



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

“Detección de *Legionella* spp. en agua y biopelículas del balneario natural “Hierve el Agua” en el Estado de Oaxaca”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

LUIS ALBERTO LEON LEMUS

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. ARTURO CALDERÓN VEGA



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser la guía y el camino en mi vida y por permitirme estudiar la vida y tratar de comprender la complejidad y magnificencia de todas y cada una de sus increíbles formas, simplemente los más espectacular que he vivido.

A la Universidad Nacional Autónoma de México a través de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y la carrera de Biología por permitirme ser parte de esta gran comunidad y darme la oportunidad de haber estudiado esta hermosa profesión siempre estaré muy orgulloso de haber pertenecido a esta Máxima Casa de Estudios.

A los miembros del comité revisor: Dra. Elvia Manuela Gallegos Neyra Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez, M. en C. Arturo Calderón Vega, M. en C. María Dolores Hernández Martínez, Biol. Blanca Nieves Martínez Rodríguez por su valiosa ayuda y observaciones para la realización de este trabajo.

En especial agradecimiento a mi director de tesis M. en C. Arturo Calderón Vega excelente profesor tutor y amigo por su gran paciencia, dedicación, comprensión y amistad al igual por su capacitación, asesoramiento invaluable para la realización de este trabajo y sobre todo por confiar en mi muchas gracias Maestro!!

A la Dra. Elvia Gallegos Neyra una de las mejores profesoras con las que tuve el privilegio de compartir mi formación al igual que este trabajo, por los viajes inolvidables realizados en los muestreos, amiga a lo largo de este proyecto y por todo lo que aprendí de ella pero sobre todo por su gran calidez y cariño que demostró siempre le estoy muy agradecido.

Para la Dra. Martha Salcedo Álvarez con gran admiración y respeto por su trabajo como investigadora, como profesora y como persona, por las muchas veces que corrigió mis errores y las que intercedió por mi y por tener el privilegio de ser su alumno le agradezco

A todos y cada uno de mis profesores que compartieron sus conocimientos conmigo estructurando los cimientos de mi formación y por hacer que me enamorara de la Biología muchas gracias a todos.

A mi mamá por su apoyo cariño y amor incondicional que me han impulsado siempre para salir adelante este gran logro es mucho en parte suyo, por todo lo que eres para mi lo que ahora soy es gracias a ti.

A mi papá por apoyarme siempre en mis decisiones por el gran sacrificio que ha hecho por sustentar mi educación por ser mi modelo a seguir como hombre y como persona pero sobre todo por su amor y cariño incondicional muchas gracias

A mi hermana por ser mi compañera académica que aunque es veterinaria es la única de la familia que me entiende cuando hablo de Biología, siempre voy a apoyarte estoy muy orgulloso de ti.

A mi familia en general les agradezco su apoyo pero en especial a mis abuelos Luisa y Hector por ser un ejemplo a seguir por su amor y cariño.

A Gaby por ser mi apoyo emocional mi compañera y mi amiga gracias por ayudarme a enamorarme de la carrera y por compartir esta etapa maravillosa conmigo, te quiero mucho.

A mis compañeras y amigas del Laboratorio de Investigación en Patógeno Emergentes por hacer más ameno el trabajo su apoyo y amistad Karen Jess y Ximena gracias.

Detección de *Legionella* spp. en agua y biopelículas del balneario natural “Hierve el Agua” en el Estado de Oaxaca

A todos mis colegas pero en especial a mis grandes amigos y que compartieron conmigo esta increíble experiencia Vladimir, Tomas, Ricardo, Salvador, Sonriks, Puga, Reptar, Tania, Julio, Vanzinni, Monse, Joss, Primavera, Pachis, y a todos los que conformaban el grupo 05 y 01 por su amistad confianza , apoyo y la infinidad de buenos momentos que pasamos juntos gracias ¡Mucho éxito a todos!

Por último a todas las personas que he conocido a lo largo de mi vida y que me han ayudado y apoyado muchas gracias.

DEDICATORIAS

A Dios, por brindarme el privilegio de estar donde me encuentro ahora, por todas las bendiciones que me ha dado a lo largo de mi vida y por lo afortunado que soy de tener una familia amigos maestros y compañeros con los cuales compartir este gran triunfo.

A mis papas Teresa y Luis por apoyarme siempre, brindarme su amor comprensión y cariño porque siempre han estado detrás de mí en cada decisión y en cada logro de mi vida jamás lo hubiera logrado sin ustedes este triunfo es en gran parte suyo, estoy muy orgulloso de ustedes, los amo.

A mi hermana Alejandra por estar a mi lado y ayudarme siempre, porque siga siendo tu ejemplo a seguir y tu apoyo te quiero mucho.

A mis abuelos Luisa y Héctor por ser ejemplos y mentores sabios por todos los consejos que me han dado y por su cariño los quiero mucho.

A toda mi familia espero que compartan la alegría de este y muchos mas triunfos conmigo por su cariño y comprensión los quiero

“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir”

Albert Einstein (1879-1955)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Historia.....	1
1.2 Taxonomía.....	2
1.3 Características.....	3
1.4 Ecología de <i>Legionella</i>	4
1.4.1 Biopelículas.....	5
1.4.2 <i>Legionella</i> en las biopelículas.....	5
1.5 Origen filogenético.....	7
1.6 Metabolismo absorción del hierro.....	9
1.7 Factores de virulencia y patogenicidad.....	9
1.7.1 Estructura antigénica.....	10
1.7.2 Membrana celular interna de <i>Legionella</i> spp.....	11
1.7.3 Periplasma.....	12
1.7.4 La membrana celular externa de <i>Legionella</i> spp.	13
1.7.5 Flagelos y pili de <i>Legionella</i> spp.....	14
1.7.6 Vesículas de la membrana externa.....	15
1.7.7 Dot/Icm (defective organelle trafficking/ Intracellular multiplication).....	15
1.7.8 Potenciador de la Inefectividad en Macrófagos (MIP).....	17
1.8 Ciclo de vida de <i>Legionella</i>	18
1.9 Inmunología.....	20
1.10 Síntomas y manifestaciones clínicas.....	20
1.10.1 Legionelosis.....	21
1.10.2 Fiebre de Pontiac.....	22
1.11 Diagnóstico.....	22
1.11.1 Cultivo.....	23
1.11.2 Medios de cultivo.....	23

1.11.3 Inmunofluorescencia directa.....	24
1.11.4 Detección de antígeno en orina.....	24
1.11.5 Pruebas serológicas.....	24
1.11.6 Métodos de Biología Molecular.....	25
1.12 Tratamiento de la legionelosis.....	25
1.13 Epidemiología.....	26
1.14 Prevención.....	28
2. ANTECEDENTES.....	30
3. JUSTIFICACIÓN.....	32
4 OBJETIVOS.	33
5. DESCRIPCION DE LA ZONA DE ESTUDIO.....	34
6. MATERIALES Y METODOS.....	36
6.1 Sitios de muestreo.....	36
6.2 Medición de los parámetros fisicoquímicos.....	39
6.2.1 Temperatura del agua.....	39
6.2.2 Temperatura atmosférica.....	39
6.2.3 pH.....	39
6.2.4 Conductividad.....	40
6.3 Análisis microbiológicos.....	40
6.4 Identificación por morfología colonial y celular.....	40
6.5 Análisis moleculares.....	41
6.5.1 Extracción de DNA.....	41
6.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	41
7. RESULTADOS.....	43
7.1 Análisis microbiológico.....	45
7.1.1 Cultivos bacterianos.....	45
7.2 Análisis de PCR.....	48
7.3 Parámetros fisicoquímicos.....	50
7.3.1 Temperatura atmosférica.....	51

7.3.2 Temperatura de los cuerpos de agua muestreados.....	52
7.3.3 pH	53
7.3.4 Conductividad.....	54
8. DISCUSIÓN.....	55
9. CONCLUSIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Ubicación taxonómica de <i>Legionella</i>	3
Cuadro 2. Especies del género <i>Legionella</i> conocidas actualmente	3
Cuadro 3. Temperaturas y ciclos utilizados en los diferentes ensayos de PCR.....	42
Cuadro 4. Resultados generales.....	44
Cuadro 5. Tipo de muestras.....	46
Cuadro 6. Parámetros fisicoquímicos del primer muestreo.....	51
Cuadro 7. Parámetros fisicoquímicos del segundo muestreo.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético que muestra la posición de la familia Legionellaceae.....	7
Figura 2. Proceso de infección intracelular de <i>Legionella pneumophila</i>	19
Figura 3. Ubicación del área de estudio.....	35
Figura 4. Referencia geográfica de los sitios de muestreo.....	35
Figura 5. Sitio de muestreo 1.....	36
Figura 6. Sitio de muestreo 2.....	37
Figura 7. Sitio de muestreo 3.....	37
Figura 8. Sitio de muestreo 4.....	38
Figura 9. Sitio de muestreo 5.....	38
Figura 10. Fotografía de las colonias de <i>Legionella pneumophila</i>	46
Figura 11. Tinción de Gram mostrando la morfología bacteriana de <i>Legionella</i>	47
Figura 12. Tipo de muestras y numero de muestras positivas basadas en la detección de la morfología colonial típica el género.....	47
Figura 13. Electroforesis mostrando los amplificadores obtenidos utilizando los primers de Pascual <i>et al.</i> , 2001.....	49
Figura 14. Electroforesis que muestra los amplificadores positivos obtenidos utilizando los primers de Bernardier <i>et al.</i> , 1997.....	49
Figura 15. Electroforesis Mostrando los amplificadores positivos obtenidos utilizando los primer Yong <i>et al.</i> , 2010.....	50
Figura 16. Temperaturas ambientales registradas para ambos el primer y el segundo muestreos.....	52

Figura 17. Temperaturas registradas para cada sitio de muestreo en el primer y segundo muestreo.....53

Figura 18. Medidas de pH registradas para los diferentes sitios de muestreo en el primer y segundo muestreos.....53

Figura 19. Conductividad registrada para los diferentes sitios de muestreo en el primer y segundo muestreo.....54

RESUMEN

Las bacterias del género *Legionella* están presentes en forma ubicua en ambientes de agua dulce naturales y artificiales, donde pueden soportar temperaturas de 5-63 °C y un intervalo de pH de 5-9, tiene la capacidad de parasitar protozoos, como amibas de vida libre las cuales comúnmente se alimentan en las comunidades tróficas de las biopelículas. La alteración de las biopelículas de tipo sólido-liquido por medios mecánicos o naturales puede conducir a la producción de aerosoles, la infección humana por *Legionella* spp. se atribuye al resultado de la inhalación de estas pequeñas partículas que pueden llevar consigo numerosas bacterias infecciosas. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de *Legionella* spp. en el agua y biopelículas del balneario natural “Hierva el Agua” en el Estado de Oaxaca así como las condiciones fisicoquímicas que este hábitat ofrece, en particular, la temperatura la conductividad y el pH. En cuatro estaciones de muestreo se recolectaron 42 muestras de agua las cuales fueron tomadas de biopelículas flotantes, biopelículas adheridas, sedimento y muestra mixta de agua. Se obtuvieron 27 aislados bacterianos identificados como *Legionella* spp. mediante el cultivo en agar selectivo BCYE buscando la morfología colonial característica del género. Se realizó un análisis de PCR, amplificando un segmento de 232 pares de bases del gene MIP característico de la especie *Legionella pneumophila*, 18 de los 27 aislados resultaron positivos para *L. pneumophila*. La mayor presencia de *L. pneumophila* analizada por PCR fue registrada para el sitio de muestreo 3 donde 6/10 muestras resultaron positivas; seguidas por el sitio de muestreo 1 con 5/10 y los sitios 2 y 4 tuvieron menor cantidad de muestras positivas con 3/10. Por el tipo de muestra las biopelículas flotantes y las adheridas fue donde se encontró con más frecuencia la presencia de *L. pneumophila* con un 50% y 62.5% de resultados positivos respectivamente. Se registró una mayor detección de *Legionella* durante el primer muestreo con 11/21 muestras positivas comparadas con 6/21 del segundo muestreo. Los parámetros fisicoquímicos no demuestran diferencias significativas. Se reporta por primera vez la presencia de bacterias patógenas del género *Legionella* spp. y *L. pneumophila* en el balneario natural “Hierva el Agua”, Oaxaca. La presencia de esta bacteria sugiere un riesgo potencial de infección especialmente en personas inmunodeprimidas, por lo que el organismo bacteriano *Legionella* debe ser monitoreado constantemente.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia

El primer aislamiento de *Legionella pneumophila* tuvo lugar en 1947, por inoculación en un cobayo con sangre de un paciente con enfermedad respiratoria febril. Para entonces se le caracterizó como un microorganismo semejante a *Rickettsia*. Estudios posteriores establecieron su verdadera identidad. La investigación retrospectiva de anticuerpos en sueros pareados, provenientes de 81 enfermos (15 de los cuales murieron) de un brote de neumonía, producido en 1965 en un hospital psiquiátrico de Washington, permitió demostrar la seroconversión para *Legionella pneumophila* en 69 de ellos (Palmeri, 2001). Pero el primer brote bien documentado de la enfermedad se estableció en 1957 en Austin Minnesota. *Legionella* también se relacionó con un brote de fiebre de corta duración y sin neumonía (Fiebre de Pontiac), que había afectado en 1968 al personal sanitario y a los visitantes del Oakland County Health Department en Pontiac, Michigan EUA (Ruiz, 2005). *Legionella* es una causa importante de neumonías graves, adquiridas tanto en la comunidad como en el ambiente hospitalario que se presentan esporádicamente o bien en forma de brotes, en conjunto representan del 1 al 5 % de las neumonías adquiridas en la comunidad, y también pueden ser responsables de infecciones extra pulmonares (Perea *et al.*, 1992).

En julio de 1976, en la ciudad de Filadelfia, en el estado de Pensilvania, EE UU tuvo lugar la 58ª Convención de la Legión Americana en el Hotel Bellevue Stratford. En el transcurso de los días, de los 4,400 asistentes entre miembros y acompañantes, se presentaron 182 casos de neumonía, de los cuales fallecieron 29 pacientes. Durante el estudio epidemiológico se descubrieron 34 casos más que produjeron otras cinco muertes. El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta, inició un estudio epidemiológico y microbiológico sin precedentes para determinar la causa del brote. La información era desconcertante: debido a que no habían patrones de intoxicación por alimentos, personas que compartieron la habitación con las que enfermaron permanecieron asintomáticas. Las opiniones de grupos de expertos eran contradictorias. Para identificar el agente etiológico, se examinaron muestras de tejido y suero de los

pacientes buscando evidencia de toxinas, bacterias, virus, hongos, clamidias y rickettsias. Del tejido pulmonar *post mortem* de cuatro de seis enfermos, que fue inoculado en animales de laboratorio, se aisló un bacilo Gram negativo. El bacilo pudo ser transferido a embriones de pollo. Las bacterias crecidas sirvieron como antígeno para probarlo con los sueros de pacientes por inmunofluorescencia indirecta, resultando positivas 101/111 de las muestra. Así se identificó, por primera vez en 1977, a un bacilo Gram negativo de crecimiento aerobio, como la causa de un brote de neumonía. A la bacteria se denominó por ello *Legionella pneumophila* y a la neumonía atípica se le llamó “enfermedad de los legionarios”. El procedimiento diagnóstico mencionado fue positivo en 54 muestras de casos esporádicos recientes de neumonía severa y, retrospectivamente, en sueros de pacientes de dos brotes de enfermedad respiratoria no resueltos. Indudablemente, esta bacteria había causado brotes de neumonía previos, pero el microorganismo aún no se conocía (Villaseñor y Sapian, 2004).

1.2 Taxonomía

Los microorganismos pertenecientes a la familia Legionellaceae son bacilos Gram-negativos que pertenecen a la subdivisión gama de las proteobacterias y comprenden a *Legionella* como único género (Fry *et al.*, 1991). A la fecha, se han descrito 52 diferentes especies de *Legionella* (Cuadro 1 y 2) y 70 serogrupos aproximadamente la mitad de ellos están asociados a enfermedades humanas (Yang *et al.*, 2009; Lück *et al.*, 2010). La especie *L. pneumophila* se ha subdividido en 15 serogrupos, pero el 85% de las infecciones en humanos son causados por miembros de los serogrupos 1, 4 y 6 (Mérault *et al.*, 2011).

Cuadro 1 Ubicación taxonómica *Legionella* (Diederer, 2008)

Dominio: Procariota
Reino: Monera
Filo: Proteobacteria
Clase: Gammaproteobacteria
Orden: Legionellales
Familia: Legionellaceae
Género: <i>Legionella</i>

Cuadro 2. Especies del género *Legionella* conocidas actualmente (Diederer, 2008).

<i>L. adalaidensis</i>	<i>L. fairfieldensis</i>	<i>L. longbeachae</i>	<i>L. sainthelensi</i>
<i>L. anisa</i>	<i>L. fallonii</i>	<i>L. lytica</i>	<i>L. santicrucis</i>
<i>L. beliardensis</i>	<i>L. feeleii</i>	<i>L. maceachernii</i>	<i>L. shakespearei</i>
<i>L. birminghamensis</i>	<i>L. geestiana</i>	<i>L. micdadei</i>	<i>L. spiritensis</i>
<i>L. bozemanae</i>	<i>L. gormanii</i>	<i>L. moravica</i>	<i>L. steigerwaltii</i>
<i>L. bozemanii</i>	<i>L. gratiana</i>	<i>L. nautarum</i>	<i>L. taurinensis</i>
<i>L. brunensis</i>	<i>L. gresilensis</i>	<i>L. oakridgensis</i>	<i>L. tucsonensis</i>
<i>L. busanensis</i>	<i>L. hackeliae</i>	<i>L. parisiensis</i>	<i>L. wadsworthii</i>
<i>L. cherrii</i>	<i>L. impletisoli</i>	<i>L. pittsburghensis</i>	<i>L. waltersii</i>
<i>L. cincinnatiensis</i>	<i>L. israelensis</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. worsleiensis</i>
<i>L. drancourtii</i>	<i>L. jamestowniensis</i>	<i>L. quateirensis</i>	<i>L. yabuuchiae</i>
<i>L. drozanskii</i>	<i>L. jordanis</i>	<i>L. quinlivanii</i>	
<i>L. dumoffii</i>	<i>L. lansinsensis</i>	<i>L. rowbothamii</i>	
<i>L. erythra</i>	<i>L. londiniensis</i>	<i>L. rubrilucens</i>	

1.3 Características

Las legionelas son bacilos aerobios Gram-negativos, no esporulados exigentes en sus nutrimentos con 0.5-1.0 µm de ancho y de 2-50 µm de largo (Jawetz, 2010). Estos microorganismos son principalmente saprófitos acuáticos que en ocasiones causan enfermedad en los humanos. Los mayores reservorios de *Legionella* parecen ser las aguas dulces. Casi todas pero no todas las especies son móviles con uno o dos flagelos

monopolares. La ultraestructura es similar a la de otras bacterias Gram negativas, con una membrana externa, un polímero de peptidoglicanos y una membrana citoplasmática. El peptidoglicano contiene ácido m-diaminopimélico y es sensible a la lisoenzima. El estudio total de ácidos grasos en la pared celular de estos microorganismos ha puesto de manifiesto la existencia de una elevada porción de ácidos grasos de cadena ramificada, característica poco común de las bacterias Gram-negativas constituyendo su demostración mediante cromatografía de gases, un método definitivo para su identificación. No oxidan ni fermentan azúcares y utilizan aminoácidos como fuente primaria de energía, pese a su diversidad todas las especies de *Legionella* tienen requerimientos nutricionales absolutos de L-cisteína en el aislamiento primario y todas, a excepción de una especie (*L. oakridgensis*), requieren de la presencia de L-cisteína en el medio de cultivo para su óptimo desarrollo en las siguientes fases de su identificación. Las reacciones de oxidasa y de catalasa son variables, la mayoría de las especies crecen mejor en medios con aire humidificado y otras con un 2-5 % de CO₂ (Lennette, 1982).

1.4 Ecología de *Legionella*

Legionella puede estar presente tanto en ambientes de agua dulce naturales y artificiales, donde pueden soportar temperaturas de 5-63 °C y un intervalo de pH de 5-9 (Atlas, 1999). *Legionella pneumophila* es la responsable de más del 90% de los casos de legionelosis, seguida por *L. longbeachae*, *L. bozemanii* y *L. micdadei*, ya que el agua es el principal reservorio natural de *Legionella*, estas bacterias pueden encontrarse en todo el mundo en diversos ambientes acuáticos naturales y artificiales como torres de refrigeración, sistemas de distribución de agua en hoteles, casas, barcos y fábricas, equipos de terapia respiratoria, fuentes, dispositivos de nebulización y spas (WHO, 2007).

Los principales reservorios de *Legionella* spp. son ambientes de agua dulce como lagos, ríos, aguas subterráneas y aguas termales, pero también pueden sobrevivir en agua de mar y el agua de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Catalan *et al.*, 1997, Costa *et al.*, 2005, Palmer *et al.*, 1993). Pueden utilizar un gran número de diferentes estrategias para sobrevivir en estos diferentes ambientes, incluyendo el uso de protozoos en especial las amebas de vida libre como anfitriones para la replicación intracelular, la protección de las células en quistes de amebas, su persistencia en biopelículas y su

capacidad para entrar en un estado viable pero no cultivable (Dusserre *et al.*, 2008; Molmeret *et al.*, 2005; Yamamoto, 1996).

1.4.1 Biopelículas

En las biopelículas, los organismos forman conjuntos que están irreversiblemente asociados con una superficie y encerrados en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) de origen propio que forman la matriz. Las biopelículas son conocidas sobre todo en las superficies sólidas, a pesar de que se pueden producir en una gran variedad de manifestaciones. Todas ellas comparten características comunes y toman beneficios ecológicos sustanciales. Entre estos beneficios está la formación estable de un, microconsorcio sinérgico, las SPE contienen enzimas extracelulares que convierten la matriz en un sistema de digestión externa; facilita la transferencia horizontal de genes e intensifica la comunicación intercelular. Por mucho tiempo, se consideró a las biopelículas literalmente como un tema secundario y experimentaron poca conciencia, aunque son conocidas desde hace tiempo, su relevancia para procesos ambientales, así como en la medicina y salud pública han ganado mucha atención sólo en las últimas décadas (Wingender *et al.*, 2011).

1.4.2 *Legionella* en las biopelículas

El hecho de que *L. pneumophila* se detecta comúnmente en ambientes acuáticos oligotróficos, a pesar de su naturaleza trofo-selectiva implica que la bacteria es capaz de obtener su suministro necesario de aminoácidos y carbono orgánico del mismo ambiente, más específicamente del consorcio microbiano situado en biopelículas. Generalmente, hay tres fases distintas en el "ciclo de vida de las biopelículas" para las bacterias: (1) la fijación bacteriana a un sustrato, (2) la maduración de biopelículas y (3) el desprendimiento de la biopelícula y la posterior dispersión en el entorno. Lo que se sabe actualmente acerca de *L. pneumophila*, en relación con la comunidad microbiana de las biopelículas se analiza utilizando cada una de estas tres fases (Declerck, 2010).

Las biopelículas formadas a 37 y 42 °C muestran una estructura más gruesa y más extensa de considerablemente mayor densidad celular y sin los canales de agua comúnmente observados en otras biopelícula. También, en temperaturas más altas la morfología de la biopelícula asociada a *L. pneumophila* parece ser filamentosa y los filamentos son multinucleados pero no septados. El hecho de que *L. pneumophila* requiere nutrientes específicos para su crecimiento con el fin de ser cultivadas en el laboratorio, es lógico que en circunstancias ambientales la bacteria se incorpora en la biopelícula preestablecida como un colonizador secundario. Esto significa que en lugar de un acoplamiento a una superficie y el desarrollo de una biopelícula, la bacteria formará una asociación transitoria con otros microorganismos, previamente unidos a esa superficie y que ya han iniciado la formación de una biopelícula. La tasa de éxito en la colonización de la superficie también depende de varias propiedades de la célula. Componentes estructurales específicos como son: el pili, fimbrias, polisacáridos, proteínas asociadas a la superficie y flagelos han demostrado que desempeñan un papel crítico en la facilitación de la interacción bacteriana con las superficies de las biopelícula (Declerck, 2010). Existen múltiples especies de microorganismos en las biopelícula, así que la competencia bacteriana para los nutrientes es alta, es ventajoso tener más de una manera de obtener los nutrientes necesarios para el crecimiento. En el caso de *L. pneumophila*, existen dos maneras distintas. En primer lugar, los nutrientes pueden ser entregados por el propio entorno de la biopelícula. En segundo lugar, *L. pneumophila* es capaz de infectar y replicarse dentro de los protozoos. Durante su estancia en el ambiente intracelular, en el huésped infectado se degradan péptidos y proteínas y se utilizan como una fuente de nutrientes. Recientemente, la atención de la investigación hacia la ecología de *L. pneumophila* se ha intensificado de manera significativa. Esto no es sólo porque mejorará nuestro entendimiento acerca de sus estrategias de supervivencia en los sistemas antropogénicos, sino también nos ayudará a desarrollar mejores y más eficientes estrategias de control para prevenir la aparición de la legionelosis (Declerck, 2007, 2010).

1.5 Origen filogenético de la familia Legionellaceae

La familia Legionellaceae forma una sub línea dentro de la subdivisión gamma de las proteobacterias. La relación es apoyada por la presencia del oligonucleótido firma (CUAACUYYG), que está presente en la posición 510 (*Escherichia coli* numeración) en

todos los miembros del subgrupo gamma (Stackebrandt *et al.*, 1983). Dos representantes de la familia Rickettsiaceae, *Coxiella burnetii* y *Wolbachia persica*, muestran una cercana relación con la familia Legionellaceae (Fry *et al.*, 1991). El origen evolutivo que comparten *L. pneumophila* y *C. burnetii*, agente causal de la fiebre “Q” fue previamente establecido por Weisberg y cols. (1989). Respecto a esto es interesante que algunas de las clasificaciones (Bozeman *et al.*, 1968; Tatlock, 1944), describían a la familia Legionellaceae originalmente como un grupo de organismos parecidos a Rickettsias por sus características biológicas (Fry *et al.*, 1991). El árbol filogenético (Fig. 1) muestra las relaciones internas dentro de la familia Legionellaceae basado en un análisis de 1350 bases, tiene su origen utilizando *Wolbachia persica* como exogrupo, las cepas de *Legionella* muestran al menos el 95 % similitud en los 1350 bases de la secuencia de ARNr comparado con *W. persica* (Fry *et al.*, 1991).

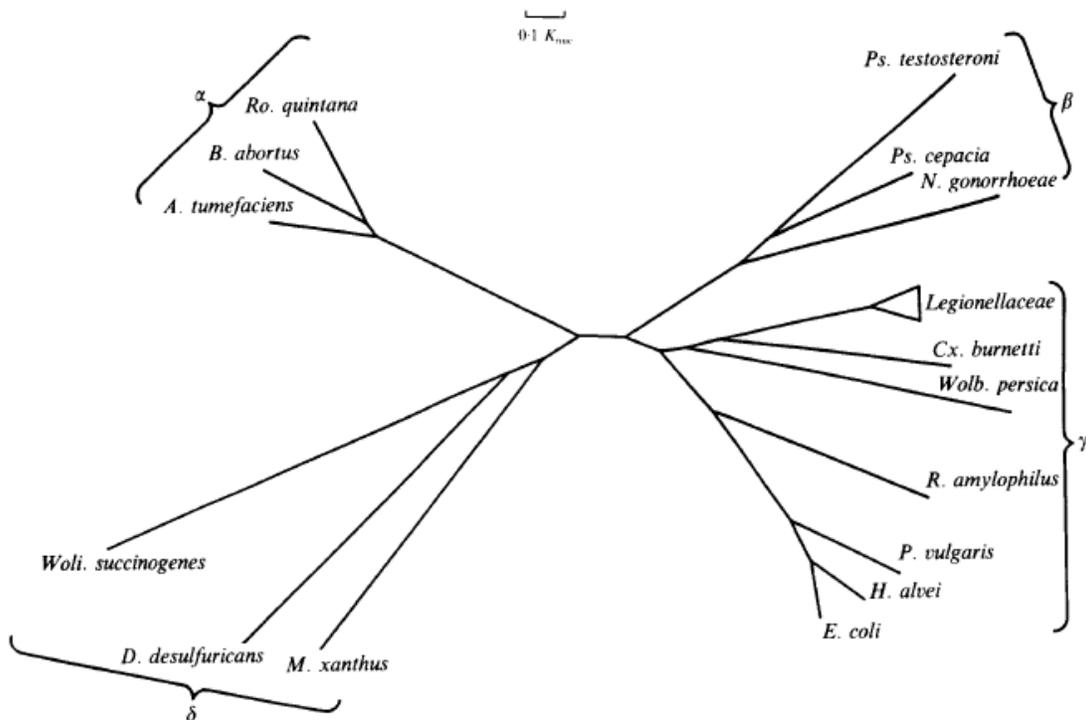


Figura 1. Árbol filogenético sin raíz que muestra la posición de la familia Legionellaceae dentro de los confines de la subdivisión gamma de las Proteobacterias. Los géneros se abrevian: A., de *Agrobacterium*; B., *Brucella*; Cx, *Coxiella*; D., *Desulfovibrio*; E., *Escherichia*; H., *Hafnia*; M., *Myxococcus*; N., *Neisseria*; P., *Proteus*; Ps, *Pseudomonas*.; R., *Ruminobacter*; Ro, *Rochalimaea*.; Wolb, *Wolbachia*.; Woli., *Wolinella* (Fry *et al.*, 1991).

La familia Legionellaceae en un tiempo constaba de tres géneros: *Legionella*, *Tlatlockia* y *Fluoribacter*, con *Tlatlockia micdadei* y *Fluoribacter bozemanii* como principales representantes de los nuevos géneros (Fry *et al.*, 1991).

El género *Tatlockia* se propuso (Brown *et al.*, 1981) para una cepa previamente clasificado como *Legionella micdadei*. La razón principal detrás de esta propuesta fue la incapacidad para detectar cualquier homología de ADN entre esta cepa y *L. pneumophila* (Brown *et al.*, 1981). En la investigación actual *L. micdadei* (*T. micdadei*) mostró del 95 al 96 % de similitud en la secuencia de ARNr (más de 1350 bases) a las cepas de *L. pneumophila*, *L. spiritensis*, *L. erythra*, *L. hackeliae* y *L. bozemanii* (*F. bozemaniae*). Además, se encontró *L. micdadei* para estar dentro de los confines de la relación definida por *Legionella* en todos los árboles filogenéticos construidos (Fry *et al.*, 1991).

Se puede distinguir de otras especies de *Legionella* utilizando un análisis detallado de la composición cuantitativa de carbohidratos (Fox *et al.*, 1984, 1990), ácidos grasos y la composición de ubiquinona (Karr *et al.*, 1982.; Lambert y Moss, 1989). Sin embargo, el espectro de variación de estas características es de la misma magnitud que el encontrado entre otras especies de *Legionella* y es por lo tanto, insuficiente para justificar géneros separados para estas cepas (Brenner *et al.*, 1984).

Hoy en día estas especies no pueden ser interpretadas sistemáticamente para reconocer grupos fenotípicamente diferentes, no se han encontrado diferencias en las especies para que no estén relacionadas a nivel de secuencia de rRNA con el género *Legionella*. Además, *L. bozemanii* (*F. bozemaniae*) y *L. micdadei* (*T. micdadei*) caen claramente dentro de la región filogenética definida por *Legionella*. Por lo tanto, es filogenéticamente no válido colocar estas especies en géneros separados (Fry *et al.*, 1991).

1.6 Metabolismo de la absorción del hierro

Se han demostrado en investigaciones previas la importancia del hierro para *Legionella*, estos estudios indican que el requerimiento de hierro es la llave para el éxito de la replicación intracelular, la infección extracelular y la virulencia de *Legionella*. En efecto el medio de cultivo estándar para el aislamiento de *Legionella* es notable por su contenido y agregado del hierro (Reinhar, 2002). La absorción de hierro es un proceso crucial durante todas las fases de crecimiento de *L. pneumophila*. Se lleva a cabo principalmente por la GTP-transportador-dependiente de hierro FeoB, que media en la captación de Fe II (Robey y Cianciotto, 2002). La proteína es necesaria para el crecimiento óptimo en condiciones de limitación de hierro en medios líquidos, así como en el crecimiento intracelular en amibas y macrófagos (Shevchuk, 2001). La IRAB es una proteína integral de la membrana interna con homología con transportadores de péptidos bacterianos. Su función se propone como un mediador en la absorción de iones de hierro en la célula, posiblemente quelado por pequeños péptidos (Shevchuk, 2001). La importancia potencial de la IRAB para la virulencia está dada por el hecho de que se encuentra casi exclusivamente en especies de *Legionella* patógenas, pero no en las especies no virulentas (Viswanathan *et al.*, 2000).

1.7 Factores de virulencia y patogenicidad

La capacidad de la bacteria Gram-negativa intracelular facultativa *L. pneumophila* para causar la enfermedad de los legionarios depende predominantemente de los componentes y las características de su envoltura celular (Shevchuk, 2001).

El citoplasma de las bacterias Gram-negativas está confinado por la membrana interna que se compone de una bicapa de fosfolípidos, dos valvas con las proteínas y lipoproteínas integrales y periféricas. Alberga las enzimas metabólicas, componentes de la cadena respiratoria y partes de la maquinaria de la adquisición de hierro. El periplasma contiene una capa relativamente delgada de peptidoglicano y proteínas diferentes. Los peptidoglicanos de *Legionella* están fuertemente reticulados (Amano y

Williams, 1983). En el periplasma están localizadas muchas enzimas de desintoxicación que degradan las sustancias nocivas del ambiente. Los mecanismos de secreción que cruzan las dos membranas también pasan por el espacio periplásmico. La membrana externa es asimétrica compuesta en su interior mayormente por fosfolípidos y una capa externa compuesta de lipopolisacáridos (LPS). Se albergan proteínas con diversas funciones en la virulencia tales como adhesión y captación en las células hospedadoras. (Shevchuk, 2001). Los LPS de *Legionella* tienen una arquitectura única, especialmente en relación con el antígeno O hidrofóbico (Shevchuk, 2001).

1.7.1 Estructura antigénica de *Legionella* spp.

Los organismos del genero *Legionella* poseen dos clases principales de antígenos. En la superficie celular existe un antígeno soluble, termolábil, identificado como un complejo de elevado peso molecular constituido por una asociación lípido-proteína-carbohidrato, en la fracción antigénica parece ser de vital importancia la parte de polisacárida y la responsable de su especificidad de serogrupo. Este complejo por su estructura química y su actividad biológica resulta similar, mas no idéntico a las clásicas endotoxinas de las bacterias Gram negativas (Rodríguez, 1996).

Si bien no se conoce el mecanismo exacto por el cual *L. pneumophila* logra causar enfermedad, su capacidad de evitar la destrucción por las células fagocitadas del hospedero desempeña un papel significativo en el proceso infeccioso, además se han demostrado otros factores fundamentales para la infección intracelular como los que se mencionan a continuación: Proteína de choque térmico 60, potenciador de la infección a macrófagos (MIP), proteínas de membrana externa (MOMP), flagelos, Sistema de secreción de tipo IV Dot/icm, y genes que codifican el sistema de secreción de tipo II requerido para el crecimiento intracelular (Forbes, 2009).

1.7.2 Membrana interna de *Legionella* spp.

Las proteínas de la membrana celular interna a menudo regulan procesos citoplásmicos tales como la expresión génica y la síntesis de la transducción de señales moleculares. Un ejemplo de esto es la adenilato ciclasa (LADC), *L. pneumophila* expresa el gen correspondiente a la proteína exclusivamente durante la infección intracelular. Se subraya su importancia para la virulencia por el hallazgo de que un mutante LADC negativo se adhiere a los macrófagos menos eficazmente y su replicación dentro de las células de mamíferos y amebas es menor (Shevchuk, 2001).

La membrana celular interna es atravesada por el complejo Tat que puede estar involucrado en la secreción de tipo II. Uno de los componentes de Tat, el DCT muestra funciones adicionales (Rossier y Cianciotto, 2005). En primer lugar, la replicación intracelular en macrófagos humanos se altera en ausencia de DCT de forma independiente de la secreción de tipo II. En segundo lugar, los mutantes - DCT negativos son defectuosos en crecimiento bajo condiciones de limitación de hierro, tanto extracelularmente como dentro de amebas. Por otra parte, TatB de *L. pneumophila* también se requiere para sintetizar el citocromo C dependiente de la respiración y, finalmente, para la exportación de una actividad específica de la fosfolipasa C (Shevchuk, 2001).

En resumen, la membrana interna de *L. pneumophila* tiene una estrecha relación con las funciones de virulencia indirectamente a través de la mediación de la adquisición del hierro y otros procesos celulares tales como la secreción de proteínas. La contribución de los componentes de la membrana interna a la virulencia pueden surgir de la necesidad de una mayor adaptabilidad a condiciones de supervivencia en medios hostiles, debido a que las células huésped y los tejidos son ejemplos de entornos hostiles para la mayoría de las bacterias (Shevchuk, 2001).

1.7.3 Periplasma

El espacio periplásmico es una capa de tipo gel compuesta de proteínas solubles y de peptidoglicano fuertemente reticulados situados entre la membrana exterior e interior. Está enriquecido en proteasas y nucleasas y otras enzimas de degradación. Se ha demostrado que principalmente en el periplasma se encuentran enzimas, tales como metaloproteasas, fosfatasas, isomerasas, los componentes periplásmicos de la maquinaria de Dot/icm y otras proteínas implicadas en virulencia de *L. pneumophila* que promueven la penetración de las células hospederas (Shevchuk, 2001).

Los peptidoglucano contenidos en la membrana de *L. pneumophila* contienen ácido murámico, glucosamina, ácido glutámico, alanina, y meso-ácido-diaminopimélico (meso-DAP). Curiosamente son extremadamente fuertes tienen una composición de enlaces cruzados con aproximadamente el 85 % de meso-DAP y 90 % de residuos de alanina que contribuyen a estos enlaces. Estos peptidoglicanos son parcialmente resistentes a tratamiento con lisoenzimas. La capa de peptidoglicanos tan estable probablemente promueve a la supervivencia en ambientes hostiles (Amano y Williams, 1983). El importante papel de los peptidoglicanos en la virulencia es subrayado por el hallazgo de que DAP auxotrófico de *L. pneumophila* en mutantes alteran negativamente la supervivencia dentro de los macrófagos y las amebas (Amano y Williams, 1983).

Fragmentos de peptidoglicano de muchas bacterias son reconocidos por los miembros de la familia de receptores NLR (dominio de unión a nucleótidos, proteínas ricas leucina) en el citosol de la célula infectada. Su activación conduce a respuestas inflamatorias, *L. pneumophila* es sólo débilmente detectado por los NLRs y los detalles de su reconocimiento por el anfitrión tiene que ser objeto de futuras investigaciones (Shevchuk, 2001).

El periplasma alberga muchas enzimas que degradan sustancias perjudiciales que entran en la célula bacteriana. Un ejemplo es la cobre-zinc superóxido dismutasa (Cu-Zn-SOD).

Se demostró que esta enzima es esencial para la supervivencia en la fase de crecimiento estacionario. Como *Legionella* tiene que sobrevivir por largos períodos cuando ningún hospedero está disponible, el Cu-Zn -SOD puede ayudar a las bacterias para superar el estrés oxidativo encontrado durante este período. (Shevchuk, 2001).

El peróxido de hidrógeno que se produce por el Cu-Zn-SOD puede ser convertido a H₂O y O₂ por la catalasa periplásmica de KatA. KatA y su contraparte citoplasmática KatB son necesarios para los ciclos de infección óptimos en macrófagos primarios y amebas. Los autores proponen un modelo en el que KatA y KatB mantienen un bajo nivel de H₂O₂ intracelular, que se requiere para un funcionamiento óptimo del aparato Dot/Icm y muchos otros procesos (Shevchuk, 2001).

1.7.4 La membrana externa celular de *Legionella* spp.

La característica distintiva de todas las bacterias Gram-negativas, es una bicapa lipídica compuesta de fosfolípidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos (LPS), y proteínas. Los fosfolípidos se encuentran principalmente en el interior de la membrana externa, al igual que las lipoproteínas que conectan con la membrana externa a los peptidoglicanos. La membrana externa es la localización de moléculas de (LPS) (Shevchuk, 2001).

Los fosfolípidos de *L. pneumophila* se analizaron poco después del descubrimiento de las bacterias. Ellos son, en orden decreciente de concentración, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, cardiolipina, monometilfosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, y dimetilfosfato intracelular (Finnerty *et al.*, 1979). El descubrimiento de la fosfatidilcolina es sorprendente ya que sólo el 10 % de todas las bacterias conocidas contienen este lípido en sus membranas en su mayoría aquellas bacterias que están estrechamente asociadas a los eucariotas, la falta de esta reduce la capacidad infectiva de *Legionella* (Shevchuk, 2001).

Además los diferentes tipos de fosfolípidos, la composición de los ácidos grasos de la membrana también influye en las propiedades bacterianas. En la fase estacionaria de crecimiento de *L. pneumophila*, la proporción de ramificado de los ácidos grasos de cadena se eleva a más del 60 % y la duración media de los ácidos grasos en las moléculas de fosfolípidos se reduce en comparación exponencial al crecimiento. Un enfoque bioinformático propuso alrededor de 250 proteínas en la membrana externa de *L. pneumophila*. Con pocas excepciones, las proteínas de la membrana externa se pueden dividir en dos clases: lipoproteínas y proteínas β -barril. Las lipoproteínas tienen restos lipídicos unidos a un residuo de cisteína amino-terminal proteínas β -barril son casi todas las proteínas integrales de membrana de la membrana externa. La mayor parte de las proteínas de la membrana externa están involucradas en la fijación o la invasión intracelular (Shevchuk, 2001).

La principal proteína de la membrana externa de *L. pneumophila* (MOMP) está implicada en la unión a las células (Krinos *et al.*, 1999). La proteína de choque térmico Hsp60 también es importante para el apego y la invasión de un modelo de células HeLa (Hoffman y Garduño, 1999; Riboldi-Tunncliffe *et al.*, 2001).

1.7.5 Flagelos y pili de *Legionella*.

Los pili de *L. pneumophila* varían en longitud y pueden ser formas largas de 0.8-1.5 μm o formas cortas de 0,1-0,6 μm . Están implicados en el apego y la adherencia a las células hospederas, la competencia natural de *L. pneumophila* así como la capacidad de la formación de biopelículas (Stone y Abu Kwaik, 1998; Lucas *et al.*, 2006). Adicionalmente a los pili, *L. pneumophila* exhibe una solo flagelo monopolar, que está anclado en ambas membranas interna y externa y al cuerpo basal de peptidoglicanos. Este juega un papel importante en la motilidad celular, la adhesión, y la invasión del huésped, también se ha descrito por estar involucrado en la formación de biopelículas (Heuner y Albert-Weissenberger, 2008).

La transición de las bacterias a la fase de transmisión es co-regulado por la expresión flagelar. Reguladores de flagelación también controlan rasgos de virulencia importantes

como evitar los lisosomas y la citotoxicidad (Gabay *et al.*, 1986), por otro lado la flagelina citosólica se describe para desencadenar la respuesta de macrófagos a una infección por *L. pneumophila* (Shevchuk, 2001).

1.7.6 Vesículas de membrana externa

Las vesículas de membrana externa (VME) se desprenden de la membrana externa por *L. pneumophila* y la mayoría de otras bacterias Gram-negativas, estas miden entre 100 y 250 nm de diámetro y consisten en componentes de la membrana externa y el periplasma, incluyendo los LPS. Las VME de *L. pneumophila* contienen una parte desproporcionadamente alta de proteínas asociadas a la virulencia, la membrana lipolítica y las actividades proteolíticas. En general, las VME de otras bacterias pueden mediar el contacto interbacterial y también el contacto con las células eucariotas. Estas pueden matar otras bacterias por la entrega de factores nocivos. Las enzimas de degradación en asociación con las VME son macromoléculas que pueden promover la adquisición de nutrientes, es decir, mediante la escisión de las proteínas en aminoácidos que son luego retomados por la bacteria. Modulaciones de la formación de biopelículas y funciones de detección de *quórum* también se han asignado a las VME (Shevchuk, 2001).

1.7.7 Dot/Icm (Defective organelle trafficking/ Intracellular multiplication)

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

Sistemas de translocación de proteínas especializadas son esenciales para el éxito de la colonización utilizados por muchos patógenos bacterianos. Estos sistemas ofrecen factores de virulencia en células hospederas 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 intracelular y la reproducción, y la propagación del agente patógeno entre las células hospederas (Thanassi *et al.*, 2012). El sistema de secreción tipo IV Dot/Icm conjugación-adaptado asociado con la bacteria patógena oportunista *Legionella pneumophila* representa un ejemplo de ello, que se transloca efectores en las células hospederas, la actividad de Dot/Icm es esencial para el éxito de *L. pneumophila* en su replicación intracelular dentro de los fagocitos, las células que están diseñadas para digerir partículas interiorizadas, incluyendo células bacterianas. El análisis genético de mutantes no replicables en macrófagos llevó a la identificación de varios loci llamado Dot o icm en el cromosoma de *L. pneumophila* que son esenciales para su replicación intracelular (Isberg *et al.*, 2009).

Tres líneas de evidencia sugieren que estos genes codifican proteínas que se ensamblan en una membrana asociada al complejo protéico implicada en sustrato de translocación. En primer lugar, muchas de estas proteínas antes mencionadas son proteínas de la membrana; segundo, algunas de estas proteínas comparten homologías detectables con proteínas implicadas en la construcción del aparato conductor para la conjugación de plásmidos y lo más importante, estas proteínas son necesarias para la transferencia conyugal de elementos movilizables derivados de la Inc Q plásmido RSF1010 (Segal *et al.*, 1999).

Finalmente el sistema Dot/Icm es importante para la apoptosis y la regresión de la célula hospedera. Las proteínas efectoras secretadas por el sistema IV son especialmente responsables de alterar la fusión de la célula hospedera, uno de tales efectores es la denominada proteína RaIF, que actúa como una proteína del hospedero (ARF1) y está implicada en la circulación vesicular entre el RE y el aparato de Golgi. Al menos 275 efectores han sido identificados con múltiples objetivos y superpuestas funciones de las células del hospedero incluyendo actividad de la GTPasa de las mismas, el metabolismo de los fosfoinosítidos, la secreción proteica, la apoptosis, traslación de proteínas

eucarióticas, ubiquitinación, y funciones mitocondriales. Variaciones mutagénicas en el sistema Dot/Icm conducen a la pérdida de la virulencia. (Schuelein *et al.*, 2001; Mandell, 2005).

1.7.8 Potenciador de la Inefectividad en Macrófagos (MIP)

El potenciador de la infectividad de macrófagos MIP, es una membrana proteica homodimérica asociada que se encuentra principalmente en la superficie bacteriana. Esta proteína está codificada por el gen potenciador de la infectividad de macrófagos, que se secuenció por primera vez en 1989 (Engelberg *et al.*, 1989). El gen MIP es una peptidilprolil isomerasa de superficie, de 24 kDa, necesaria en las etapas iniciales de la infección para una óptima invasión intracelular, además inhibe la acción de la proteinquinasa C necesaria para una completa virulencia en ciertos animales. Por otro lado la proteína de choque térmico Hsp60 ha demostrado que incrementa la invasión de las células epiteliales y de cultivos celulares tipo Hela (Mandell, 2005; Shevchuk, 2001). El gen MIP encuentra en las cepas virulentas y se cree que participa en este proceso, ya que las cepas sin esta proteína muestran una disminución de 80 veces en la infectividad (Cianciotto *et al.*, 1990). *Legionella pneumophila* puede multiplicarse dentro de los macrófagos alveolares como resultado de la inhibición de la fusión de lisosomas-fagosoma (Cianciotto, 1989). Este gen ha permitido que las técnicas de manipulación de ADN, incluyendo PCR, a ser aplicada al reconocimiento de *Legionella pneumophila* (Lindsay, 1994).

Poco después de su primera descripción, MIP ha demostrado ser un FKBP Tipo P-Plase, que era un hallazgo novedoso dentro de esta familia de proteínas (Fischer *et al.*, 1992). MIP es diferencialmente expresado bajo el control de letA, que es un regulador global de la virulencia asociada a los genes de *L. pneumophila* (Shi *et al.*, 2006; Wieland *et al.*, 2002). La proteína se compone de dos dominios que están conectados a través de una α -hélice muy larga (Riboldi-Tunncliffe *et al.*, 2001). El pliegue del dominio C-terminal (residuos 100-213) está estrechamente relacionada con la proteína de unión a FK506-humana (FKBP12), y como FKBP12, expone actividad MIP/trans peptidil-prolil cis-

isomerasa (PPIase). El dominio N-terminal de α -helicoidal es responsable de la formación de homodímeros de MIP muy estables (Köhler *et al.*, 2003).

1.8 Ciclo de vida de *Legionella*

La replicación en macrófagos es una característica de la infección por *L. pneumophila*. Dentro de los macrófagos, (Figura 2) las bacterias bloquean la fusión del fagolisosoma e interceptan el tráfico de vesículas en éstos por la vía secretora. El resultado de esto es la *Legionella* containing vacuole (LCV), esta porta en última instancia, las propiedades del retículo endoplasmático rugoso. La formación de la LCV depende de la función del Dot/Icm tipo de sistema de secreción IV B utilizado por el patógeno para entregar efectores en el citoplasma de la célula hospedera. Al menos 275 efectores han sido identificados, los cuales tienen objetivos múltiples y superpuestos sede de las funciones celulares incluyendo la actividad GTPasa de la célula hospedera, el metabolismo del fosfato, la secreción de proteínas, la apoptosis eucariota, traducción de proteínas, ubiquitinación, la activación de NF- κ B y la función mitocondrial (Shevchuk, 2001).

La intervención a los macrófagos puede ser mediada por la intervención del complemento fijado sobre la superficie celular, aunque también puede ocurrir sin su intervención. En el interior de las células reside en un fagosoma especializado que no se fusiona con los lisosomas y por lo tanto el fagosoma no llega a ser acidificado; y además la actividad respiratoria es minimizada. En el interior del fagosoma continua la multiplicación bacteriana hasta que el macrófago es destruido y liberada la progenie bacteriana, este ciclo puede repetirse en los alveolos lo que conduce a una amplificación de la infección. *L. pneumophila* tiene dos fases en su ciclo de vida: la fase replicativa intracelular (FR) y la transmisora no replicativa infecciosa (FT), o forma quística. En la FR son avirulentas, no flageladas, y resistentes a detergentes. Mientras que en la FT son virulentas, flageladas, y móviles. Un sistema complejo regulatorio es el que rige la diferenciación entre estas dos fases. En la TP la bacteria tiene una expresión genética concerniente con la transmisión y el ataque a las células del hospedero, mientras que en la FR sólo expresa componentes de metabolismo aeróbico, por lo que este sistema regulatorio no sólo controla la virulencia si no también la motilidad. La fase replicativa comienza con la unión del complemento a

una proteína que es la porina de la membrana externa y C3b en la superficie bacteriana. Esto permite que las bacterias se unan a los receptores C3R del complemento de los fagocitos mononucleares (Murray *et al.*, 2006; Cohen, 2010).

Un sistema complejo regulatorio es el que rige la diferenciación entre estas dos fases. En la FT la bacteria tiene una expresión genética concerniente con la transmisión y el ataque a las células del hospedero, así como substratos del sistema de secreción Dot/Icm tipo IV y más de 90 proteínas, mientras que en la FR sólo expresa componentes del metabolismo aeróbico, por lo que este sistema regulatorio no solo controla la virulencia sino también la motilidad (Mandell, 2005).

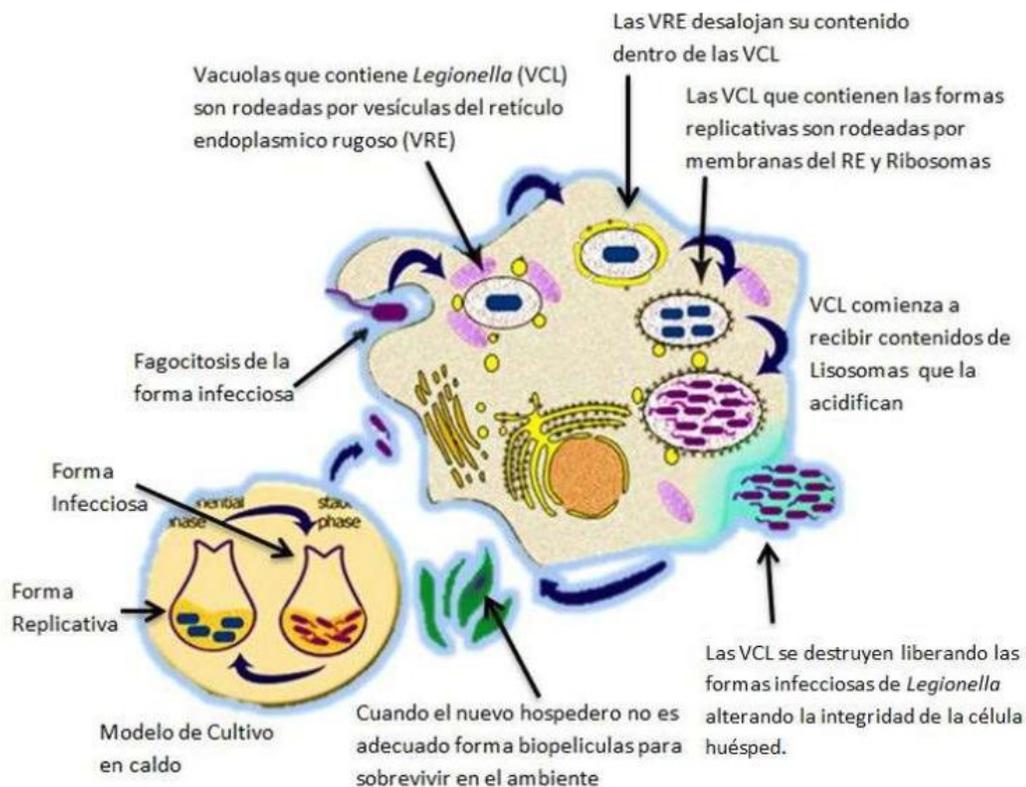


Figura 2. Se muestra el proceso de infección intracelular de *Legionella pneumophila* en la célula hospedera (Metapathogen, 2012)

1.9 Inmunología.

Legionella pneumophila es un patógeno intracelular, se replica dentro de los macrófagos alveolares, sin embargo la resolución de la infección en el pulmón requiere múltiples tipos de células y un abundante cruce entre células inmunológicas.

El control inmunológico de la infección está mediado por el sistema inmunitario celular, y es el que parece ser el mecanismo de defensa principal del huésped frente a esta infección. La respuesta de linfocitos T colaboradores (Th1), y sus citosinas asociadas, es particularmente importante para el combate de *Legionella*. La activación del IFN- γ hace que los macrófagos impidan el crecimiento de *Legionella pneumophila*. Este cambio en la permisividad del hospedero implica entre otros, una reducción en el hierro intracelular, un factor necesario para la replicación y crecimiento dentro de la célula. Se producen anticuerpos durante la infección por *Legionella pneumophila*, pero la respuesta humoral no parece decisiva en la defensa del huésped (Perea, 1992; Mandell, 2005).

Los macrófagos y células dendríticas (DC) son centinelas importantes del sistema inmune para la detección de agentes infecciosos, mecanismos microbianos altamente conservados, denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Las células dendríticas representan un grupo heterogéneo de células con propiedades funcionales especializadas, las células dendríticas juegan un rol crítico en la obtención de la respuesta inmunitaria adaptativa a través de su papel como células primarias de presentación del antígeno. Estudios recientes han mostrado que las células dendríticas plasmocitoides (pDC) realizan una importante contribución a la restricción de la infección de *Legionella in vivo*. Durante la infección por *Legionella* las pDC son rápidamente reclutadas a los pulmones y en el agotamiento de la pDC hay un incremento significativo y una sobrecarga microbiana en el pulmón (Schuelein, 2011).

1.10 Síntomas y manifestaciones clínicas

La infección por *Legionella* se manifiesta en dos formas muy diferentes: la fiebre de Pontiac y la neumonía o Legionelosis (enfermedad de los legionarios). No se sabe con

certeza porque la enfermedad se expresa en algunas de estas dos forma y no en la otra, pero probablemente el tamaño del inóculo, la modalidad de transmisión y los factores del hospedador sean importantes (Mandell, 2005).

1.10.1 Legionelosis.

La manifestación principal de esta enfermedad es la neumonía, abarca un largo espectro de síntomas que comprenden desde tos leve con fiebre débil hasta un cuadro de estupor asociado con infiltrados pulmonares diseminados e insuficiencia multisistémica. El periodo de incubación de la enfermedad de los legionarios oscila entre 2 y 10 días. En una fase temprana los pacientes refieren síntomas inespecíficos como: fiebre, malestar general, mialgias, anorexia y cefalea (Mandell, 2005). El dolor torácico de tipo pleurítico puede o no ser una manifestación importante en algunos casos. La diarrea se observa en el 25 al 50 % de los casos: por lo general las heces son blandas y no sanguinolentas. Del 10 al 20 % de los pacientes padecen náuseas, vómitos y dolor abdominal. Los síntomas neurológicos varían entre cefalea y letargia y un cuadro de encefalopatía, el síntoma neurológico más frecuente es alteración del estado mental (Mandell, 2005). En los casos típicos el examen físico del tórax revela sonidos anormales en el pulmón (rales pulmonares) en una fase temprana de la enfermedad (Mandell, 2005). La bradicardia en relación con la fiebre es una manifestación sobrevalorada, pero puede observarse en ancianos con neumonía avanzada. La hipotensión se observó en el 17 % de los pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (Mandell, 2005). La fiebre es virtualmente universal; en una serie el 19 % de los pacientes tenían más de 40 °C. Los escalofríos con temblores son más frecuentes en los pacientes con neumonía avanzada. En estudios prospectivos comparativos, las manifestaciones clínicas generalmente eran similares en las neumonías causadas por *L. pneumophila* y las causadas por otros microorganismos. Asimismo, las anomalías de laboratorio, como anomalías en pruebas funcionales hepáticas, hipofosfatemia y alteraciones hematológicas no son más frecuentes en la enfermedad de los legionarios que en la neumonía por otras causas. Por otra parte, la hiponatremia (nivel sérico de sodio ≤ 130 mEq/L) se observó con mucha mayor frecuencia en la enfermedad de los legionarios que en las neumonías por otras causas. La incidencia de la enfermedad clínicamente significativa es superior en hombres mayores de 55 años de edad. Los factores asociados con riesgo elevado incluyen: tabaquismo, bronquitis crónica, enfisema, esteroides y otros tratamientos inmunosupresores (Jawetz, 2010).

Aunque la presentación clínica no es específica, las siguientes manifestaciones deben orientar hacia el diagnóstico de la enfermedad de los legionarios en un paciente con neumonía de causa desconocida: 1) abundante cantidad de neutrófilos y cantidad mínima o nula de microorganismos en las secreciones respiratorias teñidas con la tinción de Gram; 2) hiponatremia (nivel sérico de sodio ≤ 130 mEq/L) y 3) ausencia a la respuesta de tratamiento con antibióticos betalactámicos (penicilina o cefalosporina) y aminoglucósidos. En pacientes inmunosuprimidos se han documentado diversas manifestaciones extrapulmonares, como, sinusitis, absceso peri-rectal, pericarditis, pielonefritis, peritonitis, pancreatitis y endocarditis. Aparentemente la diseminación es consecuencia de la bacteremia. Se han observado casos de infección de la herida, secundaria a la contaminación con agua por *Legionella*. La anemia es una manifestación frecuente; su gravedad se correlaciona con la duración de la infección (Mandell, 2005).

1.10.2 Fiebre de Pontiac

La fiebre de Pontiac es una enfermedad tipo gripal aguda y auto limitada sin neumonía. El periodo de incubación de la fiebre de Pontiac 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 y cefalea, tos seca mareos y náuseas. Estos pacientes solo necesitan un tratamiento sintomático generalmente se recuperan por completo (Mandell, 2005).

1.11 Diagnóstico

En los últimos años se han desarrollado diferentes métodos para la confirmación del diagnóstico clínico de la legionelosis, aunque el cultivo de muestras respiratorias sigue siendo el método de preferencia ya que tiene, a diferencia de otros métodos habituales, una alta sensibilidad y permite la detección de otras especies de *Legionella*. Además del cultivo la detección de *Legionella* por inmunofluorescencia directa, la detección de antígeno en orina, el diagnóstico serológico y las prueba de biología molecular completan

las posibilidades diagnósticas de esta infección (Ruiz, 2005). Las colonias de *Legionella* son ligeramente mucoides, de color blanco a gris convexas semejando vidrio esmerilado y en presencia de luz ultravioleta pueden presentar fluorescencia amarillo-verdosa. Para confirmar la identificación se debe realizar la tinción de Gram, pruebas bioquímicas y fenotípicas (producción de oxidasa, gelatinasa y β -lactamasa, oscurecimiento en los medios suplementados con tirosina, autofluorescencia y capacidad de hidrolizar el hipurato). Esta última prueba diferencia *L. pneumophila* de otras especies de *Legionella* implicadas en infecciones. Asimismo, deben realizarse pruebas serológicas para la confirmación del serogrupo (Ruiz, 2005).

1.11.1 Cultivo

Los esputos, incluso los que no reúnen los criterios de aceptación establecidos para otros patógenos respiratorios, son aceptables para el cultivo de *Legionella*. Otras muestras como lavados broncoalveolares y líquidos pleurales, son también válidas aunque debido a su bajo inóculo bacteriano, se recomienda la concentración por centrifugación previa al cultivo. Aunque un porcentaje relativamente importante de enfermos tienen bacteriemia, los métodos habituales de hemocultivos no se recomiendan por su escasa sensibilidad (Ruiz, 2005). En muestras ambientales los métodos habitualmente empleados son los de filtración por membrana de un volumen adecuado de agua, aproximadamente 1 L procedente del circuito de agua caliente y los puntos terminales de los circuitos de agua (Ruiz, 2005).

1.11.2 Medios de cultivo

El medio de cultivo para *Legionella* más comúnmente utilizado es el agar α -BCYE (agar tamponado que contiene extracto de levadura, pirofosfato férrico, carbón activado y cetoglutarato) (Ruiz, 2005). La L-cisteína es un componente esencial del medio de cultivo y los cetoácidos y los iones férricos concurren para estimular el desarrollo de *Legionella*. Los ingredientes activos del extracto de levadura aparentemente son los derivados purínicos y pirimidínicos entre los cuales los más importantes son las guaninas. El carbón activado absorbe y detoxifica los ácidos grasos y radicales oxigenados y previene la oxidación de la cisteína (Mandell, 2005).

1.11.3 Inmunofluorescencia directa

Legionella pueden detectarse en muestras respiratorias por tinción directa con fluorocromos. Este método, aunque rápido, tiene importantes limitaciones, como resultados falsos positivos por reacciones cruzadas con otras bacterias y el hecho de que los resultados negativos no excluyen la presencia de la enfermedad (Ruiz, 2005).

1.11.4 Detección de antígeno en orina

Desde los primeros días de infección se produce la eliminación por la orina de antígenos solubles de la pared celular de *L. pneumophila*, que son detectados por métodos de radioinmunoanálisis (RIA) (sensibilidad del 80 % y especificidad del 99 %) y enzimoimmunoanálisis (ELISA) (sensibilidad del 95 % especificidad del 94 %) (Ruiz, 2005).

No obstante, aparte de los aspectos positivos del método deben señalarse algunas limitaciones: a) detecta solo el antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1 y no el de los restantes serogrupos que pueden llegar a representar el 20% de las infecciones por *Legionella*, y b) en el caso de brotes no puede prescindirse del cultivo de las muestras respiratorias puesto que es indispensable el tipado molecular de las cepas para saber la relación entre los pacientes infectados y el origen de la infección (Ruiz, 2005).

1.11.5 Pruebas serológicas

Los anticuerpos frente a *Legionella* se elaboran muy lentamente, siendo en muchos casos detectables solo a partir de las tres semanas del comienzo de la infección. Incluso en algunos pacientes inmunodeprimidos no se forman. Al igual que en otras enfermedades infecciosas, solo el estudio pareado de muestras de suero recogidas con un intervalo de 3-4 semanas puede tener utilidad diagnóstica. La detección de títulos de anticuerpos superiores a 1/256 de muestras de suero recogidas durante la fase aguda de la infección puede tener interés epidemiológico. No obstante, se debe considerar la posibilidad de que

en determinados grupos de la población la prevalencia de anticuerpos ante *Legionella* sea relativamente alta. Los métodos utilizados del diagnóstico serológico de legionelosis son la inmunofluorescencia indirecta y el análisis inmunoenzimático (Ruiz, 2005).

1.11.6 Métodos de Biología Molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), concretamente la realizada en tiempo real, aporta rapidez y alta especificidad al diagnóstico; sin embargo es una técnica costosa y de menor sensibilidad que el cultivo. Estos métodos se aplican sobre todo para establecer epidemiológicamente la relación clonal de las cepas aisladas en muestras procedentes de pacientes y las procedentes de diferentes orígenes ambientales. Los métodos más utilizados con estos fines son los de la electroforesis en gel de campo pulsante y el de PCR con indicadores de secuencia arbitraria (Ruiz, 2005). El estándar actual para el diagnóstico molecular de *L. pneumophila* se basa en la detección del gen MIP (potenciador de la infectividad a macrófagos) específico para *L. pneumophila* y la detección de 16S rRNA para la identificación del género *Legionella* (Templeton *et al.*, 2003). El gen MIP fue uno de los primeros genes asociados con la capacidad de *L. pneumophila* de replicarse en células eucariotas y codifica una superficie peptidilprolil cis/trans isomerasa (PPIasa) (Cianciotto *et al.*, 1990). Los 24 kDa del gen MIP son producto de la similitud entre las secuencias de aminoácidos estructuralmente parecida a la de la familia eucariótica principalmente de proteínas de unión a FK-506, una clase de inmunofilinas (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001).

1.12 Tratamiento de la legionelosis

Legionella es un patógeno intracelular, y los antibióticos capaces de alcanzar altas concentraciones intracelulares se asocian con mayor probabilidad de eficacia en los seres humanos que los agentes con escasa penetración celular. Los sistemas intracelulares en modelos de cultivos celulares confirman que los macrólidos, las quinolonas, la rifampicina, la trimetoprima-sulfametoxazol y las tetraciclinas son eficaces contra *Legionella in vivo*. La superioridad de estos agentes respecto de los betalactámicos y los aminoglucósidos probablemente se debe a la excelente capacidad de penetración de estos antibióticos en las células fagocíticas (Mandell, 2005).

Los estudios clínicos de eficacia antibiótica son más precisos si el diagnóstico de la enfermedad de los legionarios se establece por aislamiento de *Legionella* en cultivos y no por métodos serológicos; los antibióticos que cumplen este requisito comprenden: la azitromicina, la ciprofloxacina, el levofloxacino y la rifampicina. Los nuevos macrólidos (sobre todo la azitromicina) y las quinolonas (cipro, levo y trovafloxacina) son los fármacos de elección para el tratamiento de la enfermedad. La eritromicina ha sido remplazada por otros macrólidos debido a su actividad relativamente reducida *in vitro* y en modelos intracelulares animales. La eritromicina se asocia con más frecuencia a efectos adversos que los nuevos macrólidos, como: ototoxicidad, manifestaciones gastrointestinales y tromboflebitis en el sitio de la inyección intravenosa. Una de las desventajas de la eritromicina es que en pacientes de edad avanzada con trastornos cardiopulmonares es la gran cantidad de líquido necesario para su administración. Algunos autores sugieren combinar un macrólido con rifampicina en pacientes con enfermedad de los legionarios grave. Aunque los antibióticos por vía oral son recomendados en casos seleccionados, en pacientes con edad avanzada y aparentemente estables en el momento del diagnóstico puede darse un deterioro brusco del estado clínico. Además dado que la disfunción gastrointestinal que es un trastorno frecuente en la enfermedad de los legionarios, puede reducir la absorción de un antibiótico oral, es prudente recomendar la vía parenteral. La respuesta clínica, incluida la remisión de la fiebre y una sensación de bienestar, generalmente se observa en el curso de 3 a 5 días. Una vez documentada la respuesta clínica, el tratamiento vía parenteral puede reemplazarse por una vía oral. El tratamiento debe durar de 10 a 14 días, aunque en pacientes inmunosuprimidos debe prolongarse más. Se han comunicado casos de recidivas, pero la revisión de la mayoría de estos informes sugiere que podría tratarse de casos de reinfección en paciente con exposición persistente a aguas contaminadas (Mandell, 2005).

1.13 Epidemiología

La ecología ambiental de *Legionella* es particularmente pertinente en la medida que la enfermedad de los legionarios es una forma de neumonía que en teoría podría prevenirse erradicando el microorganismo de su reservorio. El hábitat natural de *Legionella* es una acumulación de agua en forma de río, lago, arroyo o aguas termales. *Legionella* es capaz

de sobrevivir a una amplia gama de condiciones ambientales: Temperatura, de 0 a 63°C; pH, de 5 a 8.5; oxígeno disuelto, de 0,2 a 15 mg/mL. Puede vivir durante años en muestras de agua conservadas a una temperatura de entre 2 y 8 C° (Mandell, 2005).

Los cuerpos acuáticos naturales contienen escasas cantidades de microorganismos *Legionella*. Dado que las especies de *Legionella* toleran el cloro, este microorganismo sobrevive al tratamiento del agua y aunque en cantidades reducidas, se encuentra presente en el sistema de distribución de agua potable. En ciertos hábitats artificiales, como torres de refrigeración o sistemas de suministro de agua, que aseguran condiciones favorables de temperatura, protección física y nutrición, el microorganismo puede desarrollarse y proliferar en forma significativa. En la actualidad se sabe que el desarrollo óptimo de *Legionella* requiere la presencia de hospederos protozoos (Mandell, 2005). *Legionella* tiene la capacidad de parasitar protozoos, como amebas de vida libre de los géneros: *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Hartmannella* reportadas como los que comúnmente se alimentan en las comunidades tróficas en las biopelículas (Greub y Raoult, 2004; Declerck *et al.*, 2007). Otros autores la han reportado en los ciliados: *Tetrahymena pyriformis* y *Tetrahymena vorax* (Rowbotham, 1980). La ruptura de protozoos hospederos libera una gran cantidad de legionelas móviles.

La localización intracelular de *Legionella* puede facilitar su supervivencia en un medio desfavorable. La colonización de los sistemas de distribución de agua por *Legionella* depende de una combinación de varios factores, incluidos la temperatura del agua, la acumulación de sedimento y la microflora comensal así como de la formación de biopelículas que son agregados microbianos organizados que están formados por diferentes tipos de microorganismos: bacterias protozoos, algas y hongos microscópicos; la biopelícula brinda protección contra antibióticos y sustancias químicas nocivas, crea también un micro hábitat que provee nutrientes para el desarrollo óptimo de toda clase de microorganismos. La alteración de biopelículas de tipo sólido-líquido por medios mecánicos o naturales puede conducir a la producción de aerosoles que permiten la transmisión de patógenos asociados con biopelículas sobre considerables distancias hasta que son inhaladas por personas susceptibles (Jennings *et al.*, 2003). La infección humana por *Legionella* spp. se atribuye principalmente al resultado de la inhalación de aerosoles

(0.5 mm) estas pequeñas partículas se llenan con numerosas bacterias infecciosas (Fields *et al.*, 2002).

1.14 Prevención

La ubicuidad de *Legionella* hace muy difícil su control, especialmente en la comunidad, donde las fuentes potenciales son muy variables. El diseño de instalaciones adecuadas y su correcto mantenimiento son aspectos fundamentales para evitar la legionelosis. El mantenimiento de las instalaciones comprende el control estricto de la temperatura y los niveles de cloro del agua, la detección precoz de problemas causados por el estancamiento del agua tanto en circuitos de agua sanitaria como en torres de refrigeración y la inspección periódica de todas las instalaciones que se han relacionado con brotes de la enfermedad de los legionarios. La investigación y el control de un brote comunitario se inician con la acotación del área afectada mediante estudios epidemiológicos convencionales. Se establecen e investigan, a continuación, las fuentes posibles de la infección en la zona: agua de distribución de la red, torres de refrigeración, instalaciones de aire acondicionado fuentes ornamentales y saunas. Es indispensable que todas las instalaciones estén previamente censadas, puesto que este hecho facilita enormemente el trabajo de los investigadores. El hallazgo de *Legionella* en alguna de ellas no significa necesariamente que sea responsable del brote. Solo la comparación de los aislados clínicos y ambientales mediante técnicas de análisis molecular aseguran la posible relación con un mismo origen. El cierre inmediato de la instalación acabara con el brote. La revisión, el tratamiento y el mantenimiento de las instalaciones implicadas deberían evitar nuevos brotes en el futuro. En los hospitales y grandes edificios, la investigación epidemiológica es mucho más simple, puesto que en la gran mayoría de los casos será el agua sanitaria caliente la fuente del brote de legionelosis. Para la prevención primaria de la legionelosis nosocomial es necesario saber si existe colonización del agua sanitaria por *Legionella* y establecer un sistema de vigilancia de la neumonía nosocomial con aplicación sistemática de pruebas para *Legionella* en caso de que el análisis ambiental sea positivo. Esta colonización puede minimizarse mediante la cloración adecuada del circuito de agua fría y manteniendo temperaturas superiores a 60°C en acumuladores y de 50° C en puntos periféricos en la red de agua sanitaria

caliente. Sin embargo, a veces ocurre que, a pesar de estas medidas, la colonización por *Legionella* y los casos de neumonía nosocomial por este microorganismo persisten. Esto es especialmente peligroso cuando se trata de hospitales con pacientes inmunodeprimidos. Se aconsejan entonces medidas de desinfección complementarias. En este sentido, el sistema de ionización con cobre y plata ha demostrado ser especialmente eficaz para el control de casos y para reducir los recuentos ambientales (Ruiz, 2005).

Varios informes han demostrado que la hipercloración de los sistemas de distribución de agua no impidieron colonización por *L. pneumophila*, ya que era sólo es eficaz para un corto período de tiempo y la recolonización era frecuentemente observada (Galli *et al.*, 2007).

2. ANTECEDENTES

En 1990, Marín y Montes reportaron el informe de un caso de neumonía por *Legionella pneumophila* en México. Se trata de un paciente masculino adulto joven que ingresó 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 *Legionella pneumophila*.

Bej *et al.*, 1991, demostró que las células de *L. pneumophila* expuestas a cloro y a altas temperaturas (quedando células no viables) no son detectadas mediante los análisis de PCR mientras que células viables también analizadas eran positivas a la amplificación mediante PCR.

Bernarder *et al.*, (1997) demostró que los análisis de PCR anidados fueron específicos tanto para detectar la presencia de *L. pneumophila* como para descartarla. Esto fue concluido en un estudio en el cual 22 de 25 pacientes que sufrían de neumonías atípicas estaban infectados por *L. pneumophila* esto fue comparado por un grupo control de pacientes que arrojaron resultados negativos en los análisis de PCR. Los autores concluyen que un análisis de PCR anidado rápido y simple utilizando primers del gen MIP, prueban ser más sensibles y específicos que los cultivos, y tan específicos como análisis de PCR no anidados reportados previamente.

Pascual *et al.*, (2001) detectó la presencia de *L. pneumophila* en aerosoles. De un total de 64 muestras que fueron tomadas de un depósito de una planta de tratamiento de agua, de una planta química, y un depósito de agua en un edificio de oficinas fueron cultivadas y analizadas mediante PCR anidado, de las cuales tres muestras fueron positivas tanto en el cultivo como en el análisis de PCR y nueve muestras que fueron negativas en cultivo resultaron positivas en el análisis por PCR probando que *L. pneumophila* estaba presente en aerosoles de estos tres diferentes ambientes.

En 2003, Villaseñor y Sapián, publicaron en el boletín Epidemiología del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud en México, un artículo donde se da una breve reseña de la enfermedad de los legionarios y sobre los eventos emergentes del agente causal, ambos autores hacen una llamada de atención para investigar la presencia de esta bacteria en el país y de esta forma iniciar las medidas que permitan controlar su aparición en México.

Declerck (2010) demostró la relación que tiene el ambiente en el crecimiento de *Legionella pneumophila* particularmente en biopelículas tanto líquido-sólidas como líquido-aéreas estas últimas representadas por biopelículas volátiles en aerosoles, así como la interacción de *L. pneumophila* con otras bacterias y de su estilo de vida intracelular para la replicación en protozoos.

Yong *et al.*, (2010) utilizando una nueva gama de primers del gene MIP y 16S rRNA demostró la importancia del desarrollo de nuevos primer objetivo para la identificación de *L. pneumophila* utilizando una hibridación entre *L. pneumophila* y *L. micdadei*.

3. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias del género *Legionella* pueden estar presentes en casi cualquier cuerpo de agua tanto natural como artificial, sobre todo si tienen las características fisicoquímicas adecuadas como salinidad, temperatura, pH y nutrición para su desarrollo y proliferación; el balneario natural “Hierve el Agua” en el estado de Oaxaca provee un ambiente propicio para el desarrollo y proliferación de *L. pneumophila*, además es un centro ecoturístico recreativo importante en la zona que es muy visitado por turistas nacionales y extranjeros, lo cual lo hacen un lugar muy concurrido; por las razones anteriores y, el hecho de que no existen registros previos de esta bacteria, siendo este el primer estudio que se realiza para detectar la presencia de *L. pneumophila* en el estado de Oaxaca, hace de este sitio un lugar importante para determinar la presencia de este microorganismo además al ser un sitio turístico muy atractivo, aumenta la posibilidad de infección a bañistas por este patógeno, lo cual es un riesgo para la salud pública. Por lo anterior es importante la detección oportuna de *L. pneumophila* basada en el aislamiento por cultivo selectivo así como la confirmación taxonómica de la especie en particular mediante pruebas de biología molecular para la verificación de los aislados bacterianos obtenidos en los muestreos que se llevaron a cabo, y así poder determinar la presencia o ausencia de *L. pneumophila* en este lugar.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Detectar la presencia de *Legionella* spp. en el agua y biopelículas del balneario natural “Hierve el Agua” en el estado de Oaxaca.

Objetivo particulares

- a) Identificar los aislados, de *Legionella* spp. a nivel de género por la morfología colonial característica, mediante cultivo en medio selectivo
- b) Confirmar la identificación taxonómica de la especie *L. pneumophila* utilizando análisis de PCR
- c) Establecer la relación entre los parámetros fisicoquímicos del agua del área de estudio con la presencia de *L. pneumophila*

5. DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO

“Hierve el Agua” es un balneario natural localizado en las montañas al este de Mitla en el exterior del Valle de Oaxaca y es uno de los más espectaculares sitios del sur de México (Figura 3) (Hewitt *et al.*, 1987).

Las cascadas de Hierve el Agua se localizan a 70 km al oriente de la ciudad de Oaxaca en la población de San Isidro Roaguía, municipio de San Lorenzo Albarradas en el estado de Oaxaca (Figura 3) lugar donde se ubican las singulares cascadas de travertino y calcita. Estas estructuras son conocidas como “Cascadas de Sal”, formadas por agua sobresaturada de carbonato de calcio; que brota de pequeñas grietas o fisuras de los cuerpos de caliza de la formación Tepozcolula (Cretácico Superior) formando ojos de agua y manantiales de agua cálida (22-27 °C); al escurrir por un escarpe de más de 200 m de profundidad, se van configurando grandes estalactitas semejantes a las que se forman en las grutas. Los ojos de agua están situados en una explanada denominada “El Anfiteatro”, en la cual los lugareños han construido dos albercas, en donde el agua adquiere una tonalidad verde turquesa, semejante al color del agua del Mar Caribe, debido a la cantidad de sales disueltas que contiene. (Instituto de Geología, UNAM, 2012).

En la explanada del centro recreativo se localizan cuatro manantiales (Fig. 4) que en época de lluvias su flujo es considerable y en época de estiaje la cantidad de agua que brota se reduce. Tres de ellos vierten su agua en las albercas, mientras que el otro se encuentra a unos 300 m al sureste de “El Anfiteatro” y es el que forma la “Cascada Petrificada”. Debido a que el flujo de agua no es constante al escurrir lentamente y ponerse en contacto con el aire; deja escapar parte del dióxido de carbono disuelto, permitiendo que la calcita y el travertino se precipiten. A medida que continúa el escurrimiento va quedando una costra de calcita y que posteriormente la oquedad es rellenada por capas de travertino y calcita (Instituto de Geología, UNAM, 2012).

Detección de *Legionella* spp. en agua y biopelículas del balneario natural “Hierve el Agua” en el Estado de Oaxaca



Figura 3. Ubicación del área de estudio, balneario natural “Hierve el Agua”, en Estado de Oaxaca (Google Earth 2014).



Figura 4. Referencia geográfica de los sitios de muestreo, las flechas indican el movimiento del agua (Google Earth 2014).

La vegetación que rodea a la enorme “Cascada de Sal” está compuesta por diferentes especies de encinos, matorral xerófilo, además de variadas cactáceas como tetechos, nopales y biznagas; además, aquí abundan los magueyes y los agaves espadín y tobalá. (SECTUR Oaxaca 2013).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Sitios de muestreo

Se llevaron a cabo dos muestreos en el balneario natural “Hierve el Agua”, a lo largo de un año el primero se realizó en el mes de septiembre de 2012 y el segundo en abril de 2013. En los muestreos se recolectaron 42 muestras de agua y biopelículas de distintos puntos de la explanada “El Anfiteatro” con frascos de polipropileno estériles en los cuales las muestras permanecieron almacenadas y fueron transportadas al laboratorio. En los muestreos se recolectaron agua y biopelículas de distintos puntos de la explanada Las muestras fueron tomadas de biopelícula flotante (Bf), biopelícula adherida (Ba), sedimento (S), muestra mixta de agua (Mm), y un muestreo de biopelícula adherida y sedimento tomado de la cascada. La colecta de las biopelículas fue basada en la distribución y características de las mismas como color y la textura. Las muestras se transportaron a temperatura ambiente desde el balneario “Hierve el Agua” hasta el Laboratorio de Patógenos Emergentes de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación (UICSE), de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), UNAM para ser procesadas. Se registraron los parámetros fisicoquímicos del agua *in situ*, para establecer su relación con las biopelículas y los aislados bacterianos.



Figura 5. Sitio de muestreo 1. Tipo de muestras: Bf, Ba, S y Mm.



Figura 6. Sitio de muestreo 2. Tipo de muestras: Bf, Ba, S y Mm.



Figura 7. Sitio de muestreo 3. Tipo de muestras: Bf, Ba, S y Mm.



Figura 8. Sitio de muestreo 4. Tipo de muestras: Bf, Ba, S y Mm.



Figura 9. Sitio de muestreo 5 “cascada” tipo de muestra: Biopelícula Adherida

6.2 Medición de parámetros fisicoquímicos

El registro de las lecturas de los parámetros fisicoquímicos se tomaron para determinar su relación con la presencia de *Legionella*, se realizaron las determinaciones *in situ* de la temperatura (°C), pH y conductividad (mS/cm³) del agua de los diferentes cuerpos de agua que componen el balneario, la temperatura atmosférica al momento de la colecta (Declerck *et al.*, 2007).

6.2.1 Temperatura del agua (°C)

La temperatura de los diferentes cuerpos de agua fue medida con un termómetro digital Hanna H 19040, se tomaron los valores de la temperatura del agua en tres puntos diferentes de cada uno de ellos y se hizo un promedio para establecer la temperatura final para identificar el gradiente de temperaturas a la cual prolifera *Legionella* (Declerck, 2007).

6.2.2 Temperatura atmosférica (°C)

Esta medición fue hecha con un termómetro digital Hanna H 19040, a diferencia de la medición anterior, en esta el sensor fue expuesto al ambiente. Este parámetro se estableció para posteriormente establecer si la temperatura atmosférica tenía un efecto en la temperatura del agua que pudiera afectar a la presencia de las bacterias del género *Legionella* (Declerck, 2007).

6.2.3 pH

Se midió con un potenciómetro digital de campo pH/EC/TDS Waterproof Hanna Instruments. Esta medición se hace para determinar si las condiciones de pH en el ambiente pueden determinar la presencia de bacterias del género *Legionella*. Diversos

trabajos reportan que la proliferación de estas bacterias se da en un amplio de pH de 5.0 a 9.2 (Atlas, 1999; Declerck, 2010).

6.2.4 Conductividad (mS/cm³)

Este parámetro fue medido con un conductímetro digital Hanna H 19040 calibrado previo a la medición. Este parámetro depende de la cantidad de iones disueltos en el agua, principalmente sulfatos y carbonatos (Declerck, 2010).

6.3 Análisis microbiológico.

En el laboratorio se llevó a cabo el aislamiento microbiológico por el método cultivo selectivo de *Legionella* spp. Las muestras fueron incubadas a 37 °C de 72 a 96 horas (NCID 2005). Se tomaron 50 mL de muestra y se centrifugaron en tubos de polipropileno estériles a 3000 x g durante 10 minutos para obtener una pastilla celular y el sobrenadante fue desechado. Las muestras fueron tratadas por descontaminación ácida para disminuir los microorganismos no pertenecientes al género *Legionella*, para esto se colocó 1.0 ml de la suspensión en un tubo estéril de 15 ml conteniendo 1.0 ml de buffer ácido (KCl-HCl 0.2N), posteriormente se incubaron por 15 minutos, después se agregó 0.1 ml de la suspensión en el medio de levadura y carbón amortiguado (BCYE; del inglés Buffered Charcoal-Yeast Extract) DIFCO Becton, Dickinson and Company Sparks MD 21152 USA, adicionado con L-cisteína y pirofosfato férrico, las placas de cultivo se mantuvieron en incubación a 35 °C El crecimiento bacteriano fue observado diariamente (NCID, 2005).

6.4 Identificación por morfología colonial y celular

El examen de los cultivos para la identificación macroscópica se realizó para buscar la morfología colonial característica de *Legionella* spp. la cual debe ser convexa, circular de color blanco a gris brillante con una textura parecida al vidrio esmerilado (NCID, 2005). Cuando las colonias fueron identificadas, se hizo la observación microscópica para la

identificación de la morfología bacilar bacteriana de *Legionella* spp. mediante tinción de Gram haciendo registro fotográfico.

6.5 Análisis moleculares

6.5.1 Extracción de DNA.

Para analizar el DNA de *Legionella*, se realizó la extracción y purificación con un kit de extracción Wizard Genomic DNA Purification Kit, de la marca comercial Promega (Madison, WI) utilizando el protocolo para extracción de DNA para bacterias Gram positivas y Gram negativas (Insolation of Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria Quick Protocol). Las muestras fueron equilibradas a temperatura ambiente (15-25°C), se seleccionó una colonia típica del organismo buscado y la extracción del DNA se desarrolló con la metodología de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

6.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para garantizar la identificación precisa de las bacterias a nivel de especie se realizó un análisis moleculares por PCR para la identificación del gen MIP con un tamaño de 232 pb. Por lo tanto el ADN puro extraído de los aislados bacterianos fue procesado con un Kit Promega PCR Master Mix M7502 Madison WI para amplificar el segmento del gen MIP. Para esta amplificación se utilizaron los primers *Lmip920* (5'-GCTACAGACAAGGATAAGTTG-3') *Lmip1548* (5' GTTTTGTATGACTTTAATTCA-3') (Bej *et al.*, 1991; Pascual *et al.*, 2001; Bernarder *et al.* 1996); utilizados como primers internos en los análisis de PCR anidados estos amplifican un segmento de 650-pb. Para los primers externos fueron utilizadas las secuencias *Lmip976* (5'-TAAAATCAAGGCATAGATG-3') y *Lmip* (5'AGACCTGAGGGAACATAAAT-3') (Pascual *et al.*, 2001) los cuales amplifican un segmento de 471-pb y los primers externos *Lmip1021* (5'-CATGCAAGACGCTATGAGTG-3') y *Lmip1392* (5'-CAAGTTGATCCAGCTGGCAT-3') (Bernarder *et al.*, 1996) obteniendo un segmento de 403-pb. También fueron utilizados en un análisis PCR no anidado los primers *lpg0774*

upstream (5'-TGCTAACAACCACTATCCCAA-3') downstream (5'-GTTTCAAATAAAAGCGTGCTCCT-3') que amplifican un segmento de 156 pb (Yong *et al.*, 2010).

El compuesto tuvo un volumen final de 25 µl. Las amplificaciones de los segmentos se llevaron a cabo en un termociclador PERKIN ELMER Gene Amp PCR System 2400 con los parámetros de la temperatura que se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Temperaturas y ciclos utilizados en los diferentes ensayos de PCR, se citan los diferentes autores de cada método.

PCR	Bernarder, 1996	Pascual, 2001	Yong, 2010
Temperaturas	30 ciclos	35 ciclos	35 ciclos
Desnaturalización	95° C / 5 min.	94° C / 5 min.	95° C / 4 min.
1° alineamiento	95° C / 30 seg.	94° C / 15 seg.	95° C / 1 min.
2° alineamiento	55° C / 30 seg.	50° C / 15 seg.	57.5° C / 1 min.
3° alineamiento	72° C / 1 min.	72° C / 15 seg.	72° C / 1 min.
Extensión	72° C / 5 min.	72° C / 6 min.	72° C / 5 min.

Después de que las amplificaciones se realizaron, 5 µl del ADN fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % a 75 volts durante 60 minutos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, se utilizó un marcador molecular BioLine Hyper Leader UK de 100 pb y fueron fotografiados bajo luz UV utilizando una cámara fotográfica Nikon Semipro.

7. RESULTADOS

Se llevaron a cabo dos muestreos en el balneario natural “Hierve el Agua”, a lo largo de un año el primero se realizó en el mes de septiembre de 2012 el segundo en abril de 2013. En los muestreos se recolectaron 42 muestras de agua y biopelículas en ambos muestreos de distintos puntos de la explanada “El Anfiteatro”. Las muestras fueron tomadas de biopelícula flotante (Bf), biopelícula adherida (Ba), sedimento (S), muestra mixta de agua (Mm), y un muestreo de biopelícula adherida y sedimento tomado de la cascada. Los diferentes puntos de muestreo se observan en el cuadro 3, numerados del sitio 1 a los sitios 4 y 5 (cascada). Las 42 muestras fueron procesadas y se obtuvieron un total de 27 crecimientos bacterianos (64 %) sembrados en el medio selectivo de estos se pudieron identificar 16 colonias bacterianas con características semejantes a las de *Legionella*. Por medio del análisis molecular por PCR se procesaron un total de 27 aislados, tuviesen o no, las características coloniales típicas del género estas muestras fueron ensayadas con los diferentes tipos de primers y los métodos que sugiere cada autor (Cuadro 3).

Cuadro 4. Resultados generales, características de las muestras positivas para morfología colonial y análisis de PCR.

Número de aislado	ID de muestra	Tipo de muestra	Número de muestreo	Morfología colonial compatible con <i>Legionella</i>	<i>L. pneumophila</i> identificada por PCR		
					Yong 2010	Bernarder 1997	Pascual 2001
1	1MM	Mm	1 ⁰	+	-	+	-
2	2all	Bf	1 ⁰	-	-	+	+
3	Cascada	Ba	1 ⁰	+	-	+	+
4	1al	Bf	1 ⁰	+	-	+	+
5	2c	S	1 ⁰	+	-	+	-
6	3MM	Mm	1 ⁰	-	-	-	-
7	2al	Bf	1 ⁰	+	-	-	-
8	2MM	Mm	1 ⁰	-	-	-	-
9	4all	Bf	1 ⁰	-	+	-	+
10	1b	Ba	1 ⁰	-	-	-	+
11	4all	Bf	1 ⁰	+	-	-	+
12	3b	Ba	1 ⁰	+	-	+	+
13	3c	S	1 ⁰	-	+	-	-
14	4b	Ba	1 ⁰	-	-	-	-
15	2b	Ba	1 ⁰	-	-	-	-
16	1c	S	1 ⁰	-	-	-	-
17	3all	Bf	1 ⁰	-	-	-	-
18	3all	Bf	1 ⁰	-	-	-	-
19	3al	Bf	2 ⁰	+	-	+	+
20	1b	Ba	2 ⁰	+	-	-	+
21	1al	Bf	2 ⁰	+	+	-	-
22	3b	Ba	2 ⁰	+	+	-	-
23	1c	S	2 ⁰	+	-	-	-
24	3c	S	2 ⁰	+	+	-	-
25	3 ^a	Ba	2 ⁰	+	-	-	-
26	4al	Bf	2 ⁰	+	-	+	-
27	ME cascada	Ba	2 ⁰	+	+	-	-
Totales positivas				16	6	8	9

Bf: Biopelícula flotante Ba: Biopelícula adherida S: Sedimento Mm: Muestra mixta de la columna de agua.

7.1 Análisis microbiológico

7.1.1 Cultivos bacterianos.

La presencia de *Legionella* spp. se determinó por el crecimiento de colonias bacterianas en medio selectivo BCYE así como la presencia de la morfología colonial típica para *Legionella* spp. considerando aquellas que presentaban formas y características parecidas a las del género *Legionella*. La mayoría de los crecimientos coloniales fueron evidentes de 3 a 6 días después de que estos habían sido sembrados e incubados (37°C). Las placas fueron incubadas hasta un máximo de 7 días después de sembradas, las que no presentaron crecimiento en este lapso de tiempo fueron descartadas según el protocolo del (NCID, 2005) para el cultivo de *Legionella*.

La mayor presencia de *Legionella* spp. en conjunto de ambos muestreos fue registrada para el sitio de muestreo 1 donde 6/10 muestras resultaron positivas; seguidas por el sitio de muestreo 3 con 4/10 muestras positivas los sitios 2 y 4 tuvieron menor cantidad de muestras positivas con 3/10 respectivamente, por lo que corresponde al muestreo realizado en el sitio de la cascada los resultados fueron positivos en ambos muestreos (Fig. 12). Con respecto al tipo de muestra las biopelículas flotantes (Bf) y las adheridas (Ba) fueron donde se encontró con más frecuencia la presencia de *Legionella* spp. (Cuadro 5).

Un análisis de la calidad de agua efectuado para cada sitio de muestreo mediante una medición de coliformes fecales totales muestra un resultado en promedio de 1 NMP (numero más probable) lo que indica que los cuerpos de agua tienen una buena calidad y la contaminación por materia fecal es casi nula y adecuada para el uso recreativo.

Cuadro 5. Tipo de muestras con crecimiento positivo y negativo de *Legionella* spp. en ambos muestreos, en los cuatro sitios de muestreo y la muestra (cascada) detectados mediante morfología colonial típica.

Muestreo	Tipo de Muestra	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Sitio 4
1°	Bf I	+	+	-	-
	Bf II	-	-	-	+
	Ba	+	-	+	-
	S	-	+	-	-
	Ma	+	-	-	-
	Cascada		+		
2°	Bf I	+	-	+	+
	Bf II	-	-	-	-
	Ba	+	+	+	-
	S	+	-	+	-
	Mm	-	-	-	+
	Cascada		+		

Tipo de muestras: Bf: Biopelícula flotante I y II de la cual fueron colectadas dos muestras de cada sitio por muestreo, Ba: Biopelícula adherida, S: Sedimento, Mm: muestra de mixta.



Figura 10. Placa de Petri con medio selectivo de agar BCYE enriquecido con cisteína mostrando la morfología colonial típica para *Legionella* spp. aislados a partir de las muestras de biopelículas del balneario natural de Hierve el Agua

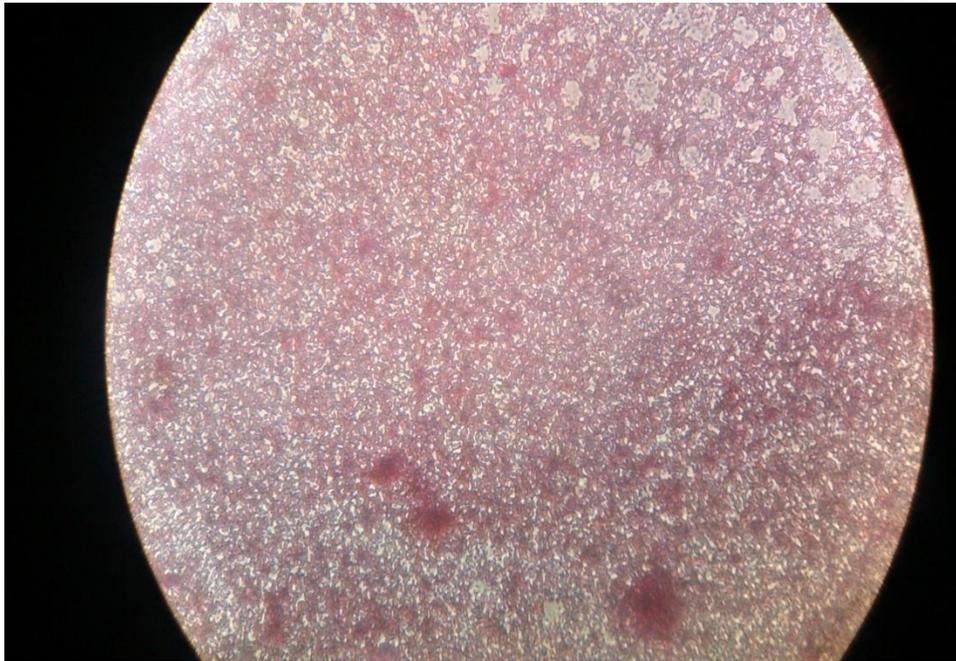


Figura 11. Morfología bacilar bacteriana de *Legionella* spp. tinción de Gram; 40x microscopio fotonico

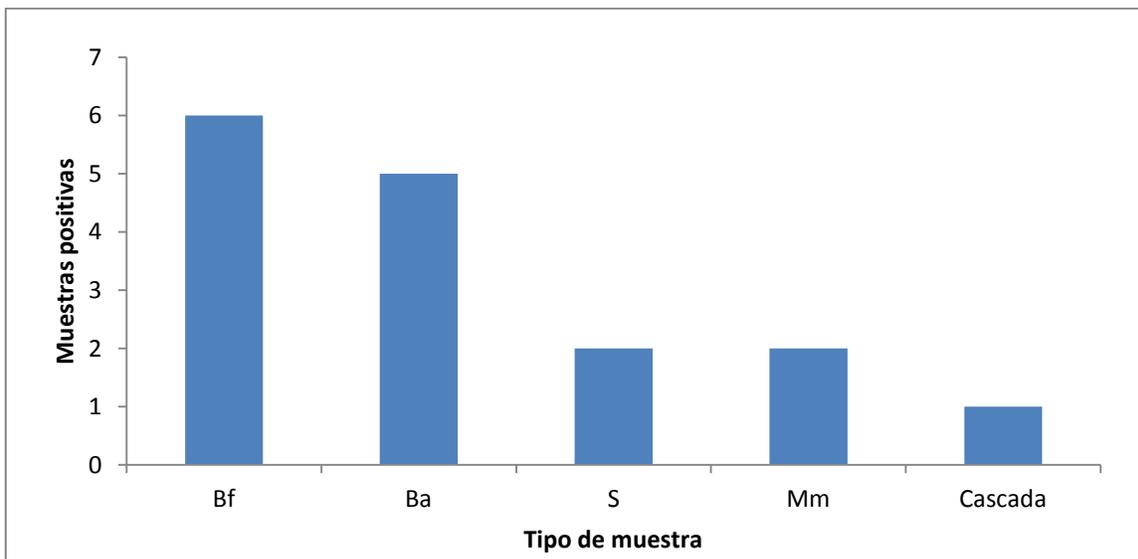


Figura 12. Tipo de muestras y numero de muestras positivas basadas en la detección de la morfología colonial típica el género (Bf: Biopelícula flotante, Ba: Biopelícula adherida, S: Sedimento, Mm: muestra mixta) registradas durante el primer y segundo muestreo.

7.2 Análisis de PCR

Las amplificaciones de DNA obtenidos durante el análisis de PCR fueron fragmentados con peso molecular de 232 pb pertenecientes al gen MIP, lo cual demostró la presencia de *L. pneumophila* en 18 de 27 (66.6 %) aislados bacterianos obtenidos previamente, 6 de estas 17 muestras fueron positivas para *L. pneumophila* serotipo 01 usando los primers específicos de 103 pb de Yong *et al.*, 2010 característicos del serotipo 01 (Cuadro 3). Todos los amplificados fueron analizados en geles de agarosa al 1.5% con un control positivo de DNA templado de la cepa *Legionella pneumophila* ATCC33152 Philadelphia ATCC (Manassas, VA).

Se obtuvo un total de 18 muestras positivas para *Legionella pneumophila*. La mayor presencia de *L. pneumophila* analizada por PCR fue registrada para el sitio de muestreo 3 donde 6/10 (60 %) muestras resultaron positivas; seguidas por el sitio de muestreo 1 con 5/10 (50%) muestras positivas, los sitios 2 y 4 tuvieron menor cantidad de muestras positivas con 3/10 (30%) cada uno el muestreo realizado en la cascada arrojó resultados positivos 2/2 (Cuadro 4). En cuanto al tipo de muestra las biopelículas flotantes y adheridas fueron donde se encontró con más frecuencia la presencia de *Legionella pneumophila* con un 50% y 62.5% de resultados positivos respectivamente, se registró una mayor detección de *Legionella* spp. durante el primer muestreo con 11/21 muestras positivas comparadas con 6/21 del segundo muestreo.

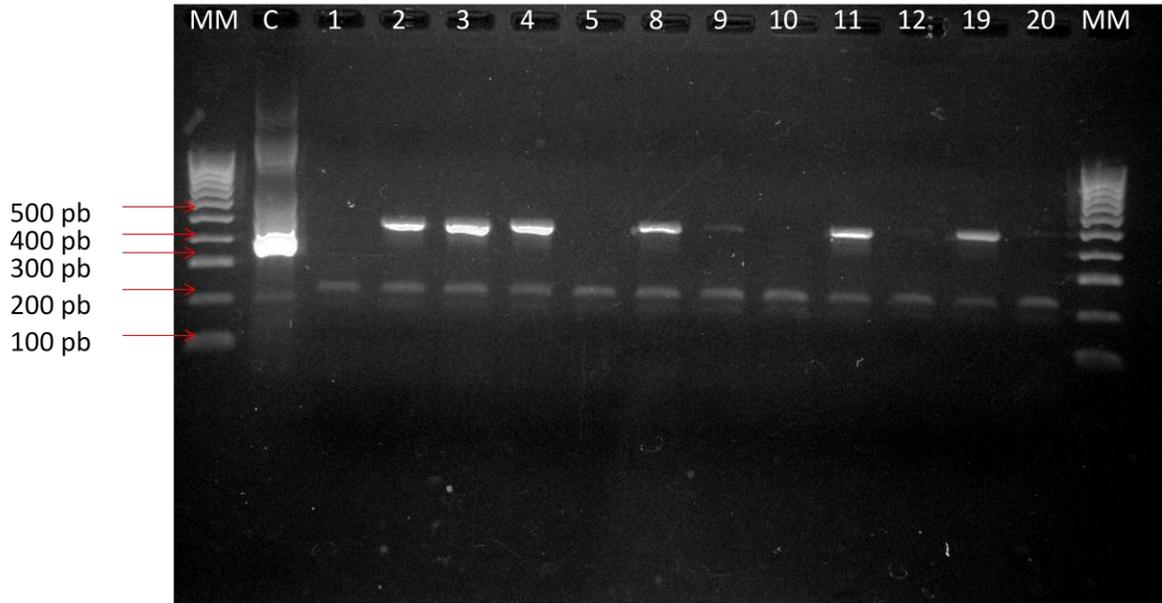


Figura 13. Electroforesis mostrando los amplificados obtenidos utilizando los primers de Pascual *et al.* 2001 en gel de agarosa al 1.5%. Marcador molecular (MM), Control (C), muestras positivas por No. de aislado: 2, 3, 4, 8, 9, 11, 12, 19, 20. Relación entre No. de aislado y característica de la muestra: 2-2all-Bf, 3-cascada-Ba, 4-1al-Bf, 8-MM2-Mm, 9-4all-Bf, 11-4all-Bf, 12-3b-Ba para el primer muestreo y 19-3al-Bf, 20-1b-Ba para el segundo muestreo

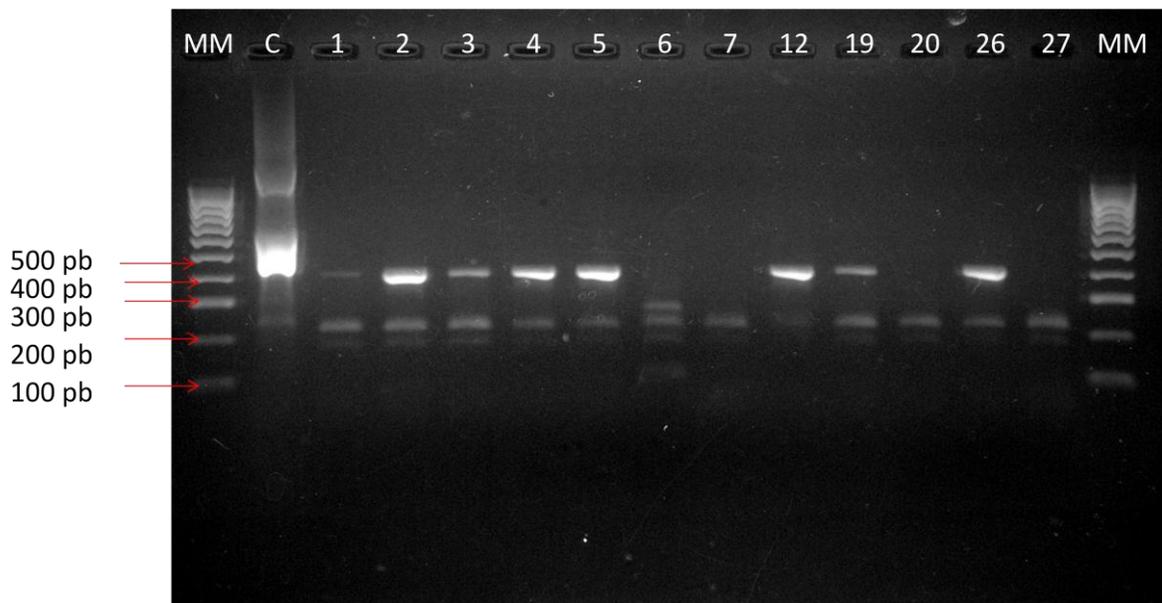


Figura 14. Electroforesis que muestra los amplificados positivos obtenidos utilizando los primers de Bernader *et al.*, 1997 en gel de agarosa al 1.5%. Control positivo (carril 1). Muestras positivas por No. de aislado: 1, 2, 3, 4, 5, 12, 19, 26. Relación entre No. de aislado y característica de la muestra: 1-MM1-Mm, 2-2all-Bf, 3-Cascada-Ba, 4-1al-Bf, 5-2c-S, 12-3b-Ba y para el segundo muestreo: 19-3al-Bf, 26-4al-Bf.

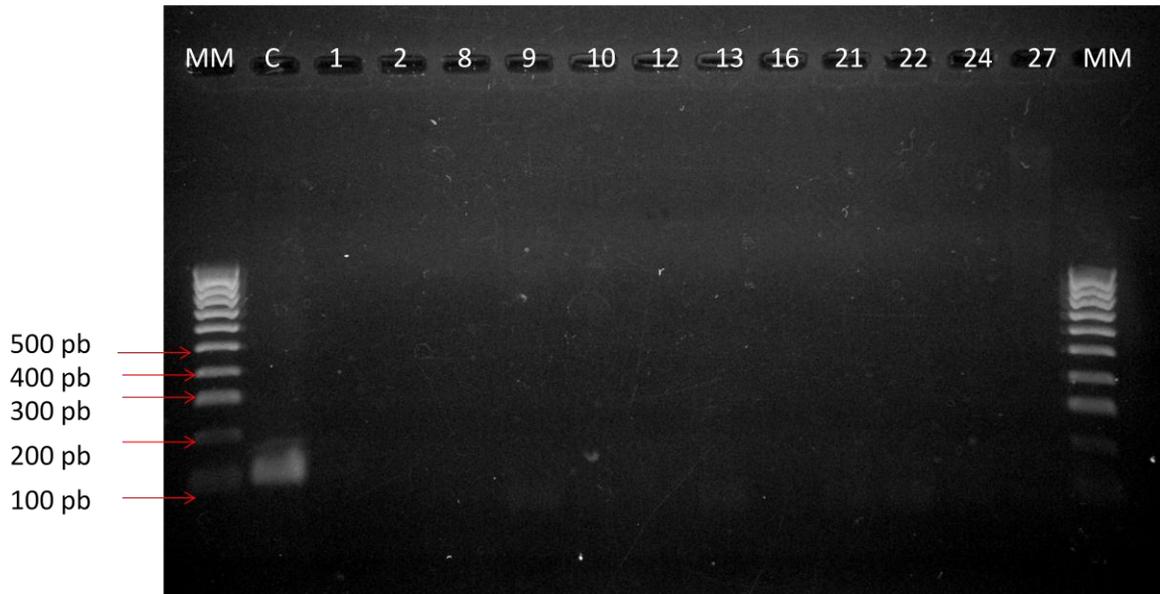


Figura 15. Electroforesis Mostrando los amplificadores positivos obtenidos utilizando los primer Yong *et al.* 2010 en gel de agarosa al 1.5%. Control (C). Muestras positivas por número de aislado: 9, 13, 21, 22, 24, 27. Relación entre No. de aislado y característica de la muestra: 9-4all-Bf, 13-3c-S para el primer muestreo y para el segundo muestreo 21-1al, 22-3b-Ba, 24-3c-S, 27-cascada-Ba.

7.3 Parámetros fisicoquímicos

Todos los parámetros medidos se sitúan dentro del rango en el que *Legionella* ha sido reportada, el resultado de las mediciones indican un ambiente propicio para el desarrollo y la proliferación de bacterias del género. En los cuadros 6 y 7 se observan los resultados generales de las mediciones realizadas en el primer y segundo muestreo.

Cuadro 6. Parámetros fisicoquímicos del agua de los sitios de muestreo y el sitio de muestreo la cascada en el primer muestreo.

Cuerpo de agua	pH	Temperatura del agua (°C)	Temperatura atmosférica (°C)	Conductividad (ms/cm ³)
1	7.2	24.9	25	9.9
2	7.8	23.0	25	9.1
3	8.4	22.2	25	8.5
4	7.3	23.4	25	9.4
5	6.9	23.1	25	9.9

Cuadro 7. Parámetros fisicoquímicos del agua de los sitios de muestreo y el sitio de muestreo de la cascada en el segundo muestreo.

Cuerpo de agua	pH	Temperatura °C del agua	Temperatura atmosférica (°C)	Conductividad (ms/cm ³)
1	6.2	28.1	21.3	10.6
2	6.6	24.4	21.3	9.5
3	6.2	24.6	21.3	8.6
4	6.5	24.2	21.3	10.4
5	6.3	24.1	21.3	10.1

7.3.1 Temperatura atmosférica

La temperatura atmosférica en promedio de cinco mediciones fue de 25 °C para el primer muestreo y de 21.32 °C para el segundo estas medidas se mantienen dentro de los intervalos óptimos que requiere *Legionella* spp. y *L. pneumophila* para su desarrollo y proliferación. El intervalo de las temperaturas (Fig. 16) entre ambos muestreos sugiere un cambio de 4 °C esto debido a que los muestreos se realizaron en diferentes temporadas (lluvias y secas).

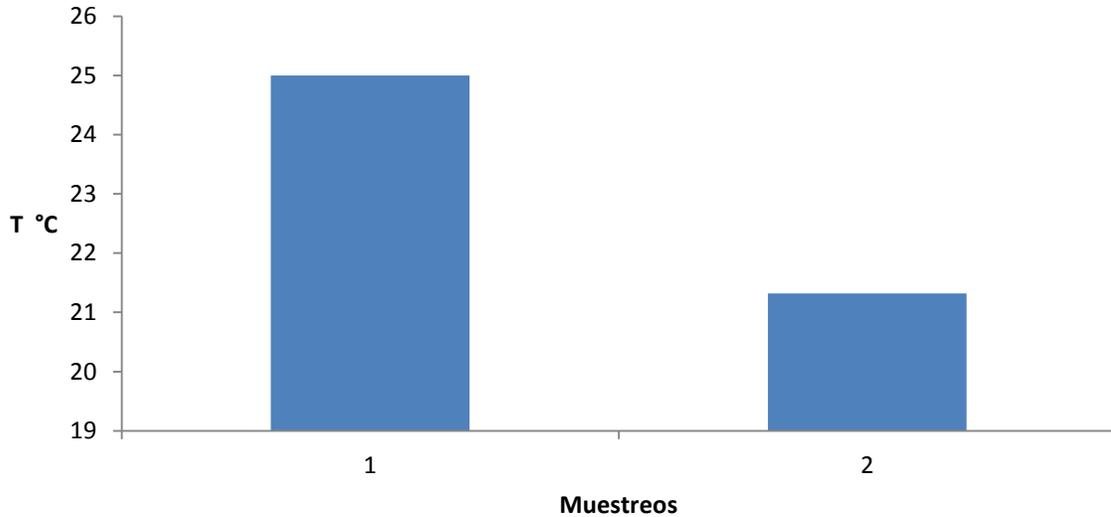


Figura 16. Temperaturas atmosférica registradas para ambos el primer y el segundo muestreos.

7.3.2 Temperatura del agua de los sitios de muestreo

La temperatura registrada en los sitios de muestreo son un factor que propicia y promueve el desarrollo y la proliferación de *Legionella*, las temperaturas mínimas registradas en el agua para el primer y segundo muestreo estuvieron entre 22.2 y 24.1 °C medidas en los sitios 3 y 5 respectivamente y las máximas fueron de 24.9 °C y 28.1 °C ambas tomadas en el sitio 1, esto debido a que en este lugar es donde el agua emana a la superficie, habiendo un intervalo entre las temperaturas máximas y mínimas de 2.7 °C en el primer muestreo y otro de 4 °C en el segundo lo cual denota una pequeña diferencia entre ellas (Fig. 17). El intervalo de temperaturas entre muestreos fue de 1.3 °C siendo esta una diferencia mínima.

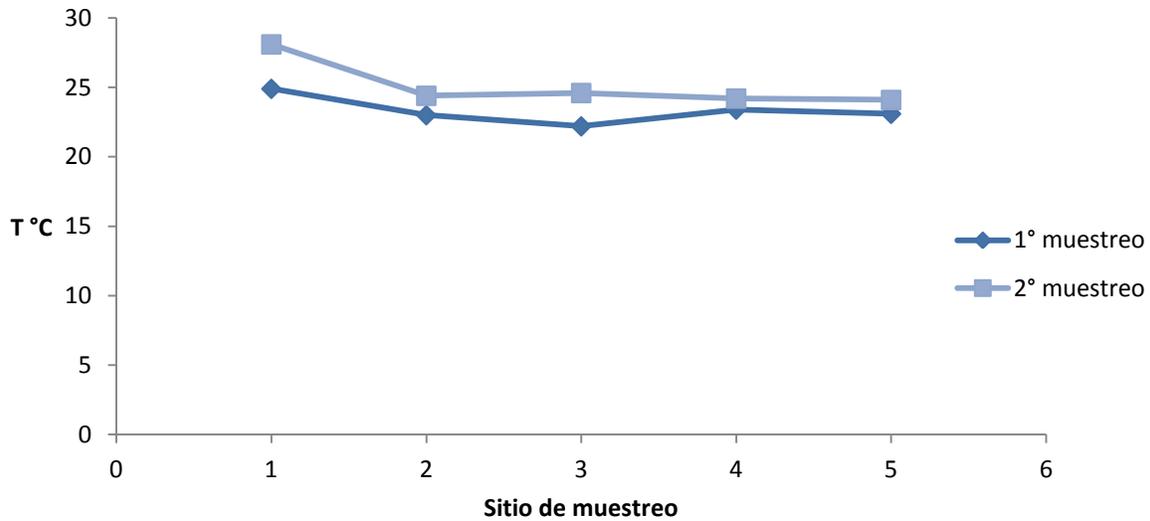


Figura 17. Temperaturas del agua registradas para cada sitio de muestreo en el primer y segundo muestreo

7.3.3 pH

El pH mínimo registrado en el primer muestreo fue de 6.93 en el sitio 5 y el máximo registrado fue de 8.43 en el sitio 3 habiendo un intervalo de 1.50. El registro mínimo para el segundo muestro fue de 6.17 en el sitio 1 y el máximo registrado fue de 6.63 para el sitio 2 con un intervalo de 0.46. Estos ambitos (Fig. 18) se encuentran dentro del rango óptimo para el crecimiento de *Legionella*

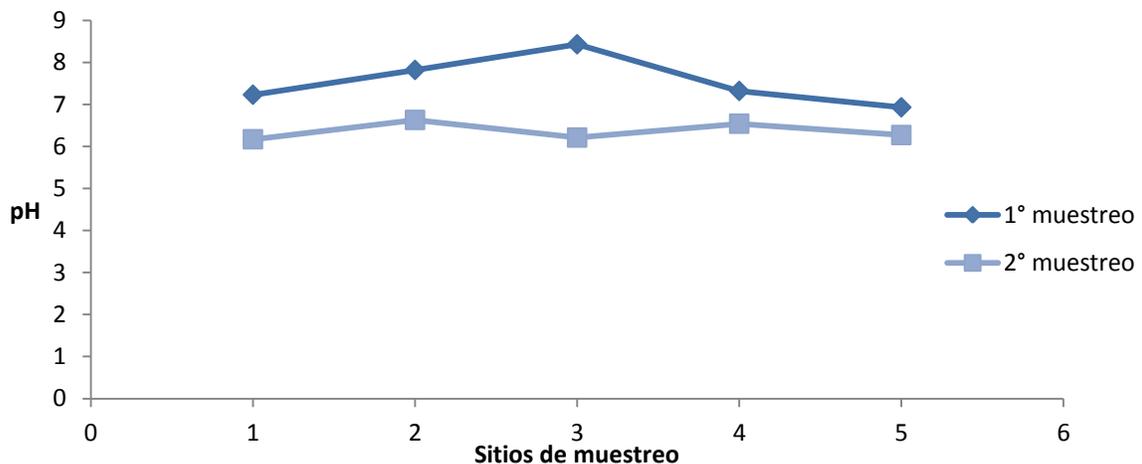


Figura 18. Medidas de pH registradas para los diferentes sitios de muestreo en el primer y segundo muestreos

7.3.4 Conductividad

Las medidas de conductividad encontradas se encuentran en el ámbito de tolerancia de *Legionella* siendo 9.90 a 8.50 ms/cm³ de los sitios 3 y 1 respectivamente los cuales marcan el rango para el primer muestreo con un intervalo de 1.40 ms/cm³. Para el segundo muestreo el ámbito fue de 8.6 a 10.6 ms/cm³ del sitio 3 y 1 respectivamente marcando un intervalo de 2 ms/cm³ entre ambos (Fig. 19).

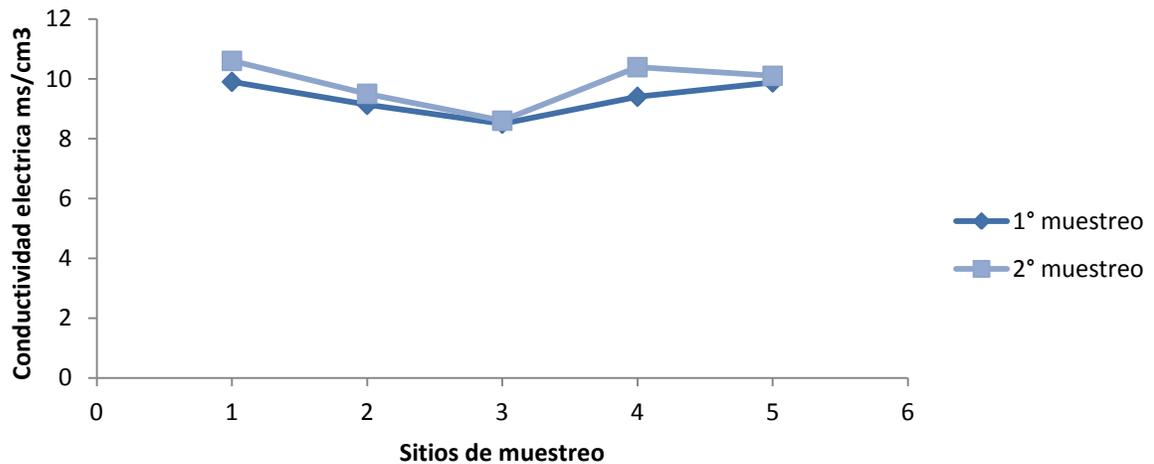


Figura 19. Conductividad registrada para los diferentes sitios de muestreo en el primer y segundo muestreo.

8. DISCUSIÓN

De los 27 aislados bacterianos obtenidos, 16 resultaron positivos como *Legionella* spp. identificados mediante la observación de las características coloniales sin embargo, solo 3 de estos 16 aislados presentaban la morfología típica del género la cual es convexa, circular de color blanco a gris brillante con una textura parecida al vidrio esmerilado, mismas que crecieron a los tres o cuatro días después de que fueron sembradas aunque se dejaron crecer hasta los 7 días que marca el protocolo (NCID, 2005), los 11 restantes presentaban una morfología atípica aunque se desarrollaron bien en el medio selectivo BCYE para *Legionella*, adicionado con cisteína, la incubación tuvo la misma duración para estas colonias atípicas que tenían características distintas, no presentaban las formas de crecimiento circular que presenta el género, éstas mostraban un crecimiento no uniforme y ninguna forma reconocible, muchas de ellas presentaban la textura característica con una consistencia ligeramente viscosa y la coloración que presentaba la mayoría de ella era de blancas brillantes a grises tenues aunque hubo dos de ellas que denotaban un color marrón y otra de color verde-amarillo.

Los resultados de las amplificaciones de los 27 aislados analizados por PCR para confirmar la presencia del gen de patogenicidad MIP y del gen LPG0744 coincidieron en un 81.25% con las muestras en cultivo con crecimiento positivo, 13 de 16 colonias pertenecían al género *Legionella pneumophila* utilizando las diferentes metodologías (Bernarder *et al.*, 1997; Pascual *et al.* 2001; Bej *et al.* 1991), la taxonomía de seis de estos aislados de *Legionella* spp. fue confirmada como de organismos pertenecientes al género y especie *L. pneumophila* serotipo 1 por el método de Yong *et al.*, (2010) con los primers lpg0744. Yu *et al.* 2002 encontraron que *L. pneumophila* serogrupo 1 es responsable del 80 al 90 % de los casos la enfermedad del legionario. Por otra parte en una serie de estudios de América del Norte y Europa Occidental, del 1 al 13% de todos los casos de neumonía están asociados con este patógeno (Broome *et al.*, 1983). Aunque la identificación de especies de *Legionella* y sus diferentes serogrupos es importante para la gestión clínica y ambiental, así como el análisis epidemiológico, algunas pruebas moleculares rápidas pueden diferenciar los aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1 de otros serogrupos, así como *L. pneumophila* de otras especies de *Legionella*. Antes de

la determinación de las secuencias del genoma de *Legionella*, se han identificado los genes que eran específicos para *L. pneumophila* por hibridación experimental de sustracción genómica de *L. pneumophila* con *L. micdadei*. Dos blancos surgieron como potencialmente útiles para discriminar serogrupos de *Legionella* basados en el hecho de que lpg0774 (lpp0839), se asoció con la región de la biosíntesis de LPS del serogrupo 1 (Yong *et al.*, 2010)

La presencia de los amplicones obtenidos del gen MIP para la identificación de *Legionella* spp. sirvió para comprobar de los resultados obtenidos de las observaciones de la morfología colonial de *Legionella*. Por lo tanto, la utilización de la amplificación del gen MIP es un método confiable que representa una herramienta útil para identificar aislados de muestras clínicas y ambientales de *L. pneumophila* y especies de *Legionella* (Haroon *et al.*, 2011). Por otra parte la amplificación del gen MIP utilizando la técnica de PCR anidado puede ser ventajoso en la construcción de una prueba de identificación rápida de muestras para su confirmación con aumento de especificidad y sensibilidad (Bernarder *et al.*, 1996). Este método de PCR anidado obtuvo resultados positivos para *L. pneumophila* recolectada de bioaerosoles en un estudio previo, aun cuando las muestras en los medios de cultivo selectivo dieron resultados negativos (Pascual *et al.*, 2001).

En cuanto al tipo de muestra, con los resultados de los aislados bacterianos se comprobó la importancia de las biopelículas para el género *Legionella* porque en las biopelículas flotante (Bf) y las adheridas (Ba) fue donde se encontraron con más frecuencia bacterias del género *Legionella* spp, ya que la naturaleza de estos medios implica que la bacteria es capaz de obtener el suministro necesario de aminoácidos y el carbono orgánico de ese mismo ambiente, además de la protección a cambios ambientales y biocidas, más específicamente del consorcio microbiano situado en las biopelículas (Declerck, 2010). *Legionella* spp. coloniza biopelículas existentes y prolifera en altos números (Rogers *et al.*, 1994).

Se considera que todos los sitios son cuerpos de agua poco contaminados aptos para el uso recreativo y con una baja cantidad de nutrientes, esto puede ser un factor favorable

para la presencia y el crecimiento de los organismos del género ya que *Legionella* spp. se detecta comúnmente en ambientes oligotróficos acuáticos (bajo contenido de nutrientes), esto por otra parte también puede favorecer a la formación de las biopelículas (Declerck, 2010). En comparación con las biopelículas flotantes, las biopelículas adheridas pueden ser vistas como un sistema de nutrientes adecuado para la mayor replicación y proliferación de bacterias heterótrofas (Hsu *et al.*, 2011). El sitio de muestreo 1 es el segundo lugar con mayor presencia de *Legionella* a pesar de que este no está al alcance de la actividad humana, y es allí, uno de los lugares donde el agua emana a la superficie. Esto sugiere que *Legionella* spp. puede provenir de las aguas subterráneas y aportes atmosféricos, como se ha propuesto previamente (Sakamoto *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2005; Parthuisot *et al.*, 2010).

En el sitio 3 de muestreo se encontró la mayor presencia de *Legionella* donde 60% de las muestras resultaron positivas, en particular este sitio es un cuerpo de agua más pequeño en, comparación con el sitio 2 y 4, además presentaba mayor estancamiento promoviendo la propagación de microflora comensal y azolve de sedimentos ya que el agua contenida en ese sistema tiene una menor circulación. La colonización de los sistemas de agua por especies de *Legionella* depende de una combinación de los factores antes mencionados (Abu *et al.* 1998).

Investigadores de todo el mundo han informado de que la presencia de *Legionella* en el ambiente acuático depende del espectro de organismos protozoos en particular de amebas de vida libre (Greub y Raoult, 2004). Otros autores también han demostrado que *Legionella* dentro de las amebas de vida libre (AVL) en biopelículas flotantes se detectan con mayor frecuencia que en las biopelículas adheridas. Esto sugiere que las condiciones de nutrientes y la presencia de AVL influyen en la presencia y supervivencia de *Legionella* (Hsu *et al.*, 2011). Condiciones de nutrientes bajas y alta prevalencia de AVL dentro de las biopelículas flotantes puede llevar a que *Legionella* se establezca en estos protozoos (Taylor *et al.*, 2009). Un ejemplo de lo anterior es, la incapacidad de *Legionella* para utilizar L-cisteína que puede actuar como un factor limitante en el crecimiento extracelular (Ewann y Hoffman, 2006). *Legionella* dentro de las AVL representan un riesgo significativo para la salud humana, ya que al estar en el medio intracelular para su multiplicación, se encuentran con frecuencia en las biopelículas flotantes, de modo que más fácilmente

puede formar aerosol, aumentando así el riesgo de difusión del microorganismo por inhalación humana pudiendo llegar mas fácilmente a los usuarios del balneario. *Legionella* en el medio intracelular en AVL puede causar sinergia debido a que su capacidad de resistir a desinfectantes al igual que para resistir la destrucción por los macrófagos humanos (Fritsche *et al.*, 1998).

La presencia de *Legionella* spp. en el área de estudio está relacionada a las condiciones físicoquímicas que este hábitat ofrece en particular, la temperatura la conductividad y el pH registrados son ideales. *Legionella* está presente en forma ubicua tanto en ambientes de agua dulce naturales como antropogénicos, donde pueden soportar temperaturas de 5 a 63 °C y un intervalo de pH de 5-9 (Atlas, 1999). Huang *et al.*, en 2010 demostraron la incidencia de *Legionella* en muestras de agua de manantial con intervalos de pH de 5-6, 6-7, 7-8 y 8-9 fue del 50 % (1/2), 46,2% (6/13), 31,0% (13/42) y 0% (0/15), de muestras positivas respectivamente, no observaron especies de *Legionella* en el agua de manantial con un pH del 8-9. Sin embargo, Ohno *et al.*, en 2003 encontraron que el pH óptimo para *Legionella* en un ambiente acuático varió de 6-8 y que la mayor supervivencia de *Legionella* fue evidente en un microcosmos de agua caliente ajustada a pH 8,0, un hallazgo que era incompatible con el resultado de Katz y Hammel *et al.*, 1987 quienes prueban que el pH es un factor importante para la supervivencia de *L. pneumophila* al demostrar que la bacteria muestra una disminución de 2 log después de una incubación de 1 mes en agua del grifo con un pH 4,0 a 7,0, pero una disminución de 6 log en pH 8,0.

En el presente estudio la mayor presencia de *Legionella* se obtuvo del sitio de muestreo 3 (Figura 18) el cual tuvo valores de pH de 8.43 en el primer muestreo y 6.21 en el segundo este cambio puede deberse a la diferencia de temporadas en que se llevaron a cabo los muestreos (húmedas o secas) ya que en temporada de lluvias (húmedas) debido a la geomorfología del lugar pudo haber un gran aporte de agua de origen fluvial modificando así el pH del sitio. El pH de 8.43 del primer muestreo sobrepasa significativamente los márgenes establecidos por los autores que se mencionan anteriormente la supervivencia de *Legionella* en este medio poco óptimo puede deberse a la presencia de AVL y a los microambientes que ofrecen las biopelículas al igual que a un mayor estancamiento del agua promoviendo la proliferación de la microflora comensal y azolve de sedimentos (Abu *et al.* 1998). ya que el agua que contiene el sitio 3 tiene una menor circulación por otra

parte Atlas *et al.*, (1999) propone un intervalo de pH de 5-9 para el crecimiento óptimo de *Legionella* spp.

Con respecto a la temperatura del agua, los intervalos registrados (Figura 17) que van de 22.2 °C a 28.1° C caen en el valor óptimo de temperatura para el desarrollo de las bacterias del género *Legionella* lo cuales concuerdan con el estudio de Huang *et al.*, (2010), en el cual se reporta que las especies de *Legionella* se distribuyeron en agua con temperaturas de 22.7-48.6° C. *Legionella* mantiene sin problemas su actividad metabólica hasta una temperatura de 42° C aunque su cultivabilidad desciende, sin embargo, con temperaturas más bajas también mostraron una supervivencia más larga sin pérdida potencial de cultivabilidad, lo que sugiere que este género puede haber evolucionado para adaptarse a ambientes acuosos a bajas temperaturas, aunque la temperatura de crecimiento preferida en medio de laboratorio es 36 °C. En otro estudio Kusnetsov *et al.*, (1996) reportan que el crecimiento celular y la actividad metabólica disminuyeron notablemente en todas las cepas de *L. pneumophila* a temperatura por encima de 45 °C; Sin embargo, la actividad metabólica fue todavía posible a 51.6 °C, más allá de la temperatura máxima para el crecimiento celular. Por otro lado Huang *et al.*, (2010) demostraron que la cultivabilidad de *L. pneumophila* en agua termal a 45 y 50 °C se pierde más rápidamente que a los 42 °C y se pierde completamente la actividad metabólica a los 50 °C.

La conductividad medida en los sitios de muestreo se ajusta al rango de tolerancia de *Legionella* spp. reportada por Ohno *et al.* 2003 en donde se demuestra que *L. pneumophila* podría mantener la actividad metabólica estando en agua con una concentración de sales casi similar a la del agua marina sin embargo, tanto el cultivabilidad y la actividad metabólica de *L. pneumophila* se pierden rápidamente en agua destilada esterilizada. Además, la dilución con agua destilada esterilizada de dos muestras de agua caliente de manantial disminuyó la capacidad de supervivencia de *L. pneumophila* en función de la tasa de dilución (Huang *et al.*, 2010). No está claro qué factor causó este fenómeno; Sin embargo, algunos minerales han sido conocidos por jugar un papel importante en el metabolismo bacteriano (Huang *et al.*, en 2010). Las medidas de conductividad tomadas en los cuatro sitios de muestreo (Figura 19), la

mayoría de ellas arriba de los 9 ms/cm³, sugiere que estos sitios tienen una cantidad considerable de minerales disueltos un factor importante en el desarrollo de *L. pneumophila*. Aunque el efecto de los minerales en la supervivencia de *L. pneumophila* es aún desconocido, States *et al.*, 1985 mostraron que los niveles más bajos de ciertos minerales, tales como hierro, zinc, y el potasio son factores importantes en la supervivencia y el crecimiento de *L. pneumophila* en agua del grifo en contraste, los niveles más altos de minerales son tóxicos.

9. CONCLUSIONES

Se determinó la presencia de bacterias del genero *Legionella* spp. en el agua y biopelículas del balneario natural “Hierve el Agua” en el Estado de Oaxaca en dos muestreos efectuados a lo largo de un año.

Mediante la utilización de la técnica de cultivo en medio selectivo BCYE enriquecido con cisteína, se logró detectar la presencia de *Legionella* spp. mostrando colonias morfológicamente similares a las descritas para el género *Legionella* además se reporta por primera vez la presencia de bacterias patógenas del género *Legionella* spp. en el estado de Oaxaca.

Aislados bacterianos con formas coloniales similares a las típicas del género en los cultivos microbiológicos identificadas como *Legionella* spp. fueron confirmadas por PCR punto final y anidado como pertenecientes a la especie *L. pneumophila*, algunas de las cuales fueron aproximadas al serotipo 1 correspondiente al grupo más virulento del género.

Se estableció que no existe relación directa de *Legionella* spp. con los parámetros fisicoquímicos medidos para cada sitio de muestreo, los resultados demostraron que eran condiciones ideales para la bacteria al estar entre los intervalos que la misma requiere y no se muestra una diferencia significativa.

La presencia de esta bacteria en el balneario sugiere un riesgo potencial de infección especialmente en personas inmunodeprimidas, por lo que *Legionella* debe ser monitoreada constantemente ya que las condiciones físicas y químicas de este tipo de ambiente facilitan el desarrollo de estas bacterias.

BIBLIOGRAFÍA

Abu Kwaik Y., Gao L.Y., Stone B.J., 1998 Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl Environ Microbiol*; **64**: 3127–3133.

Amano, K., y Williams, J. C. 1983. Peptidoglycan of *Legionella pneumophila*: apparent resistance to lys-ozyme hydrolysis correlates with a high degree of peptide cross-linking. *J. Bacteriol.* **153**, 520–526.

Atlas, R.M. (1999). *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Applied Environ. Microbiol.* **1**: 283–293.

Bej, A. K. M. Mahbubani y Atlas R. M. 1991. Detection of variable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Applied Environ. Microbiol.*, p. 597-600.

Bernander S., Hanna-Stina H., Bo J. y Lars-Victor S., 1997. A nested polymerase chain reaction for detection of *Legionella pneumophila* in clinical specimens 'Department of Clin. Microbiol., Stockholm, Sweden *Clin. Microbiol. and Infec.*, **3** (1): 1- 7pp.

Bozeman, F. M., Humphries, J. W. y Campbell, J. M. 1968. A new group of rickettsia-like agents recovered from guinea pigs. *Acta Virologia* **12**, 87-93.

Brenner, D. J., Feeley, J. C. y Weaver, R. E. 1984. Family *Legionellaceae*. In *Bergey's*, .. En: Krieg, N. R. y Holt, J. G . *Manual of Systematic Bacteriology* Baltimore: Williams & Wilkins. **1**: 279-288 pp.

Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Gormang, W., Wilkinson, H. W., Bibb, W . F., Hackelm, .., Tyndall R. L., Campbell J., Feeley J. C., Thacker W. L., Skaliy P., Martin T., Brake B. J., Fields B. S., Mceachern H. V. y Corcoranl K. 1985. Ten new species of *Legionella*. *Int. J. Syst. Bact.* **35**, 50-59.

Broome, C.V. 1983 Current issues in the epidemiology of legionellosis. In: *Legionella* ^ Proceedings Second International Symposium (Thornsberry, C., Balows, A., Feeley, J.C. and Jakubowski, W., Eds.), pp. 205-209. *American Society for Microbiology Press*, Washington, DC.

Brown A., Garrity G. M. y Vickers R. M. 1981. *Fluoribacter dumofii* (Brenner *et al.*) comb. nov. and *Fluoribacter gormanii* (Morris *et al.*) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **31**, (11) 1-15.

Catalan, V., F. Garcia, C. Moreno, M. J. Vila, and D. Apraiz. 1997. Detection of *Legionella pneumophila* in wastewater by nested polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.* **148**:71–78.

Cianciotto, N. P., B. I. Eisenstein, C. H. Mody, y N. C. Engelberg. 1990. A mutation in the mip gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. *J. Infect. Dis.* **162**:121-126.

Cianciotto, N. P., B. I. Eisenstein, C. H. Mody, G. B. Toews, and N. C. Engelberg. 1989. A *Legionella pneumophila* gene encoding a species specific surface protein potentiates initiation of intracelular infection. *Infect. Immun.* **57**:1255-1262.

Cianciotto, N. P., Bangsberg, J. M., Eisenstein, B. I., y Engleberg, N. C. 1990. Identification of mip-like genes in the genus *Legionella*. *Infect. Immun.* **58**, 2912–2918.

Cohen J, Powderly 2010. WG. *Infectious Disease*. 2 vols. 3a ed. China: *Mosby Elsevier*, p. 1750-1752.

Costa, J., I. Tiago, M. S. da Costa, y A. Verissimo, 2005. Presence and persistence of *Legionella* spp. in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:663–671.

Declerck, P. 2010. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol.* **12**(3), 557–566

Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V., and Ollevier, F. 2007 Detection of *Legionella pneumophila* and some of its amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Res* **41** : 3159–3167.

Diederer, B. M. W. 2008. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J. Infect.* **1**:1-12.

Dusserre, E., C. Ginevra, S. Hallier-Soulier, F. Vandenesch, G. Festoc, J. Etienne, S. Jarraud, y M. Molmeret, 2008. A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable *Legionellae* that can recover their cultivability. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:4817–4824.

Engelberg, N. C., Carter, D. R., Weber, N. P. Cianciotto, y B. I. Eisenstein. 1989. DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect. Immun.* **57**:1263-1270.

Ewann, F., Hoffman, P.S., 2006. Cysteine metabolism in *Legionella pneumophila*: characterization of an L-cysteine-utilizing mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3993-4000.

Fields, B.S., Benson, R.F., Besser, R.E., 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* **15** (3), 506–526.

Fischer G., Bang H., Ludwig B., Mann K., Hacker J., 1992 Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl- *cis/trans* isomerase (PPIase) activity. *Mol Microbiol* **6**:1375–1383

Forbes, B.A., Sham D.F., 2009. Diagnostico microbiológico de Bailey y Scott. 12^a ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 424-428 .

Fox, A., Lau, P., Brown A., Morgan S. L., Zhu Z -T., Lena M., y Wallam D., 1984. Capillary gas chromatographic analysis of carbohydrates of *Legionella pneumophila* and other members of the family *Legionellaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **19**, 326- 332.

Fox, A., Rogers, J. C., Fox, K. F., Schnitzer, G., Morgan, S. L., Brown A. y Aono, R. 1990. Chemotaxonomic differentiation of *Legionellae* by detection and characterisation of aminodideoxyhexoses and other unique sugars using gas-chromatography- mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 546- 552.

Fox, K. F. y Brown A. 1989. Partial sequence analysis of the 16S rRNA of *Legionellae*: taxonomic implications. *Systematic and Applied Microbiology* **11**, (135) 1-39.

Fritsche, T.R., Sobek, D., Gautom, R.K., 1998. Enhancement of in vitro cytopathogenicity by *Acanthamoeba* spp. following acquisition of bacterial endosymbionts. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**, 231-236.

Fry, N. K., Warwick, S., Saunders, N. A. y Embley, T.M. 1991. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. *J. Gen.Microbiol.***137**: 1215–1222.

Gabay, J. E., Blake, M., Niles, W.Finnerty, W. R., Makula, R. A., y Feeley, J. C. 1979. Cellular lipids of the Legionnaires' disease bacterium. *Ann. Intern. Med.* **90**, 631–634.

Galli, M.G., Tesauro, M., Bianchi, A., Pregliasco, F., Consonni, M. 2007 5-Year surveillance for *Legionella pneumophila* and comparison of disinfection methods in two hospitals of Milan. *Ann. Ig.* **19** (6), 533-540.

Garduño, R. A., Garduño, E., y Hoffman, P. S. 1998. Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect. Immun.* **66**, 4602–4610.

Garduño, R.A., Garduño, E., Hiltz, M., Hoffman, P.S., 2002. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives increase to a differentiation form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect. Immun.* **70**, 6273-6283.

Greub, G. y Raoult, D., 2004. Micro-organisms resistant to freeliving amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 413–433.

Heuner, K., y Albert-Weissenberger, C. 2008. *Legionella Molecular Biology*. Norfolk: Caister Academic Press. **5**: 133-139

Hewitt William P., Marcus C. Winter, y David A. Peterson, 1987. Salt Production at Hierve el agua, Oaxaca. *American Antiquity.* **52** (4) pp. 799-816.

Hsu Bing-Mu , Chin-Chun Huang , Jung-Sheng Chen, Nai-Hsiung Chen, Jen-Te Huang. 2011. Comparison of potentially pathogenic free-living amoeba hosts by *Legionella* spp. in substrate-associated biofilms and floating biofilms from spring environments water research *Elsevier* **45**: 5171-5183 pp.

Instituto de Geología Universidad Nacional Autónoma de México. http://www.geologia.unam.mx/igl/index.php?option=com_content&view=article&id=363:hierveelagua&catid=186:ventanas&Itemid=174 (consultada 1 de septiembre de 2012).

Isberg R. R., O'Connor T.J., Heidtman M., 2009 *Nat Rev Microbiol* **7**:13–24

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA 2010. *Microbiología Médica*. 25 ed. Mexico D.F.; Mc Graw Hill; 281-283 pp.

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

Karr D. E., Bibb.W. F. y Moss C. W. 1982. Isoprenoid quinones of the genus *Legionella*. *J. Clin. Microbiol.* **15**: 1044-1048.

Katz, S. M., y J. M. Hammel. 1987. The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Ann. Clin. Lab Sci.* **17**:150–156.

Köhler R. Steinert M. Fanghänel J., König B., Lüneberg E., Frosch M., Rahfeld J-U, Hilgenfeld R., Fischer G., Hacker J., 2003. Biochemical and functional analyses of the Mip protein: Influence of the N-terminal half and of peptidyl-prolyl-*cis* / *trans*-isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **71**:4389–4397

Krinos, C., High, A. S., y Rodgers, F. G. 1999. Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 237–244.

Kusnetsov, J. M., E. Ottoila, y P. J. Martikainen. 1996. Growth, respiration, and survival of *Legionella pneumophila* at high temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* **81**:341–347.

Lennette H. E., 1982. *Microbiología clínica*. 3ra ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; p. 390-397

Lindsay Diane S. J., William H. Abraham, y Ronald J. Fallon, 1994. Detection of mip Gene by PCR for Diagnosis of Legionnaires' Disease. *Environ. Microbiol. Minireview. Environmental Microbiology* (3), 557–566.

Lucas, C. E., Brown, E., y Fields, B. S. 2006. Type IV pili and type II secretion play a limited role in *Legionella pneumophila* biofilm colonization and retention. *Microbiology* **152**, 3569–3573.

Lück, P. C., 2010. *Legionella dresdenensis* sp. nov., isolated from river water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**:2557–2562.

Mandell G.L., Benett J.E., Dolin R., 2005. *Principles and practice of infectious diseases*. 2 vols. 6ta ed. Philadelphia: Elsevier; p. 2711-2721

Marin, V. I. y Montes, L. D. 1991. Neumonía por *Legionella pneumophila*. Informe de un caso. *Inv. Med. Int.* **17** (4): 205-209.

Mérault N., Rusniok C., Jarraud S., Gomez-Valero L., Cazalet C., Marin M., Brachet E., Aegerter P., Gaillard J. L., Etienne J., Herrmann J. L., Lawrence C., Buchrieser C., 2011. Specific Real-Time PCR for Simultaneous Detection and Identification of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in Water and Clinical Samples. *Appl Environ Microbiol* 77(5):1708. doi:10.1128/AEM.02261-10

Metapathogen Portal de internet (Home page en internet) EUA: Metapathogen; 2012 (consultada el 30 de enero de 2013). Disponible en <http://www.metapathogen.com/legionella/>

Molmeret, M., M. Horn, M. Wagner, M. Santic, and Y. Abu Kwaik. 2005. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:20–28.

Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A., 2006. *Microbiología Medica*. 5ta ed. Madrid: Elsevier;. p.391-395

National Center for Infectious Diseases (NCID) 2005. Procedures for the recovery of *Legionella* from the Environment. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Atlanta, GA. USA. 13p.

Ohno Akira, Naoyuki Kato, Koji Yamada, y Keizo Yamaguchi 2003. Factors Influencing Survival of *Legionella pneumophila* Serotype 1 in Hot Spring Water and Tap Water Applied And Environmental Microbiology, *American Society for Microbiology.* **69** (5): 2540–2547

Palmer, C. J., Tsai Y. L., Paszko-Kolva C., Mayer C. y Sangermano L. R., 1993. Detection of *Legionella* species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3618–3624.

Palmeri O. J. 2001 *Enfermedades Infecciosas* Mc Graw-Hill Intenamericana, 293-295 pp.

Parthuisot N., N. J. West, P. Lebaron and J. Baudart 2010. Effects Impact of Seasonal and Anthropogenic *Legionella* spp. in a Pristine River and High Diversity and Abundance of *Appl. Environ. Microbiol.* , **76** (24): 8201.

Perea E.J., 1992. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Tomo 2. Barcelona: Ed Doyma;. p. 691-697

Reinhar M, Youset AK, Bartlett C., 2002. *Legionella*. Washington DC: *American society for microbiology*;. p. 1-9, 31-36

Riboldi-Tunncliffe, A., Konig, B., Jessen, S., Weiss, M. S., Rahfeld, J., Hacker, J., Fischer, G., y Hilgenfeld, R. 2001. Crystal structure of Mip, a prolyl isomerase from *Legionella pneumophila*. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 779–783.

Robey, M., y Cianciotto, N. P. 2002. *Legionella pneumophila* feo-AB pro-motes ferrous iron uptake and intra-cellular infection. *Infect. Immun.* **70**, 5659–5669.

Rodríguez G. J. A., Picazo J. J., 1996. *Microbiología médica Tomo I: Microbiología General*. Madrid: Harcourt brace;. p. 271-277

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.

Rossier, O., y Cianciotto, N. P. 2005. The *Legionella pneumophila* tat-B gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection. *Infect. Immun.* **73**: 2020–2032.

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., Moreno G. S., 2005. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Madrid: Médica Panamericana;. p. 419-424

Sakamoto, R., A. Ohno, T. Nakahara, K. Satomura, S. Iwanaga, Y. Kouyama, F. Kura, N. Kato, K. Matsubayashi, K. Okumiya, and K. Yamaguchi. 2009. *Legionella pneumophila* in rainwater on roads. *Emerg. Infect. Dis.* **15**:1295–1297.

Schuelein R., Desmond K., Ang Y., Lan R., Van D., Hartland L. E., 2011. Immune control of *Legionella* infección: an in vivo perspective. *Frontiers in Microbiology*.; **126** (2): 1-6

Secretaría de Turismo (SECTUR) Oaxaca
http://www.revistabuenviaje.com/conocemexico/destinos/oaxaca/hierveagua/hierve_el_agua.php (Consultada el 29 de agosto del 2012).

Segal G., Shuman H. A., (1999). *Infect Immunology* **67**:2117–2124

Shevchuk O., Jäger J., Steinert M., 2001. Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope. *Frontiers in Microbiology*.; **74** (2): 1-12

Stackebrandt E., Murray R. G. E. y Truper H. G. 1988. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the ‘purple bacteria and their relatives’. *International J. System. Bacteriol.* **38**: 321-325.

States, S. J., L. F. Conley, M. Ceraso, T. E. Stephenson, R. S. Wolford, R. M. Wadowsky, A. M. McNamara, y R. B. Yee. 1985. Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:1149–1154.

Stone, B. J., y Abu Kwaik, Y. 1998. Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect. Immun.* **66**: 1768–1775.

Tatlock, H. 1944. A rickettsia-like organism recovered from guinea pigs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **57**: 95-99.

Taylor, M., Ross, K., Bentham, R., 2009. *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microb. Ecol.* **58**: 538-547.

Templeton, K. E., Scheltinga, S. A., Sillekens, P., Crielaard, J. W., van Dam, A. P., Goossens, H., Claas, E. C. 2003. Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 4016–4021.

Thanassi D.G., Bliska J.B., Christie P.J., 2012. *FEMS Microbiol Rev* **36**:1046–1082

Villaseñor, I. R. y Saipan, L. A., 2004. La enfermedad de los legionarios. *Boletín Epidemiología.* **8** (22): 1-3

Viswanathan, V. K., Edelstein, P. H., Pope, C. D., y Cianciotto, N. P., 2000. The *Legionella pneumophila* ira-AB locus is required for iron assimilation, intracellular infection, and virulence. *Infect. Immun.* **68**: 1069–1079.

Weisberg W. G., Dobson M. E., Samuel J. E., Dasch G. A., Mallavia L. P., Baca, O., Mandel Col., Sechrest J. E., Weiss E. y Woese C. R. 1989. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J. Bacteriol.* **171**: 4202-4206.

Wieland H., Faigle M., Lang F., Northoff H., Neumeister B., 2002. Regulation of the *Legionella* mip promotor during infection of human monocytes. *FEMS Microbiol Lett* **18**:127–132

Wingender Jost, Hans-Curt Flemming 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **214**: 417– 423

World Health Organization, 2007. *Legionella* and the prevention of Legionellosis. WHO Library Catalogin-Publication Data.252 p.

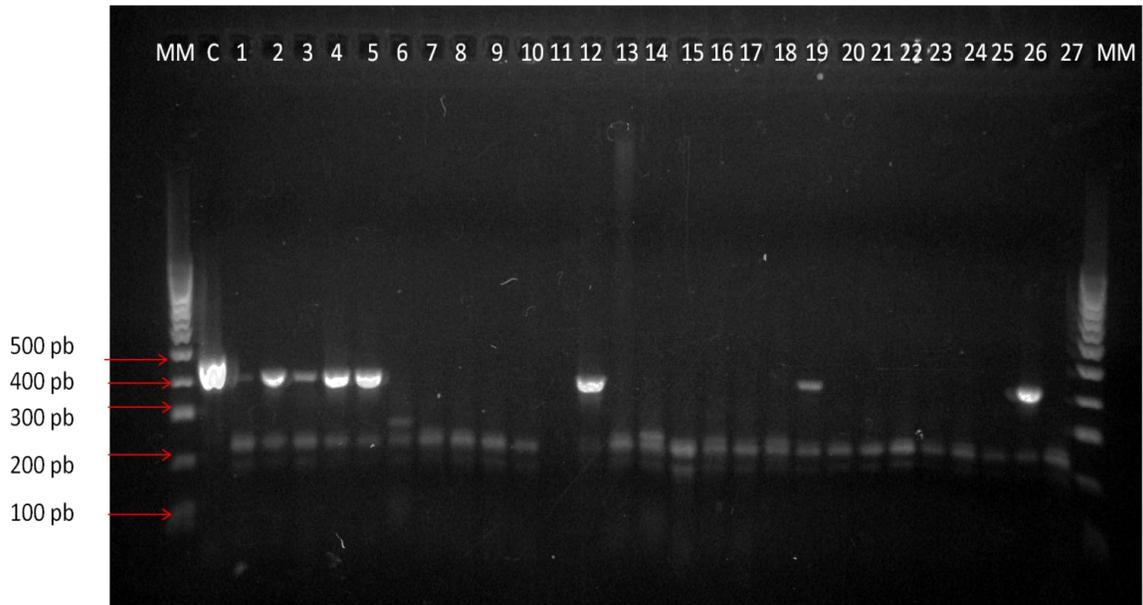
Yamamoto, H., Y. Hashimoto, y T. Ezaki. 1996. Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **20**:149–154.

Yang, G. R. Benson, T. Pelish, E. Brown, J. M. Winchell y B. Fields. 2009. Dual detection of *Legionella pneumophila* and *Legionella* species by real-time PCR targeting the 23S-5S rRNA gene spacer región. Respiratory Diseases Branch, Division of Bacterial Diseases, CDC, Atlanta, GA, USA. *Journal Compilation 2009 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI*, **16**: 255–261.

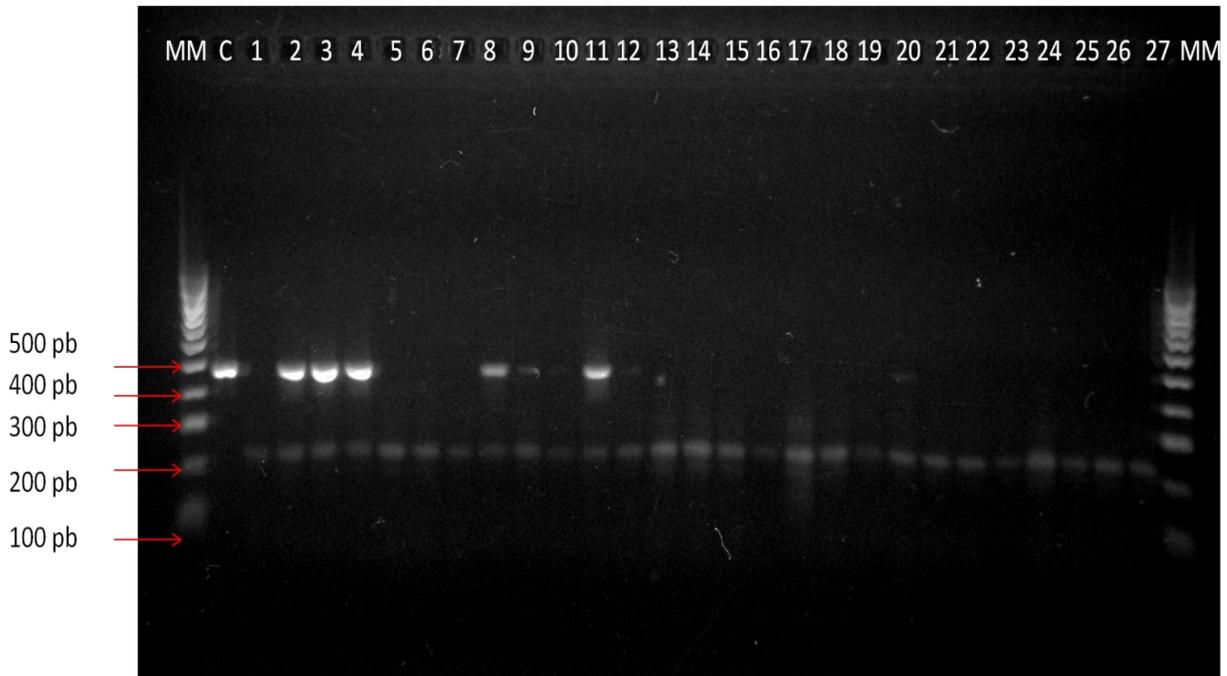
Yong Stacey F. Y., Shin Hwa Tan, Joanne Wee, Jing Jhi Tee, Fiona M. Sansom, Hayley J. Newton y Elizabeth L. Hartland 2010. Molecular detection of *Legionella*: moving on from mip. *Frontiers in Microbiology.* **1** : 1-123

Yu V. L., Plouffe J. F., Pastoris M. C., Stout J. E., Schousboe M., Widmer A., Summersgill J., File T., Heath C. M., Paterson D. L., Cheresky A., 2002. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis*; **186**: 8-127.

ANEXO



Electroforesis que muestra el total de amplificados obtenidos utilizando los primers de Bernarder *et al.*, 1997 en gel de agarosa al 1.5%. Control positivo (carril 1). Muestras positivas por No. de aislado: 1, 2, 3, 4, 5, 12, 19, 26. Relación entre No. de aislado y característica de la muestra: 1-MM1-Mm, 2-2al-Bf, 3-Cascada-Ba, 4-1al-Bf, 5-2c-S, 12-3b-Ba y para el segundo muestreo: 19-3al-Bf, 26-4al-Bf.



Electroforesis mostrando el total de amplificados obtenidos utilizando los primers de Pascual *et al.* 2001 en gel de agarosa al 1.5%. Marcador molecular (MM), Control (C), muestras positivas por No. de aislado: 2, 3, 4, 8, 9, 11, 12, 19, 20. Relación entre No. de aislado y característica de la muestra: 2-2all-Bf, 3-cascada-Ba, 4-1al-Bf, 8-MM2-Mm, 9-4all-Bf, 11-4all-Bf, 12-3b-Ba para el primer muestreo y 19-3al-Bf, 20-1b-Ba para el segundo muestreo