



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

Legionella spp. en las biopelículas formadas
por un géiser en el Estado de Hidalgo, México.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A

PRESENTA:
MELISA CITLALLI LAUREANO GALLARDO

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ELVIA MANUELA GALLEGOS NEYRA



Los Reyes Iztacala. Mayo, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México a través de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por abrirme sus puertas y dejarme ser una puma más.

A los miembros del comité revisor: Dr. Erasmo Negrete Abascal, M. en C. Arturo Calderón Vega, Dra. Elvia Manuel Gallegos Neyra, M. en C. Gloria Luz Paniagua Contreras y M. en C. Eric Monroy Pérez por su valiosa ayuda y observaciones para la realización de este trabajo.

Muy especialmente al M. en C. Arturo Calderón Vega por su capacitación y asesoramiento en las técnicas moleculares y por los magníficos muestreos al géiser.

Al Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras por su ayuda y asesoramiento en la fotodocumentación de geles y asesoramiento en técnicas moleculares.

A mi mamá académica Elvia Gallegos, porque aparte de ser mi directora de tesis fue mi amiga a lo largo de este proyecto. Gracias por confiar en mí, por compartir tus conocimientos y por aumentar mi pasión por el maravilloso mundo de los parásitos. Yo también te quiero mucho!!!

A todos mis profesores de carrera que con su enseñanza, exigencia y amistad me guiaron a lo largo de la carrera a ser mejor estudiante.

A mi mamá por estar conmigo siempre y apoyarme en la difícil búsqueda de universidades, por brindarme todo su amor, cariño y enseñarme que la escuela es como un juego (aún más las matemáticas). Por enseñarme el respeto a mis profesores y soportar los momentos difíciles que la vida nos ha puesto enfrente. Gracias Nani.

A mi papá por apoyarme en las decisiones profesionales que he tomado y por ser un ejemplo para mí desde que era una niña.

A mi mayor regalo que hasta ahorita la vida me ha dado... mi hermano, por aguantarme al hablar de términos "raros" y por acompañarme hasta altas horas de la noche cuando este trabajo se estaba construyendo.

A todos y cada uno de los integrantes del laboratorio de Patógenos Emergentes que coincidieron conmigo en tiempo y espacio, haciendo más amenas las horas que llevaban las técnicas que hacía. América, Arturo e Iraís, muchas gracias.

A mis ángeles en la escuela: Tania, Areli y Karla. Gracias por dejarme ser parte de ustedes desde el primer semestre y porque sin ustedes las horas en clase, en la biblioteca y las prácticas de campo, simplemente no hubieran sido lo mismo. Las amo.

Gracias a todos mis compañeros de los grupos 53, 06 y 02 generación 2006-2009 por enseñarme el valor de la competencia, por valorar mi trabajo y por tener una sonrisa para mí en todos y cada uno de los momentos dentro y fuera del salón de clases. ¡Mucho éxito a todos!

Para finalizar quiero agradecer a todas aquellas personas que la vida puso en mi camino y que a lo largo de todas las etapas de mi vida, enriquecieron mi conocimiento del mundo que está fuera de las cuatro paredes de un salón de clases.

DEDICATORIAS

A DIOS, por ser el máximo líder y creador de este mundo. Por haberme otorgado la capacidad de pensar y ser la persona que soy. Porque gracias a mi carácter una vez terminado este ciclo me pondré nuevas metas y sé que Él me dará los recursos y herramientas para alcanzarlas. Por llenarme de bendiciones cada día y poner a mis ángeles en los momentos que más los he necesitado.

A MIS PADRES ROSITA Y AARÓN, porque desde niña soñé en que llegara el día de presentarles una Tesis, esto es por ustedes y para ustedes. Los amo.

A MI HERMANO OSCAR, por compartir tantos y tantos momentos y por dejarme ser un ejemplo para ti. Te quiero muchísimo, esto también es para ti ;)

A MI ABUELITA LOLITA †, aunque ya no estés conmigo sabes que siempre te llevo en mi mente y corazón, y sé que cada imagen de mis prácticas de campo que guardaba en mi memoria, llegaban a ti con el fervor con que te las mandaba. Gracias por compartir conmigo tu interés hacia el maravilloso mundo que nos rodea, en especial el de las plantas y por hacer que me convirtiera en una naturalista desde hace años... hoy toda una Bióloga. Con cariño y respeto te dedico este libro.

A MI FAMILIA, por ser el pilar fundamental para el desarrollo de una persona. Gracias a todos por su apoyo y cariño.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Historia de la bacteria <i>Legionella</i> spp.....	2
1.2 Taxonomía	3
1.3 Especies de <i>Legionella</i> de importancia médica	4
1.4 Características generales de <i>Legionella</i> spp.	5
1.5 Características de crecimiento	5
1.6 Legionelosis y Fiebre de Pontiac.....	6
1.7 Factores de riesgo.....	8
1.8 Patogenia	8
1.9 Ecología	9
1.10 Transmisión.....	11
1.11 Epidemiología.....	12
1.12 Diagnóstico	13
1.13 Tratamiento de la legionelosis	14
1.14 Información estadística.....	14
2. ANTECEDENTES.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. OBJETIVOS	22
5. ÁREA DE ESTUDIO	23
5.1 Tecozautla, Hidalgo.....	23
5.2 Balneario “El géiser”	23
5.3 Protozoos presentes en el sistema hidrotermal “El Géiser”	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27

6.1	Recolecta de las muestras	27
6.2	Registro de parámetros fisicoquímicos <i>in situ</i> del agua y biopelículas	32
6.2.1	Temperatura interna de las biopelículas (°C)	32
6.2.2	Temperatura del agua (°C)	32
6.2.3	Temperatura atmosférica (°C)	32
6.2.4	pH del agua	33
6.2.5	Conductividad eléctrica (mS/cm ³) del agua.....	33
6.3	Detección microbiológica de <i>Legionella</i> spp.	33
6.4	Identificación morfológica de colonias del género <i>Legionella</i>	33
6.5	Identificación de la morfología bacilar de <i>Legionella</i> spp.	34
6.6	Registro fotográfico	34
6.7	Identificación molecular de <i>Legionella pneumophila</i>	34
6.7.1	Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	35
7.	RESULTADOS	37
7.1	Crecimientos bacterianos y tinciones	39
7.2	Identificación molecular de los aislados bacterianos.	41
7.3	Parámetros fisicoquímicos del agua y biopelículas.....	43
7.3.1	Temperatura de las biopelículas (°C).....	43
7.3.2	Temperatura atmosférica (°C)	45
7.3.3	pH del agua	46
7.3.4	Conductividad eléctrica (mS/cm ³) del agua.....	46
8.	DISCUSIÓN.....	48
8.1	Identificación de <i>Legionella</i> spp. y <i>L. pneumophila</i>	48
8.2	Características de las biopelículas.	48
8.3	Parámetros físicoquímicos del agua y biopelículas.	49
8.4	Asociación de las bacterias del género <i>Legionella</i> con protozoos hospederos.....	51

8.5 Riesgo de infección por <i>Legionella</i> spp. o <i>L. pneumophila</i>	52
9. CONCLUSIONES	55
10. RECOMENDACIONES	57
LITERATURA CITADA	59
ANEXOS.....	64

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especies de <i>Legionella</i> conocidas actualmente.	4
Cuadro 2. Especies de <i>Legionella</i> de importancia médica.	4
Cuadro 3. Manifestaciones clínicas de enfermedad por <i>Legionella</i>	7
Cuadro 4. Factores de virulencia conocidos para <i>Legionella</i>	9
Cuadro 5. Especies de <i>Legionella</i> aisladas de fuentes humanas y ambientales.	10
Cuadro 6. Distribución de <i>Legionella</i> spp. y <i>L. pneumophila</i> en cada muestreo.....	37
Cuadro 7. Características de las muestras y resultados obtenidos en los tres muestreos.	38
Cuadro 8. Porcentajes de la presencia de <i>Legionella</i> spp. y <i>L. pneumophila</i>	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colonias de <i>Legionella</i> spp. crecidas en agar BCYE.....	6
Figura 2. Casos reportados de neumonía por <i>Legionella pneumophila</i> en pacientes europeos con visitas a países de América Latina y Canadá.....	16
Figura 3. Casos de neumonías por grupo de edad y sin agente etiológico reportados por las principales dependencias del Sector Salud de México.....	17
Figura 4. Localización del balneario “El Géiser”.....	24
Figura 5. Balneario “El Géiser” en el Estado de Hidalgo.....	24
Figura 6. Géneros amebianos identificados en el agua del balneario “El Géiser”.....	25
Figura 7. Paredes periféricas del géiser y área de muestreo de biopelículas.....	28
Figura 8. Representación esquemática de las paredes periféricas del géiser y los puntos de muestreo de biopelículas y aerosoles.....	28
Figura 9. Detalle de los sitios de muestreo de biopelículas fijas.....	29
Figura 10. Detalle de los sitios de muestreo de biopelículas fijas.....	29
Figura 11. Detalle de los sitios de muestreo de biopelículas fijas.....	30
Figura 12. Detalle de los sitios de muestreo de biopelículas fijas.....	30
Figura 14. Vista del sitio de muestreo de biopelículas fijas a la vegetación.....	31
Figura 15. Placas de Petri con crecimientos coloniales de <i>Legionella</i> spp. obtenidos a partir de muestras de biopelículas sembradas en agar BCYE enriquecido con cisteína...39	
Figura 16. Microscopía de luz por campo brillante de bacilos Gram negativos pertenecientes a <i>Legionella</i> spp.....	40
Figura 17. Acercamiento de microfotografía tomada a 40X de bacilos Gram negativos de <i>Legionella</i> spp.....	40
Figura 18. Acercamiento de microfotografía tomada a 40X de bacilos Gram negativos de <i>Legionella</i> spp.....	41
Figura 19. Electroforesis de fragmentos amplificados por PCR para <i>Legionella pneumophila</i> pertenecientes al primer muestreo.....	42
Figura 20. Electroforesis de fragmentos amplificados por PCR para <i>Legionella pneumophila</i> pertenecientes al primer muestreo.....	42

Figura 21. Electroforesis de fragmentos amplificados por PCR para <i>Legionella pneumophila</i> pertenecientes al segundo muestreo.	43
Figura 22. Valores de la temperatura interna de las biopelículas en cada uno de los tres muestreos.	44
Figura 23. Intervalos de temperaturas donde se obtuvieron crecimientos de <i>Legionella</i> spp. y <i>L. pneumophila</i>	44
Figura 25. Valores de pH para cada una de las muestras correspondientes al segundo y tercer muestreo respectivamente.	46
Figura 26. Valores de conductividad en mS/cm ³ para cada una de las muestras correspondientes al segundo y tercer muestreo respectivamente.	47

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATCC	Colección americana de cultivos
BCYE	Agar extracto de levadura y carbón activado
CDC	Centros para el control y la prevención de enfermedades
HCl	Ácido clorhídrico
KCl	Cloruro de potasio
MIP	Potenciador de infectividad a macrófagos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

RESUMEN

Las bacterias del género *Legionella* se pueden encontrar en ambientes naturales y artificiales, ya sea en forma libre planctónica, como parásito intracelular de protozoos o como parte de biopelículas establecidas en esos ambientes. Las infecciones humanas, principalmente atribuidas a la especie *L. pneumophila*, son resultado de la inhalación de aerosoles contaminados con estas bacterias. En México se ha mencionado la posible ocurrencia de dos pacientes con diagnóstico clínico de neumonía por *Legionella* spp. sin pruebas de laboratorio confirmatorias y ninguno con el aislamiento del agente causal. El objetivo de este trabajo fue identificar la presencia de *Legionella* spp. en las biopelículas formadas por un géiser en el Estado de Hidalgo. Se recolectaron muestras de agua, biopelículas y aerosoles del géiser en estudio y se midieron los parámetros de: temperatura interna de las biopelículas, temperatura atmosférica, pH y conductividad del agua. Se obtuvieron 50 aislados de *Legionella* spp. que crecieron en medio BCYE. La identificación de *Legionella* spp. se realizó buscando la forma característica de crecimiento colonial de la bacteria sobre el agar selectivo. La confirmación taxonómica a nivel de especie se realizó por PCR, amplificando un fragmento de 232 pb del gen MIP de *L. pneumophila*, 14 muestras fueron positivas para ésta especie. Los genomas positivos pertenecen a muestras de agua, biopelículas y aerosoles. Se reporta por primera vez en México el aislamiento de la bacteria patógena *Legionella pneumophila* a partir de muestras ambientales procedentes de un sistema hidrotermal en el estado de Hidalgo. *Legionella* spp. se encuentra presente en las diversas biopelículas del lugar, por lo que su presencia sugiere un riesgo potencial de infección por estos microorganismos especialmente en personas mayores o inmunodeprimidas que recurren a estos lugares como terapia alternativa. La detección de este microorganismo en México puede aumentar la sospecha de legionelosis en el medio hospitalario y en los grupos de riesgo, así como el establecer información para su vigilancia epidemiológica y obtener una oportuna acción del personal de la salud en caso de un probable brote de la infección.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia de la bacteria *Legionella* spp.

En julio de 1976, en la ciudad de Filadelfia, Pensilvania, tuvo lugar la Convención de la Legión Americana en el Hotel Bellevue Stratford en los Estados Unidos. Días después del evento, 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 (López-Merino, 2006). 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 enfermos, McDadey y Shepard, microbiólogos de los CDC, consiguieron aislar un bacilo Gram negativo que fue inoculado en cobayos y embriones de pollo (Huerta-Torrijos *et al.*, 1995; Ortiz de Villajos, 2002). La bacteria se desarrolló libre de los antibióticos y agentes descontaminantes iniciales y los microorganismos fueron utilizados como antígeno para probarlo por inmunofluorescencia indirecta con los sueros de pacientes dando positivo en 101 de 111 de las muestras. Así se identificó por primera vez en 1977 a la bacteria *Legionella pneumophila* como la causa del brote de neumonía que ocasionó 34 muertes en la Convención de Legionarios de 1976, por lo cual se denominó “enfermedad de los legionarios” (Villaseñor y Sapián, 2004). Durante más de 20 años, se han descrito brotes comunitarios en países de la Unión Europea, los Estados Unidos y otros países más, asociados a fuentes ornamentales, aparatos de nebulización, excavaciones y especialmente a torres de refrigeración (Delgado-Viscogliosi *et al.*, 2005; Declerck *et al.*, 2007; Konishi *et al.*, 2006; Sabria *et al.*, 2006).

En las tres últimas décadas, se ha identificado como enfermedad emergente a la producida por *Legionella*, considerándola como un padecimiento relacionado a un nuevo agente etiológico o con factores causales ya conocidos, pero que recientemente ha adquirido un carácter epidémico dado que ocurren en regiones donde no se había reportado su aparición o se convierten en amenaza. Entre las enfermedades

consideradas como emergentes o re-emergentes se encuentran las enfermedades bacterianas (legionelosis, enfermedad de Lyme, campilobacteriosis y *Helicobacter pylori*), virales (VIH, Ébola, hepatitis B y C), parasitarias (criptosporidiosis, ciclosporidiosis) y otras de difícil clasificación como las encefalopatías espongiiformes (priones) (Kershenovich, 2010).

1.2 Taxonomía

La familia Legionellaceae contiene solo un género: *Legionella*. Estudios recientes utilizando el ARNr 16S confirman a ésta familia como un grupo monofilético dentro de la subdivisión gamma de las Proteobacterias (Fields *et al.*, 2002).

Reino: Bacteria.

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Legionellales

Familia: Legionellaceae

Género: *Legionella*

El número de especies y serogrupos de las legionelas continúa en aumento. Actualmente se conocen más de 50 especies (Cuadro 1) y 70 distintos serogrupos en el género *Legionella* (Costa *et al.*, 2005). Para *L. pneumophila* se conocen 15 serogrupos y 2 en cada una de las siguientes especies: *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. feeleii*, *L. hackeliae*, *L. sainthelensi*, *L. spiritensis*, *L. erythra* y *L. quinlivanii*. Para el resto de las especies se conoce un solo serogrupo. Aproximadamente la mitad de las especies conocidas han sido asociadas a enfermedades humanas mejor conocidas como legionelosis, siendo *Legionella pneumophila* la responsable de más del 90 % de los casos reportados, seguida por *L. longbeache*, *L. bozemanii*, *L. dumoffiii* y *L. micdadei*. El serogrupo 1 de los 15 descritos para *L. pneumophila* es el responsable de más del 80 %

de las infecciones en los humanos, así como el más frecuente en el ambiente (Villaseñor y Sapián, 2004; Darby y Buising, 2008; Diederer, 2008; Declerck, 2009).

Cuadro 1. Especies de *Legionella* conocidas actualmente (Diederer, 2008).

<i>L. adelaidensis</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 Especies de *Legionella* de importancia médica

Legionella pneumophila es la bacteria prototipo del grupo. Las legionelas patógenas para el hombre se enumeran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Especies de *Legionella* de importancia médica primaria (Jawetz *et al.*, 1990)

Especie	Neumonía	Fiebre de Pontiac
<i>L. pneumophila</i>	+	Serogrupos 1 y 6
<i>L. micdadei</i>	+	-
<i>L. gormanii</i>	+	-
<i>L. dumoffii</i>	+	-
<i>L. bozemanii</i>	+	-
<i>L. longbeachae</i>	+	-
<i>L. wadsworthii</i>	+	-
<i>L. jordanis</i>	+	-
<i>L. feeleii</i>	+	+
<i>L. oakridgensis</i>	+	-

(+) Especies que causan enfermedad en los seres humanos.

(-) Especies de las que no se ha reportado su infección en humanos.

1.4 Características generales de *Legionella* spp.

+

Las bacterias del género *Legionella* son bacilos Gram negativos con un promedio de 0.5 a 1 µm de ancho y de 2 a 5 µm de largo, llegando a formar bacilos filamentosos de hasta 100 µm de largo (Jawetz *et al.*, 1990; Huerta *et al.*, 1995). Son aerobios y poseen un flagelo para desplazarse (Keith *et al.*, 1990). Son microorganismos no esporulados ni capsulados, que requieren cisteína y hierro para crecer y multiplicarse. Todos los miembros de la familia Legionellaceae producen catalasa y son relativamente inertes desde el punto de vista bioquímico. *L. pneumophila* es asacarolítica, oxidasa negativa, ureasa negativa, y es capaz de producir la hidrólisis del hipurato (García-Rodríguez y Picazo, 1999).

Las legionelas son capaces de sobrevivir en un amplio ámbito de condiciones físico-químicas, se multiplican entre los 20 a 45 °C, y se destruyen a 70 °C. Su temperatura óptima de crecimiento es de 35 a 37 °C (Forbes *et al.*, 2004).

1.5 Características de crecimiento

Las legionelas se desarrollan en medios complejos como el agar con extracto de levadura y carbón activado amortiguado (ELCA) con α-cetoglutarato, el agar-extracto de levadura y carbón activado (BCYE) y el medio semiselectivo para el crecimiento de *Legionella pneumophila* (BMPA-α) (Jawetz *et al.*, 1990). De forma típica, las colonias de especies de *Legionella* crecen después de 2 a 3 días de incubación, su tamaño es variable y puntiforme con un tamaño de 1 a 4 mm; son brillantes, convexas, circulares, levemente irregulares y tienen un borde entero. Tienen una apariencia de vidrio esmerilado, adquiriendo un color aperlado (Koneman *et al.*, 1992; NCID, 2005). Su color varía desde transparente hasta rosa pálido o azul iridiscente, son traslúcidas o moteadas (Fig. 1).

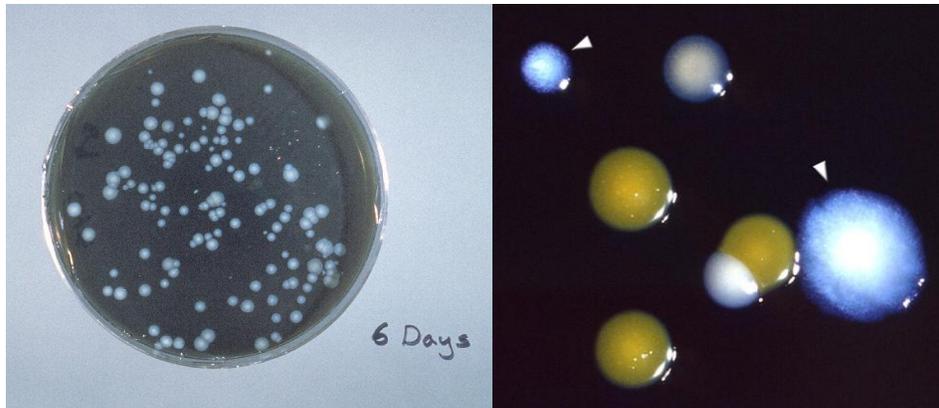


Figura 1. Colonias de *Legionella* spp. crecidas en agar BCYE con seis días de incubación a 36 °C. Fotografías obtenidas en <http://phil.cdc.gov/phil/gov/home.asp>.

Las legionelas son microorganismos positivos a la catalasa. *L. pneumophila* es positiva a la oxidasa; las otras legionelas son variables en cuanto a la actividad de la oxidasa. *L. pneumophila* hidroliza el hipurato, no así las otras legionelas. La mayor parte de estos microorganismos producen gelatinas y β -lactamasa; *L. micdadei* no produce estas enzimas (Jawetz *et al.*, 1990).

1.6 Legionelosis y Fiebre de Pontiac

Existen dos formas clínicas, en función del tipo de afectación y el pronóstico de la enfermedad:

1. Legionelosis o enfermedad del legionario: neumonía atípica grave, que es el prototipo de la infección causada por *Legionella*.
2. Fiebre de Pontiac: cuadro seudogripal autolimitado que aparece en pacientes que no tienen alterada la inmunidad.

La legionelosis comienza bruscamente con un cuadro de neumonía inespecífica tras un período de incubación de 2 a 10 días y es caracterizada por malestar general, cefalea, mialgias y debilidad. Después de 24 horas ocurren escalofríos y fiebre alta de unos 39 a 40 °C. En la mitad de los pacientes se presenta tos con expectoración mucopurulenta y en un tercio de los casos hemoptisis leves; las cuales, se acompañan de dolor torácico y disnea, síntomas que deben hacer pensar en embolismo pulmonar (Jawetz *et al.*, 1990; García-Rodríguez y Picazo, 1999; Villaseñor y Sapían, 2004).

La infección se acompaña de signos digestivos: diarrea, náusea, vómito y dolor abdominal; signos de afectación neurológica: confusión, desorientación, sueño patológico y profundo, alucinaciones, depresión, delirio y puede aparecer coma, siendo raras las convulsiones pero no la alteración cerebelar. La principal complicación que lleva a la muerte es la insuficiencia respiratoria, aunque se puede presentar: absceso pulmonar, empiema, hipotensión, shock, rotura de las fibras musculares, coagulación intravascular diseminada, púrpura trombocitopénica e insuficiencia renal (Forbes *et al.*, 2004). Las radiografías de tórax muestran, en etapas iniciales, una infiltración en los pulmones que dura pocos días, seguida rápidamente de zonas de condensación, únicas o múltiples, localizadas especialmente en lóbulos inferiores (García-Rodríguez y Picazo, 1999).

La fiebre de Pontiac se caracteriza por un periodo de incubación de uno o dos días seguido de una infección aguda de vías respiratorias altas, caracterizada por fiebre elevada, cefalea, mialgias y debilidad extrema de varios días de duración. Puede acompañarse de tos, disnea, diarrea, confusión y dolor torácico. Se resuelve espontáneamente sin secuelas dejando seroconversión frente a los antígenos de *Legionella* (Jawetz *et al.*, 1990; García-Rodríguez y Picazo, 1999; Villaseñor y Sapían, 2004). En el Cuadro 3 se resumen las manifestaciones clínicas de las dos patologías causadas por bacterias del género *Legionella*.

Cuadro 3. Manifestaciones clínicas de enfermedad por *Legionella* (Koneman *et al.*, 1992).

Manifestación	Enfermedad de los legionarios	Fiebre de Pontiac
Mortalidad	15 a 20 %	0 %
Periodo de incubación	2 a 10 días.	1 a 2 días.
Síntomas	Fiebre, escalofríos, tos, mialgias, cefalea, dolor torácico, esputo, y diarrea. Confusión y otros estados mentales en algunos.	Similares a los de la influenza: fiebre, escalofríos y mialgias. Tos, dolor y confusión.
Pulmones	Neumonía y derrame pleural (absceso pulmonar en algunos).	Dolor pleural, sin neumonía ni absceso pleural.
Riñones	Insuficiencia renal y proteinuria, azoemia y hematuria en algunos.	Sin manifestaciones renales.
Hígado	Moderadas anormalidades de la función hepática.	Sin anormalidades de la función hepática.
Tracto gastrointestinal	Diarrea acuosa, dolor abdominal, náusea y vómito.	Sin anormalidades.
Sistema nervioso central	Somnolencia, delirio, desorientación, confusión y obnubilación (rara vez se han documentado convulsiones).	Sin manifestaciones.

1.7 Factores de riesgo

Es común la infección asintomática en todos los grupos de edad, a juzgar por los títulos elevados de anticuerpos específicos. La frecuencia de enfermedad clínicamente importante es más elevada en los varones mayores de 55 años de edad. Los factores relacionados con el riesgo elevado son tabaquismo, pacientes con enfermedades crónicas como bronquitis, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y diabetes mellitus, así como en pacientes bajo tratamientos con esteroides y otros agentes inmunosupresores (Huerta *et al.*, 1995; López-Merino *et al.*, 2006).

1.8 Patogenia

Las especies de *Legionella* pueden infectar y multiplicarse dentro de algunas especies del grupo de los protozoos, como el caso de las amebas *Hartmannella*, *Acanthamoeba* y *Naegleria*, o en un ciliado del género *Tetrahymena*; de igual forma, son capaces de vivir y multiplicarse dentro de asociaciones microbiológicas denominadas biopelículas (Abu *et al.*, 1998; Forbes *et al.*, 2004; Shadrach *et al.*, 2005). Esta capacidad de las legionelas de vivir y multiplicarse dentro de hospederos, contribuye a su supervivencia en el ambiente ya que esta interacción hospedero-parásito indica una gran adaptación de la bacteria a parasitar a dichos organismos, la cual es fundamental para entender la patogénesis y ecología de la misma. *Legionella* spp. puede persistir y prosperar en el microambiente dentro de amibas de vida libre (AVL), obteniendo así una relativa protección y riqueza de nutrientes, así como una mayor virulencia, resistencia a antibióticos y supervivencia bacteriana. Dentro del ambiente de protección de un quiste amebiano, las especies de *Legionella* pueden soportar la desecación, la acción de los biocidas como el cloro y temperaturas extremas, además de proporcionarles un mecanismo para la dispersión en nuevos hábitats (Abu Kwaik, 2001; Sheehan *et al.*, 2005).

Si bien no se conoce con exactitud el mecanismo por el que *L. pneumophila* causa enfermedad, su capacidad para evitar su destrucción por las células fagocíticas desempeña un papel significativo en el proceso infeccioso. Se considera que *L. pneumophila* es un patógeno intracelular facultativo ya que luego de la infección, los microorganismos son capturados por fagocitosis dentro de los macrófagos alveolares,

donde sobreviven y se replican dentro de una vacuola especializada limitada por una membrana que le permite resistir la acidificación y evadir la fusión con los lisosomas; este secuestro de las legionelas dificulta el ingreso y la acumulación de antimicrobianos dentro de los macrófagos (Pérez, 2001; Forbes, *et al.*, 2004).

Legionella pneumophila posee una proteína de superficie de 24 kD denominada potenciadora de infectividad a macrófagos (MIP por sus siglas en inglés), que es requerida para una óptima infección intracelular y para la total expresión de la virulencia, aunque se han encontrado otras moléculas implicadas en el proceso de la patogenicidad (Cuadro 4).

Cuadro 4. Factores de virulencia conocidos para *Legionella*. (García-Rodríguez y Picazo, 1999; Pérez, M. M., 2001; Steinert *et al.*, 2002).

Enzima	Acción
Potenciadora de infectividad a macrófagos (MIP)	Participa en el plegamiento de proteínas requeridas para la infección celular.
Fosfatasa	Inhibe la secreción de superóxido de los neutrófilos.
Toxina peptídica	Interfiere en la activación de neutrófilos.
Metaloproteasa de Zinc	Inhibe la producción de superóxido, quimiotaxis y migración de polimorfonucleares.
Fosfolipasa C	Con actividad proteolítica.
Legiolisina	Con actividad hemolítica.

1.9 Ecología

Las legionelas se encuentran en todo el ambiente y su distribución es mundial. Forman parte de la flora acuática habitual, encontrándose en numerosos reservorios y fuentes de agua dulce, aunque ocasionalmente se les ha aislado en agua de mar (Heller *et al.*, 1998; Forbes *et al.*, 2004). Las bacterias del género *Legionella* pueden ser encontradas en lagos, ríos y en el lodo, aunque casi nunca se han implicado a estas fuentes como origen de enfermedad humana. Son capaces de vivir en cualquier ambiente, y pueden sobrevivir en el agua en una amplia gama de temperaturas, generalmente entre los 25 a 45 °C (Keith *et al.*, 1990) por lo tanto, se les puede encontrar desde los lagos alpinos

hasta los manantiales de aguas termales como los del parque Nacional de Yellowstone en los Estados Unidos (Declerck, 2009).

Desde los reservorios naturales la bacteria coloniza los sistemas de abastecimiento de las ciudades y a través de la red de distribución de agua potable, alcanza las instalaciones de agua de los edificios; en las ciudades, su nicho ecológico preferido son las áreas húmedas y calientes de los sistemas mecánicos de grandes edificios, fundamentalmente los sistemas de aire acondicionado y de distribución de agua caliente, donde la bacteria puede sobrevivir durante meses. Las vías de distribución de agua y las tuberías en los centros de hidroterapia, en regaderas, torres de enfriamiento y demás sistemas acuáticos alterados por el hombre, proporcionan un hábitat ideal para el crecimiento de la bacteria y de esta forma, incrementan el riesgo de contraer una infección por este patógeno (Sheehan *et al.*, 2005).

Es de destacar que muchas especies de *Legionella* solo se han aislado del ambiente o se han registrado como casos individuales. En el Cuadro 5 se observa una lista abreviada de algunas de las especies de *Legionella* de importancia médica y la fuente de donde han sido aisladas.

Cuadro 5. Especies de *Legionella* aisladas de fuentes humanas y ambientales (Forbes *et al.*, 2004).

Especies aisladas en seres humanos.	Especies aisladas del ambiente.
<i>L. pneumophila</i> , serotipos 1 a 15	<i>L. cherrii</i>
<i>L. micdadei</i>	<i>L. erythra</i>
<i>L. bozemanii</i>	<i>L. gratiana</i>
<i>L. dumoffii</i>	<i>L. jamestowniensis</i>
<i>L. feeleyi</i>	<i>L. brunensis</i>
<i>L. gormanii</i>	<i>L. fairfieldensis</i>
<i>L. hackeliae</i>	<i>L. santicrucis</i>
<i>L. longbeachae</i>	
<i>L. oakridgensis</i>	
<i>L. wadsworthii</i>	

Las especies de *Legionella* pueden sobrevivir como células de vida libre dentro de comunidades microbiológicas o biopelículas (Sheehan *et al.*, 2005; Declerck *et al.*, 2007). Estas organizaciones microbianas se adhieren a diferentes superficies gracias a la secreción de un exopolímero compuesto de glicocálix principalmente, el cual es secretado por bacterias, hongos y protozoos organizados en forma de colonias. Estas estructuras presentan características como heterogeneidad, diversidad de

microambientes, resistencia a antimicrobianos y capacidad de comunicación intercelular, las cuales las convierten en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen (Betancourth *et al.*, 2004).

Por lo general, las biopelículas se forman en diferentes tipos de ambientes, aunque donde se nota realmente la protección que brindan es en aquellos que presentan condiciones extremas ya sean temperaturas muy elevadas (55 a 121 °C) o bajas (-2 a 20°C), con alta salinidad (NaCl 2 a 50 M), alta alcalinidad (pH arriba de 8) o alta acidez (pH menor a 4) (Nazar, 2007). Debido a que los lugares en donde se han llegado a encontrar bacterias del género *Legionella* presentan temperaturas de hasta 45 °C, se les ha clasificado como organismos termófilos (Ramírez *et al.*, 2006). Los ambientes naturales o artificiales que cuentan con sistemas de distribución de agua a ésta temperatura, han sido de interés para el hombre debido a las propiedades terapéuticas que se les confieren. Se piensa que los beneficios obtenidos por los tratamientos con dichas aguas no dependen exclusivamente de este vital líquido, sino de una multiplicidad de estímulos físicos (temperatura), químicos (elementos disueltos) y biológicos (flora y fauna hidrotermal). Tal es el caso de las zonas de aguas termales y balnearios cuyo principal atractivo turístico depende en gran parte de los beneficios antes mencionados.

1.10 Transmisión

Las infecciones humanas de legionelosis se presentan como resultado de la inhalación de aerosoles con gotas de agua contaminadas con la bacteria *Legionella* (Pérez, 2001; Fields *et al.*, 2002; Konishi *et al.*, 2006). En estas condiciones, el recuento de bacterias alcanza de 10^3 a 10^6 UFC ml⁻¹, muy superior a la observada en el medio natural (Konishi *et al.*, 2006). Para que su concentración aumente lo suficiente y cause riesgo a los humanos (10 000 UFC ml⁻¹), debe colonizar las redes de distribución de agua potable, sistemas hídricos construidos por el hombre, como torres de refrigeración y sistemas de distribución de agua sanitaria, donde encuentra condiciones de temperatura idóneas para su multiplicación (25 a 45 °C), protección física y nutrientes apropiados (Villaseñor y Sopian, 2005). Las bacterias del género *Legionella* no se transmiten desde un

paciente infectado hacia otras personas, ni se han encontrado como reservorios a animales domésticos (Pérez, 2001).

1.11 Epidemiología

Las legionelas son ubicuas y están muy distribuidas en el ambiente, por consiguiente, la mayoría de los individuos está expuesta; sin embargo, pocos desarrollan los síntomas. Al ser microorganismos procedentes de diversos nichos naturales y artificiales, su propagación necesita la concurrencia de una serie factores que constituyen los eslabones de la cadena epidemiológica (García-Rodríguez y Picazo, 1999):

1. Reservorio ambiental. Desde los ambientes acuáticos naturales, las legionelas pueden acceder a cierto tipo de instalaciones (agua caliente, aire acondicionado), que actúan como reservorios principales.
2. Factores de amplificación. Ciertos factores pueden inducir un importante incremento en la concentración de microorganismos. Los tanques y tuberías de distribución de agua caliente, cuando las temperaturas no son demasiado elevadas (menores a 50 °C), favorecen el crecimiento de *Legionella*. Las torres de refrigeración y otros elementos de los sistemas de aire acondicionado constituyen un hábitat ideal para el desarrollo de estos microorganismos.
3. Mecanismo de diseminación. La inhalación de aerosoles es el principal modo de transmisión.
4. Susceptibilidad del huésped. Es un punto clave en el desarrollo de la enfermedad.

Además de *L. pneumophila*, se ha hallado que algunas otras especies de *Legionella* causan enfermedades humanas. En general, también son infecciones relacionadas con el agua y producen aspectos clínicos comparables a los de la enfermedad de los legionarios. Entre estas especies se destaca *L. micdadei*, que era conocida como el agente de la neumonía de Pittsburgh antes de establecerse su relación con *L. pneumophila* (Pérez, 2001).

La enfermedad legionelosis aparece de forma esporádica, endémica y epidémica. Su incidencia varía mucho y parece depender de la región geográfica. Estudios

epidemiológicos indican que *Legionella* es un patógeno oportunista, la tasa de mortalidad de la enfermedad de los legionarios aún con el tratamiento adecuado varía del 7 al 24 % en adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos. Las diferencias observadas en la susceptibilidad del huésped y la virulencia bacteriana hace difícil definir claramente la dosis infectiva de bacterias (Steinert *et al.*, 2002).

1.12 Diagnóstico

Los métodos microbiológicos que se han empleado para el diagnóstico e identificación de *Legionella* son: cultivo de la bacteria utilizando los medios de cultivo como el agar-extracto de levadura y carbón amortiguado (BCYE) y el medio semiselectivo para *Legionella pneumophila* (BMPA- α), la detección del antígeno específico de *L. pneumophila* serogrupo 1 en orina y la visualización del microorganismo en líquidos o tejidos mediante inmunofluorescencia directa (IFD) (Vargas-Marcos, 1999).

Dado que las especies de *Legionella* son inertes desde el punto de vista bioquímico y muchas pruebas producen resultados dudosos, las pruebas bioquímicas exhaustivas se utilizan poco. La identificación bioquímica requiere un laboratorio de referencia especializado que realice cultivos selectivos (Forbes *et al.*, 2004).

Utilizando el serodiagnóstico, la mayoría de los pacientes con legionelosis se diagnostica de manera retrospectiva mediante la determinación de un aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos contra *Legionella* con una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Las muestras deben tomarse con una diferencia no menor que dos semanas entre sí. Una sola muestra de suero con un título de más de 256 y un cuadro clínico característico pueden hacer presumir legionelosis (*op. cit.*).

Un último método de diagnóstico es la detección directa de segmentos específicos de ADN o ARN de la especie de *Legionella* de interés por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Esta herramienta brinda resultados rápidos y aumenta la sensibilidad en muestras hospitalarias y ambientales (Darby y Buising, 2008).

1.13 Tratamiento de la legionelosis

Los estudios de la sensibilidad *in vitro* no son pronósticos de la respuesta clínica y no deben realizarse para los aislamientos individuales de legionelas. Hasta hace poco, la eritromicina era el fármaco de elección para el tratamiento de la enfermedad causada por *Legionella*. En algunos pacientes resultan eficaces dosis elevadas de trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclinas. La administración de rifampicina junto con eritromicina puede ser beneficiosa, en especial en casos graves. La azitromicina, un antibiótico macrólido nuevo, es muy activo contra legionelas, así como la fluoroquinolona. Lo habitual es que la respuesta clínica se produzca en el curso de las 48 horas después de la indicación de un tratamiento eficaz. En los pacientes con infección severa se recomienda el uso de las fluoroquinolonas más que de la eritromicina. Las penicilinas, las cefalosporinas de todas las generaciones y los aminoglucósidos no son eficaces en el tratamiento por lo que no deben ser administradas (Forbes *et al.*, 2004).

1.14 Información estadística

En el continente europeo se han reportado un total de 9039 casos de legionelosis entre 1987 y 2010, siendo el 2007 el año con más casos registrados (947) (EWGLI, 2010). Borella y cols. (2005) refieren que en el año 2004, la guía europea para el control y prevención de la enfermedad de los legionarios asociada a viajes, registró el mayor número de casos notificados de enfermedad de los legionarios en turistas que viajaron a Italia (132 de 676 casos), donde 35 grupos de viajes asociados a la enfermedad fueron identificados a partir de julio 2002 a octubre de 2003, principalmente en hoteles y residencias de 14 regiones italianas.

En Australia, el mayor brote de enfermedad de los legionarios se dio en la ciudad de Melbourne en abril del 2000, con 125 casos confirmados. En esta ocasión, el brote fue asociado a las torres de enfriamiento de esta localidad, encontrando en ellas altos niveles de contaminación por la bacteria *Legionella* (Darby y Buising, 2008).

En el año 2006, Ozerol y cols. reportaron seis casos de neumonía nosocomial por *Legionella pneumophila* en un hospital de Turquía. Las muestras fueron analizadas por medio del inmuno ensayo enzimático (ELISA) en orina y cultivo de esputo. De igual

manera, 22 sistemas de distribución de agua fueron rastreados, encontrándola en 15 de los sitios estudiados. En Japón el número de casos reportados por *Legionella pneumophila* se ha incrementado dramáticamente: 53 casos en 1999, 151 en el 2000, y 83 casos para el 2001. En el 2002, en un brote de legionelosis ocurrido por el uso de baños públicos en la ciudad de Miyazaki en el mismo país, fueron confirmados 32 casos de *L. pneumophila* por un laboratorio y 263 más fueron sospechosos (Konishi *et al.*, 2006).

Para el caso del continente Americano, los Estados Unidos cuentan con el mayor número de brotes de enfermedad de los legionarios reportados con cerca de 8 mil casos reportados anualmente a los CDC de Atlanta (Villaseñor y Sapián, 2005). La especie *Legionella pneumophila* es considerada como un agente etiológico de rutina en las infecciones del tracto respiratorio tanto en este país como en Europa Occidental. En los Estados Unidos puede haber de 25,000 a 100,000 casos de enfermedad de los legionarios cada año (Sheehan *et al.*, 2005) y representar del 2 % al 8 % de los casos de neumonía adquirida en la comunidad, quedando en segundo lugar sólo después de *Streptococcus pneumoniae* (Konishi *et al.*, 2006). En Brasil se ha demostrado la presencia de *L. pneumophila* en muestras ambientales, sistemas de aire acondicionado y calderas de hospitales, así como casos reportados de neumonía por dicho patógeno en pacientes hospitalizados (Carvalho *et al.*, 2007). En Cuba, se aisló por primera vez *Legionella* spp. en 1987 y se diagnosticó el primer caso de enfermedad de los legionarios en 1988; en 1997 se aisló *L. bozemanii* en un ambiente hospitalario (Lázaro-Regalado *et al.*, 1997).

En México han sido reportados sólo dos casos de neumonía por *Legionella* (López-Merino, 2006); en contraste, el grupo europeo de trabajo para las infecciones por *Legionella* (EWGLI por sus siglas en inglés), una organización no gubernamental que hace vigilancia epidemiológica de los casos de legionelosis que ocurren en Europa desde 1987, asocia 68 casos ocurridos en turistas con su estancia en México entre 1990 y 2009 (Fig. 2).

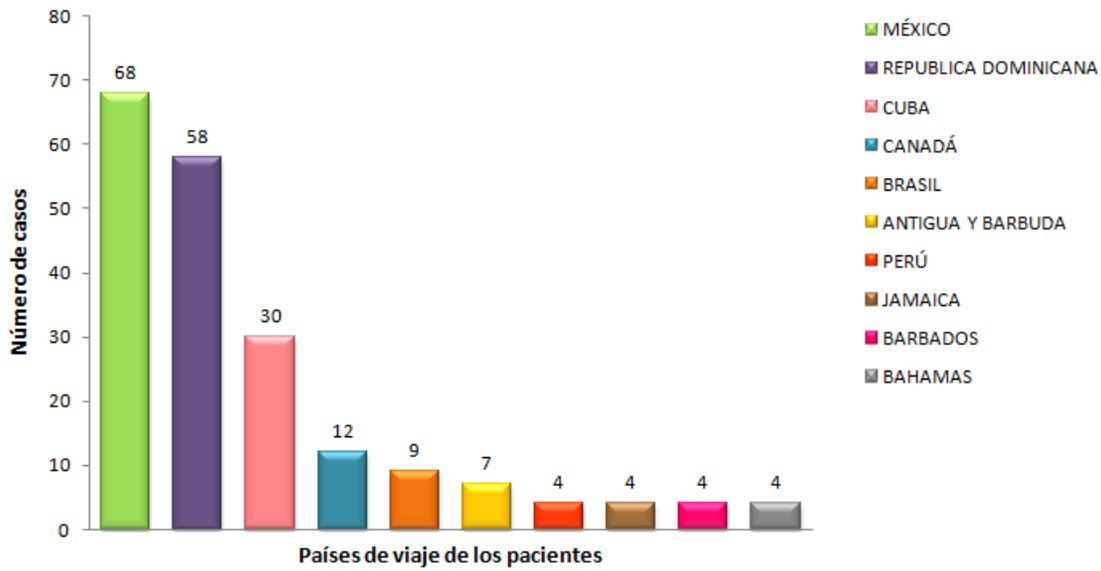


Figura 2. Casos reportados de neumonía por *Legionella pneumophila* en pacientes europeos con visitas a países de América Latina y Canadá en un periodo de 1987-2010. Fuente: EWGLI, 2010.

Por otra parte, se tomaron los reportes de casos de neumonía por grupo de edad en un periodo de diez años a la fecha (2000-2008) publicados por el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) y el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Se contempla que el mayor número de casos se encuentra en el sector vulnerable de la población (Fig. 3), aunque no se indica cual fue el agente etiológico de dichas infecciones.

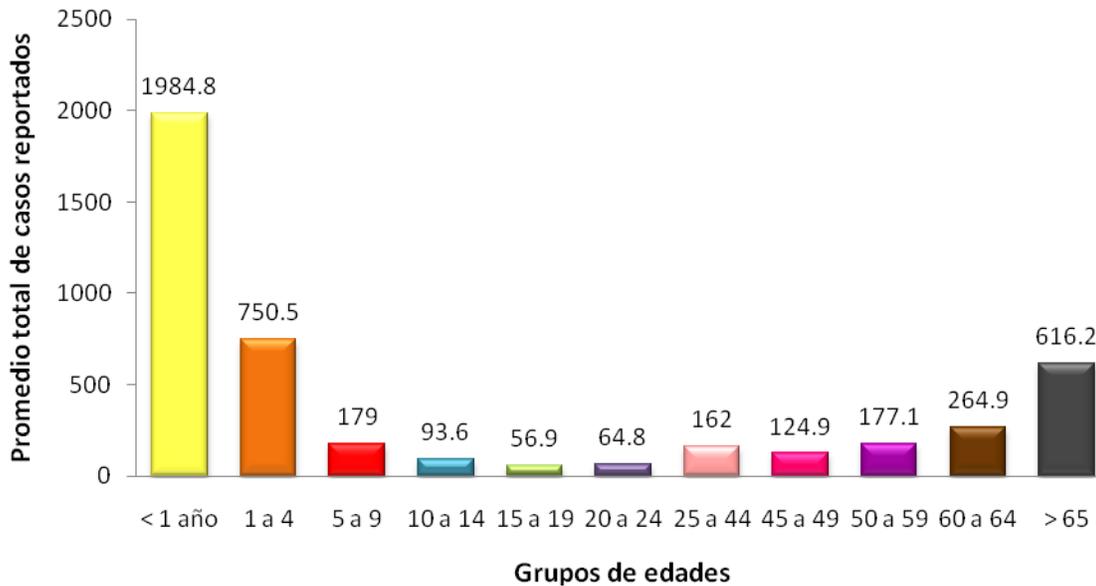


Figura 3. Casos de neumonías por grupo de edad y sin agente etiológico reportados por las principales dependencias del Sector Salud de México. Fuente: CENAVECE, 2010; INEGI, 2010.

Hasta el momento no ha sido notificado ningún brote de legionelosis en México, ni la bacteria ha sido aislada en ningún caso de neumonía (López-Merino, 2006), sin embargo es necesario investigar la presencia de esta bacteria en nuestro país, haciendo análisis exhaustivos en torres de refrigeración, sistemas de aire acondicionado y de agua caliente, duchas de centros de masajes y piscinas de hidromasaje, condensadores de evaporación, balnearios, en fuentes naturales o artificiales que generen aerosoles, grifos, humidificadores y equipos de terapia respiratoria en hospitales. De esta manera, se podrán iniciar las medidas que permitan capacitar al personal de la salud y poder controlar su aparición.

2. ANTECEDENTES

En 1990, Marín y Montes publicaron 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*.

Un segundo caso de neumonía ocasionada por *Legionella pneumophila* fue reportado en 1995 por Huerta-Torrijos y colaboradores en el Estado de Guerrero. Se menciona el caso de una paciente con un cuadro clínico característico de neumonía, refiriendo que cuatro días antes de ingresar incursionó en las cuevas de Tolantongo en Hidalgo. Después de 17 días de ingresar a la unidad de terapia intensiva, y después de obtener una biopsia a cielo abierto, con evidencia de bronquialveolitis con escaso infiltrado inflamatorio y tinciones para hongos y micobacterias negativas, se solicita valoración a infectología, la que sugiere la posibilidad de neumonía atípica por *Legionella pneumophila*. Los resultados de la serología para *Legionella* fueron positivos con valores en los títulos de 1:512 y 1:256 en la tercera y cuarta semana de evolución después del tratamiento con eritromicina, considerándose como nivel de corte para positividad con un título de 1:256.

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.

En 1992 Jaulhac y colaboradores detectaron especies de *Legionella* en fluidos broncoalveolares usando la amplificación de ADN con primers específicos para el gen MIP, el cual, codifica a la proteína potenciadora de infección a macrófagos. Se probaron tres grupos de primers (Lpm1, Lpm2 y LEG1, LEG2, LEG3, descritos por Starnbach en 1989). Se analizaron 68 muestras congeladas con sospecha de legionelosis. Ocho muestras de cultivo positivo para *Legionella* dieron positivas en la amplificación, de 60

muestras de cultivo negativo para *Legionella*, siete dieron positivas después de la amplificación. De las tres muestras restantes, los resultados de serología para legionelosis no fueron determinados y aunque el agente causal de infección pulmonar no fue determinado, las características clínicas de los pacientes estaban en conformidad con el diagnóstico de legionelosis.

En el 2007 Carvalho y cols. detectaron a *Legionella pneumophila* en 67 muestras de agua y biopelículas por cultivo y métodos moleculares a partir de sistemas artificiales de abastecimiento de agua para evaluar la incidencia de legionelosis en Sao Paulo, Brasil. Los resultados del PCR y la secuenciación revelaron muestras positivas para *L. pneumophila*. Con este trabajo los autores demostraron que la amplificación del gen que codifica a la proteína potenciadora de Infectividad a los macrófagos (MIP) como marcador molecular es una importante herramienta en la identificación de *L. pneumophila*.

En el mismo año, Nintasen y cols. probaron el PCR anidado para detectar la presencia de *Legionella pneumophila* a partir de muestras ambientales usando la amplificación de fragmentos del gen MIP. Este estudio demostró que la detección del genéticamente estable gen MIP por PCR anidado puede ser rápida y efectiva para aislar a *L. pneumophila* a partir de microambientes.

En 2003, Liu y cols. emplearon el uso del gen *dnaJ*, el cual codifica a una proteína chaperona (Hsp) la cual le brinda a la bacteria una mayor resistencia a cambios de temperatura. Con este trabajo, se identificaron todos los serogrupos de *L. pneumophila* y se describieron los primers usados para la detección de secuencias de los genes 16S rDNA de la mayoría de los miembros del género *Legionella*.

En 2005 Sheehan y cols. investigaron la presencia de especies de *Legionella* dentro de comunidades de algas y eucariotas en ambientes geotérmicos ácidos del Parque Nacional de Yellowstone en los Estados Unidos. Amplificando por PCR fragmentos específicos de genes 16S rRNA detectaron cuatro especies conocidas de *Legionella* así como secuencias de especies del mismo género que no estaban representadas en bases de datos. La ocurrencia no aleatoria de secuencias detectadas a temperaturas

menores de 30 °C y mayores de 38 °C sugirieron los gradientes termales naturales de distribución de las especies de *Legionella* en el lugar.

En 2006, Rangel aisló a la ameba *Naegleria fowleri* a partir del agua de las piscinas del balneario “El Géiser” en el Estado de Hidalgo, encontrando un diverso grupo de protozoos amebianos principalmente de los géneros *Vahlkampfia*, *Acanthamoeba*, *Rosculus* y *Hartmannella*; haciendo hincapié en el riesgo de infección que hay en los usuarios del balneario para contraer alguna enfermedad relacionada a ciertos géneros encontrados. En el mismo año, Urbina determinó el efecto de la temperatura sobre la distribución de amebas de vida libre en el mismo sistema hidrotermal. Los resultados obtenidos demostraron la presencia de especies amebianas patógenas para el hombre como: *Naegleria fowleri*, *N. gruberi*, *Acanthamoeba castellanii*, y *A. polyphaga*.

3. JUSTIFICACIÓN

Particularmente en el balneario “El Géiser” ubicado en el importante corredor acuático en el municipio de Tecozautla, Hidalgo, los monitoreos que se han hecho a lo largo de cuatro años en el agua y en las biopelículas de este lugar, han demostrado la presencia de amebas de vida libre de los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Hartmannella* (Rangel, 2006; Urbina, 2006). Como ya se ha mencionado, éstos patógenos han sido reportados como hospederos de bacterias del género *Legionella*, lo que podría aumentar la probabilidad de aislar a la bacteria en dicho lugar. De igual manera, el sistema hidrotermal de estudio cuenta con las características descritas por Sheehan y colaboradores en el año 2005, para permitir la presencia de bacterias del tipo *Legionella* en fuentes termales del Parque Nacional de Yellowstone en los Estados Unidos.

En México sólo se han reportado dos casos con diagnóstico clínico de neumonía por *Legionella* spp. sin pruebas de laboratorio confirmatorias y ninguno con el aislamiento del agente causal. Mientras que, los datos epidemiológicos que se reportan de infección por *Legionella pneumophila* a los Centros de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta comprenden hasta 1 000 casos anualmente en los Estados Unidos. Se estima que 25 000 casos de la enfermedad ocurren cada año en el mundo, causando más de 4 000 muertes. Por eso, es importante que en nuestro país se investigue la presencia de *Legionella pneumophila* para iniciar las medidas que permitan controlar su aparición y patogenicidad, y de esta manera, no confundir el diagnóstico de infección por *Legionella* con el de otros agentes etiológicos (Villaseñor y Sapián, 2004).

4. OBJETIVOS

GENERAL

Identificar la presencia de bacterias del género *Legionella* spp. en las biopelículas fijas y flotantes de un géiser en el Estado de Hidalgo.

PARTICULARES

- Identificar molecularmente la presencia de la especie patógena *Legionella pneumophila* en el lugar.
- Establecer las características del sustrato que favorecen la presencia de *Legionella* spp.
- Determinar que parámetros fisicoquímicos del agua y el ambiente influyen en la presencia de *Legionella* spp. en el géiser.
- Establecer la relación de las bacterias del género *Legionella* spp. con la presencia de amebas de vida libre en el lugar.
- Determinar el riesgo potencial de infección por *Legionella* spp. y *L. pneumophila* en los usuarios de aguas termales provenientes del géiser en estudio.

5. ÁREA DE ESTUDIO

5.1 Tecozautla, Hidalgo

Municipio del Estado de Hidalgo famoso por tener un importante corredor turístico de balnearios de aguas termales. Se ubica en las coordenadas geográficas 20° 31' 58" de latitud norte, 99° 37' 57" de longitud oeste y a una altitud de 1700 msnm. Tiene una superficie de 537.83 km²; colinda al norte con el municipio de Zimapán, al sur con el municipio de Huichapan, al oeste con el Estado de Querétaro y al este con los municipios de Tasquillo y Alfajayucan (Rangel, 2006; Urbina, 2006).

Las principales fuentes hidrológicas de este municipio son: la cuenca del río Pánuco, el río Tecozautla, el río San Francisco y el río Moctezuma, así como numerosos pozos y manantiales. Tecozautla está ubicado en una zona rica en manantiales de aguas termales, situación que lo coloca como un importante municipio turístico, con una veintena de balnearios con aguas termales, cuya temperatura oscila entre los 30 a 40° C (*op. cit.*).

Cerca de Tecozautla se encuentra el géiser de Taxhidó, famoso en la década de los 50's por ser el primer pozo del cual explotó el vapor proveniente del interior de la tierra. Fue usado como planta geotérmica y en la actualidad se usa como balneario de aguas termales.

5.2 Balneario “El géiser”

El balneario “El Géiser” se encuentra en el municipio de Tecozautla a 180 km de distancia de la Ciudad de México (Fig. 4). Se localiza en una depresión rodeada de cerros de mediana altura. Su principal atractivo es un géiser natural del cual brota un potente chorro de agua sulfurosa con vapores de hasta 95 °C que se elevan a gran altura, produciendo una nube de aerosoles de tamaño considerable que humedecen las paredes adyacentes al sistema hidrotermal, propiciando la formación de diversas biopelículas. Las aguas termales no cloradas de este sistema, abastecen por medio de acueductos aéreos aguas termales a dos albercas de 1.60 metros de profundidad, una

fosa para clavados de 5 metros, dos piscinas para enjabonarse y un tanque sauna (Fig. 5).



Figura 4. Localización del municipio de Tecozautla, Hidalgo y sus principales vías de acceso.

Actualmente el balneario cuenta con un área de oasis, la cual tiene tres piscinas principales, cuatro pozas, una alberca tipo playa, dos chapoteaderos, cuatro toboganes y tres cascadas. De igual forma, se encuentran dos canales subterráneos, que toman agua del receptáculo del géiser y la llevan hasta el río que se ubica a unos metros abajo del balneario, cuando las piscinas son lavadas, toda el agua que se desecha en enviada el río.



Figura 5. Balneario “El Géiser” en el Estado de Hidalgo. (a) Géiser del balneario, (b y c) albercas y zonas recreativas del balneario.

5.3 Protozoos presentes en el sistema hidrotermal “El Géiser”

La resistencia que algunas bacterias tienen hacia la depredación natural por los protozoos les ha acuñado el término de microorganismos resistentes a amebas. Parásitos tales como *Coxiellaburnetii*, *Escherichia coli* 0157, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella* spp., etc., disponen de mecanismos de resistencia cuya comprensión plantea importantes implicaciones clínicas y epidemiológicas en ámbitos como la seguridad alimenticia, la seguridad quirúrgica y a sanidad ambiental, entre otras (Ortiz de Villajos y Ferrer, 2002).

Para conocer los tipos de protozoos, específicamente de amebas de vida libre (AVL) presentes en el balneario el “El Géiser”, se consultaron los trabajos realizados por Rangel (2006) y Urbina (2006), lo cuales consistieron en identificar la distribución de AVL en el agua proveniente del géiser que abastece las piscinas del lugar. Cabe destacar que en estos dos trabajos se dio prioridad a la búsqueda de especies de amebas patógenas para el hombre (Fig. 6).

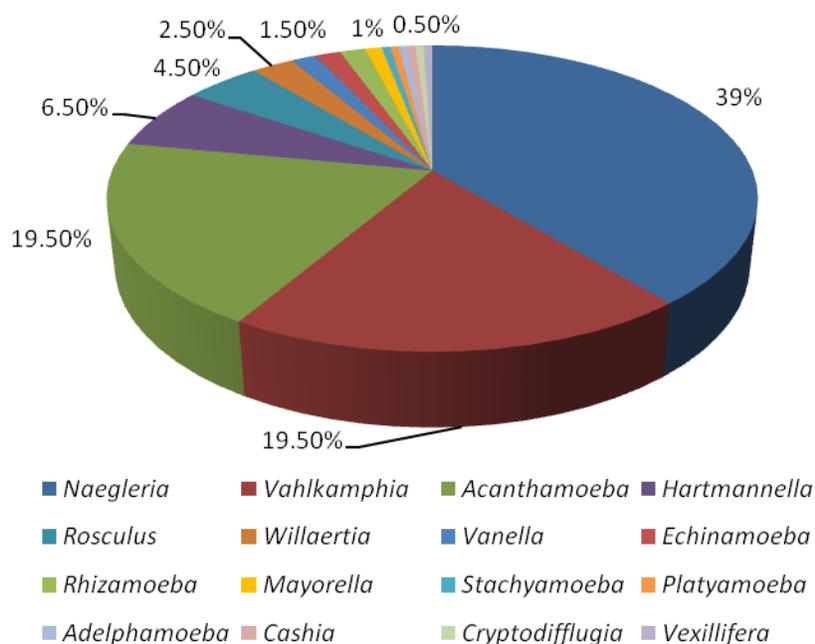


Figura 6. Porcentaje de géneros amebianos identificados en el agua del balneario “El Géiser” durante septiembre de 2004 y mayo de 2005 (Rangel, 2006; Urbina, 2006).

Como se observa en la figura anterior, los géneros más encontrados en ambos trabajos fueron *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia*, *Hartmannella* y *Rosculus*. De igual forma, se logró al identificación de algunas especies, tales como *N. fowleri*, *N. gruberi*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *V. avara* y *H. vermiformis*. Estos resultados son de gran importancia para este estudio ya que tres de los géneros amebianos (*Acanthamoeba*, *Hartmannella* y *Naegleria*) encontrados en el agua proveniente del géiser y en la misma que se encuentra en las piscinas del lugar, son los que se han reportado como principales hospederos de bacterias del género *Legionella* (Pérez, 2001; Fields *et al.*, 2002; Ortiz de Villajos y Ferrer, 2002, Steinert *et al.*, 2002; Shadrach *et al.*, 2005; Sheehan *et al.*, 2005; Declerck *et al.*,2007)

Los datos anteriores son relevantes ya que la presencia de estos géneros y especies amebianas, sugiere que el lugar cuenta con las condiciones microbiológicas adecuadas para la presencia y multiplicación de bacterias del género *Legionella*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo tres muestreos en el balneario “El Géiser” en los meses de octubre de 2008 y febrero y octubre de 2009 respectivamente.

6.1 Recolecta de las muestras

En cada muestreo se recolectaron 15 muestras de biopelículas de aproximadamente 4 cm² raspando la superficie de las paredes que rodean el géiser (Figs. 7 y 8) con un abatelenguas estéril. Las muestras fueron almacenadas en tubos estériles de polipropileno de 50 ml con agua del mismo lugar para evitar la desecación de éstas durante el transporte al laboratorio (Sheehan *et al.*, 2005; Declerck *et al.*, 2006). La colecta de las biopelículas se basó en la diferencia de color, textura y grosor de las mismas, de igual forma se consideró la disponibilidad de éstas fueran fijas o flotantes y la distancia al géiser en la que estaban (Figs. 9 a 14). Las muestras de aerosoles se colectaron por medio de la condensación de vapores en frascos de polipropileno de boca ancha (NALGENE) esterilizados. Éstos fueron colocados lo más cerca posible de los vapores provenientes del géiser durante una hora (Fig. 13). Al término de este tiempo, se recolectaron aproximadamente 30 ml de agua de condensación, los cuales fueron colocados en tubos de 50 ml para su posterior análisis en el laboratorio. Las muestras se transportaron a temperatura ambiente, desde el balneario “El Géiser” hasta el Laboratorio de Patógenos Emergentes de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación (UIICSE), de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-I), UNAM, para su procesamiento.



Figura 7. Paredes periféricas del géiser y área de muestreo de biopelículas.

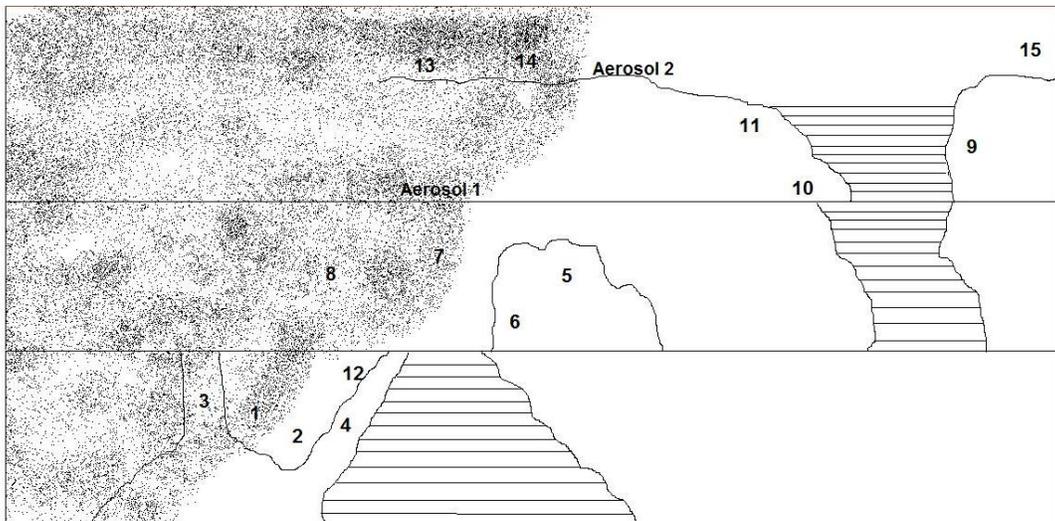


Figura 8. Representación esquemática de las paredes periféricas del géiser y los puntos de muestreo de biopelículas y aerosoles.



Figura 9. Detalle de los sitios de muestreo de biopelículas fijas.



Figura 10. Detalle de los sitios de muestreo de biopelículas fijas.



Figura 11. Detalle de los sitios de muestreo de biopelículas fijas.



Figura 12. Detalle de los sitios de muestreo de biopelículas fijas.



Figura 13. Detalle de los sitios de muestreo de biopelículas flotantes y aerosoles.



Figura 14. Vista del sitio de muestreo de biopelículas fijadas a la vegetación.

6.2 Registro de parámetros fisicoquímicos *in situ* del agua y las biopeículas

Para registrar las lecturas de los parámetros fisicoquímicos y establecer su relación con los aislamientos bacterianos, se realizaron las determinaciones *in situ* de la temperatura (°C), pH y conductividad (mS/cm³) del agua que baña las paredes del géiser, temperatura atmosférica, y temperatura interna de las biopelículas al momento de su colecta (Borella *et al.*, 2004; Declerck *et al.*, 2007).

6.2.1 Temperatura interna de las biopelículas (°C)

La temperatura interna de las biopelículas fue medida insertando dentro de la biopelícula el sensor de temperatura de un termómetro digital Hanna H 19040 antes de su colecta (Declerck *et al.*, 2007).

6.2.2 Temperatura del agua (°C)

Este parámetro se midió con un termómetro digital Hanna H 19040, se tomaron los valores de la temperatura del agua que baña las paredes del géiser para registrar la temperatura de crecimiento de las bacterias del género *Legionella*, así como de las amebas de vida libre en los diferentes microambientes. La medida de este parámetro es esencial para identificar el gradiente de temperaturas a la cual crece la bacteria de interés en este trabajo (Gallegos, 1997).

6.2.3 Temperatura atmosférica (°C)

Se midió con un termómetro digital Hanna H 19040, en este caso, el electrodo se expuso al ambiente. Este parámetro se determinó para conocer si la temperatura ambiental afectaba la temperatura del agua ó a la presencia de *Legionella* spp (Declerck, 2007).

6.2.4 pH del agua

Este parámetro se midió con un potenciómetro digital de campo pH/EC/TDS Waterproof Hanna Instruments. La medición de pH se hace para establecer si las condiciones del ambiente son las adecuadas para la presencia de bacterias del género *Legionella*, en las cuales, su crecimiento se ve favorecido en un ámbito de pH de 5.0 a 9.2 (Declerck, 2009).

6.2.5 Conductividad eléctrica (mS/cm³) del agua

Se midió con un conductímetro digital Hanna H 19040. Este parámetro depende de la cantidad de iones que presente el agua, principalmente sulfatos y carbonatos. Considerando la altitud a nivel del mar del lugar de muestreo, se realizó un ajuste de presión en el aparato para la medición de este parámetro (Sheehan *et al.*, 2005; 2007).

6.3 Detección microbiológica de *Legionella* spp.

Las muestras de agua, biopelículas y aerosoles recolectadas en tubos de polipropileno se incubaron a 37° C por cinco días. Después de este tiempo fueron agitadas vigorosamente con un vórtex y se tomaron 15 ml del agua con partículas en suspensión, los cuales, se centrifugaron a 3000 X *g* durante 30 minutos (Boulanger y Edelstein, 1995). Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue procesada por descontaminación ácida (KCl-HCl 0.2N) en un volumen de 1:1 durante 30 minutos (NCID, 2005). Posteriormente, se sembraron 100 µl de la mezcla anterior en placas de agar-extracto de levadura y carbón amortiguado (BCYE) enriquecido con cisteína, medio específico para el crecimiento de *Legionella* spp. (Delgado-Viscogliosi *et al.*, 2005). Las placas de agar se incubaron a 37 °C y fueron revisadas diariamente con la finalidad de buscar la forma característica de las colonias pertenecientes a *Legionella* (HPA, 2006).

6.4 Identificación morfológica de colonias del género *Legionella*

Las colonias se tornan visibles en tres a cuatro días después de la incubación a 37 °C en una atmósfera húmeda. Las placas se mantuvieron en un máximo de dos semanas antes de desecharlas. Las colonias miden de 3 a 4 mm de diámetro, de color blanco-grisáceo, convexas y circulares. Presentan bordes enteros y un moteado granular interno similar al vidrio esmerilado (NCID, 2005). La identificación de la morfología colonial se llevó a cabo comparando el crecimiento obtenido con la cepa *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC #33152.

6.5 Identificación de la morfología bacilar de *Legionella* spp.

Como parte de los análisis necesarios para la identificación de *Legionella pneumophila*, se tiñeron mediante el método de Gram cinco colonias con las características antes mencionadas para identificar la forma bacilar de las bacterias y la tinción rosa características de éstas al teñirse con Safranina, último colorante utilizado en la técnica (Ver Anexo 1).

6.6 Registro fotográfico

Las fotografías digitales de los sitios de muestreo y cultivos bacterianos se tomaron con una cámara digital Lumix FX10P-S. Las fotografías de las tinciones se tomaron con la ayuda de un microscopio Motic B Series y una cámara digital Motic Cam 2000 de 1.3 Megapíxeles y el programa informático Motic Images Plus 2.0.

6.7 Identificación molecular de *Legionella pneumophila*.

A los aislados identificados por morfología colonial como pertenecientes al género *Legionella*, se les realizó una extracción y purificación de ADN genómico utilizando el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) con el cual se obtuvo ADN de alta pureza (Ver Anexo 2). Para ello, se lavaron las células bacterianas con una solución de lisis para romper los sistemas membranales celulares y liberar el ADN bacteriano. Posteriormente se agregó RNasa en solución para eliminar el ARN de las muestras y una solución para precipitar las proteínas con la finalidad de que la

extracción de ADN de los aislados no presentara impurezas. Las muestras tratadas se centrifugaron y el sobrenadante con el ADN fue transferido a un tubo nuevo con alcohol isopropílico para precipitar el ADN y lavarlo posteriormente con etanol al 70 %. Al término de este tratamiento se retiró todo el alcohol, quedando solamente el ADN bacteriano, el cual fue hidratado con un amortiguador y almacenado a -20 °C hasta su análisis.

6.7.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Para la identificación precisa de las bacterias a nivel de especie se utilizó la PCR. De esta manera, con el ADN puro obtenido de los aislados se realizó la técnica con el kit Maxim Biotech. Inc. Cat. No.: SP-10486, diseñado para amplificar un fragmento de 232 pares de bases (pb) perteneciente al gen MIP (Ver Anexo 3). Para la amplificación se utilizaron los primers forward 5'-GCTGCAACCGATGCCACATC y reverse 3'-ATTCAGCAGTACGCTTTGCCATCA. El volumen final de la mezcla fue de 50 µl: 40 µl de mezcla maestra lista para usar que contiene desoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs), ambos primers, buffer de reacción, cloruro de magnesio (MgCl₂) y 0.2 µl de ADN polimerasa termoestable por cada tubo de reacción; por último se agregaron 10 µl de ADN templado de las muestras.

La mezcla maestra o "Master Mix" que incluye el kit es una mezcla elaborada a base de tres componentes principales para la PCR: el primer juego de componentes son los desoxinucleótidos (dNTPs), los cuales utiliza la *Taq* polimerasa para poder construir la cadena complementaria del segmento a amplificar, éstos dNTPs incluyen adenina, timina, guanina y citosina; el segundo componente es el buffer de reacción Tris-HCl pH 8.4; 50 mM KCl; 0.1 % p/v gelatina; y el tercero es el cloruro de magnesio (MgCl₂). Estos últimos son utilizados como amortiguadores para catalizar el proceso de la PCR.

La amplificación del ADN se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp 2400, con los siguientes parámetros de temperatura: desnaturalización inicial a 96 °C por un minuto; seguida de 35 ciclos de 94 °C por un minuto, 58 °C por un minuto y 72 °C por un minuto. Finalmente una extensión final a 72 °C durante 10 minutos (Ver anexo 3).

Después de la amplificación del ADN, 8 μ l de cada muestra fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2 % a 65 volts por 120 minutos (Ver Anexo 4). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de foto documentación Alfa Imager, Alpha Innotech Corporation.

7. RESULTADOS

Se llevaron a cabo tres muestreos en los meses de octubre de 2008 y febrero y octubre de 2009, de los cuales se obtuvieron 45 muestras de biopelículas fijas y flotantes de las paredes y alrededores del géiser de interés y cinco muestras de aerosoles de la misma fuente termal. Del total de las muestras obtenidas, se obtuvieron 50 crecimientos bacterianos en agar BCYE enriquecido con cisteína. De los crecimientos obtenidos en el agar selectivo, se aislaron e identificaron molecularmente 14 colonias bacterianas pertenecientes a la especie *Legionella pneumophila*: cuatro aislados para el Muestreo I (23.5 %), 10 para el Muestreo II (62.5 %) y cero para el muestreo III (0 %) respectivamente (Cuadro 6 y 7).

Cuadro 6. Distribución de *Legionella* spp. y *L. pneumophila* aisladas en cada muestreo.

Muestreo	No. positivos/Total de muestras (%)	
	<i>Legionella</i> spp.	<i>Legionella pneumophila</i>
I	17/17 (100)	4/17 (23.5)
II	16/16 (100)	10/16 (62.5)
III	17/17 (100)	0/17 (0.0)

Para cada muestra de biopelícula y aerosoles se obtuvieron crecimientos bacterianos sobre medio específico BCYE, considerando aquellos que presentaban colonias parecidas a la del género *Legionella* y otros crecimientos de algas, hongos y protozoos del lugar. Molecularmente solo se identificaron 14 muestras que pertenecieron a la especie *Legionella pneumophila*, una de ellas identificada a partir de aerosoles del lugar. Cabe destacar que las muestras de aerosoles fueron las que más días tardaron en tener algún crecimiento sobre el agar selectivo, siendo evidentes las primeras colonias hasta cuatro o cinco días después de su siembra e incubación a 37 °C.

El cuadro 7 sintetiza los resultados obtenidos sobre la presencia de aislados bacterianos en agar BCYE y la identificación molecular de éstos por medio de la PCR. De igual forma, muestra la temperatura del interior de las biopelículas al momento de su colecta y la relación que guardaban con las paredes periféricas del géiser y sus alrededores. Se observa que en todas las muestras se obtuvo un crecimiento similar al de las colonias del género *Legionella* sobre el medio específico, sin embargo,

molecularmente se pudo comprobar que el estatus de solo algunas de ellas se encuentra en la especie *L. pneumophila*.

Cuadro 7. Características de las muestras y resultados obtenidos en los tres muestreos.

Muestra	Temperatura de la muestra °C	Característica de la biopelícula	Crecimiento de <i>Legionella</i> spp. BCYE	<i>L. pneumophila</i> identificada por PCR
1a	47.7	F	+	
1b	22.1	F	+	+
1c	25.9	F	+	
2a	47.7	F	+	
2b	33.8	F	+	+
2c	24.0	F	+	
3a	47.8	F	+	+
3b	28.3	F	+	+
3c	25.4	F	+	
4a	42.5	F	+	
4b	27.9	F	+	+
4c	27.3	F	+	
5a	36.0	F	+	
5b	28.0	F	+	+
5c	36.5	F	+	
6a	47.2	F	+	
6b	26.0	F	+	
6c	28.9	F	+	
7a	50.0	F	+	
7b	37.0	F	+	
7c	39.3	F	+	
8a	50.0	F	+	
8b	34.0	F	+	+
8c	40.9	F	+	
9a	37.2	F	+	
9b	25.0	F	+	+
9c	25.3	F	+	
10a	37.0	F	+	+
10b	26.0	F	+	
10c	25.8	F	+	
11a	38.0	F	+	
11b	26.4	F	+	
11c	24.1	F	+	
12a	24.1	F	+	
12b	33.3	F	+	+
12c	24.2	F	+	
13a	36.2	FL	+	+
13b	43.0	FL	+	+
13c	42.0	FL	+	
14a	36.2	FL	+	
14b	30.8	FL	+	
14c	35.5	FL	+	
15a	28.0	FV	+	
15b	21.8	FV	+	+
15c	32.0	FV	+	
Aerosol1a	41.0		+	
Aerosol 1b	41.0		+	
Aerosol 1c	45.0		+	
Aerosol 2a	40.0		+	+
Aerosol 2c	39.1		+	
			50 positivos	14 positivos

(a) Muestreo I, (b) Muestreo II, (c) Muestreo III. (F) Fija a las paredes del géiser, (FL) biopelículas flotantes, (FV) biopelículas encontradas fijadas a la vegetación del lugar.

7.1 Crecimientos bacterianos y tinciones

Debido a que la siembra de las muestras en agar específico es un método convencional estándar para la detección, aislamiento e identificación de especies de *Legionella* en muestras clínicas o ambientales (Nintansen *et al.*, 2007), en este estudio se realizó la siembra de las muestras en agar extracto de levadura y carbón amortiguado (BCYE). Como era de esperarse, las primeras colonias con las características típicas de las legionelas en cuanto a forma, color y apariencia (Fig. 15), fueron visibles aproximadamente al tercer o cuarto día después de la siembra, tal y como lo confirman los manuales de recuperación, detección y enumeración de especies de *Legionella* del CDC de Atlanta (NCID, 2005; HPA, 2006). La incubación de las muestras se mantuvo a 37 °C por diez días en condiciones micro aerófilas. Pasado este tiempo, se descartaron las placas de agar sin crecimientos aparentes.

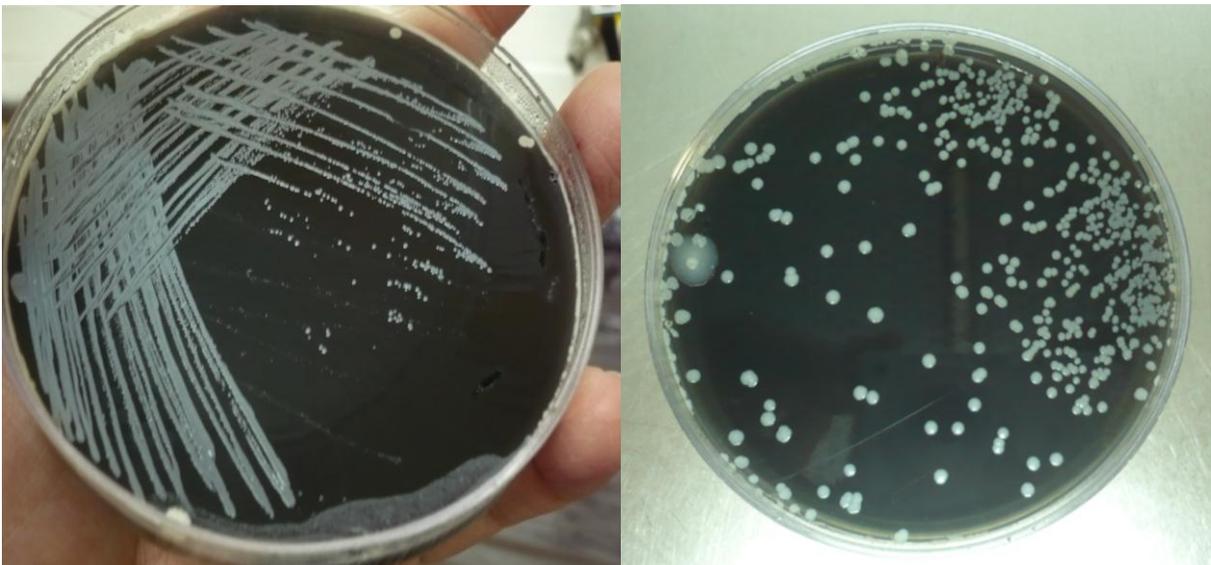


Figura 15. Placas de Petri con crecimientos coloniales de *Legionella* spp. obtenidos a partir de muestras de biopelículas sembradas en agar BCYE enriquecido con cisteína.

Las tinciones Gram empleadas en cinco colonias seleccionadas al azar, mostraron la presencia de un número considerable de bacilos Gram negativos al teñirse con la safranina y adquirir una tonalidad rosada (Figs. 16 a 18).

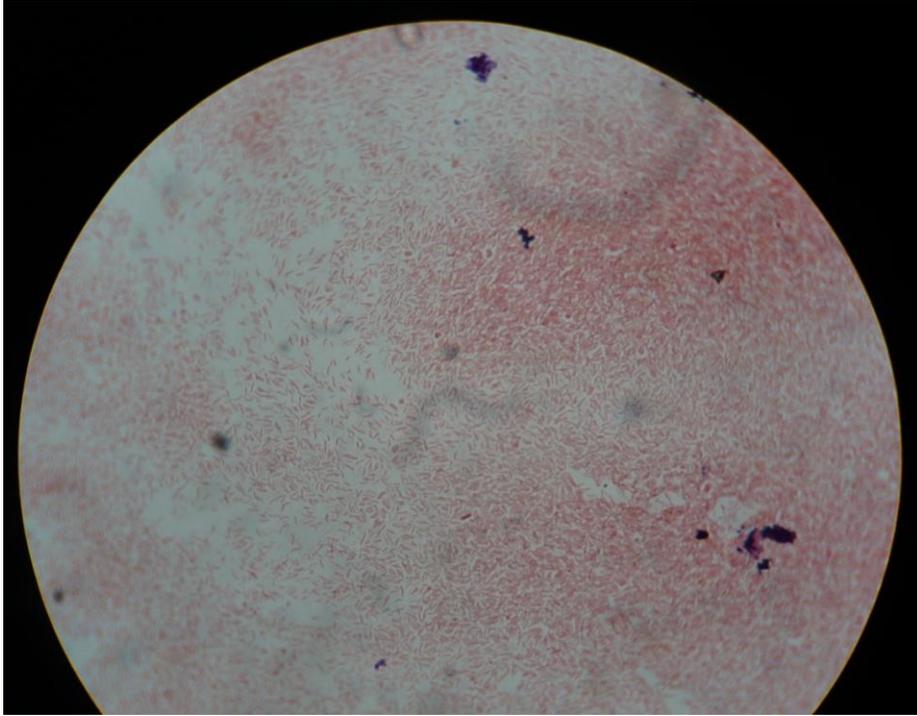


Figura 16. Tinción de Gram de bacilos de *Legionella* spp. tomados a 40X. Microscopía de luz por campo brillante.

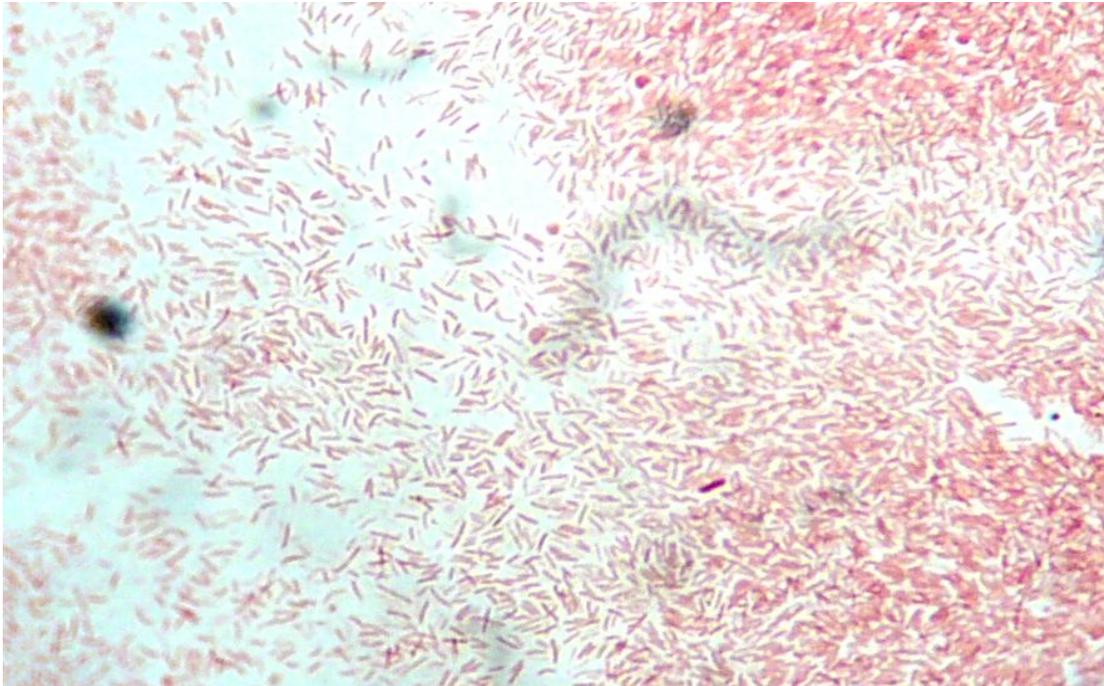


Figura 17. Acercamiento de microfotografía tomada a 40X de bacilos Gram negativos de *Legionella* spp. Microscopía de luz por campo brillante.

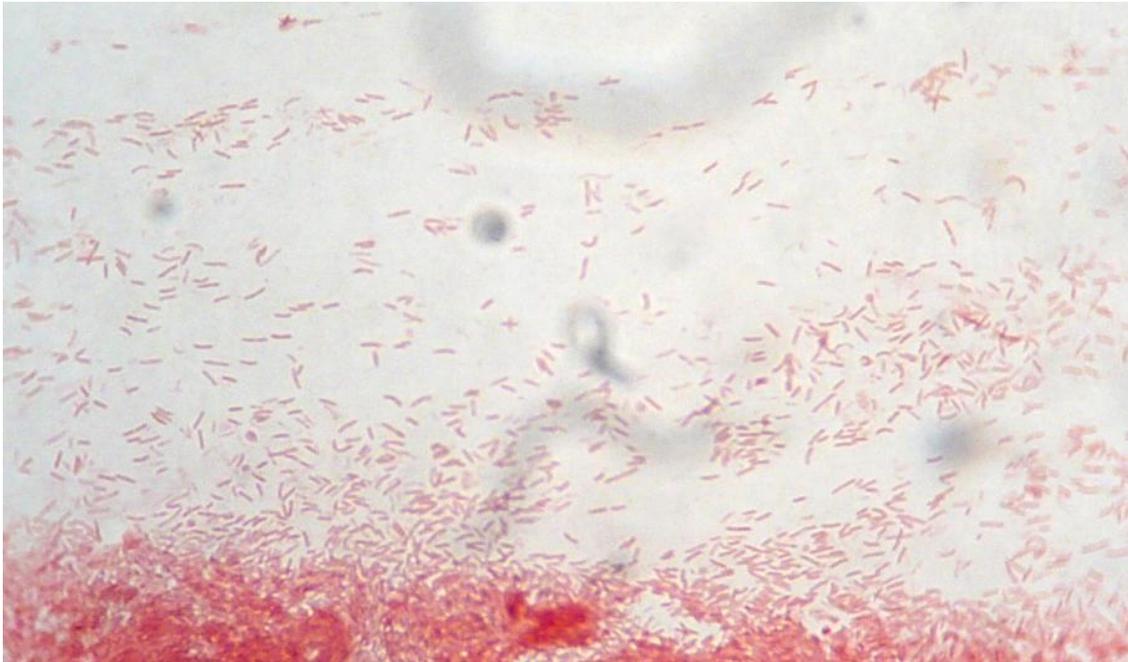


Figura 18. Acercamiento de microfotografía tomada a 40X de bacilos Gram negativos de *Legionella* spp. Microscopía de luz por campo brillante.

7.2 Identificación molecular de los aislados bacterianos.

Los productos obtenidos mediante la PCR fueron fragmentos con peso molecular de 232 pb pertenecientes al gen MIP, lo que demostró la presencia de la especie *Legionella pneumophila* en 14 muestras de 50 totales que se sembraron. Los amplificados se analizaron en geles de agarosa al 2 % contrastando las muestras con un control positivo, ya sea un templado de ADN de la cepa *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 o con un templado de ADN que el kit proporciona para identificación de dicha especie. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril libre de ADN. (Figs. 19 a 21).

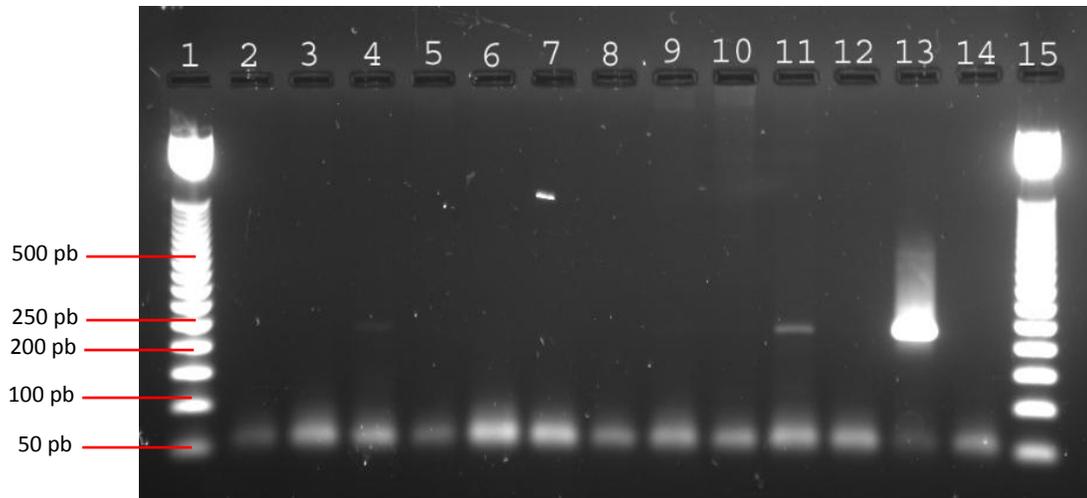


Figura 19. Electroforesis de fragmentos amplificados por PCR para *Legionella pneumophila* pertenecientes al primer muestreo. Marcador de peso molecular (escaleras de 50 pb, carriles 1 y 15). Fragmentos de 232 pb del gen MIP (carriles 4 y 11). Control positivo: fragmento de 232 pb del gen MIP (carril 13). Control negativo: agua destilada estéril (carril 14). Gel de agarosa al 2 %.

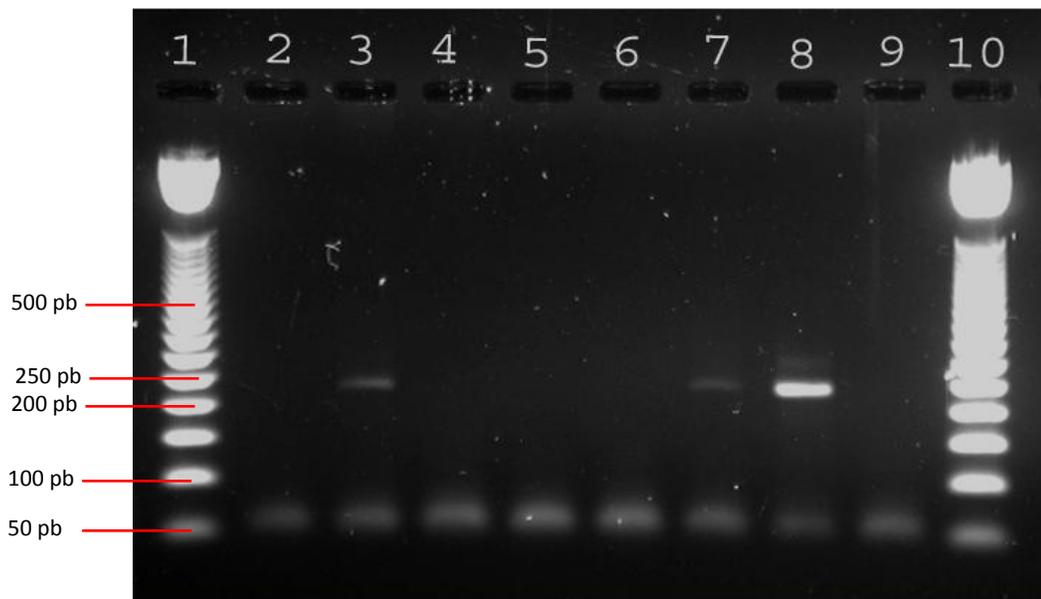


Figura 20. Electroforesis de fragmentos amplificados por PCR para *Legionella pneumophila* pertenecientes al primer muestreo. Marcador de peso molecular (escaleras de 50 pb, carriles 1 y 10). Fragmentos de 232 pb del gen MIP (carriles 3 y 7). Control positivo: fragmento de 232pb del gen MIP (carril 8). Control negativo: agua destilada estéril (carril 9). Gel de agarosa al 2 %.

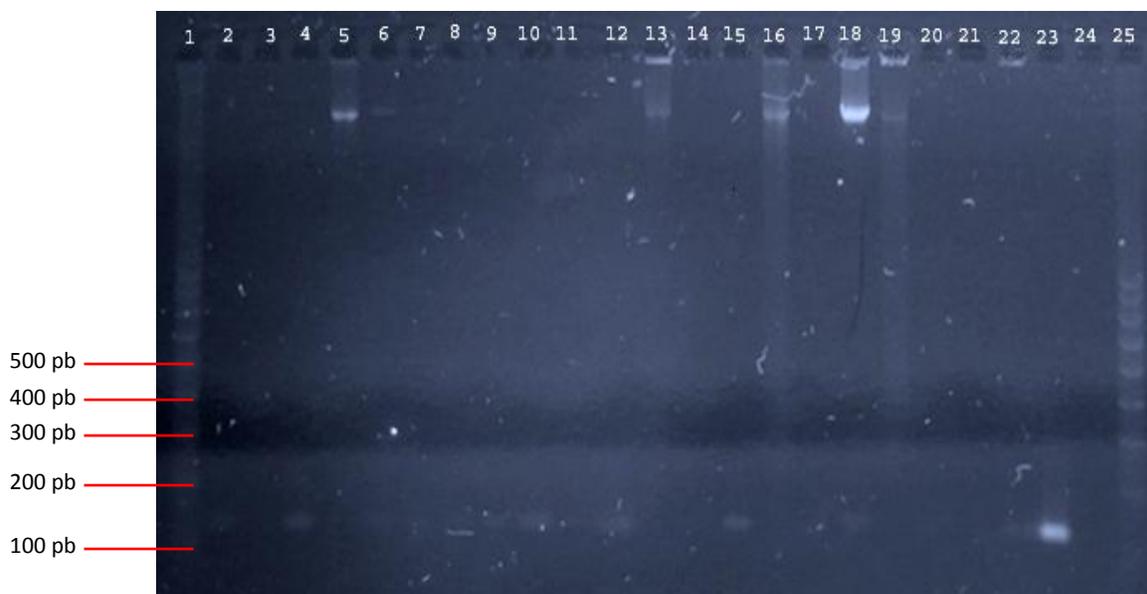


Figura 21. Electroforesis de fragmentos amplificados por PCR para *Legionella pneumophila* pertenecientes al segundo muestreo. Marcador de peso molecular (escaleras de 100 pb, carriles 1 y 10). Fragmentos de 232 pb del gen MIP (carriles 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 18 y 20). Cepa *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152 (carril 22). Control positivo: fragmento de 232 pb del gen MIP (carril 23). Control negativo: agua destilada estéril (carril 24). Gel de agarosa al 2 %.

7.3 Parámetros fisicoquímicos

La temperatura interna de las biopelículas al momento de su colecta y los valores de pH y conductividad eléctrica fueron medidos en el balneario “El Géiser”. Estos parámetros son de gran importancia para determinar si las condiciones del microambiente que brindan las biopelículas son las adecuadas para la supervivencia y multiplicación de bacterias del género *Legionella*.

7.3.1 Temperatura de las biopelículas (°C)

Los resultados obtenidos con la medición de este parámetro mostraron que la temperatura mínima encontrada dentro de las biopelículas fue de 21.8 °C y la máxima de 47.8 °C, habiendo un intervalo entre ellas de 26 °C. Esta notable diferencia se debe a que durante el primer muestreo, el géiser presentaba mucha actividad debido a la temporada de lluvias. Por lo anterior, la nube de aerosoles era densa y con una temperatura superior a los 50 °C hasta donde era posible medirla. Bajo estas

condiciones, la nube de aerosoles golpeaba con mayor potencia las paredes cercanas que rodean al géiser, teniendo como consecuencia el incremento brusco de la temperatura interna en las biopelículas. Este comportamiento puede ser observado en la Figura 22 donde de manera particular puede apreciarse que durante el muestreo I se obtuvieron las temperaturas más altas dentro de las biopelículas, y en el muestreo II y III dicho parámetro se comporta de manera similar.

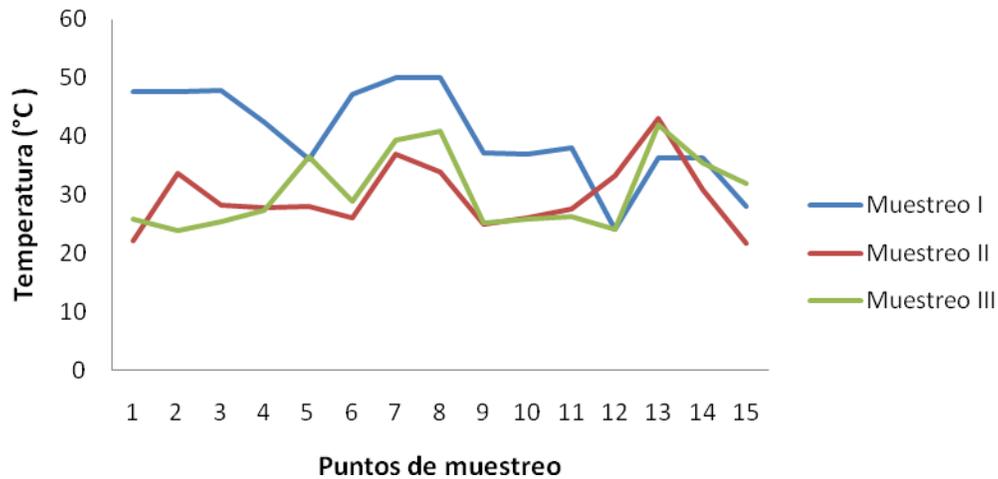


Figura 22. Valores de la temperatura interna de las biopelículas en cada uno de los tres muestreos.

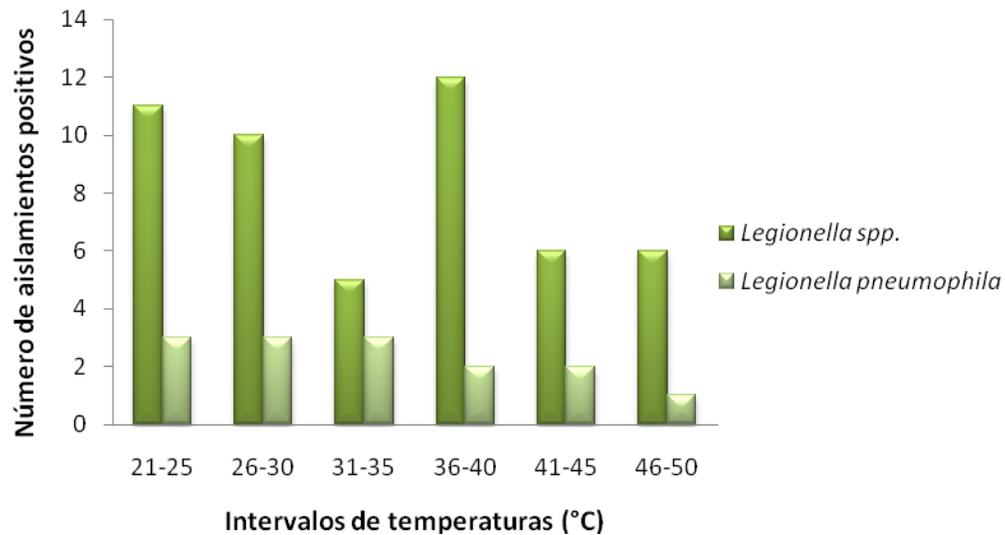


Figura 23. Intervalos de temperaturas donde se obtuvieron crecimientos de *Legionella* spp. y *L. pneumophila*.

En la Figura 23 se muestran los intervalos de temperatura en donde se obtuvieron crecimientos bacterianos en agar BCYE para *Legionella* spp. y el número de muestras positivas para *Legionella pneumophila*. Se observa que el número de bacterias de la especie *L. pneumophila* decrece conforme aumenta la temperatura del lugar, estando el rango óptimo de temperatura entre los 21 y 35 °C lo que permite la presencia y multiplicación de dicha especie.

7.3.2 Temperatura atmosférica (°C)

Para este trabajo fue necesario medir la temperatura ambiental (Fig. 24) para conocer si el lugar presentaba las condiciones adecuadas para la presencia de bacterias del género *Legionella* y amebas de vida libre, principales hospederas de estos microorganismos. Como se puede observar, existe una diferencia considerable entre la temperatura del primer muestreo y la de los dos restantes. Esto se debe a la temporada de lluvias y el mal tiempo que se presentó durante el primer muestreo, sin embargo, la temperatura se mantuvo en el intervalo óptimo para el crecimiento de bacterias del género *Legionella* y AVL.

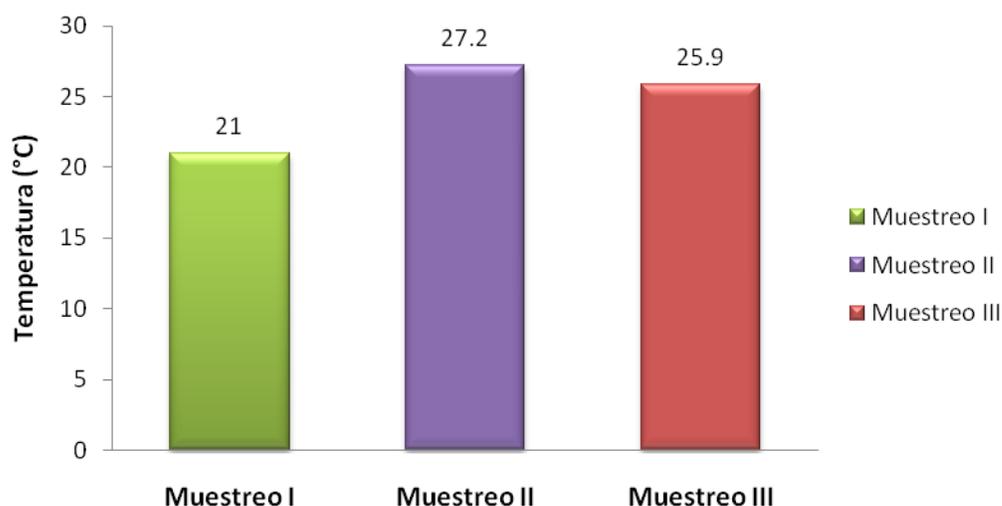


Figura 24. Promedio de los valores de la temperatura ambiental registrados en cada muestreo.

7.3.3 pH del agua

Los valores de pH registrados para cada una de las muestras permanecieron constantes a lo largo de dos muestreos. Este valor no se determinó en el primer muestreo (Fig. 25). El valor máximo y mínimo nos indica que el agua emanada por el géiser tiene un grado alcalino y se encuentra dentro del ámbito de crecimiento reportado para *Legionella* spp.

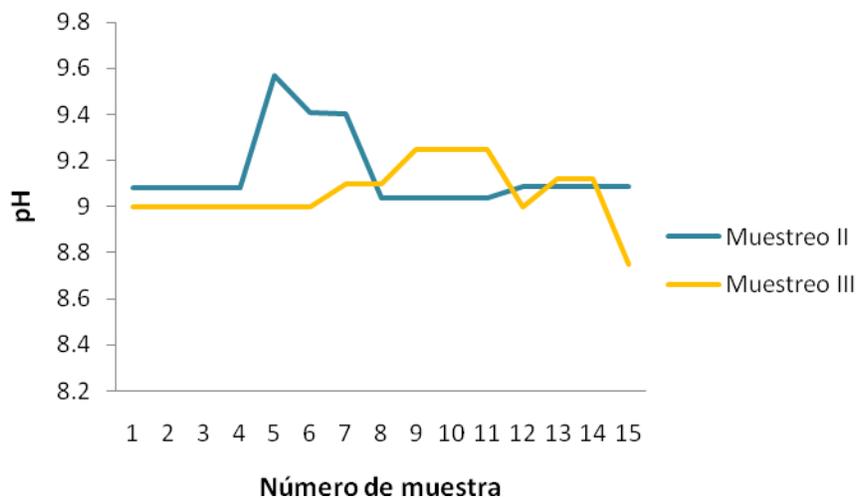


Figura 25. Valores de pH para cada una de las muestras correspondientes al segundo y tercer muestreo respectivamente.

7.3.4 Conductividad eléctrica (mS/cm³) del agua

Los valores registrados para las muestras del segundo y tercer muestreo (Fig. 26) permanecieron constantes y dentro del ámbito de tolerancia de las bacterias del género *Legionella*. Este valor no se midió en el primer muestreo.

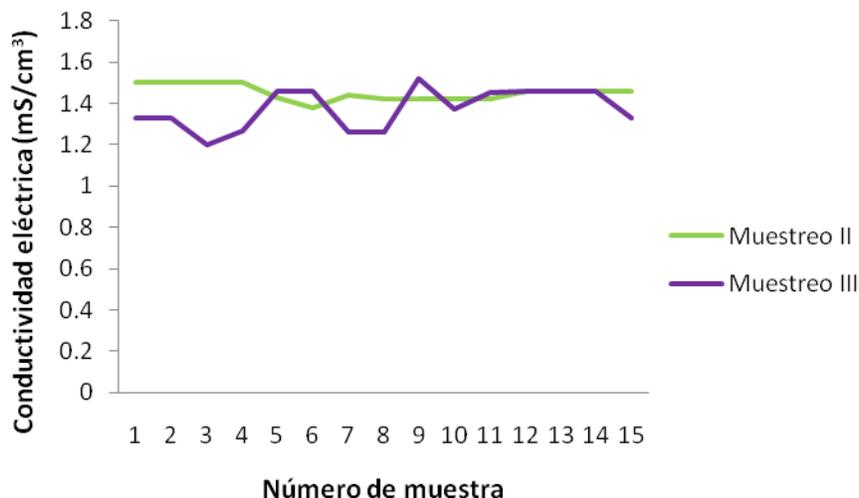


Figura 26. Valores de conductividad en mS/cm³ para cada una de las muestras correspondientes al segundo y tercer muestreo respectivamente.

Los resultados globales de este trabajo mostraron que un 28.0 % de las muestras colectadas contienen a la bacteria *Legionella pneumophila* (Cuadro 8), lo que nos indica que es un patógeno que se puede encontrar fácilmente en el ambiente. Esta cifra es considerablemente alta ya que, si se considera que sólo se realizaron tres muestreos en el balneario y de éstos, en más de una cuarta parte de las muestras podemos encontrar a la especie patógena número uno reportada para los casos de neumonía y fiebre de Pontiac, no se puede descartar su presencia en más muestras de biopelículas, en el agua que corre por los acueductos ni la que abastece las piscinas del lugar.

Cuadro 8. Resultados globales y porcentajes de la presencia de *Legionella* spp. y *L. pneumophila*.

	<i>Legionella</i> spp.	<i>L. pneumophila</i>
Número de muestras positivas (n) / Total de muestras (N). (%)	50/50 (100)	14/50 (28.0)

Por lo anterior, se puede afirmar que existe un riesgo considerable de adquirir una infección por la bacteria *Legionella* spp. y *L. pneumophila* al inhalar los aerosoles que emite el géiser o agua procedente de los escurrimientos de las paredes del mismo.

8. DISCUSIÓN

8.1 Identificación de *Legionella* spp. y *L. pneumophila*.

A partir de muestras de agua, biopelículas y aerosoles formados en las paredes periféricas de un géiser en el Estado de Hidalgo, se identificó la presencia de bacterias del género *Legionella* y específicamente a la especie patógena *L. pneumophila* la cual, es responsable de casi el 90 % de los casos reportados de enfermedad (Diederer, 2008; Declerck, 2009). Con este estudio, se reporta por primera vez el aislamiento de este patógeno a partir de muestras ambientales en México.

La identificación de la especie *Legionella pneumophila* en el 28% de las muestras analizadas sugiere que es un patógeno que se puede encontrar fácilmente en las muestras ambientales, ya que en casos hospitalarios se ha reportado que el porcentaje de su presencia es solo del 5 % (Benkel *et al.*, 2000; Diederer, 2007; Darby y Buising, 2008).

Con la PCR estándar se pudo identificar de manera sencilla y relativamente rápida el estatus de las colonias seleccionadas como probables legionelas. Es un método empleado frecuentemente para diagnosticar la presencia de las especies patógenas en los brotes epidemiológicos con una especificidad del 100 %, sobrepasando la de las pruebas serológicas y del antígeno urinario (Darby y Buising, 2008). Con esta herramienta de biología molecular se pueden identificar de igual forma los aislados bacterianos que no pertenecieron a la especie *L. pneumophila*, tomando en cuenta que también se han reportado infecciones por especies como *L. dumoffii*, *L. micdadei*, *L. bozemanii* y *L. longbeacheae*, las cuales han sido asociadas con la exposición a mecanismos de riego en jardines y fuentes ornamentales (Darby y Buising, 2008).

8.2 Características de las biopelículas.

Con la elaboración de este trabajo se pudo comprobar que las biopelículas representan una buena estrategia para la supervivencia de bacterias y demás microorganismos.

Esto coincide con lo encontrado por Betancourth y cols. (2004) y Declerck y cols. (2007) quienes mencionan que las bacterias logran ventajas significativas al quedar protegidas dentro de las biopelículas, de las fluctuaciones ambientales de humedad, temperatura y pH; logrando cierta tolerancia a los antimicrobianos y convirtiéndolas en complejos difíciles de erradicar. Lo anterior se comprobó en el laboratorio ya que aún siguiendo la metodología mencionada por los CDC para la recuperación de *Legionella* del ambiente y sometiendo a las muestras a una descontaminación ácida, en todos los primeros cultivos se presentó una contaminación excesiva de los mismos. Al presentarse esta situación, se fueron aislando y purificando las colonias hasta obtener crecimientos similares a los del género *Legionella* sobre el agar selectivo BCYE. Esto puede deberse a lo referido por Declerck (2009) sobre la gran cantidad de bacterias Gram negativas que pueden ser encontradas dentro de las biopelículas, las cuales, al estar adheridas unas a otras forman una gran matriz de mucopolisacárido el cual, mejora la trama de otros microorganismos al producir y suministrar más fuentes de energía y canales de circulación de agua, oxígeno y nutrientes, encontrando de esta forma dentro de las biopelículas un microambiente adecuado para todos los microorganismos que las conforman.

8.3 Parámetros físicoquímicos del agua y biopelículas.

La temperatura interna de las biopelículas fue un parámetro de interés en este estudio ya que esto demuestra la capacidad que tienen estas matrices de crear una interfase entre los microorganismos y el ambiente externo. En este trabajo se encontró que el ámbito de temperatura de las biopelículas en la que se encuentran las bacterias del género *Legionella* se amplía de forma significativa en la zona, encontrando aislados bacterianos a partir de biopelículas con temperaturas menores a los 25 °C. Esto coincide con lo citado por Piao y cols. (2006) y Declerck (2009) al presentar que las condiciones de crecimiento de las legionelas en el ambiente no son muy estrictas ya que pueden soportar temperaturas de 5 hasta 63 °C. Por lo general, los ambientes naturales no son relacionados con legionelosis ya que muchas veces las condiciones del hábitat no son compatibles con la extensión masiva de estos microorganismos; sin embargo, al pasar de un ambiente natural a un sistema artificial donde la temperatura tiende a ser mayor, se ha observado que *Legionella* spp. coloniza las biopelículas

existentes y se multiplica masivamente en un tiempo menor que el que le tomaría en los ambientes naturales (Ortiz de Villajos y Ferrer, 2002; Piao *et al.*, 2006). En este trabajo no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la estructura de la biopelícula y la presencia de *Legionella* spp. y *L. pneumophila* ya que se logró su aislamiento a partir de biopelículas fijadas a las paredes del géiser y a la vegetación, así como en las biopelículas flotantes. Todas ellas presentando diferencias en grosor y textura.

De igual forma, se estableció que la temperatura atmosférica del lugar no condicionó la presencia o ausencia de bacterias del género *Legionella* ni de la especie *L. pneumophila* ya que las temperaturas ambientales en el lugar, entran en el intervalo óptimo de crecimiento de estas bacterias, el cual se encuentra entre los 20 y 50 °C (Konishi *et al.*, 2006). Lo anterior sugiere que a pesar de que en el tercer muestreo no se obtuvieron muestras positivas para *L. pneumophila*, el parámetro de la temperatura ambiental no sobrepasó los valores obtenidos en el primero y segundo muestreo, por lo que se sugiere revisar los procesos metodológicos para extraer y purificar el ADN de las muestras.

Se comprobó que la presencia de las bacterias del género *Legionella* y de la especie *L. pneumophila* estuvo determinada por los valores de pH encontrados en el agua del lugar. Como lo describen Ohno y cols. (2003) y Declerck (2009), el intervalo de mediciones tan estrecho encontrado para este parámetro sugiere que las condiciones alcalinas del lugar cumplen con los requerimientos para la presencia y multiplicación de estas bacterias. Cabe destacar que se encontró a la especie *L. pneumophila* en una muestra con un pH mayor al que ha reportado Declerck (2009) que puede llegar a tolerar este microorganismo (pH de 5.0 a 9.2). En este trabajo se encontró a esta especie en una muestra con pH de 9.57, perteneciente al segundo muestreo. Esto podría sugerir la presencia de esta bacteria dentro de una estructura de resistencia como un quiste amebiano o dentro de un protozoo.

En cuanto a la conductividad eléctrica, los resultados obtenidos en este trabajo corresponden a los que reportaron Ohno y cols. (2003). Al comparar ambos trabajos, se determinó que el ámbito de valores de conductividad eléctrica que soportan las especies del género *Legionella* es muy amplio, encontrándose entre los 0.9 mS/cm³ hasta los 27 mS/cm³. Con esto se confirma que la conductividad eléctrica del agua

proveniente del géiser es óptima para el crecimiento de estos microorganismos. Los resultados obtenidos sobre la presencia de las bacterias de interés en este trabajo, sugieren la presencia de minerales como el magnesio, calcio, sodio y sulfatos en concentraciones adecuadas ya que éstos juegan un importante papel en el metabolismo bacteriano: la baja presencia de éstos minerales traería consigo un efecto desfavorable para la supervivencia y crecimiento de *L. pneumophila*. Por el contrario, altas concentraciones de minerales, son tóxicos para las células (Ohno, 2006; Hrubá, 2009).

8.4 Asociación de las bacterias del género *Legionella* con protozoos hospederos.

Es importante mencionar que en los estudios realizados por Rangel (2006) y Urbina (2006) en el mismo balneario, fueron encontradas amebas de vida libre de los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Hartmannella*, entre otras. Se sabe que *Legionella pneumophila* es capaz de infectar a catorce especies de amebas de vida libre, entre ellas las antes mencionadas y dos de protozoos ciliados (Abu, 2001; Shadrach *et al.*, 2005; Fields, 2002). Para este estudio, la importancia de esta relación de endosimbiosis radica en que en los brotes de enfermedad de los legionarios, ameba y bacteria han sido aisladas de la misma fuente de infección. Como es sabido, con la replicación intracelular dentro de los protozoos, *L. pneumophila* exhibe un dramático incremento en la resistencia a condiciones desfavorables, incluyendo elevadas temperaturas, acidez y una gran osmolaridad, lo cual puede facilitar la supervivencia de la bacteria en el ambiente (Sheehan *et al.*, 2005 y 2007); del mismo modo, se ha demostrado que dentro de los protozoos la bacteria se hace más resistente a desinfecciones químicas y biocidas, comparadas con bacterias crecidas *in vitro*. Lo más alarmante en este asunto es que en el balneario de interés fueron encontrados estos dos grupos de organismos patógenos para el hombre, lo que podría hacer pensar que la presencia de ambos podría potencializar la infección de uno de ellos. Esto ha sido comprobado por Abu (2001), que demostró con pruebas en ratones que la infectividad de *Legionella pneumophila* se ve dramáticamente incrementada cuando se replica dentro de la ameba *Hartmannella vermiformis*, al producir más infecciones y volviéndola más letal.

Por la capacidad que presenta *Legionella pneumophila* de sobrevivir en las biopelículas y multiplicarse dentro de protozoos hospedadores patógenos para el hombre, existe una

alta probabilidad de contagio para los usuarios del balneario por cualquiera de los dos grupos de microorganismos encontrados en el agua procedente del géiser y que abastece a las albercas, así como en las biopelículas que se forman en las paredes periféricas de dicho complejo hidrotermal. En base a lo anterior, se recomienda aplicar técnicas de microscopía electrónica a los aislados amebianos encontrados en el balneario “El Géiser” y posteriormente ampliar la metodología a probables fuentes de contagio, con la finalidad de establecer con certeza y precisión la relación de las bacterias del género *Legionella* con sus protozoos hospederos.

Sólo en una muestra de aerosoles se pudo aislar e identificar molecularmente a *Legionella pneumophila*, aunque esto no signifique estrictamente que no exista su presencia en elevadas concentraciones en el vapor del agua proveniente del géiser. Como menciona Pascual *et al.* (2001) es necesario llevar a cabo un muestreo de aerosoles por un largo periodo de tiempo ya que la concentración de éstos baja y la presencia de bacterias viables puede verse disminuida drásticamente.

8.5 Riesgo de infección por *Legionella* spp. o *L. pneumophila*.

La importancia de aislar a bacterias del género *Legionella* y especialmente a *L. pneumophila* a partir de muestras ambientales de un balneario en el Estado de Hidalgo, radica en que se ha reportado como un organismo oportunista, siendo uno de los agentes causales de neumonías atípicas en el hombre y su presencia en dicho lugar de recreación apunta que se tiene que poner especial atención a personas vulnerables tanto en edad como en su sistema inmunológico que recurren a este lugar como terapia alternativa. En base a esto, se podría sugerir un estudio futuro que pretenda el aislamiento de este patógeno emergente a partir de sistemas de refrigeración, torres de enfriamiento, aparatos de nebulización y demás fuentes hospitalarias e industriales.

Cabe destacar que en lo referido por Abu y cols. (1998) la erradicación de *L. pneumophila* de fuentes ambientales por desinfección puede requerir un continuo tratamiento del agua con agentes antimicrobianos específicos para dicho fin. Sin embargo, la sofisticada asociación de las legionelas con los protozoos es el mayor factor para la continua presencia de la bacteria en el ambiente. En base a esto se puede

suponer que la habilidad de *L. pneumophila* para sobrevivir dentro de quistes amebianos, el cual es un estado de desarrollo de gran resistencia de estos protozoos, contribuyen a la resistencia de *L. pneumophila* frente a agentes físicos y bioquímicos empleados para su erradicación. Por ello, es posible que la eliminación de la bacteria del ambiente deba empezarse con la prevención de infección por protozoos, los cuales parecen ser una parte integral y esencial en el ciclo infectivo de *L. pneumophila*.

La detección de bacterias del género *Legionella* en México puede aumentar la sospecha de legionelosis en el medio hospitalario y en los grupos de riesgo y de esta manera, establecer información para su vigilancia epidemiológica y obtener una oportuna acción del personal de la salud en caso de un brote de infección. Hasta la fecha solo se han reportado en el país dos casos de neumonía por *Legionella pneumophila* sin pruebas de laboratorio confirmatorias y ninguna por el aislamiento del agente causal (López-Merino, 2006). Sin embargo, se tienen reportados 68 casos (Fig. 2) a partir de 1987 de turistas que viajaron a México y presentaron un cuadro de neumonía por *L. pneumophila* en su país de origen (EWGLI, 2010). Estos datos muestran que nuestro país no está exento de presentar brotes cuyo agente causal sea este microorganismo, lo que evitaría que estos casos pasaran desapercibidos o que fueran reportados con un diagnóstico de etiología desconocida.

Cabe destacar que en México no se han tomado las medidas necesarias para la información y capacitación sobre las bacterias del género *Legionella*. Este microorganismo no está presente en los agentes etiológicos reportados para neumonías en el país como lo son, en orden de importancia: *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. coagulasa* negativa, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida* spp., *C. albicans*, *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas* spp. (Díaz-Ramos, 2010). Sin embargo, sí se puede identificar en laboratorios especializados como los del Instituto de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas (INDRE, 2010). En una búsqueda de información sobre el estatus epidemiológico de *L. pneumophila* en nuestro país, solo fueron encontrados los trabajos preventivos de Villaseñor y Sapian (2005) y López-Merino (2006).

Si entendemos la vigilancia epidemiológica como información para la acción en caso de un brote de legionelosis en el país, se puede actuar oportunamente al haber dado este primer paso: la detección de *Legionella* spp. y *L. pneumophila* a partir de muestras procedentes de un sistema hidrotermal en México.

9. CONCLUSIONES

Se identificó por primera vez en México la presencia de bacterias del género *Legionella* a partir de muestras de biopelículas de un sistema hidrotermal en el Estado de Hidalgo.

Molecularmente se identificó a la especie *L. pneumophila* a partir de cultivos realizados sobre agar selectivo BCYE de las muestras de biopelículas. Comprobando que es una herramienta útil y de gran sensibilidad para determinar la presencia o ausencia de microorganismos difíciles de cultivar e identificar por métodos bioquímicos.

Se comprobó que el tipo de sustrato y las características de las biopelículas no condicionan la presencia de bacterias del género *Legionella*, ya que éstas fueron encontradas en todos los tipos de biopelículas que se colectaron.

Se determinó que las mediciones obtenidas de los parámetros fisicoquímicos en el lugar tales como la temperatura interna de las biopelículas, la temperatura ambiental y la conductividad, estuvieron dentro del intervalo de tolerancia de las especies del género *Legionella*. Sin embargo, en el caso del pH, se registró la presencia de la especie *L. pneumophila* en un intervalo mayor al que se ha reportado que tolera este microorganismo.

En estudios anteriores realizados en el balneario se obtuvieron resultados positivos para la presencia de AVL reportadas como microorganismos esenciales para la multiplicación y supervivencia de bacterias del género *Legionella*. Se establece una estrecha relación entre la presencia de estos agentes y de la bacteria de interés en el estudio dada la excesiva contaminación que presentaron las muestras al ser sembradas sobre el agar específico y al obtener a *Legionella pneumophila* en un intervalo de pH mayor al que se ha reportado que resiste esta especie.

Al identificar a la especie *Legionella pneumophila* en un 28 % de las muestras analizadas, su presencia sugiere un riesgo de infección por esta bacteria en los usuarios del balneario de aguas termales que fue analizado.

En México, la identificación del género *Legionella* no ha sido reportado a partir de muestras hospitalarias ni destaca entre los agentes etiológicos de neumonías adquiridas, por lo que se sugiere ampliar este tema de investigación para que este grupo de microorganismos sea considerado por el Sector Salud de nuestro país en el diagnóstico de patologías de etiología desconocida.

10. RECOMENDACIONES

Se recomienda hacer estudios de identificación de *Legionella* spp. y *L. pneumophila* en medios hospitalarios e industriales, así como en torres de refrigeración y sistemas de aire acondicionado de oficinas y hoteles. De esta manera, se tendrá una mejor perspectiva sobre los lugares donde tienden a distribuirse estos microorganismos y así iniciar los procesos de desinfección o control de los mismos.

Se sugiere investigar la presencia de estas bacterias dentro de amibas de vida libre y estructuras de resistencia como quistes amebianos mediante técnicas de microscopía electrónica, con la finalidad de establecer la relación hospedero-parásito que mantienen estos dos microorganismos y los factores de virulencia que se activan con dicha simbiosis.

En un ambiente natural, en el cual no se puede llevar a cabo un proceso de desinfección total, se debe tener especial cuidado con niños y adultos mayores al visitar un ambiente hidrotermal, no dejar que los niños se zambullan sin el debido entrenamiento y evitar acudir a estos lugares si se tiene sospecha de una merma en el sistema inmunológico. Esto con la finalidad de evitar una posible infección bacteriana por *Legionella* spp. o cualquier otro microorganismo oportunista que pueda haber, tal es el caso de las AVL encontradas en el lugar de estudio.

Las albercas y tinas de hidromasaje de los centros recreativos y de descanso, deben ser inspeccionadas y mantenidas con un nivel continuo de biocidas o desinfectantes. Del mismo modo, es necesario medir los niveles de calidad del agua periódicamente para registrar si el desinfectante sigue siendo efectivo para la desinfección y de esta forma mantener en niveles bajos las posibles unidades formadoras de colonias (ufc ml⁻¹) de bacterias patógenas para el hombre.

Las torres de enfriamiento deben ser drenadas y limpiadas en forma periódica para eliminar las escamas y el sedimento formados con el paso del tiempo. En los aparatos de inhaloterapia no debe utilizarse agua corriente de la llave. Son eficaces las medidas de descontaminación por métodos como la cloración, el sobrecalentamiento de los abastecimientos de agua o ambos en lugares sospechosos.

LITERATURA CITADA

- Abu, Y., Gao, L., Stone, B., Venkataraman, C. y Harb, O. 1998. Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (9): 3127-3133.
- Abu, Y. K. Invasion and exploitation of amoebae by *Legionella pneumophila*. En: IX International Meeting of the Biology and Pathogenicity of Free Living Amoebae Proceedings. July 2001. 8-14 pp.
- Bartie, C., Venter, S. N. y Nel, L. H. 2003. Identification methods for *Legionella* from environmental samples. *Water Res.* **37** (6): 1362–1370.
- Benkel, D., McCulture, E., Woolard, D., Rullan, J., Miller, G., Jerkins, S., Hershey, J., Benson, R., Pruckler, J., Brown, E., Kolczak, M., Hackler, R., Rouse, B. y Breiman, R. 2000. Outbreak of Legionnaires' disease associated with a display whirlpool spa. *Int. J. Epidemiol.* **29** (6): 1092-1098.
- Bethancourth, M., Botero, J. E. y Rivera, S. P. 2004. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colomb. Med.* **35** (1): 34-39.
- Borella, P., Montagna, T., Romano-Spica, V., Stampi, S., Stancanelli, G., Triassi, M., Neglia, R., Marchesi, I., Fantuzzi, G., Tato, D., Napoli, C., Quaranta, G., Laurenti, P., Leoni, E., de Luca, G., Ossi, C., Moro, M. y Ribera, G. 2004. *Legionella* infection risk from domestic hot water. *Emerg. Infect. Dis.* **10** (3): 457-464.
- Borella, P., Montagna, M. T., Stampi, S., Stancanelli, G., Romano-Spica, V., Triassi, M., Marchesi, I., Bargellini, A., Tato, D., Napoli, C., Zanetti, F., Leoni, E., Moro, M., Scaltriti, S., Ribera D'Alcalá, G., Santarpia, R. y Boccia, S. 2005. *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(10): 5805-5813.
- Boulanger, C. A. y Edelstein P. H. 1995. Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (5):1805–1809.
- Carvalho, F. R. S., Foronda, A. S. y Pellizari, V. H. 2007. Detection of *Legionella pneumophila* in water and biofilm samples by cultura and molecular methods from man-made systems in Sao Paulo – Brazil. *Braz. J. Microbiol.* **38** (4): 743-751.
- Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE). Anuarios de morbilidad 1984-2008. Principales causas, nivel nacional. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html> (Consultada el día 20 de febrero de 2010).
- Costa, J., Tiago, I., da Costa, M. S. y Veríssimo, A. 2005. Presence and persistence of *Legionella* spp. in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (2): 663-671.

Darby, J. y Buising, K. 2008. Could it be *Legionella*? *Aust. Fam. Physician.* **37** (10): 812-815.

Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., Hoef, V., Keersmaecker, B. y Ollevier, F. 2007. Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol. Res.* **164** (6): 593-603.

Declerck, P. 2009. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol.* Minireview. (En revisión para publicar). <http://www.ncbi.nlm.gov/pubmed/19678829>.

Delgado-Viscogliosi, P., Simonart T., Parent, V. Marchand, G., Dobbelaere, M. Pierlot, E., Pierzo, V. , Menard-Szczegara, F. , Gaudard-Ferveur, E. Delabre, K. y Delattre, J. M. 2005. Rapid method for enumeration of viable *Legionella pneumophila* and other *Legionella* spp. in Water. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (7): 4086–4096.

Díaz-Ramos, R. D. 2003. Infecciones Nosocomiales. www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-6-2003/08.pdf. (Consultada el día 16 de marzo de 2010).

Diederer, B. M. W. 2008. *Legionella* spp. And Legionnaires' disease. *J. Infect.* **56** (1):1-12.

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

Forbes, B. A., Sahm, D. F. y Weissfeld, A. S. 2004. Bailey & Scott, Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. 11a Edición. México. 502-506 pp.

Gallegos, N. E. M. 1997. *Amibas de Vida Libre Potencialmente Patógenas en Cuerpos de Agua de Uso Recreativo en el Estado de San Luis Potosí*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. México.

García-Rodríguez, J. A. y Picazo, J. J. 1999. Compendio de Microbiología Médica. Género *Legionella*. Edit. Harcourt. España. 172-174 pp.

Health Protection Agency (HPA). 2006. Detection and enumeration of *Legionella* species by centrifugation. *National Standard Method.* **13** (1): 1-15.

Héller, R., Höller, C., Sübmuth, R. y Gundermann, K. 1998. Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. *Lett. Appl. Microbiol.* **26** (1): 64-68.

Hrubá, L. 2009. The colonization of hot water systems by *Legionella*. *Ann. Agric. Environ. Med.* **16** (1): 115-119.

Huerta-Torrijos, J. H., Lisker-Halpert, A., Núñez-Pérez, R. C., Kimura-Fujikami, K., Vázquez-Figueroa, S. y Lázaro-Castillo, J. L. 1995. La neumonía por *Legionella pneumophila*. Informe del segundo caso en México. *Gac. Med. Mex.* **131** (5-6): 587-590.

Instituto de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas (INDRE). 2010. *Enfermedades Emergentes y Urgencias*. <http://www.cenavece.salud.gob.mx/indre/> (Consultada el día 3 de marzo de 2010).

Instituto de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas (INDRE). 2010. *Procedimientos básicos en la toma de muestras biológicas para diagnóstico*. http://www.cenavece.salud.gob.mx/indre/descargas/pdf/procedimientos_basicos_en_la_toma_de_muestras_finales.pdf (Consultada el día 3 de marzo de 2010).

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2010. *Morbilidad hospitalaria 1998-2006*. <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/soc/sis/sisept/default.aspx?t=msal04&s=est&c=3354> (Consultada el día 20 de febrero de 2010).

Jaulhac, B., Nowicki, M., Borstein, M. Meunier, O., Prevost, G., Piemont, Y., Fleurette, J. y Monteil, H. 1992. Detection of *Legionella* spp. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplificación. *J. Clin. Microbiol.* **30** (4): 920-924.

Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., Brooks, G. F., Butel, J. S. y Ornston, L. N. 1990. Microbiología Médica. *El Manual Moderno*. México. D. F. 250-253 pp.

Keith, J. S. y Westran, R. P. 2005. *Bacteriología Clínica*. Masson. Barcelona, España. 93-103 pp.

Kershenobich, D. 2010. Enfermedades emergentes. Seminario "El ejercicio actual de la medicina". Facultad de Medicina, UNAM. http://www.facmed.unam.mx/eventos/seam2k1/2007/oct_01_ponencia.html (Consultada el día 13 de abril de 2010).

Koneman, E. W., Stephen, D. A., Dowell, V. R., William, J. M., Sommers, H. M. y Winn, W. 1992. *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. México. 348-372 pp.

Konishi, T., Yamashiro, T., Koide, M. y Nishizono, A. 2006. Influence of temperature on growth of *Legionella pneumophila* biofilm determined by precise temperature gradient incubator. *J. Biosci. Bioeng.* **10** (6): 478-484.

Lázaro, R. A., Alfonso, G. M., Verdura, H. J., Selman-Houssein, E. y Hernández, H. S. 1997. Aislamiento de *Legionella bozemanii*. Primer reporte en Cuba. *Rev. Cubana. Hig. Epidemiol.* **35** (2): 111-116.

Liu, H., Li, Y., Huang, X., Kawamura, Y. y Ezaki, T. 2003. Use of the *dnaJ* gene for the detection and identification of all *Legionella pneumophila* serogroups and description of the primers used to detect 16S rDNA gene sequences of major members of the genus *Legionella*. *Microbiol. Immunol.* **47** (11): 859-869.

López-Merino, A., Contreras-Rodríguez, A. Sapián-López, L. A., Sergio-Bonilla, S. G., Lozano-Zarain, P., Martínez-Laguna, Y. y Rocha-García R. C. 2006. Agentes infecciosos. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **48** (2): 146-153.

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

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

Nazar, J. 2007. Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir Cabeza Cuello.* **67** (1): 61-72.

Nintansen, R., Utrarachkij, F., Siripanichgon, K., Bhumiratana, A., Suzuki, Y. y Suthienkul, O., 2007. Enhancement of *Legionella pneumophila* culture isolation from microenvironments by Macrophage Infectivity Potentiator (*mip*) gene-specific nested Polymerase Chain Reaction. *Microbiol. Immunol.* **51** (8): 777-785.

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

Ortiz de Villajos, R. J. y Ferrer, B. S. 2002. Notas sobre la ecología de *Legionella*: "El caballo de Troya". *Profesión Veterinaria.* **16** (69): 54-59.

Ozerol, I. H., Bayraktar, M., Cizmeci, Z., Durmaz, R., Akbas, E., Yildirim, Z y Yologlu, S. 2006. Legionnaire's disease: a nosocomial outbreak in Turkey. *J. Hosp. Infect.* **62** (1): 50-57.

Pascual, L., Pérez-Luz, S., Amo, A., Moreno, C., Apraiz, D. y Catalán, V. 2001. Detection of *Legionella pneumophila* in bioaerosols by polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.* **47** (4): 341-347.

Pérez, M. M. Legionelas. En: Llop, A., Valdes-Dapena, V. y Zuarzo, J. S. 2001. *Microbiología y Parasitología Médicas*. Editorial Ciencias Médicas. La Habana, Cuba. 325-332 pp.

Piao, Z., Sze, C. C., Barysheva, O., Iida, K. y Yoshida, S. 2006. Temperature-Regulated Formation of Mycelial Mat-Like Biofilms by *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (2): 1613-1622.

Ramírez, N., Serrano, J. A. y Sandoval, H. 2006. Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Rev. Mex. de Ciencias Farmacéuticas* . **37** (3): 56-71.

Rangel, K. L. R. 2006. *Aislamiento de Naegleria fowleri de un balneario termal alimentado por el agua de un géiser en el Estado de Hidalgo*. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México. 63 pp.

Sabria, M., Alvarez, J., Dominguez, A., Pedrol, A., Sauca, G., Salleras, L., Lopez, A., Garcia-Nuñez, M. A., Parron, I. y Barrufet, M. P. 2006. A community outbreak of legionnaires' disease: evidence of a cooling tower as the source. *Clin. Microbiol. Infect.* **12** (7):642-647.

Shadrach, W. S., Rydzewski, K., Laube, U., Holland, G., Özel, M., Kiderlen, A. F. y Flieger, A. 2005. *Balamuthia mandrillaris*, free-living ameba and opportunistic agent of encephalitis, is a potential host for *Legionella pneumophila* bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (5): 2244-2249.

Sheehan, K. B., Henson, J. M. y Ferris, M. J. 2005. *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (1): 507-511.

Sheehan, K. B., Fagg, J. A., Ferris, M. J. and Henson, J. M. Thermophilic amoebae and *Legionella* in Hot Springs in Yellowstone and grand Teton National Parks. En: Inskeep, W. P. y McDermott, T. R. 2007. *Geothermal Biology and Geochemistry in Yellowstone National Park*. Thermal Biology Institute, Montana State University, Bozeman, Montana. 318-324 pp.

Steinert, M., Hentschel, U. y Hacker, J. 2002. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiology Reviews.* **26** (2): 149-162 p.

The European Working Group for *Legionella* Infections (EWGLI). 2010. http://www.ewgli.org/data/data_tables/month_year_onset.asp (Consultada el día 11 de marzo de 2010).

The European Working Group for *Legionella* Infections (EWGLI). 2010. http://www.ewgli.org/data/graph_of_cases.htm (Consultada el día 11 de marzo de 2010).

The European Working Group for *Legionella* Infections (EWGLI). 2010. http://www.ewgli.org/data/data_tables/year_onset_country_travel.asp (Consultada el día 11 de marzo de 2010).

The *Legionella* Experts. 2010. http://www.legionella.org/general_info.htm (Consultada el día 13 de marzo de 2010).

Urbina, C. M. 2006. *Efecto de la temperatura sobre la distribución de amebas de vida libre en un sistema de aguas termales alimentado por un Géiser en el Estado de Hidalgo*. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México. 65 pp.

Vargas-Marcos, F. 1999. *Recomendaciones para la prevención y control de la Legionelosis*. Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo. Dirección General de Salud Pública. Madrid, España. 90 p.

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

ANEXOS

- 1. TINCIÓN DE GRAM**
- 2. AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO DE BACTERIAS GRAM**
- 3. PROTOCOLO PARA PCR ESTÁNDAR**
- 4. GEL DE AGAROSA PARA ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS**

ANEXO 1. TINCIÓN DE GRAM

1. Preparar un frotis de la colonia bacteriana. Fijarla con la menor cantidad de calor posible.
2. Teñir durante un minuto con cristal violeta.
3. Lavar el exceso con agua y sacudir el portaobjetos.
4. Cubrir el frotis con lugol para el Gram y mantenerlo por un minuto.
5. Lavar con agua y sacudir sin dejar secar.
6. Decolorar con la mezcla de alcohol-acetona ó alcohol del 95 % por algunos segundos o menos, lo cual es suficiente para un frotis fino.
7. Lavar con agua.
8. Teñir con safranina durante 15 a 20 segundos.
9. Lavar el exceso de colorante y observar al microscopio.

ANEXO 2. AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Wizard Genomic ADN Purification Kit (Promega, Madison, WI)

1. Agregar 1ML de cultivo a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ML.
2. Centrifugar a 13 000 – 16 000 X G por 2 minutos y quitar el sobrenadante.
3. Agregar 600 µl de la solución para lisar el núcleo. Pipetear suavemente.
4. Incubar a 80 °C por 5 min para lisar las células. Enfriar a temperatura ambiente.
5. Agregar 3 µl de solución RNASE a las células lisadas. Invertir 2 - 5 veces el tubo para mezclar.
6. Incubar a 37 °C de 15 a 60 min. Enfriar a temperatura ambiente.
7. Agregar 200 µl de solución de precipitación de proteínas. Agitar vigorosamente en el vórtex por 20 segundos.
8. Incubar la muestra en hielo por 5 minutos.
9. Centrifugar a 13 000 – 16 000 X G por 3 minutos.
10. Transferir el sobrenadante (con el ADN) a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ML limpio que contenga 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
11. Mezclar suavemente por inversión hasta que se vea como una masa de hilos de ADN.
12. Centrifugar a 13 000 – 16 000 X G por 2 minutos.
13. Con cuidado verter el sobrenadante sobre un papel absorbente limpio.
14. Agregar 600 µl de etanol 70% a temperatura ambiente e invertir el tubo unas cuantas veces para lavar el pellet de ADN.
15. Centrifugar a 13 000 – 16 000 X G por 2 minutos. Con cuidado aspirar el etanol.
16. Drenar el tubo sobre papel absorbente y dejarlo al aire libre por 10–15 minutos.
17. Agregar 100 µl de solución rehidratante de ADN al tubo.
18. Incubar a 65 °C por una hora mezclando la solución periódicamente, ó
19. Dejar la solución toda la noche a 4 °C
20. Conservar el ADN a 2-8 °C.

ANEXO 3. PROTOCOLO PARA PCR ESTÁNDAR

Maxim Biotech Kit Inc. Cat. No.: SP-10486

A. Preparación de la Mezcla Maestra.

Agregar 250 µl de Primers pre-mezclados a cada tubo de Buffer para PCR. Esta mezcla se puede guardar a -20 °C.

Solución	Por prueba de PCR
Solución maestra (A)	40 µl
Muestra o control (ADNc)	10 µl
Taq polimerasa	0.2 µl

Llevar los tubos a un volumen final de 50 µl con agua destilada si la muestra o control utilizado es menor a 10 µl.

Puesto que la cantidad de Taq polimerasa necesaria para cada reacción es muy baja, se recomienda que la mezcla maestra (A) y la polimerasa se mezclen en suficiente cantidad para las muestras necesarias del día. La mezcla maestra junto con la polimerasa se deberá etiquetar como “*Mezcla maestra lista para usar*”, la cual se deberá guardar en un tubo de reacción individual antes de agregar la muestra o el control de ADN.

La “*Mezcla maestra lista para usar*” puede prepararse diariamente y guardarse a 4 °C.

B. Perfiles de la reacción de PCR.

Los perfiles de la reacción deberán ser ajustados de acuerdo al tipo de máquina y las necesidades del usuario. Sin embargo, un perfil de tiempo-temperatura para la reacción de PCR se ha ajustado para las máquinas Perkin Elmer tipos 2400 y 9600 y se proporciona lo siguiente:

°C	Tiempo	Número de ciclos
96 °C	1 min	1 x
94 °C	1 min	30 – 35 x
58 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	1 x
4-25 °C	Detener	

Análisis de las muestras amplificadas.

Una décima parte de la muestra amplificada puede ser estudiada por electroforesis en gel de agarosa que contenga 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Una franja de 232 pares de bases (pb) indica un resultado positivo o la presencia de secuencias blanco en las muestras.

ANEXO 4. GEL DE AGAROSA PARA ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

1. Disolver agarosa en la concentración requerida (*) en buffer TBE 0.5 X a ebullición.
 2. Enfriar a 55 °C y agregar 0.5 µg/ml de bromuro de etidio si se requiere (**).
 3. Sellar los extremos de la bandeja con el gel en la autoclave y ponerla en la posición correcta del peine.
 4. Verter la agarosa en el recipiente y evitar la formación de burbujas de aire (flamear suavemente el fluido para remover el gel). Obtener un gel de 0.5 cm de grosor.
 5. Permitir que el gel se asiente a temperatura ambiente y llevarlo al refrigerador durante 30 minutos.
 6. Remover el masking tape de los extremos de la bandeja de fundición y cuidadosamente remover bien la formación del peine.
 7. Dejar el gel en la bandeja de fundición y ponerlo dentro del aparato para electroforesis.
 8. Poner en el aparato para electroforesis el buffer TBE 0.5 X hasta que el gel quede sumergido unos cuantos milímetros en el buffer.
 9. Poner 2 µl de buffer de carga en 8 µl de muestra de ADN, mezclar vigorosamente mediante short spin y agregar a cada uno de los pozos.
 10. Conectar la fuente de poder y el aparato de electroforesis y dejarlo que funcione por el tiempo elegido (65V por 120 minutos).
 11. Si la electroforesis se lleva a cabo en presencia de bromuro de etidio, cuidadosamente remover la bandeja de fundición con el gel y ver el gel bajo luz ultravioleta a 305 nm.
 12. Si la electroforesis no se realiza en presencia de bromuro de etidio, teñir el gel por una hora en agua destilada que contenga 1 µl/ml de bromuro de etidio y desteñir por 20 min en agua destilada después observar bajo la luz ultravioleta.
 13. Fotografiar el gel bajo la luz ultravioleta usando una Polaroid 665 instatamic film y un sistema Polaroid MP-4. Un filtro anaranjado Wratten 23^a es puesto entre el gel y la cámara y un filtro Wratten 2^a es solo usado entre la fuente de luz y el filtro 23^a. Los tiempos de exposición comunes con una apertura de lentes de 4.5 es de 30 segundos. La película se desarrolla de acuerdo a las instrucciones de manejo.
- Las imágenes producidas con la Polaroid 665 son de mediana calidad de impresión, pero de alta calidad en negativos.

(*) El fraccionamiento de la gama de ADN varía de acuerdo a las siguientes concentraciones de agarosa:

5-60 kbp	0.35 %
2-20 kbp	0.7 %
0.6-8 kbp	1 %
0.5-6 kbp	1.2 %
0.2-4 kbp	1.4 %
0.1-2 kbp	2 %

(**) La presencia de bromuro de etidio durante la electroforesis reduce la movilidad de ADN cerca de 15% y puede alterar el relativo orden de movilidad del plásmido de ADN.

(***) Los aparatos pueden correr a 14 v/cm para un rápido análisis. De otra manera, se obtiene una mejor resolución con geles de electroforesis largos a una velocidad de 1.5 a 2 v/cm toda la noche. Para ambos sistemas, detener la electroforesis cuando se haya desplazado aproximadamente el 75% del gel.

Soluciones:

X10 BUFFER PARA ELECTROFORESIS TRIS-BORATE-EDTA (TBE)

Tris base	53.9 g/500 ml	0.89 M
Ácido bórico	27.5 g/500 ml	0.89 M
EDTA (Na ₂)	4.65 g/500 ml	0.025 M

Ajustar el pH a 8.2 – 8.3 si es necesario.

BROMURO DE ETIDIO

Disolver bromuro de etidio (toda la noche usando un agitador magnético) a una concentración de 10 mg/ml en agua bidestilada. Envolver el frasco en papel aluminio y guardar en la oscuridad a 4 °C.

Agregar 50 µl EBr/L en buffer TBE y 5 µl EBr/100 ml de gel de agarosa (concentración final de 0.5 µg/ml) o 100 µl/L de agua destilada si el gel de agarosa se encuentra manchado después de la electroforesis.