



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN INTERDISCIPLINARIA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y
EDUCACIÓN (UIICSE)

Búsqueda de *Legionella* spp. en sistemas hidrotermales
en México.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

EDUARDO RIUBI GALGUERA

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. Arturo Calderón Vega



Los Reyes Iztacala, Noviembre, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado una excelente formación profesional y por permitirme ser parte de esa admirable y respetable institución.

A los profesores que fungieron como sinodales de este trabajo: M. en C. Arturo Calderón Vega, Dra. Elvia M. Gallegos Neyra, M. en C. María Dolores Hernández Martínez, Biól. Blanca Nieves Martínez Rodríguez y M. en C. Pilar Castillo Nava.

Especialmente quiero agradecerle a mi director de tesis el profesor Arturo Calderón por haberme permitido ser parte de este gran proyecto, por su apoyo y asesoría en cada momento que lo necesite, por los conocimientos que me brindo, por todas las observaciones hechas durante este trabajo, pero sobre todo por ser una gran persona y un gran amigo.

A su esposa la profesora Elvia Gallegos por compartir y brindar sus conocimientos, así como sus observaciones y sugerencias dadas en este trabajo, al igual que le agradezco por haber sido un gran apoyo y motivación en todo momento.

A la profesora Blanca Martínez por su ayuda y asesoramiento durante la tinción de Gram realizada en este trabajo.

A la Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado y al Dr. Elías Piedra Ibarra, por brindarme su amistad.

A mi abuelita y madre “Martita” (q.e.p.d), por haberme enseñado tantas cosas en la vida, por estar conmigo y mis hermanos en todo momento, por haber sido una persona muy fuerte en el momento más adverso, pero sobre todo por todo ese gran amor incondicional que me brindo a mí y cada uno de sus seres queridos, gracias por haberme dado tanto, siempre estarás en mi corazón.

A mi “padre adoptivo”, mi tío Miguel, por apoyarme y ayudarme a mí y a mis hermanos toda la vida y en todo momento, por ser un gran amigo y una persona maravillosa, que a todo sin esperar recibir nada a cambio, sin su apoyo difícilmente se hubiera podido

culminar este trabajo, siempre serás como un padre para mí. Te quiero mucho y te admiro, gracias.

A mi mamá Soledad por haberme dado la vida, apoyarme y motivarme cuando lo necesite, gracias “Chole”. Te quiero.

A mi hermano Rogelio por ser aparte un gran amigo, un compañero en todo momento, por ser una parte muy importante en este proyecto, sin su ayuda ni apoyo no hubiera logrado concluir este objetivo de en mi vida, y por compartir todos esos malos y buenos momentos que hemos vivido juntos, así como tantas cosas que hemos aprendido tantas cosas el uno del otro. Te quiero mucho “Roy”.

A mis hermanos: Miguel Ángel, por ser una motivación para concluir este trabajo y el apoyo que me brindo en el transcurso de mi vida; mi hermana Marina por haberme cuidado y ayudado en ciertos momentos importantes en mi vida. Los quiero mucho.

A mis “hermanitas”, mis primas Claudia y Lucero, por tantas cosas que hemos vivido juntos, por todo el apoyo y motivación que me brindaron en cada momento de mi vida, y por ser también unas grandes amigas, las quiero mucho; también a mi tía Emilia por abrirme las puertas de su casa, gracias.

A mi amada novia “Pily”, por ayudarme en la elaboración de esta tesis, pero más por haberme motivado a culminar este trabajo, por todo su apoyo y comprensión que me ha brindado desde el primer momento juntos, y por ser una gran compañera en todo y cada uno de los momentos tanto buenos como malos en mi vida, gracias amor. Te amo.

Por último quiero agradecer a todos mis amigos y compañeros durante la carrera, aprendí cosas muy buenas de cada uno y por vivir tantos momentos agradables juntos, en especial quiero agradecer a mis amigos de toda la vida: Marcos, Julio, Helios y Pancho, por compartir tantas experiencias y por brindarme su apoyo cuando lo he necesitado.

DEDICATORIAS

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño a:

A Dios, que me dio la oportunidad de vivir, por haberme permitido llegar a esta instancia de mi vida, pero sobre todo por rodearme de gente tan maravillosa como familia, amigos, compañeros, de los cuales he aprendido mucho y me han ayudado a conseguir este de tantos objetivos planteados en mi vida.

A mi abuelita “Martita”, por haber sido una gran inspiración en mi vida, me hubiera encantado que estuviera en este momento, este trabajo especialmente está dedicado para ti “mamá”, jamás te olvidaré.

A mi tío Miguel, por haberme apoyado en todo momento de mi vida y durante este trabajo, esta tesis es para ti en gran parte.

A mi hermano Rogelio, espero este trabajo te inspire y sobre todo te sientas orgulloso de algo que hicimos juntos, porque también sin tu apoyo no hubiera podido llegar hasta aquí.

A mi mamá Soledad por haberme traído a este mundo y siempre creer en mí.

A mi familia: mis hermanos **Miguel Ángel y Marina**, mis primas **Claudia y Lucero**, mi tía **Emilia** y mis sobrinos **Ricardo, Bernardo, Jesé y Uriel**; gracias por estar conmigo y apoyarme siempre, y de igual manera espero que sea una inspiración para todos ustedes.

A todos y cada uno de los seres queridos que me han acompañado a lo largo de mi vida y me han enseñado cosas muy valiosas. En especial al amor de mi vida, **Pilar**, que ha sido una gran inspiración a lo largo de la carrera y un gran apoyo en cada momento.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Microbiología de <i>Legionella</i>	4
1.1.1 Taxonomía.....	4
1.1.2 Especies y serogrupos.....	5
1.2 Especies de importancia médica.....	6
1.3 “ <i>Legionella</i> -like amoeba pathogens”.....	6
1.4 Características morfológicas y fisiológicas de <i>Legionella</i>	7
1.5 Legionelosis y fiebre de Pontiac.....	9
1.6 Transmisión de <i>Legionella</i>	11
1.7 Diagnóstico de <i>Legionella</i>	12
1.7.1 Cultivo.....	13
1.7.2 Estudio serológico por inmunofluorescencia indirecta.....	13
1.7.3 Antígeno específico de <i>L. pneumophila</i> serogrupo 1.....	14
1.7.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	14
1.8 Tratamiento.....	15
1.9 Patogenicidad de <i>Legionella</i>	16
1.9.1 Ciclo intracelular de <i>Legionella</i>	17
1.9.2 Factores de virulencia.....	18
1.9.2.1 Enzimas.....	18
1.9.2.2 Sistemas de secreción.....	19
1.9.2.3 Proteínas de superficie.....	21
1.10 Ecología de <i>Legionella</i>	22
1.10.1 Factores de crecimiento.....	25
1.10.1.1 Temperatura.....	25
1.10.1.2 Asociación con otros microorganismos.....	26
1.10.1.3 Asociación de <i>Legionella</i> con la biopelícula.....	26
1.10.1.4 Beneficios entre la asociación <i>Legionella</i> – ameba.....	28
2. ANTECEDENTES.....	29
3. JUSTIFICACIÓN.....	31
4. OBJETIVOS.....	32

5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
5.1 Recolecta de muestras.....	33
5.2 Registro de parámetros fisicoquímicos <i>in situ</i> del agua y biopelículas.....	34
5.2.1 Temperatura interna de las biopelículas (°C).....	34
5.2.2 Temperatura del agua (°C).....	35
5.2.3 pH del agua.....	35
5.2.4 Conductividad eléctrica del agua(mS/cm ³).....	35
5.3 Detección microbiológica de <i>Legionella</i> spp.....	35
5.4 Identificación morfológica de colonias del género <i>Legionella</i>	36
5.5 Identificación molecular de <i>Legionella pneumophila</i>	36
5.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
6.1 Aislados bacterianos y tinciones.....	40
6.2 Identificación de <i>L. pneumophila</i> por PCR.....	48
6.3 Parámetros fisicoquímicos.....	50
6.3.1 Temperatura de las biopelículas y el agua.....	50
6.3.2 pH de las biopelículas y el agua.....	52
6.3.3 Conductividad eléctrica (mS/cm ³) de las biopelículas y el agua.....	54
7. CONCLUSIONES.....	57
LITERATURA CITADA.....	59
ANEXOS.....	70

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal.
ATCC *	Colección americana de cultivos.
BCYE*	Agar extracto de levadura y carbón activado.
CDC*	Centro de control y prevención de enfermedades.
CYE*	Agar extracto de levadura y carbón.
<i>Dot</i>	Defecto en el transporte de orgánulos.
EIA	Enzimoimmunoanálisis.
HCl	Ácido clorhídrico.
Hsp	Proteína de choque térmico.
ICT	Inmunocromatografía.
<i>Icm</i>	Multiplicación intracelular.
IFI	Inmunofluorescencia indirecta.
KCl	Cloruro de potasio.
LLAP*	<i>Legionella</i> como patógeno de amebas.
Lsp	Vía de secreción de <i>Legionella</i> .
MH-IH	Agar Müeller-Hinton con hemoglobina e IsoVitaleX.
Mip*	Potenciador de infectividad a macrófagos.
MOMP*	Proteína de membrana externa.
PCR*	Reacción en cadena de la polimerasa.
UFC	Unidades formadoras de colonias.

(*) Por sus siglas en inglés

CONTENIDODE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación Taxonómica de <i>Legionella</i>	4
Cuadro 2. Especies de <i>Legionella</i> conocidas actualmente.....	5
Cuadro 3. Especies de <i>Legionella</i> de importancia médica.....	6
Cuadro 4. Principales características de la enfermedad del legionario y fiebre de Pontiac.....	11
Cuadro 5. Pruebas de laboratorio especializadas en el diagnóstico de la infección por <i>Legionella</i>	15
Cuadro 6. Enzimas que participan en la virulencia de <i>Legionella</i>	19
Cuadro 7. Sistemas de secreción que contribuyen a la virulencia de <i>Legionella</i>	20
Cuadro 8. Proteínas de superficie involucradas en la virulencia de <i>Legionella</i>	21
Cuadro 9. Condiciones favorables para la proliferación de <i>Legionella</i>	28
Cuadro 10. Distribución de <i>Legionella</i> spp. y <i>L. pneumophila</i> aisladas de diferentes lugares de muestreo.....	39
Cuadro 11. Características de las muestras del “Géiser” y aislados obtenidos.....	42
Cuadro 12. Muestras de sistemas de agua potable (regaderas, cisternas, tinacos) y aislados obtenidos.....	43
Cuadro 13. Muestras de cuerpos de agua naturales, balnearios de agua termal y aislados obtenidos.....	46
Cuadro 14. Muestras del agua de autolavados ubicados en el Distrito Federal y aislados obtenidos.....	47
Cuadro 15. Parámetros fisicoquímicos que favorecen la presencia de <i>Legionella</i> ...	55

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Características de crecimiento de colonias de <i>Legionella</i> spp. en medio específico BCYE.....	7
Figura 2. Colonias de <i>Legionella</i> spp. creciendo en medio específico BCYE.....	9
Figura 3. Ciclo de vida de <i>L. pneumophila</i> en protozoos y macrófagos humanos....	18
Figura 4. Colonización, dispersión y transmisión de <i>Legionella</i> a partir de reservorios naturales.....	23
Figura 5. Desarrollo de <i>Legionella</i> en función de la temperatura del agua en diversos sistemas hidrotermales.....	24
Figura 6. <i>Legionella pneumophila</i> anclada mediante un pseudópodo a la ameba <i>Hartmannella vermiformis</i>	27
Figura 7. Protozoo <i>Tetrahymena vermiformis</i> con cadenas de color rojo de las bacterias intracelulares de <i>L. pneumophila</i>	27
Figura 8. Muestreo de agua de regadera.....	34
Figura 9. Muestreo de cuerpo de agua natural.....	34
Figura 10. Número de aislados del género <i>Legionella</i> spp. y organismos no identificados en las muestras obtenidas.....	39
Figura 11. Aislados coloniales de <i>Legionella</i> spp. en placas de Petri con agar BCYE enriquecido con cisteína, obtenidos a partir de sistemas de agua potable.....	40
Figura 12. Aislados coloniales de <i>Legionella</i> spp. en placas de Petri con agar BCYE enriquecido con cisteína, obtenidos a partir de agua de cuerpos de agua natural.....	40
Figura 13. Tinción de Gram de bacilos de <i>Legionella</i> spp. tomados a 40x. Microscopía de luz por campo brillante.....	41
Figura 14. Tinción de Gram de bacilos de <i>Legionella</i> spp. tomados a 40x. Microscopía de luz por campo brillante.....	41
Figura 15. Porcentaje del total de bacterias identificadas como positivas del género <i>Legionella</i> spp. y <i>L. pneumophila</i>	49
Figura 16. Electroforesis de fragmentos amplificados por PCR para <i>Legionella pneumophila</i> de muestras analizadas.....	49
Figura 17. Valores de la temperatura de cada muestra.....	52

Figura 18. Valores de pH de cada muestra.....	53
Figura 19. Valores de conductividad de cada muestra.....	55

RESUMEN

Legionella es una bacteria ambiental, habitante común de hábitats naturales y antropogénicos de agua dulce como: lagos, ríos, suministros de agua potable de grandes edificios, hoteles y hospitales *Legionella* se encuentra en los sistemas acuáticos, formando biopelículas, las cuales son sistemas complejos formados por poblaciones bacterianas, envueltas por una matriz glucoprotéica, que tiene la capacidad de adherirse a superficies. *Legionella pneumophila* es un parásito facultativo intracelular que se multiplica dentro de los macrófagos alveolares humanos y es el agente etiológico del 90% de los casos de legionelosis. En México sólo se han reportado dos casos con diagnóstico clínico de neumonía probablemente causados por *Legionella* aunque sin el aislamiento de la bacteria. El objetivo principal de este trabajo fue aislar e identificar bacterias del género *Legionella* spp. a partir de diversas fuentes hidrotermales y sistemas de agua potable en México, se recolectaron muestras de agua y biopelículas en algunos estados de la República, el D.F y zona metropolitana. Las muestras se procesaron por métodos microbiológicos utilizando medio de cultivo BCYE género específico para *Legionella*; obteniéndose 60 aislados bacterianos positivos para *Legionella* spp. en cultivo de agar. Para la identificación a nivel especie, se aisló y purificó el ADN de las bacterias y se amplificó por PCR un fragmento de un gen (*dnaJ*) que codifica para una proteína de superficie (Hsp70) característica de *L. pneumophila*. El análisis del ADN por PCR mostró un fragmento de 287 pb en algunos aislados, correspondiente al esperado para confirmar el diagnóstico de *Legionella pneumophila*.

1. INTRODUCCIÓN

En el mes de julio de 1976, en la ciudad de Filadelfia, Pensilvania, Estados Unidos tuvo lugar la 58ª Convención de la Legión Americana en el Hotel Bellevue Stratford. En el transcurso de ésta, de los 4,400 asistentes, entre miembros y acompañantes, se presentaron 182 casos de neumonía, de los cuales 29 fueron fatales. Durante el estudio epidemiológico se descubrieron 34 casos más que produjeron otras cinco muertes. También se celebraba el bicentenario de la Independencia de los EUA. La situación hacía sospechar que el brote epidémico se originó por causas naturales o incluso por un atentado (Fraser, 1977).

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de Atlanta, inició un estudio epidemiológico y microbiológico sin precedentes para determinar la causa del brote. La información era desconcertante: no había patrones de intoxicación por alimentos, personas que compartieron la habitación con las que enfermaron permanecieron asintomáticas y las opiniones de los expertos eran contradictorias (Lopez *et al.*, 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. Al examinar el bazo e hígado de las personas infectadas se consiguió observar con la tinción de Giménez, por primera vez al microorganismo responsable. Mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) se demostró que el 90% de los pacientes del brote de la convención de legionarios habían desarrollado anticuerpos frente a este microorganismo (Heuner y Swanson, 2008).

Así se identificó, por primera vez en 1977, a un bacilo Gram negativo de crecimiento aerobio, como la causa de un brote de neumonía que ocasionó 34 muertes en la convención de legionarios de 1976. Por ello, a la bacteria se le denominó *Legionella pneumophila* y a la neumonía atípica “enfermedad de los legionarios”. El procedimiento diagnóstico mencionado fue positivo en 54 muestras de casos esporádicos recientes de neumonía severa y retrospectivamente, en sueros de pacientes de dos brotes de enfermedad respiratoria no resueltos. Indudablemente, esta bacteria había causado brotes de neumonía previos, pero el agente infeccioso aún no se conocía (Villaseñor y Sopian, 2004).

Legionella pneumophila fue aislada por primera vez mediante el uso de agar Müeller-Hinton suplementado con hemoglobina e IsoVitaleX (MH-IH), el cual es un suplemento de definición química. Se encontró que el componente esencial de la hemoglobina era una forma soluble de hierro y L-cisteína el aminoácido esencial para el crecimiento de *Legionella*. Esto condujo al desarrollo de nuevos medios para cultivar la bacteria, como es el medio de extracto de levadura y carbono (CYE, por sus siglas en inglés) el cual más tarde se modificó reemplazando el almidón con carbón activado lo que permitió una mejor recuperación de *L. pneumophila* (Fields *et al.*, 2002). Posteriormente se desarrolló un medio de crecimiento óptimo, el medio “Buffered Charcoal Yeast Extract” (BCYE), cuya base sigue siendo utilizada en la actualidad (McDade *et al.*, 1977).

Actualmente, se reconocen dos formas clínico-epidemiológicas de la infección por *Legionella*: “enfermedad de los legionarios” o forma neumónica y “fiebre de Pontiac” o forma no neumónica (Glick *et al.*, 1978). La “fiebre de Pontiac” se describió, también, en relación con las cepas aisladas de un brote de corta duración y sin foco aparente que había afectado, en 1968, a personal sanitario y visitantes del *Oakland County Health*

Department of Pontiac (Michigan). Actualmente la identificación del microorganismo causante de la enfermedad del legionario y la fiebre de Pontiac, así como los aspectos epidemiológicos y el espectro clínico de estas enfermedades, están bien establecidos (Marrie *et al.*, 2010).

1.1 Microbiología de *Legionella*

1.1.1 Taxonomía

En la actualidad la familia Legionellaceae comprende un único género: *Legionella*. Estudios recientes utilizando el ARNr 16s, confirman esta familia como un solo grupo monofilético dentro de la división Gamma de las Proteobacterias. Se han realizado diversas propuestas de división de esta familia en tres géneros: *Legionella*, *Fluoribacter* y *Tatlockia*. No obstante los dos últimos no han sido completamente aceptados, por lo que el género *Legionella* es utilizado generalmente para describir todas sus especies (Fields *et al.*, 2002).

Cuadro 1. Clasificación Taxonómica de *Legionella* (Fields *et al.*, 2002; Ulloa, 2008)

Dominio	Prokaryota Chatton, 1925
Reino:	Eubacteria Woese, 1990
Filo:	Proteobacteria Garrity <i>et al.</i> , 2005
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Legionellales Garrity <i>et al.</i> , 2005
Familia:	Legionellaceae Brenner <i>et al.</i> , 1979
Género:	<i>Legionella</i> Brenner <i>et al.</i> , 1979

1.1.2 Especies y serogrupos.

En la actualidad el género *Legionella* incluye más de 50 especies y más de 70 serogrupos distintos (Cuadro2). A nivel mundial *L. pneumophila* serogrupo 1 es el agente etiológico responsable del 84 % de los casos de legionelosis. La neumonía puede ser causada, también, por otras especies de *Legionella* tales como: *L. longbeachae*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. micdadei*, *L. anisa*, *L. feeleii*, *L.jordanis* y *L. maceachemii* (Blyth *et al.*, 2009; Greub y Raoult, 2004; Lau y Ashbolt, 2009; Newton *et al.*, 2010)

El estudio del ambiente ha permitido el descubrimiento de nuevas especies del género, y es muy probable que el número de especies y serogrupos continúe aumentando; aunque no todas son patógenas (Cuadro 2). Entre las que son patógenas destaca *L. pneumophila*, la primera especie descrita, que comprende 16 serogrupos. En estudios de Biología Molecular se han descrito la existencia de tres subespecies: *L. pneumophila* subsp. *pneumophila*, *L. pneumophila* subsp. *fraseri* y *L. pneumophila* subsp. *pascullei* (Brenner *et al.*, 1988).

Cuadro 2. Especies de *Legionella* conocidas actualmente (Diederer, 2008; Laureano, 2010; Luck *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011)

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

1.2 Especies de importancia médica

La mayoría de las infecciones humanas con organismos como *L. pneumophila* son neumónicas y ocurren después de la exposición a la bacteria, se han registrado casos de infección provocados por otras especies de *Legionella*, estos representan del 2 al 7 % de las infecciones por *Legionella* en todo el mundo; como se describe en el siguiente cuadro (Newton *et al.*, 2010).

Cuadro 3. Especies de *Legionella* de importancia médica (Fields *et al.*, 2002; Jawetz *et al.*, 1990; Laureano, 2010)

Especie	No. de serogrupo	No. de serogrupo asociado con enfermedades	Neumonía	Fiebre de Pontiac
<i>L. pneumophila</i>	16	16	+	Serogrupos 1 y 6
<i>L. micdadei</i>	1	1	+	-
<i>L. gormanii</i>	1	1	+	-
<i>L. dumorffii</i>	1	1	+	-
<i>L. bozemanii</i>	2	2	+	-
<i>L. longbeacheae</i>	2	2	+	-
<i>L. wadsworthii</i>	1	1	+	-
<i>L. jordanis</i>	1	1	+	-
<i>L. feeleii</i>	2	2	+	+
<i>L. oakridgensis</i>	1	1	+	-

(+) Especies que causan enfermedad en seres humanos.

(-) Especies sin reporte de infección en humanos.

1.3 “*Legionella*-like amoeba pathogens”

“*Legionella*-like amoeba pathogens” (LLAP, por sus siglas en inglés), se han aislado y reproducido mediante el cocultivo de la bacteria con sus huéspedes protozoos. Son un subconjunto de bacterias que crecen, exclusivamente dentro de las amebas y son filogenéticamente cercanas a *Legionella* spp. Su número aumenta progresivamente y pese a las preocupaciones, los estudios serológicos sugieren que pueden ser muchas

las posibles causas de infección humana, principalmente por agentes coinfecciosos (Roig y Rello, 2003).

1.4 Características morfológicas y fisiológicas de *Legionella*.

Legionella es un microorganismo aerobio estricto, no esporulado, de forma cocoide o bacilar que mide de 0.3 a 0.9 μm de ancho y de 1.5 a 20 μm de longitud dependiendo del tiempo de cultivo; en cultivos frescos los cocobacilos de *Legionella* pueden ser de 2 a 6 μm de longitud, mientras que en cultivos prolongados pueden observarse formas filamentosas de hasta 20 μm de largo (Fig. 1). Son móviles con uno o más flagelos en disposición polar o lateral y se ha demostrado la presencia de fimbrias y de una estructura polisacárida acídica extracelular (Marrie *et al.*, 2010; Ulloa, 2008).



Figura. 1. Características de crecimiento de colonias de *Legionella* spp. en medio específico BCYE (CDC, 2011).

Legionella es una bacteria Gram negativa que contiene una gran proporción de fosfolípidos en su composición lipídica, hecho que dificulta su tinción por el método de Gram. La ultraestructura es similar a otras bacterias Gram negativas, con una membrana externa, un polímero de peptidoglicano y una membrana citoplasmática. Sin embargo, la pared bacteriana contiene grandes cantidades de ácidos grasos de cadena ramificada y ubiquinonas (Gress *et al.*, 1980).

Desde un punto de vista bioquímico, las especies del género *Legionella*, son quimiorganotróficas, poco sacarolíticas y en general, con metabolismo poco activo: Con oxidasa variable, catalasa positiva débil y reacciones de nitrato y ureasa negativas. La mayoría producen β -lactamasas y un pigmento marrón que se incrementa con la adición de tirosina al medio de cultivo. Algunas especies son capaces de producir pigmentos fluorescentes. No fermentan los carbohidratos ni las azúcares habituales. En contraste con otras bacterias acuáticas, utilizan aminoácidos y otros compuestos orgánicos, como su fuente principal de carbono y energía como el almidón. Por esta razón, los medios de cultivo tradicionales resultan inapropiados para su aislamiento (Steinert *et al.*, 2002).

En condiciones de laboratorio, la mayoría de las especies de *Legionella* necesitan para su crecimiento en aislamiento primario, sales férricas y L-cisteína. El BCYE es el medio primario para cultivar y aislar la bacteria, en este es necesario entre 3 y 10 días para visualizar las colonias (Fig. 2). El extracto de levadura suministra proteínas y otros nutrientes que favorecen el crecimiento. La L-cisteína representa un ingrediente esencial para el cultivo, mientras que los iones de hierro facilitan su desarrollo. El carbón activado descompone el peróxido de hidrógeno, un producto de metabolismo que para las especies de *Legionella* es tóxico; también puede tomar dióxido de carbono

y modificar la presión superficial. Se añade tampón ACES al medio para mantener un pH adecuado para el crecimiento óptimo (Fields *et al.*, 2002)



Figura. 2. Colonias de *Legionella* spp. creciendo en medio específico BCYE (EMLab P&K, 2011)

1.5 Legionelosis y fiebre de Pontiac

La legionelosis es una de las muchas infecciones surgidas en el siglo XX, causada por *Legionella pneumophila* y bacterias relacionadas. La gravedad de la legionelosis varía desde una enfermedad febril leve (fiebre de Pontiac) hasta una forma potencialmente mortal de neumonía (enfermedad del legionario); estas pueden afectar a cualquiera, pero hay grupos cuya susceptibilidad aumenta debido a la edad, mala salud, inmunosupresión y otros factores de riesgo como el tabaquismo (OMS, 2007).

1.5.1 Legionelosis o enfermedad del legionario

La legionelosis es una neumonía que tiene un periodo de incubación de dos a diez días. La probabilidad de contraer la enfermedad aumenta proporcionalmente a factores de susceptibilidad propios del huésped: afecta con más frecuencia al género masculino, principalmente a aquellos hombres cuya edad oscila entre los 40 y los 70 años. A menudo la enfermedad se caracteriza por anorexia, malestar y letargo como síntomas iniciales; pudiéndose, también, desarrollar una tos leve. Aproximadamente la mitad de los pacientes desarrollan pus que causa esputo y dolor en el pecho. Los síntomas gastrointestinales son prominentes con diarreas acuosas, náuseas, vómitos y dolores abdominales. La fiebre elevada está presente en casi todos los casos y cerca de la mitad de los pacientes sufren trastornos del sistema nervioso, como: confusión, delirio, depresión, desorientación y alucinaciones (EPA, 1999; OMS, 2007).

La enfermedad del legionario no tiene síntomas ni signos característicos; no hay síndrome típico y no todas las personas expuestas a este microorganismo desarrollan síntomas de enfermedad (OMS, 2007).

1.5.2 Fiebre de Pontiac

La fiebre de Pontiac es una enfermedad aguda y autolimitada; es un síndrome gripal sin neumonía, con un periodo de incubación de uno o dos días. A diferencia de la legionelosis, su tasa de ataque es alta, afectando hasta el 95% de los individuos expuestos. Se caracteriza por fiebre elevada, cefalea, artralgia (dolor en articulaciones), mialgia (dolor muscular) y astenia (debilidad extrema); en algunos casos puede

ocasionar tos, disnea (dificultad para respirar), diarrea, náusea, vómito, dolor en el pecho y confusión (Marrie *et al.*, 2010). Los estudios de seroprevalencia de anticuerpos indican que estas infecciones son asintomáticas (AEPAP, 2010). En el cuadro 4 se muestran los síntomas y características de la enfermedad del Legionario y la fiebre de Pontiac.

Cuadro 4. Principales características de la Enfermedad del Legionario y Fiebre de Pontiac (OMS, 2007).

Características	Enfermedad del legionario	Fiebre de Pontiac
Periodo de Incubación	2 a 10 días	1 ó 2 días
Duración	Semanas	2 a 5 días
Tasa de letalidad	Variable por susceptibilidad, en pacientes de hospital puede ser de 40 al 80%	Sin muertes
Tasa de ataque	0.1-5% de la población general 0.4-14% en hospitales	Más del 95 % de los individuos expuestos
Síntomas	A menudo no específicos. Astenia. Fiebre elevada. Dolor de cabeza. Tos seca. Ocasionalmente expectoración sanguinolenta. Escalofrío. Mialgia. Disnea. Diarrea (25-50% de los casos). Vómito, náusea (10-30% de los casos). Alteraciones del sistema nervioso central como confusión y delirio (50% de los casos). Falla renal.	Similares a los de influenza. Astenia. Fiebre elevada. Escalofrío. Mialgia. Dolor de cabeza. Artralgia. Diarrea. Ocasionalmente vómito y náusea. Disnea. Tos seca.

1.6 Transmisión de *Legionella*

La inoculación de *Legionella* en el humano se produce, básicamente, por la inhalación de aerosoles contaminados con un número suficiente de bacterias (10 000 UFC ml⁻¹);

no hay evidencia de transmisión de humano a humano, ni de la existencia de reservorios animales conocidos (Newton *et al.*, 2010; Pérez, 2001).

Para que un ser humano resulte infectado deben cumplir varios requisitos:

- Que el microorganismo tenga una vía de entrada a la instalación (instalaciones de agua como aires acondicionados, spas, regaderas, etc.). Esto suele producirse por pequeñas cantidades de aguas contaminadas con la bacteria.
- Que su multiplicación en el agua produzca suficientes microorganismos para representar un riesgo hacia personas susceptibles.
- Que a partir del sistema, el agua contaminada, sea dispersada en la atmósfera en forma de aerosol convirtiéndose en un riesgo potencial al facilitar un mayor tiempo de suspensión en el aire a las gotas minimizadas y aumentando la probabilidad de que su tamaño sea menor a 5 μm , tamaño máximo de las gotas que pueden penetrar los pulmones (Berk *et al.*, 1998).
- Que sea patógeno para el ser humano, ya que algunas especies y serogrupos resultan inocuos.
- Que uno o más individuos susceptibles sean expuestos a un aerosol contaminado con suficiente *Legionella* viable (Fields *et al.*, 2002; OMS, 2007; Pérez, 2001).

1.7 Diagnóstico de *Legionella*

Son necesarias pruebas especializadas para diagnosticar la infección por *Legionella* (Cuadro 5). Una prueba más amplia puede proporcionar ayuda en la vigilancia

epidemiológica de infecciones debidas a *Legionella*. Este tipo de pruebas puede realizarse por los siguientes métodos:

1.7.1 Cultivo

La bacteria se cultiva a partir de muestras respiratorias (esputo, tejido pulmonar, etc.) utilizando el medio de cultivo BCYE. Las muestras contaminadas, como el esputo, deben descontaminarse antes de ser sembradas. La principal ventaja de este cultivo diagnóstico es que todas las legionelas pueden ser detectadas por este método, aunque, existen problemas inherentes al cultivo de *Legionella* debidos a que el organismo presenta exigencias nutricionales muy estrictas y es de lento crecimiento. La efectividad de este método depende de la severidad de la enfermedad: entre el 15 y el 25 % de los casos de neumonías leves dan positivo para esta prueba, en contraste con el 95 % de resultados positivos para neumonía severa (Blyth *et al.*, 2009)

1.7.2 Estudio serológico por inmunofluorescencia indirecta

Este método revela la presencia de anticuerpos específicos en el suero del paciente infectado. La seroconversión es medida por Inmunofluorescencia indirecta (IFI), y se determina cuando el número de anticuerpos para *Legionella* presenta un incremento igual o superior a cuatro veces, entre un suero de fase aguda y un suero de fase convaleciente, demostrando el diagnóstico de legionelosis. La seroconversión se produce en el 70 al 80 % de los casos confirmados por cultivo y se suele presentar entre las primeras semanas de la infección; periodo de tiempo que descarta el uso de esta técnica como método de diagnóstico. Por lo que solo se utiliza en estudios

epidemiológicos de brotes o para establecer la infección retrospectivamente (Darby y Buising, 2008; Murdock, 2003; OMS, 2007).

1.7.3 Antígeno específico de *Legionellapneumophila* serogrupo 1.

Es una técnica rápida con alta sensibilidad y especificidad, cuya ventaja es que no se ve afectada por el tratamiento antibiótico ni por el transcurso de las semanas (Darby y Buising, 2008; Murdock, 2003). Se basa en un examen urinario porque los antígenos microbianos se concentran en orina más que en otros fluidos, ya que en ella no existen anticuerpos que alteren los resultados (Molinos, 2006). Las técnicas de enzimoimmunoanálisis (EIA) o inmunocromatografía (ICT) son, actualmente, las pruebas de detección más eficaces en la práctica clínica (Murdock, 2003; OMS, 2007).

1.7.4 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Los ensayos han sido mayormente utilizados para detectar el ADN de muestras ambientales, pero también pueden ser usados para analizar muestras clínicas como el esputo, este ensayo tiene como objetivo el análisis de lo siguiente:

- ARN ribosomal (ARNr) los genes o sus regiones espaciadoras intergénicas.
- El gen codificador de una proteína de choque térmico (*dnaJ*).
- El gen de la ARN polimerasa (*rpoB*).
- El gen potenciador de infectividad a macrófagos (*Mip*) (Darby y Buising, 2008; OMS, 2007).

Cuadro 5. Pruebas de laboratorio especializadas en el diagnóstico de infección por *Legionella* (Blyth *et al.*, 2009; Darby y Buising 2008; Murdock, 2003; Roig y Rello, 2003).

Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Tiempo requerido
Antígeno en orina*	70	100	2-3 horas
PCR (suero, orina y muestras respiratorias)	80	100	2-4 horas
Cultivo de esputo	80	100	3-7 días
Serología	40-60	96-99	3-10 semanas

*Detecta solamente *L.pneumophila* serogrupo 1.

Los métodos bien establecidos, tales como el cultivo de *Legionella* y la detección de antígeno urinario, siguen siendo la base para el diagnóstico de infecciones por *Legionella*. Nuevos métodos incluyendo el análisis de PCR, probablemente serán más accesibles en el futuro. Dadas las limitaciones actuales el diagnóstico en el laboratorio, los pacientes que presentan una neumonía seguirán recibiendo terapia profiláctica contra *Legionella* (EPA, 1999).

1.8 Tratamiento

La terapia oral de macrólidos (antibióticos naturales, semisintéticos y sintéticos) ocupa un lugar destacado en el tratamiento de infecciones por bacterias intracelulares, ha demostrado, en muchos estudios ser eficaz en el tratamiento de pacientes con enfermedad leve o moderada. Usando eritromicina, claritromicina, azitromicina, roxytromicina, josamicina, midecamicina y diritromicina, se han obtenido resultados satisfactorios en el tratamiento de pacientes; existen opciones similares tales como ciprofloxacina, cotrimoxazol y tetraciclinas. Las fluoroquinolonas ofrecen una mayor acción contra *Legionella* se recomiendan en casos severos en vez de la eritromicina. La trovofloxacina y esparfloxacina son mucho más potentes que la ciprofloxacina, pero su uso general ha sido suspendido debido a su potencial toxicidad. Datos preliminares

indican que la telitromicina es una nueva posibilidad, y la evidencia clínica limitada confirma a los ketólidos como tratamiento de primera línea. La combinación de rifampicina y eritromicina puede ser efectiva contra *L. pneumophila* en casos graves (EPA, 1999; OMS, 2007; Roig y Rello 2003).

La duración del tratamiento dependerá del antibiótico, el grado de inmunodepresión, la presencia continua de la infección y el curso clínico de la enfermedad (EPA, 1999; OMS, 2007; Roig y Rello 2003).

1.9 Patogenicidad de Legionella

La patogénesis y ecología de *Legionella* están muy relacionadas. Rowbotham (1980) demostró que *L. pneumophila*, podía infectar amebas y describió su ciclo de vida intracelular mediante observaciones con microscopía de luz. Más tarde, Horwitz (1983) demostró que *L. pneumophila* se multiplica intracelularmente en macrófagos humanos evitando la fusión fagosoma-lisosoma (Moreira *et al.*, 2006).

Existen similitudes en los procesos de infección en protozoos y células fagocíticas de mamíferos, ambos procesos utilizan genes y productos génicos similares y se ha postulado que la capacidad del interior de las células de mamíferos, es el resultado de una previa adaptación a nichos intracelulares como sucede al interior de los protozoos (Newton, *et al.*, 2010).

A pesar que, desde un punto de vista genético, aún no se conoce bien la patogénesis de *L. pneumophila*, se siguen realizando estudios en este campo. *L. pneumophila* es una bacteria patógena intracelular facultativa y su patogénesis, está directamente

relacionada con su capacidad de invadir y multiplicarse en un gran número de células eucariotas, incluidos fagocitos mononucleares, monocitos y macrófagos alveolares humanos.

1.9.1 Ciclo intracelular de *Legionella*

Los mecanismos de virulencia de *L. pneumophila* son complejos, se sabe que hay muchas proteínas inducidas durante su replicación intracelular.

La interacción de *L. pneumophila* con células fagocíticas puede dividirse en diferentes etapas (Fig.3): a) Adhesión del microorganismo a los receptores de la superficie de las células, b) Endocitosis, penetración del microorganismo en los macrófagos, c) Fusión con el retículo endoplásmico, d) Formación de una vacuola replicativa, e) Multiplicación intracelular y, f) Liberación de las bacterias y muerte de la célula huésped (Moreira *et al.*, 2006).

Legionella pneumophila penetra el pulmón del hospedero por aspiración, tanto las cepas virulentas como las no virulentas son fagocitadas por los macrófagos alveolares y se mantienen intactas dentro de los fagosomas. Durante la fagocitosis inicia una cascada compleja de reacciones que incluyen: inhibición del estrés oxidativo, reducción de la acidificación del fagosoma, bloqueo de la maduración del fagosoma y cambios en el tráfico de orgánulos. Solamente las cepas virulentas pueden inhibir la fusión de los fagosomas-lisosomas y transformar el fagolisosoma en un nicho para su replicación dentro de los macrófagos. Esto conduce a la muerte del macrófago y a la liberación de un gran número de bacterias. Las bacterias liberadas pueden infectar otros macrófagos,

y de esta forma aumentar la concentración de bacterias en el pulmón (Fields *et al.*, 2002).

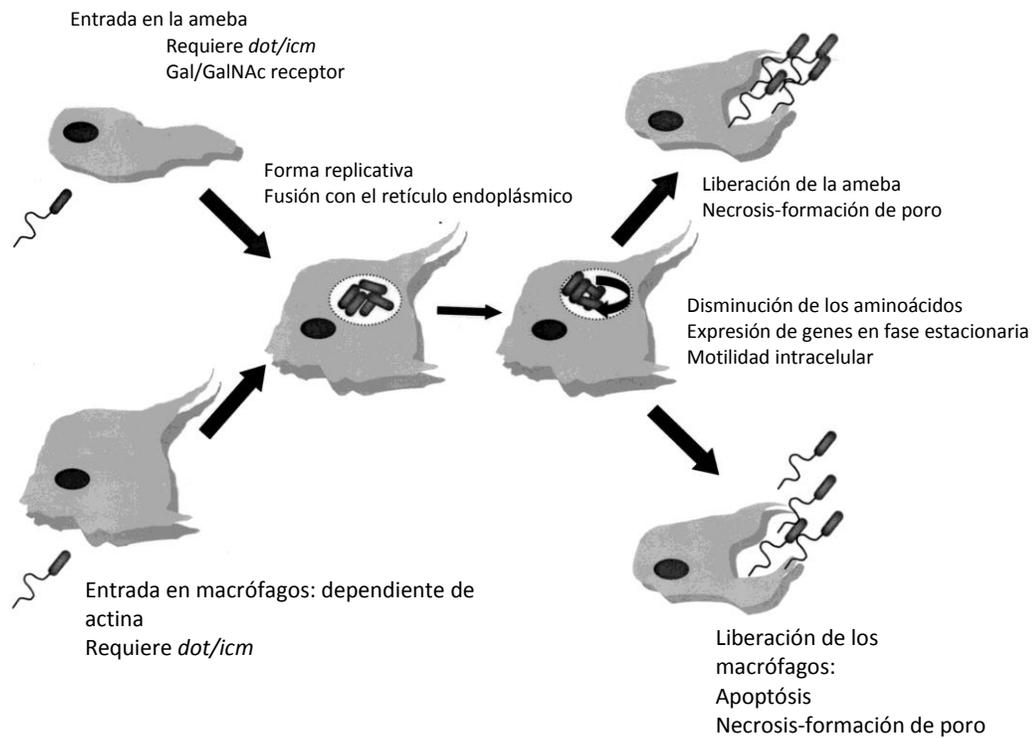


Figura 3. Ciclo de vida de *L. pneumophila* en protozoos y macrófagos humanos (Fields *et al.*, 2002)

1.9.2 Factores de Virulencia

1.9.2.1 Enzimas

Un aspecto importante de la virulencia de *Legionella* es su capacidad de secretar citotoxinas y proteasas destructoras de tejido al medio extracelular. Las enzimas extracelulares como proteasas y hemolisinas (Cuadro 6), han sido implicadas como probables factores responsables de algunas manifestaciones pulmonares y extrapulmonares de legionelosis. Por lo tanto, la producción de una enzima citolítica

podría explicar la lisis del infiltrado inflamatorio pulmonar visto en muchos casos (Dowling *et al.*, 1992).

Cuadro 6. Enzimas que participan en la virulencia de *Legionella* (Aragon *et al.*, 2002; Baine, 1985; Dowling *et al.*, 1992; Laureano, 2010)

Enzima	Función
Toxina peptídica	Inhibe la activación de neutrófilos. Primer factor conocido para esta acción.
Fosfatasa	Inhibe la secreción de superóxido de los neutrófilos.
Fosfolipasa C	Con actividad proteolítica.
Metaloproteasa de Zinc	Inhibe la producción de superóxido, quimiotaxis y migración de polimorfonucleares.
Hemolisina (legiolisina)	Con actividad hemolítica.

1.9.2.2 Sistemas de secreción

Para establecer una interacción exitosa patógeno-huésped, proteínas de virulencia del patógeno deben ser transportadas a la superficie bacteriana, hacia el ambiente extracelular o directamente a la célula huésped. Este es un reto para las bacterias Gram negativas por que las proteínas secretadas deben cruzar la membrana interna y externa. Para la secreción extracelular directa en células huésped, existen varios mecanismos especializados de secreción en bacterias Gram negativas, cada uno responsable del transporte de un subconjunto específico de proteínas (De Buck *et al.*, 2007).

Como una estrategia fundamental para la virulencia, un gran número de patógenos poseen sistemas de secreción especializados que se utilizan para proporcionar proteínas efectoras al interior de las células, modulando así, la función celular del huésped (Heuner y Swanson, 2008).

Durante la infección *L. pneumophila* emplea mecanismos sofisticados para proporcionar proteínas a las localizaciones celulares y extracelulares. En particular el sistema de secreción *Dot/Icm* tipo IV (*dot*, del inglés “defective for organelle trafficking”; *icm*, del inglés “intracellular multiplication”) (Vogel y Isberg, 1999) y el sistema de secreción *Lsp* tipo II (del inglés “*Legionella* secretion pathway”) (Söderberg *et al.*, 2004), contribuyen a la virulencia (Fig. 3 y Cuadro 7). El sistema *Dot/Icm* tipo IV es necesario para el establecimiento del nicho de replicación intracelular de *L. pneumophila* en protozoos y macrófagos humanos (Galka *et al.*, 2008).

Cuadro 7. Sistemas de secreción que contribuyen a la virulencia de *Legionella* adaptado de: (Al-Khodori *et al.*, 2008; Aragon *et al.*, 2002; Heuner y Swanson, 2008; Hubber y Roy, 2010; Johnson *et al.*, 2006; Newton *et al.*, 2010; Rossier *et al.*, 2009; Shin y Roy, 2008; Söderberg *et al.*, 2004; Vogel e Isberg, 1999)

Sistema de secreción	Función
<i>Dot/Icm</i> tipo IV	Es una estructura multiprotéica que forma un canal que abarca las membranas internas y externas de la bacteria. Es el mayor sistema de virulencia de <i>Legionella</i> codificado por 26 genes <i>dot/icm</i> . Su función es transportar una gran cantidad de sustratos proteicos en el citoplasma de las células fagocíticas, lo que le permite a <i>Legionella</i> sobrevivir y replicarse dentro de estas células que normalmente actúan como bactericidas. Este sistema no solo es necesario para el establecimiento y replicación de la bacteria, sino que también está involucrado en la entrada de <i>Legionella</i> , la inhibición de la apoptosis de la célula huésped y la salida de <i>Legionella</i> a partir de dicha célula.
<i>Lsp</i> tipo II	Está relacionado con la infección intracelular de <i>Legionella</i> . Transportan un gran número de proteínas secretadas desde el citoplasma hasta el medio extracelular. Este sistema media al menos 25 proteínas como: metaloproteasas, aminopeptidasas, fosfatasa ácida, quitinasa, lipasa, fosfolipasa A y C, RNasa, etc. Estas proteínas participan en una amplia variedad de funciones importantes para la ecología y patogénesis de <i>L. pneumophila</i> .

1.9.2.3 Proteínas de superficie

Las estructuras de superficie de membrana juegan un papel muy importante en la patogenicidad de *Legionella*. La adherencia seguida de la penetración de la bacteria en la célula hospedera, es un paso fundamental para el ciclo de infección. Ciertas proteínas de superficie, están involucradas en la adherencia y entrada de *Legionella* en macrófagos alveolares y protozoos. Estas proteínas (Cuadro 8) incluyen, entre otras: la proteína de membrana externa (MOMP, por sus siglas en inglés), las proteínas de choque térmico Hsp60 y Hsp70 (Hsp del inglés “Heat Shock Proteins”) y la proteína potenciadora de la infección (Mip, del inglés “Macrophage Infectivity Potentiator”) (Steinert *et al.*, 2002).

Cuadro 8. Proteínas de superficie involucradas en la virulencia de *Legionella* adaptado de: (Atlas, 1999; Bellinger y Horwitz, 1990; Cianciotto, 1990; Garduño *et al.*, 1998; Hoffman y Garduño, 1999; Liu *et al.*, 2003; Steinert *et al.*, 2002; Weissenberger *et al.*, 2007)

Proteína de superficie	Función
Proteína de membrana externa (MOMP)	Es una porina que se une al componente C3 de complemento, y media la entrada de <i>L. pneumophila</i> vía receptores de macrófagos con complemento CR1 y CR3, aunque el papel de estos receptores no ha sido determinado.
Proteínas de choque térmico (Hsp 60 y Hsp 70)	Son codificadas por el gen <i>dnaJ</i> , favorecen la relación endosimbiótica con el huésped y aumentan la invasión en células epiteliales. El gen <i>dnaJ</i> se emplea para diferenciar entre subespecies de <i>Legionella</i> y serogrupos de <i>L. pneumophila</i> .
Potenciador de infectividad a macrófagos (Mip)	Es codificada por el gen <i>Mip</i> , claramente está asociado a la virulencia de <i>Legionella</i> . Es necesaria para la infección en células fagocíticas humanas como protozoos, ya que interviene en los estadios de infección temprana. Mejora la capacidad de <i>L. pneumophila</i> a parasitar a los macrófagos humanos y causar una neumonía o enfermedad de los legionarios. Incluso se utiliza la secuencia del gen <i>Mip</i> para identificar a <i>L. pneumophila</i> .

1.10 Ecología de Legionella

Legionella es una bacteria ambiental, su hábitat principal son las aguas dulces de lagos, ríos, y fuentes hidrotermales. En estos ambientes *Legionella* puede vivir en condiciones variadas, con temperaturas de entre 5 y 63 °C (Declerck, 2010; Kusnetsov *et al.*, 1993) (Fig. 5), un pH 5 a 9.2 (Declerck, 2010; Hsu *et al.*, 2006) y una concentración de oxígeno disuelto de 0.2 a 15 ppm (EPA, 1999). Se encuentra en bajas concentraciones en plancton, al interior de protozoos como las amebas o formando parte de las biopelículas en el ambiente, que le ayudan a soportar las variaciones ambientales (Ulloa, 2008).

Las biopelículas son sistemas complejos formados por poblaciones bacterianas, envueltas por una matriz glucoprotéica, que tiene la capacidad de adherirse a superficies, interfases u otras. En las biopelículas hay microcolonias de bacterias, hongos, algas, etc. rodeadas de canales llenos de agua y su función es semejante a la de un sistema circulatorio primitivo; permitiendo el acceso de nutrientes, la eliminación de desechos y la comunicación con otros microorganismos habitantes del mismo sistema (Diamond, 2007; Lau y Ashbolt, 2009).

A partir de los reservorios naturales la bacteria coloniza diferentes instalaciones acuáticas artificiales como sistemas de abastecimiento y distribución de agua de las ciudades, a través de los cuales se incorpora a redes de agua potable y otros sistemas que requieren agua para su funcionamiento como: torres de refrigeración, sistemas centralizados de agua caliente, equipos de aerosolterapia y sistemas de agua climatizada entre otros, propensos a la contaminación por *Legionella* (Fig. 4) la cual

puede infectar al hombre mediante la inhalación de microaerosoles infectados (Borella *et al.*, 2005; Ulloa, 2008).

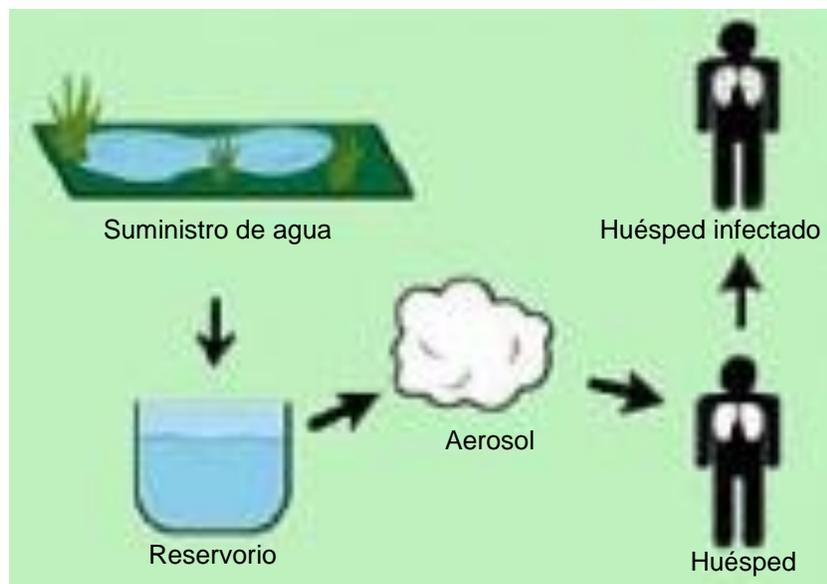


Figura 4. Colonización, dispersión y transmisión de *Legionella* a partir de los reservorios naturales (Moondragon, 2011).

Las instalaciones artificiales favorecen el estancamiento y acumulación de productos orgánicos que sirven como nutrientes para protozoos y bacterias que coexisten, y que, con una temperatura adecuada, pueden multiplicarse hasta alcanzar niveles infectantes para el hombre y convirtiéndose en un nicho ecológico favorable para el crecimiento y persistencia de *Legionella* (Schoen y Ashbolt, 2011); aunque no debe perderse de vista que las biopelículas tienen, también aspectos benéficos como el potencial de autopurificación del agua mediante la mineralización de la materia orgánica presente en ella (Wingender y Flemming, 2011).

El crecimiento de *Legionella* es particularmente mayor en sistemas de agua domésticos e industriales debido a condiciones tales como: calor, estancamiento, nutrición en sedimentos y la presencia de protozoos y otras bacterias (Darby y Buising, 2008).

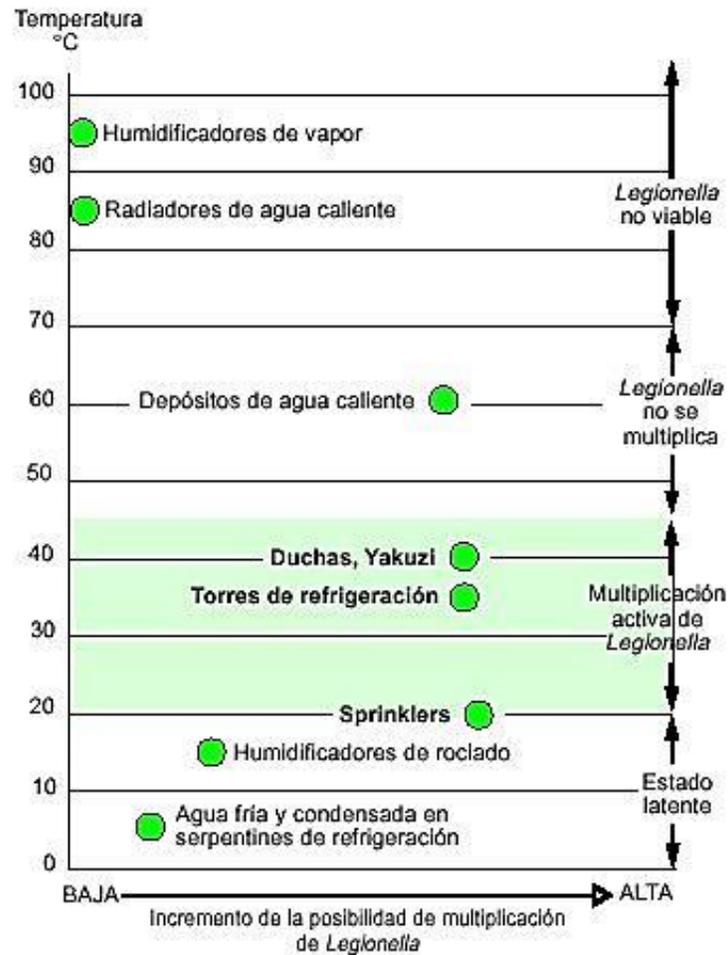


Figura 5. Desarrollo de *Legionella* en función de la temperatura del agua en diversos sistemas hidrotérmicos (JMCPRL, 2010)

La presencia de biopelículas juega un papel importante en el anidamiento de bacterias y constituye un foco de reinfección de las instalaciones (Lau y Ashbolt, 2009).

1.10.1 Factores de crecimiento

Para que los organismos lleguen a tener una capacidad infectiva, es necesario que alcancen en el agua una cierta concentración de los mismos. Los principales factores que favorecen su multiplicación en el medio son:

1.10.1.1 Temperatura

Legionella es una bacteria termófila que vive medios acuáticos, siendo ideales para su desarrollo aquellos cuya temperatura oscila entre los 25 y 40 °C, donde si cuenta con los nutrientes adecuados es capaz de multiplicarse. Presentando un crecimiento óptimo alrededor de los 37°C (EPA, 1999; Ricketts *et al.*, 2008).

Las instalaciones que representan un potencial riesgo de infección con la bacteria, son aquellas en las que la temperatura es de entre 20 y 45 °C como son: agua caliente sanitaria (regaderas), torres de refrigeración, condensadores evaporativos y piscinas; además de spas, jacuzzis, etc. (Feazelet *et al.*, 2009).

Por debajo de los 20 °C *Legionella* permanece en estado latente, esto significa que sobrevive pero no se multiplica peligrosamente. Este es el medio en el que se encuentra en la naturaleza, en ríos y lagos. Entre los 40 y 60 °C puede sobrevivir pero es incapaz de multiplicarse y finalmente por encima de los 70 °C queda inactiva (Hrubá, 2009; Leoni *et al.*, 2001; Ulloa, 2008)

1.10.1.2 Asociación con otros microorganismos

El medio acuático por sí solo, no permite la proliferación de *Legionella*. Esta puede sobrevivir un largo periodo, pero no multiplicarse. El agua sucia garantiza la presencia de microorganismos y nutrientes necesarios para su crecimiento. Los nutrientes pueden ser suplementados directa e indirectamente por microorganismos como: algas, protozoos y otras bacterias, en forma de constituyentes orgánicos disueltos por exceso de producción de nutrientes orgánicos o por descomposición de los microorganismos (Taylor *et al.*, 2009).

Los protozoos (principalmente amebas y ciliados) ayudan a *Legionella* a protegerse de los efectos de los biocidas, por ejemplo: *Legionella* puede sobrevivir en amebas enquistadas durante largos periodos de tiempo, este puede ser el motivo por el que *L. pneumophila* es capaz de soportar condiciones ambientales adversas y sobrevivir en aerosoles conservando su capacidad de entrar en estado viable pero no cultivable, esto significa que las bacterias se encuentran en estado de “latencia” (García *et al.*, 2007; Storey *et al.*, 2004)

1.10.1.3 Asociación de *Legionella* con biopelículas

La interacción *Legionella*-protozoos se ve afectada por microorganismos que constituyen las biopelículas en la construcción de sistemas de agua industriales y domésticos. Se sabe que *Legionella* coloniza estas biopelículas y puede persistir dentro de estas comunidades durante años. *Legionella* se encuentra, más fácilmente, en muestras de biopelículas que en muestras de agua, lo que sugiere su estrecha asociación a las biopelículas (Lau y Ashbolt, 2009).

Se han realizado estudios enfocados a la caracterización de la interacción bacteriana en biopelículas. En donde evaluaron el efecto de temperatura y materiales de la superficie en el crecimiento de *L. pneumophila*, así como el efecto de biocidas en la fase planctónica y sésil de *Legionella* (Fields *et al.*, 2002).

La base de la biopelícula está compuesta por *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Flavobacterium* como organismos aislados de una muestra de agua que contiene *Legionella*. La adición de la ameba *Hartmannella vermiformis* al reactor da como resultado un equilibrio reproducible entre amebas y bacterias heterotróficas (Taylor *et al.*, 2009).

Legionella pneumophila persiste en la biopelícula con o sin la presencia de *H. vermiformis* (Figs.6 y 7), *L. pneumophila* puede persistir en ausencia de amebas, aunque necesita de ellas para poder multiplicarse (Fields *et al.*, 2002).

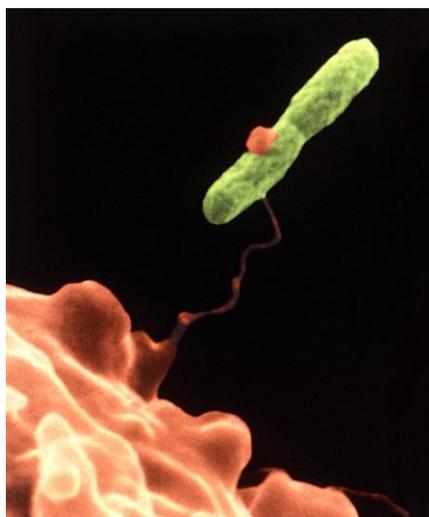


Figura 6. *Legionella pneumophila* (verde) anclada mediante un pseudópodo a la ameba *Hartmannella vermiformis* (naranja). Microscopio electrónico de barrido (CDC, 2010).



Figura 7. Protozoo *Tetrahymena vermiformis* con cadenas de color rojo de las bacterias intracelulares de *L. pneumophila* (CDC, 2010).

La biopelícula es un mecanismo de resistencia a condiciones adversas, tales como la limitación de nutrientes y temperaturas extremas. Los gradientes de nutrientes, pH y oxígeno en la matriz, sustituyen las distintas necesidades de los microorganismos que conforman la biopelícula (Allison, 2003; Wimpenny *et al.*, 2000).

Cuadro 9. Condiciones favorables para la proliferación de *Legionella* (EPA, 1999; Fields *et al.*, 2002; Lau y Ashbolt, 2009; Ricketts *et al.*, 2008; Storey *et al.*, 2004)

Temperatura	Entre 20 y 45 °C. Óptima: entre 35 y 37 °C.
Estancamiento de agua Calidad del agua	Baja velocidad de circulación del agua. Presencia de nutrientes, depósitos de sólidos en suspensión, conductividad, turbidez, etc.
Tipo de superficie en contacto con agua	Tipo de material (celulosa, madera, etc.), rugosidad, depósitos cálcicos, corrosión.
Depósitos biológicos (biopelículas)	Protozoos, algas, bacterias.

1.10.1.4 Beneficios entre la asociación *Legionella*–ameba

Patógenos tales como *Legionella pneumophila* son absorbidos por protozoos como las amebas y ciliados, sin someterse a la digestión. Las amebas de vida libre tienen los mismos hábitats acuáticos y son probables huéspedes naturales de *Legionella*. El motivo por el cual estos microorganismos se encuentran en asociación se debe a que ambos obtienen mutuos beneficios, por ejemplo:

- a) Las amebas le sirven a *Legionella* como vehículos de transporte.
- b) Que la virulencia de *Legionella* sea incrementada al igual que la patogenicidad de las amebas, ya que se podría dar una coinfección.
- c) La resistencia y protección que le brindan las amebas a *Legionella* ante condiciones ambientales adversas y desinfectantes (Marciano-Cabral *et al.*, 2010; Harf y Monteil, 1988; Huang y Hsu, 2010).

2. ANTECEDENTES

En 2001 Leoni y colaboradores, hicieron un estudio para evaluar la prevalencia de bacterias del género *Legionella* en agua de piscinas y regaderas en 12 balnearios de la ciudad de Bolonia, Italia. Cada lugar se muestreocuatro veces, una muestra por cada estación del año. El aislamiento de la bacteria se realizó en un medio BCYE. De 48 muestras tomadas de piscinas, solo en dos se detectó la presencia de dos especies de *Legionella* (*micdadei* y *bozemani*); y en 27 de las 48 muestras de regaderas fueron positivas para *Legionella* spp: 19 para *L. pneumophila* y 18 para otras especies. Con esta investigación los autores demostraron que estos ambientes ofrecen un riesgo potencial de infección por *Legionella*.

En 2003, Liu y colaboradores usaron el gen *dnaJ* para detectar e identificar todos los serogrupos de *L. pneumophila*; describieron los primers usados para la detección de secuencias de genes 16s de la mayoría de los miembros del género, este estudio se realizó con cepas de referencia de *Legionella pneumophila* obtenidas del ATCC.

En 2007, Carvalho y colaboradores analizaron sistemas artificiales de abastecimiento de agua en Sao Paulo, Brasil, colectaron un total de 67 muestras de agua y biopelículas; utilizaron medio de cultivo BCYE- α para sembrarlas. La detección de *L. pneumophila* se realizó por medio de PCR teniendo como blanco el gen Mip. Se detectó la presencia *L. pneumophila* en nueve muestras provenientes de torres de refrigeración, regaderas, tanques de agua y calentadores.

En 2010 Huang y colaboradores realizaron un estudio para determinar que parámetros de calidad del agua favorecen la prevalencia de *Legionella* en cuerpos de agua

termales. Colectaron en seis áreas recreativas de Taiwán un total de 72 muestras de agua provenientes de spas, albercas y jacuzzis, tanto personales como públicos. Tomaron en cuenta parámetros fisicoquímicos como: pH, turbidez, temperatura, etc. Se sembraron en medio BCYE y posteriormente por medio de un Kit de extracción se obtuvo el ADN. Para el análisis de PCR usaron una cepa de referencia de *L. pneumophila* del ATCC; por último visualizaron los amplicones en un gel de agarosa al 2 %. De esta manera se comprobó la presencia de *Legionella* en las seis áreas recreativas y entre las especies detectadas con mayor frecuencia se encontró a *L. pneumophila*.

En el mismo año Laureano realizó un estudio de biopelículas formadas por un Géiser en el Estado de Hidalgo en México. Colectó un total de 50 muestras; 45 de biopelículas fijas y flotantes de las paredes del Géiser y cinco muestras de aerosoles de la misma fuente. Detectó la presencia de *Legionella* spp. en todas las muestras y de *L. pneumophila* en 14 de ellas, identificando por primera vez en México la presencia de bacterias de este género y especie.

En 2011, Wullings y colaboradores analizaron muestras de agua sin cloración de dos diferentes fuentes de abastecimiento de agua en Holanda para evaluar la concentración y diversidad de *Legionella* spp; las sembraron en medio BCYE, previamente desinfectadas mediante tratamiento por calor (30 minutos a 50 °C). La identificación de *L. pneumophila* se realizó por medio de PCR en tiempo real teniendo como objetivo la amplificación del gen Mip de 654 pb. Se detectó la presencia de *L. pneumophila* y otras especies del género, en ambas fuentes de abastecimiento de agua.

3. JUSTIFICACIÓN

En México no existen normas para análisis, determinación y mantenimiento, de sistemas acuáticos contaminados por *Legionella*; derivado de esto, se desconoce la distribución de la bacteria en nuestro país y, tal vez por ello, tampoco hay reportes de neumonía causada por *L. pneumophila* lo que indica que de existir no se han identificado. En México sólo se han reportado dos casos con diagnóstico clínico de probable neumonía por *Legionella*, sin pruebas de laboratorio confirmatorias y ninguno por aislamiento del agente causal (Sapián, 2006).

Actualmente en México no se cuenta, en ningún laboratorio clínico o de investigación, con una metodología rápida y precisa para la identificación de *Legionella pneumophila* y cuando se consigue un aislado solo es posible, en algunos casos, identificarlo a nivel de género. Por ello, este proyecto está enfocado en desarrollar y proveer herramientas que faciliten aislar e identificar, de manera precisa y específica, a *Legionella pneumophila*, así como determinar con que organismos patógenos está comúnmente asociada y así valorar claramente el riesgo a la salud de los humanos que representa este organismo, principalmente por encontrarse en cuerpos de agua de uso recreativo.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar la presencia de bacterias del género *Legionella* spp. a partir de diversas fuentes hidrotermales en México.

Objetivos Particulares

- Determinar si *Legionella* spp. es habitante común del agua y de biopelículas fijas y/o flotantes de diversos sistemas acuáticos.
- Aislar e identificar a *Legionella* spp. por métodos tradicionales de cultivo.
- Aislar e identificar *L. pneumophila* en diferentes muestras de cuerpos hidrotermales en México, utilizando herramientas de biología molecular como PCR.
- Establecer la relación de los parámetros fisicoquímicos del agua y biopelículas con la presencia de *Legionella* spp.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de cuerpos de agua naturales sin cloración, balnearios de agua termal en los estados de Veracruz, Chiapas, Puebla, Oaxaca y San Luis Potosí; biopelículas del Estado de Hidalgo, sistemas de agua potable y del agua empleada en autolavados del Distrito Federal y zona metropolitana. Muestreos realizados durante el periodo comprendido de marzo de 2010 a febrero de 2011.

5.1 Recolecta de muestras

Las muestras de agua y de biopelículas fueron almacenadas en recipientes bacteriológicos estériles, se tuvo la precaución de evitar la desecación de las biopelículas (se les agrego agua del lugar) durante el transporte al laboratorio. El procedimiento en la recolecta de las muestras se hizo de acuerdo con las técnicas de muestreo especificadas en el Standard Methods (1999). Las muestras se transportaron a temperatura ambiente al Laboratorio de Investigación en 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 8. Muestreo de agua de regadera.

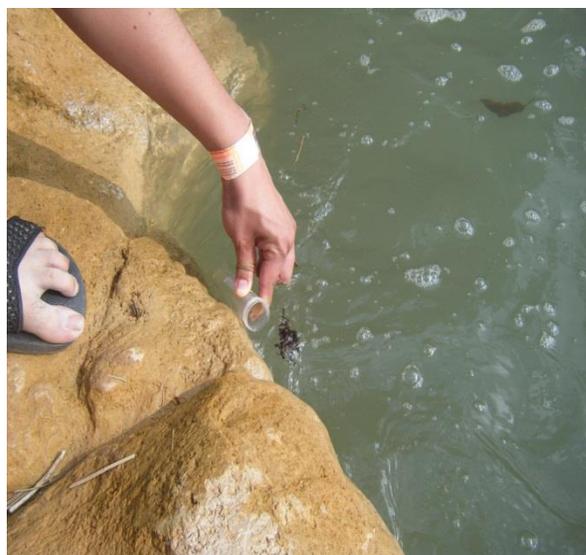


Figura 9. Muestreo de cuerpo de agua natural.

5.2 Registro de parámetros fisicoquímicos *in situ* del agua y biopelículas

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 del agua ($^{\circ}\text{C}$), pH y conductividad (mS/cm^3), así como la temperatura interna de las biopelículas al momento de su colecta (Borella *et al.*, 2005, Declerck *et al.*, 2007).

5.2.1 Temperatura interna de las biopelículas ($^{\circ}\text{C}$)

La temperatura interna de las biopelículas fue medida insertando en la biopelícula el sensor de un termómetro digital Hanna H 19040 antes de su colecta (Declerck *et al.*, 2007; Laureano, 2010).

5.2.2 Temperatura del agua (°C)

Se midió con un termómetro digital Hanna H 19040. Estos valores son indispensables para determinar el gradiente de temperatura que permite el crecimiento de las bacterias del género *Legionella* (Laureano, 2010).

5.2.3 pH del agua

Este parámetro se midió con un potenciómetro digital de campo pH/EC/TDS Waterproof Hanna Instruments (Díaz *et al.*, 2005). Esta medición se hace para establecer si las condiciones ambientales son adecuadas y favorecen la presencia y crecimiento de bacterias del género *Legionella*, siendo especialmente favorecidas en ámbitos de pH de 5.0 a 9.2 (Declerck, 2010; Hsu *et al.*, 2006; Laureano, 2010)

5.2.4 Conductividad eléctrica del agua(mS/cm³)

Se midió con un conductímetro digital Hanna H 19040. Este parámetro está asociado con la cantidad de iones que contiene el agua, principalmente sulfatos y carbonatos (Laureano, 2010).

5.3 Detección microbiológica de *Legionella* spp

Las muestras de agua y biopelículas recolectadas se incubaron a 37 °C por aproximadamente cinco días para estimular el crecimiento de bacterias del género *Legionella*. Al finalizar este tiempo las muestras de biopelícula fueron agitadas vigorosamente con un vórtex y se tomaron 15 ml de agua con partículas en suspensión,

los cuales se centrifugaron a 3000 X g durante 30 minutos (Bartie *et al.*, 2003). Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue procesada por descontaminación ácida (KCl-HCl 0.2N) para eliminar la microbiota acompañante y favorecer el reconocimiento de las colonias de *Legionella*, en un volumen de 1:1 durante 30 minutos (NCID, 2005). Las muestras de agua se procesaron de la misma forma. Posteriormente, se sembraron 100 µl de muestra en placas de agar extracto de levadura y carbón amortiguado (BCYE) enriquecido con cisteína, medio específico para el crecimiento de *Legionella spp.* (Delgado-Viscogliosi *etal.*, 2005; Ulloa, 2008). Las placas se incubaron a 37 °C y fueron revisadas diariamente con la finalidad de buscar el crecimiento de bacterias con las características morfofisiológicas pertenecientes a *Legionella* (HPA, 2006).

5.4 Identificación morfológica de colonias del género *Legionella*

Las colonias se vuelven visibles tres o cuatro días después de haber sido incubadas en las placas. Las colonias miden de 3 a 4 mm de diámetro, son de color blanco-grisáceo, convexas y circulares. Presentan bordes enteros y un moteado granular interno similar al vidrio esmerilado (NCID, 2005). La identificación de las colonias se llevó a cabo comparando el crecimiento obtenido con la cepa de *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC #33152.

5.5 Identificación molecular de *Legionella pneumophila*

A los aislados identificados por morfofisiología 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). Se lavaron las células bacterianas en una solución de lisis para romper los sistemas de membrana

celulares y liberar el ADN bacteriano. Posteriormente se le agregó RNasa en solución para degradar el ARN bacteriano; después se agregó una solución para precipitar las proteínas con la finalidad de que el 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 deshidratar y precipitar el ADN, por último se lavó el pellet de ADN con etanol al 70 %. Al término de este tratamiento se retiró el alcohol, quedando solamente el ADN bacteriano, el cual fue hidratado con un amortiguador y almacenado a -20 °C hasta el análisis.

5.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la identificación precisa de las bacterias a nivel de especie se analizó el ADN purificado obtenido de los aislados por PCR. Utilizando el Kit PCR Master Mix (Promega). Para la reacción se utilizaron los primers *dnaJ* 19 F 5'-AGG TGG TTT TGG CGG ATT TGG -3' y *dnaJ* 19 R 5'-TGA ATT CTG ACT TGC CCC ATG -3', diseñados para amplificar un fragmento de 287 pares de bases (pb) pertenecientes al gen *dnaJ* (Liu *et al.*, 2003). El volumen final de la mezcla de PCR fue de 50 µl: 25 µl de mezcla maestra lista para usar que contiene desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), buffer de reacción y cloruro de magnesio (MgCl₂); 2 µl por cada primer; 10 µl de ADN templado de las muestras y 11 µl de agua libre de nucleasas (Liu *et al.*, 2003)

La "Master Mix" que incluye el kit, tiene una mezcla elaborada con tres componentes principales para la PCR: 1) Mezcla de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), los cuales utilizan la *Taq* polimerasa para construir la cadena complementaria del segmento a amplificar, estos dNTPs incluyen adenina, timina, guanina y citosina; 2) buffer de reacción Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 0.1 % p/v gelatina y 3) cloruro de magnesio

(MgCl₂). Estos dos últimos son utilizados como amortiguador y catalizador en el proceso de la PCR.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp 2400, con los siguientes parámetros de temperatura: a) Un pre-PCR a 95 °C por 5 minutos, b) seguido de 40 ciclos a tres temperaturas; 95 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos y 74 °C durante un minuto, por último una extensión final a 74 °C por 10 minutos (Liu *et al.*, 2003).

Después de la amplificación del ADN, 15 µl de cada amplificado fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % sometidos 65 volts. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De 92 muestras colectadas en este estudio se obtuvieron 60 aislados bacterianos. Los aislados positivos para bacterias del género *Legionella* se identificaron molecularmente por PCR, obteniendo un total de cuatro aislados bacterianos pertenecientes a la especie *Legionella pneumophila* (Fig. 10 y Cuadro 10).

Cuadro 10. Distribución de *Legionella* spp. Y *L. pneumophila* aisladas de diferentes lugares de muestreo.

Sistema muestreado	Total de muestras	Aislados de <i>Legionella</i> spp.	Aislados de <i>L. pneumophila</i>
Géiser	15	11	1
Sistemas de agua potable	53	28	3
Cuerpos de agua naturales y balnearios de agua termal	19	18	ND
Autolavados	5	3	ND
Total	92	60	4

ND= No determinado

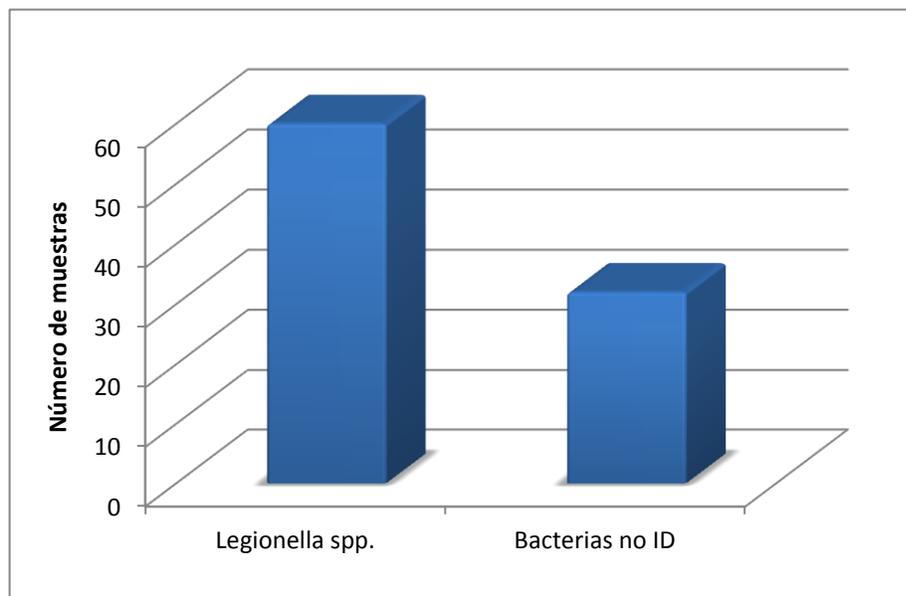


Figura 10. Número de aislados del género *Legionella* spp. y organismos no identificados en las muestras obtenidas.

Se aislaron bacterias del género *Legionella* spp. en un medio género específico (BCYE), obtenidas de muestras de cuerpos de agua naturales, balnearios de agua termal, sistemas de agua potable domésticos y de autolavados. Las características de morfología colonial, color y tamaño coinciden con las de este género.

6.1 Aislados bacterianos y tinciones

Como ya se mencionó anteriormente, la siembra de las muestras se realizó en agar extracto de levadura carbón activado (BCYE). La incubación de las muestras se mantuvo en 37 °C durante cinco a siete días en condiciones microaerófilas, después de este periodo se descartaron las placas de agar sin crecimientos aparentes y/o contaminadas con otro microorganismo. Al tercer o quinto día después de la siembra se observó el crecimiento y las características típicas de *Legionella* como son: forma, color y apariencia (circular, convexas y de color aperlado) (Figs. 11 y 12).



Figura 11. Aislados coloniales de *Legionella* spp. en placas de Petri con agar BCYE enriquecido con cisteína, obtenidos a partir de sistemas de agua potable.



Figura 12. Aislados coloniales de *Legionella* spp. en placas de Petri con agar BCYE enriquecido con cisteína, obtenidos a partir de agua de cuerpos de agua natural.

Se realizó la tinción de Gram a un cierto número de colonias para confirmar de qué se trataba de un organismo en forma de bacilo Gram negativo al adquirir el color característico de rosado a rojo (Figs. 13 y 14).



Figura 13. Tinción de Gram de bacilos de *Legionella* spp. Microscopía de luz por campo brillante, 40x.

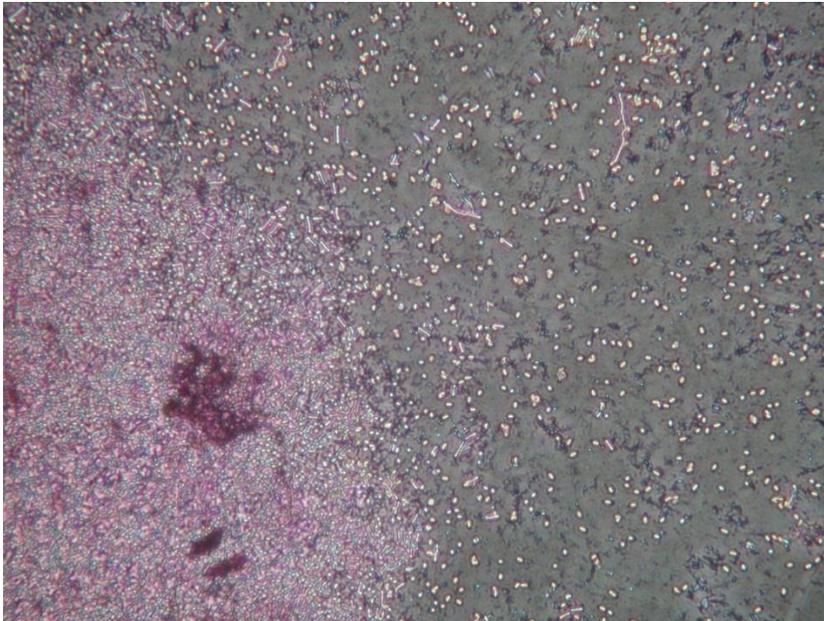


Figura 14. Tinción de Gram de bacilos de *Legionella* spp. Microscopía de luz por campo brillante, 40x.

Se obtuvo un alto número de aislados positivos para el género *Legionella* spp. del total de muestras obtenidas de agua y biopelícula del Géiser (Cuadro 11). Los resultados demuestran la presencia de *Legionella* en el agua que emana de este sistema y la protección que les confieren las biopelículas para su supervivencia. Los valores obtenidos de los parámetros fisicoquímicos (ver anexo 1, cuadro16) demuestran, de igual manera, que las características son adecuadas para el desarrollo y presencia de esta bacteria; lo que representa un riesgo para la salud de usuarios de estos sistemas acuáticos, ya que el agua de “el Géiser” abastece un balneario de aguas termales. Los resultados concuerdan con los obtenidos por Laureano (2010), quien realizó un estudio del mismo sitio, en el que de 50 muestras colectadas de agua, biopelícula y aerosoles del Géiser se obtuvo un porcentaje del 100 % para el género *Legionella*.

Cuadro 11. Características de las muestras de “el Géiser” y aislados obtenidos.

Muestra	Características de la biopelícula	Aislado de <i>Legionella</i> spp.
Ge1	Agua de escurrimiento y biopelícula de paredes de piedra del balneario	+
Ge2	Agua de escurrimiento y biopelícula de paredes de piedra del balneario	-
Ge3	Agua de escurrimiento y biopelícula de paredes de piedra del balneario	+
Ge4	Agua de escurrimiento y biopelícula de paredes de piedra del balneario	+
Ge5	Agua de escurrimiento y biopelícula de paredes de piedra del balneario	+
Ge6	Agua de escurrimiento y biopelícula de paredes de piedra del balneario	+
Ge7	Agua de escurrimiento y biopelícula de paredes de piedra del balneario	-
Ge8	Agua de escurrimiento y biopelícula de paredes de piedra del balneario	+
Ge9	Agua de escurrimiento y biopelícula de paredes de piedra del balneario	+
Ge10	Agua y biopelícula de la piscina del balneario	-
Ge11	Agua y biopelícula de la piscina del balneario	+
Ge12	Agua y biopelícula de la piscina del balneario	-
Ge13	Agua y biopelícula de la piscina del balneario	+
Ge14	Agua y biopelícula de la piscina del balneario	+
Ge15	Agua y biopelícula de la piscina del balneario	+

Ge= Géiser; 1 al 15= Número de muestra; (+)= Positivo; (-)= Negativo

Se aisló a *Legionella* en las diferentes instalaciones de sistemas de agua potable como: regaderas, cisternas y tinacos (Cuadro 12). Donde se obtuvo mayor porcentaje positivo de aislados para *Legionella* en cuanto a proporción de muestras tomadas, fue en las muestras colectadas de cisternas que representaron el 62.5 % del total de aislados positivos, seguidos por el 42 % del total de aislados positivos obtenidos de regaderas. El alto número de aislados positivos encontrados en cisternas podría deberse a la poca limpieza que normalmente se les da a este tipo de contenedores de agua, permitiendo que se acumulen biopelículas y por ende grandes cantidades de bacterias. En el caso de regaderas podría deberse a que la temperatura en la que normalmente se encuentran este tipo de instalaciones oscila entre los 27 y 34 °C (ver anexo 1, cuadro 17) lo cual se acerca mucho al valor óptimo para el desarrollo de *Legionella* que es de 37 °C; también como no son dispositivos que se descomponen con facilidad, se usan durante mucho tiempo permitiendo de igual manera que se acumule gran cantidad de microorganismos. En el caso de tinacos también se obtuvieron aislados bacterianos, aunque en menor porcentaje, esto puede deberse a que la temperatura que se encuentra el agua en estos contenedores, es menor que la que se registró en regaderas, aunque los valores de pH y conductividad para los tres tipos de instalaciones no mostraron mucha diferencia en el ámbito (ver anexo 1, cuadro17).

Cuadro 12. Muestras de sistemas de agua potable (regaderas, cisternas, tinacos) y aislados obtenidos.

Tipo de Muestra	Entidad federativa que pertenece	Aislado de <i>Legionella</i> spp. BCYE
R-1	Edo. de México	-
R-2	Edo. de México	-
R-3	Edo. de México	-
R-4	Edo. de México	+
R-5	Edo. de México	-
R-6	Edo. de México	-
R-7	Edo. de México	+
R-8	Edo. de México	-
R-9	Distrito Federal	-

Legionella spp.

R-10	Distrito Federal	-
R-11	Edo. de México	+
R-12	Edo. de México	-
R-13	Edo. de México	-
R-14	Edo. de México	-
R-15	Edo. de México	-
R-16	Edo. de México	+
R-17	Edo. de México	+
R-18	Edo. de México	+
R-19	Edo. de México	+
R-20	Distrito Federal	+
R-21	Edo. de México	-
R-22	Edo. de México	+
R-23	Edo. de México	+
R-24	Distrito Federal	+
C-1	Distrito Federal	-
C-2	Edo. de México	-
C-3	Distrito Federal	-
C-4	Edo. de México	+
C-5	Edo. de México	-
C-6	Distrito Federal	+
C-7	Edo. de México	-
C-8	Edo. de México	+
C-9	Edo. de México	+
C-10	Edo. de México	+
C-11	Edo. de México	+
C-12	Edo. de México	+
C-13	Edo. de México	+
C-14	Edo. de México	+
C-15	Distrito Federal	-
C-16	Edo. de México	+
T-1	Distrito Federal	-
T-2	Distrito Federal	+
T-3	Edo. de México	-
T-4	Edo. de México	-
T-5	Distrito Federal	-
T-6	Distrito Federal	-
T-7	Distrito Federal	+
T-8	Distrito Federal	+
T-9	Distrito Federal	+
T-10	Edo. de México	-
T-11	Edo. de México	+
T-12	Edo. de México	+
T-13	Edo. de México	+

1 al...= Número de muestra; (+)= Positivo; (-)= Negativo; R= Regadera; C= Cisterna; T= Tinaco

Se asume que *Legionella* llega a los sistemas de distribución de agua potable desde las fuentes de abastecimiento de agua. Una vez colonizado el sistema y en presencia de condiciones favorables, la bacteria puede desarrollarse hasta alcanzar un número suficientes de colonias para poder infectar al ser humano. La prevención de contaminación por *Legionella* se puede llevar a cabo en la fase de diseño de las instalaciones, garantizando el aislamiento y la correcta circulación del agua (minimizando el estancamiento) y sobre todo, procurando el mantenimiento de las mismas (CDC, 2003).

El estudio de las fuentes de infección asociadas con casos de legionelosis, ha llevado a identificar distintas instalaciones como focos a partir de los cuales se disemina la bacteria causante de la infección. Sistemas de agua sanitaria (fría o caliente) conductos de aire acondicionado, torres de refrigeración, aparatos de respiración mecánica, piscinas climatizadas e incluso fuentes ornamentales han sido claramente implicados en el brote de la enfermedad. Los conocimientos actuales sobre la biología de la bacteria permiten formular una serie de medios básicos para reducir al máximo los riesgos de contaminación por *Legionella*, así como su multiplicación y diseminación (CDC, 2003)

De todas las fuentes que se muestrearon; los sistemas acuáticos naturales arrojaron el mayor número de aislados de *Legionella* spp., ya que de las 19 muestras colectadas y sembradas en BCYE se obtuvieron 18 aislados bacterianos positivos para *Legionella*, lo que representa la presencia de *Legionella* spp. en el 94 % de las muestras, en proporción del número de muestras tomadas y el número de aislados obtenidos (Cuadro 13).

Legionella se puede encontrar en lagos y ríos, aunque su concentración en estos hábitats naturales suele ser baja. En especial, las biopelículas del agua son grandes nichos ecológicos en los que prolifera *Legionella*. Factores como temperatura elevada, contenidos orgánicos e inorgánicos del agua y la presencia de protozoos hospederos juegan un papel clave en su crecimiento y propagación. La concertada influencia de estos factores puede explicar por qué aumenta la densidad de *Legionella* en hábitats artificiales, como los sistemas de agua caliente (Huang *et al.*, 2010; Leoni *et al.*, 2005; Steinert *et al.*, 2002).

Cuadro 13. Muestras de cuerpos de agua naturales, balnearios de agua termaly aislados obtenidos.

Muestra	Estado al que pertenece	Aislado de <i>Legionella</i> spp. BCYE
J1	Veracruz	+
J2	Veracruz	+
J3	Veracruz	+
F1	Veracruz	+
F2	Veracruz	+
Chgogo	San Luis Potosí	+
Albgogo	San Luis Potosí	+
Chapfin	San Luis Potosí	+
Lag. Esc.	Veracruz	+
Río Est.	Veracruz	+
Pue Fn2	Puebla	+
Pue Fn1	Puebla	+
Oax Fn1	Oaxaca	+
Oax 1	Oaxaca	-
Casc. Agua Azul	Chiapas	+
Lag. Montebello	Chiapas	+
Alb. Mayabell	Chiapas	+
Cañon del sumidero	Chiapas	+

(+)= Positivo; (-)= Negativo

Se aisló por primera vez en México, a *Legionella* spp. en el agua empleada en autolavados (Cuadro14), el estudio de este tipo de fuentes resulta de gran importancia por la gran cantidad de aerosoles producidos en estas instalaciones; aunque no hay muchos reportes de infección por este tipo de fuentes a nivel mundial, se deben hacer estudios más especializados ya que de ser inhalados aerosoles suficientemente contaminados puede presentarse una infección por *Legionella*, lo que resulta un alto riesgo para los trabajadores que están expuestos continuamente a dicha fuente (Newton *et al.*, 2010; Pérez, 2001).

Cuadro 14. Muestras del aguade autolavados ubicados en el Distrito Federal y aislados obtenidos.

Muestra	Aislado de <i>Legionella</i> spp. BCYE
AL1	+
AL2	+
AL3	+
AL4	-
AL5	-

AL= autolavado; 1 al 5= Número de muestra; (+)= Positivo; (-)= Negativo

Existen diversos factores de riesgo para el crecimiento de *Legionella* en autolavados como son: que el agua reciclada que se utiliza se almacena a temperaturas por encima de los 30°C, no se utiliza ningún desinfectante para el tratamiento del agua y la producción de aerosoles por las mangueras de alta presión (VGHI, 2010)

Este estudio demuestra la capacidad de *Legionella* para colonizar diferentes fuentes de agua, revelando la presencia del género *Legionella* spp. en el 65 % del total de muestras obtenidas.

Aunque en un número limitado de estudios se ha revelado la presencia de *Legionella* spp. en distintos ambientes acuáticos, poco se sabe acerca de cómo estas poblaciones naturales se ven afectadas por factores ambientales y artificiales. Por lo tanto, la investigación de la ecología de *Legionella* spp. es esencial para comprender mejor su relación con el entorno natural, su mecanismo de entrada en los sistemas de agua artificiales y los factores que permiten su supervivencia y crecimiento en estos hábitats acuáticos (Parthuisot *et al.*, 2010).

La presencia de bacterias del género *Legionella*, especialmente en sistemas de agua doméstica como regaderas, debe ser considerada como un riesgo de enfermedad legionelosis; aunque otras variables relacionadas como el tipo de exposición, la generación de aerosoles; el nivel de bacterias presentes y el estado de salud de los usuarios de estas aguas, probablemente tienen un papel más importante (Codony *et al.*, 2002).

6.2 Identificación de *L.pneumophila* por PCR

Se obtuvieron fragmentos mediante PCR con un peso molecular de 287 pb, pertenecientes al gen *dnaJ*, esto demostró la presencia de *Legionella pneumophila* en cuatro de 15 muestras analizadas de entre 60 muestras de ADN obtenidas de los aislados bacterianos (Fig. 15); de estas muestras positivas para *L. pneumophila*, una pertenece al Géiser y las tres restantes pertenecen a sistemas de agua potable.

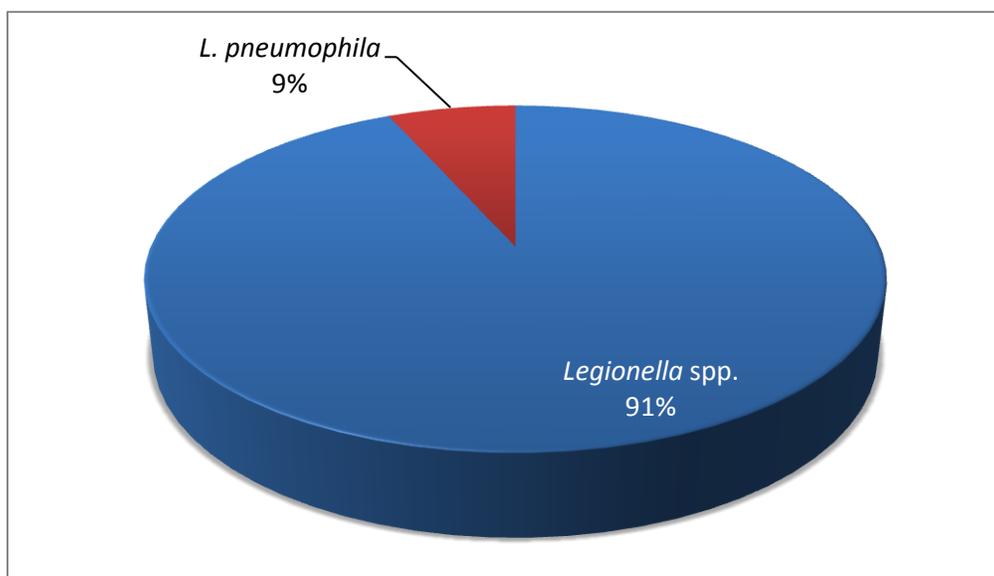


Figura 15. Porcentaje del total de bacterias identificadas como positivas del género *Legionella* spp. y *L. pneumophila*.

Los amplificados se analizaron en gel de agarosa al 2 % contrastando las muestras con un control positivo, en este caso se utilizó ADN templado de la cepa de *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* del ATCC(Fig.16).

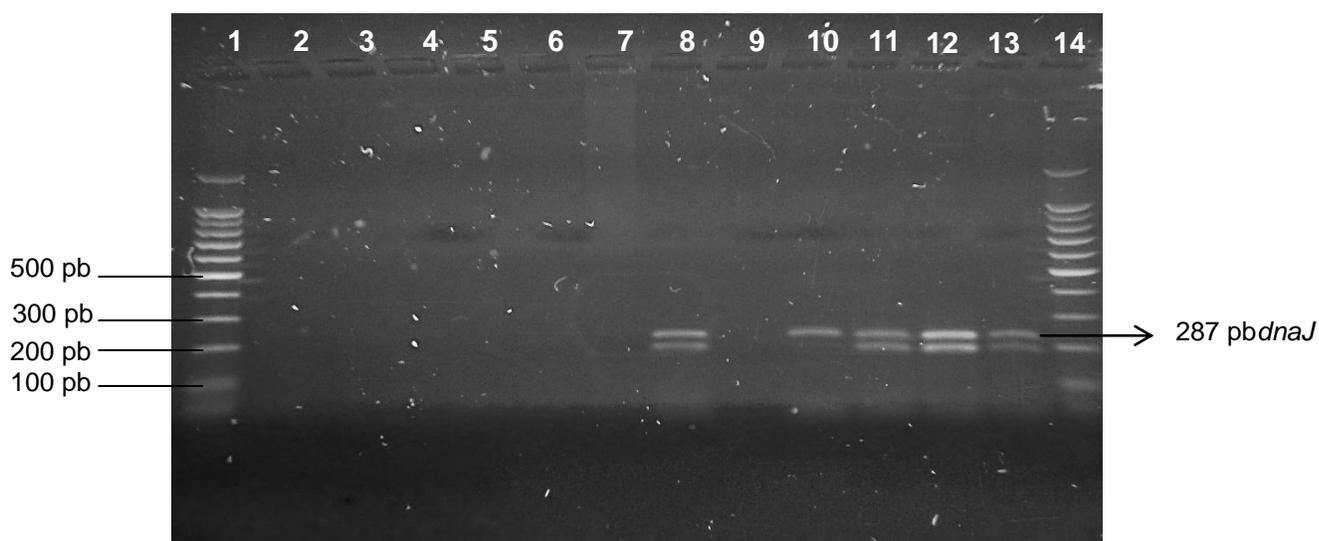


Figura 16. Electroforesis de fragmentos amplificados por PCR para *Legionella pneumophila* de muestras analizadas. Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, carriles 1 y 14). Fragmentos de 287 pb del gen *dnaJ* (carriles 10, 11, 12 y 13). Carril 8 control positivo de *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* (ATCC) fragmento de 287 pb del gen *dnaJ* Gel de agarosa al 2%.

Con frecuencia se intenta comparar los resultados obtenidos por aislamiento en cultivo y por PCR. Sin embargo, hay que tener en cuenta que por medios de aislamiento detectamos unidades formadoras de colonia (UFC), mientras que por PCR se detectan fragmentos de ácidos nucleicos de secuencia específica, y en muchas ocasiones los resultados no son comparables. Diferentes estudios realizados, han demostrado que cuando se trata de cultivos de *Legionella*, los resultados obtenidos por cultivo y PCR son totalmente coincidentes. En consecuencia, la PCR es un método diagnóstico extraordinariamente útil, pero cuyos resultados hay que interpretar correctamente para poder tomar las medidas preventivas apropiadas en cada situación (Catalán, 2006).

6.3 Parámetros fisicoquímicos

Se consideraron valores como temperatura, pH y conductividad eléctrica de los diferentes sitios de muestreo. La importancia de estos valores es su utilidad para determinar, en el caso del balneario de aguas termales “el Géiser”, si las condiciones del microambiente que brindan las biopelículas son adecuadas para la supervivencia y multiplicación de *Legionella*. En el caso de sistemas de agua potable, cuerpos de agua naturales, balnearios de agua termal y autolavados, ayudan a determinar si las condiciones del agua son óptimas para acoger a *Legionella* y en consecuencia, permitirle sobrevivir y multiplicarse.

6.3.1 Temperatura de las biopelículas y el agua

Las fuentes muestreadas que registraron los valores más elevados de temperatura y mayor porcentaje de aislados positivos fueron “El Géiser”, cuerpos de agua natural y

balnearios de agua termal; en el caso de “El Géiser” la temperatura fue de entre 18 y 45 °C, siendo un ámbito bastante amplio; sugiere que la presencia de la bacteria se debe a la protección que le confieren las biopelículas contra temperaturas extremas (Declerck, 2010) como las que se encuentran en géisers. Por otra parte, el ámbito de temperatura en los cuerpos de agua natural y balnearios de agua termal fue de entre 18 y 39 °C (Fig. 17), resultados atribuibles a la interacción de *Legionella* con gran cantidad de organismos propios de esos ambientes y que le sirven como protección y nutrientes necesarios para su supervivencia (Taylor *et al.*, 2009). Los demás valores de temperatura se mantuvieron constantes en los sistemas de agua potable y el agua empleada en autolavados.

Observando los valores obtenidos en cuanto al lugar de muestreo entre, temperatura y presencia de *Legionella* spp. no hubo gran diferencia entre ellos, ya que se logró aislar a la bacteria en todas las fuentes independientemente de sus ámbitos de temperatura, los resultados coinciden con lo citado por Declerck (2010) y Kusnetsov (1993) quienes mencionan que *Legionella* puede sobrevivir en un extenso ámbito de temperatura, desde 5 hasta 63 °C (Cuadro 15).

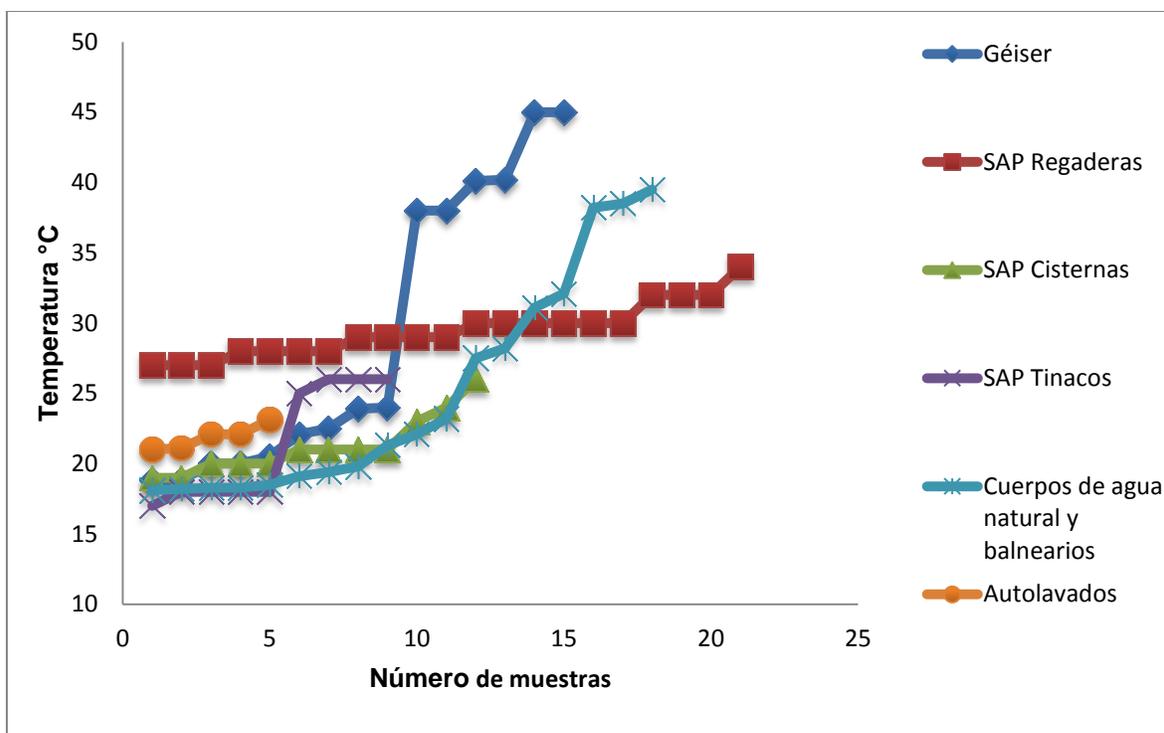


Figura 17. Valores de la temperatura de cada muestra (SAP= Sistemas de agua potable)

6.3.2 pH de las biopelículas y el agua

Los valores de pH registrados, en la mayoría de muestras colectadas, fueron constantes exceptuando los valores observados en el “Géiser”, en donde se obtuvieron aislados pese a tener un pH de 9.48 (Fig. 18). Esto concuerda con el estudio realizado por Laureano en (2010) en el que se reportaron aislamientos con valores de pH de hasta 9.57; sugiere, también, que las biopelículas o la asociación con otros microorganismos (como protozoos) le brindan a *Legionella* una gran protección y garantía de supervivencia frente a condiciones muy adversas. En general considerando los valores obtenidos para pH que van de 6.7 hasta 9.48, se hace evidente que el agua tiene un grado alcalino que se encuentra dentro de los parámetros de prevalencia para *Legionella*.

Se encontró que las muestras positivas presentaron un pH, que fue desde el valor más bajo hasta el más alto, lo que concuerda con el estudio de Ohno y colaboradores en el 2003, donde se encontró que el ámbito óptimo de pH para la supervivencia de *Legionella* en el medio acuático era de entre 6.0 y 8.0; igualmente en los estudios realizados en 2006 y 2009 por Hsu y colaboradores reportaron aislamientos de *Legionella* en ámbitos de pH 5.0 hasta 9.0, lo cual sugiere la resistencia al cambio de pH de *Legionella* (Cuadro 15).

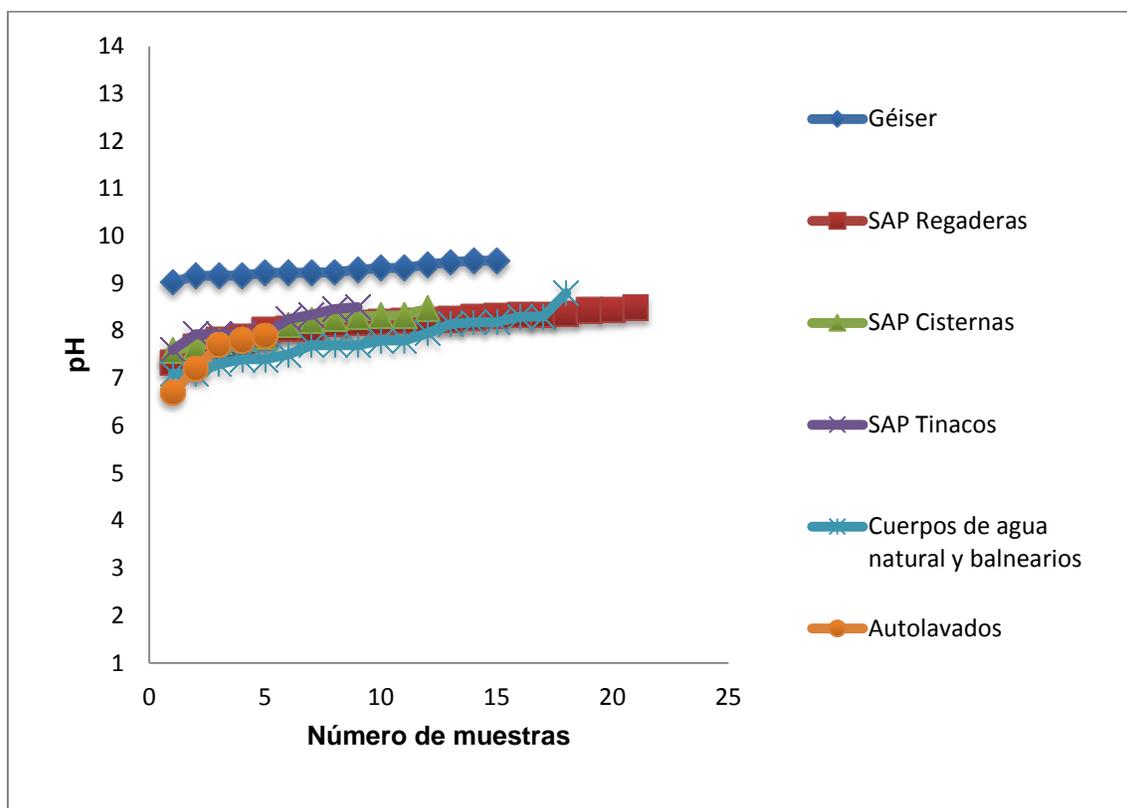


Figura 18. Valores de pH de cada muestra (SAP= Sistemas de agua potable)

6.3.3 Conductividad eléctrica (mS/cm³) de las biopelículas y el agua

Los valores de conductividad del agua fueron constantes a excepción de los obtenidos en autolavados, cuerpos de agua natural y balnearios de agua termal. En las muestras correspondientes al agua de autolavados se observó un amplio ámbito de conductividad que fluctuó desde 1.22 hasta 3.33 (mS/cm³), siendo este último el más alto de todos. En muestras de cuerpos de agua natural y balnearios de agua termal igualmente se obtuvo, también, un ámbito con valores que fueron desde 0.34 hasta 2.52 (mS/cm³) (Fig. 19). Estos resultados corresponden a los reportados por Declerck y colaboradores en el 2007, quienes obtuvieron aislados de *Legionella* spp. y *Legionella pneumophila* en un ámbito desde 0.31 hasta 0.96 (mS/cm³) a partir de muestras de biopelículas de ambientes de agua natural y artificiales; Ohno y colaboradores en el 2003 reportaron para *Legionella pneumophila* serogrupo 1, valores desde 0.9 hasta 27 (mS/cm³) en aguas termales y en agua del grifo. Se logró aislar a *Legionella* de muestras con valores muy bajos de hasta 0.11(mS/cm³), lo cual demuestra que el ámbito de conductividad eléctrica que soporta *Legionella* es muy amplio (Cuadro 15); también, sugiere la presencia de minerales como el magnesio, calcio, sodio y sulfatos en concentraciones adecuadas, ya que juegan un papel importante en el metabolismo bacteriano y por lo tanto ayuda a la supervivencia y crecimiento de *Legionella*. Altas concentraciones de minerales, serían tóxicas para las células (Laureano, 2010).

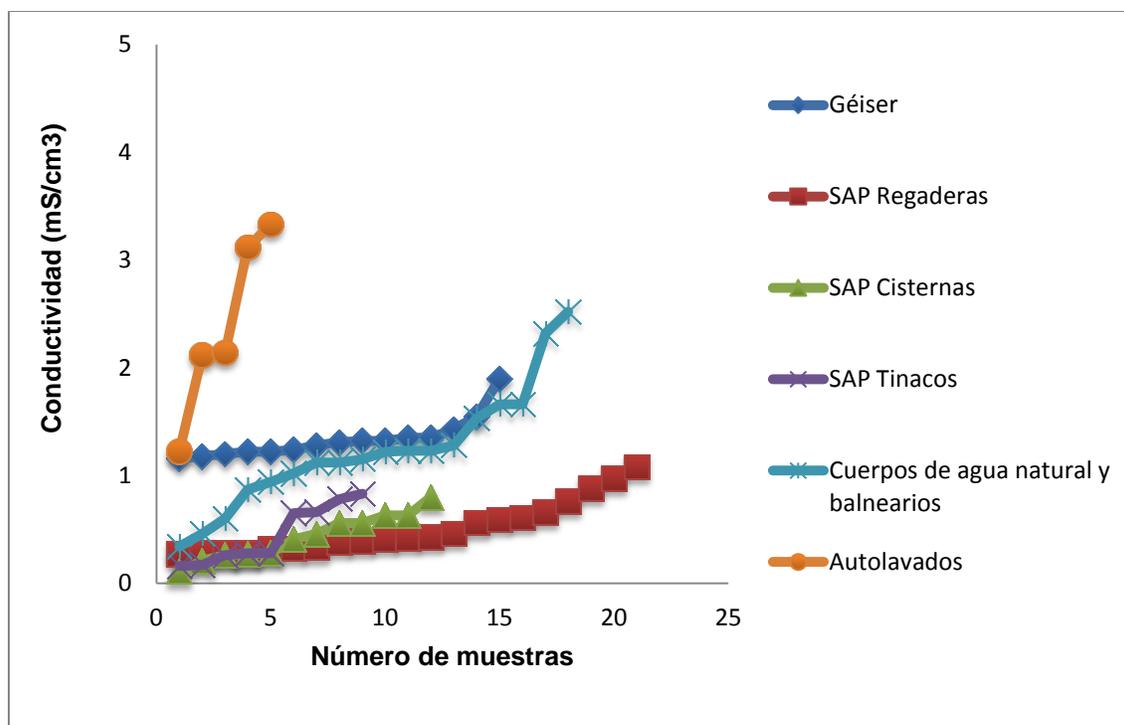


Figura 19. Valores de conductividad de cada muestra (SAP= Sistemas de agua potable)

Cuadro 15. Parámetros fisicoquímicos que favorecen la presencia de *Legionella* (Declerck, 2010; EPA, 1999; Hsu *et al.*, 2006; Kusnetsov *et al.*, 1993; Ohno *et al.*, 2003).

Parámetro fisicoquímico	Ámbito
Temperatura (°C)	5 – 63
pH	5 - 9.2
Conductividad (mS/cm ³)	0.9 – 27

Algunos parámetros fisicoquímicos o biológicos permiten predecir la presencia y/o abundancia de agentes patógenos en sistemas de agua potable, puesto que reflejan las condiciones ambientales de los microhábitats proporcionados por las biopelículas y que determinan la composición microbiana. Las relaciones entre especies y la ambigua conexión entre bacterias patógenas con las características fisicoquímicas y bacteriológicas del agua potable representan un gran reto a superar en futuras investigaciones. Se debe resaltar la necesidad de establecer protocolos de investigación

para la detección de patógenos específicos mediante el monitoreo del agua potable (Felföldi *et al.*, 2010).

7. CONCLUSIONES

Se identificó, por primera vez en México, la presencia de bacterias del género *Legionella* a partir del muestreo de sistemas de agua potable del Distrito Federal y Zona Metropolitana, de cuerpos de agua naturales y balnearios de agua termal de los estados de Chiapas, Oaxaca, Puebla y Veracruz.

Con respecto a la identificación de *Legionella*, se puede considerar que los métodos de identificación propuestos (como medios de cultivo específicos), resultan poco conocidos en nuestro país, lo que favorece el desconocimiento de este microorganismo patógeno. Se hace evidente la necesidad de establecer un método para la detección oportuna de estos microorganismos patógenos en el ambiente y en muestras clínicas de sencilla aplicación

Los métodos diagnósticos moleculares como la PCR se han convertido en la mejor alternativa a los métodos convencionales, debido principalmente a su rapidez, sensibilidad y especificidad. Sin embargo, a pesar de las múltiples ventajas de la PCR, su implementación en laboratorios diagnósticos está siendo lenta. Su progresiva incorporación en los laboratorios, mediante la validación de métodos propios o usando kits comerciales, facilitaría el uso de técnicas futuras más automatizadas.

Se determinó que los valores obtenidos de los parámetros fisicoquímicos en los diferentes lugares de muestreo como: temperatura, pH y conductividad estuvieron dentro del ámbito de tolerancia de las especies del género *Legionella*.

En general, hay que tener en cuenta que cualquier instalación de agua, puede ser foco de brotes de legionelosis. Por esto se deben hacer estudios cada vez más amplios sobre la presencia de *Legionella* en todo tipo de instalaciones de agua, pero sobre todo en aquellos a los que el ser humano está expuesto con más frecuencia.

Este estudio confirma el riesgo que representa esta bacteria sobre todo al estar presente en sistemas de agua potable, ya que pone en riesgo la integridad de la salud en las personas que están expuestas diariamente a estas fuentes de agua; por lo que este tipo de instalaciones deben de estar constantemente en limpieza, ya que la supervivencia y multiplicación de la bacteria, no solo se relaciona con los parámetros fisicoquímicos adecuados, si no también, de su relación con otros microorganismos que le ofrecen una cierta protección frente a los tratamientos de desinfección del agua que habitualmente, consisten en el aumento de la temperatura y el uso de desinfectantes químicos.

Desde un punto de vista epidemiológico, puede afirmarse que en México no se conocen muchas características de *Legionella*, las cuales podrían ser relevantes para el abordaje de acciones preventivas más efectivas contra posibles brotes en nuestro país. Por ello, se deben impulsar estudios que permitan conocer su relación con microorganismos (sobre todo los protozoos), biopelículas y el papel que desempeñan los parámetros fisicoquímicos indicadores de la calidad del agua de calidad del agua (pH, temperatura, conductividad, salinidad, turbidez, etc.) en la supervivencia de *Legionella*.

LITERATURA CITADA

- Al-Khodor, S., Price, C. T., Habyarimana F., Kalla, A. y Kwak, Y. A. 2008. A Dot/Icm translocated ankyrin protein of *Legionella pneumophila* is required for intracellular proliferation within human macrophages and protozoa. *Molecular Microbiology*. **70** (4): 908-923.
- Allison D. G. 2003. The biofilm matrix. *Biofouling*. **19**: 139-150.
- Aragon, V., Rossier, O. y Cianciotto, N. P. 2002. *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities. *Microbiology*. **148**: 2223-2231.
- Asociación Española de Pediatría de Atención Primaria (AEPAP). 2010. <http://www.aepap.org/pdf/legionela.pdf>(consultada el día 13 de Febrero del 2010)
- Atlas, M. R. 1999. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environmental Microbiology*, **1**: 283-293.
- Baine, W. B. 1985. Cytolytic and phospholipase C activity in *Legionella* species. *Journal in General Microbiology*. **131**: 1383-1391.
- Bartie, C., Venter, S. N. y Nel, L. H. 2003. Identification methods for *Legionella* from environmental samples. *Water Research*. **37**: 1362–1370.
- Bellinger-Kawahara, C. y Horwitz M. A. 1990. Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*. **172**: 1201–1210.
- Berk, S. G., Ting, R. S., Turner, G. W. y Ashburn, R. J. 1998. Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. **64** (1): 279-286.

- Blyth, C. C., Adams, N. D. y Chen S. C, 2009. Diagnostic and typing methods for investigating *Legionella* infection. *NSW Public Health Bulletin*. **20** (9-10): 157-161.
- Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M. y Messi, P. 2005. Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnology Annual Review*. **11**: 355-380.
- Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Epple, P., Bibb, W. F., Mckinney, R. M., Starnes, R. W., Colville, J. M., Selander, R. K., Edelstein, P. H. y Moss, C. W. 1988. *Legionella pneumophila* serogroup lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and descriptions of *L. pneumophila* subsp. *fraseri* subsp. nov., and *L. pneumophila* subsp. *pascullei* subsp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*. **26** (9): 1695-1703.
- 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. Journal of Microbiology*. **38** (4): 743-751.
- Catalán C. V. 2006. La técnica de PCR: ¿En qué fase de desarrollo técnico se encuentra? *Revista de Salud Ambiental*. **6** (1-2): 85-88.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2003. Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA 30333. 40-58 pp.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC), Public Health Image Library (PHIL). 2011. <http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>. (Consultada el día 13 de Agosto de 2011).

- Cianciotto, P. N., Bangsberg, M. J., Eisenstein I. B. y Engleberg C. N. 1990. Identification of mip-like genes in the Genus *Legionella*. *Infection and Immunity*. **58** (9): 2912-2928.
- Codony, F., Álvarez, J., Oliva, J. M., Ciurana, B., Company, M., Camps, N., Torres, J., Minguell, S., Jové, N., Cirera, E., Admetlla, T., Abós, R., Escofet, A., Pedrol, A., Grau, R., Badosa, I. y Vila, G. 2002. Factors promoting colonization by Legionellae in residential water distribution systems: an environmental case-control survey. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **21**: 717-721.
- Darby, J. y Buising, K. 2008. Could it be *Legionella*? *Australian Family Physician*. **37** (10): 812-815.
- De Buck, E., Anné, J. y Lammertyn, E. 2007. The role of protein secretion systems in the virulence of intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Microbiology*. **153**: 3948-3953.
- Declerck P. 2010. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology*. **12** (3): 557-566.
- Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., Van Hoef, V., Keersmaecker, B. y Ollevier, F. 2007. Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiology Research*. **164** (6): 593-603.
- Declerck, P., Behets, J., Van Hoef, V. y Ollevier, F. 2007. Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Research*. **41**: 3159-3167.
- Díaz, V. M., Elizalde, A. E. E., Quiroz, C. H., García, R. J. y Molina, E. I. 2005. Caracterización de algunos parámetros físico químicos del agua y sedimento del Lago de Zempoala, Morelos, México. *Acta Universitaria*. **15** (2): 57-65.

- Diederer, B. M. 2008. *Legionella* spp. and Legionnaire's disease. *Journal of Infection*. **56** (1): 1-12.
- Diamond, H. J. y Miranda, N. G. 2007. Biofilm: ¿amenaza latente o factor de protección? estado del arte. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. **27** (1): 22-28.
- Dowling, J. N., Saha, A. K. y Glew, R. H. 1992. Virulence factors of the family Legionellaceae. *Microbiological Reviews*. **56** (1): 32-60.
- Environmental Lab (EMLab P&K). 2011. http://www.emlab.com/s/services/legionella_testing_lab.html (Consultada el día 13 de Agosto de 2011).
- Environmental Protection Agency (EPA). 1999. Legionella: Human health criteria document. Office of Science and Technology, Office of Water, Washington, DC 20460. 123 p.
- Feazel, M. L., Baumgartner, K. L., Peterson, L. K., Frank, N. D., Harris, K. J. y Pace, R. N. 2009. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **106** (38): 16393-16399.
- Felföldi, T., Tarnóczy, T. y Homonnay, Z. G. 2010. Presence of potential bacterial pathogens in a municipal drinking water supply system. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. **57** (3): 165-179.
- Fields, B. S., Benson, R. F. y Besser, R. E., 2002. *Legionella* and legionnaire's disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews*. **15** (3): 506-526.
- Fraser, D. W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W. E., Beecham, H. J., Sharrar, R. J., Harris, J., Mallison G. F., Martin, S. M., McDade, J. E., Shepard, C. C y Brachman P. S. 1977. Legionnaire's disease: description of an epidemic of pneumonia. *The New England Journal of Medicine*. **297**: 1189-1197.

- Galka, F., Wai, S. N., Kusch, H., Engelmann, S., Hecker, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Uhlin, B. E. y Steinert, M. 2008. Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. *Infection and Immunity*. **76** (5): 1825-1836.
- García, M. T., Jones, S., Pelaz, C., Millar, R. D. y Kwalk, Y. A. 2007. *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environmental Microbiology*. **9** (5): 1267-1277.
- Garduño, R. A., Faulkner, G., Trevors, M. A., Vats, N., y Hoffman, P. S. 1998. Immunolocalization of Hsp 60 in *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology*. **180** (3): 505 - 513.
- Glick, T.H., Gregg, M.B., Mallison, B. G., Rhodes, W. W. Jr. y Kassanoff, I. 1978. Pontiac fever: an epidemic of unknown etiology in a health department. I. Clinical and epidemiologic aspects. *American Journal of Epidemiology*. **107**: 149-160.
- Gress, F. M., Myerowitz, R. L., Pasculle, A. W., Rinaldo, C. R. y Dowling, J. N. 1980. The ultrastructural morphologic features of Pittsburgh pneumonia agent. *American Journal of Pathology*. **101**: 63-67.
- Greub, G. y Raoult, D. 2004. Microorganisms resistant to free living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*. **17** (2): 413-433.
- Harf, C. y Monteil, H. 1988. Interactions between Free-Living Amoebae and *Legionella* in the Environment. *Water Science & Technology*. **20** (11-12): 235-239.
- Health Protection Agency (HPA). 2006. Detection and enumeration of *Legionella* species by centrifugation. *National Standard Method*. **13** (1): 1-15.
- Heuner, K. y Swanson, M. *Legionella: Molecular Microbiology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK. 2008. 49-55 pp.

- Hoffman, P. S. y Garduño, R. A. 1999. Surface-associated heat shock proteins of *Legionella pneumophila* and *Helicobacter pylori*: roles in pathogenesis and immunity. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. **7**: 58-63.
- Horwitz, M. A. 1983. The Legionnaire's disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*. **158**: 2108–2126.
- Hrubá L. 2009. The colonization of hot water systems by *Legionella*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. **16**: 115-119.
- Hsu, B. M., Chen, C. H., Wan, M. T. y Cheng, H. W. 2006. *Legionella* prevalence in hot spring recreation areas of Taiwan. *Water Research*. **40**: 3267-3273.
- Huang S. W y Hsu B. M. 2010. Survey of *Naegleria* and its resisting bacteria-*Legionella* in hot spring water of Taiwan using molecular method. *Parasitology Research*. **106**: 1395-1402.
- Huang, S. W., Hsu, B. M., Wu, S. F., Fan, C. W., Shih, F. C., Lin, Y. C. y Ji, D. D. 2010. Water quality parameters associated with prevalence of *Legionella* in hot spring facility water bodies. *Water Research*. **44**: 4805-4811.
- Hubber, A. y Roy, C. R. 2010. Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **26**: 261-283.
- Jawetz, E., Meinick, 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.
- Johnson, T. L., Abendroth, J., Hol, G. J. y Sandkvist, M. 2006. Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiology Reviews*. **255**(2): 175-186.
- Kusnetsov, J. M., Martikainen, P. J., Jousimies-Somer, H. R., Väisänen, M., Tulkki, A. I., Ahonen, H. E. y Nevalainen, A. I. 1993. Physical, chemical and

- microbiological water characteristics associated with the occurrence of *Legionella* in cooling tower systems. *Water Research*. **27** (1): 85-90.
- Lau, H.Y. y Ashbolt, N.J. 2009. The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 368–378.
 - Laureano, G. 2010. *Legionella* spp. en las biopelículas formadas por un Géiser en el Estado de Hidalgo, México. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México, Edo. de México. 69 p.
 - Leoni, E., De Luca, G., Legnani, P. P., Sacchetti, R., Stampi, S. y Zanetti, F. 2005. *Legionella* waterline colonization: detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems. *Journal of Applied Microbiology*. **98**: 373-379.
 - Leoni, E., Legnani, P. P., Sabbatini, M. A. y Righi, F. 2001. Prevalence of *Legionella* spp. in swimming pool environment. *Water Research*. **35** (15): 3749-3753.
 - López, M. A., Contreras, R. A., Sapián, L. L. A., Sergio, B. S. G., Lozano, Z. P., Martínez, L. Y. y Rocha, G. R. 2006. Agentes infecciosos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **48** (2): 146-153.
 - Luck, P. C., Jacobs, E., Röske, I., Schröter-Bobsin, U., Dumke, R. y Gronow, S. 2010. *Legionella dresdenensis* sp. nov., isolated from river water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **60** (11): 2557-2562.
 - Marciano-Cabral, F., Jamerson, M. y Kaneshiro, E. S. 2010. Free-living amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap water supplied by a municipal drinking water utility in the USA. *Journal of Water and Health*. **8** (1): 71-82.

- Marrie, T. J., Garay, J. R. y Weir, E. 2010. Legionellosis: why should I test and report? *Canadian Medical Association Journal*. **182** (14): 1538-1542.
- McDade, J. E., Shepard, C. C., Fraser, D. W., Tsai, T. R., Redus, M. A. y Dowdle, W. R. 1977. Legionnaires disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *The New England Journal of Medicine*. **297**: 1197-1203.
- Molinos, L. 2006. Detección de antígenos en la orina. *Archivos de Bronconeumología*. **42** (3): 101-103.
- Moondragon's Health & Wellness Legionnaire's disease. 2011. <http://www.moondragon.org/health/disorders/legionnaires.html> (Consultada el día 23 de Mayo de 2011).
- Moreira, E. F., Helbig, J. H. y Swanson, M. S. 2006. Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes of lysosomes. *Infection and Immunity*. **74** (6): 3285-3295.
- Murdoch, D. R. 2003. Diagnosis of *Legionella* infection. *Medical Microbiology*. **36**: 64-69.
- National Center for Infectious Diseases (NCID). 2005. Procedures for the recovery of *Legionella* from the environment. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Atlanta, GA. USA. 13 p.
- Newton, H. J., Ang, D. K. Y., van Driel, I. R. y Hartland, E. L. 2010. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clinical Microbiology Reviews*. **23** (2): 274-298.
- Ohno, A., Kato, N., Yamada, K. y Yamaguchi, K. 2003. Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Applied and Environmental Microbiology*. **69** (5): 2540-2547.

- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2007. *Legionella* and the prevention of legionellosis. Ginebra, Suiza. 276 p.
- Parthuisot N, West N. J, Lebaron P y Baudart J. 2010. High diversity and abundance of *Legionella* spp. in a pristine river and impact of seasonal and anthropogenic effect. *Applied and Environmental Microbiology*. **76** (24): 8201-8210.
- Pérez, M. M., Valdes-Dapena, V. y Zuazo, J. S. 2001. *Legionelas. Microbiología y Parasitología Médicas*. Editorial Ciencias Médicas. La Habana, Cuba. 325-332 pp.
- Recursos Documentales y Gráficos para Técnicos de Prevención (JMCPRL). 2010. http://www.jmcpri.net/ntps/@datos/ntp_538.htm (Consultada el día 20 de Mayo de 2011).
- Ricketts, K. D., Joseph, C., Lee, J. y Wewalka, G. 2008. Survey on legislation regarding wet cooling systems in european countries. *Eurosurveillance*. **13** (8): 1-5.
- Roig, J. y Rello, J. 2003. Legionnaire's disease: a rational approach to therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **51**: 1119-1129.
- Rossier, O., Dao, J. y Cianciotto, N. P. 2009. A type II secreted RNase of *Legionella pneumophila* facilitates optimal intracellular infection of *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology*. **155**: 882-890.
- Rowbotham, T. J. 1986. Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Israel Journal of Medical Sciences*. **22**: 678-689.
- Sapián L. A. 2006. Agentes Infecciosos. *Revista latinoamericana de Microbiología*. **48** (2): 146-153.
- Schoen, M.E. y Ashbolt N.J. 2011. An in-premise model for *Legionella* exposure during showering events. *Water Research*. Publicado antes de impresión.

- Shin, S. y Roy, C. R. 2008. Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Cellular Microbiology*. **10** (6): 1209-1220.
- Söderberg, M. A., Rossier, O. y Cianciotto, N. P. 2004. The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures. *Journal of Bacteriology*. **186** (12): 3712-3720.
- Standard Methods 1999. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20^a ed. American Public Health Association. Washington, EUA. 1325 p.
- Steinert, M., Hentschel, U. y Hacker, J. 2002. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiology Reviews*. **26**: 149-162.
- Storey, M. V., Winiiecka-Krusnell, J., Ashbolt, N. J. y Strenstrom, T. A. 2004. The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. **36** (9): 656-662.
- Taylor, M., Ross, K. y Bentham, R. 2009. *Legionella*, protozoa and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microbial Ecology*. **58**: 538-547.
- Ulloa F. M. T. 2008. *Legionella pneumophila*. *Revista Chilena de Infectología*. **25** (3): 208.
- Victorian Government Health Information (VGHI). 2010. <http://www.health.vic.gov.au/environment/legionella/waterdeliverysystems.htm>
(Consultada el día 25 de Septiembre de 2011)
- Villaseñor, I. R. y Sapián, L. A. 2004. La enfermedad de los legionarios. *Boletín de Epidemiología*. **8** (22): 1-3.
- Vogel, J. P. y Isberg, R. R. 1999. Cell biology of *Legionella pneumophila*. *Microbiology*. **2**: 30-34.

- Weissenberger, C. A., Cazalet, C. y Buchrieser, C. 2007. *Legionella pneumophila* – a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **64**: 432-448.
- Wingender, J. y Flemming, H.-C. 2011 Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. Publicado antes de impresión.
- Wimpenny, J., Manz, W. y Szewzyk, U. 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*. **24**: 661-671.
- Wullings, B. A., Bakker, G. y van Der Kooij, D. 2011. Concentration and diversity of uncultured *Legionella* spp. in two unchlorinated drinking water supplies with different concentrations of natural organic matter. *Applied and Environmental Microbiology*. **77** (2): 634-641.
- Yang, G., Benson, R. F., Ratcliff, R., Brown, E. W., Steigerwalt, A. G., Thacker, L. W., Daneshvar, M., Morey, R. E., Saito, A. y Fields, B. S. 2011. *Legionella nagasakiensis* sp. nov., isolated from water samples in Japan and Australia and from a patient with pneumonia in the United States. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Publicado antes de impresión.

ANEXOS

Anexo 1. Cuadros de parámetros fisicoquímicos pertenecientes a las muestras de cada uno de los sitios de muestreo.

ANEXO 1

Cuadro 16. Parámetros fisicoquímicos medidos en el balneario de aguas termales “el Géiser”

Muestra	Temperatura (°C)	pH	Conductividad (mS/cm³)
Ge1	22.1	9.24	1.18
Ge2	18.8	9.23	1.22
Ge3	18.8	9.23	1.22
Ge4	40.1	9.23	1.24
Ge5	22.5	9.45	1.28
Ge6	23.9	9.40	1.20
Ge7	45	9.33	1.32
Ge8	45	9.33	1.32
Ge9	20.5	9.29	1.90
Ge10	20	9.48	1.35
Ge11	20	9.48	1.35
Ge12	40.2	9.17	1.55
Ge13	38	9.16	1.31
Ge14	38	9.17	1.16
Ge15	24	9.03	1.43

Ge= Géiser; 1 al 15= Número de muestra

Cuadro 17. Parámetros fisicoquímicos medidos en los sistemas de agua potable
(regaderas, cisternas y tinacos)

Tipo de Muestra	Temperatura del agua (°C)	pH	Conductividad (mS/cm³)
R-1	ND	ND	ND
R-2	ND	ND	ND
R-3	ND	ND	ND
R-4	30	8.05	0.76
R-5	30	8.23	0.88
R-6	30	8.34	0.66
R-7	29	7.87	0.27
R-8	28	8.31	0.56
R-9	28	8.18	1.08
R-10	32	7.81	0.41
R-11	32	8.14	0.32
R-12	30	7.67	0.28
R-13	28	8.28	0.97
R-14	27	8.16	0.32
R-15	29	8.24	0.28
R-16	34	8.36	0.38
R-17	28	8.43	0.42
R-18	27	8.03	0.33
R-19	29	8.02	0.59
R-20	32	8.49	0.46
R-21	30	8.44	0.43
R-22	30	7.33	0.28
R-23	29	8.21	0.39
R-24	27	8.34	0.61
C-1	ND	ND	ND
C-2	ND	ND	ND
C-3	ND	ND	ND
C-4	26	8.33	0.56
C-5	24	8.32	0.46
C-6	ND	ND	ND
C-7	21	8.47	0.63
C-8	21	8.31	0.56
C-9	19	7.89	0.28
C-10	20	7.78	0.27
C-11	19	7.60	0.26
C-12	21	7.84	0.80
C-13	20	8.13	0.21
C-14	20	8.22	0.41
C-15	21	8.26	0.63
C-16	23	7.67	0.11
T-1	ND	ND	ND
T-2	ND	ND	ND
T-3	26	7.94	0.17

T-4	26	8.50	0.78
T-5	ND	ND	ND
T-6	ND	ND	ND
T-7	17	7.60	0.26
T-8	26	7.94	0.16
T-9	25	8.34	0.66
T-10	18	7.93	0.28
T-11	18	8.46	0.83
T-12	18	8.25	0.65
T-13	19	7.93	0.28

R= Regadera; C= Cisterna; T= Tinaco; 1 al...= Número de muestra; ND= No determinado.

Cuadro 18. Parámetros fisicoquímicos medidos en cuerpos de agua natural y balnearios de agua termal.

Muestra	Temperatura (°C)	pH	Conductividad (mS/cm ³)
J1	19.1	7.7	1.23
J2	18.2	7.8	1.66
J3	19.8	7.1	1.12
F1	21.3	8.3	0.87
F2	22.1	7.8	1.12
Chgogo	38.5	8.8	2.32
Albgogo	39.5	8.3	2.52
Chapfin	38.2	7.7	1.23
Lag. Esc.	18.3	7.4	1.53
Río Est.	18.1	7.1	1.28
Pue Fn2	28.2	7.5	0.94
Pue Fn1	27.5	7.4	1.22
Oax Fn1	31.1	7.7	1.66
Oax 1	32.1	7.3	1.02
Casc. Agua Azul	19.4	7.9	1.15
Lag. Montebello	18.5	8.1	0.34
Alb. Mayabell	23.2	8.1	0.60
Cañon del sumidero	18.3	8.1	0.46

Cuadro 19. Parámetros fisicoquímicos medidos en autolavados.

Muestra	Temperatura (°C)	pH	Conductividad (mS/cm³)
AL1	22.1	7.2	3.33
AL2	21.0	6.7	3.12
AL3	23.1	7.7	1.22
AL4	21.1	7.8	2.14
AL5	22.1	7.9	2.12

AL= autolavado; 1 al 5= Número de muestra