 de cisternas, 21 de tinacos, dos de pozos, una de alberca y 13 de agua embotellada, de las cuales, 51 muestras fueron positivas para crecimiento bacteriano de *Legionella* spp. en agar específico BCYE, y 45 muestras fueron negativas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Relación del total de muestras recolectadas según su origen, así como el total de aislados de *Legionella* spp.

Delegación/ Municipio	Muestra	Origen	<i>Legionella</i> spp.
Naucalpan, Edo. de México	T1	T	-
Naucalpan, Edo. de México	T2	T	+
Naucalpan, Edo. de México	T3	T	+
Naucalpan, Edo. de México	T4	T	+
Ecatepec, Edo. de México	CA-R	R	+
Ecatepec, Edo. de México	GI	C	+
Ecatepec, Edo. de México	PI-R	R	-
Ecatepec, Edo. de México	YH	C	-
Ecatepec, Edo. de México	YH-R	R	-
Tlalnepantla, Edo. de México	RS-R	R	-
Ecatepec, Edo. de México	GI-R	R	-
Ecatepec, Edo. de México	CA	C	-
Ixtapaluca, Edo. de México	ANG-R	R	+
Ixtapaluca, Edo. de México	PA-R	R	-
Ixtapaluca, Edo. de México	PAN	C	-
Ixtapaluca, Edo. de México	EM	C	-
Ixtapaluca, Edo. de México	EM-R	R	-
Ixtapaluca, Edo. de México	HE-R	R	-
Ixtapaluca, Edo. de México	MO	P	-
Ixtapaluca, Edo. de México	PA	C	-
Ixtapaluca, Edo. de México	PO-R	R	-
Ixtapaluca, Edo. de México	JU-R	R	-
Ixtapaluca, Edo. de México	PAN-R	R	+
Naucalpan, Edo. de México	RMS	R	+
Naucalpan, Edo. de México	GMS	G	+
Naucalpan, Edo. de México	TMS	T	+
Naucalpan, Edo. de México	CMS	C	+
Naucalpan, Edo. de México	CAA	C	-

Naucalpan, Edo. de México	TAA	T	+
Naucalpan, Edo. de México	RAA	R	-
Naucalpan, Edo. de México	GAA	G	+
Cuautitlán Izcalli, Edo de México	NAN	C	+
Ecatepec, Edo. de México	ROB-R	R	-
Atizapán de Zaragoza	TAN	C	-
Atizapán de Zaragoza	TAN-R	R	+
Ecatepec, Edo. de México	ROB	C	+
Gustavo A Madero, D.F	ALD	C	+
Gustavo A Madero, D.F	ALD-R	R	+
Azcapotzalco, D.F.	KAR-R	R	+
Cuautitlán Izcalli, Edo. de México	NAN-R	R	-
Gustavo A Madero, D.F	LAU-R	R	+
Naucalpan, Edo. de México	RAG	R	+
Naucalpan, Edo. de México	GA1	G	+
Ecatepec, Edo. de México	YO-G	G	+
Naucalpan, Edo. de México	TRM	T	+
Naucalpan, Edo. de México	GAG	G	+
Ecatepec, Edo. de México	MAM-G	G	+
Naucalpan, Edo. de México	TAG	T	+
Ecatepec, Edo. de México	JU-G	G	+
Naucalpan, Edo. de México	ROT	T	-
Naucalpan, Edo. de México	ROOT	T	+
Naucalpan, Edo. de México	ROR	R	+
Naucalpan, Edo. de México	ROG	G	-
Naucalpan, Edo. de México	ROT1	T	+
Naucalpan, Edo. de México	RUC	C	+
Naucalpan, Edo. de México	ECOG	G	+
Naucalpan, Edo. de México	ELOT	T	+
Ecatepec, Edo. de México	SAR	C	-
Ecatepec, Edo. de México	SAR-R	R	+
Ecatepec, Edo. de México	FRA	C	+
Ecatepec, Edo. de México	OSC	C	-
Ecatepec, Edo. de México	OSC-R	R	+
Coacalco de Berriozábal, Edo. de México	BET	R	-
Coacalco de Berriozábal, Edo. de México	BET-R	R	-
Ecatepec, Edo. de México	FRA-R	R	+
Ecatepec, Edo. de México	GAB-R	R	+
Ecatepec, Edo. de México	GAB	C	+
Gustavo A. Madero	RRS-R	R	-
Ecatepec, Edo. de México	HID-R	R	-
Ecatepec, Edo. de México	HID	C	-
Gustavo A. Madero	RRS-G	G	-
Gustavo A. Madero	RRS	C	+
Ecatepec, Edo. de México	HID-A	A	+

Naucalpan, Edo. de México	ELV-R	R	-
Naucalpan, Edo. de México	LIL-G	G	-
Naucalpan, Edo. de México	ELVC	C	-
Naucalpan, Edo. de México	ELVT-1	T	-
Naucalpan, Edo. de México	ELV-G	G	-
Naucalpan, Edo. de México	ELVT	T	-
Ecatepec, Edo. de México	PRI-R	R	+
Gustavo A. Madero	LAU-R2	R	+
Ecatepec, Edo. de México	PRI	C	+
Ecatepec, Edo. de México	ALI-T	T	-
Ecatepec, Edo. de México	LIL	C	+
Ecatepec, Edo. de México	LIL-R	R	-
Ecatepec, Edo. de México	ANG	P	-
Ecatepec, Edo. de México	JU-T	T	-
Tlalnepantla, Edo. de México	LAL-T1	T	-
Tlalnepantla, Edo. de México	LAL-T2	T	+
Tlalnepantla, Edo. de México	LAL-T	T	-
Tlalnepantla, Edo. de México	LAL-C	C	+
Tlalnepantla, Edo. de México	LAL-R	R	+
Tlalnepantla, Edo. de México	LAL-G	G	+
Ecatepec, Edo. de México	PI-C	C	-
Ecatepec, Edo. de México	PI-T	T	-
Ecatepec, Edo. de México	JO-T	T	+

* T= Tinaco; C= Cisterna; P= Pozo; A= Alberca, R= Regadera

La mayoría de las muestras se tomaron de los municipios: Ecatepec de Morelos y Naucalpan de Juárez, con 33 y 31 muestras de agua respectivamente. De ellas, 20 muestras de agua fueron positivas para crecimiento bacteriano de *Legionella* spp en agar específico BCYE, de las pertenecientes a Naucalpan de Juárez, mientras que de las muestras obtenidas del municipio de Ecatepec de Morelos, se registraron 17 muestras positivas para crecimiento bacteriano de *Legionella* spp (Cuadro 4).

En general, las muestras de agua recolectadas de regadera fueron las que presentaron el mayor número de cultivos positivos para *Legionella* spp., ya que también fue de éstas que se recolectaron el mayor número de muestras (Fig. 6).

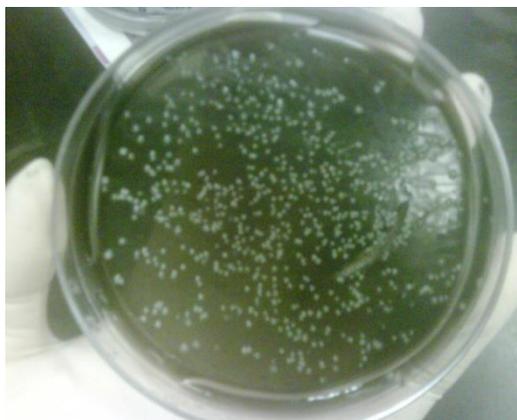


Figura 6. Aislados de *Legionella* spp. en agar específico BCYE obtenidos a partir de las muestras de agua recolectadas.

Es frecuente detectar especies de *Legionella* en ambientes acuáticos, por ejemplo en embalses, ríos, lagos, etc. (Sheehan *et al.*, 2005), aunque también *Legionella* ha encontrado un nicho ecológico adecuado en torres de refrigeración, aguas termales, y ambientes acuáticos humanos tales como aguas residuales y sistemas de agua potable (Pascual *et al.*, 2001), esto es de esperarse si tomamos en cuenta que *Legionella* es considerada una bacteria ambiental teniendo su nicho natural en aguas superficiales, desde éstos reservorios naturales la bacteria pasa a colonizar los sistemas de abastecimiento de las ciudades, y a través de la red de distribución hídrica, se incorpora a los sistemas de agua ya sea fría o caliente (García, 2009). Es por ello que en el presente estudio se lograron obtener aislados de *Legionella* de todos los puntos muestreados (Cuadro 4), si bien no se aisló al organismo de todas las muestras de agua como era de esperarse, ya que se considera que ésta bacteria es omnipresente en el agua (Fliermans *et al.*, 1981), ello puede deberse a que *Legionella* alcanza concentraciones demasiado bajas para ser detectada mediante métodos de cultivo (WHO, 2007), o debido a que el patógeno se encuentra expuesto a limitaciones y cambios en la disponibilidad de nutrientes, temperatura, salinidad, oxígeno y pH, por lo que las bacterias suelen entrar en un estado “temporalmente no cultivable” para poder adaptarse al ambiente tan estresante y regular la diferenciación celular para adaptarse a tales tensiones y luego resucitar cuando las condiciones ambientales sean favorables para su crecimiento (Ohno *et al.*, 2003).

1.1 Parámetros fisicoquímicos

Es importante conocer la forma en que *Legionella* interactúa con su entorno natural y con otras especies, ya que esto nos ayuda a comprender los factores que favorecen la supervivencia y crecimiento en los sistemas de agua artificiales,

con este fin, se evaluaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: temperatura del agua (°C), pH y conductividad (mS/cm³).

1.1.1 Temperatura del agua

Las temperaturas registradas en los puntos de muestreo oscilaron entre los 17 a 34 °C, con un promedio de 25 °C. Las temperaturas más elevadas fueron las que se registraron de las muestras de agua de regadera, mientras que las muestras que tuvieron las temperaturas más bajas fueron las de agua de cisterna y garrafón (Fig. 7).

El crecimiento bacteriano se ve influenciado por diferentes condiciones de cultivo. La temperatura es un componente esencial que regula el crecimiento de las bacterias y su morfología. A pesar de que las bacterias del género *Legionella* se pueden encontrar en aguas que van de frío a muy caliente, su multiplicación se limita a temperaturas de entre 25 a 42 °C con un crecimiento óptimo a los 35 °C (Fields, 2008).

La temperatura del agua es un factor crucial en la colonización por *Legionella* de los sistemas de distribución de agua (Yu, 2000), ya que estos organismos son capaces sobrevivir en ámbitos de temperatura amplios, que van de los 25 a los 43 °C (Huang, 2010).

En el presente estudio las temperaturas más elevadas fueron de 27-34 °C y se registraron en las muestras de agua de regadera (Fig. 7), siendo también en estas muestras donde se obtuvieron el mayor número de aislados de *Legionella* spp. (cuadro 4), debido a que los intervalos de temperatura son los óptimos para el crecimiento de éste patógeno, mostrando así una relación entre la temperatura y el crecimiento bacteriano, lo cual concuerda con el estudio realizado por Hubrá (2009), donde los niveles más altos de colonización por *L. pneumophila* se registraron a temperaturas de 30-35 °C en el agua.

Por otro lado las temperaturas más bajas registradas para este estudio, se encontraron en las muestras de agua de cisterna (Fig. 7), siendo también en estas donde se obtuvieron el menor número de aislados de *Legionella* (Cuadro 4), esto pudo ser debido a que por debajo de los 20 °C el organismo va disminuyendo su aparición en el agua, si bien *Legionella* consigue estar presente, puede ser que se encuentre en concentraciones demasiado bajas para ser detectada mediante métodos de cultivo (WHO, 2007).

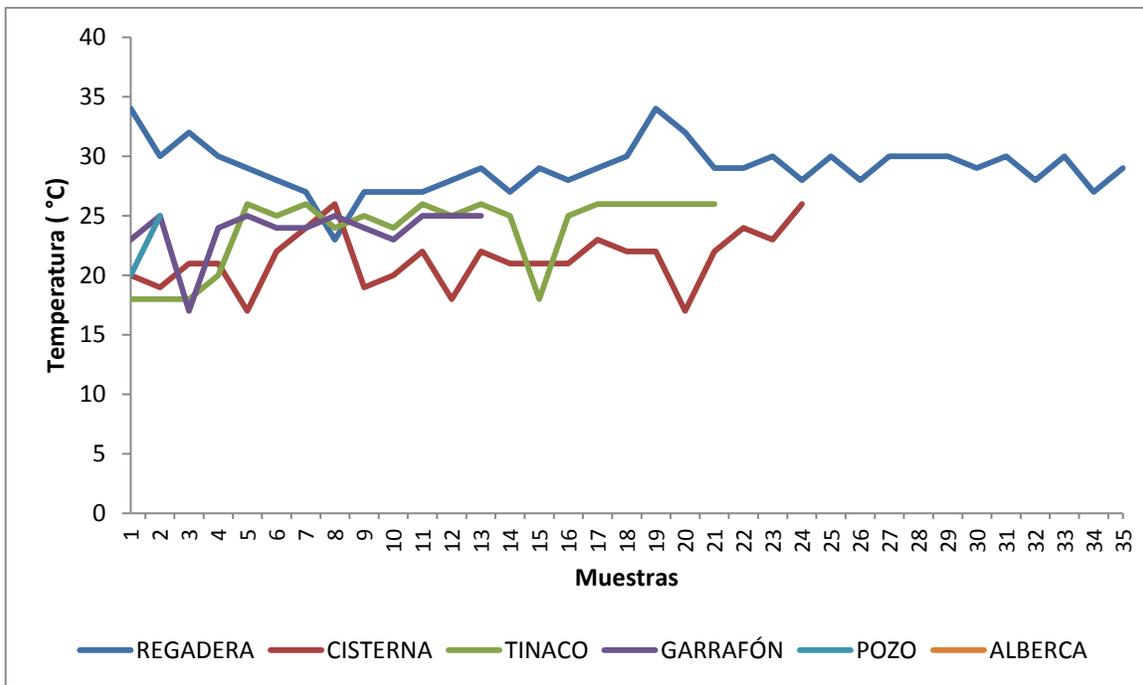


Figura 7. Temperaturas registradas para cada una de las muestras recolectadas agrupadas según su origen. La temperatura más elevada 34 °C, se registró en las muestras de agua de regadera, mientras que la más baja 17 °C, se midió en el agua de cisterna y garrafón.

Es muy importante tener en cuenta la influencia de la temperatura, ya que no solo se ha asociado con la ocurrencia de *Legionella* spp. en el agua, sino también con la virulencia, Edelstein en 1987, realizó un estudio para evaluar el crecimiento y la virulencia de *Legionella pneumophila* cultivándola a diferentes temperaturas, para después infectar cerdos y macrófagos alveolares, demostrando que la misma cepa de *Legionella pneumophila* varía su virulencia cuando se cultiva a diferentes temperaturas, siendo las bacterias que crecieron a 25 °C cinco veces más virulentas que las cultivadas a 41 °C.

Konishi y colaboradores (2006), evaluaron el efecto de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano, determinando que a ≤ 43.1 °C casi todas las cepas bacterianas de *L. pneumophila* se multiplican, y a ≥ 44.1 °C más del 88.9 % de las cepas no se multiplican, es por ello que como medida para la prevención de *Legionella* en el agua, se debe mantener la temperatura del agua por arriba de los 50 °C (óptimamente por encima de los 55 °C) ya que se ha encontrado que el riesgo de cultivo de *Legionella* disminuye con el aumento de la temperatura (Brooks *et al.*, 2004).

Y para el almacenamiento de agua fría se recomienda que la temperatura debe estar por debajo de los 20 °C, ya que a estas temperaturas disminuye la aparición de *Legionella* en el agua (WHO, 2007), sin embargo, aún sigue existiendo el

problema de determinar la temperatura adecuada para inactivar a *Legionella* en los sistemas de agua caliente y fría (Hubrá, 2009).

También es importante tener un control de temperatura en los sistemas de fontanería, aparatos de aire acondicionado y baños calientes (también conocido como piscinas de spa), ya que generalmente utilizan agua en el intervalo de temperatura que favorece el crecimiento de *Legionella*, además estos sistemas de agua pueden producir aerosoles en grandes cantidades, aumentando la propagación de las bacterias (WHO, 2007).

1.1.2 pH

A cada una de las muestras también se les midió *in situ* el pH, los valores que se registraron estuvieron entre 6.3-8.52. En general, los valores de pH de las muestras se muestran como alcalinos, ya que todos los registros se encuentran por arriba de 7, a excepción de una muestra de agua de regadera donde se midió el valor más bajo que fue de 6.3, siendo un valor de pH ácido (Fig. 8).

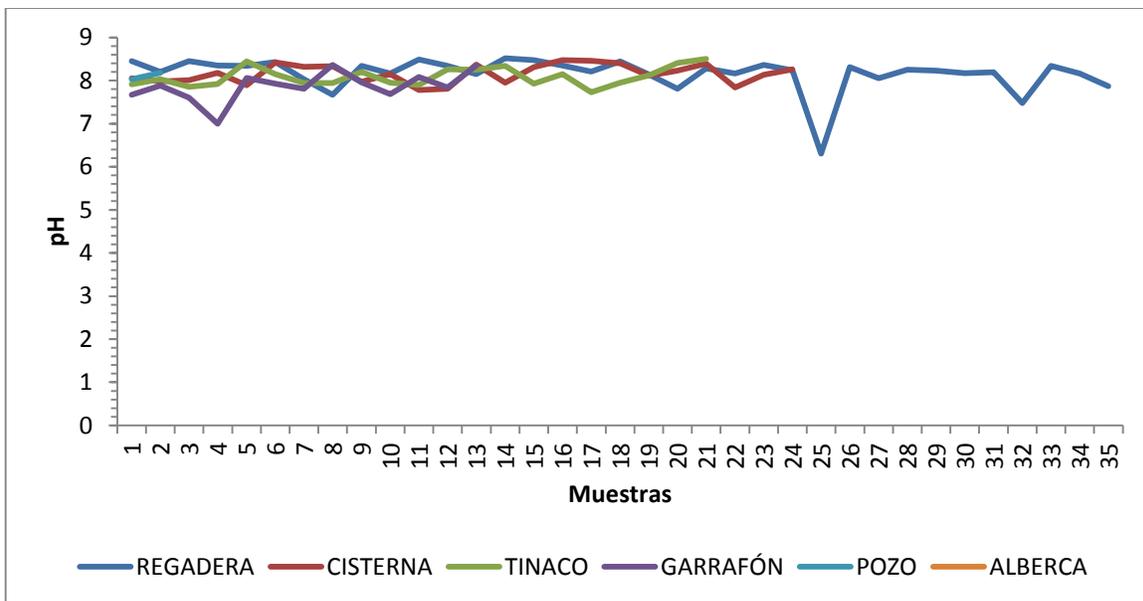


Figura 8. Registros de pH tomados para cada una de las muestras agrupadas según su origen.

Las bacterias del género *Legionella* están presentes en el agua tolerando un intervalo de pH de 5.0-9.2 (Declerck, 2009), aunque también se les considera como acidotolerantes, ya que pueden soportar la exposición a pH de 2.0 durante períodos cortos, y por ello han sido aisladas a partir de fuentes ambientales que van desde un pH de 2.7 a 8.3 (Sheehan *et al.*, 2005).

En este estudio se aisló a la bacteria en un ámbito de pH de 6.3 a 8.5 (Fig. 8), lo que significa que se encontró dentro de la escala de pH que soporta el género *Legionella* en el agua. Fliermans y colaboradores en 1981, realizaron un estudio para identificar la distribución ecológica de *L. pneumophila*, encontrando al organismo en un intervalo de pH de 5.5 a 8.1; Ohno y colaboradores (2003), evaluaron los factores implicados en la supervivencia del patógeno, encontrando que el intervalo óptimo de pH fue de entre 6 y 8; mientras que Huang y colaboradores en 2010, aislaron especies de *Legionella* en un ámbito de pH de 6.4 a 7.8, todos encontrándose dentro de los valores de pH registrados para este estudio.

El pH es un factor importante para la supervivencia de *L. pneumophila*, Katz y Hammel (1987) demostraron que hay un descenso de células viables de *L. pneumophila* después de permanecer durante un mes en agua de grifo en un pH de 4 a 7, y a un pH de 2-3 el organismo solo puede sobrevivir en un corto plazo (minutos) de exposición.

1.1.3 Conductividad (mS/cm³)

Los valores de conductividad oscilaron entre los 0.06–1.17 mS/cm³, con un promedio 0.48 mS/cm³, el valor mínimo se registró en una muestra de agua de garrafón, mientras que el valor más alto fue de una muestra de regadera y cisterna (Fig. 9).

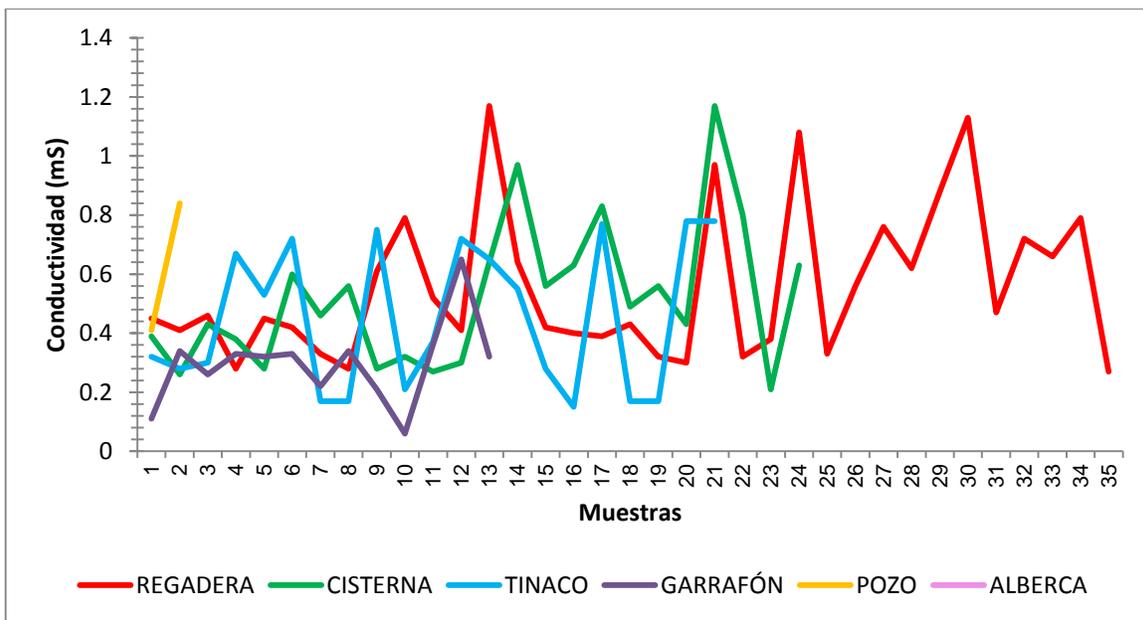


Figura 9. Conductividad (mS/cm³) registrada para cada una de las muestras tomadas agrupadas según su origen.

Debido a que todas las aguas naturales tienen contacto con la atmósfera y con la superficie terrestre, éstas siempre contienen en mayor o menor cantidad sales en solución. Los iones que contiene el agua como sales disueltas provienen de procesos de disolución que se llevan a cabo en cuanto el agua se pone en contacto con diversos compuestos y sustancias, y se miden cualitativamente por medio de la conductividad, ya que estas partículas en solución están cargadas positiva o negativamente, y por lo tanto son capaces de conducir corriente eléctrica. Cuanto mayor es la cantidad de partículas disueltas en un solvente, mayor es la conductividad de una solución. Generalmente en aguas naturales, los iones mayormente disueltos son: calcio, magnesio, sodio, potasio, cloruros, sulfatos, nitratos, entre otros.

En el presente estudio se aislaron a los organismos en una escala de conductividad de 0.06–1.17 mS/cm³ (Fig. 9), mientras que Fliermans y colaboradores (1981) aislaron a *L. pneumophila* de hábitats acuáticos con una conductividad de 0.018-0.106 mS/cm³; Ohno y colaboradores (2003) encontraron a la bacteria en muestras de agua con valores de conductividad de 0.066-26.8 mS/cm³; los valores de conductividad varían en función del grado de saturación de compuestos solubles y éstos a su vez dependerán del origen del agua así como del tiempo que duren en contacto con el agua. Ohno y colaboradores en 2003, mencionan que la concentración de solutos en el agua es también un factor importante en la supervivencia de *L. pneumophila*, señalan además que algunos minerales han sido conocidos por jugar un papel importante en el metabolismo bacteriano.

Heller y colaboradores en 1997, evaluaron el efecto de la concentración salina y la temperatura sobre la supervivencia de *L. pneumophila*, observando que la adición de pequeñas cantidades de NaCl (0.1-0.5 %) mejora la supervivencia del patógeno, lo que sugiere un efecto protector del NaCl, sin embargo, también menciona que la combinación de altas temperaturas (30-37 °C) con concentraciones de sal de más del 1-2 % disminuye claramente el número de células.

La función específica de los iones de sodio y cloro en el metabolismo de *L. pneumophila* no han sido examinados, pero es bien sabido que el sodio está implicado en los sistemas metabólicos del portador y es también un importante co-factor en enzimas.

Barbaree y colaboradores (1983) evaluaron la tolerancia de *Legionella* al cloruro de sodio, demostrando que diferentes especies del género tienen un nivel de

tolerancia distinto y que *L. pneumophila* era capaz de crecer en caldo de cultivo que contenía de 1-1.5 % de NaCl.

States y colaboradores (1985) mencionan que las altas concentraciones de metales afectan la actividad metabólica, la supervivencia, la diversidad y la estabilidad de las comunidades microbianas.

Los picos más altos de conductividad se registraron en las muestras de agua de regadera (Fig. 9), sí como lo menciona Ohno, y colaboradores en 2003, la concentración de solutos en el agua es también un factor importante en la supervivencia de *L. pneumophila*, esto podría explicar por qué en las muestras de agua de regadera se lograron obtener el mayor número de aislados de *Legionella* (Cuadro 4), además de que en estas muestras se registraron temperaturas de 27-34°C siendo óptimas para el crecimiento del patógeno (Fig. 2) y valores de pH ideales lo que hace al agua de regadera un medio idóneo para la supervivencia, multiplicación y diseminación de *L. pneumophila*, todo lo anterior cobra aún más relevancia debido a que el agua de regadera produce un gran número de aerosoles con capacidad infectante.

Schoen y Ashbolt (2011) mencionan que los aerosoles desprendidos de la ducha han sido reconocidos como vías importantes de exposición al patógeno, además de que las biopelículas dentro de los sistemas de agua, pueden crear un nicho biológico para el crecimiento y persistencia de *Legionella*, para demostrarlo crearon un modelo matemático para simular la exposición al patógeno, a partir de la inhalación de aerosoles provenientes de la ducha (Fig. 10).

Los procesos incluidos en dicho modelo son: en primer lugar, la bacteria se multiplica dentro de la biopelícula (o sedimentos), o dentro de una población de protozoos, durante el baño la bacteria se separa de la biopelícula (o sedimentos) y es transportada hasta la cabeza de la ducha para después ser aerosolizada, para por último ser inhalada y depositada en la región alveolar de los pulmones.

Kuroki y colaboradores (2009), menciona que el mayor número de casos de legionelosis ubicó su origen en la infección por aerosoles desprendidos del agua de la ducha, siendo de vital importancia tener un control de higiene sobre los sistemas de tuberías, para evitar posibles riesgos de infección.

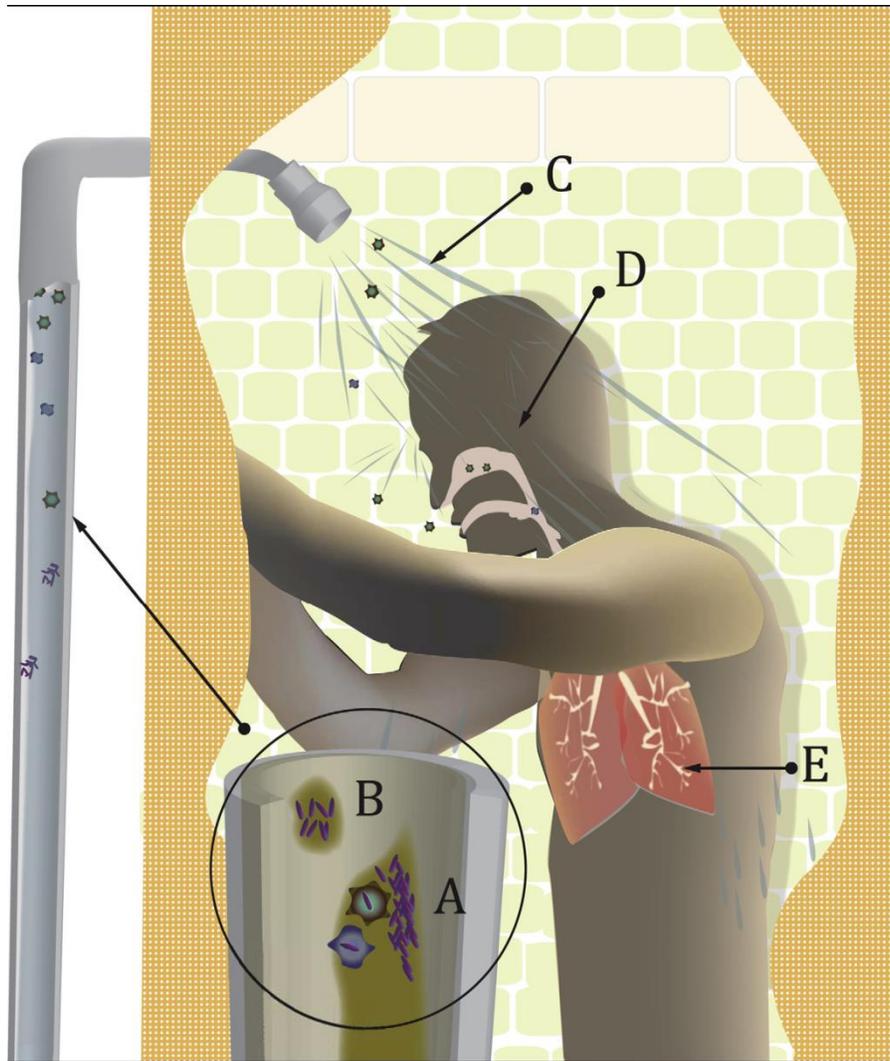


Figura 10. Modelo conceptual para la exposición a *Legionella* por la inhalación de aerosoles desprendidos de la ducha. En primer lugar *Legionella* se multiplica dentro de la biopelícula. A) *Legionella* se separa de la biopelícula durante la ducha. B) es transportada a la cabeza de la ducha y C) es aerosolizada. D) el aerosol es inhalado. E) una fracción de la dosis inhalada se deposita en la región alveolar de los pulmones.

2. Identificación molecular de *Legionella pneumophila* mediante PCR

Los aislados bacterianos de *Legionella* spp., fueron procesados mediante PCR para su identificación a nivel de especie, hallándose la presencia de *Legionella pneumophila* en el 20.7 % de éstos aislados (Cuadro 5).

Cuadro 5. Relación de muestras positivas para *Legionella* spp. y las identificadas a nivel de especie.

Delegación/Municipio	Muestra	Origen	<i>Legionella</i> spp.	<i>Legionella pneumophila</i>
Azcapotzalco, D. F.	KAR-R	R	+	+
Gustavo A Madero, D.F.	ALD	C	+	-
Gustavo A Madero, D.F.	ALD-R	R	+	-
Gustavo A Madero, D.F.	LAU-R	R	+	-
Gustavo A. Madero, D. F.	RRS	C	+	-
Gustavo A. Madero, D. F.	LAU-R2	R	+	+
Atizapán de Zaragoza, Edo. de México	TAN-R	R	+	-
Cuautitlán Izcalli, Edo. de México	NAN	C	+	-
Ecatepec, Edo. de México	CA-R	R	+	-
Ecatepec, Edo. de México	GI	C	+	-
Ecatepec, Edo. de México	ROB	C	+	-
Ecatepec, Edo. de México	YO-G	G	+	-
Ecatepec, Edo. de México	MAM-G	G	+	-
Ecatepec, Edo. de México	JU-G	G	+	+
Ecatepec, Edo. de México	SAR-R	R	+	+
Ecatepec, Edo. de México	FRA	C	+	-
Ecatepec, Edo. de México	OSC-R	R	+	-
Ecatepec, Edo. de México	FRA-R	R	+	-
Ecatepec, Edo. de México	GAB-R	R	+	-
Ecatepec, Edo. de México	GAB	C	+	-
Ecatepec, Edo. de México	HID-A	A	+	-
Ecatepec, Edo. de México	PRI-R	R	+	-
Ecatepec, Edo. de México	PRI	C	+	-
Ecatepec, Edo. de México	LIL	C	+	+
Ecatepec, Edo. de México	JO-T	T	+	-
Ixtapaluca, Edo. de México	ANG-R	R	+	-
Ixtapaluca, Edo. de México	PAN-R	R	+	+
Naucalpan, Edo. de México	T2	T	+	+
Naucalpan, Edo. de México	T3	T	+	-
Naucalpan, Edo. de México	T4	T	+	-
Naucalpan, Edo. de México	RMS	R	+	-
Naucalpan, Edo. de México	GMS	G	+	-
Naucalpan, Edo. de México	TMS	T	+	-
Naucalpan, Edo. de México	CMS	C	+	-
Naucalpan, Edo. de México	TAA	T	+	-
Naucalpan, Edo. de México	GAA	G	+	-
Naucalpan, Edo. de México	RAG	R	+	-
Naucalpan, Edo. de México	GA1	G	+	+
Naucalpan, Edo. de México	TRM	T	+	-
Naucalpan, Edo. de México	GAG	G	+	-
Naucalpan, Edo. de México	TAG	T	+	-
Naucalpan, Edo. de México	ROOT	T	+	+
Naucalpan, Edo. de México	ROR	R	+	+
Naucalpan, Edo. de México	ROT1	T	+	+
Naucalpan, Edo. de México	RUC	C	+	-
Naucalpan, Edo. de México	ECOG	G	+	-
Naucalpan, Edo. de México	ELOT	T	+	-
Tlalnepantla, Edo. de México	LAL-T2	T	+	-
Tlalnepantla, Edo. de México	LAL-C	C	+	-

Tlalnepantla, Edo. de México	LAL-R	R	+	-
Tlalnepantla, Edo. de México	LAL-G	G	+	-

* T= Tinaco; C= Cisterna; P= Pozo; A= Alberca, R= Regadera

Se hizo la identificación de la especie *Legionella pneumophila*, en 5 de las muestras obtenidas del municipio de Naucalpan de Juárez, en 3 muestras de agua del municipio de Ecatepec y en una muestra de Ixtapaluca, Gustavo A. Madero y Azcapotzalco respectivamente (Cuadro 5).

Los ejemplares provenientes de agua de regadera, fueron los que tuvieron el mayor porcentaje de muestras donde fue identificada la bacteria *L. pneumophila* con un 9.4 %, mientras que en el de agua de cisterna solo se identificó a la bacteria en el 1.9 % de los aislados (Fig. 11).

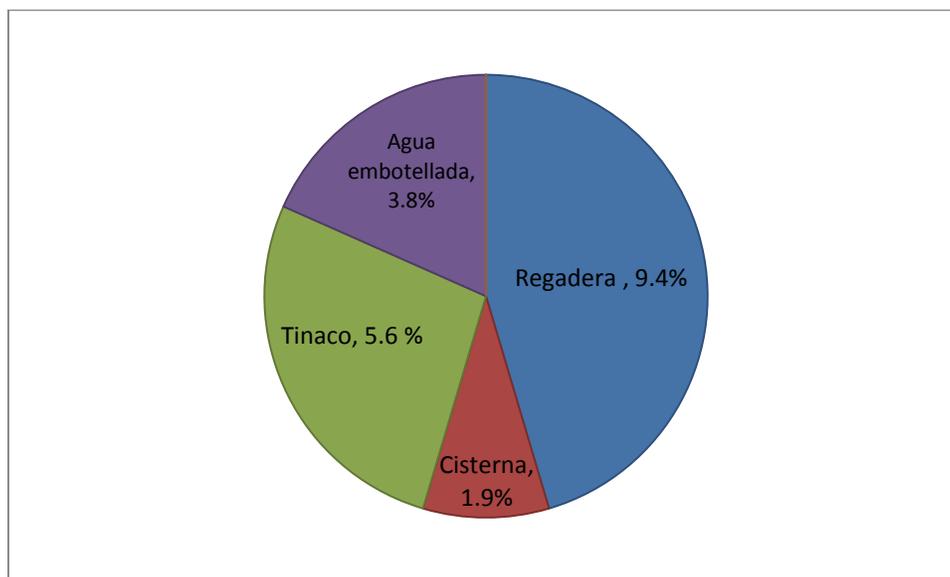


Figura 11. Porcentaje de muestras según su origen, donde se identificó a *Legionella pneumophila*.

La identificación de la especie *L. pneumophila* a partir de las muestras de agua recolectadas, se llevó a cabo utilizando secuencias de primers que amplifican el gen *mip* específico de la especie mediante la técnica de PCR.

Además se utilizaron primers que amplifican secuencias distintas a la del gen *mip*, pero que igualmente se emplean para la identificación de la especie *L. pneumophila*, los primers *lpg0774* amplifican un fragmento que se asocia al serogrupo 1 de la especie y a la biosíntesis del lipopolisacárido (LPS) y el *lpg1905* amplifica un fragmento que se asocia a la mejora de la replicación intracelular de *L. pneumophila*. Todas las secuencias de primers fueron inicialmente probadas en

las cepas de catálogo: *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC® 33152™ y *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC® 33153™ (Fig. 12).

Las secuencias de los primers *Lmip920* y *Lmip1548* (Bej *et al.*, 1990) amplifican el gen *mip*, en un fragmento de 650 pb, a partir de éste fragmento de ADN se realizó un PCR anidado para amplificar una región interna del gen *mip*, las secuencias *Lmip976* y *Lmip1427* (Pascual *et al.*, 2001) amplifican una secuencia de 471 bp, mientras que las secuencias *Lmip1021* y *Lmip1392* (Bernarder *et al.*, 1997) producen bandas de ADN en 403 pb (Fig. 12).

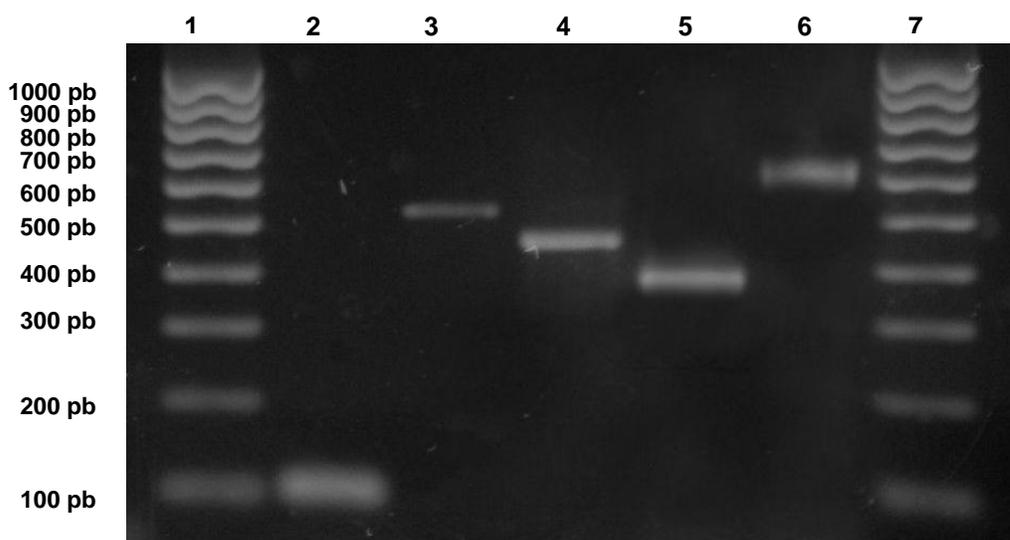


Figura 12. Amplificación de fragmentos de ADN de las cepas de catálogo: *Legionella pneumophila* subsp. *Pneumophila* ATCC® 33152™ y *Legionella pneumophila* subsp. *Pneumophila* ATCC® 33153™. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Línea 1 y 7, marcador molecular. Línea 2, amplicón de 156 pb (*lpg0774* - Yonge *et al.*, 2010). Línea 3, amplicón de 529 pb (*lpg1905* - Yonge *et al.*, 2010). Línea 4, amplicón de 471 pb (*Lmip976* y *Lmip1427* - Pascual *et al.*, 2001). Línea 5, amplicón de 403 pb (*Lmip1021* y *Lmip1392* – Bernarder *et al.*, 1997). Línea 6, amplicón de 650 pb (*Lmip920* y *Lmip1548* – Bej *et al.*, 1990).

Generalmente la detección de *L. pneumophila* en muestras clínicas y ambientales se realiza mediante la amplificación del gen *mip* o el gen 16S rRNA, sin embargo, las recientes secuencias del genoma de *Legionella* han abierto otras posibilidades para el desarrollo de nuevas dianas moleculares para su diagnóstico y detección, las secuencias de primers *lpg0774* amplifican un fragmento que se asocia al serogrupo 1 de la especie y a la biosíntesis del lipopolisacárido (LPS) obteniéndose marcas de ADN en 156 pb y el *lpg1905* amplifica un fragmento de 529 pb (Fig. 12) que se asocia a la mejora de la replicación intracelular de *L. pneumophila*. Después de probar todas las secuencias de primers en las cepas de referencia, se eligieron las secuencias de primers que aportaran mayor

información para la identificación a nivel de especie de *Legionella pneumophila* (Fig. 13).

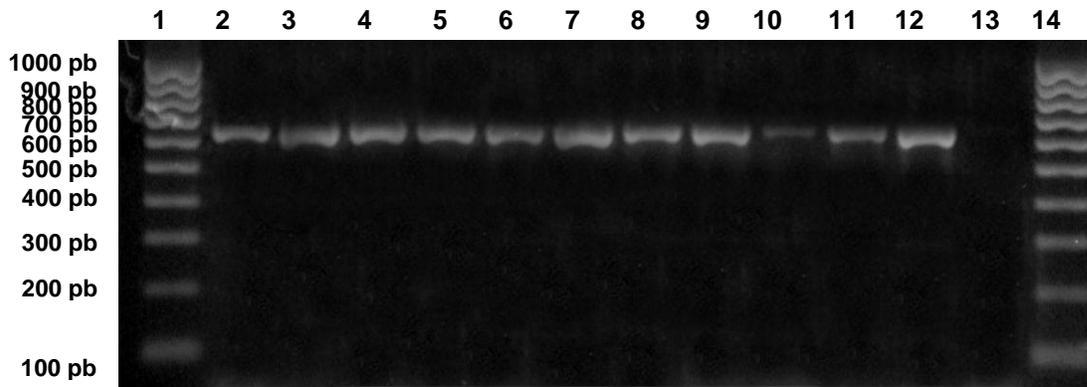


Figura 13. Identificación de *L. pneumophila* a partir de las muestras de agua recolectadas. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Línea 1 y 14: marcador molecular. Línea 2 -12: aislados bacterianos de las muestras recolectadas, con marca en 650 pb, utilizando los primers *Lmip920* y *Lmip1548* (Bej *et al.*, 1990). Línea 13, control negativo.

Las secuencias primers *Lmip920* y *Lmip1548* produjeron bandas positivas de ADN en fragmentos de 650 pb, en las muestras de ADN de las cepas de referencia y en el 20.7 % de los aislados bacterianos, identificando así a la especie *L. pneumophila*.

Además de los pares de primers diseñados por Bej y colaboradores (1990) para la identificación de *L. pneumophila* a partir de los aislados bacterianos obtenidos de las muestras de agua recolectadas, se utilizaron los primers *lpg0774* y *lpg1905* que amplifican secuencias distintas a la del gen *mip* pero que igualmente identifican a la especie, sin embargo, no se obtuvieron marcas de ADN en ninguna de las muestras, esto puede deberse a que los primers diseñados por Yong y colaboradores (2010), amplifican regiones demasiado específicas del genoma de *L. pneumophila*.

Por lo tanto, las secuencias de primers *Lmip920* y *Lmip1548* (Bej *et al.*, 1990) son importantes debido a que codifican la región del gen *mip*, uno de los genes mayormente utilizados para la identificación de la especie *L. pneumophila*, varios autores han reconocido la gran utilidad de ésta diana molecular para la identificación del patógeno.

El medio de cultivo estándar para la detección, aislamiento e identificación de *L. pneumophila* en muestras clínicas y ambientales, es el agar específico BCYE, teniendo una sensibilidad de aproximadamente el 70 % (Nintasen *et al.*, 2007); pero debido a que se requieren varios días e incluso semanas de incubación,

aunado a que el crecimiento de *Legionella* puede ser inhibido o enmascarado por el desarrollo excesivo de organismos contaminantes, éste método resulta ser menos sensible que las herramientas moleculares (Dusserre *et al.*, 2008).

Debido a la dificultad de cultivo de la bacteria se ha llevado al desarrollo de pruebas moleculares rápidas para la detección de ácidos nucleicos de *Legionella*, el diagnóstico molecular se basa en la detección de secuencias específicas para la identificación de la especie *Legionella pneumophila*, con hasta un 90 % de sensibilidad (Yong *et al.*, 2010).

La diferencia en la obtención de resultados entre los métodos de cultivo y la PCR para la identificación de *L. pneumophila*, puede tener varias explicaciones, la PCR detecta ADN viable pero no cultivable (VBNC), y el ADN de células muertas de bacterias (Blatny *et al.*, 2008); el estado VNBC de *L. pneumophila* puede deberse al estrés que se llega a presentar en la bacteria, ya que éstas con frecuencia se vuelven incapaces de crecer y formar colonias debido a una lesión estructural o metabólica, en estos casos la presencia de protozoos puede restablecer la capacidad de cultivo del organismo (Fields, 2008).

El uso de la PCR para detectar organismos del género *Legionella* en el ambiente ha indicado que hasta el 80 % de las aguas dulces son positivas mientras que sólo del 20 al 60 % son positivas por cultivo (Arnou *et al.*, 1985).

Sin embargo, Nintasen y colaboradores (2007) mencionan que la combinación de una técnica de aislamiento por cultivo y un método molecular como es la PCR, mediante la amplificación de genes específicos como el gen *mip*, es fundamental para una rutina efectiva para la identificación de *L. pneumophila*, mejorando la detección del patógeno en microambientes.

Métodos para la detección de *L. pneumophila* mediante ácidos nucleicos han existido desde 1984. Kohne y colaboradores (1984) prepararon una sonda de ADN por transcripción inversa de rRNA del serogrupo de 1 de *L. pneumophila*, esta sonda reacciona de forma específica con los miembros de la familia Legionellaceae.

Otro sistema para la detección de ADN de *Legionella* fue desarrollado por Starnbach y colaboradores (1989), utilizaron cebadores específicos para la identificación de *L. pneumophila*. Posteriormente, Bej y colaboradores en 1990, desarrollaron un sistema de PCR que contenía dos pares de oligonucleótidos diferentes, uno dirigido al gen 5S rRNA, y el otro al gen *mip*; desde entonces otros sistemas de PCR se han diseñado algunos de los cuales utilizan diferentes cebadores para el gen *mip* (Maiwald *et al.*, 1998).

Para el presente estudio las secuencias de primers diseñadas por Bej y colaboradores (1990), fueron las que otorgaron mayor información para la identificación del gen *mip* de las cepas de referencia, permitiendo además la identificación de *Legionella pneumophila* a partir de los aislados bacterianos.

Varios autores mencionan la importancia del uso del gen *mip* para la identificación de *Legionella pneumophila* en muestras clínicas y de origen ambiental. Hajia y colaboradores (2004), señalan que el uso de la PCR para la identificación de *Legionella pneumophila* mediante el gen *mip*, mostró ser una prueba rápida y sensible; Nintasen y colaboradores (2007), identificaron a *L. pneumophila* mediante PCR utilizando como diana al gen *mip*, determinando que en comparación con los métodos de cultivo la tasa de detección de la bacteria mediante PCR fue relativamente alto, teniendo la prueba muy buena especificidad, eficiencia y fidelidad de amplificación, concluyendo que la PCR es un método que puede permitir la identificación rápida y eficaz de la bacteria en el agua; por otro lado Blatny y colaboradores (2008), realizaron un estudio para la identificación de *L. pneumophila* en aerosoles desprendidos de estanques, mencionando que el uso del gen *mip* es un gen diana adecuado para la identificación de la especie.

En el presente estudio se confirma la gran utilidad de los primers diseñados por Bej y colaboradores (1990) para hacer la identificación de *Legionella pneumophila*, encontrando a la especie en el 20.7 % de los aislados bacterianos. Los primers utilizados para la amplificación del gen *mip*, así como para la amplificación de regiones internas de éste, dieron las mejores marcas de ADN, tanto para las cepas de referencia como para los aislados bacterianos.

A pesar de que *Legionella* es común en muchos sistemas de agua raramente causan enfermedad, ya que se deben reunir situaciones específicas para contraerla. Estudios prospectivos han encontrado que hasta el 60 % de los edificios están colonizados por estas bacterias, sin embargo, no se identificó ningún caso de la enfermedad del legionario (Fields, 2008) debido a que deben reunirse las condiciones necesarias para el desarrollo de la patología, entre ellas están:

- Que el microorganismo tenga una vía de entrada a la instalación de agua. Esto suele producirse por aporte de aguas naturales contaminadas por la bacteria, normalmente en pequeñas cantidades.

- Que se multiplique en el agua hasta conseguir un número de microorganismos suficientes como para que sea un riesgo para personas susceptibles. La multiplicación es en función de la temperatura del agua, de su estancamiento y de

la presencia de otros contaminantes, incluyendo la suciedad en el interior de las instalaciones.

-Que se disperse en el aire en forma de aerosol a partir del sistema. El agua contaminada representa un riesgo solamente cuando se dispersa en la atmósfera en forma de aerosol (dispersión de un líquido o un sólido en el aire o en un gas). El riesgo aumenta cuando se reduce el tamaño de las gotas en suspensión, porque las gotas quedan en suspensión en el aire más tiempo y sólo gotas de tamaño inferior a 5 mm penetran en los pulmones.

-Que sea virulento para el hombre, ya que no todas las especies o serogrupos están igualmente implicados en la producción de enfermedad.

-Que individuos susceptibles sean expuestos a aerosoles conteniendo cantidad suficiente de *Legionella* viable.

En el ámbito hospitalario, el riesgo de adquirir la enfermedad después de la exposición a agua contaminada depende del tipo e intensidad de la exposición, así como del estado de salud de la persona. Presentan un mayor riesgo enfermos inmunocomprometidos y pacientes con enfermedades crónicas, tales como insuficiencia renal crónica y hemopatías malignas. Enfermos con riesgo moderado son diabéticos, pacientes con enfermedad pulmonar crónica, enfermos con hemopatías no malignas, fumadores, ancianos (García, 2009).

Debido a esto es importante realizar estudios de identificación de *L. pneumophila* en los sistemas de agua potable para prevenir posibles brotes de legionelosis. Una forma de prevención es el uso de monocloramina para la desinfección de los abastecimientos de agua (Heffelfinger *et al.*, 2000), ya que la monocloramina persiste y penetra mejor en las biopelículas que el cloro libre. En un estudio realizado en la ciudad de Pinellas, Florida el porcentaje de edificios colonizados por *Legionella* disminuyó de un 19.8 % a 6.2 % un mes después del uso de monocloramina como desinfectante de los sistemas de agua (Fields, 2008).

8. CONCLUSIONES

Se logró identificar bacterias del género *Legionella* en muestras de agua de uso doméstico de la Ciudad de México y su área metropolitana.

Se optimizó una técnica molecular mediante PCR para realizar la identificación de la especie *Legionella pneumophila* a partir de cepas de referencia, utilizando como diana el gen *mip*, específico de dicha especie.

Se realizó la identificación molecular mediante PCR de la especie *Legionella pneumophila* a partir de muestras de agua de uso doméstico de la Ciudad de México y su área metropolitana. Comprobando que el gen diana utilizado para la identificación del organismo es adecuado por su eficiencia y especificidad.

Se determinó que los ámbitos en los parámetros fisicoquímicos medidos en las muestras: temperatura del agua, pH y conductividad, se encontraron dentro de los amplios intervalos que toleran las bacterias del género *Legionella* en el agua.

Al identificar a la especie *Legionella pneumophila* en el 20.7 % de las muestras de agua de uso doméstico, su presencia supone un riesgo de infección potencial para los usuarios del agua potable.

9. LITERATURA CITADA

- Arnow, P. M., Weil, D. y Para, M. F. 1985. Prevalence and significance of *Legionella pneumophila* contamination of residential hot-tap water systems. *Journal of Infectious Diseases*. **152**:145–151.
- Atlas, M. R. 1999. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environmental Microbiology*. **1**(4): 283-293.
- Barbaree, J., M., Sanchez, A. y Sanden, G. N. 1983. Tolerance of *Legionella* species to sodium chloride. *Current Microbiology*. **9**: 1– 5.
- Barbaree, J. M., Fields, B. S., Feeley, J. C., Gorman, G. W. y Martin, W. T. 1986. Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*. **51** (2): 422-424.
- Barker, J., Scaife, H. y Brown, M. R. W. 1995. Intraphagocytic growth induces anantibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **39**: 2684–2688.
- Bartlett, C. R., Kurtz, J. B., Hutchison, J. G., Turner, G. C. y Wright, A. E. 1983. *Legionella* in hospital and hotel water supplies. *Lancet*. **2**: 1315.
- Bej, K. A., Mahbubani, H. M. y Atlas, M. R. 1990. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by Polymerase Chain Reaction and gene probe methods. *Applied and Environmental Microbiology*. **57** (2): 597-600.
- Bernander, S., Hanson, H. S., Johansson, B. y Von Stedingk, L. V. 1997. A nested polymerase chain reaction for detection of *Legionella pneumophila* in clinical specimens. *Clinical Microbiology and Infection*. **3** (1): 95-101.
- Berk, S. G., Ting, R. S., Turner, G. W. y Ashburn, R. J. 1998. Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Applied Environmental Microbiology*. **64**: 279–286.
- Blatny, J. M., Reif, B. A., Skogan, G., Andreassen, O., Hoiby, E. A., Ask, E., Waagen, V., Aanonsen, D., Aaberge, I. S. y Caugant, D. A. 2008. Tracking airborne *Legionella* and *Legionella pneumophila* at a biological treatment plant. *Environmental Science and Technology*. **42** (19): 7360–7367.
- Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G. y McDade, J. E. 1979. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus *novum*, species

nova, of the family Legionellaceae, familia *nova*. *Annals of Internal Medicine*. **90**: 656–658.

Brenner, D. J. 1986. Classification of Legionellaceae: current status and remaining questions. *Israel Journal of Medical Sciences*. **22**: 620-632.

Brieland, J. K., Fantone, J. C., Remick, D. G., LeGendre, M., McClain, M. y Engleberg, N. C. 1997. The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaires' disease. *Infection and Immunity*. **65**: 4892–4896.

Brooks, T., Riffard, S., Osicki, R., Springthorpe, V. S. y Sattar, S. A. 2004. Detection and identification of *Legionella* species from groundwaters. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. **67**: 1845–1859.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2005. Procedures for the Recovery of *Legionella* from the Environment. *Public Health Service*. 15 pp.

Cianciotto, N. P. y Fields, B. S. 1992. *Legionella pneumophila mip* gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **89**: 5188-5191.

Cianciotto, N. P., Kwaik, Y. A., Edelstein, P. H., Fields, B. S., Geary, D. F., Harrison, T. G., Joseph, C. A., Ratcliff, R. M., Stout, J. E. y Swanson, M. S. 2006. *Legionella: State of the Art 30 Years After its Recognition*. 2 ed, American Society for Microbiology. Washington D. C. 565 pp.

Cirillo, J. D., Falkow, S. y Tompkins, L. S. 1994. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infection and Immunity*. **62**: 3254–3261.

Coers, J., Monahan, C. y Roy, C. R. 1999. Modulation of phagosome biogenesis by *Legionella pneumophila* creates an organelle permissive for intracellular growth. *Nature Cell Biology*. **1**: 451–3.

Consulado de Estados Unidos, 2011. Página WEB: <https://travelregistration.state.gov/ibrs/ui/>

Darelid, J., Lofgren, S. y Malmvall, B. E. 2002. Control of nosocomial Legionnaires' disease by keeping the circulating hot water temperature above 55 degrees C: experience from a 10-year surveillance programme in a district general hospital. *Journal of Hospital Infection*. **50**: 213–219.

- De Buck, E., Anné, J. y Lammertyn E. 2007. The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Microbiology Mini-Review*. **153**: 3948–3953.
- DebRoy, S. V., Aragon, S. K. y Cianciotto, N. P. 2006. *Legionella pneumophila* Mip, a surface-exposed peptidylprolinecis-trans isomerase, promotes the presence of phospholipase C-like activity in culture supernatants. *Infection and Immunity*. **74**: 5152-5160.
- Declerck, P. 2009. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology*. 1-10.
- Dey, R., Bodennec, J., Mameri, M. O. y Pernin, P. 2008. Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiology Letters*. **290**: 10-17.
- Donlan, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. **8**: 881–890.
- Donlan, R. M. y Costerton, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. **15**: 167–193.
- Dusserre, E., Ginevra, C., Hallier-Soulier, S., Vandenesch, F., Festoc, G., Etienne, J., Jarraud, S., y Molmeret, M. 2008. A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable Legionellae that can recover their cultivability. *Applied and Environmental Microbiology*. **74** (15): 4817–4824.
- Edelstein, P. H., Beer, K. B. y DeBoynton, E. D. 1987. Influence of growth temperature on virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*. **55**: 2701-2705.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1999. *Legionella: Human Health Criteria Document*. Office of Water Washington, D.C. 123 pp.
- Fields, B. S. 2008. *Legionella* in the environment. *En*: Hoffman, P., Friedman, H. y Bendinelli, M. *Legionella pneumophila: Pathogenesis and immunity*. Springer. New York. 85-94 pp.
- Fields, B. S., Haupt, T., Davis, J. P., Arduino, M. J., Miller, P. H. y Butler, J. C. 2001. Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from a whirlpool spa: possible role of bacterial endotoxin. *Journal of Infectious Diseases*. **1284**: 1289-1292.

Fields, B. S., Benson, F. R. y Besser, E. R. 2002. *Legionella* and Legionnaires disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews*. **15** (3): 506-526.

Fliermas, C. B., Cherry, W. B., Orrison, L. H., Smith, S. J., Tison, D. L. y Pope, D. H. 1981. Ecological distribution *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*. **41** (1): 9-16.

Fraser, W. D., Tsai, R. T., Orenstein, W., Parkin, W. E., Beecham, H. J., Sharrar, R. G., Harris, J., Mallison, G. F., Martin, M. S., McDade, J. E., Shepard, C. C. y Brachman, P. S. 1977. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *Journal of Medicine*. **297** (22): 1189-1197.

García, N. M. 2009. *Colonización, citopatogenicidad y persistencia de Legionella en Agua Sanitaria Hospitalaria*. Tesis de Doctorado en Medicina Interna. Universidad Autónoma de Barcelona. 128 pp.

Garduño, R. 2008. Life cycle, growth cycles and developmental cycle of *Legionella pneumophila*. En: Hoffman, P., Friedman, H., Bendinelli, M. *Legionella pneumophila: Pathogenesis and Immunity*. Springer. New York. 65-84 pp.

Glick, T. H., Gregg, M. B., Berman, B., Mallison, G., Rhodes, W. W. y Kassanoff, I. 1978. Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *American Journal of Epidemiology*. **107**: 149–160.

Hajia, M., Hossieni-Doust, R., Rahbar, M. 2004. Identification of *Legionella pneumophila* in bronchoalveolar lavage fluid specimens by PCR. *Archives of Iranian Medicine*. **7** (4): 287 – 291.

Heffelfinger, J. D., Kool, J. L., Fridkin, S. K., Fraser, V. J., Hageman, J., Carpenter, J. y Whitney, C. G. 2000. Risk of hospital-acquired legionnaires' disease in cities using monochloramine versus other water disinfectants. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. **24** (8): 569–574.

Heller, R., Holler, C., Submuth, R. y Gundermann, K. O. 1997. Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. *Letters in Applied Microbiology*. **26**: 64-68.

Horwitz, M. A. y Silverstein S. C. 1980. Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. *Journal of Clinical Investigation*. **66**:441–450.

Horwitz, M. A. 1993. Toward an understanding of host and bacterial molecules mediating pathogenesis. En: Barbaree, J. M., Breiman, R. F. y Doufur, A. F.

Legionella: Current Status and Emerging Perspectives. Washington, D. C. American Society for Microbiology. 55–62pp.

Huang, S. W., Hsu, B. M., Wu, S. F., Fan, C. W., Shih, Y. C. L. y Ji, D. D. 2010. Water quality parameters associated with prevalence of *Legionella* in hot spring facility water bodies. *Water Research*. **44**: 4805-4811.

Hubrá, L. 2009. The colonization of hot water systems by *Legionella*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. **16**: 115-119.

Isberg, R. R., O'Connor, T. J. y Heidtman, M. 2009. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cost niche inside host cells. *Nature Reviews Microbiology*. **7**: 13-24.

Jennings, S. S., Moran, A. P. y Carroll, C. V. 2003. Bioaerosols and biofilms. *En: Lens, P., Moran, A. P., Mahony, T., Stoodley, P. y O'Flaherty, V. Biofilms in Medicine, Industry and Environmental Biotechnology*. London, UK: IWA Publishing. 160–178 pp.

Katz, S. M. y Hammel, J. M. 1987. The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. **17**: 150–156.

Köhler, R., Fanghanel J., König, B., Luneberg, E., Frosch, M., Rahfeld, J. U., Hilgenfeld, R., Fischer, G., Hacker, J. y Steinert M. 2003. Biochemical and functional analyses of the *mip* protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolylisomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*. **71** (8): 4389–4397.

Kohne, D. E., Steigerwalt, A. G. y Brenner, D. J. 1984. Nucleic acid probe specific for members of the genus *Legionella*. *En: Thornsberry, C., Balows, A., Feeley, J. C. y Jakubowsky, W. Legionella: Proceedings of the 2nd International Symposium*. American Society for Microbiology. Washington D. C. pp. 107–108.

Konoshi, T., Yamashiro, T., Koide, M. y Nishizono, A. 2006. Influence of temperature on growth of *Legionella pneumophila* biofilm determined by precise temperature gradient incubator. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **101** (6): 478-484.

Kool, J. L., Carpenter, J. C. y Fields, B.S. 1999. Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease. *Lancet*. **353**: 272–277.

- Kwaik, A. Y., Gao, L. Y., Harb, O. S. y Stone, B. J. 1997. Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant. *Molecular Microbiology*. **24**: 629-642.
- Kuiper, M. W. 2006. *Occurrence of Legionella pneumophila and Hartmannella vermiformis in Freshwater Environments and their Interactions in Biofilms*. Tesis de Doctorado. Universidad de Wageningen.
- Kuroki, T., Ishihara, T., Ito, K. y Kura, F. 2009. Bathwater-associated cases of Legionellosis in Japan, with a special focus on *Legionella* concentrations in water. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. **62**: 201-205.
- Lau, H. Y. y Ashbolt, N. J. 2008. The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *Journal Applied Microbiology*. **107**: 368-378.
- LeBlanc, J. J. y Vogel, J. P. 2008. The dot/icm type IVB secretion system. *En: Hoffman, P., Friedman, H., Bendinelli, M. Legionella pneumophila: Pathogenesis and Immunity*. Springer. New York. 49-63pp.
- Lindsay, D. S. J., Abraham, W. H. y Fallon, R. J. 1994. Detection of *mip* gene by PCR for diagnosis of legionnaires' disease. *Journal of Clinical Microbiology*. **32** (12): 3068-3069.
- Lopardo, G., Sturba, E., Martinez, L. M., Roel, J. E., Gamba, A., Boindi, H. y Stambouljian, D. 2002. Detección de infección aguda por *Legionella pneumophila* en pacientes con neumonía adquirida en La Comunidad en la ciudad de Buenos Aires. *Medicina*. **62**: 145-148.
- Maiwald, M., Helbig, J. H. y Luck, P. C. 1998. Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections. *Journal of Microbiological Methods*. **33**: 59-79.
- Marín, V. I. y Montes, L. D. 1991. Neumonía por *Legionella pneumophilla*. Informe de un caso. *Investigación Médica Internacional*. **17**: 205-209
- Marrie, T. J. 2008. Legionnaires' Disease - Clinical Picture. *En: Hoffman, P., Friedman, H. y Bendinelli, M. Legionella pneumophila: Pathogenesis and Immunity*. Springer. New York. 133-144 pp.
- McDade, J. E., Shepard, C. C., Fraser, D. W., Tsai, T. R., Redus, M. A. y Dowdle, W. R. 1977. Legionnaire's disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *New England Journal of Medicine*. **297**: 197-203.

Miller, L. A., Beebe, J. L., Butler, J. C., Martin, W., Benson, R., Hoffman, R. E. y Fields, B. S. 1993. Use of polymerase chain reaction in an epidemiologic investigation of Pontiac fever. *Journal of Infectious Diseases*. **168**: 769-772.

Miyamoto, M., Yamaguchi, Y. y Sasatsu, M. 2000. Disinfectant effects of hot water, ultraviolet light, silver ions and chlorine on strains of *Legionella* and nontuberculous mycobacteria. *Microbios*. **101**: 7–13.

Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., y Kwaik, Y. A. 2005. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**: 20–28.

Molmeret, M., Santic, M. y Kwaik, Y. A. 2008. Interaction of *Legionella pneumophila* with amoeba. En: Hoffman, P., Friedman, H. y Bendinelli, M. *Legionella pneumophila: Pathogenesis and Immunity*. Springer. New York. 185-202 pp.

Mülazimoglu, L. y Yu, V. L. 2001. Can Legionnaires' disease be diagnosed by clinical criteria?. *A Critical Review. CHEST*. **120** (4):1049–1053.

Nintasen, R., Utrarachkij, F., Siripanichgon, K., Bhumiratana, A., Suzuki, Y. y Suthienkul, O. 2007. Enhancement of *Legionella pneumophila* culture isolation from microenvironments by macrophage infectivity potentiator (*mip*) gene-specific nested polymerase chain reaction. *Microbiology and Immunology*. **51** (8): 777–785

Ohno, A., Kato, N., Yamada, K. y Yamaguchi, K. 2003. Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Applied and Environmental Microbiology*. **69** (5): 2540–2547.

Pascual, L., Pérez-Luz S., Amo, A., Moreno C., Apraiz, D. y Catalán V. 2001. Detection of *Legionella pneumophila* in bioaerosols by polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Microbiology*. **47** (4):341-7.

Pine, L., George, J. R., Reeves, M. W. y Harrell, W. K. 1979. Development of a chemically defined liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*. **9**: 615-626.

Ratcliff, R. M., Lanser, J. A., Manning, P. A. y Heuzenroeder, M. W. 1998. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene. *Journal of Clinical Microbiology*. **36** (6): 1560-1567.

Riboldi-Tunncliffe, A., König, B., Jessen, S., Weiss, M. S., Rahfeld, J., Hacker, J., Fischer, G. y Hilgenfeld R. 2001. Crystal structure of *mip*, a prolyl isomerase from *Legionella pneumophila*. *Nature Structural Biology*. **8**: 779 – 783.

- Riffard, S., Vandenesch, F., Reyrolle, M. y Etienne, J. 1996. Distribution of mip-related sequences in 39 species (48 serogroups) of Legionellaceae. *Epidemiology and Infection*. **117**: 501-506.
- Roig, J. y Rello, J. 2003. Legionnaires' disease: a rational approach to therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **51**: 1119–1129.
- Rowbotham, T. J. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology*. **33**: 1179–1183.
- Sapian, L. L. 2006. La enfermedad de los legionarios. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **48** (2): 146-153.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2005. La enfermedad de los legionarios. *Secretaría de Salud*. **22** (8): 1-3.
- Schoen, M. E. y Ashbolt, N., J. 2011. An in-premise model for *Legionella* exposure during showering events. *Water Research*.doi:10.1016/j.watres.2011.08.031.
- Segal, G., Russo, J. J. y Shuman, H. A. 1999. Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology*. **34** (4): 799-809.
- Segal, G., Feldman, L. y Zusman T. 2005. The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiellaburnetii*. *FEMS Microbiology Reviews*. **29**: 65–81.
- Sexton, J. A. y Vogel, J. P. 2002. Type IVB secretion by intracellular pathogens. *Traffic*. **3**: 178–85.
- Sheehan, K. B., Henson, J. M. y Ferris, M. J. 2005. *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone Nacional Park. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**: 507-511.
- States, S., J., Conley, L., F., Ceraso, M., Stephenson, T. E., Wolford, R. S., Wadowsky, R. M., McNamara, A. M. y Yee, R. B. 1985. Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems. *Applied and Environmental Microbiology*. **50** (5): 1149–1154.
- Starnbach, M. N., Falkow, S. y Tompkins, L. S. 1989. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. **27** (6): 1257-1261.

Storey, M. V., Ashbolt, N. J. y Stenstrom, T.A. 2004. Biofilms, thermophilic amoebae and *Legionella pneumophila* – a quantitative risk assessment for distributed water. *Water Science and Technology*. **50** (1): 77-82.

Torrijos, J. H., Lisker-Halpert, A., Pérez, R. C., Fujikami, K. K., Figueroa, S. V. y Lázaro C. J. 1995. La neumonía por *Legionella pneumophilla*. Informe del segundo caso en México. *Gaceta Médica de México*. **131**: 587-590.

Vincent, C. D. y Vogel, J. P. 2008. The dot/icm type IVB secretion system of *Legionella*. En: Heuner, K. y Swanson, M. *Legionella*. Molecular Microbiology. HorizonScientificPress. Gran Bretaña. pp. 249.

Vogel, J. P. e Isberg, R. R. 1999. Cell biology of *Legionella pneumophila*. *Current Opinion in Microbiology*. **2**: 30–34.

Watnick, P. y Kolter, R. 2000. Biofilm, city of microbes. *Journal of bacteriology*. **182**:2675–2679.

Wilson, D. A., Yen-Lieberman, B., Reischl, U., Gordon, S. M., y Procop, G. W. 2003. Detection of *Legionella pneumophila* by real-time PCR for the *mip* gene. *Journal of Clinical Microbiology*. **41** (7): 3327–3330.

Wintermeyer, E., Ludwig, B., Steinert, M., Schmidt, B., Fischer, G., y Hacker, J. 1995. Influence of site specifically altered *mip* proteins on intracellular survival of *Legionella pneumophila* in eukaryotic cells. *Infection and immunity*. **63** (12): 4576–4583.

World Health Organization (WHO). 2004. *Guidelines for Drinking Water Quality*. 3 ed. Vol. 1. Recommendations. Geneva, WHO.

World Health Organization (WHO). 2007. *Legionella and the prevention of Legionellosis*. Geneva, WHO.

Yong, S. F., Tan, S. H., Wee, J., Tee, J. J., Sansom, F. M, Newton, H. J. y Hartland, E. L. 2010. Molecular detection of *Legionella*: moving on from *mip*. *Frontiers in Microbiology*. **1**: 1-5.

Yu, V. L. 2000. *Legionella pneumophila* (Legionnaires' disease). En: Mandell, G. L., Bennett, J. E. y Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, Churchill Livingstone. 2424–2435 pp..

Zink, S. D., Pedersen, L., Cianciotto, N. P. y Kwaik Y. A. 2002. The dot/icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. *Infection and Immunity*. **70** (7): 1657–1663.