



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
Carrera de Biología**

**Detección de *Legionella pneumophila* en  
ambientes intrahospitalarios de las regiones del  
Papaloapan y Sierra Norte del estado de Oaxaca**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**Keyla Constansa Gutiérrez Valle**



**DIRECTORA DE TESIS:**

**D en C Elvia Manuela Gallegos Neyra**

**M en C Arturo Calderón Vega †**

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México**

**Octubre 2017**



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.

## EN MEMORIA DE...

**Mi Mamá Fabiola Valle †**, una gran mujer, de carácter fuerte, pero con mucho amor, que me dio todo el cariño y apoyo que necesitaba, me hubiera gustado que estuvieras aquí, la llevo siempre en mi corazón, todos los días me hace falta, pero sé que está muy orgullosa de mí, le dedico esta tesis porque es parte de mi inspiración para seguir adelante en el camino. Soy la mujer que soy por ella. Gracias por traerme al mundo y creer en mí, por todo tu amor, tus abrazos y tus besos, por la paciencia y tus enseñanzas.

**Mi Profe Arturo Calderón Vega †**, excelente profesor y tutor, siempre queriendo ser mejor cada día, leyendo y como él decía “siendo autodidacta” para superarse, gracias por su paciencia, amistad, comprensión, dedicación, confianza, enseñanzas y asesoramiento para la realización de este trabajo. Lo extraño, me hubiera gustado que estuviera a mi lado hasta el final de este proyecto, pero sé que estaría muy contento con el resultado.

*El amor es sufrido, es benévolo; el amor no tiene envidia, el amor no es jactancioso, no se envanece; no hace nada indebido, no busca lo suyo, no se irrita, no guarda rencor; no se goza de la injusticia, más se goza de la verdad. Todo lo sufre, todo lo cree, todo lo espera, todo lo soporta. El amor nunca deja de ser.*

1 Corintios 13: 4-8

## DEDICATORIA

Este éxito se lo dedico a:

A **DIOS**, por darme la vida y haberme conducido hasta este momento de mi vida, porque ha guiado mis pasos y no me ha soltado, me ha dado inteligencia, sabiduría, paz, felicidad, familia, amistad, salud y muchas bendiciones más, porque su gracia y fidelidad me acompaña a donde quiera que vaya, porque en su infinito amor me levanta con nuevas fuerzas, me llena de esperanza y amor cada día, a él debo este logro porque ha tomado mis piezas rotas y me ha hecho una nueva criatura, transformando mi vida, dándole luz y color. Dios me lleva más allá de lo que puedo imaginar, él me ha dado la victoria y ahora soy más que vencedora.

A mi PAPÁ, por apoyarme siempre en mis decisiones, por el gran sacrificio que ha hecho por sustentarme, por ser una gran persona, un gran hombre y ser un modelo a seguir, pero sobre todo gracias por su amor y cariño incondicional.

A mi hermana Tanya, gracias por apoyarme al escoger esta carrera, gracias por estar siempre a mi lado, por pasar desvelos y hasta estudiar conmigo, por compartir buenos y malos momentos, por preocuparte por mí cuando me iba de prácticas de campo. Te quiero mucho.

A mi hermana Mary y mis sobrinos José-Manuel y Anita y a mi cuñado José, por siempre acompañarme en cada momento que los necesite, por inyectarme de alegría y energía para echarle ganas cuando a veces sentía que ya no podía, por siempre estar presentes. Los quiero mucho.

A Anna Belle, eres mi prima, pero te convertiste en mi mejor amiga y hasta mi hermana, Dios nos puso en el camino y aunque coincidimos por una situación tormentosa salimos adelante y ahora estamos mejor que nunca, gracias por el apoyo y las pláticas largas pero edificantes. Te quiero mucho. Gracias por estar a mi lado.

A Fany Ortega Saucedo, nadie se explica cómo es que terminamos siendo amigas, pero te convertiste en mi mejor amiga, nuestras locuras son similares claro que tú estás más loca, gracias por ser parte de mi vida, por entenderme, escucharme y apoyarme, la vida nos cruzó de forma extraña pero hoy eres una persona muy especial. ¡Te quiero mucho mujer!

A mis amigos David, Diego, Arturo, pero en especial a Lidia y a Oscar, amigos desde hace muchos años, desde la preparatoria, grandes personas, que a pesar de que tomamos caminos diferentes siempre están en los momentos de más importancia, así como en los más difíciles. Somos un gran equipo con diferentes virtudes y defectos, pero nos entendemos a la perfección y cuando estamos juntos somos imparables, llenos de diversión, alegría, humor y sobre todo apoyo. ¡Los quiero mucho chicos!

A mis amigas Yael, Lú y Rebe, nos conocimos desde primer semestre cada una con personalidades diferentes, pero eso es lo divertido, siempre estamos riendo por nuestras ocurrencias. Gracias por estar siempre presentes en los buenos y malos momentos. ¡Las quiero!

A mi familia MCC que me recibieron con los brazos abiertos y me brindaron amistad, cariño y oraciones. En especial quiero agradecer al obispo Adalberto Rocha y al pastor Abraham Rocha, por siempre guiar mis pasos a través de los consejos que el Señor les da para mi vida, por su preocupación, su apoyo y sus motivaciones.

Finalmente, pero no menos importante quiero agradecer a tres mujeres fuertes e increíbles, con un carácter extraordinariamente fuerte, siendo ejemplo de que la vida se toma de frente, personas maravillosas, que me dieron amor y me abrieron las puertas de su casa recibíendome como si fuera de su familia y compartiendo grandes momentos, la vida nos separó, pero siempre las llevare en mi corazón con buenos recuerdos. Señora Maribel, abuela Lupe y tía Ana. ¡Las quiero muchísimo!

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por brindarme una excelente formación profesional, siempre estaré orgullosa de ser un Puma y haber estudiado esta maravillosa profesión, "Biología".

A los miembros del comité revisor: D en C Elvia Manuela Gallegos Neyra, D en C Rodolfo de la Torre Almaraz, M en C María Dolores Hernández Martínez, M en C Alejandro Cruz Monsalvo Reyes y Biól. Blanca Nieves Martínez Rodríguez, por su valiosa ayuda en la realización de este trabajo.

En especial quiero agradecer a la Dra. Elvia, porque me adoptó no solo como una estudiante sino como a una hija, me brindo el apoyo que necesitaba, se convirtió en mi asesora de tesis y una gran amiga, me escucho cuando más necesitaba y sobre todo me tuvo mucha paciencia, me impulso en este proyecto y me enseñó invaluable cosas. La quiero mucho.

Agradezco especialmente al Dr. Rodolfo, por aceptarme en su laboratorio y enseñarme técnicas y métodos de laboratorio, es un excelente profesor y no solo eso, también es una gran persona y un gran amigo, que me tuvo mucha paciencia, fue un gran tutor.

A la maestra Lolita que me conoce desde primer semestre siempre fue muy linda conmigo, enseñándome siempre para ser mejor profesionista, una gran amiga, gran persona con una gran dedicación en lo que hace.

A mis compañeros de laboratorio por su amistad y por hacer más ameno el trabajo a América, Mariela, Karen, Mariana, Ivon, Rodrigo, Miguel de patógenos emergentes y a Héctor Salgado y todos los que compartimos el laboratorio de fitopatología. ¡Gracias por la pizza!

*"Cuando descubro algo sobre el genoma humano y entonces recapacito sobre el misterio de la vida, me invade un sentimiento de asombro, admiración y respeto reverencial. Me digo: '¡Qué maravilla! ¡Solo Dios lo sabía de antemano!'. Es una sensación sumamente hermosa y conmovedora que me motiva a apreciar a Dios y que hace que la Ciencia me resulte aún más gratificante."*

*Francis Collins*

## CONTENIDO

CONTENIDO .....	vii
CONTENIDO DE CUADROS.....	ix
CONTENIDO DE FIGURAS.....	x
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN .....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Características generales de <i>Legionella</i> spp.....	3
2.2 Historia de <i>Legionella pneumophila</i> .....	4
2.3 Taxonomía de <i>Legionella</i> spp.....	5
2.3.1 Especies y serogrupos de <i>Legionella</i> spp.....	6
2.4 Características morfológicas y factores de virulencia.....	8
2.4.1 Flagelo y pili.....	8
2.4.2 Membrana externa .....	9
2.4.3 Periplasma de <i>Legionella pneumophila</i> .....	9
2.4.4 Membrana interna y citoplasma de <i>Legionella pneumophila</i> .....	10
2.4.5 Vesículas de la membrana externa .....	10
2.4.6 Sistema de Secreción Tipo II.....	11
2.4.7 Sistema de Secreción tipo IV Dot/Icm.....	13
2.4.8 Gen potenciador de la infectividad en macrófagos.....	14
2.5 Gen 16S de DNA ribosomal.....	14
2.6 Ecología de <i>Legionella</i> spp.....	15
2.7 Ciclos de vida de <i>Legionella pneumophila</i> .....	17
2.7.1 Ciclo de vida de <i>Legionella pneumophila</i> en macrófagos.....	17
2.7.2 Ciclo de vida de <i>Legionella pneumophila</i> en protozoos.....	18
2.7.3 Asociación de <i>Legionella pneumophila</i> con amibas de vida libre.....	19
2.8 Biopelículas.....	21
2.8.1 <i>Legionella</i> y las biopelículas como hábitat .....	22
2.9 Diagnóstico .....	23
2.9.1 Cultivo de <i>Legionella pneumophila</i> .....	24
2.9.2 Pruebas serológicas.....	25
2.9.2.1 Inmunofluorescencia directa .....	25
2.9.2.2 Inmunofluorescencia indirecta.....	26
2.9.2.3 Inmunoensayo enzimático .....	26
2.9.2.4 Detección de antígeno en orina .....	27
2.9.3 Métodos de biología molecular para la detección de <i>Legionella</i> spp. ....	27
2.10 Importancia médica .....	28
2.10.1 Transmisión de <i>Legionella pneumophila</i> al hombre .....	28
2.10.1.1 Fiebre de Pontiac .....	29
2.10.1.2 Legionelosis .....	30
2.10.1.3 Tratamiento de la legionelosis .....	31
2.10.1.4 Prevención de la legionelosis.....	32
2.11 Epidemiología.....	32
3. ANTECEDENTES.....	35
4. JUSTIFICACIÓN.....	37
5. ÁREA DE ESTUDIO.....	39



5.1 Descripción de los lugares de muestreo.....	39
5.1.1 Estado de Oaxaca.....	39
5.2 Sitios de muestro.....	40
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
6.1 Muestreo del agua y biopelículas.....	43
6.2 Registro de los parámetros fisicoquímicos del agua.....	44
6.3 Aislamiento de <i>Legionella pneumophila</i> .....	44
6.3.1 Concentración de bacterias por centrifugación.....	44
6.3.2 Descontaminación ácida.....	45
6.4 Identificación de <i>Legionella pneumophila</i> .....	45
6.4.1 Extracción y purificación del DNA bacteriano.....	45
6.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa punto final y anidado.....	46
6.5 Secuenciación de los productos de DNA obtenidos de la PCR.....	48
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
7.1 Cultivos bacterianos.....	50
7.2 Parámetros fisicoquímicos.....	56
7.2.1 Temperatura.....	57
7.2.2 pH.....	58
7.2.3 Cloro libre residual.....	59
7.3 Detección y secuenciación de <i>Legionella pneumophila</i> mediante PCR.....	60
7.3.1 PCR para gen 16S rDNA.....	60
7.3.2 PCR para gen mip.....	61
7.4 Secuenciación de <i>Legionella pneumophila</i> .....	63
8. CONCLUSIONES.....	65
9. RECOMENDACIONES.....	66
10. BIBLIOGRAFÍA.....	68
11. ANEXOS.....	80

## Contenido de cuadros

Cuadro 1. Ubicación taxonómica de <i>Legionella pneumophila</i> .....	6
Cuadro 2. Especies y serogrupos de <i>Legionella</i> spp y su relación con casos clínicos.....	7
Cuadro 3. Condiciones de la PCR para el gen 16S rDNA .....	46
Cuadro 4. Condiciones de la PCR para los primer LmipL920 y LmipL1548.....	47
Cuadro 5. Condiciones de la PCR para los primer LmipL1021 y LmipL1392.....	47
Cuadro 6. Condiciones de la PCR para los primer LmipL976 y LmipL1427.....	48
Cuadro 7. Relación de las muestras colectadas para <i>Legionella</i> spp en Papaloapan en el estado de Oaxaca. ....	50
Cuadro 8. Relación de las muestras colectadas para <i>Legionella</i> spp en Sierra Norte en el estado de Oaxaca. ....	51
Cuadro 9. Esquema de tipificación del gen mip para <i>Legionella pneumophila</i> .....	63

## Contenido de figuras

Figura 1. Micrografía electrónica de <i>Legionella pneumophila</i> .....	3
Figura 2. Crecimiento de <i>Legionella</i> spp .....	4
Figura 3. Modelo de T2S en bacterias Gram-negativas .....	12
Figura 4. Desarrollo de <i>Legionella</i> en función de la temperatura del agua .....	16
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Legionella pneumophila</i> en protozoos .....	19
Figura 6. Trofozoitos de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> infectados con <i>Legionella pneumophila</i> .....	20
Figura 7. Formación de una biopelícula.....	22
Figura 8. Regiones en el estado de Oaxaca.....	39
Figura 9. Hospital de San Juan Bautista.....	40
Figura 10. Hospital de Loma Bonita .....	41
Figura 11. Hospital María Lombardo de Caso .....	41
Figura 12. Hospital de Ixtlán de Juárez .....	42
Figura 13. Recolección de muestras de agua.....	43
Figura 14. Recolección de muestras de biopelícula.....	44
Figura 15. Comparación de las muestras positivas y negativas para <i>Legionella</i> spp.en Papaloapan.....	51
Figura 16. Comparación de las muestras positivas y negativas de <i>Legionella</i> spp.en Sierra Norte .....	52
Figura 17. Porcentaje de las muestras totales de los cultivos positivos y negativos para la presencia de <i>Legionella</i> spp.....	53
Figura 18. Porcentaje por región de las muestras positivas de <i>Legionella</i> spp. ....	53
Figura 19. Colonias de <i>Legionella</i> spp. en agar BCYE .....	54
Figura 20. Porcentaje de muestra positivas para <i>Legionella pneumophila</i> según su origen ..	55
Figura 21. Temperatura del agua en los cuatro diferentes hospitales. ....	57
Figura 22. pH del agua en los cuatro hospitales.....	58
Figura 23: Electroforesis en gel de agarosa al 1 % para los primers 16S rDNA. ....	61
Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con los primers descritos por Pascual y Bernader. ....	62

## Abreviaturas

ATCC	Colección americana de cultivos tipo
AVL	Amibas de vida libre
BCYE	Agar extracto de levadura y carbón activado
CDC	Centro de control de enfermedades (por sus siglas en ingles)
DNA	Acido desoxirribonucleico
Dot	Tráfico defectuoso de organelos
EPA	Agencia de protección ambiental de Estados Unidos
Fe	Fierro
FeoB	Proteína transportadora de fierro B
GTP	Guanosintrifosfato
HCl	Ácido clorhídrico
Icm	Multiplicación intracelular
IEE	Inmunoensayo enzimático
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ISSEMYM	Instituto de Seguridad Social del Estado de México
ITIS	Sistema Integrado de Información Taxonómica
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilo Daltons
LPS	Lipopolisacárido
MCO	Cobre multioxidasa
MH-IH	Müller Hinton con hemoglobina e IsoVitaléX
MIP	Potenciador de infectividad a macrófagos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en ingles)
PilD	Proteína peptidasa Prepilin D
PilE	Proteína peptidasa Prepilin E
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal

SPE	Sustancias poliméricas extracelulares
T2S	Sistema de secreción tipo II
Tat	Doble-arginina translocon
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
UFC	Unidades formadoras de colonias
VME	Vesículas de la membrana externa
WHO	Organización Mundial de la Salud (por sus siglas en inglés)

## RESUMEN

*Legionella pneumophila*, es el agente causal de dos enfermedades: la legionelosis, una neumonía con alta letalidad, si no es diagnosticada correctamente y la fiebre de Pontiac la cual es una infección respiratoria menos agresiva y con baja mortalidad.

El objetivo de este trabajo fue el de caracterizar la presencia de *Legionella pneumophila* en distintas fuentes de agua y biopelícula de cuatro hospitales de las regiones de Sierra Norte y Papaloapan del estado de Oaxaca, por lo tanto, se recolectaron un total de 24 muestras de agua y de biopelículas a partir de diversos suministros como grifos de regaderas y lavamanos, cisternas tratadas con cloro y sin él, así como nebulizadores y el aire acondicionado. Se obtuvieron en medio genero específico (BCYE) un total de 11 aislados del género *Legionella* que se caracterizan por formar colonias de un color blanco aperlado y de forma convexa. El DNA de 11 aislados fue utilizado como templado para realizar un PCR punto final para el gen 16S rDNA, específico para determinar la presencia de *Legionella pneumophila*. Después se amplificaron regiones específicas del gene mip utilizando diferentes primers específicos con un tamaño de banda de 403 y 471 pb.

La secuenciación nucleotídica obtenidas fueron secuenciados, analizados y comparados con la base de datos del GenBank, obteniendo un porcentaje de identidad del 100 %.

Por lo que se determinó la presencia de *Legionella pneumophila* en biopelículas y muestras de agua, pertenecientes a los hospitales, básico comunitario de Ixtlán de Juárez, en Sierra Norte, el hospital general de San Juan Bautista Tuxtepec y el hospital general básico comunitario de Loma Bonita, estos dos últimos en la región de Papaloapan.



## 1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Legionella* pueden estar presentes en casi cualquier cuerpo de agua tanto natural como artificial, sobre todo si encuentra un ambiente adecuado para su desarrollo y su proliferación.

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs), las neumonías, bronconeumonías, y las meningitis bacterianas se encuentran dentro de las 20 causas de morbilidad y mortalidad y constituyen un problema de salud pública en México. El 99 % de los casos que se notifican pertenecen a infecciones de vías respiratorias superiores y solo el 1 % corresponde a las infecciones de vías aéreas inferiores como es el caso de las neumonías y bronconeumonías. Las IRAs se ubican entre las tres principales causas de mortalidad en niños menores de 5 años y en la actualidad se encuentran en el noveno lugar como causa de mortalidad general en México. En el año 2012 el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) reportó las cifras de 26, 566, 330 casos de IRAs y 143,881 casos de neumonías y bronconeumonías (INDRE, 2015).

En México se han reportado solo dos casos con diagnóstico clínico de neumonía por *Legionella*, sin embargo, no se demostró la presencia de *L. pneumophila*, debido a que no hubo pruebas de laboratorio confirmadas y ninguno por el agente causal, estos casos fueron en el Estado de México y estado de Guerrero. Una organización no gubernamental en Europa, que hace vigilancia epidemiológica de los casos de legionelosis que ocurren desde 1987, asocia 46 casos ocurridos en turistas con su estancia en México entre 1990 y 2005 (Sapian, 2006).

Debido a que *Legionella pneumophila* es un patógeno emergente capaz de provocar la legionelosis siendo los más susceptibles ancianos, fumadores y las personas inmunocomprometidas (Weissenberger *et al.*, 2007), la presencia de esta bacteria en los hospitales, adquiere una gran importancia ya que significa un riesgo potencial para la salud de los pacientes. La transmisión de la legionelosis se produce a través de los aerosoles generados de fuentes ambientales, no de persona a persona (Fields, 1996).

No existen estudios comparativos de las características de la legionelosis esporádica y relacionada



con el brote. En teoría, los factores de riesgo y la presentación clínica de la legionelosis epidémica pueden diferir de las formas esporádicas debido a su mayor tasa de ataque y el hecho de que el diagnóstico de una proporción de casos más leves puede pasar desapercibido en un entorno con más cuidados médicos. Durante un brote, la mayor conciencia de los médicos sobre el rango de presentaciones clínicas puede promover un diagnóstico y tratamiento más temprano y, en consecuencia, modificar el resultado de legionelosis (Sopena *et al.*, 2007).

La legionelosis es una causa importante de la neumonía adquirida en la comunidad. Estudios de Europa y América del Norte muestran que la infección por *Legionella* es responsable del 1-5 % de los casos de neumonía adquirida en la comunidad hospitalizada. Un estudio australiano informó que las especies de *Legionella* causan el 3% de los casos de neumonía adquirida en la comunidad. La tasa de letalidad de casos de pacientes con legionelosis todavía es bastante alta de 5-30 %, dependiendo de los factores de riesgo subyacentes a los pacientes como edad, sexo, enfermedades crónicas o con deficiencia inmune. Las especies de *L. pneumophila*, son causa común de la legionelosis en Victoria, Australia. La mayoría de los brotes de la legionelosis en Australia, se han debido a *L. pneumophila* serogrupo 1. El método definitivo para el diagnóstico de laboratorio de *Legionella* sigue siendo en medios selectivos. Otros métodos de diagnóstico de uso rutinario en los laboratorios victorianos, incluyen pruebas serológicas para la inmunofluorescencia y el inmunoensayo enzimático del antígeno urinario (Formica *et al.*, 2001).

*Legionella pneumophila* ha sido reconocida como una causa importante de la comunidad y la neumonía adquirida en el hospital. La información relativa a las diferencias clínicas entre estas dos configuraciones de infecciones por legionela es escasa y se limita al período de preantigenuria, período durante el cual el aspecto clínico de los casos nosocomiales y comunitarios se reportó para ser similar. Sin embargo, estudios recientes sugieren que, de hecho, la infección por *Legionella* puede diferir en estos dos entornos, ya que la fuente de infecciones, los modos de transmisión, las características de la población y el retraso en el inicio de un tratamiento apropiado son probablemente diferentes (Pedro-Botet *et al.*, 2006).

---

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Características generales de *Legionella* spp.

Todas las bacterias del genero *Legionella* son bacilos de 0.5-1.0  $\mu\text{m}$  de ancho y de 2-5  $\mu\text{m}$  de largo, no encapsulados, no formadores de esporas, no fermentativos, aerobios estrictos, microaerófilicos, con tinción débil Gram-negativas, pudiéndose utilizar para su tinción diversas técnicas de fluorescencia y alternativamente la tinción de Giménez. La mayoría exhiben motilidad a través de uno o más flagelos laterales (Figura 1) (EPA, 1999; García, 2009; Jawetz *et al.*, 2010).

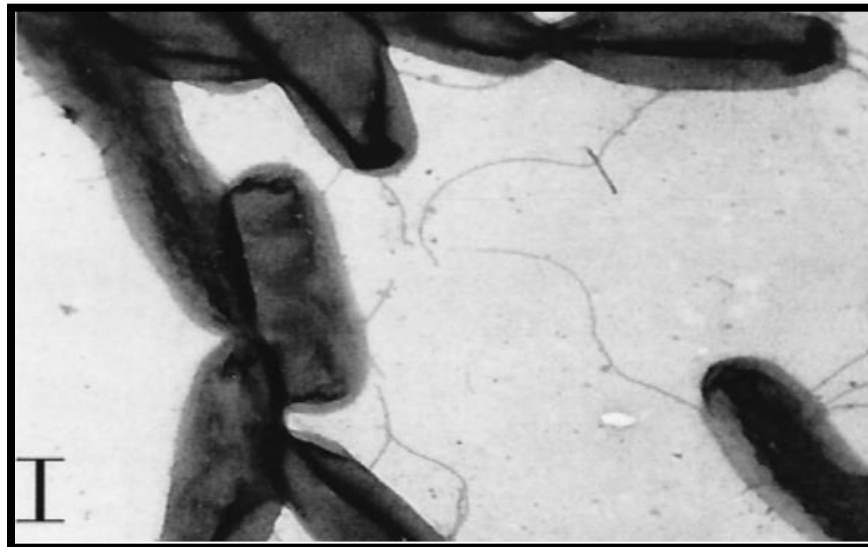


Figura 1. Micrografía electrónica de *Legionella pneumophila*, suspendidas en  $\text{H}_2\text{O}$ , en rejillas de cobre, sombreado con acetato de uranilo al 2 %, observadas a través de un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM10. (Dietrich *et al.*, 2001)

Los miembros de la familia Legionellaceae son quimiorganotrófos, poco sacarolíticos y con características metabólicas poco activas. Son oxidasa variable, catalasa positiva débil y utilizan aminoácidos como fuente de energía 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 *et al.*, 1979; Steinert *et al.*, 2002).

En el laboratorio, todas las especies de *Legionella* tienen requerimientos nutricionales absolutos, para su aislamiento primario necesitan 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 específico para el cultivo y aislamiento de la bacteria, donde son necesarios de 3 a 4 días para visualizar el crecimiento bacteriano (Figura 2) (Fields *et al.*, 2002; Ghotaslou *et al.*, 2013).



Figura 2. Crecimiento de bacterias del género *Legionella* en agar BCYE (Gutiérrez, 2017)

## 2.2 Historia de la bacteria *Legionella pneumophila*

El primer aislamiento de *L. pneumophila* tuvo lugar en 1947, por inoculación en un cobayo con sangre de un paciente con enfermedad respiratoria febril. Estudios posteriores establecieron su verdadera identidad debido a que se le caracterizaba como un organismo parecido a *Rickettsia*. La investigación retrospectiva de anticuerpos en sueros pareados, provenientes de 81 enfermos de los cuales 15 murieron (18 %) de un brote de neumonía, producido en 1965 en un hospital psiquiátrico de Washington permitió demostrar la seroconversión para *L. pneumophila* en 69 de ellos (Palmeri, 2001).

El primer brote documentado de la legionelosis se estableció en 1957 en Austin, Minnesota. En 1968, se le relacionó con un brote de fiebre de corta duración y sin neumonía que afectó al

personal sanitario y a los visitantes del Departamento de Salud del Condado de Oakland en Pontiac, Michigan, Estados Unidos de América (EUA) (Ruiz y Moreno, 2005).

En 1976, la legionelosis fue descrita, en julio de ese año en la ciudad de Filadelfia, en el estado de Pensilvania, EUA, tuvo lugar la “58ª Convención de la Legión Americana” en el Hotel Bellevue Stratford. De los 4, 400 asistentes, se presentaron 221 casos de neumonía de los cuales 34 (15 %) murieron (Fraser *et al.*, 1977; EPA, 1999). El Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, inicio un estudio epidemiológico y microbiológico sin precedentes para demostrar la causa del brote. Para identificar el agente etiológico, se examinaron muestras de tejido y suero de los pacientes buscando evidencias de toxinas, bacterias, virus, hongos, clamidias y rickettsias. El agente causal se logró aislar de tejido pulmonar *post mortem* de cuatro pacientes, que después fue inoculado en animales de laboratorio, al examinarlo se logró observar por primera vez al microorganismo responsable, éste era un bacilo Gram-negativo. Así mismo por inmunofluorescencia indirecta, se demostró que el 90 % de los pacientes del brote epidémico de Filadelfia, habían desarrollado anticuerpos frente a este microorganismo (McDade *et al.*, 1977; Villaseñor y Sapián, 2004).

Así, en 1977 se identificó por primera vez a un bacilo Gram-negativo de crecimiento aerobio y fue denominado *L. pneumophila*, del vocablo griego *pneumo* – pulmón y *philos* – amante y a la enfermedad atípica se le llamó “legionelosis”, en honor a los legionarios estadounidenses afectados en el brote de 1976 (EPA, 1999; García, 2009).

### **2.3 Taxonomía de *Legionella* spp.**

La familia Legionellaceae está constituida solo por el género *Legionella*. Estudios recientes han utilizado en el análisis del gen 16S rDNA que codifica la subunidad ribosomal 16S que confirman a la familia Legionellaceae (Cuadro 1) como un solo subgrupo monofilético dentro de la gamma-2 subdivisión del filo Proteobacteria.

Cuadro 1. Ubicación taxonómica de *Legionella pneumophila* (ITIS, 2016).

---

---

<b>Reino:</b> Bacteria
<b>Filo:</b> Proteobacteria
<b>Clase:</b> Gammaproteobacteria
<b>Orden:</b> Legionellales
<b>Familia:</b> Legionellaceae
<b>Género:</b> <i>Legionella</i>

---

---

Dentro del género *Legionella*, la relación de DNA entre las cepas de una especie dada, es al menos 70 %, mientras que la relación de DNA de una especie a otra es menos del 70 %. Filogenéticamente, la más cercana relación con la familia Legionellaceae es *Coxiella burnetii*, el agente etiológico de la fiebre Q. Estos organismos tienen estilos de vida intracelular similares y pueden tener en común genes asociados con los procesos de infección en sus huéspedes (Fields *et al.*, 2002).

### 2.3.1 Especies y serogrupos de *Legionella* spp.

El número de especies y serogrupos de *Legionella* continúa aumentando. Actualmente se han caracterizado 50 especies que comprenden 70 serogrupos distintos en el género *Legionella*, y 24 de las especies han sido reportadas como patógenas para los humanos, a pesar de la descripción de al menos 15 serogrupos de *L. pneumophila*. El serogrupo 1 es responsable de más del 84 % de los casos en todo el mundo (Newton *et al.*, 2010), otras especies también pueden causar la enfermedad, particularmente en casos nosocomiales, sin embargo, no todas las especies del género *Legionella* causan la patología (Cuadro 2) (ITIS, 2016).

Cuadro 2. Especies y serogrupos del genero *Legionella* y su relación con casos clínicos (ITIS, 2016)

<b>Especies de <i>Legionella</i></b>	<b>Serogrupos</b>	<b>Asociación con casos clínicos</b>
<i>L. adelaidensis</i>		
<i>L. anisa</i>		+
<i>L. beliardensis</i>		
<i>L. birminghamensis</i>		+
<i>L. bozemanii</i>	2	+
<i>L. brunensis</i>		
<i>L. busanensis</i>		
<i>L. cherrii</i>		
<i>L. cincinnatiensis</i>		+
<i>L. drancourtii</i>		
<i>L. dresdenensis</i>		
<i>L. drozanskii</i>		
<i>L. erythra</i>	2	+
<i>L. fairfieldensis</i>		
<i>L. fallonii</i>		
<i>L. feeleii</i>		+
<i>L. geestiana</i>		
<i>L. genomospecies</i>		
<i>L. gormanii</i>		+
<i>L. gratiana</i>		
<i>L. gresilensis</i>		
<i>L. hackeliae</i>	2	+
<i>L. impletisoli</i>		
<i>L. israelensis</i>		
<i>L. jamestowniensis</i>		
<i>L. jordanis</i>		+
<i>L. lansingensis</i>		+
<i>L. londiniensis</i>	2	

<i>L. longbeachae</i>	2	+
<i>L. lytica</i>		
<i>L. moravica</i>		
<i>L. nagasakiensis</i>		
<i>L. nautarum</i>		
<i>L. oakridgensis</i>		+
<i>L. parisiensis</i>		+
<i>L. pneumophila</i>	15	+
<i>L. quateirensis</i>		
<i>L. quinlivanii</i>	2	
<i>L. rowbothamii</i>		
<i>L. rubrilucens</i>		
<i>L. sainthelensi</i>	2	+
<i>L. santicrucis</i>		
<i>L. shakespearei</i>		
<i>L. spiritensis</i>	2	
<i>L. steigerwaltii</i>		
<i>L. taurinensis</i>		
<i>L. tucsonensis</i>		+
<i>L. wadsworthii</i>		+
<i>L. waltersii</i>		
<i>L. worsleiensis</i>		
<i>L. yabuuchiae</i>		

Casos clínicos registrados (+).

## 2.4 Características morfológicas y factores de virulencia de *Legionella pneumophila*

### 2.4.1 Flagelo y pili

La primera evidencia de la presencia de flagelos y pili en la superficie de *L. pneumophila* fue proporcionada por Rodgers *et al.*, en 1980. Los autores también fueron los primeros en observar que los pili de *L. pneumophila* varían en longitud. Más tarde, los pili se dividieron en largo (0,8 a 1,5  $\mu\text{m}$ ) y corto (0,1 a 0,6  $\mu\text{m}$ ). Posteriormente se descubrió una proteína, PilE,

ubicada en el pili, está implicada en el apego y la adhesión a las células huésped, así como la competencia natural de *L. pneumophila*. Otra proteína responsable de la producción pili es la peptidasa prepilin (PilD). A diferencia de PilE, PilD es importante para el éxito en la proliferación intracelular, ambas proteínas mencionadas facilitan la formación de biopelículas de *L. pneumophila*. Adicionalmente a los pili, *L. pneumophila* exhibe un solo flagelo monopolar, que está anclado en ambas membranas y el peptidoglicano por el cuerpo basal. Este orgánulo juega un papel importante en la motilidad celular, la adhesión e invasión del huésped. Se ha descrito también que está involucrado en la formación de biopelículas. La expresión de flagelos está influenciada por muchos factores ambientales y es controlado por una cascada jerárquica de los reguladores. La transición de las bacterias a la fase de infectiva es co-regulada con la expresión de flagelos. Los reguladores que controlan el flagelo también controlan rasgos de virulencia importantes (Shevchuk *et al.*, 2011).

#### **2.4.2 Membrana externa**

La membrana externa es la característica distintiva de todas las bacterias Gram-negativas. Es una bicapa lipídica compuesta de fosfolípidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos (LPS) y proteínas. La pérdida de fosfatidilcolina de la membrana de *L. pneumophila* causa citotoxicidad en otras bacterias dentro de los macrófagos. La mayor parte de las proteínas de la membrana externa están involucradas tanto en la fijación como en la invasión a las células huésped (Conover *et al.*, 2008).

En resumen, la membrana externa es la interfaz directa entre *L. pneumophila* y sus organismos huéspedes. Algunos de sus componentes proteicos están directamente involucrados en la adhesión y procesos de invasión (Shevchuk *et al.*, 2011).

#### **2.4.3 Periplasma de *Legionella pneumophila***

En el espacio periplásmico se encuentra la maquinaria Dot/Icm y otras proteínas implicadas en la virulencia de *L. pneumophila* que promueven la penetración a las células huésped. La capa de peptidoglicano es probable que promueva la supervivencia en ambientes hostiles. El periplasma alberga muchas enzimas que degradan perjudicialmente sustancias que entran en la célula bacteriana. Uno de los componentes de la maquinaria Dot/Icm, se localizó en el



---

periplasma de *L. pneumophila* (Shevchuk *et al.*, 2011).

#### **2.4.4 Membrana interna y citoplasma de las bacterias *Legionella pneumophila***

La primera capa de las bacterias de *L. pneumophila* es la membrana interna, también denominado membrana citoplasmática. Es una bicapa lipídica con componentes integrados de diversos sistemas, incluyendo la maquinaria de captación de hierro, la cadena respiratoria, y el sistema de desintoxicación (Hindahl y Iglewski, 1984).

Una función importante de la membrana interna de *L. pneumophila* es la regulación de la captación de hierro. La absorción de hierro es un proceso crucial durante todas las fases de crecimiento de *L. pneumophila*, se lleva a cabo principalmente por el GTP-dependiente transportador de hierro (FeoB), que media la captación de Fe (II), la proteína FEOB se requiere para un crecimiento óptimo en condiciones de limitación de hierro en medios líquidos, así como en amibas con restricción de hierro y macrófagos. FeoB se requiere para matar eficientemente a los macrófagos y da plena virulencia en la legionelosis. Otra proteína importante, por su relación con la virulencia, es iraAB la cual es importante por el hecho de que se encuentra casi exclusivamente en la bacteria *Legionella* patógena, pero no en las especies no virulentas. En la membrana citoplasmática se encuentra también una proteína mutante (cobre multioxidasa) MCO-negativo, el cual expresa la replicación intracelular normal dentro de los macrófagos. Por lo tanto la función de MCO parece limitarse al crecimiento extracelular (Shevchuk *et al.*, 2011).

#### **2.4.5 Vesículas de la membrana externa**

Las vesículas de la membrana externa (VME) se desprenden de esta membrana de algunas bacterias Gram-negativas y de *L. pneumophila*. Las VME de *L. pneumophila* contiene desproporcionadamente un alto número de proteínas asociadas con la virulencia (Galka *et al.*, 2008).

En general, las VME pueden mediar el contacto interbacterial y también el contacto con las células eucarióticas, pueden matar otras bacterias mediante la liberación de factores nocivos. Macromoléculas degradadoras de enzimas en asociación con las VME puede promover la adquisición de nutrientes al igual que las modulaciones de la formación de biopelículas. En la

interacción con las células huésped eucariotas, las VME pueden secretar toxinas y otros factores de virulencia y se ha demostrado que se adhieren a las superficies celulares, además, la respuesta inmune, la inflamación y la inmunidad innata son modificados por el contacto con las VME bacterianas (Ellis y Kuehn, 2010).

Un análisis proteómico reveló 74 proteínas diferentes. La exportación de 33 de estas proteínas se produce sólo a través de las VME, pero no individualmente a través de los sistemas de secreción III, o IV. De estas proteínas específicas de las VME, 18 se reportan para contribuir a la patogénesis y virulencia. Este hallazgo condujo a la conclusión de que *L. pneumophila* emplea a las VME como vehículos para el transporte de factores de virulencia hacia ambiente. El contacto entre las VME y las células dio lugar a un cambio en la morfología celular, que conduce a redondear las células. Las VME de *L. pneumophila* aumentan el crecimiento de *Acanthamoeba castellanii* en el transcurso de 72 h (Galka *et al.*, 2008).

#### **2.4.6 Sistema de secreción tipo II**

Los sistemas de secreción son sistemas de translocación de proteínas especializadas, son esenciales para el éxito de la colonización por muchos patógenos bacterianos. Este sistema ofrece factores de virulencia en las células huésped para facilitar diversos aspectos del proceso de infección, incluyendo la entrada en la célula huésped, la inhibición de la fagocitosis y la inmunidad innata, la supervivencia y la reproducción intracelular, y la propagación del patógeno entre las células huésped (Thanassi *et al.*, 2012).

*Legionella pneumophila* segrega un gran número de factores que promueven la virulencia y/o infección intracelular de las células huésped. Estos factores abarcan tanto las proteínas y las moléculas no proteicas. En las bacterias Gram-negativas, la secreción de proteínas es un proceso complicado que requiere tránsito a través de la membrana interna, periplasma y luego la membrana externa. Como grupo, las bacterias Gram-negativas tienen seis, y tal vez ocho, sistemas que facilitan la secreción desde dentro de la bacteria al medio extracelular y/o en las células huésped, es decir, de tipo I, II, III, etc. (Desvaux *et al.*, 2009).

Diversas investigaciones han demostrado que la secreción de proteínas de tipo II y de tipo IV son esenciales para *L. pneumophila*. El sistema de secreción tipo II (T2S) es común, aunque

no universal, entre las bacterias Gram-negativas (Cianciotto, 2005). El sistema de secreción tipo II es un proceso multi-etapa (Korotkov *et al.*, 2012).

Las proteínas que van a ser secretadas, primero son translocadas a través de la membrana interna. En la mayoría de los casos, los sustratos no plegados atraviesan la membrana interior, sin embargo, en algunos casos, los sustratos plegados cruzan a través de la doble-arginina translocon (Tat). Una vez en el periplasma, los sustratos no plegados asumen una terciaria conformación y en ciertos casos oligomeriza. En el último paso, los sustratos son movidos a través de la membrana exterior por un complejo de proteínas que se dedican al sistema de secreción tipo II (Figura 3) (Cianciotto, 2013).

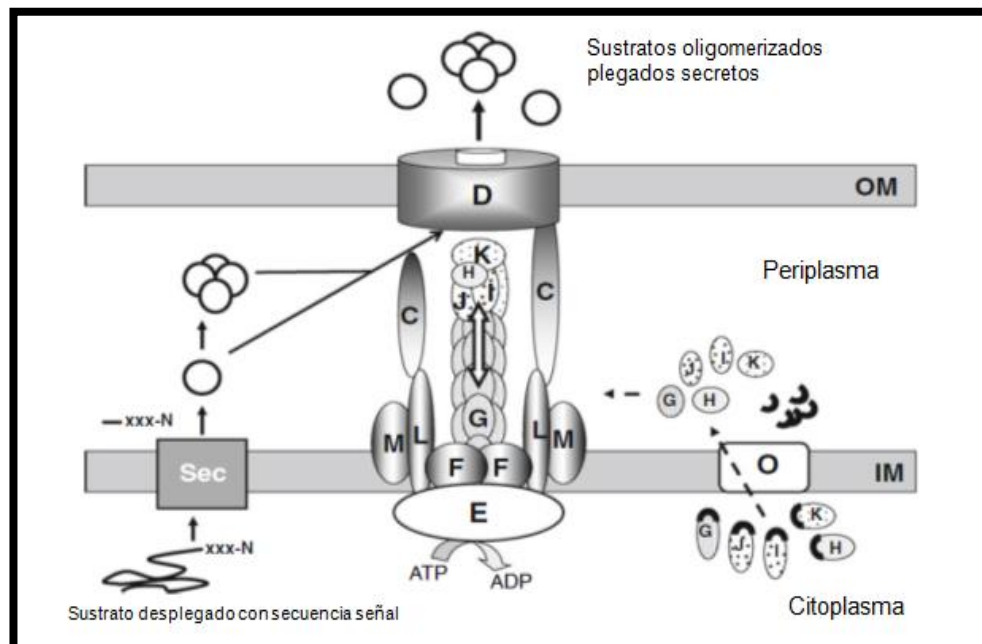


Figura 3. Modelo de T2S en bacterias Gram-negativas. Los componentes básicos de T2S se indican mediante denominaciones de una sola letra, C-M. Seguido de la translocación a través de la membrana interna (MI) a través de Sec y plegado dentro del periplasma, los sustratos proteicos son reconocidos por el aparato de T2S. Usando la energía generada en la MI, una estructura de pilis hecho del mayor (G) y menor (H, I, J, K) pseudopilus actúan "empujando" los sustratos a través de la secretina dodecamérica (D) en la membrana externa (ME). El pre-pilina peptidasa (O) escinde y N-metilatos pseudopilus antes de su integración en el aparato de T2S. (Cianciotto, 2013).

El sistema de secreción tipo II de *L. pneumophila* es responsable de la secreción de muchas enzimas degradativas incluyendo una metaloproteasa, una fosfatasa ácida, una fosfolipasa A, y una lisofosfolipasa A. Sin embargo, este sistema no es necesario para la inducción de la apoptosis (Zink *et al.*, 2002).

### 2.4.7 Sistema de secreción tipo IV Dot/Icm

El sistema de secreción tipo IV esta codificado con 23 genes conocidos como Dot/Icm tráfico defectuoso de organelos (defective organelle trafficking) Dot y multiplicación intracelular (intracellular multiplication) icm, que pueden engañar a las células eucariontes en el transporte al retículo endoplásmico (RE); estos genes de virulencia Dot/Icm ambos promueven la infección intracelular por varias vías. Primero incrementan la entrada de *L. pneumophila* a la célula huésped, segundo, es esencial para mantener la capacidad de *Legionella* de inhibir la fusión lisosómica/fagolisosómica y establecer su nicho replicativo (Forbes y Sham, 2009).

La actividad de Dot/Icm es esencial para el éxito de *L. pneumophila* en la replicación intracelular en los fagocitos, células que están diseñadas para digerir partículas interiorizadas, incluyendo células bacterianas (Isberg *et al.*, 2009).

El sistema de secreción Dot/Icm es esencial para la inducción de la apoptosis. *L. pneumophila* causa una apoptosis dependiente del contacto dentro de las células huésped que no requiere la invasión o la síntesis de proteínas bacterianas. El sistema de secreción de tipo IV ha demostrado que exporta moléculas efectoras que interfieren con la señalización celular. Este sistema Dot/Icm es crítico para la capacidad de *L. pneumophila* de sobrevivir y replicarse dentro de las células de mamíferos. Se ha demostrado 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 en la formación de poros. Un mecanismo por el que varios patógenos bacterianos inducen apoptosis en las células de mamíferos es a través de la formación de poros dentro de la membrana plasmática, esto permite una afluencia de iones de calcio en el citoplasma que desencadena una respuesta dentro de la célula huésped y provoca apoptosis a través de un mecanismo dependiente de GTPasa. Sin embargo, el sistema de secreción tipo IV Dot/Icm de *L. pneumophila* no es dependiente del sistema de secreción de tipo II para la inducción de la apoptosis (Zink *et al.*, 2002). Variaciones mutagénicas en el sistema Dot/Icm conducen a la pérdida de la virulencia.

### 2.4.8 Gen potenciador de la infectividad en macrófagos

El gen potenciador de la infectividad en macrófagos, “MIP”, (por sus siglas en inglés), fue uno de los primeros genes asociados con la capacidad de *L. pneumophila* de replicarse en células eucariotas, y la secuencia de nucleótidos del gen *mip* se ha utilizado ampliamente como un objetivo para el diagnóstico molecular de *Legionella* y la tipificación por más de dos décadas, se secuenció por primera vez en 1989. El producto de *mip* es una proteína de 24 kDa con actividad peptidilprolil cis/trans isomerase (PPIase) que comparte la secuencia de aminoácidos similares principalmente con la familia eucariota de unión de proteínas a FK506, una clase de inmunofilinas. *mip* se exporta a la superficie celular, donde la proteína existe como un homodímero estable. El gen *mip*, es otro imitador estructural y funcional de las proteínas eucariotas. MIP entonces actúa en concierto con una serina proteasa de cualquiera de origen bacteriano o de acogida para degradar la matriz extracelular (Newton *et al.*, 2010).

*L. pneumophila* puede multiplicarse dentro de los macrófagos alveolares como resultado de la inhibición de la fusión lisosomas-fagosomas (Cianciotto *et al.*, 1989).

El gen *mip* se encuentra en células virulentas y se cree que participa en el proceso de patogenicidad, ya que las cepas sin esta proteína muestran una disminución de 80 veces en la infectividad. (Cianciotto *et al.*, 1990).

### 2.5 Gen 16S de DNA ribosomal y su relación filogenética

La secuencia del gen 16S rDNA, que es de aproximadamente 1,500 pb de longitud y contiene nueve regiones variables intercaladas entre regiones conservadas, es el componente molecular importante de la pequeña subunidad ribosomal de procariontes. Ha sido ampliamente utilizado como un reloj molecular para estimar las relaciones entre las bacterias (filogenia), pero más recientemente, también se ha convertido en un importante medio para identificar una bacteria desconocida a nivel de género o especie en diversas poblaciones microbianas. El gen 16S rDNA se ha implicado directamente en la discriminación de los sitios de iniciación de mRNA, tRNA vinculante y la asociación de las dos subunidades ribosomales. Las regiones variables de 16S rDNA son con frecuencia utilizadas en las clasificaciones filogenéticas a nivel de género o especie (Brosius *et al.*, 1978; Sacchi *et al.*, 2002).

## **2.6 Ecología de *Legionella* spp.**

El agua es el principal reservorio de *Legionella*, y las bacterias se encuentran en ambientes de agua dulce en todo el mundo. *Legionella* tolera el cloro por lo que este microorganismo sobrevive al tratamiento de agua, y aunque en cantidades reducidas, *Legionella* se encuentra presente en el sistema de distribución de agua potable, casi todos los casos de legionelosis se han relacionado con el agua potable. En ciertos hábitats artificiales, como torres de refrigeración o cisternas, que aseguran condiciones favorables de temperatura, protección física y nutrición, esta bacteria puede desarrollarse y proliferar en forma significativa (Fields *et al.*, 2002; Palencia, 2010).

*Legionella* es habitante común de ambientes de agua dulce natural y antropogénicos, pueden soportar temperaturas entre 5 a 63 °C y se multiplica entre 25 a 45 °C, un ámbito de pH de entre 5.0 a 9.2, oxígeno disuelto de 0.2 a 15 mg/ml (Arvand *et al.*, 2011; Declerck, 2010). Las únicas aguas naturales consideradas una fuente de legionelosis son las aguas termales, donde las temperaturas en general tienen un ámbito entre 35 a 40 °C. *L. pneumophila* puede sobrevivir más de un año en muestras de agua conservadas a una temperatura de entre 2 y 8 °C. No se observa crecimiento por debajo de los 20 °C y la supervivencia se inhibe por encima de los 60 °C (Figura 4) (Mashiba *et al.*, 1993).

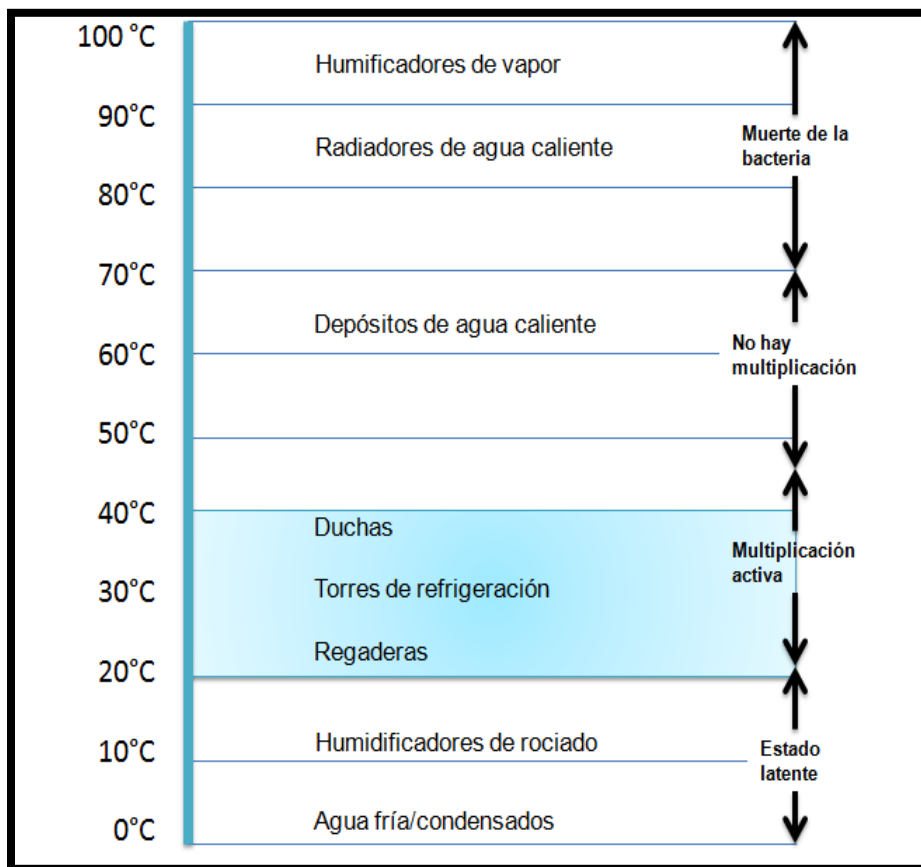


Figura 4. Desarrollo de *Legionella* en función de la temperatura del agua (Hernández, 1999)

Tras la transferencia de los hábitats de agua dulce natural en sistemas antropogénicos, donde las temperaturas son generalmente superiores a la temperatura ambiente, *L. pneumophila* coloniza biopelículas existentes y prolifera en elevado número (Rogers *et al.*, 1994).

La omnipresencia de *Legionella* en los sistemas de agua potable representa una preocupación potencial para la salud, a partir de estas instalaciones como aire acondicionado, regaderas y/o nebulizadores, especialmente para las personas inmunosuprimidas, tanto en países en desarrollo como en los industrializados debido a que *Legionella* puede infectar al hombre por inhalación de micro-aerosoles contaminados con la bacteria. (Storey *et al.*, 2004; Ulloa, 2008).

## **2.7 Ciclo de vida de *Legionella pneumophila***

La característica principal de la patogénesis de *Legionella* es su capacidad para multiplicarse intracelularmente. El ciclo de vida de *Legionella* se ha caracterizado tanto en protozoos y en células de mamíferos (Horwitz y Silverstein, 1980).

Hay sorprendentes similitudes en los procesos por los cuales *Legionella* infecta protozoos y células fagocítica de mamíferos, microscópicamente, los procesos son prácticamente idénticos, aunque con notables diferencias en el mecanismo de entrada y salida de la célula huésped (Fields *et al.*, 2002)

### **2.7.1 Ciclo de vida de *Legionella pneumophila* en macrófagos**

Las bacterias entran en las células mediante fagocitosis y una vez internalizados, las bacterias residen dentro de un único fagosoma que no se fusiona con los lisosomas. También se describe la interacción del fagosoma con mitocondrias y vesículas ribosomales (Horwitz y Silverstein, 1980).

Los macrófagos altamente bactericidas interiorizan a las bacterias en un intento de matarlas. Sin embargo, *L. pneumophila* es capaz no sólo de sobrevivir dentro del medio ambiente del anfitrión de los macrófagos, sino que también es capaz de replicarse y eventualmente matar a la célula huésped. *L. pneumophila* sobrevive intracelularmente mediante la inhibición de la acidificación de la fusión de fagosoma lisosoma naciente. En lugar de fusionarse con lisosomas, los fagosomas que contienen *L. pneumophila* sufren una serie de etapas de maduración celular biológica en las que se asocian con pequeñas vesículas y mitocondrias, eventualmente rodeadas de retículo endoplásmico rugoso (Vincent *et al.*, 2006).

En los macrófagos y las células epiteliales alveolares, *L. pneumophila* induce la apoptosis durante las primeras etapas de la infección. Una segunda fase es la necrosis inducida por una actividad de formación de poros se realiza en los fagocitos humanos infectados (Fields *et al.*, 2002).



### 2.7.2 Ciclo de vida de *Legionella pneumophila* en protozoos

La multiplicación intracelular de *L. pneumophila* en protozoos requiere 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 esta bacteria (Molmeret *et al.*, 2008).

Las bacterias del género *Legionella* son fagocitadas por protozoos y posteriormente se reproducen dentro de estos organismos. Estas relaciones proporcionan nutrientes y protección en condiciones ambientales adversas y también hacen a las bacterias más virulentas y resistentes a los antibióticos. La adaptación de *Legionella* a nichos intracelulares dentro de protozoos acuáticos parece haber generado un grupo rasgos de virulencia durante su evolución que permiten a *Legionella* infectar también a las células humanas (Palusinska-Szyszyk y Cendrowska-Pinkosz, 2009).

En el ambiente *L. pneumophila* puede entrar en las células huésped mediante la fagocitosis convencional, *L. pneumophila* se unen a los filipodios de la ameba. Una vez unido a una célula huésped, las bacterias entran rápidamente en la célula por un proceso no fagocítico. Una vez que una célula de *L. pneumophila* ha entrado en el huésped, la bacteria ocupa un fagosoma único (Fields *et al.*, 2002).

Aproximadamente de 4 a 6 h después de entrar a la célula huésped, el fagosoma de *L. pneumophila* se asocia con membranas ribosomales que son la sede de células del retículo endoplásmico. *L. pneumophila* evita lisosomas y la vía endocítica tradicional mediante la utilización de una nueva vía en la célula huésped. La etapa final del ciclo infeccioso es la muerte de la célula huésped y liberación de las bacterias, *L. pneumophila* mata a su célula huésped ya sea por necrosis o apoptosis mediada por una actividad de formación de poros, o ambos. La muerte de las células huésped amebianas requieren la actividad de *L. pneumophila* para eliminar a estos protozoos y salir (Figura 5) (Fields *et al.*, 2002).

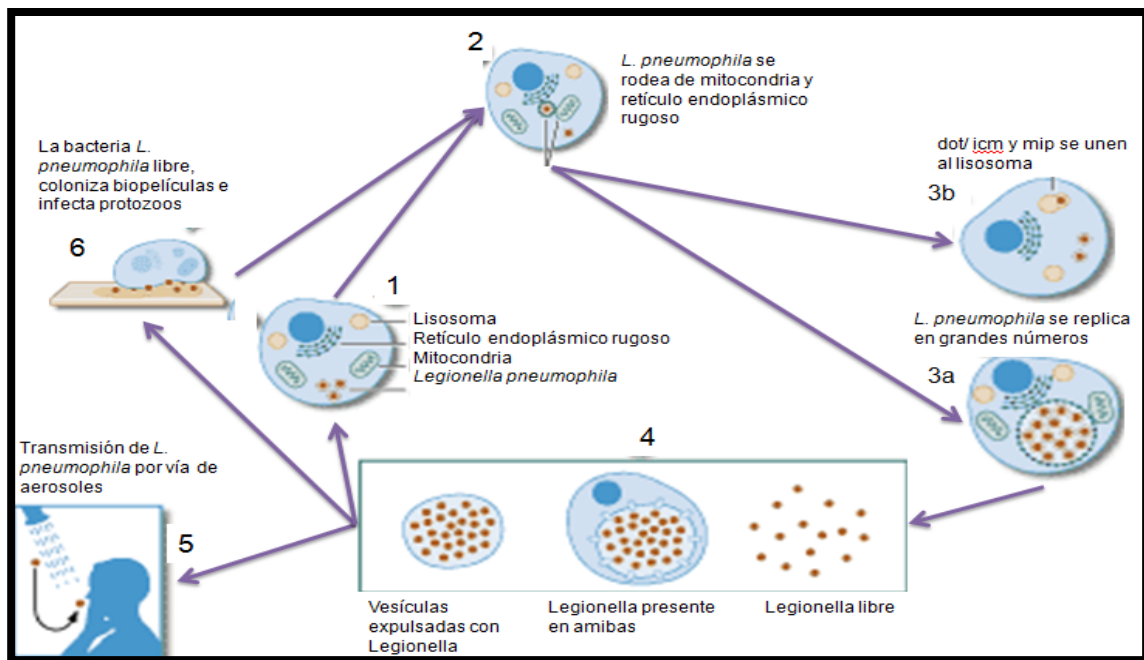


Figura 5. Ciclo de vida de *Legionella pneumophila* en protozoos.

El ciclo de vida de las AVL comprende una fase activa llamada trofozoíto y una forma quística o de latencia; presentándose en algunos casos una forma flagelada, un estadio temporal en el que el organismo no se alimenta ni se reproduce, sólo le sirve para desplazarse a un mejor microambiente. La forma de quiste es la fase de resistencia en la cual puede permanecer largos períodos en condiciones adversas como: la desecación, concentraciones bajas de oxígeno, escasez de alimento, etc. Se sabe que en este estadio estos organismos pueden ser resistentes a varios tratamientos de desinfección (Castro, 2016).

### 2.7.3 Asociación de *Legionella pneumophila* con amibas de vida libre

*Legionella pneumophila* puede sobrevivir en ambientes de suelos acuáticos y húmedos como parásitos intracelulares de protozoos de vida libre. Estas bacterias han demostrado multiplicarse en 14 especies de amibas de vida libre (AVL), dentro de las que destacan: *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia* y *Naegleria*, dos especies de protozoos ciliados *Tetrahymena* y *Cyclidium*, mientras que el crecimiento de *L. pneumophila* en ausencia de protozoos se ha documentado sólo en medios de laboratorio. Las AVL juegan un papel importante en la ecología y la patogenicidad de *L. pneumophila*. Ofrecen un lugar acogedor,

donde las bacterias se protegen del estrés ambiental tales como biocidas, antibióticos, ácido o estrés osmótico, y las amibas también ayudan a propagar el patógeno en sistemas acuáticos antropogénicos, en algunos casos las amibas utilizan a las bacterias como fuente de alimento, situación que *L. pneumophila* aprovecha para sobrevivir dentro de las vacuolas de la amiba durante periodos prolongados (Atlas, 1999; Declerck *et al.*, 2007; Fields, Benson y Besser, 2002; Newton *et al.*, 2010). La virulencia de *L. pneumophila* incrementa al igual que la patogenicidad de las AVL.

Cabe destacar que a *L. pneumophila* se le ha considerado como patógena, no solo para las células humanas sino también para las amibas, debido a que estas se lisan como resultado de la replicación intracelular de la bacteria una vez que ésta logra atravesar la membrana de las vacuolas digestivas y ha penetrado en el citoplasma de la amiba (Herrera *et al.*, 1998).

Rowbotham (1980), fue el primero en reportar el crecimiento de *L. pneumophila* en *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp., y posteriormente caracterizó el ciclo de vida de la bacteria. Señaló que la bacteria entra 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 lizarla o mantenerse dentro de una amiba enquistada (Figura 6).

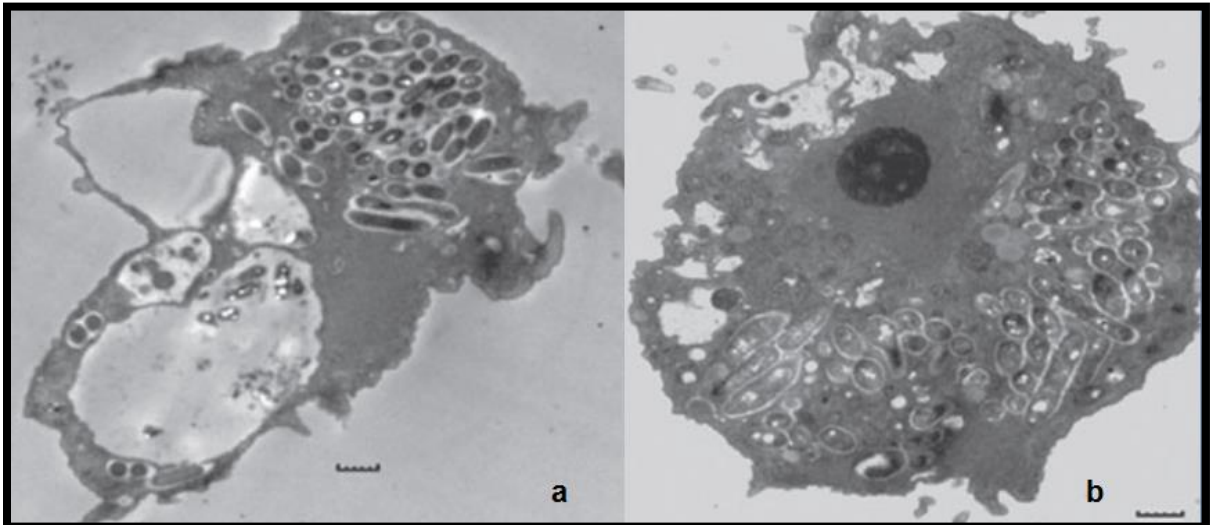


Figura 6. Trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* infectados con *Legionella pneumophila*. La multiplicación intracelular de *L. pneumophila* cepa AA100 dentro de *A. polyphaga*, examinada mediante microscopía. Se observan trofozoítos infectados después de 18 (a) y 48 h (b) (Lau y Ashbolt, 2009).

## 2.8 Biopelículas

Los biofilms o biopelículas se definen como comunidades microbianas complejas, caracterizadas por las células que se unen entre sí a un sustrato de mucopolisacárido o límite de fase, por medio de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) de producción propia (Donlan y Costerton, 2002).

Microcolonias de células bacterianas encapsuladas en la matriz de SPE se separan unas de otras por canales de agua intersticiales, lo que permite el transporte de nutrientes, oxígeno, genes e incluso agentes antimicrobianos (Prakash *et al.*, 2003).

Debido a su carácter dinámico, las comunidades de las biopelículas pueden continuamente cambiar en el tiempo y en el espacio, proporcionando una mejor supervivencia y crecimiento de los microorganismos asociados. Por esta razón, es fácil entender que, en la mayoría de los ambientes naturales, las biopelículas son el estilo de vida microbiana que prevalece (Watnick y Kolter, 2000).

En general, hay tres fases distintas en el ciclo de vida de las biopelículas bacterianas: a) fijación bacteriana a un sustrato, b) maduración de biopelículas y c) desprendimiento de la biopelículas y la posterior dispersión en el entorno (Figura 7) (Donlan y Costerton, 2002).

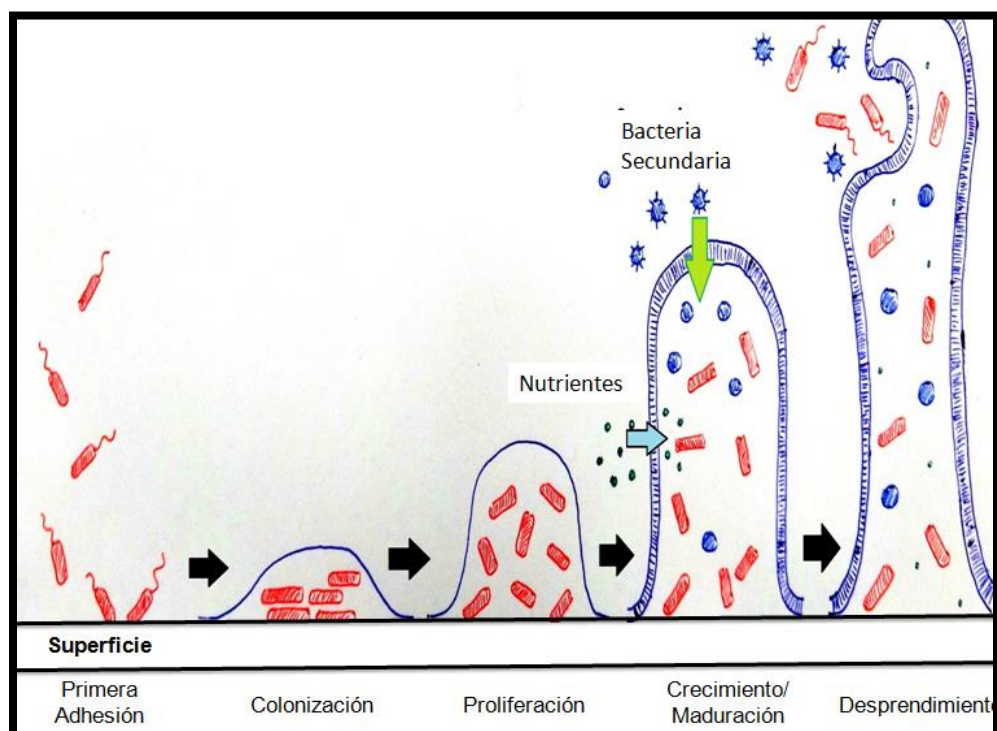


Figura 7. Formación de una biopelícula (Aguinaldo, 2015)

Por mucho tiempo, se consideró a las biopelículas como un tema secundario, aunque son conocidas desde hace tiempo, su relevancia para procesos ambientales, así como la medicina y salud pública han ganado mucha atención en las últimas décadas (Wingender y Flemming, 2011).

### 2.7.1 *Legionella* y las biopelículas como hábitat

El hecho de que *L. pneumophila* se encuentra comúnmente en ambientes acuáticos oligotróficos, a pesar de su naturaleza trofo-selectiva implica que la bacteria es capaz de obtener su suministro necesario del mismo ambiente, más específicamente del consorcio microbiano situado en biopelículas (Declerck, 2010). En el caso de *L. pneumophila*, existen dos maneras distintas de adquirir los nutrientes: en primer lugar, 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 la 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 este sistema son más resistentes a los tratamientos por pesticidas biológicos, permitiendo la proliferación de patógenos potenciales (Lau y Ashbolt, 2009).

Para poder desprenderse de la comunidad de la biopelícula, *L. pneumophila* puede infectar alguna ameba y esta nadará fuera de las biopelículas cuando las condiciones sean desfavorables o en otro caso 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 la bacteria viaja distancias considerables (Berk *et al.*, 1998; Declerck *et al.*, 2007).

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 este microorganismo, ya que una vez establecidas, son difíciles de eliminar de los sistemas de las tuberías (Cianciotto *et al.*, 2006).

## 2.9 Diagnóstico

La neumonía causada por *Legionella* no es, desde un punto de vista clínico, suficientemente diferente de las causadas por otros agentes como para poder fundamentar el diagnóstico sobre datos clínicos, por lo que resulta necesario recurrir a procedimientos de laboratorio (Mellado, 1998).

Desde el primer momento se evidenció la dificultad de *Legionella* para crecer en medios de cultivo convencionales. Por este motivo, los diagnósticos fueron poco frecuentes y la legionelosis se consideró una causa poco recurrente de neumonía, ligada casi exclusivamente a brotes comunitarios o nosocomiales (Salleras, 2002).

El diagnóstico de la legionelosis se basa, en la actualidad, en el cultivo de muestras respiratorias, inmunofluorescencia directa, serología y detección del antígeno en orina (Sabriá, 2002).

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 lo anterior debe optimizarse el procedimiento de detección, incluyendo la toma de la muestra que será diseñada en función de la finalidad de análisis (García, 2009).

### **2.9.1 Cultivo de *Legionella pneumophila***

*Legionella pneumophila* se aisló primero mediante el uso de agar Müeller-Hinton suplementado con hemoglobina e IsoVitaleX (MH-IH). El componente esencial de la hemoglobina se encontró que era una forma soluble de hierro, y la L-cisteína es el aminoácido esencial proporcionado por el IsoVitaleX. Estos refinamientos fueron llevados al desarrollo del agar Feeley-Gorman, que proporciona una mejor recuperación del organismo a partir de tejido. Más tarde, el almidón fue sustituido con carbón para desintoxicar el medio y la fuente de aminoácidos se cambió a extracto de levadura, lo que resulta en agar de carbón con extracto de levadura. Este agar es la base para formar la mayoría de los medios utilizados para crecer *Legionella*, el medio ha sido modificado varias veces, para mejorarlo, sin embargo, es el medio más utilizado en la actualidad, agar tamponado con extracto de levadura y carbón activado "BCYE", (por sus siglas en ingles), agar enriquecido con  $\beta$ -cetoglutarato con y sin agentes selectivos añadidos. El cultivo requiere el uso de medios selectivos y no selectivos, estos medios se pueden preparar con o sin colorantes indicadores, que imparten un color específico para ciertas especies de *Legionella*. Aunque la mayoría de las legionelas crecen fácilmente en agar BCYE, algunos requieren suplementación con albúmina de suero bovino para mejorar el crecimiento. La sensibilidad de aislamiento en cultivo de las secreciones respiratorias varía ampliamente, del 20 a 80 %, lo que refleja el carácter perecedero de estos ejemplares y la experiencia necesaria. *Legionella* se puede aislar a partir de un número de especímenes, incluida la sangre, el tejido pulmonar, las muestras de biopsia de pulmón, secreciones respiratorias (esputo, lavado alveolar y aspirado bronquial) y heces. *Legionella* también ha sido cultivada a partir de un gran número de sitios extra-pulmonares como la médula ósea, prótesis de válvulas cardíacas, y heridas esternas (Fields *et al.*, 2002).

En muestras ambientales los métodos habitualmente empleados son los de filtración por membrana de un volumen adecuado de agua, aproximadamente de 1L procedente del circuito de agua caliente y los puntos terminales de los circuitos de agua (Ruiz y Moreno, 2005).

En estos medios de cultivo selectivos las colonias aparecen dentro de los 3 a 4 días de incubación, sus características son: pequeñas, grisáceas-azuladas, aperladas y brillantes; la identificación precisa se hace sometiendo a estas colonias a pruebas específicas de género y especie (CDC, 2005).

## **2.9.2 Pruebas serológicas**

Las especies de *Legionella* pueden identificarse por una variedad de métodos. Estos incluyen inmunofluorescencia, aglutinación en porta o con partículas de látex, ensayos con anticuerpos género-específicos mediante *dot-blot* en colonias y amplificación específica del DNA mediante técnicas de PCR. También se pueden utilizar algunas pruebas bioquímicas, aunque no suelen ser muy útiles debido a que aportan resultados variables (Palencia, 2010).

Las técnicas serológicas determinan la presencia de anticuerpos contra *Legionella* en muestras de suero. Para realizar el diagnóstico es necesario recoger dos muestras de suero del mismo paciente tomadas, al menos, con tres semanas de separación. Además, se han producido reacciones cruzadas dando resultados falsos positivos en pacientes con infección por otras especies y serogrupos de *Legionella*, e incluso por bacterias pertenecientes a otras familias (Murdoch, 2003).

### **2.9.2.1 Inmunofluorescencia directa**

La prueba de inmunofluorescencia directa (IFD) fue el primer método utilizado para detectar a *Legionella* en el tejido pulmonar y las secreciones respiratorias (Fields *et al.*, 2002). En secreciones del tracto respiratorio inferior, se han detectado sensibilidades desde un 25 % (Zuravleff *et al.*, 1983) hasta de un 62 % (Edelstein *et al.*, 1980) o un 68 % (Saravolatz *et al.*, 1981) en el mejor de los casos. Usando anticuerpos conjugados con un fluorocromo, el cual proporciona un resultado en 2 a 4 h, lo que representa una gran ventaja, pero requiere emplear una técnica relativamente compleja que debe llevarse a cabo por personal de laboratorio



experimentado (Murdoch, 2003). Otra ventaja es que puede detectar a la bacteria varios días después de comenzar el tratamiento antimicrobiano (Fields *et al.*, 2002).

La sensibilidad de la IFD es variable según los distintos estudios, pero siempre considerablemente menor que la del cultivo, y poco conocida para especies distintas a *L. pneumophila*. Se pueden obtener resultados falsos positivos al producirse reacciones cruzadas con otras bacterias, entre las que se encuentran *Bacteroides fragilis* y especies de los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Flavobacterium*. Los problemas de sensibilidad y especificidad han limitado el uso de la IFD, y un resultado positivo no se acepta como diagnóstico en ausencia de otra prueba que apoye la evidencia de una infección por *Legionella* (Murdoch, 2003).

### **2.9.2.2 Inmunofluorescencia indirecta**

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se utiliza en la mayoría de los laboratorios para detectar el nivel de anticuerpos en suero. Un aumento de cuatro veces en el título se desarrolla dentro de 1 a 9 semanas después de la aparición de la enfermedad. Sin embargo, hasta un 25 % de seroconversión (desarrollo de anticuerpos) pasa desapercibida porque el suero se recoge más de ocho semanas después de la aparición de la enfermedad. La IFI se utiliza para diagnosticar la legionelosis mediante la incubación de muestras con un antisuero hiperinmune y luego se visualizan mediante la aplicación de un marcador con fluorescencia, llamado anticuerpo anti-*Legionella*, inmunoglobulina-fluoresceína conjugado con isotiocianato. Un control positivo (suero de referencia humano) y un control negativo (suero humano de un individuo sano) son obligatorios (WHO, 2007).

### **2.9.2.3 Inmunoensayo enzimático**

El inmunoensayo enzimático (IEE) y la microaglutinación, también se han utilizado para detectar los anticuerpos contra la bacteria de la legionelosis. Los métodos se pueden utilizar para el diagnóstico serológico de *L. pneumophila* serogrupo 1 en los tejidos. Varios kits de diagnóstico serológicos de IEE están disponibles comercialmente, con una sensibilidad que oscila entre un 80 % a 90 % y una especificidad de aproximadamente 98 %. La sensibilidad de los kits para las pruebas de anticuerpo a partir de los serotipos 2 a 6 es aún desconocido. La conformidad de pruebas con el método de inmunofluorescencia es de aproximadamente

un 91 %. La prueba de microaglutinación rápida tiene algunas ventajas sobre la inmunofluorescencia, tales como la facilidad de probar un gran número de las muestras y la aparición temprana de anticuerpos aglutinantes (WHO, 2007).

#### **2.9.2.4 Detección de antígeno en orina**

Sin duda, el mayor avance en el diagnóstico de la legionelosis ha sido la detección del antígeno en orina, que ha permitido el reconocimiento precoz de algunos brotes epidémicos de *Legionella*. El antígeno detectado es un componente termoestable de la porción del lipopolisacárido de la pared celular de *L. pneumophila* serogrupo 1. La antigenuria de *Legionella* puede ser detectada desde un día después que se instauren los síntomas y persiste de días a semanas. La prueba del antígeno en orina es actualmente una herramienta establecida y válida para el diagnóstico de la legionelosis, particularmente en las regiones donde *L. pneumophila* serogrupo 1 es la causa más común de la enfermedad (Murdoch, 2003).

El antígeno es detectable en la mayoría de los pacientes entre uno y tres días después de la aparición de los síntomas, y puede persistir durante algunas semanas o meses, incluso cuando otra prueba ya no puede detectar el antígeno (WHO, 2007).

#### **2.9.3 Métodos de biología molecular para la detección de *Legionella* spp.**

Recientemente, las técnicas de detección de DNA se han mostrado prometedoras en el diagnóstico rápido de la infección por *Legionella*. La reacción en cadena de la polimerasa, PCR, por sus siglas en inglés, permite la amplificación específica de pequeñas cantidades del DNA de la bacteria, proporciona resultados en un corto período de tiempo y tiene el potencial de detectar infecciones causadas por cualquier especie y serogrupo de *Legionella* (Murdoch, 2003).

El DNA de *L. pneumophila* se detectó primero en muestras clínicas mediante un ensayo de hibridación de ácido nucleico comercial que utiliza una radio RNA marcado isotópicamente de la sonda. Sin embargo, las preocupaciones sobre la sensibilidad y especificidad de la prueba llevaron a su posterior retirada (Fields *et al.*, 2002).

Desde entonces, los ensayos de *Legionella* por PCR se han utilizado más activamente para detectar el DNA a partir de muestras ambientales, pero también puede ser utilizado para el análisis de muestras clínicas, en particular las del tracto respiratorio. La detección del DNA de *L. pneumophila* se ha dirigido a:

- Genes RNA ribosomal (rDNA) o sus regiones espaciadoras intergénicas
- Un gen que codifica para la proteína de choque térmico (dnaJ)
- El gen de RNA polimerasa (rpoB)
- El gen potenciador de la infectividad de macrófagos (MIP)

Tradicionalmente, el gen de rDNA se han utilizado para los ensayos dirigidos al género *Legionella* y el gen MIP para ensayos específicos de *L. pneumophila*.

Una característica importante de la PCR de *Legionella* es que el método potencialmente puede detectar todos los serogrupos de *L. pneumophila* y por tanto es útil en el diagnóstico precoz de las infecciones, particularmente en los casos nosocomiales. En los últimos años, las técnicas de PCR han mejorado sustancialmente, en particular aquellas para PCR tiempo real debido a que acelera el procedimiento de diagnóstico para la legionelosis y mejora la especificidad (WHO, 2007).

## 2.10 Importancia médica

### 2.10.1 Transmisión de *Legionella pneumophila* al hombre

*Legionella pneumophila* es un patógeno de transmisión aérea y como consecuencia de su posible presencia en los bioaerosoles generados por los ambientes acuáticos que puede ser un importante factor de riesgo para el ser humano. Torres de refrigeración de aire acondicionado, duchas, humidificadores, respiradores y otros equipos que generan aerosoles están implicados comúnmente como fuentes en brotes de enfermedades, ya que la infección humana se produce sólo por inhalación de aerosoles contaminados. La legionelosis es una causa importante de neumonía adquirida en los hospitales. Se reconoce al agua potable como la principal fuente ambiental asociada a la enfermedad (Arvand *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2010; Pascual *et al.*, 2001).

La entrada de *Legionella* en el humano se produce por inhalación de aerosoles que contengan un número suficiente de bacterias, no habiendo evidencia de su posible transmisión de

persona a persona, ni de la existencia de reservorios animales conocidos (WHO, 2007).

Para que se produzca infección en el hombre se tienen que dar una serie de requisitos (Colbourne *et al.*, 1988):

- a) Que el microorganismo tenga una vía de entrada por la instalación. Esto suele producirse por aporte de aguas naturales contaminadas por la bacteria, normalmente en pequeñas cantidades.
- b) 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 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.
- c) 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. 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 µm penetran en los pulmones.
- d) Que sea virulento para el hombre, ya que no todas las especies o serogrupos están igualmente implicados en la producción de enfermedad.
- e) Que individuos susceptibles sean expuestos a aerosoles conteniendo cantidad suficiente de legionelas viables.

En la actualidad se conocen dos formas clínicas y epidemiológicas de la infección por *Legionella*: la “legionelosis” (forma neumónica) y la “fiebre de Pontiac” (forma no neumónica) (Compañ *et al.*, 2011).

### **2.10.1.1 Fiebre de Pontiac**

La fiebre de Pontiac es una enfermedad tipo gripal aguda y autolimitada sin neumonía. El periodo de incubación es de 24 a 48 horas y la tasa de ataque en las personas expuestas supera el 90 %. Los síntomas principales comprenden: malestar general, mialgias, fiebre, escalofríos, cefaleas, tos seca, mareos y náuseas. Estos pacientes solo necesitan un tratamiento sintomático, generalmente se recuperan por completo (Mandell *et al.*, 2005).

En el caso de Fiebre de Pontiac el tratamiento es sintomático. La tasa de ataque (nº de enfermos/nº de personas expuestas) en brotes es de 0.1 a 5 % en la población en general; la letalidad, en la comunidad, supone menos del 5 %, pero puede llegar a ser del 15 o 20 % si no se instaura un tratamiento antibiótico adecuado (Edelstein, 1995). En los casos nosocomiales la frecuencia oscila entre el 0.4 y 14 % (Marrie *et al.*, 1991) y la letalidad puede llegar a ser del 40 % (Marston *et al.*, 1994) incluso alcanzar el 80 % en pacientes inmunocomprometidos sin tratamiento adecuado (Edelstein, 1995). El tratamiento antibiótico de elección es eritromicina, de gran eficacia y del que no se han descrito resistencias (Edelstein, 1993).

### **2.10.1.2 Legionelosis**

La legionelosis es una enfermedad bacteriana de origen ambiental que presenta una infección pulmonar, caracterizada por neumonía con fiebre alta, cefalea y mialgias. Alrededor de un tercio de los casos desarrollan diarrea y vómitos y la mitad de ellos pueden presentar confusión mental y delirio, pudiendo llevar al individuo a la muerte (McDade *et al.*, 1977)

La legionelosis se produce tanto de forma esporádica, así como en brotes en la comunidad y también en el ámbito de la atención sanitaria. Se ha implicado como la segunda causa más común de neumonía adquirida en la comunidad, mientras que la infección nosocomial afecta a menos del 1 % de los pacientes hospitalizados (Anbumani *et al.*, 2010).

La neumonía es clínicamente indistinguible de otras neumonías atípicas y con frecuencia los pacientes requieren hospitalización. El periodo de incubación es normalmente de 2 a 10 días, en el ámbito hospitalario, el riesgo de adquirir la enfermedad después de la exposición al 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, etc. (Marston *et al.*, 1994).

La presentación clínica sugestiva general de la legionelosis consta de una neumonía aguda grave, confundida con citólisis hepática, hiponatremia y fracaso renal. Factores de riesgo de la legionelosis incluyen el tabaquismo, sexo masculino, enfermedad cardiaca o pulmonar

crónica, la diabetes en fase terminal, insuficiencia renal, trasplante de órganos, la inmunosupresión, cáncer y la edad de 50 años. La tasa global de letalidad es de alrededor del 10 al 15 % en Francia y la mortalidad en unidades de cuidados intensivos oscila entre el 15 y 33 % (Chidiac *et al.*, 2012).

La infección por *Legionella* puede ser adquirida fundamentalmente en dos grandes ámbitos, el comunitario y el hospitalario. En ambos casos la enfermedad puede estar asociada a varios tipos de instalaciones y de edificios, y puede presentarse en forma de brotes o casos agrupados, casos relacionados y casos aislados o esporádicos (Edelstein, 1995).

### **2.10.1.3 Tratamiento de la legionelosis**

Le legionelosis fue considerada por muchos como una plaga por su elevada mortalidad. Actualmente, el índice de mortalidad ha disminuido y el inicio temprano de un tratamiento adecuado es reconocido hoy como crucial para un resultado exitoso de la legionelosis. Los primeros estudios indican que los pacientes tratados con eritromicina tuvieron una menor tasa de mortalidad que los pacientes tratados con aminoglucósidos, antibióticos lactámicos, o cloranfenicol (6 % frente al 30-40 %). La escasa respuesta a estos antibióticos se ha relacionado con su incapacidad para penetrar en las células fagocítica. De hecho, los estudios han indicado que los antibióticos clínicamente eficaces deben tener las siguientes características: (1) superiores actividad *in vitro* contra especies de *Legionella*, (2) la capacidad de entrar y concentrarse en las células fagocítica, y (3) la capacidad de alcanzar altas concentraciones en el tejido pulmonar y exudado alveolar. Históricamente la eritromicina se ha considerado la primera opción en el tratamiento de la legionelosis. El tratamiento con este antibiótico, sin embargo, se asocia con varios efectos secundarios adversos, incluyendo la pérdida transitoria de la audición, flebitis, la intolerancia gastrointestinal, y, más raramente, arritmia ventricular. Las fluoroquinolonas y macrólidos más nuevos como claritromicina, azitromicina, roxitromicina, son atractivos porque han exhibido actividad superior contra las especies de *Legionella* y mayor penetración intracelular con potencialmente menos efectos adversos. Con el desarrollo de formulaciones intravenosas, estos nuevos macrólidos pueden sustituir a la eritromicina como el tratamiento de elección. Las quinolonas han demostrado una mayor actividad contra especies de *Legionella* y mayor penetración intracelular que los macrólidos. Otros antibióticos que han mostrado resultados variables en el tratamiento de la

legionelosis incluyen las tetraciclinas (por ejemplo, doxiciclina, minociclina y tetraciclina) y la combinación de trimetoprim-sulfametoxazol. La rifampicina es un antibiótico que se utiliza en el tratamiento combinado para los pacientes gravemente enfermos y por lo general se administra por vía oral o por vía intravenosa, aunque no se administra como una monoterapia debido a la posibilidad de desarrollar cepas de *Legionella* resistentes a rifampicina (EPA, 1999; Murder y Yu, 2002).

#### **2.10.1.4 Prevención de la legionelosis**

La legionelosis se puede considerar una enfermedad emergente, producida por un microorganismo que se ha visto favorecido por las actuales condiciones de vida (sistemas de abastecimiento de agua de las ciudades, instalaciones de agua doméstica y otras instalaciones que requieren agua para su funcionamiento, como nebulizadores o torres de refrigeración). Es bien conocida la ubicación de *Legionella* en ambientes naturales como lagos y ríos, la concentración de *Legionella* en estas aguas es baja, por eso, a pesar de las aerosolizaciones que debe tener el lugar en saltos de agua naturales, no se ha descrito ningún caso por lo que el control del medio ambiente es inútil y además extremadamente caro. Es en ciertos ambientes creados por el hombre donde se hace necesario el control de *Legionella*, para ello muchos países han elaborado normas para la prevención de la legionelosis que controlan dos fases de actuación: 1) durante el montaje y diseño de los sistemas y 2) durante la parte de explotación de los sistemas, mediante un mantenimiento adecuado (Palencia, 2010). Otras medidas dirigidas contra *L. pneumophila* serían eficaces en la reducción de los niveles de otras especies de *Legionella* en el agua potable. Estas medidas incluyen la cloración de choque y el sobrecalentamiento y lavado (para la desinfección de emergencia), y tratamiento de ionización de cobre y plata (como medida de desinfección a largo plazo). La cloración ha sido utilizada como una medida de desinfección a largo plazo, aunque ya no se recomienda, una desventaja importante es que el mantenimiento de altos niveles de cloro puede causar la corrosión de tuberías y fugas (Murder y Yu, 2002).

### **2.11 Epidemiología**

Se estima que *L. pneumophila* causa 25, 000 casos de neumonía en los Estados Unidos cada año o el 1 % de todos los casos de neumonía. Antes del reconocimiento de *L. pneumophila*, se estima que en los Estados Unidos la incidencia anual de neumonía de origen desconocido

fue de 800,000 casos. Los datos anteriores sugieren que los casos de legionelosis esporádicos puede representar sólo el 3 %. La legionelosis representa el 3.8 % de los casos graves de neumonía nosocomial en los Estados Unidos, posiblemente lo que refleja la susceptibilidad preferencial de la población hospitalizada. Diecinueve epidemias de legionelosis se investigaron por el Centro de Control de Enfermedades (CDC); los 19 brotes han sido causados por *L. pneumophila*. Los brotes ocurrieron en 1965 y se han asociado con un síndrome clínico de la legionelosis en todos menos en dos casos. Típicamente, la epidemia de legionelosis se produce en el verano y principios del otoño. La epidemia de legionelosis reconoce que se produce en tres patrones: fuente puntual explosivo, fuente puntual en curso, y aumento estacional en una zona hiperendémica. La mayoría de los brotes se reconocieron en el este de los Estados Unidos. Ellos se han asociado en casos tanto nosocomial como la adquisición de la enfermedad en la comunidad. La enfermedad adquirida en la comunidad afecta ya sea residentes locales o viajeros, dependiendo en gran medida de la fuente de contagio. Las tasas de ataque de la epidemia de legionelosis son del 95 al 100 % para la fiebre de Pontiac, pero son generalmente de 0.1 a 0.5 % para la legionelosis (Blackmon *et al.*, 1981).

En 2013, se notificaron 5, 851 casos de legionelosis en 28 estados miembros de la Unión Europea y en Noruega. El número de notificaciones por millones de habitantes fue 11.4 muy dentro del rango de 2005-2012. Seis países (Francia, Italia, España, Alemania, Países Bajos y Reino Unido) representaron el 83 % de todos los casos notificados. El número de notificaciones varió de 0.1 por millón de habitantes en Bulgaria a 39.4 por millón en Eslovenia. La mayoría de los casos fueron adquiridos por la comunidad (73 %), el 19 % estaban asociados a viajeros y el 8 % estaban vinculados a centros de salud. Personas mayores de 50 años de edad representaron el 81 % de todos los casos. La relación hombre-mujer fue 2.4 a 1. La tasa de letalidad fue del 10 % en 2013, similar a años anteriores. La mayoría de los casos (88 %) fueron confirmados por la prueba de antígeno urinario, pero una proporción creciente de los casos se informa que han sido diagnosticados por PCR. *L. pneumophila* serogrupo 1 fue el más comúnmente identificado como patógeno, lo que representa el 83 % de los casos confirmados por cultivo. Para 2013, se notificaron 787 casos legionelosis asociada a viajeros en 30 países. Esto fue 5 % inferior a los 831 casos reportados en 2012, continuando una tendencia ligeramente decreciente desde 2007. Cinco países (Francia, Italia, Países Bajos, España y Reino Unido) reportaron tres cuartas partes de casos de legionelosis asociada a la realización de viajes. La proporción hombre-mujer de 2.4 a 1 y la mediana de edad de 63 años



eran casi idénticas a las correspondientes a 2012. Un total de 110 “grupo estándar 1” fueron detectados en 2013, 10 % más que en el año anterior. Los nombres de dos sitios de alojamiento se publicaron en el sitio web del centro europeo para la prevención y control de enfermedades, después de que el punto de contacto nacional indicara que las medidas de control eran inadecuadas (ECDC, 2015).

En México sólo se han reportado tres 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, Guerrero y Quintana Roo. Hasta el momento, no se ha notificado ningún brote de legionelosis en México, ni la bacteria se ha aislado de ningún caso de neumonía (Compañ *et al.*, 2011)

En el año 2015 se habían registrado 145, 509 casos de infecciones respiratorias agudas (IRA), notificadas por diversas fuentes en las que se encuentra el IMSS, ISSSTE, DIF, PEMEX, entre otras, estas mismas fuentes dan un registro de 817 casos de neumonías y bronconeumonías, en especial en niños menores de 5 años y ancianos. Las IRA, se encuentran dentro de las 20 causas de morbilidad y mortalidad y constituyen un problema de Salud Pública en México. El 99% de los casos que se notifican pertenecen a infecciones de vías respiratorias superiores y solo el 1% corresponde a las infecciones de vías aéreas inferiores como es el caso de las neumonías y bronconeumonías. Las IRAs se ubican entre las tres principales causas de mortalidad en niños menores de 5 años y en la actualidad se encuentran en el noveno lugar como causa de mortalidad general en México. (INDRE, 2015).

Hasta la semana 37 del año 2017, la dirección general de epidemiología registró en esta semana epidemiológica, a nivel nacional se notificaron 420 casos nuevos de IRAs por cada 100,000 habitantes. Solo para el estado de Oaxaca se notificó una incidencia de 256.6 casos de IRA por 100,000 habitantes. En esta semana se presenta un incremento del 41.3 % con respecto a la semana 34 que registro 291 casos nuevos de IRAs por cada 100, 000 habitantes. Con respecto al mismo período del año anterior se presenta un incremento del 26.6 % en el número de casos (DGE, 2017).

### 3. ANTECEDENTES

Wadowsky *et al.*, en 1982, obtuvieron muestras de hospitales, que fueron cultivadas para la detección de *Legionella* spp. de las superficies interiores de grifo, cabezal y tuberías de ducha, donde *L. pneumophila* fue recuperada de los accesorios de plomería de los hospitales.

Bollin *et al.*, en 1985, muestrearon duchas y grifos de agua caliente en hospitales, aproximadamente el 50 % de los organismos recuperados fueron atrapados en las partículas de aerosol de entre 1 y 8  $\mu\text{m}$  de diámetro, determinando que los cabezales de ducha y grifos de agua caliente, contienen *L. pneumophila*. Por lo tanto, estos sitios pueden estar implicados como un medio de transmisión de *L. pneumophila* a partir de agua potable al paciente.

Barbaree *et al.*, en 1987, realizaron un estudio en dos hospitales donde fue aislada *L. pneumophila*, en ambos casos se muestrearon tanques de agua caliente y el agua de cuatro sistemas de compresores de aire para terapia respiratoria además de grifos de agua fría y caliente, encontrando la mayor concentración de *L. pneumophila* en los tanques de agua caliente.

Marín y Montes en 1991, reportaron un caso de neumonía por *L. pneumophila* en México. Se trata de un paciente masculino, adulto joven, que ingreso al Hospital de Especialidades del Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios (ISSEMYM) de Toluca, con neumonía intersticial atípica, se reportó tinción de Giménez positiva para *L. pneumophila*.

Bej *et al.*, en 1991, utilizaron la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sondas de genes como el gen mip, con los primers Lmip920 y Lmip1548, para una secuencia de 650 pb para detectar a *L. pneumophila*. Las bacterias fueron investigadas después de ser expuestas a biocidas (cloro) y temperatura elevada, quedando células no viables las cuales no fueron detectadas.

Bernarder *et al.*, en 1997, realizaron un PCR anidado, específico para *L. pneumophila*, utilizaron primers del gen MIP. Veintidós de 25 muestras clínicas fueron positivas entre los pacientes que sufren de neumonía demostrando ser debida a serogrupos de *L. pneumophila*

---

1,3, 4, 5 y 6.

Miyamoto *et al.*, en 1997, realizaron un estudio para idear un nuevo ensayo de PCR semianidada para la detección de *Legionella* spp. en muestras de agua como medio, anulando los inhibidores de la PCR sin perder la sensibilidad. El ensayo de PCR semianidado utilizó primers para amplificar el gen 16S rRNA siendo específico y sensible para la encuesta de legionela en torres de refrigeración de agua y el agua de un río.

Pascual *et al.*, en 2001, analizaron un total de 64 muestras, tomadas en una planta de tratamiento de aguas residuales, una planta química y un edificio de oficinas, fueron analizadas por cultivo y PCR anidado, utilizando como primers externos: Lmip 976 y Lmip1548, y como primers internos: Lmip976 y Lmip1427, que amplifican una región interna del gen MIP de 471 pb. Los resultados demostraron que *L. pneumophila* estaba presente en bioaerosoles de estos tres entornos diferentes.

Yong *et al.*, en 2010, utilizaron una nueva gama de primers del gen 16S rRNA y MIP *lpg0774* para identificar el serotipo 1. Se obtuvieron marcas de 156 pb para *lpg0774* y de 654 pb para 16S rRNA. Demostró la importancia del desarrollo de nuevos primers, en la identificación de *L. pneumophila* utilizando la hibridación entre *L. pneumophila* y *L. micdadei*.

Ghotaslou *et al.*, en 2013, realizaron un estudio en hospitales de Tabriz, Irán, en donde, el 7 % de las muestras fueron positivas para *Legionella*. De este estudio se concluyó que *Legionella* spp. estaba presente en el ambiente acuático en hospitales.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Hasta la fecha no se han realizado estudios para determinar la presencia de *L. pneumophila* en agua de grifo, nebulizadores, regaderas, etc. dentro de los hospitales, en México. Normalmente las bacterias responsables de las infecciones no se transmiten por aire si no tienen un vehículo de transporte. Por tanto, cuantas menos partículas se encuentren suspendidas en el aire, se tendrá menos posibilidad de contaminación microbiana.

Es por ello que se hace necesaria la investigación de la presencia de esta bacteria en hospitales de nuestro país, para iniciar las medidas que permitan controlar su aparición, además de disponer de un método eficaz que permita la vigilancia sanitaria de este patógeno, así como un buen diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, debido a que está sub-diagnosticada.

---

## 5. OBJETIVOS

- Diagnosticar y caracterizar la presencia de *Legionella pneumophila* a partir de diferentes fuentes de agua y biopelículas recolectadas de grifos, nebulizadores, regaderas, aires acondicionados y cisternas, en cuatro hospitales de las regiones de Papaloapan y Sierra Norte en el estado de Oaxaca
- Identificar especies de *Legionella* utilizando medios de cultivo específicos.
- Determinación de la presencia de *Legionella pneumophila* por métodos de biología molecular, a través de la amplificación de regiones específicas para el gen mip para la completa identificación de los aislados a nivel de especie de *Legionella pneumophila* por medio de la secuenciación nucleotídica de los productos de la PCR.
- Determinar la similitud correspondiente del amplicon obtenido con la base de datos del GeneBank.

## 5. ÁREA DE ESTUDIO

### 5.1 Descripción de los lugares de muestreo

#### 5.1.1 Estado de Oaxaca

El estado de Oaxaca está localizado en la región sureste del Pacífico Mexicano: limita al norte con Puebla y Veracruz, al este con Chiapas y al oeste con Guerrero. Está dividido geográficamente en ocho regiones del estado: Cañada, Costa, Istmo, Mixteca, Papaloapan, Sierra Norte, Sierra Sur y Valles Centrales (Figura 8).



Figura 8. Regiones en el estado de Oaxaca.

Enmarcado en una complicada y caprichosa orografía, tiene una extensión territorial de 95,430 km<sup>2</sup>, el estado goza de variados microclimas y ecosistemas, haciendo de esta entidad una de las más ricas en diversidad biológica. Los sistemas montañosos del estado dan origen a una compleja red de ríos que corren tanto hacia la vertiente del Golfo de México como hacia la del Océano Pacífico. En general, las cuencas hidrográficas de la vertiente del Pacífico son más escarpadas que las del Golfo. En conjunto, en las dos vertientes encontramos ocho regiones hidrológicas, formadas por 14 cuencas (4.37 % del total nacional) y 68 subcuencas (INEGI, 2000).

De modo general, la entidad presenta climas de los grupos cálido, semicálido, templado, semiseco y húmedo, con un rango de temperatura media anual de 15 a 28.3 °C y un rango de precipitación total anual de 430 a 3,600 mm<sup>3</sup> (INEGI, 2012).

## 5.2 Sitios de muestro

Se seleccionaron cuatro hospitales en dos regiones del estado de Oaxaca:

Región del Papaloapan:

- *Hospital General de San Juan Bautista Tuxtepec*, ubicado en la calle Sebastián Ortiz, N° 310, Col. María Luisa, San Juan Bautista, Tuxtepec, Oaxaca, México. CP. 68310 (Figura 9).



Figura 9. Hospital General de San Juan Bautista, Tuxtepec, Oaxaca.

- *Hospital General Básico Comunitario de Loma Bonita*, ubicada en Av. Cuauhtémoc s/n° Col. Josefa Ortiz de Domínguez, 2° sección, Loma Bonita, Oaxaca, México. CP. 68400 (Figura 10).



Figura 10. Hospital General Básico Comunitario de Loma Bonita

Región de Sierra Norte:

- *Hospital General María Lombardo de Caso*, ubicada en Av. 5 señores, esq. Heladio Ramírez López, s/n°, Col. Centro, María Lombardo de Caso, San Juan Cotzocon, Oaxaca, México. CP. 70215, (Figura 11).



Figura 11. Hospital General María Lombardo de Caso.



- *Hospital Básico Comunitario de Ixtlán de Juárez*, ubicado en la Av. Venustiano Carranza s/n°, Barrio La Soledad, Ixtlán de Juárez, Oaxaca, México. CP. 68725. (Figura 12).



Figura 12. Hospital Básico Comunitario de Ixtlán de Juárez.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Muestreo del agua y biopelículas.

Se recolectarán 12 muestras de agua de 1L de diferentes fuentes como regaderas y cisternas, y 12 muestras de hisopados de biopelículas de nebulizadores (Figuras 13 y 14), agua de grifos y aire acondicionado, en contenedores de polipropileno estériles. Las muestras de agua se agitaron durante 30 segundos y se tomó una alícuota de 50 ml en tubos Falcon. La muestra de las biopelículas se realizó con hisopos de algodón estériles y fueron sumergidos en tubos Falcon estériles con 3-5 ml de agua de la misma muestra. Las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente al laboratorio de Patógenos Emergentes de la UIICSE en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

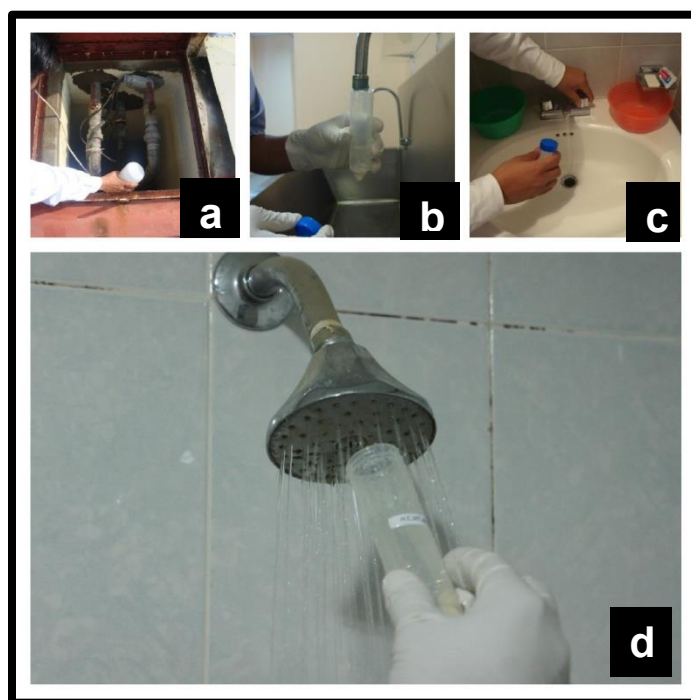


Figura 13. Recolección de muestras de agua de los distintos sistemas hídricos de los hospitales, cisterna (a), agua de grifo (b y c) y agua de regadera (d).



Figura 14. Recolección de muestras de biopelículas en los distintos hospitales, agua de grifo (a y b), nebulizadores (c), aire acondicionado (d y e).

## 6.2 Registro de los parámetros fisicoquímicos del agua

Los parámetros fisicoquímicos del agua fueron registrados *in situ* para cada una de las muestras, la temperatura del agua (°C) se midió con un termómetro digital Itawa, y el pH se midió con un instrumento pH EC 98130 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI). El cloro libre residual se midió mediante el kit colorimétrico HANNA modelo HI 3831F (Declerck, 2007; Declerck, 2009; Gallegos, 1997)

## 6.3 Aislamiento de *Legionella pneumophila*

### 6.3.1 Concentración de bacterias por centrifugación

Los tubos de polipropileno que contenían la muestra de agua fueron centrifugados a 3, 000 x g durante 10 minutos. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante dejando 1 ml de la muestra, aproximadamente, el cual se procesó por descontaminación acida, para disminuir los microorganismos no pertenecientes al género *Legionella* (Boulanger y Edelstein, 1995).

### **6.3.2 Descontaminación ácida**

Para algunas muestras de agua con altas concentraciones de bacterias, es necesario utilizar un procedimiento selectivo, antes del cultivo, para reducir el número de bacterias que no sean del género *Legionella*. El tratamiento con ácido y el calentamiento de muestras se utiliza habitualmente para este propósito. *Legionella* es más resistente a un pH más bajo y breve exposición a temperaturas más altas que muchas otras bacterias de agua dulce. El siguiente procedimiento es utilizado por los laboratorios del CDC para preparar estas muestras para cultivo.

1. Se colocó 1 ml de la muestra en un tubo de centrifuga estéril de 15 ml que contenía 1 ml de buffer ácido (KCl-HCl 0.2N) y se mezcló.
2. Se incubó la suspensión acidificada durante 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Se colocó 1  $\mu$ l de la suspensión en placas BCYE, adicionado con L-cisteína y pirofosfato férrico, y se extendió con una varilla de vidrio estéril.
4. Se incubaron las placas a 35 °C. Las placas se observaron de 72 a 96 horas después de la incubación (Delgado-Viscogliosi *et al.*, 2005).

En estos medios de cultivo selectivos, agar tamponado con extracto de levadura y carbón activado (BCYE) las colonias aparecen dentro de los 3 a 4 días de incubación, sus características son: pequeñas, grisáceas-azuladas, aperladas y brillantes; la identificación precisa se hace sometiendo a estas colonias a pruebas específicas de género y especie (CDC, 2005).

## **6.4 Identificación de *Legionella pneumophila*.**

### **6.4.1 Extracción y purificación del DNA bacteriano**

Para analizar a *L. pneumophila* se llevó a cabo la extracción y purificación del DNA bacteriano con un kit de extracción Wizard Genomic DNA Purification Kit, de la marca comercial Promega, utilizando el protocolo para extracción de DNA para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Quick protocol). Se seleccionaron las colonias típicas del organismo buscado

(Instrucción del fabricante).

#### 6.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa punto final y anidado

Para garantizar la identificación precisa de las bacterias a nivel de especie, se realizó un análisis molecular por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), para buscar y amplificar regiones específicas de esta especie utilizando diferentes secuencias de primers.

Se utilizaron los primers FD1Eubac (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y RD1Eubac (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') los cuales amplifican el gen 16S rDNA de un segmento de 1,600 pb, en un volumen de reacción de 10 µl: se mezclaron 1 µl de Buffer 10x, 0.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.2 µl de dNTP's 10 mM, 0.4 µl de cada primer, 0.2 µl de Taq® DNA Polimerasa, 0.5 µl de DNA templado y 7 µl de agua libre de nucleasas para ajustar el volumen final.

Se realizó la amplificación de una región mediante un PCR, utilizando las condiciones descritas (Cuadro 3) para los primers de 16S rDNA.

Cuadro 3. Condiciones de la PCR para los primer

Desnaturalización Inicial	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Extensión final
94 °C - 3 min		30 ciclos		72 °C – 7 min
	94 °C – 1 min	55 °C – 30 seg	72 °C – 2 min	

Se utilizaron los primers específicos LmipL920 (5'-GCTACAGACAAGGATAAGTTG-3') y LmipR1548 (5'-GTTTTGTATGACTTTAATTCA-3') (Bej *et al.*, 1991; Bernarder *et al.*, 1997; Pascual *et al.*, 2001) los cuales amplifican el gen mip específico de *L. pneumophila* de un segmento de 650 pb, en un volumen de reacción de 10 µl: se mezclaron 1 µl de Buffer 10x, 0.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.2 µl de dNTP's 10 mM, 0.4 µl de cada primer, 0.2 µl de Taq® DNA Polimerasa, 0.5 µl de DNA templado y 7 µl de agua libre de nucleasas para ajustar el volumen final.

Se realizó la amplificación de una región del gen mip mediante un PCR, utilizando las condiciones descritas (Cuadro 4) para los primers externos LmipL920 y LmipL1548 de Bej *et*

*al.*, 1991.

Cuadro 4. Condiciones de la PCR para los primer LmipL920 y LmipL1548 (Bej *et al.*, 1991)

<b>Desnaturalización Inicial</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Alineación</b>	<b>Extensión</b>	<b>Extensión final</b>
94 °C - 5 min		35 ciclos		72 °C – 6 min
	94 °C – 15 seg	50 °C – 15 seg	72 °C – 30 seg	

Para un PCR anidado se utilizaron como primers internos Lmip1021 (5'-CATGCAAGACGCTATGAGTG-3') y Lmip1392 (5'-CAAGTTGATCCAGCTGGCAT-3') (Bernarder *et al.*, 1997), para la detección de un fragmento de 403 pb, con diferentes condiciones (Cuadro 5). En un volumen de reacción de 10 µl: se mezclaron 1 µl de Buffer 10x, 0.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.2 µl de dNTP's 10 mM, 0.4 µl de cada primer, 0.2 µl de Taq<sup>®</sup> DNA Polimerasa, 0.5 µl de DNA templado y 7 µl de agua libre de nucleasas para ajustar el volumen final.

Cuadro 5. Condiciones de la PCR para los primer LmipL1021 y LmipL1392 (Bernarder *et al.*, 1997)

<b>Desnaturalización Inicial</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Alineación</b>	<b>Extensión</b>	<b>Extensión final</b>
95 °C - 5 min		30 ciclos		72 °C – 5 min
	95 °C – 30 seg	55 °C – 30 seg	72 °C – 1 min	

Para un segundo PCR anidado primero se realizó la amplificación de la región interna del gen mip, utilizando las condiciones antes descritas (Cuadro 4) para los primers externos LmipL920 y LmipL1548 de Bej *et al.*, 1991. Y después se utilizaron como primers internos *Lmip976* (5'-TAAAATCAAGGCATAGATG-3') y *Lmip1427* (5'-AGACCTGAGGGAGCATAAAT-3') (Pascual *et al.*, 2001), para la detección de un fragmento de 471 pb, con diferentes condiciones (Cuadro 6). En un volumen de reacción de 10 µl: se mezclaron 1 µl de Buffer 10x, 0.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.2 µl de dNTP's 10 mM, 0.4 µl de cada primer, 0.2 µl de Taq<sup>®</sup> DNA Polimerasa, 0.5 µl de DNA templado y 7 µl de agua libre de nucleasas para ajustar el volumen final.

Cuadro 6. Condiciones de la PCR para los primer LmipL976 y LmipL1427 (Pascual *et al.*, 2001)

<b>Desnaturalización Inicial</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Alineación</b>	<b>Extensión</b>	<b>Extensión final</b>
95 °C - 5 min		30 ciclos		72 °C – 5 min
	95 °C – 30 seg	55 °C – 30 seg	72 °C – 1 min	

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler.

Todos los productos de PCR fueron analizados por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 %, a 100 volts durante 20 minutos. Se utilizó el marcador molecular 1Kb Plus DNA Lader® de 12, 000 pb. Se visualizaron en un transiluminador de rayos UV. y se fotografiaron con una cámara convencional Nikon con un filtro de color naranja.

### **6.5 Secuenciación de los productos de DNA obtenidos de la PCR**

Las bandas observadas en el gel de agarosa y con el tamaño esperado del amplicon, se purificaron con los protocolos de Gene Clean® Kit y ExoSAP-IT® Kit.

Con Gene Clean® Kit, con una navaja se cortó el fragmento de gel que contenía la banda de DNA de interés y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se disolvió la agarosa y se le agregó 200 µl de la solución de fijación de la membrana y se metió al vortex. Se incubó a 57 °C hasta que el gel estuviera disuelto. El gel disuelto se pasó a través de microcolumnas de celulosa para hacer un lavado y coleccionar el DNA, por último, se lavó lo obtenido de las microcolumnas con la solución de lavado de membrana.

Con ExoSAP-IT® Kit, con este Kit los productos de PCR no fueron analizados por agarosa, directamente fueron inoculados con la solución ExoSAP-IT, el cual se degradó los primers y nucleótidos remanentes, para inactivar la solución se incubó a 80 °C y el producto fue mandado a secuenciar (instrucción del fabricante).

La secuenciación de los productos fue realizada en el laboratorio de Bioquímica Molecular de

Detección de *Legionella pneumophila* en ambientes intrahospitalarios de las regiones del Papaloapan y Sierra Norte del estado de Oaxaca.

---

la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Los productos clonados fueron analizados en un secuenciador Applied Biosystem Genetic Analyzer 3130 xl. La secuencia nucleotídica fue comparada para su identificación con secuencias disponibles en la base de datos del GenBank (NCBI, 2016).



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Cultivos bacterianos

Se colectaron 12 muestras por región, seis muestras por hospital, obteniendo un total de 24 muestras de agua y de biopelículas a partir de diversas fuentes, para cada hospital se muestreo agua de grifos y cisternas, con y sin tratamiento de cloro, además de hisopados de la biopelículas en nebulizadores, regaderas y aire acondicionado (Cuadros 7 y 8). Las muestras fueron positivas para tres de los cuatro hospitales estudiados, en donde los hospitales de la región de Papaloapan tienen mayor cantidad de muestras positivas (Figura 15).

Cuadro 7. Relación de las muestras colectadas con el total de aislados positivos para *Legionella* spp., por cada hospital muestreado, para las regiones de Papaloapan en el estado de Oaxaca.

<b>Región: Papaloapan</b>			
<b>Hospital</b>	<b>Tipo de muestra</b>	<b>Origen de la muestra</b>	<b>Presencia de <i>Legionella</i> spp.</b>
General San Juan Bautista Tuxtepec	Agua	Cisterna no tratada	+
		Cisterna con tratamiento	-
		Grifo	-
	Biopelículas	Nebulizador	+
		Regadera	+
		Aire acondicionado	+
Básico comunitario Loma Bonita	Agua	Cisterna no tratada	+
		Cisterna con tratamiento	+
		Grifo	-
	Biopelículas	Nebulizador	+
		Regadera	-
		Aire acondicionado	+

No se detectó crecimiento de *Legionella* spp. (-).

Presencia de *Legionella* spp. en los cultivos bacterianos (+).

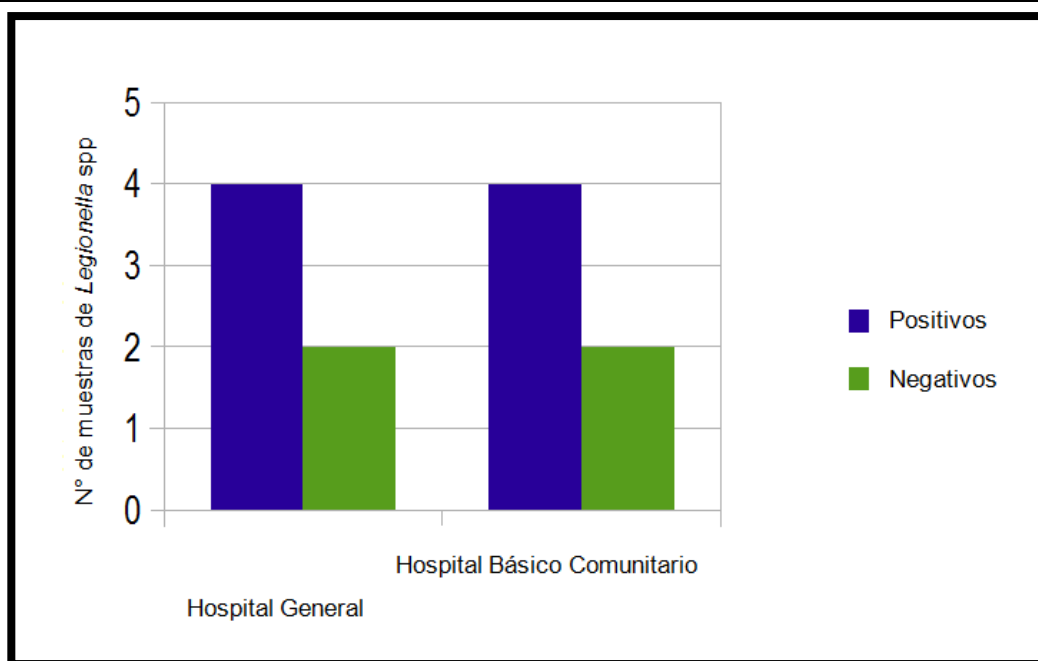


Figura 15. Comparación de las muestras positivas y negativas para *Legionella* spp. en la región Papaloapan de Oaxaca.

La región del Papaloapan mostró un mayor número de muestras positivas para los aislados bacterianos en medio selectivo BCYE, mientras que en la región de Sierra Norte solo se obtuvo un crecimiento positivo para un hospital con tres muestras positivas (Cuadro 8) (Figura 16).

Cuadro 8. Relación de las muestras colectadas con el total de aislados positivos para *Legionella* spp., por cada hospital muestreado, para la región de Sierra Norte en el estado de Oaxaca.

Región: Sierra Norte			
Hospital	Tipo de muestra	Origen de la muestra	Presencia de <i>Legionella</i> spp.
General María Lombardo de Caso	Agua	Cisterna no tratada	-
		Cisterna con tratamiento	-
		Grifo	-
	Biopelículas	Nebulizador	-
		Regadera	-

		Aire acondicionado	-
Básico comunitario Ixtlán de Juárez	Agua	Cisterna no tratada	-
		Cisterna con tratamiento	+
		Grifo	+
	Biopelículas	Nebulizador	-
		Regadera	+
		Aire acondicionado	-

No se detectó crecimiento de *Legionella* spp. (-).

Presencia de *Legionella* spp. en los cultivos bacterianos (+).

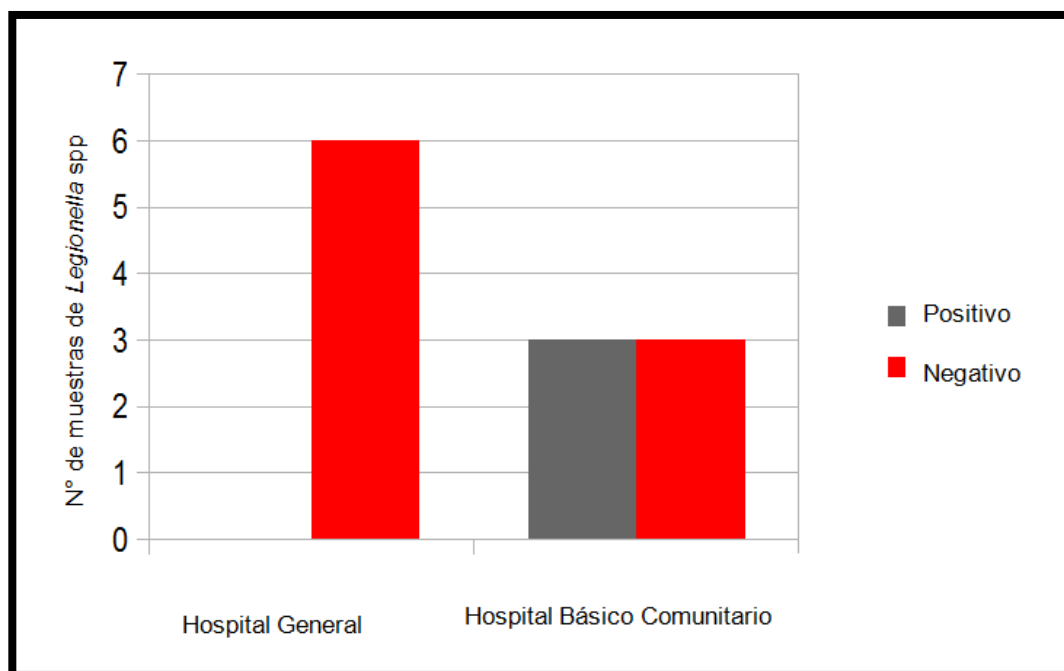


Figura 16. Comparación de las muestras positivas y negativas de *Legionella* spp. en la región de Sierra Norte de Oaxaca.

Se obtuvieron 11 aislados positivos de bacterias para el género *Legionella* que crecieron en

medio BCYE enriquecido con cisteína, lo que representa el 45.8 % del total de las muestras (Fig. 17).

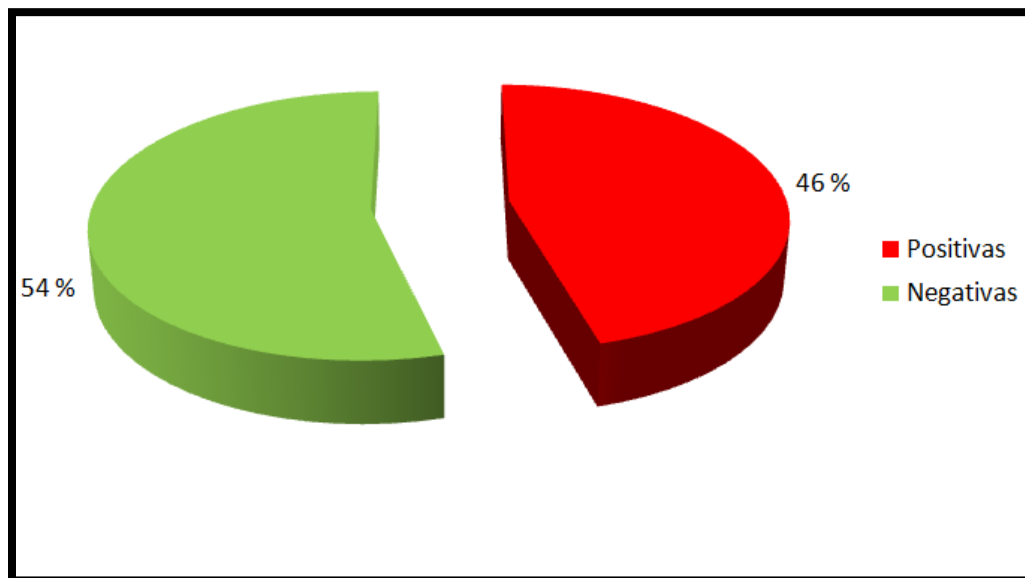


Figura 17. Porcentaje de las muestras totales de los cultivos positivos y negativos para la presencia de *Legionella* spp. obtenidas de las placas BCYE, en las regiones estudiadas.

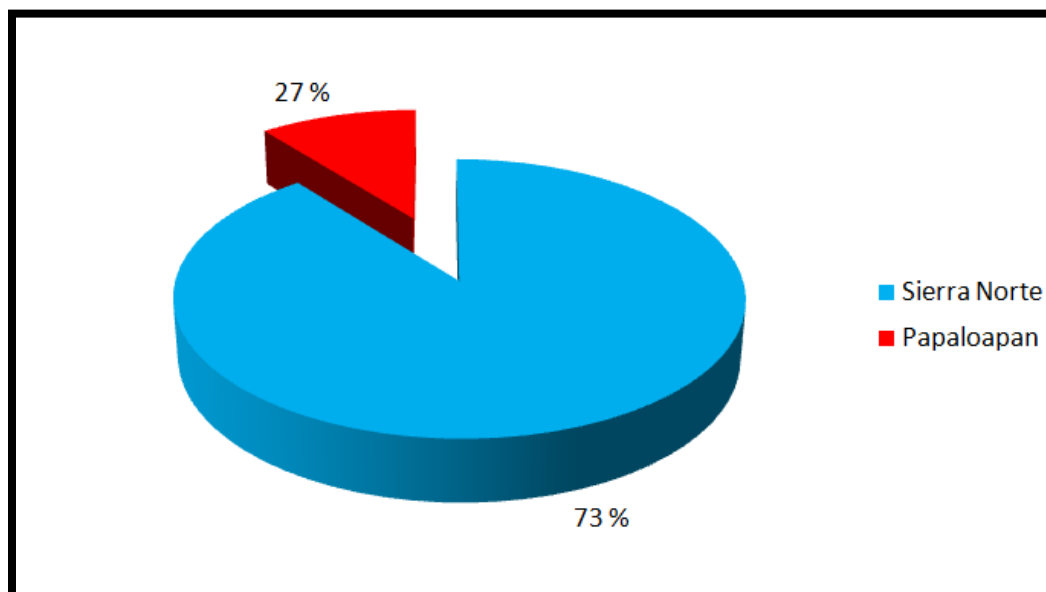


Figura 18. Porcentaje de las muestras de los cultivos positivos con la presencia de *Legionella* spp. obtenidas de las placas BCYE, por región.

La identificación primaria de los aislados bacterianos se determinó por el crecimiento de las colonias bacterianas tomando en cuenta las características morfológicas que los cultivos presentaron en medio selectivo BCYE. Como era de esperarse las primeras colonias mostraron una forma convexa, redondeada y de color blanco aperlado, algunas blanco azulada y otras blanco amarillento (Figura 19), después de 3 a 6 días después de la siembra, siendo estas características específicas del género, tal como lo confirman los manuales del centro de control de enfermedades (CDC) de Atlanta (NCID, 2005; HPA, 2006). Las muestras de agua recolectadas de las cisternas fueron las que presentaron mayor número de cultivos positivos seguido del aire acondicionado y las regaderas.

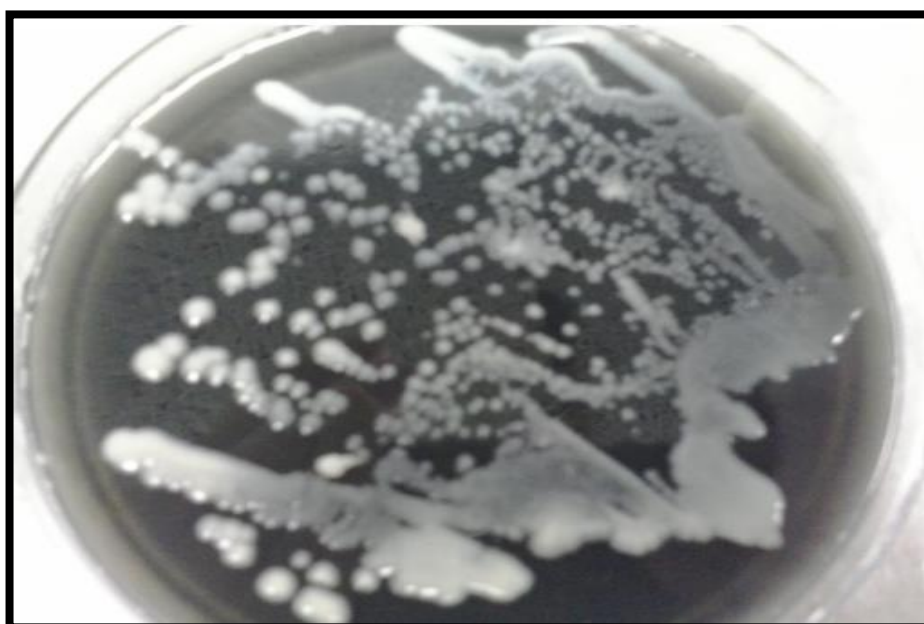


Figura 19. Colonias de *Legionella* spp. en agar BCYE proveniente de la biopelículas de regadera del hospital básico comunitario de Ixtlán de Juárez en la región Sierra Norte del estado de Oaxaca.

Bollin *et al.*, en 1985, recuperaron *L. pneumophila* cuando muestrearon el vapor de agua que salía de las duchas, pero no de cualquier parte de la habitación cuando se colocó a una distancia corta (1 m aproximadamente) de la ducha. La mayoría del aerosol colectado contiene *L. pneumophila*, el 90 % aproximadamente, lo suficiente para poder alcanzar el sistema respiratorio, dichas observaciones explican por qué la ducha es un factor de riesgo en algunos casos de legionelosis nosocomial.

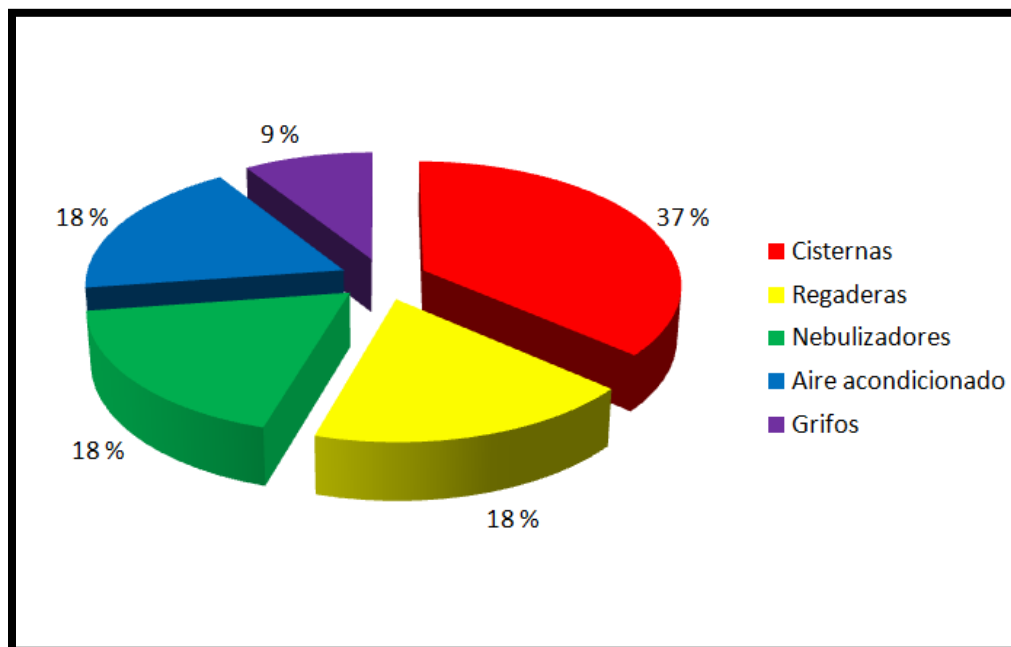


Figura 20. Porcentaje de muestra positivas, para *Legionella pneumophila*, según su origen.

La adquisición de legionelosis nosocomial ha sido relacionada con la inhalación de aerosoles que contienen *L. pneumophila*, originados de las torres de refrigeración, humidificadores, sitios de excavación del suelo, y nebulizadores. Los brotes también han sido reportados en los hospitales, donde *L. pneumophila* fue recuperada de cabezales de ducha y agua potable. La inhalación de aerosoles generados por las duchas o los grifos se supone que es el modo de transmisión en estos brotes (Bollin *et al.*, 1985)

Actualmente se sabe que *Legionella* también puede ocurrir en sistemas de agua potable, particularmente en los hospitales. Las bacterias se han aislado de ducha en los hospitales en los que había habido casos de la enfermedad (Wadowsky *et al.*, 1982).

Plouffe *et al.*, en 1995, describieron que la legionelosis en nosocomios está asociada con la recuperación de *L. pneumophila* desde el agua potable. Para definir mejor el modo de transmisión de estos sitios para el paciente, probaron cabezales de ducha y grifos de agua caliente en las habitaciones de pacientes para aerosolización de *L. pneumophila*, encontrando a la bacteria.

En el presente estudio se obtuvieron aislados positivos, aunque la bacteria no se aisló en todas las muestras de agua, como era de esperarse, debido a que *L. pneumophila* no está omnipresente. Pero al encontrarse en 11 de las 24 muestras totales, se deben de tomar medidas de prevención ante una epidemia por legionelosis. Al estar presente *L. pneumophila* en los hospitales, los más susceptibles a contraer la infección son las personas inmunocomprometidas (Weissenberge *et al.*, 2007).

Un estudio reciente encontrado por Parthuisot *et al.*, 2010, realizado en Francia, analizaron la dinámica espacial y temporal de *Legionella* spp., *L. pneumophila* tiene una mayor prevalencia sobre otras especies del mismo género, un resultado consistente con observaciones similares de otros entornos naturales de aguas termales. *Legionella* spp. coloniza los sistemas de distribución urbanos. Estas bacterias pueden sobrevivir a pesar de las medidas de desinfección y control realizadas. Varios estudios han revelado una alta prevalencia de *L. pneumophila*, también en estos ambientes artificiales, tanto antes como después del tratamiento. Por lo tanto, la investigación de la ecología de *Legionella* spp. es esencial para comprender mejor sus fuentes en el medio natural, el mecanismo de su entrada en los sistemas de agua para el hombre, y los factores que permiten su supervivencia y crecimiento en los hábitats acuáticos.

Recientemente, la atención de las investigaciones hacia la ecología de *L. pneumophila* se ha intensificado de manera significativa. Esto no es sólo porque mejorará nuestra comprensión relativa de sus estrategias de supervivencia en los sistemas antropogénicos, sino también ya que ayudará a desarrollar estrategias de control, mejores y más eficientes para prevenir la aparición de la legionelosis. Aunque microbiólogos están ganando rápidamente una mayor comprensión de los aspectos fundamentales implicados en el ciclo de vida en biopelículas de *L. pneumophila*, muchas preguntas y cuestiones aún siguen sin respuesta (Declerck, 2009)

## 7.2 Parámetros fisicoquímicos

El patógeno puede o no puede estar presente debido a que 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 a tales tensiones tan estresantes y regular la diferenciación celular, para adaptarse

a tales tensiones y luego reactivarse cuando las condiciones ambientales sean favorables para su crecimiento (Ohno *et al.*, 2003).

*Legionella pneumophila* puede soportar temperaturas entre 5-63 °C y multiplicándose entre los 25-45 °C y un pH de entre 5.0-9.2.

### 7.2.1 Temperatura

Las temperaturas registradas en los lugares de muestreo oscilaron entre los 19-27 °C, con un promedio de 24 °C (Figura 21).

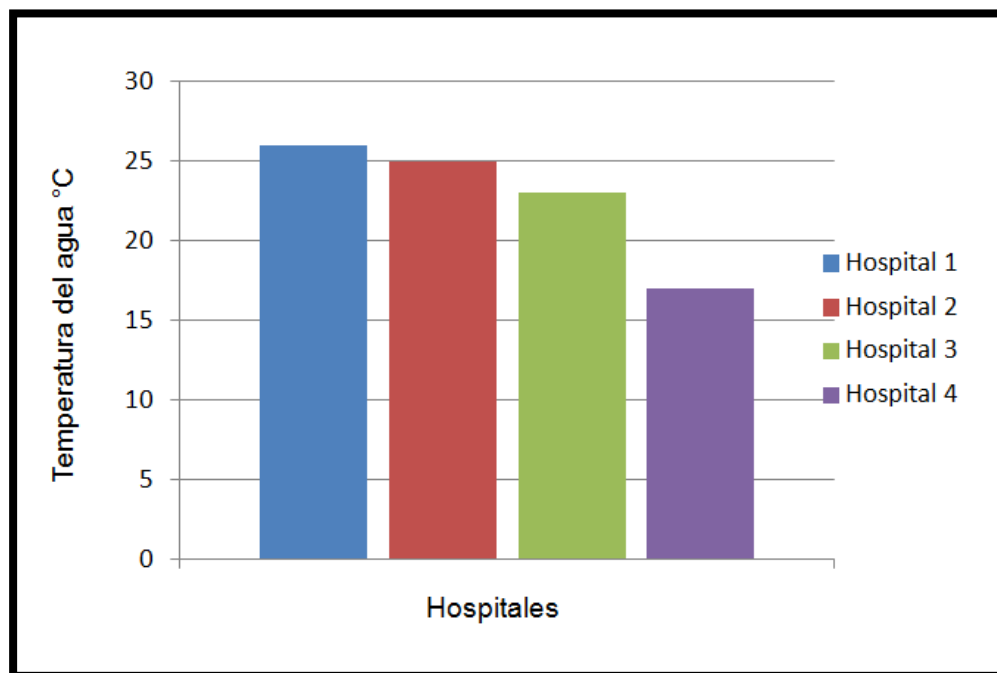


Figura 21. Temperatura del agua en los cuatro diferentes hospitales. Hospital General Juan Bautista (1). Hospital Comunitario Loma Bonita (2). Hospital General María Lombardo (3). Hospital Comunitario de Ixtlán de Juárez (4). en el estado de Oaxaca.

Se sabe que *Legionella* se reproduce fácilmente en sistemas de agua a alta temperatura entre 25-43 °C y puede sobrevivir a temperaturas de hasta 55-60 °C (Newton *et al.*, 2010), como en las torres de refrigeración y cabezales de ducha. Zanette *et al.*, en el 2000, reportaron que no hubo una asociación inversa entre la temperatura del agua y la concentración de *L. pneumophila*. Este estudio mostró que las bacterias pueden estar presentes aun debajo de los 20 °C, puede que se encuentre en concentraciones bajas para ser detectadas (WHO, 2007).



El estado de Oaxaca tiene un clima caluroso, manteniendo un ambiente de entre los 15 a 28 °C, permitiendo que el agua se encuentre a una temperatura idónea para la multiplicación de *Legionella*.

### 7.2.2 pH

Los resultados de pH registrados en los lugares de muestreo oscilan entre de 6.5 a 7.6, con un promedio de 7.1 (Figura 22).

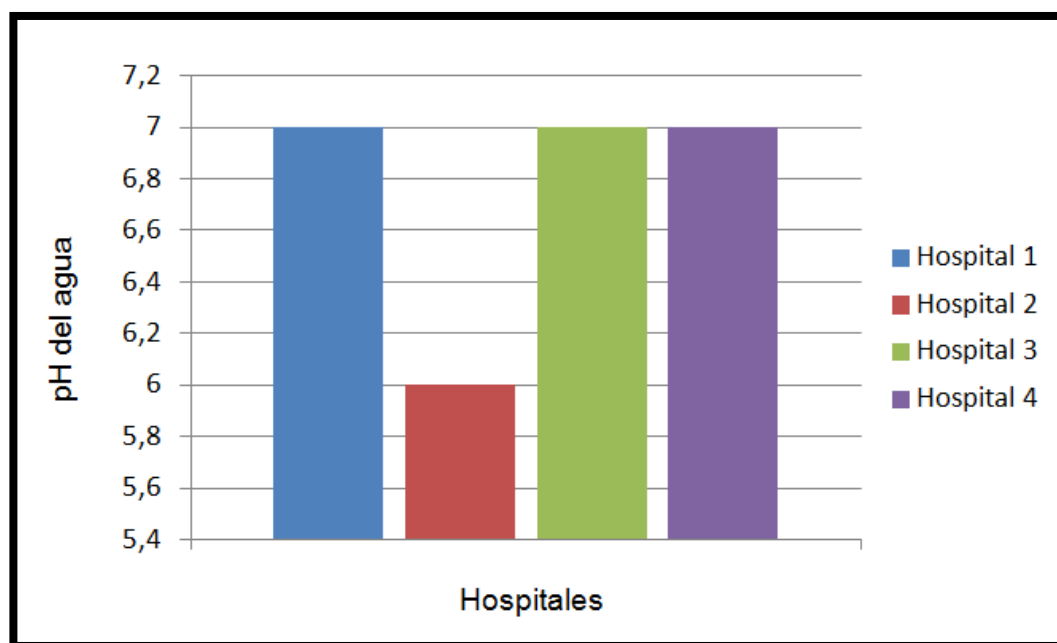


Figura 22. pH del agua en los cuatro diferentes hospitales. Hospital General Juan Bautista (1). Hospital Comunitario Loma Bonita (2). Hospital General María Lombardo (3). Hospital Comunitario de Ixtlán de Juárez (4). en el estado de Oaxaca.

Las bacterias del género *Legionella* están presentes en el agua, tolerando un intervalo de pH de 5-9.2 (Declerck, 2009), aunque también se les considera como ácido-tolerantes, ya que pueden soportar la exposición a pH de 2 durante periodos cortos, siendo aisladas a partir de intervalos de pH de 2.7 a 8.3 (Sheehan *et al.*, 2005).

Katz y Hammel en 1987, demostraron que el pH es un factor importante para la supervivencia de *L. pneumophila* al demostrar una disminución en las células viables después de la incubación durante 1 mes en el agua del grifo con un pH de 4 a 7.

En microcosmos de agua termal ajustados artificialmente de pH 2 a 10, el pH más bajo mató a *L. pneumophila* durante un día de incubación. Una disminución más rápida de cultivabilidad

se detectó tanto a pH 5 y a 10 en comparación con la observada a pH 6 y 8; sin embargo, se mantuvo la actividad metabólica a pH 5. La mejor supervivencia fue evidente en un microcosmos de agua caliente ajustada a pH 8, un hallazgo incompatible con el resultado de Katz y Hammel. Sin embargo, el agua de manantial caliente con un de pH 8, apoyó mejor la supervivencia de *L. pneumophila*.

Este estudio muestra parámetros dentro de los establecidos que la bacteria puede soportar y son óptimos para su crecimiento o bien para su supervivencia, encontrando a *Legionella* en un pH ácido y neutro.

### **7.2.3 Cloro libre residual**

En este estudio, se detectaron niveles de cloro libre residual nulos, es decir de cero. Leoni *et al.*, en 2001, encontraron relación entre los niveles de cloro bajos y la presencia de *Legionella* spp.

Debido a que las lecturas de cloro libre residual fueron de cero, esto nos dice que las cisternas no reciben ningún tratamiento, promoviendo el crecimiento de biopelículas, además de la proliferación de hongos, virus, protozoos y bacterias incluyendo a *Legionella* spp.

En México existen normas (NOM) como la NOM-127-SSA1-1994 donde se refiere a los requerimientos sanitarios para el abastecimiento de agua potable además de la calidad de la misma para su potabilización, en los cuales se establece que debe de haber una lectura de 0.2 a 1.5 mg/L de cloro libre residual.

En dado caso de que las tuberías o depósitos estuvieran en mantenimiento, se permite un nivel de más alto hasta de 1.5 mg/L de cloro libre residual.

La OMS dice que niveles más altos de cloro no son perjudiciales, si el agua es para consumo humano, sin embargo, solo permite hasta 5.0 mg/L de cloro libre residual (OMS, 2009).

---

### 7.3 Detección y secuenciación de *Legionella pneumophila* mediante PCR

Se realizó la extracción de DNA de 11 aislados de las 24 muestras totales recolectadas, esto debido a que solo 11 presentaron crecimiento colonial típico de *Legionella*, y las otras 11 mostraron morfología atípica con consistencia viscosa y colores marrón y amarillento. Las amplificaciones de DNA obtenidos durante el análisis de PCR fueron primeramente analizadas por el gen 16S rDNA que amplificaron un fragmento de 1600 pb.

En todos los análisis de PCR se utilizó un testigo positivo de DNA templado de la cepa *L. pneumophila* ATCC® 33152 y un control negativo de *Virgibacillus* sp.

#### 7.3.1 PCR para gen 16S rDNA

El gen 16S rDNA se utilizó en las 11 aislados positivos dependiendo del crecimiento colonial bacteriano que están presentaron, se utilizaron los primers FD y RD que amplifican el gen 16S rDNA en las 11 muestras, las cuales dieron positivo para determinar el género como lo hacen Sacchi *et al.*, en 2002 los cuales utilizaron el gen 16S rDNA para diferenciar tres diferentes *Bacillus*. El gen 16S rDNA es utilizado como componente molecular importante de la pequeña subunidad ribosomal de procariotas. En este trabajo se utilizó para identificar la presencia de *Legionella*, como lo hace al igual Yong *et al.*, en 2010, siendo el 100 % de las muestras positivas para este gen (Figura 23).

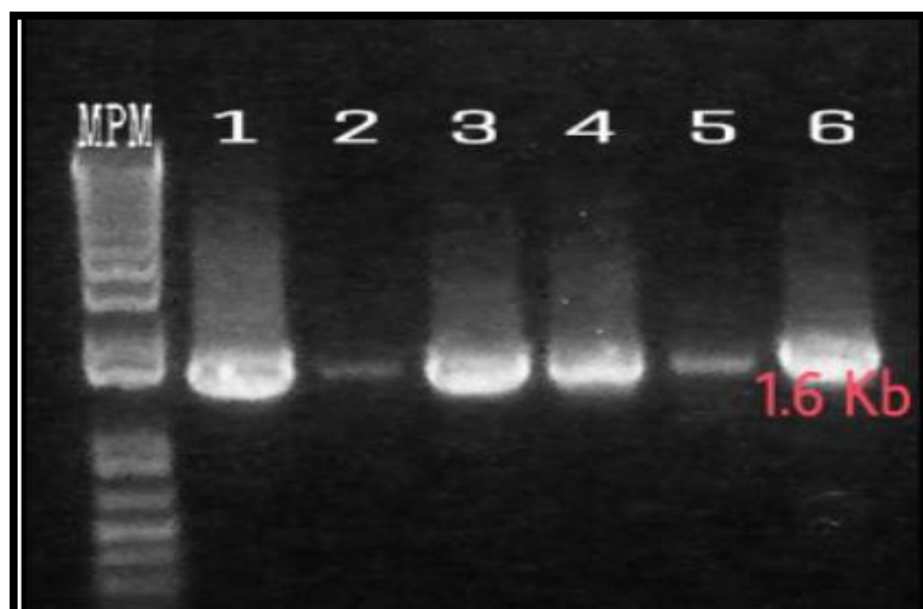


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. (100 V, 25 min). Con los primers FD y RD 16S rDNA. Marcador de pesos molecular 1Kb (carril MPM). Muestra de cisterna sin tratamiento (carril 1). Muestra de cisterna con tratamiento (carril 2). Muestra de la biopelículas de aire acondicionado (carril 3). Muestra de biopelículas de nebulizador (carril 4). Muestra de la bacteria *Legionella pneumophila* ATCC (carril 5). Control negativo muestra de *Virgibacillus* sp. (carril 6).

### 7.3.2 PCR para gen 16S rDNA

Debido a que las 11 muestras salieron positivas para 16S rDNA, estas después fueron analizadas por PCR para confirmar la presencia para el gen de patogenicidad mip, para *L. pneumophila*, utilizando los primer Lmip920 y Lmip1548 (Bej *et al.*, 1991) en un fragmento de 650 pb, a partir de este fragmento de DNA, 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 pb, mientras que las secuencias Lmip1021 y Lmip1392 (Bernarder *et al.*, 1997) producen bandas de DNA de 403 pb (Figura 24).



Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. (100 V, 25 min). Marcador de peso molecular 1Kb (carril MPM). Carril 1-6 PCR anidado, producto esperado de 471 pb (Pascual *et al*, 2001). Carril 7-12 producto esperado de 403 pb (Bernarder *et al*, 1997). Agua de cisterna (carril 1); agua de cisterna (carril 2); biopelícula (carril 3); agua de cisterna (carril 4); control positivo (carril 5); control negativo (carril 6); agua de cisterna (carril 7); agua de cisterna (carril 8); biopelícula (carril 9); agua de cisterna (carril 10); control positivo (carril 11); control negativo (carril 12).

Se obtuvieron seis muestras positivas (54 %) del gen mip, para *L. pneumophila*, de los 11 aislados positivos que resultaron del gen 16S rDNA, que es el 25 % de las 24 muestras totales de agua obtenidas en un inicio de los ambientes hídricos intrahospitalarios.

Las muestras positivas fueron limpiadas y se mandaron a secuenciar, al laboratorio de bioquímica molecular en la UBIPRO en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Para el presente estudio las secuencias de primers diseñados por Bernarder *et al.*, en 1997 y Pascual en 2001, fueron las que otorgaron mayor información para la identificación de *L. pneumophila* a partir de los aislados bacterianos, confirmando la gran utilidad de los primers para hacer la identificación de *L. pneumophila*.

#### 7.4 Secuenciación de *Legionella pneumophila*

Las cepas obtenidas fueron tipificadas, correspondientes a cepas ambientales y cepa control, dentro de las cepas de control se utilizaron cepas de referencia de *L. pneumophila* ATCC® 33152.

Para los productos obtenidos por la PCR se estableció su secuencia, misma que se depositó en el Genbank con el número de acceso KY205714, KY205715, KY205716, de muestras procedentes de las regiones de Sierra Norte y Papaloapan, en el estado de Oaxaca (Cuadro 9).

Cuadro 9. Esquema de tipificación del gen mip para *Legionella pneumophila*.

Numero de acceso	Secuencia	Similitud con <i>Legionella pneumophila</i> .	Bases
KY205714	ttaaaaatcaaggcatagatgtaatccggaagcaatggctaag gcatgcaagacgctatgagtggcgctcaattggcttaaccgaac agcaaatgaaagacgttctaacaagtttcagaaagattgatggc taagcgtactgctgaattcaataagaaagcggatgaaaataaagt aaaaggggaagccttttaactgaaaacaaaaacaagccaggc gttgtgtattgccaagtggttgcaatacaaagtaatcaattctgga aatgggttaaacccggaaaatcggatacagtcactgtcgaatat actggtcgtctgattgatggtaccgttttgacagtaccgaaaaaact ggtaagcc	100 %	373

KY205715	ttaaaaatcaaggcatagatgtaaatccggaagcaatggctaaag gcatgcaagacgctatgagtggcgctcaattggcttaaccgaac agcaaatgaaagacgttctaacaagtttcagaaagattgatggc aaagcgctactgctgaattcaataagaaagcggatgaaaataaag taaaaggggaagccttttaactgaaaacaaaaacaagccagg cgttgtgtattgccaagtggttgcaatacaaagtaatcaattctgg aatgggtgtaaacccggaaaatcggatacagtcactgtcgaata tactggctgctgattgatggtaccgttttgacagtaccgaaaaaac tggaagccagcaacgttccagg	100 %	387
KY205716	aagacgttctaacaagttcagaaagattgatggcaaagcgtac tgctgaattcaatagaaagcggatgaaaataaagtaaaagggg aagccttttaactgaaaacaaaaacaagccaggcgttgtgtatt gccaagtggttgcaatacaaagtaatcaattctggaaatgggtgta aacccggaaaatcggatacagtcactgtcgaatatactggctgct gattgatggtaccgttttgacagtaccgaaaaaactggaagcca gcaacgttccaggtttcacaagttatccctggatggacagaagcttt gcaattgatgccagctggatcaactt	100 %	348

La comparación de las secuencias obtenidas de los aislados de *L. pneumophila*, con las disponibles en el GenBank, confirmaron la identidad de esta bacteria por mostrar una similitud del 100 % con aislados de la misma bacteria (NCBI, 2017).

## 8. CONCLUSIONES

Se aislaron bacterias del género *Legionella* spp., a partir de diversas fuentes de agua y de biopelículas provenientes de cisternas tratadas con cloro y sin tratamiento, así como nebulizadores, grifos de regaderas y aire acondicionado, en tres hospitales del estado de Oaxaca, en la región del Papaloapan fue en un hospital general y en un hospital básico comunitario, y en la región de Sierra Norte fue solo en el hospital básico comunitario.

Mediante la técnica de cultivo en medio BCYE género específico se detectó la presencia de *Legionella* spp. identificando las características de morfología colonial, color y tamaño que coinciden con aquellas pertenecientes al género buscado.

Se confirmó la identidad de *Legionella* spp. por PCR punto final con los primers FD/RD que codifican el gen 16S rDNA, también se confirmó la especie *L. pneumophila* por medio de un PCR anidado utilizando los primers Lmip976/Lmip1427 y Lmip1021/mip1392 que codifican el gen mip.

Se observó que los parámetros fisicoquímicos medidos en el sitio de muestreo, eran condiciones ideales para la bacteria al estar entre los intervalos apropiados para la multiplicación de *L. pneumophila*, según lo reportado.

De 24 muestras totales obtenidas de diversas fuentes de agua y biopelículas, 11 aislados fueron positivos en agar BCYE, conforme a su crecimiento colonial bacteriano, de los cuales se obtuvieron amplicones con primers específicos para las regiones correspondientes al gen 16S rDNA del tamaño esperado, al igual que del gen mip, del cual solo hubo una correspondencia de seis muestras, para *L. pneumophila*. La similitud de las seis secuencias obtenidas para *L. pneumophila* corroboran la presencia de la bacteria.

La presencia de la *L. pneumophila* sugiere un riesgo potencial para los pacientes en los hospitales especialmente aquellos debilitados, como las personas inmunocomprometidas, por lo que *Legionella* debe ser monitoreada, al igual que se deben implementar medidas para mejorar las condiciones en los sistemas de agua intrahospitalarios de las regiones de Papaloapan y Sierra Norte del estado de Oaxaca.



---

## 9. PERSPECTIVAS

Las cisternas, las torres de refrigeración, los grifos de regaderas y de lavamanos deben ser drenadas y limpiadas de forma periódica debido a que se forman biopelículas donde se encuentran microorganismos patógenos para el humano, debemos eliminar la biopelículas formadas por el paso del tiempo. Son eficaces las medidas de descontaminación por métodos como la cloración o el sobrecalentamiento de los abastecimientos. Los aparatos de nebulización no se deben llenar con agua corriente de la llave.

De acuerdo a la norma mexicana 127 (NOM-127-SSA1-1994) de “salud ambiental, agua para uso y consumo humano, límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización” el agua debe de clorarse en caso de contener alguna bacteria, helmintos, protozoarios y virus o usar componentes con cloro, yodo, ozono, luz ultravioleta, plata, sin exceder los niveles permisibles de 0.2- 1.5mg/L de cloro libre residual.

Al igual que las instalaciones de agua potable deben monitorearse por lo menos una vez al año, según la norma mexicana 179 (NOM-179-SSA1-1998) de “Vigilancia y evaluación del control de calidad del agua para uso y consumo humano, distribuida por sistemas de abastecimiento público”. Y de acuerdo a la norma mexicana 230 (NOM-230-SSA1-2002) de “Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua” los sistemas de distribución deben llevar una bitácora en la cual se especifique los análisis a los que fue sometida, los resultados, los mantenimientos realizados, entre otros.

Se recomienda hacer más estudios de identificación de *Legionella* spp. y *L. pneumophila*, así como estudios para su correcto diagnóstico, así como su oportuna divulgación para iniciar los procesos de desinfección o control para evitar brotes epidémicos. Al igual que la capacitación del personal de limpieza dentro de los hospitales y del personal médico.

Se sugiere investigar la presencia de estas bacterias como endosimbionte de amibas de vida libre y de sus estructuras de resistencia como quistes amebianos mediante técnicas de microscopía electrónica, con la finalidad de observar la relación simbiótica que mantienen los microorganismos y los factores de virulencia que se activan con dicha simbiosis.

En estudios anteriores realizados en los mismos hospitales muestreados en el presente estudio, se detectaron la presencia de amibas de vida libre (AVL), reportadas por la literatura y su estrecha relación con *Legionella*, además de microorganismos esenciales para la multiplicación y supervivencia de la bacteria nos permite suponer como *Legionella* fue encontrada dentro de los ambientes intrahospitalarios y nos daría la oportunidad de seguir en el estudio ahora como organismos endosimbiontes.

Aunque *Legionella* es habitante común del sistema de agua potable, raramente causa enfermedad ya que se deben reunir situaciones específicas para contraerla, como edad avanzada, problemas respiratorios como neumonías y pacientes inmunocomprometidos. Estudios prospectivos han encontrado a esta bacteria hasta en el 60 % de los edificios, pero sin casos de la enfermedad (Fields, 2008).

Se sugiere ampliar este tema de investigación para que este grupo de microorganismos sean considerados por el Sector Salud, debido a que en México no hay estudios reportados por lo que en nuestro país el diagnóstico de patologías de etiología es desconocido.

En relación a lo anterior, el trabajo es pionero en la detección e identificación de *L. pneumophila* en muestras intrahospitalarias en México

---

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguinaldo, J. 2015. *Biofilm Research*. Public Health. St. George's University. Disponible en: [mph.sgu.edu/mphblog/2015/04/27/687/](http://mph.sgu.edu/mphblog/2015/04/27/687/) Consultado en: abril de 2017.
- Anbumani, S., Gururajkumar, A. y Chaudhury, A. 2010. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical and environmental sources in a tertiary care hospital. *Ind. J. Med* 131: 761-764
- Arvand, M., Jungkind, K. y Hack, A. 2011. Contamination of the cold water distribution system of health care facilities by *Legionella pneumophila*: Do we know the true dimension? *Euro Surveill.* 16 (16): 1-6.
- Atlas, R. M. 1999. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ. Microbiol.* 1: 283-293.
- Barbaree, J. M., Gorman, G. W., Martin, W. T., Fields, B. S. y Morrill, W. E. 1987. Protocol for sampling environmental sites for *Legionellae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (7): 1454-1458
- Bej, K. A., Mahbubani, H. M. y Atlas, M. R. 1991. Detection of viable *Legionella pneumophila* en water by Polymerase Chain Reaction and gene probe methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (2): 597-600.
- Bernader, S., Hanson, H. S., Johansson, B. y Von Stedingk, L. V. 1997. Nested polymerase chain reaction for detection of *Legionella pneumophila* in clinical specimens. *Clin. Microbiol. Infect.* 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 279-286
- Blackmon, J. A., Chandler, F. W., Cherry, W. B., England III, A. C., Feeley, J. C., Hicklin, M. D., McKinney, R. M. y Wilkinson, H. W. 1981. Legionellosis. *AJP.* 103 (3): 429-459.
- Bollin, G. E., Plouffe, J. F., Para, M. F. y Hackman, B. 1985. Aerosols Containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (5): 1128-1131.

- Boulanger, C. A. y Edelstein, P. H. 1995. Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (5): 1805-1809.
- Brosius, J., Palmer, M. L., Kenedy, P. J. y Noller, H. F. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Biochem.* 75 (10): 4801-4805.
- Castro, D. K. 2016. *Detección de Amibas de Vida Libre Aisladas de Hospitales Regionales de la Sierra Norte y los Valles Centrales del estado de Oaxaca*. Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM. FESI. 78 pp.
- Center of Disease Control and Prevention (CDC). 2005. *Procedures for the Recovery of Legionella from the Environment*. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Atlanta, GA 30333. 15 pp
- Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI) [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (US), Centro Nacional de Información Biotecnológica; [1988] - [citado 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Chidiac, C., Che, D., Pires-Cronenberger, S., Jarraud, S., Campe`se C., Bissery, A., Weinbreck, P., Brun-Buisson, C., Sollet, J-P., Ecochard, R., Desenclos, J-C., Etienne, J., y Vanhems, P. 2012. Factors associated with hospital mortality in community acquired legionellosis in France. *Eur. Res. J.* 30: (4) 963-970.
- Cianciotto, N. P. 2013. Type II secretion and *Legionella* virulence. *Curr. Top. Microbiol. Immun.* 376: 81-102.
- Cianciotto, N. P., Einssenetein, B. I., Mody, C. H. y Engleberg, N. C. 1990. A mutation in the MIP gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. *J. Infect. Dis.* 162: 121-126.
- Cianciotto, N. P., Eisenstein, B. I., Mody, C. H., Toews, G. B. y Engleberg, N. C. 1989. A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect. Immun.* 57: 1255-1262.
- Cianciotto, N. P., Kwai, 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, Am. Soc. Microbiol. Washington D. C. 565 pp.

- Cianciotto, N.P. 2005. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends. Microbiol.* 13:581–588.
- Colbourne, J. S., Trew, R. M. y Dennis, P. J. 1988. Treatment of water for aquatic bacterial growth studies. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 79-85.
- Compañ, D. G., Zuñiga, I. R., Lozano, J. C. y Ávila, J. I. 2011. Legionelosis, una enfermedad olvidada en México. *Rev. Enf. Infec. Pediatría.* 39-42.
- Conover, G. M., Martínez-Morales, F., Heidtman, M. I., Luo, Z. Q., Tang, M., Chen, C., Geiger, O. y Isberg, R. R. 2008. Phosphatidylcholine synthesis is required for optimal function of *Legionella pneumophila* virulence determinants. *Cell. Microbiol.* 10: 514–528.
- Costa, J., da Costa, M. S. y Veríssimo, A. 2010. Colonization of a therapeutic spa with *Legionella* spp: a public health issue. *Res. Microbiol.* 161: 18-25.
- Declerck, P. 2010. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 12(3): 557-566.
- Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V. y Ollevier, F. 2007. Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Wat. Res.* 41: 3159-3167.
- Declerck, P. 2009. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol. Minireview.* 1-10.
- Delgado-Viscogliosi, P., Simonart, T., Parent, V., Marchand, G., Dobbelaere, M., Pierlot, E., Pierzo, V., Menard-Szczebara, F., Gaudard-Ferveur, E., Delabre, K. y Delattre, J. M. 2005. Rapid method for enumeration of viable *Legionella pneumophila* and other *Legionella* spp. in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (7): 4086-4096.
- Desvaux, M., Hebraud, M., Talon, R. y Henderson, I. R. 2009. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends. Microbiol.* 17:139–145.

- Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B. C., Hacker, J. y Steinert, M. 2001. Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Am. Soc. Microbiol.* 69 (4): 2116-2122.
- Dirección General de Epidemiología (DGE), 2017. Informe semanal de vigilancia epidemiológica. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/259188/IRA\\_2017\\_SE37.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/259188/IRA_2017_SE37.pdf). Consultado el: agosto 2017
- Donlan, R. M. y Costerton, J. W. 2002 Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167-193.
- Edelstein, P. H. 1993. Legionnaire's disease. *Clin. Infect. Dis.* 16: 741-749.
- Edelstein, P. H. 1995. Antimicrobial chemotherapy for legionnaires' disease: a review. *Clin. Infect. Dis.* 21(3): 265-276.
- Edelstein, P. H., Meyer, R. D. y Finegold, S. M. 1980. Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease. *Am. Rev. Resp. Dis.* 121: 317-327.
- Ellis, T. N., y Kuehn, M. J. 2010. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74: 81-94.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1999. *Legionella: Human Health Criteria Document. Office of Science and Technology, Office of Water, Washington, DC 20460.* 123 pp.
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Legionnaires' Disease in Europe*, 2013. Estocolmo: ECDC; 2015.
- Fields B. S. 2008. *Legionella* in the environmental. En: Hoffman, P., H. Friedman y M. Bendinelli. 2008. *Legionella pneumophila: Path. Immun.* Springer-Verlag USA. 208 pp.
- Fields, B. S., Benson, R. F. y Besser, R. E. 2002. *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (3): 506-526.
- Fields, B.S. 1996. The molecular ecology of legionellae. *Trends. Microbiol.* 4: 286- 290.
- Forbes, B. A., y Sham, D. F., 2009. *Diagnostico Microbiológico de Bailey y Scott* 12a ed. Medicina Panamericana. Buenos Aires. 424-428.

- Formica, N., Yates, M., Beers, M., Carnie, J., Hogg, G., Ryan, N. y Tall, G. 2001. The impact of diagnosis by legionella urinary antigen test on the epidemiology and outcomes of legionnaires' disease. *Epidemiol. Infect.* 127: 275–280.
- Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W., Parking, W. E., Beecham, H. J., Sharrar, R. J., Harris, J., Mallison, G. F., Martin, S. M., McDade, J. E., Shepard, C. C. y Brachman, P. S. 1977. Legionnaire's disease: description of an epidemic of pneumonia. *New. Engl. J. Med.* 297: 1189-1197.
- Galka, F., Wai, S. N., Kusch, H., Engelmann, S., Hecker, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Uhlin, B. E. y Steinert, M. 2008. Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. *Infect. Immun.* 76: 1825–1836.
- Gallegos, N. E. M. 1997. *Amibas de Vida Libre Potencialmente Patógenas en Cuerpos de Agua de Uso Recreativo en el Estado de San Luis Potosí*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Facultad en Ciencias, UNAM. México. 132 pp
- 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.
- Ghotaslou, R., Sefidan, F. Y., Akhi, M. T., Soroush, M. H. y Hejazi, M. S. 2013. Detection of *Legionella* contamination in Tabriz hospitals by PCR assay. *Adv. Pha. Bul.* 3 (1): 131-134.
- Hernández, A. 1999. Notas Técnicas de Prevención 538. Legionelosis: Medidas de Prevención y Control en Instalaciones de Suministro de Agua. Disponible en: [www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/501a600/ntp\\_538](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/501a600/ntp_538). Consultado en agosto de 2016.
- Herrera, J. M., Cruz, A. y Uribe, A. 1998. *Identificación y Aislamiento de Posibles Legionella spp. como Bacterias Endosimbiontes de Amebas de Vida Libre*. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Minireview. 1-11
- Hindahl, M. S. y Iglewski, B. H. 1984. Isolation and characterization of the *Legionella pneumophila* outer membrane. *J. Bacteriol.* 159: 107-113.

- Howitz, M. A. y Silverstein, S. C. 1980. Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. *J. Clin. Invest.* 66: 441-450.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) "Dr. Manuel Martínez Báez". 2015. Lineamientos para la Vigilancia Epidemiológica de las Infecciones Respiratorias Agudas Graves e Invasivas Causadas por *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*. 1ª ed. México. 104 pp.
- Instituto de Órganos Históricos de Oaxaca (IOHIO), 2017. Disponible en: [iohio.org.mx/esp/mapas.html](http://iohio.org.mx/esp/mapas.html). Consultado en: febrero 2017.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2000. Disponible en: [www.oaxaca.gob.mx/wp-content/uploads/2015/12/IEFyS\\_Marco\\_Geografico.pdf](http://www.oaxaca.gob.mx/wp-content/uploads/2015/12/IEFyS_Marco_Geografico.pdf). Consultado en: Julio de 2016.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2012. Disponible en: [www.oaxaca.gob.mx/wp-content/uploads/2015/12/IEFyS\\_Marco\\_Geografico.pdf](http://www.oaxaca.gob.mx/wp-content/uploads/2015/12/IEFyS_Marco_Geografico.pdf). Consultado en: Julio de 2016.
- Integrated Taxonomic Information System (ITIS). 2016. Disponible en: <http://www.itis.gov>; consultada en: 1 de febrero de 2016.
- Isberg, R. R., O'Connor, T. J. y Heidman, M. 2009. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 13-24.
- Jawetz, E., Melnick, J. L. y Adelberg, E. A. 2010. *Microbiología Médica*. 25 ed.; McGraw Hill; México D.F. 588 pp.
- Katz, S. M., y Hammel, J. M. 1987. The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 17: 150–156.
- Korotkov, K. V., Sandkvist, M. y Hol, W. G. 2012. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 336–351.
- Lau, H. Y. y Ashbolt, N. J. 2009. The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *J. Appl. Microbiol.* 107: 368-378.



- Leoni, E., Legnani, P. P., Bucci Sabattini, M. A. y Righi, F. 2001. Prevalence of *Legionella* spp. in swimming pool environment. *Wat. Res.* 35 (15): 3749-3753.
- Mandell, G. L., Benett, J. E. y Dolin, R. 2005. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Vol 2, 6a ed. Philadelphia: Elsevier. 3904 pp.
- Marín, V. I. y Montes, L. D. 1991. Neumonía por *Legionella pneumophila*. Informe de un caso. *Inv. Med. Int.* 17 (4): 205-209.
- Marrie T. J., Haldane, D., MacDonald, S., Clarke, K., Fanning, C., Le Fort-Jost, S., Benzanson, G. y Joly, J. 1991. Control of endemic nosocomial Legionnaires' disease by using sterile potable water for high risk patients. *Epidemiol. Infect.* 107:591-605.
- Marston B. J., Lipman, H. B. y Breiman, R. F. 1994. Surveillance for Legionnaires' disease: risk factors for morbidity and mortality. *Arch. Intern. Med.* 154: 2417-2422.
- Mashiva, K., Hamamoto, T. y Torikai, K. 1993. A case of Legionnaires' disease due to aspiration of hot spring water and isolation of *Legionella pneumophila* from hot spring water. *Kansenshogaku Zasshi.* 67 (2): 163-166
- McDade, J. E., Shepard, C. C., Fraser, D. W., Tsai, T. R., Redus, M. A. y Dowdle, W. R. 1977. Legionnaires disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *New. Engl. J. Med.* 297: 1197-1203.
- Mellado, A. 1998. Géneros *Brucella*, *Legionella* y *Pasteurella*. **En:** Jawetz, E., Melnick J. L. y Adelberg, E. A. 2010. *Microbiología Médica*. 25 ed.; Mc Graw Hill; México D.F; 588 pp.
- Miyamoto, H., Yamamoto, H., Arima, K., Fujii, J., Maruta, K., Izu, K., Shiomori, T. y Yoshida, S. 1997. Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *Legionellae* in hospital cooling tower water. *Ame. Soc. Microbiol.* 63(7): 2489-2494.
- 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: Path. Immun.* Springer. New York. 208 pp.
- Muder, R. R. y Yu, V. L. 2002. Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. *Clin. Infect. Dis.* 35: 990-998.
- Murdoch, D. R. 2003. Diagnosis of *Legionella* infection. *Clin. Infect. Dis.* 36: 64-9.

- Newton, H. J., Ang, D. K., van Driel, I. R. y Hartland, E. L. 2010. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin. Microbiol. Rev.* 23 (2): 274-98.
- NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. (Modificación del año 2000). 1999. Diario Oficial de la Federación. México. 16 de diciembre de 1999.
- NOM-179-SSA1-1998, Vigilancia y evaluación del control de calidad del agua para uso y consumo humano, distribuida por sistemas de abastecimiento público. 2001. Diario Oficial de la Federación. México. 24 de septiembre de 2001.
- NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo. 2003. Diario Oficial de la Federación. México. 1 de agosto de 2003.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (5): 2540-2547.
- Organización Mundial de la Salud. 2009. *Medición del cloro residual en el agua. Guía técnica N° 11*. Disponible en: <http://www.disaster-info.net/Agua/pdf/11-CloroResidual.pdf>. Consultada en: febrero de 2017.
- Palencia, S. B. 2010. *Desarrollo, Optimización y Evaluación de Nuevos Métodos Inmunológicos y Moleculares en el Diagnóstico de las Infecciones Causadas por Legionella pneumophila*. Tesis de Doctorado en Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona. 192 pp.
- Palmeri, O. J. 2001. *Enfermedades Infecciosas*. Mc Graw-Hill Interamericana. 293-295 pp.
- Palusinska-Szys, M. y Cendrowska-Pinkosz, M. 2009. Pathogenicity of the family *Legionellaceae*. *Inmun.* 57: 279-290.

- Parthuisont, N., West, N. J., Lebaron, P. y Baudart, J. 2010. High diversity and abundance of *Legionella* spp. in a pristine river and the impact of seasonal and anthropogenic effects. *Appl. Environ. Microbiol.* 10: 1-35.
- 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. *Can. J. Microbiol.* 47: 341–347.
- Pedro-Botet, M. L., Mateu, L., Sopena, N., Roure, S., Casas, I., García-Nuñez, M., Rey-Joly, C., y Sabriá, M. 2006. Hospital and community-acquired *Legionella pneumophila*: two faces of the same disease? *En: 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. (eds.). Legionella: State of the Art 30 Years After its Recognition. Am. Soc. Microbiol. 2 ed. Washington D. C. 565 pp.*
- 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*. *J. Clin. Microbiol.* 9: 615-626.
- Plouffe, J. F., Jr. File, T. M, Breiman, R. F., Hackman, B. A., Martson, S. J. y Fields, B. S. 1995. Reevaluation of the definition of Legionnaires' disease: use of the urinary antigen assay. Community based pneumonia incidence study group. *Clin. Infect. Dis.* 20 (5): 1286-1291
- Prakash, B., Veeregowda, B. M. y Krishnappa, G. 2003. Biofilms: A survival strategy of bacteria. *J. Cur. Sci.* 85: 9-10.
- Rodgers, F. G., Greaves, P. W., Macrae, A. D. y Lewis., M. J. 1980. Electron microscopic evidence of flagella and pili on *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Pathol.* 33: 1184-1188.
- Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V. y Keevil, C. W. 1994. Influence of plumbing materials on biofilms formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1842-1851.
- Rowbotham, T. J. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* 33: 1179-1183.
- Ruiz A. V. y Moreno, G. S. 2005. *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Médica Panamericana. Madrid. 1628 pp.

- Sabriá, L. M. 2002. Legionelosis: pasado, presente y futuro. *Med. Clin.* 119 (2): 4-8.
- Sacchi, C. T., Whitney, A. M., Mayer, L. W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weyant, R. S. y Popovic, T. 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (10): 1117-1123.
- Salleras, S. L. 2002. La legionelosis: un problema de salud pública emergente. *Medicina Clínica.* 119(2): 1-3
- Sapián, L. L. 2006. La enfermedad de los legionarios. *Rev. Lat. Am. Microbiol.* 48 (2): 146-153.
- Saravolatz, L. D., Russell, G. y Cvitkovich, D. 1981. Direct inmunofluorescencia in the diagnosis of Legionnaires' disease. *Clin. Investigation.* 79(5): 566-70.
- Sheehan, K. B., Henson, J. M. y Ferris, M. J. 2005. *Legionella* species diversity in an acidic biofilms community in Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (1): 507-511.
- Shevchuk, O., Jäger, J. y Steinert, M. 2011. Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope. *Front. Microbiol. Rev.* 74 (2): 1-12.
- Sopena, N., Force, L., Pedro-Botet, M.L., Barrufet, P., Sauca, G., García-Núñez, M., Tolchinsky, G., Capdevila, J. A. y Sabria, M. 2007. Sporadic and epidemic community legionellosis: two faces of the same illness. *Eur. Res. J.* 29: 138–142.
- Steinert, M., Hentschel, U. y Hacker, J. 2002. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS. Microbiol. Rev.* 26 (2): 149-162.
- Storey, M. V., Winiiecka-Krusnell, J., Ashbolt, N. J. y Stenstorm, T. A. 2004. The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant Acanthamoebae and *Legionellae*. *Scand. J. Infect. Dis.* 36: 656-662.
- Thanassi, D. G., Bliska, J. B. y Christie, P. J. 2012. *FEMS. Microbiol. Rev.* 36: 1046–1082.
- Ulloa, M. T. 2008. *Legionella pneumophila*. *Rev. Chil. Infect.* 2 (3): 208.
- Villaseñor, I. R. y Sapián, L. A. 2004. La enfermedad de los legionarios. *B. Epidemiol.* 8 (22): 1-3.

- Vincent, C., Cheol, K. J., Sexton, J., Buford, E. y P. Vogel, J. 2006. El sistema de secreción de tipo IV de Dot / Icm de *Legionella pneumophila*. En: Cianciotto N, Kwaik, Y, Edelstein P, Campos B, Geary D, Harrison T, Joseph C, Ratcliff R, Stout J, y Swanson M (eds.). *Legionella*. ASM Press, Washington, DC. 184-191 p.
- Wadowsky R. M., Yee, R. B., Mezmar, L., Wing, E. J. y Dowling, J. N. 1982. Hot water Systems as Sources of *Legionella pneumophila* in Hospital and Nonhospital Plumbing Fixtures. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (5): 1104-1110.
- Watnick, P. y Kolter, R. 2000. Biofilms, city of microbes. *J. Bacteriol.* 182: 2675-2679.
- Weissenberger, C. A., Cazalet, C. y Buchrieser, C. 2007. *Legionella pneumophila*- a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell. Mol. Life. Sci.* 64: 432-448.
- Wingender, J. y Flemming, H. C. 2011. Biofilms in drinking water and their roles as reservoir for pathogens. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 214: 417-423.
- World Health Organization (WHO). 2007. *Legionella and prevention of legionellosis*. Geneva: 252 pp.
- World Health Organization (WHO). 2007. *Legionella and the prevention of legionellosis*. Switzerland: 258 pp
- Yong, S. F. Y., 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. *Fron. Mic.* (1): 1-5
- Zanette, F., Stampi, S., De Luca, G., Fateh- Moghadam, P., Antonietta, M., Sabattini, B. y Checchi, L. 2000. Water characteristics associated with occurrence of *Legionella pneumophila* in dental units. *Eur. J. Sci.* 108 (1): 22-28.
- 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. *Am. Society. Microbiol.* 70 (7): 1657-1663.
- Zuravleff, J. J., Yu, V. L., Shonnard, J. W., Davis, B. K. y Rihs, J. D. 1983. Diagnosis of Legionnaires' disease. An update of laboratory methods with new emphasis on isolation by culture. *JAMA.* 250(15): 1981-1985.



---

## 11. ANEXOS

### Anexo 1

Medio de Cultivo

#### Agar BCYE

Formula:

Levadura.....	10g
Buffer.....	10g
Carbón Activado...	1.5g
$\alpha$ – Cetogluturato..	1g
Pirofosfato Férrico.	0.25g
Agar.....	15g

L-Cisteína (4 %) estéril en 10 mL

- 1.- Suspender 38 g del medio en 900 mL de agua destilada
- 2.- Ajustar pH a 6.9 con Hidróxido de Potasio (KOH) 1N
- 3.- Aforar a 1000 mL
- 4.- Hervir para disolver perfectamente
- 5.- Esterilizar en autoclave 121 °C por 15 min.
- 6.- Dejar enfriar 45- 50 °C
- 7.- Adicionar 10 mL de la solución estéril de L-Cisteína (4 %) en la cámara de flujo laminar para evitar la contaminación del medio
- 8.- Mezclar y adicionar un inhibidor si es necesario
- 9.- Dispensar con agitación en cajas de Petri (20 mL)

## **Anexo 2**

Aislamiento de DNA genómico, a partir de cultivos celulares

### Wizard Genomic DNA Purification kit.

- 1.- Cosechar las células y transfíralas a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL
- 2.- Centrifugar a 13,000-16,000 x *g* por 10 segundos para concentrar las células.
- 3.- Quite el sobrenadante, dejando la pastilla de células con aprox. 10-50  $\mu$ L de líquido residual.
- 4.- Agregar 200  $\mu$ L de Protein Binding Solution, para lavar las células. Centrifugar a 13,000-16,000 x *g* por 10 segundos y quitar la PBS. Agitar en el vortex vigorosamente para resuspender las células.
- 5.- Agregar 600  $\mu$ L de Nuclein Lysis Solution y pipetee para lisar las células, hasta que no presente grumos visibles.
- 6.- Agregar 3  $\mu$ L de RNAase Solution al lisado nuclear y mezclar por inversión 2-5 veces. Incubar la mezcla por 15-30 min a 37 °C. Permita que la muestra se enfríe a temperatura ambiente por 5 min antes de continuar.
- 7.- Una vez a temperatura ambiente agregar 200  $\mu$ L Protein Precipitation Solution y vortex vigorosamente a velocidad alta por 20 segundos. Enfriar la muestra en hielo por 5 minutos.
- 8.- Centrifugar por 4 min. a 13,000-16,000 x *g*. La proteína precipitada formara un denso pellet blanco.
- 9.- Retirar cuidadosamente el sobrenadante conteniendo el DNA y transfíralo a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL limpio, que contenga 600  $\mu$ L de isopropanol a temperatura ambiente.
- 10.- Mezclar suavemente la solución por inversión hasta que las bandas blancas como hilos de DNA formen una masa visible.
- 11.- Centrifugar por 1 min a 13,000-16,000 x *g*. Decantar cuidadosamente el sobrenadante.
- 12.- Agregar 600  $\mu$ L de etanol al 70 % a temperatura ambiente e invierta el tubo varias veces para lavar el DNA. Centrifugar por 1 min 13,000-16,000 x *g*.
- 13.- Aspirar cuidadosamente el etanol utilizando una pipeta Pasteur o una micropipeta. Se debe tener mucho cuidado con el pellet de DNA en este punto ya que se puede aspirar.
- 14.- Invertir el tubo sobre un papel absorbente limpio y seque el pellet al aire por 10-15 min.
- 15.- Agregar 100  $\mu$ L de DNA Rehydration Solution y rehidrate el DNA incubándolo a 65 °C por una hora. Mezclar periódicamente la solución golpeando ligeramente el tubo. Alternativamente



rehidrate el DNA incubando la solución toda la noche a temperatura ambiente o a 4 °C.

### **Anexo 3**

Limpieza del producto de PCR

#### Gene Clean

##### a) Disolver Agarosa

- 1.- Cortar el producto de la electroforesis y transferirlo a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.
- 2.- Agregar 10 µl de Membrane Binding Solution por 10 mg de gel. Simultáneamente incubar a 50-65 °C y vortex hasta que esté completamente disuelto.

##### b) Colecta

- 1.- Transferir el gel disuelto a una microcolumna de celulosa. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
- 2.- Centrifugar a 16,000 x g por 1min. Tirar y reinsertar la microcolumna dentro de un tubo de colecta.

##### c) Lavado

- 1.- Agregar 700 µl de Membrane Washed Solution (con etanol). Centrifugar 16,000 x g por un minuto. Tirar lo recolectado y centrifugar por un minuto para evaporar los residuos.

##### d) Elución

- 1.- Transferir microcolumna a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.
- 2.- Agregar 25 µl de agua libre de nucleasas a la microcolumna.
- 3.- Incubar a temperatura ambiente por un minuto. Centrifugar a 16,000 x g por un minuto y repetir.
- 4.- Almacenar de 4-20 °C.

## **Anexo 4**

### Protocolo de limpieza de PCR ExoSAP-IT

- 1.- Retirar ExoSAP-IT del congelador (-20 °C). Mantenerlo en hielo mientras se realiza el procedimiento de limpieza.
- 2.- Mezclar 5 µl de un producto de reacción post-PCR con 2 µl de ExoSAP-IT, para un total de reacción de 7 µl.
- 3.- Incubar a 37 °C por 15 min para degradar los primers y nucleótidos restantes.
- 4.- Incubar a 80 °C por 15 min para inactivar ExoSAP-IT.
- 5.- El producto de PCR esta a listo para usarse en la secuencia de DNA u otros análisis.

## Anexo 5

Ciclo de vida ambiental de *Legionella pneumophila* dentro de los protozoos (Fig. 4).

1. *L. pneumophila* en las biopelículas con otras bacterias, o en suspensión infectante de protozoos.

2. Después de la entrada, *L. pneumophila* reside en una vacuola unida a la membrana que recluta orgánulos de la célula huésped tales como la mitocondria y el retículo endoplásmico rugoso y no se fusionan con los lisosomas.

3B. Dot/lcm y mip mutantes se fusionan con los lisosomas

3A. *L. pneumophila* se replica dentro de esta vacuola especializada y llega a un gran número

4. La partícula infecciosa no se conoce, pero puede incluir vesículas llenas de *Legionella* excretados intactos, amibas llenas de *Legionella*, o *Legionella* libre que se sometieron a lisis de su célula huésped.

5. La transmisión al hombre se produce a través de medios mecánicos, tales como grifos y duchas. La infección en humanos se produce por inhalación de la partícula infecciosa y el establecimiento de la infección en los pulmones.

6. *Legionella* spp. que ha escapado a su célula huésped puede sobrevivir en suspensión durante largos períodos de tiempo, puede infectar otros protozoos, o llevar a cabo la recolonización de las biopelículas.

Fuente: <http://newsarchive.asm.org/oct00/figs/fig1f>



Detección de *Legionella pneumophila* en ambientes intrahospitalarios de las regiones del Papaloapan y Sierra Norte del estado de Oaxaca.