

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Optimización de una técnica de PCR a tiempo real para la detección de Legionella spp. y especies non-pneumophilas viables

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE ALIMENTOS

ALUMNO/A: **MARÍA SELVA MARÍN ENÉRIZ**

TUTOR/A ACADEMICO: JORGE GARCÍA HERNÁNDEZ
COTUTOR/A: YOLANDA MORENO TRIGOS
DIRECTOR EXPERIMENTAL: LAURA MORENO MESONERO

Curso Académico: 2019-2020

VALENCIA, 25 DE NOVIEMBRE DE 2020

OPTIMIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DE PCR A TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE *LEGIONELLA* SPP. Y ESPECIES NON-PNEUMOPHILA VIABLES

María Selva Marín Enériz¹ ¹Yolanda Moreno Trigos², Laura Moreno Mesonero², Jorge García Hernández³

RESUMEN

Legionella spp. es un género de bacterias gram negativas presente en diferentes tipos de aguas, cuya reproducción y propagación en los sistemas de distribución se considera un problema de salud pública. La especie patógena más abundante es *Legionella pneumophila* aunque existen otras especies patógenas menos estudiadas como *L. micdadei* o *L. anisa*. La detección *Legionella* spp. mediante técnicas microbiológicas tradicionales es ardua y no es determinante puesto que suelen presentarse en numerosas ocasiones formas viables no cultivables. Este trabajo tiene como objetivo la puesta a punto de un protocolo de PCR cuantitativa múltiple a tiempo real (qPCRm) para la identificación y cuantificación de *Legionella* spp. y las dos especies patógenas *L. micdadei* y *L. anisa*. Además, mediante la incorporación de un tratamiento previo con Propidio de Monoacida (PMA) al protocolo, este método ha permitido la detección de únicamente las formas viables de las mismas. Los análisis se realizaron con SYBR Green en el caso de la detección de *Legionella* spp. y con dos sondas de hidrólisis TaqMan para la cuantificación de *L. anisa* y *L. micdadei* específicas de la región intergénica 23S-5S. En este trabajo, se ha conseguido optimizar un método PMA-qPCR múltiple, que podría ser aplicado para la detección de las células viables de las especies *L. micdadei* y *L. anisa* en muestras de agua.

Palabras clave: *Legionella* spp.; PCR Multiple en Tiempo Real; sonda TaqMan; *Legionella anisa*; *Legionella micdadei*; Propidio de monoacida.

ABSTRACT

Legionella spp. it is a genus of gram-negative bacteria present in different types of water, whose reproduction and spread in distribution systems is considered a public health problem. The most abundant pathogenic species is *Legionella pneumophila* although there are other less studied pathogenic species such as *L. micdadei* or *L. anisa*. *Legionella* spp detection. Traditional

¹ Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural ETSIAMN, Universitat Politècnica de València, C/Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain.

² Instituto Universitario de Ingeniería del Agua y del Medio Ambiente, Universitat Politècnica de València, C/Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain.

³ Departamento de Biotecnología, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural ETSIAMN, Universitat Politècnica de València, C/Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain.¹

microbiological techniques are arduous and not decisive as viable non-arable forms often occur on numerous occasions. This work aims to tune a real-time multiple quantitative PCR (qPCRm) protocol for the identification and quantification of *Legionella* spp. and the two pathogenic species *L. micdadei* and *L. anisa*. In addition, by incorporating prior treatment with Monoacidal Propide (PMA) into the protocol, this method has enabled the detection of only viable forms. The tests were performed with SYBR Green in the case of *Legionella* spp detection and with two TaqMan hydrolysis probes for the quantification of *L. anisa* and *L. micdadei* specific to the 23S-5S intergenic region. In this work, it has been possible to optimize a multiple PMA-qPCR method, which could be applied for the detection of viable cells of the species *L. micdadei* and *L. anisa* in water samples.

Keywords: *Legionella* spp.; Multiplex real-time PCR, TaqMan probe; *Legionella anisa*; *Legionella micdadei*; Monoacid propidium.

RESUM

Legionella spp. és un gènere de bacteris gram negatives present en diferents tipus d'aigües, la reproducció i la propagació de les quals en els sistemes de distribució es considera un problema de salut pública. L'espècie patògena més abundant és *Legionella pneumophila* encara que existeixen altres espècies patògenes menys estudiades com a *L. micdadei* o *L. anisa*. La detecció *Legionella* spp. mitjançant tècniques microbiològiques tradicionals és àrdua i no és determinant perquè solen presentar-se en nombroses ocasions formes viables no cultivables. Aquest treball té com a objectiu la posada a punt d'un protocol de PCR quantitativa múltiple a temps real (qPCRm) per a la identificació i quantificació de *Legionella* spp. i les dues espècies patògenes *L. micdadei* i *L. anisa*. A més, mitjançant la incorporació d'un tractament previ amb Propidio de Monoacida (PMA) al protocol, aquest mètode ha permès la detecció d'únicament les formes viables d'aquestes. Les anàlisis es van realitzar amb SYBR Green en el cas de la detecció de *Legionella* spp. i amb dos sondes d'hidròlisi TaqMan per a la quantificació de *L. anisa* i *L. micdadei* específiques de la regió intergènica 23S-5S. En aquest treball, s'ha aconseguit optimitzar un mètode PMA-qPCR múltiple, que podria ser aplicat per a la detecció de les cèl·lules viables de les espècies *L. micdadei* i *L. anisa* en mostres d'aigua.

Paraules clau: *Legionella* spp.; PCR Multiple en Temps Real; sonda TaqMan; *Legionella anisa*; *Legionella micdadei*; Propidio de monoacida.

INTRODUCCION

En el género *Legionella*, perteneciente a la familia Legionellaceae, existen 48 especies y un total de 78 serotipos (Journal of Clinical Microbiology, 2001). No todas las especies de esta familia causan patología. La gran mayoría de las infecciones humanas son pulmonares y se producen tras la exposición a una fuente ambiental de *Legionella*, generalmente por inhalación de aerosoles contaminados provocando patologías como la enfermedad del legionario y/o

fiebre de Pontiac. Entre las especies conocidas de *Legionella* spp., *L. pneumophila* ssp1 ha sido identificada como la especie más común causante de neumonía grave o enfermedad del legionario (Aziziyan et al., 2020). Aunque esta especie es la más frecuente en casos clínicos (80-90%), también hay otras especies causantes de enfermedad como es el caso de *L. anisa* y *L. micdadei* (Cross et al., 2016). La legionelosis es una enfermedad de declaración obligatoria, que posee una elevada repercusión mediática al ser asociada a brotes comunitarios. Por tanto, la importancia del estudio de *Legionella* spp. no solo se centra en sus importantes implicaciones sanitarias, sino que también ha de abarcar las implicaciones socioeconómicas que lleva asociada, al afectar a importantes sectores, como el del turismo, comercio e industria entre otros (Moreno, 2002).

En 2015 se notificaron según la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) un total de 1.310 casos de legionelosis en España, 380 casos más que los notificados en 2014 (930 casos). Además, el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) notificó a través de la red ELDSNet 74 casos en turistas extranjeros que viajaron a España durante el periodo de incubación de la enfermedad. Aunque en 2018 y 2019 los casos notificados de legionelosis (RENAVE) fueron menores (951 casos en 2018 y 806 casos en 2019), siguen siendo un número elevado.

El método de referencia para detección por cultivo de *Legionella* spp. se basa en la norma UNE-EN ISO 11731. Es el único método disponible que permite detectar cualquiera de las especies y serogrupos de *Legionella* pero tiene como inconveniente el tiempo que tarda en crecer el microorganismo (de 3 a 10-12 días) y su baja sensibilidad debida, entre otros, a la naturaleza de la bacteria que crece con dificultad en medios selectivos, a la capacidad de adquirir un estado Viable no Cultivable (VBNC) en condiciones de estrés (tratamientos de calor o con desinfectantes) y la dificultad del aislamiento de la bacteria en muestras que presentan un elevado número de microbiota acompañante. En estado VBNC, *Legionella* no es capaz de crecer en un medio sintético, pero continúa siendo viable y por tanto infectiva. Por ello, es necesario el uso de otras técnicas moleculares de detección más rápidas y efectivas, como la PCR cuantitativa.

El desarrollo de los métodos de detección moleculares y en particular, la aparición de la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) ha mejorado en gran medida el diagnóstico ambiental y clínico de *Legionella* spp. y *L. pneumophila* ya que presenta mucha mayor sensibilidad que el cultivo (Ditommaso et al., 2015). Esta técnica proporciona una detección más rápida sin que sea necesario el cultivo y reduciendo así el tiempo de análisis a unos 45 minutos. La técnica de PCR en tiempo real se ha utilizado para detectar y cuantificar *L. pneumophila* mediante el uso de SYBR Green y sondas TaqMan (Salihah, N. T et al., 2018).

Las sondas TaqMan son sondas de hidrólisis que poseen una molécula fluorescente en el extremo 5' y una molécula absorbente de fluorescencia en su extremo 3'. Su funcionamiento se basa en que la fluorescencia emitida por la molécula del extremo 5' de la sonda TaqMan es suprimida por la molécula absorbente o quencher durante la amplificación por qPCR, en la que la enzima polimerasa hidroliza la sonda provocando que la molécula fluorescente se aleje del Quencher y permitiendo que esta fluorescencia aumente para producir una detección directa de la amplificación (Salihah, N. T et al., 2018).

Sin embargo, aunque la qPCR permite reducir el tiempo de análisis de muestras, posee un gran inconveniente, la imposibilidad de diferenciar entre el

ADN de células viables y por tanto infectivas, y el ADN procedente de células muertas o no viables. Con la finalidad de poder identificar mediante qPCR únicamente ADN de células viables presentes en la muestra y no sobreestimar la presencia de las mismas, se puede combinar esta técnica con agentes intercalantes del DNA, como el propidio monoazida (PMA) (Nkuipou-Kenfack et al. 2013) . El PMA es un colorante fotorreactivo que tiene alta afinidad por unirse al ADN, preferentemente al DNA de doble cadena. La membrana celular es impermeable al PMA, por lo que este se une selectivamente con el ADN de las células cuyas membranas están dañadas. El PMA se une fotoquímicamente al ADN por un enlace covalente de nitrógeno-carbono estable. Esta modificación del ADN inhibe la acción de la polimerasa, por lo que el ADN de las células comprometidas, no viables, no es amplificado en la qPCR (Lee and Ponce, 2011). Por lo tanto, mediante el uso combinado de la qPCR con PMA, la detección, identificación y cuantificación, teóricamente, se limita a las células con membranas celulares intactas, consideradas viables. Este método se ha optimizado para diferentes matrices, pero hay una falta de consenso en cuanto a las condiciones óptimas y por lo tanto su robustez y fiabilidad es debatida (Whiley and Taylor, 2016).

Numerosas publicaciones han descrito protocolos para la detección de *Legionella* spp. y *L. pneumophila* por separado (Yáñez et al., 2011). La determinación simultánea de varias especies o especies y géneros en una misma muestra y reacción de amplificación representa una considerable reducción tanto en el tiempo de diagnóstico del patógeno como en el coste de análisis y volumen de muestra (Panicker et al., 2004).

Por todo ello el objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Máster es el estudio, puesta a punto y estandarización de una PCR a tiempo real para la detección de *Legionella* spp. y la cuantificación simultánea (múltiple qPCR), de dos especies de *Legionella* no pneumophila como son *L. anisa* y *L. micdadei*. A su vez, se ensayará la combinación de esta técnica con la aplicación del PMA para la detección únicamente de células viables que son las potencialmente infectivas.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS DE *LEGIONELLA* UTILIZADAS Y CONDICIONES DE SIEMBRA

Cepas de diferentes especies de *Legionella* (*L. pneumophila*, *L. parisiensis*, *L. bozzemaniai*, *L. anisa*, *L. micdadei*, *L. longbeachae* y *L. dumoffi*) (Tabla 1) de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), de la American Type Culture Collection (ATCC), de la Culture Collection, University of Gothenburg (CCUG) y ambientales (Tabla 1, Anexo I), se sembraron por duplicado en agar BCYE-Cys® (BCYE, CM655, Oxoid) mediante triple estría para obtener colonias aisladas de cada una de ellas. Todas las placas se incubaron a 37°C en aerobiosis (con una concentración mínima de 2,2 mg de oxígeno/L) entre 24 y 72 horas.

Se seleccionaron las colonias características de *Legionella*, que se resuspendieron en 1,5 ml de tampón PBS 1X (Tampón fosfato).

EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del ADN se realizó con el sistema comercial de extracción en columnas GeneJET Genomic DNA Purification (K0721, Thermo Scientific, EEUU) siguiendo el protocolo para bacterias gram negativas recomendado por el fabricante. El DNA se eluyó en 50 μ L y se conservó a -20°C .

MEDIDA DE LA PUREZA Y CONCENTRACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO

La medida de la pureza del ADN extraído se realizó con un espectrómetro ultravioleta (Nanodrop™ 2000 Ref. ND2000 ThermoScientific). El ratio A260/280 determinó la pureza de las muestras (tabla 2). Mediante el sistema Qubit® dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, CA, EE.UU.) y el fluorómetro Qubit® 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) se midió la concentración de DNA de las cepas de *L. anisa* y *L. micdadei* a fin de poder determinar la concentración exacta de ADN en ng/ μ L y poder después determinar la concentración exacta para elaborar las curvas diluciones seriadas de cada cepa y elaborar a partir de estas cada una de las curvas patrón. Las concentraciones de DNA de partida fueron de 20.4 ng/ μ L para *L. micdadei* y de 68.1 ng/ μ L para *L. anisa*.

SELECCIÓN DE SONDAS E INICIADORES

Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica para la selección de iniciadores y sondas que pudieran identificar las principales especies patógenas de *Legionella no pneumophila* que pudieran encontrarse en aguas de consumo. Las sondas e iniciadores utilizados se seleccionaron según lo publicado por Cross *et al.*, 2016. Los iniciadores descritos por estos autores, amplificaban una región de la zona intergénica 23S-5S conservada y específica para todas las especies de *Legionella* descritas por Grattard *et al.*, 2006y se seleccionaron dos sondas de hidrólisis 5' TaqMan únicas dentro de esta región para la detección específica de *L. anisa* y *L. micdadei*.

Especificidad de iniciadores *insilico*

El estudio teórico de la especificidad de las secuencias de las sondas e iniciadores seleccionados, se realizó empleando el programa BLAST (Basic Local Search Tool; Altschul, 1997), (www.ncbi.nlm.nih.gov) que alineó las secuencias de los mismos con la base de datos de secuencias contenidas en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Las secuencias de cada uno de los iniciadores y sondas se muestran en la Tabla 2 del Anexo I. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados y marcados por Metabion International AG (Planegg, Germany) con purificación por HPLC.

A fin de poder diferenciar y ajustar de forma eficiente cada una de las reacciones de la qPCR múltiple, cada una de las sondas TaqMan fue marcada para emitir fluorescencia a distintas longitudes de onda, siendo estas $\lambda=530$ nm

para *L. micdadei* (6-Fam) y $\lambda=560$ nm para *L. anisa* (Hex), La detección de *Legionella* spp. se realizó con el sistema SYBRgreen.

CONDICIONES DE qPCR

Para la optimización de la temperatura de alineamiento de los iniciadores, se ensayaron las condiciones descritas por Cross *et al.*, 2016. y otras, aumentando la establecida por los autores en forma de gradiente. Así mismo, se testaron varias concentraciones de iniciadores y sondas para identificar la concentración óptima de los mismos en la reacción Para la detección de *Legionella* spp se probaron distintas mezclas de reacción que contenían un volumen final 20 μ L con: 2, 3 y 4 μ L de SYBR Green® Master Mix (Roche Ltd, Switzerland); 1, 1.5 y 2 μ L de cada iniciador *forward* y *reverse* (3 μ M); 1, 2.5 y 3 μ M de MgCl₂ y ADN. Las condiciones de qPCR y los tiempos y temperaturas para la detección de *Legionella* spp. se muestran en la Tabla 3 del Anexo I.

Para la detección de *L. anisa* y *L. micdadei*, en cada reacción de qPCR (volumen final de 20 μ L) se probaron 2, 4 y 6 μ L de FastStart TaqMan® Probe MasterMix (Roche Ltd, Switzerland); 100 y 150 nM de cada iniciador *forward* y *reverse*; 25, 35 y 50 nM de sonda *L. anisa* (sonda HEX), 25, 35 y 50 nM de cada sonda *L. micdadei* (FAM) y ADN. Las condiciones para la qPCR se muestran en la Tabla 4, Anexo I.

ESPECIFICIDAD IN VITRO CON CEPAS DE REFERENCIA

La especificidad de los iniciadores y sondas utilizados para la detección de *Legionella* spp., *L. micdadei* y *L. anisa* (con las condiciones de reacción de la qPCR optimizadas), se analizó con una batería de cepas de *Legionella* de referencia (tabla 1) junto con una cepa de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. que se utilizaron como controles negativos.

CURVA PATRÓN DE *L. MICDADEI* Y *L. ANISA*

Una vez establecidas las condiciones óptimas de qPCR, se realizó una curva estándar de *L. micdadei* y otra de *L. anisa*, para utilizarlas como patrón en la cuantificación mediante qPCR. Para ello, se realizaron diluciones seriadas de concentración de ADN conocidas ($10^6 - 10^1$), obteniendo los puntos de corte (*crossing points*) que conforman la curva patrón y relacionando así la concentración de ADN con la fluorescencia. Se partió de 20.4 ng/ μ L de DNA de *L. micdadei* y 68.1 ng/ μ L de *L. anisa*. En este caso en lugar de relacionar la fluorescencia con concentración de DNA, se relacionó con equivalentes genómicos (EG) o Unidades genómicas (GU).

Para ello se calculó el peso del genoma y el número de copias del gen detectado de *L. micdadei* y *L. anisa* (3 copias) partiendo de los pares de bases de cada una de ellas obtenidas de la base de datos de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) que se muestran en la Tabla 5 del Anexo I.

El peso de los genomas se calculó de acuerdo con el peso medio de pares de bases (1.096 E21 g/pb) para determinar la concentración de DNA de un GU o EG.

$$\text{Unidades genómicas (GU)} = \frac{\text{Concentración de ADN}}{\text{Masa genómica}^a} \quad (1)$$

^a valores de 3.4 fg, para *L. micdadei* 3.56 fg y para *L. anisa* 5.64 fg.

PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA qPCR MULTIPLE (qPCRm)

Con el objetivo de poder detectar simultáneamente *L. micdadei* y *L. anisa* en una misma reacción, se procedió a la puesta a punto de una qPCR múltiple (multiplex). Para ello, se llevaron a cabo varios ensayos. Se probaron diversas concentraciones de ambas sondas y reactivos. Las concentraciones de ambas sondas ensayadas fueron de 0.5, 1 y 2 μM y los volúmenes de MasterMix (TaqMan® Probe MasterMix) por cada reacción fueron 4, 6 y 7 μL .

Las condiciones de qPCRm establecidas previamente para las reacciones individuales se optimizaron, evaluando diferentes temperaturas de unión de los iniciadores (de 56 hasta 62°C) y tiempos de extensión (desde 5 hasta 30 segundos) para conseguir condiciones idénticas de amplificación para la detección de ambas especies en la misma reacción. Tras optimizar las condiciones idóneas para la reacción multiplex se procedió a realizar la curva patrón mediante diluciones decimales seriadas de concentración de ADN de 10^5 a 10^1 . De nuevo se evaluó la especificidad y la sensibilidad de la multiplex qPCR del mismo modo descrito que para las reacciones simples.

DETECCIÓN DE *L. MICDADEI* Y *L. ANISA* VIABLES MEDIANTE LA APLICACIÓN DEL PROPIDIO MONOAZIDA (PMA).

La detección de *L. anisa* y *L. micdadei* mediante la aplicación de propidio de monoazida (PMA) se llevó a cabo con varios ensayos. El primero de ellos consistió en un estudio de viabilidad realizado a partir de un cultivo de ambas cepas de 24 horas en agar BCYE. A partir de este cultivo se recogieron las colonias y se resuspendieron en tampón PBS 1X. Cada una de las suspensiones celulares se dividió a su vez en dos alícuotas (A y B: *L. micdadei*; C y D: *L. anisa*), constituyendo así un total de cuatro alícuotas. Las alícuotas B y C, se sometieron a un tratamiento de 15 minutos a 85°C para obtener suspensiones de células muertas. Se realizó una mezcla en proporciones iguales de A+C y de B+D para obtener muestras mixtas para el ensayo. Se realizó un recuento en placa para determinar la concentración de UFC (Unidades Formadoras de Colonias), de cada una de las suspensiones (A, B, C y D). Para ello, se inocularon 100 μL de las suspensiones en agar BCYE-Cys® (BCYE, CM655, Oxoid) y se incubaron 24-48 h a 37°C. Paralelamente, se realizó una tinción de las muestras de las suspensiones con SYTO9 y yoduro de propidio (PI) en proporciones 1:1 con el sistema comercial LIVE/DEAD® Cell Viability Assays (Invitrogen, Reino Unido)

según las instrucciones del fabricante, para cuantificar las células viables y no viables mediante recuento en microscopio de fluorescencia. A continuación, las dos suspensiones mixtas de células (A+C y B+D), se incubaron con PMA a una concentración de 25µM en oscuridad a 30°C durante 15 minutos agitando frecuentemente. Posteriormente se fotoactivaron durante 15 minutos usando el equipo phAST Blue. A continuación, se centrifugaron a 8.000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 100 µL de PBS 1X. Finalmente se extrajo el DNA y se realizó una qPCR múltiple.

El segundo ensayo llevado a cabo fue a partir de un cultivo mantenido a 37°C durante 7 días (condiciones de estrés) de *L. micdadei* y *L. anisa*, con el objetivo de simular las condiciones desfavorables en las que generalmente se encuentran estas bacterias en muestras ambientales. Los procedimientos de tratamiento de muestras fueron los mismos que los descritos en el primer ensayo.

ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES DE AGUAS MEDIANTE qPCR Y PMA

Se tomaron 5 litros de muestras de agua procedentes de dos plantas de tratamiento de agua potable (A y B). Los puntos de muestreo fueron el influente (agua bruta) y el efluente final (agua tratada). En el caso de la potabilizadora B, el tratamiento final consistió en un paso de desinfección con UV. Dichas muestras de agua se filtraron a través de membranas de 0,45 µm de tamaño de poro para concentrar las bacterias presentes. Posteriormente los filtros se introdujeron en una suspensión de PBS (2 mL) y con un raspador de células estéril se recuperaron las células retenidas. Seguidamente, la suspensión de PBS de cada muestra se dividió en dos alícuotas iguales. En una de las alícuotas de cada muestra se realizó un tratamiento con PMA tal como se describe en el apartado anterior. Posteriormente se procedió a realizar la extracción de DNA de todas las muestras mediante el sistema de extracción descrito en los apartados anteriores. Por último, las muestras fueron analizadas mediante qPCRm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ESPECIFICIDAD *IN SILICO* DE INICIADORES Y SONDAS

Los iniciadores y sondas seleccionadas procedentes de bibliografía (Cross *et al.*, 2016) para realizar los análisis de qPCR de las diferentes especies de *Legionella* resultaron específicos, alineando selectivamente con las secuencias de la región intergénica 23S – 5S de *Legionella* spp., *L. micdadei* y *L. anisa* de las secuencias contenidas en la base de datos NCBI. Los alineamientos específicos para *L. anisa* y *L. micdadei* se encuentran en las Figuras 14 y 15 del Anexo II.

ESPECIFICIDAD Y ANÁLISIS *IN VITRO*

Finalmente, para la detección de *Legionella* spp. mediante SYBR Green I se seleccionó una temperatura de unión de iniciadores (annealing) de 60°C y un

tiempo de extensión a 72°C de 9 segundos, ya que fueron las condiciones que amplificaban con mejor eficiencia, es decir con la misma concentración de DNA, la amplificación se producía antes y se obtenían datos de Ct más bajos (datos no mostrados).

Todas las cepas de *Legionella* analizadas para evaluar la especificidad *in vitro* fueron amplificadas con los iniciadores Pan-*Legionella*, para detectar *Legionella* spp., con SYBR Green®. Se comprobó así su especificidad para la detección del género *Legionella* (curvas de amplificación, Figura 1), determinando las temperaturas de fusión específicas (*Melting Peaks*) para cada una de las especies, que oscilaban entre 80 y 83 °C (Figura 2).

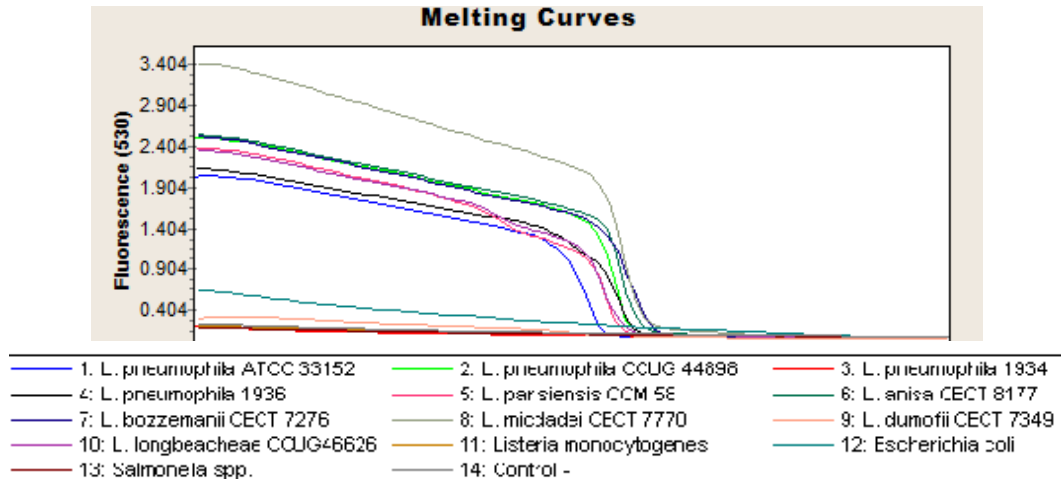


FIGURA 1. Curvas de amplificación para especificidad de género *Legionella*.

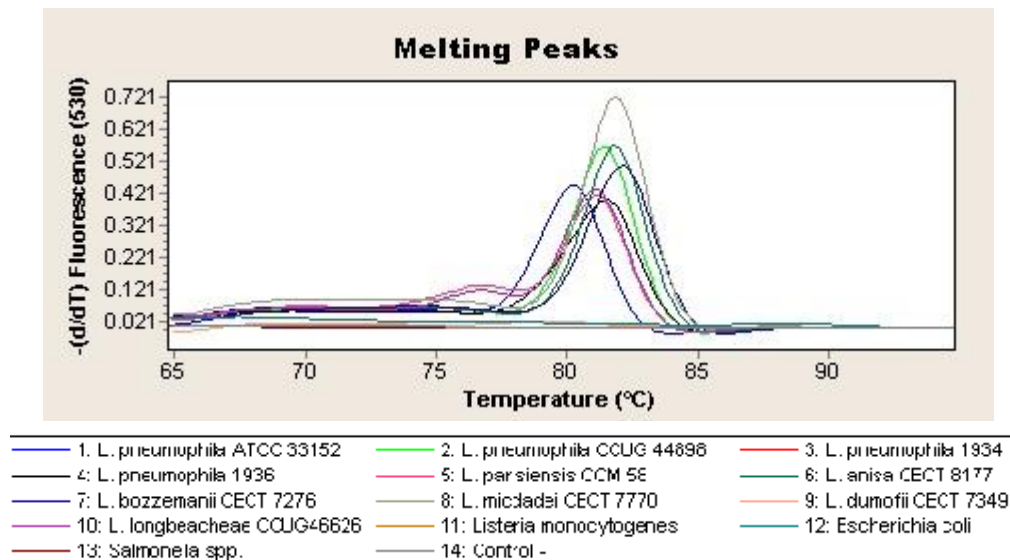


FIGURA 2. Temperaturas de fusión (*Melting Peaks*) para género *Legionella*.

Las condiciones óptimas para la detección de *Legionella* spp. se muestran en la Tabla 6 (Anexo I).

Del mismo modo, tras ajustar las concentraciones de reactivos con varios ensayos de qPCR (datos no mostrados), se seleccionaron como condiciones de qPCR óptimas las mostradas en la Tabla 7 (Anexo I).

Por otra parte, se ajustaron también las condiciones para la detección mediante qPCR con sondas TaqMan, de las especies *L. anisa* y *L. micdadei*. En primer lugar, para que la eficiencia de emisión de las sondas seleccionadas fuera la óptima, se realizó una compensación de canales en el LigtCycler 2.0, con cada una de las sondas, según el protocolo descrito (<https://www.qiagen.com/us/resources/>).

Finalmente, y tras varios ensayos (datos no mostrados), las concentraciones óptimas de cada reacción de amplificación mediante qPCR para cada especie fueron las expuestas en la Tabla 8 y 9 (Anexo I).

La especificidad de la reacción optimizada se comprobó mediante la amplificación de las especies de *Legionella* y otros géneros patógenos que se pueden encontrar en aguas y que podrían interferir (Fig. 3 y Fig. 4). Solo se observó amplificación de las especies para las que se diseñó cada qPCR.

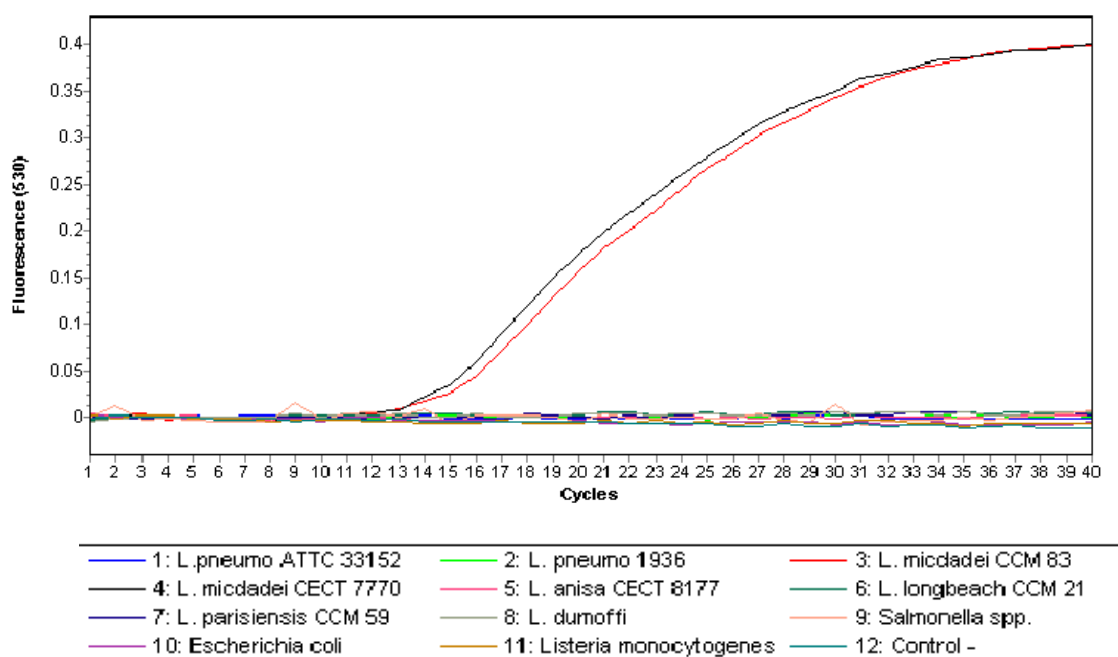


Figura 3. Especificidad *in vitro* *L. micdadei*. La amplificación mostrada corresponde a las dos especies de *L. micdadei* utilizadas. (Lectura a 530 nm, FAM)

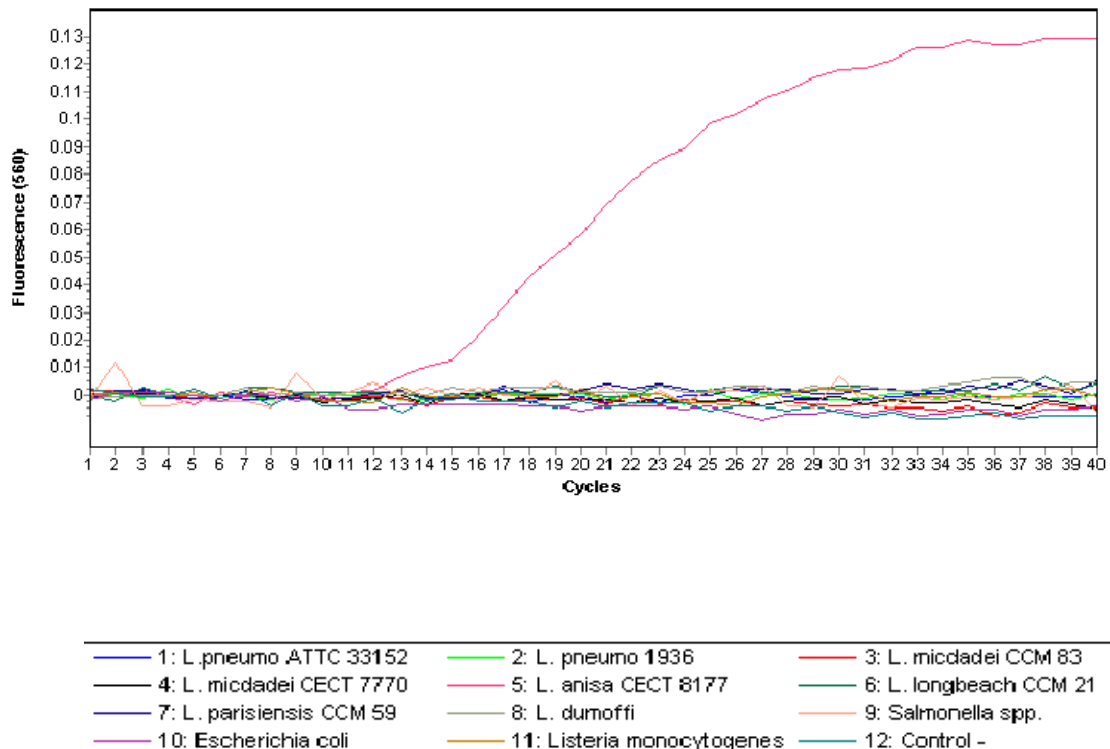


Figura 4. Especificidad *in vitro* *L. anisa*. La amplificación mostrada corresponde a la especie *L. anisa*. (Lectura a 560 nm, Hex).

Por último, tras varios ensayos (datos no mostrados), se establecieron como condiciones óptimas de amplificación mediante qPCR para cada especie las expuestas en la Tabla 10 (Anexo I).

A partir de los resultados obtenidos, se procedió a comprobar la sensibilidad de la reacción de amplificación para cada una de las especies, partiendo de diluciones decimales seriadas de concentración conocida, cuyas gráficas, eficiencia y error experimental se muestran en las Figuras 5 a 8 de las curvas patrón (Fig 6 y Fig. 8).

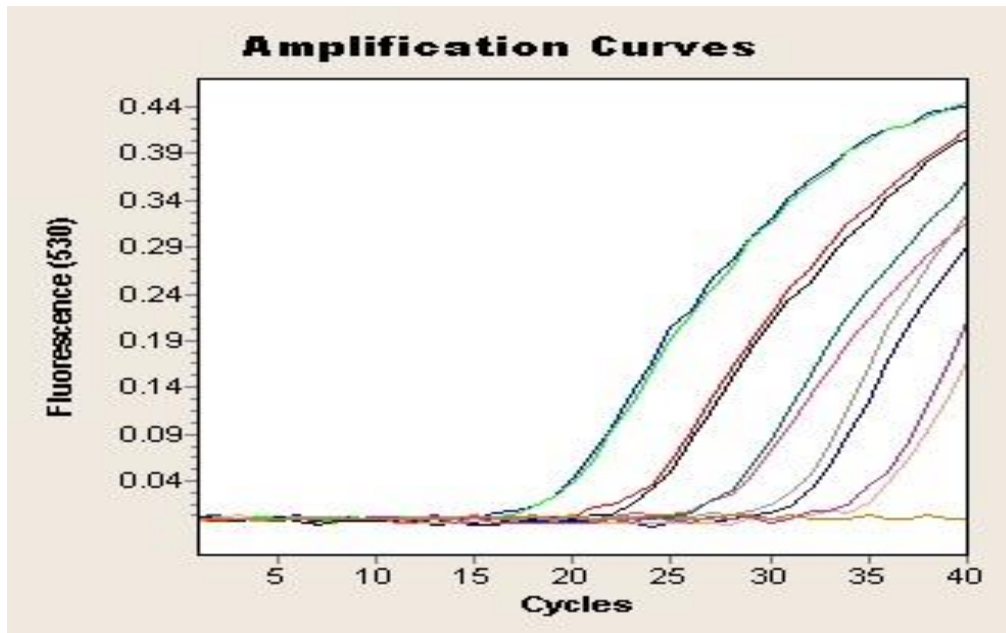


FIGURA 5. Curva de amplificación de las distintas diluciones seriadas (10^5 - 10^1) de células de *L. micdadei* en la detección de la región intergénica de los genes 16S-5S, empleadas para la obtención de una curva patrón de cuantificación.

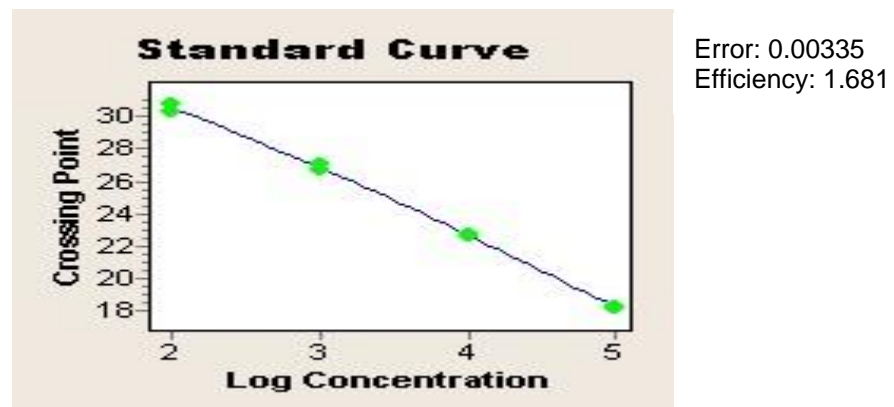


FIGURA 6. Curva Patrón, eficiencia y error de *L. micdadei*.

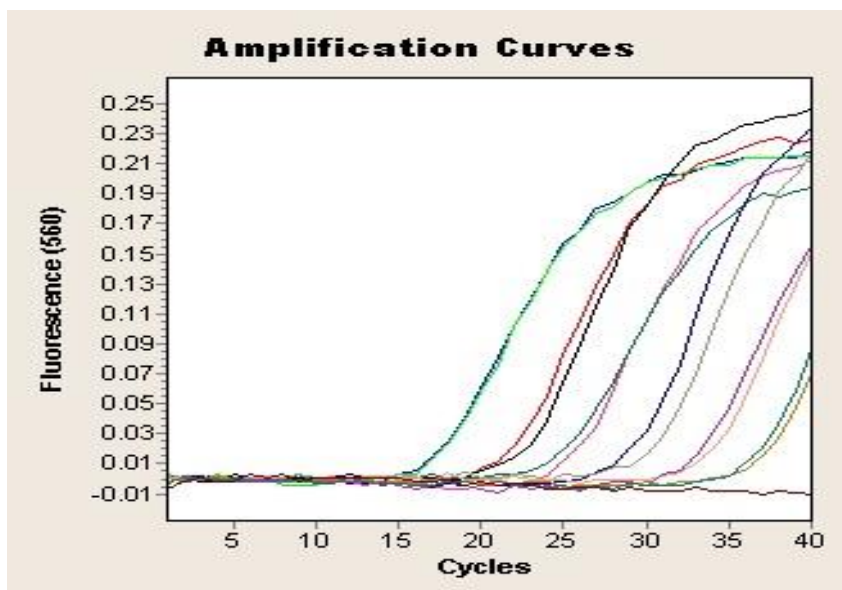
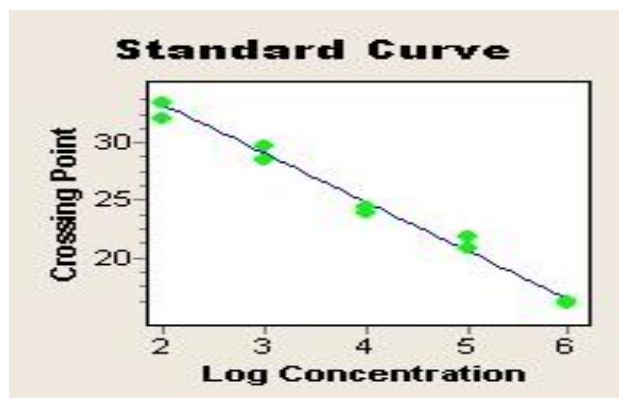


FIGURA 7. Curvas de amplificación de las distintas diluciones seriadas (10^6 - 10^1) de células de *L. anisa* en la detección de la región intergénica de los genes 16S-5S, empleadas para la obtención de una curva patrón de cuantificación.

La curva de amplificación presenta una eficiencia de 1.68, por lo que se verificó su optimización, ya que se establece que la eficiencia debe de estar comprendida entre el 80-110%. Mediante la generación de la curva patrón de cuantificación se obtuvo una sensibilidad de la qPCR de *L. micdadei* para el equipo LightCycler 2.0 (Roche) con un rango dinámico de $10E2$ - $10E5$ GU (Unidades Genómicas) para cuantificar y una detección de hasta 10 GU/ reacción.



Error: 0.0571
Efficiency: 1.802

FIGURA 8. Curva Patrón, eficiencia y error de *L. anisa*.

De igual manera, la curva de amplificación para la qPCR de *L. anisa* presenta una eficiencia de 1.802, por lo que también se verificó su optimización obteniendo una curva patrón de cuantificación con un rango dinámico de $10E2$ - $10E5$ GU para cuantificación y un mismo límite de detección (LOD) de hasta 100 UG/ reacción.

PUESTA A PUNTO DE UNA qPCR MULTIPLE de *L. micdadei* y *L. anisa*

Una vez optimizadas las qPCRs para ambas especies por separado, se realizaron ensayos para optimizar una reacción múltiple en la que se detectaran las dos especies a la vez.

Normalmente, los ensayos de qPCR multiplex en tiempo real requieren un par de iniciadores y una sonda para cada objetivo de la reacción. Al apuntar a la región espaciadora intergénica 23S-5S, que tiene regiones conservadas y variables, pudimos amplificar una sola región diana para cualquier *Legionella* spp. con un único par de iniciadores y detectar mediante el uso de una sonda específica para cada una de las especies, la señal fluorescente emitida por cada sonda cuando se une a su región específica amplificada. Este enfoque minimiza el número de oligonucleótidos en la mezcla de reacción, reduciendo el potencial de reactividad cruzada.

Se estableció que la concentración óptima de la sonda de *L. micdadei* era de 1 μ M por reacción y para la sonda de *L. anisa* de 2 μ M. El volumen más adecuado de MasterMix (TaqMan® Probe MasterMix) fue de 6 μ L por cada reacción. Además, la temperatura óptima de unión de iniciadores se estableció en 60°C y el tiempo de unión en 20 segundos. Las condiciones óptimas finales de reactivos por reacción, así como las condiciones de la qPCR se muestran en la Tabla 11 y 12 (Anexo I).

Una vez optimizadas las condiciones, se obtuvo la curva patrón de qPCRm para la detección y cuantificación simultánea de *L. micdadei* y *L. anisa* que presentó una eficiencia de 1.863 (Fig. 9). Las curvas de amplificación de *L. micdadei* se obtenían seleccionando el filtro de 530 nm (emisión 6-FAM), mientras que las de *L. anisa* se observaban cambiando el filtro de 560 nm (emisión HEX), ambas obtenidas en una misma reacción (Fig. 10 y Fig. 11). No hubo diferencia entre la eficiencia de la reacción qPCR multiplex con respecto a las qPCR individuales. Por tanto, podemos decir que se ha conseguido optimizar una reacción qPCR múltiple para la detección y cuantificación conjunta de las especies *L. micdadei* y *L. anisa*, lo que reduce considerablemente el tiempo de análisis, así como el coste de reactivos y la cantidad de DNA necesaria de la muestra.

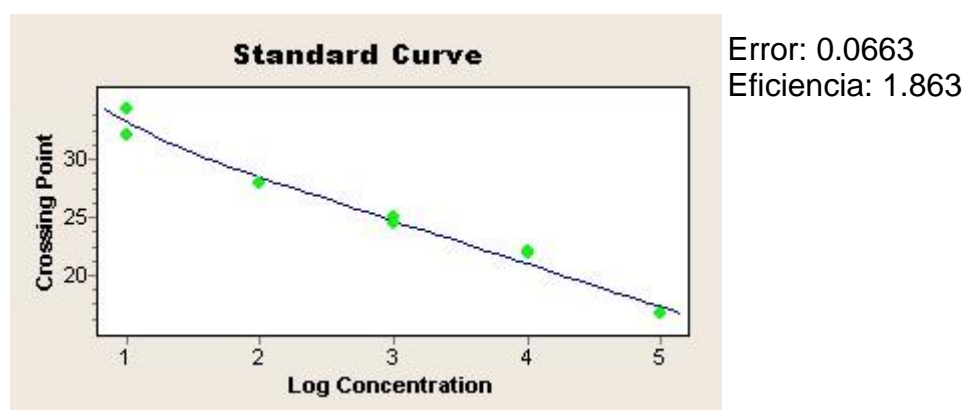


FIGURA 9. Curva standard qPCR Multiplex, eficiencia y error.

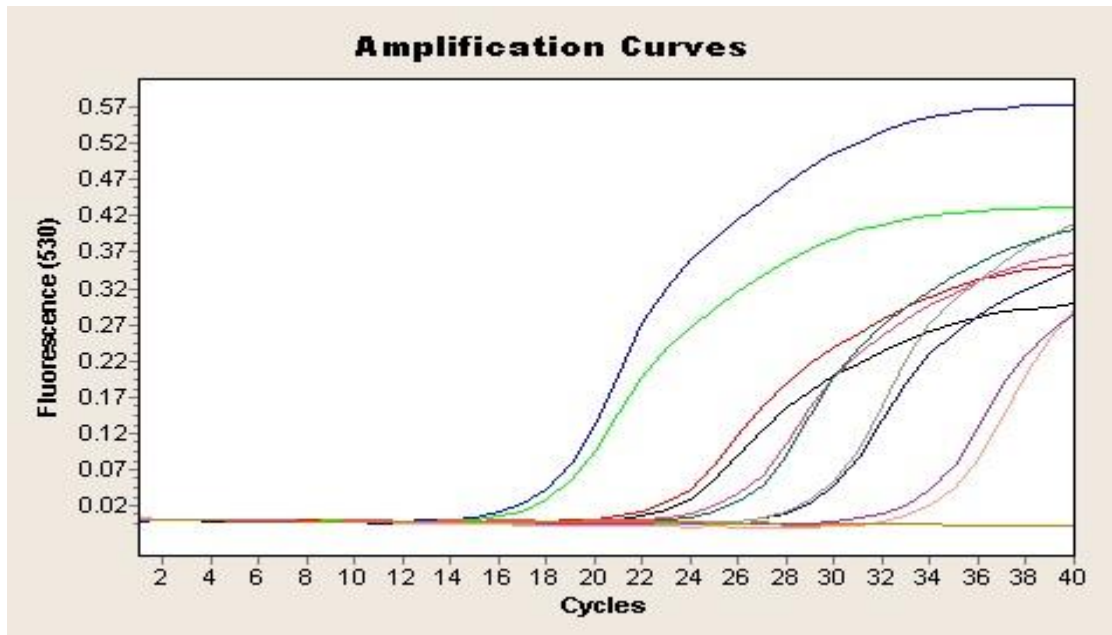


FIGURA 10. Curva patrón Multiplex (Lectura a 530 nm (6-FAM), sonda *L. micdadei*). Diluciones seriadas de 10^5 a 10^1 (izquierda a derecha).

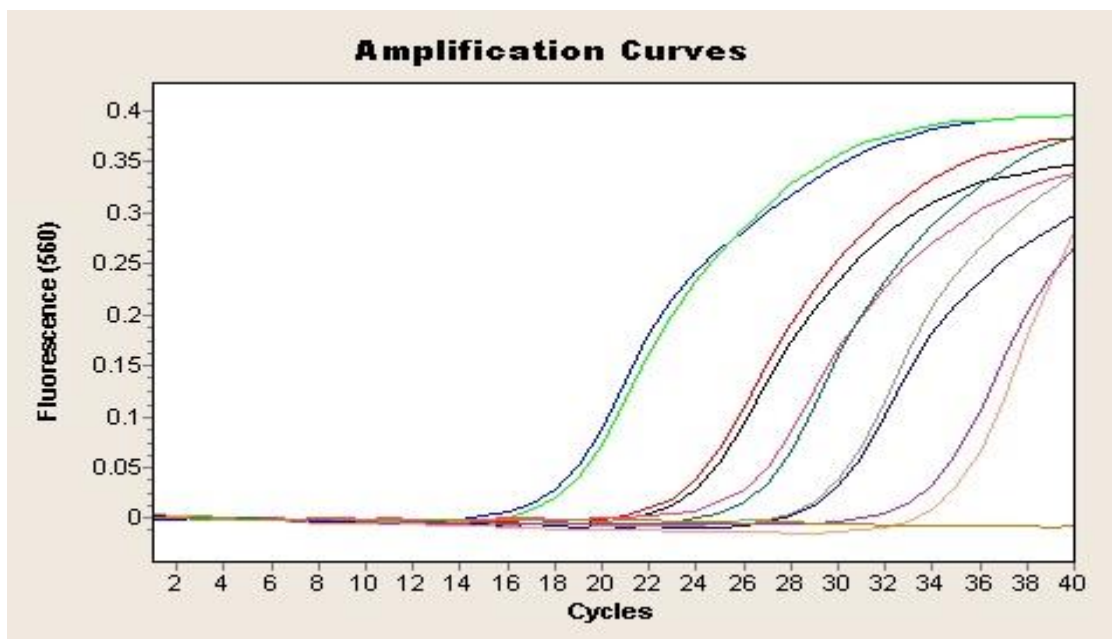


FIGURA 11. Curva patrón Multiplex (Lectura a 560 nm (HEX), sonda *L. anisa*). Diluciones seriadas de 10^5 a 10^1 (izquierda a derecha).

Este ensayo podría modificarse para permitir la detección de otras especies de *Legionella* de interés, mediante el diseño de una sonda de hidrólisis específica de la especie dentro de la región amplificada por los iniciadores específicos de género y reevaluar el rendimiento del ensayo múltiple. Esto permitiría la personalización del ensayo para examinar la presencia de formas viables de las especies más comunes non- pneumophila, presentes en diferentes hábitats y evaluar su riesgo real para la salud humana.

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *L. MICDADEI* Y *L. ANISA* VIABLES MEDIANTE LA APLICACIÓN DEL PROPIDIO MONOAZIDA (PMA)

La puesta a punto de un método combinado de PMA- qPCR múltiplex (PMA-qPCRm) que permitiera únicamente la detección de células viables de *L. micdadei* y *L. anisa*, se realizó partiendo de los dos ensayos enunciados en Materiales y Métodos.

El primer ensayo o ensayo de viabilidad estaba formado por suspensiones viables y no viables de ambas especies. Mediante recuento con SYTO y PI de ambas suspensiones de células vivas (A y C) se determinó una concentración inicial de $7.58E6$ células viables por recuento con tinción con SYTO para *L. anisa* y $9.32E6$ para *L. micdadei*. Mediante el mismo sistema se determinó una concentración inicial de células no viables por recuento con tinción de Yoduro de Propidio de $6.43E2$ células no viables para *L. anisa* y $9.02E2$ células no viables para *L. micdadei*. En el caso de las células tratadas a $85^{\circ}C$, las tinciones con el sistema LIVE/DEAD, mostraron que todas las células estaban dañadas, observándose teñidas con PI. Además, no se observó ninguna colonia en las placas procedentes de la siembra de estas suspensiones. Se realizó una serie de mezclas (tal como se describe en el último apartado de Materiales y Métodos) a partir de estas suspensiones y se comprobó el efecto de la incubación con PMA antes de la qPCR (Tabla 13, Anexo I). Las mezclas de células no viables tratadas con PMA mostraron una gran disminución de amplificación, tanto para *L. micdadei* como para *L. anisa* debido a la penetración del PMA en las células. En el caso de las mezclas de células sin tratamiento con calor (A+C), se observa una pequeña disminución que no llega a un orden de magnitud en la cuantificación de células ya que procedían de un cultivo de 24 horas, además las Ct solo tienen un aumento de aproximadamente 1 ciclo, cuando se trataron previamente con PMA con respecto a la amplificación de las no tratadas. Esto indica que dicha mezcla contenía inicialmente células viables en su mayoría, ya que como se comentó en el apartado de Materiales y Métodos, la suspensión pertenecía a un cultivo en condiciones favorables. Los resultados de la PMA-qPCRm deberían coincidir con los resultados obtenidos mediante epifluorescencia. Sin embargo, los resultados de PMA-qPCRm muestran una disminución de un orden en GU, debido probablemente a la manipulación y al error experimental en el tratamiento de las muestras desde la suspensión inicial hasta el resultado de la qPCRm, el cual incluye varios pasos de centrifugación. Los resultados de cultivo, ya comentados, muestran unos dos órdenes de magnitud menor que los obtenidos por PMA-qPCRm o epifluorescencia, lo que indica que en las suspensiones de células no tratadas (A y C), había células viables cultivables y otra parte de células viables no cultivables (VBNC), siendo ambos tipos detectados con la PMA-qPCR puesta a punto en el presente trabajo.

El segundo ensayo con las células sometidas a estrés contenía igualmente DNA de dos suspensiones viables y no viables de ambas especies. Mediante recuento con SYTO y PI de ambas suspensiones de células vivas (A y C) se determinó una concentración inicial de $1.56E3$ células viables por recuento con tinción con SYTO para *L. anisa* y $1.87E3$ para *L. micdadei*. Mediante el mismo sistema se determinó una concentración inicial de células no viables por recuento con tinción de Yoduro de Propidio de $6.47E6$ células no viables para *L. anisa* y $8.25E6$ células no viables para *L. micdadei*. En el caso de las células

tratadas a 85°C, las tinciones con el sistema LIVE/DEAD, mostraron que todas las células estaban dañadas, observándose teñidas con PI. Tampoco, se observó ninguna colonia en las placas procedentes de la siembra de estas suspensiones. Se realizó una serie de mezclas (al igual que en el primer ensayo) y se comprobó el efecto de la incubación con PMA antes de la qPCR (Tabla 14, Anexo I). Las mezclas de células no viables tratadas con PMA mostraron una disminución de amplificación casi por completo, tanto para *L. micdadei* como para *L. anisa* debido a la penetración del PMA en las células, uniéndose al ADN y evitando así que sea amplificado. En el caso de las mezclas de células sin tratamiento con calor (A+C), se observa una disminución en un orden de magnitud en la cuantificación de células o lo que es lo mismo, un aumento de las Ct de unos 3 ciclos, cuando se trataron previamente con PMA con respecto a la amplificación de las no tratadas. Esto indica que dicha mezcla contenía inicialmente células viables y no viables, ya que como se comentó en el apartado de Materiales y Métodos, la suspensión pertenecía a un cultivo en condiciones desfavorables. Los resultados de la PMA-qPCRm deberían coincidir con los resultados obtenidos mediante epifluorescencia. Sin embargo, los resultados de PMA-qPCRm muestran una disminución de un orden en GU, debido probablemente a la manipulación y al error experimental en el tratamiento de las muestras desde la suspensión inicial hasta el resultado de la qPCRm, el cual incluye varios pasos de centrifugación. Los resultados de cultivo, ya comentados, muestran unos dos órdenes de magnitud menor que los obtenidos por PMA-qPCRm o epifluorescencia, lo que indica que en las suspensiones de células no tratadas (A y C), había células viables cultivables y otra parte de células viables no cultivables (VBNC), siendo ambos tipos detectados con la PMA-qPCR puesta a punto en el presente trabajo.

ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES DE AGUAS MEDIANTE qPCR Y PMA

El análisis mediante qPCRm de las muestras analizadas, resultó negativo tanto con cómo sin tratamiento previo con PMA. Por tanto, no se pudo establecer la viabilidad del método optimizado en muestras reales, ya que las muestras analizadas no contenían células de las especies *L. micdadei* o *L. anisa* o su concentración estaba por debajo del nivel de detección de la técnica. (Fig 12 y 13).

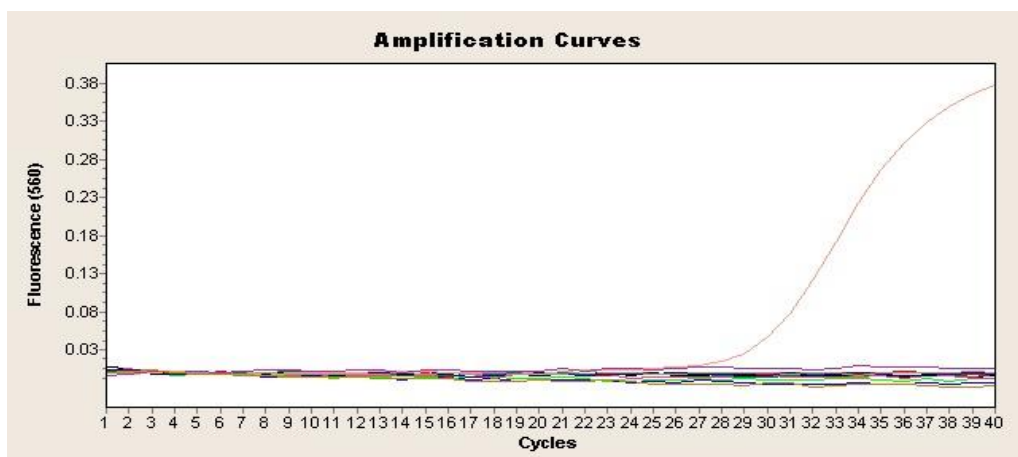


FIGURA 12. Resultado del análisis de muestras de agua con qPCR múltiple

(530 nm, sonda FAM). La amplificación mostrada corresponde al control positivo de *L. micdadei*.

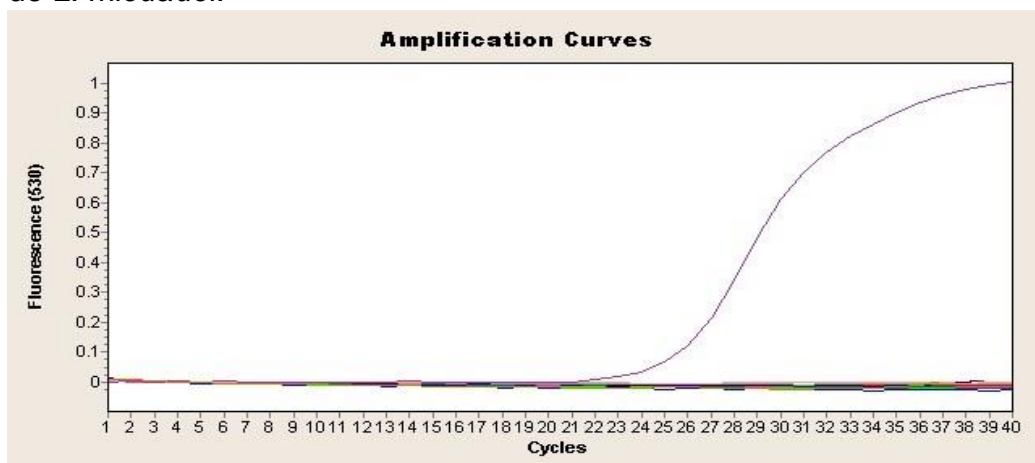


FIGURA 13. Resultado del análisis de muestras de agua con qPCR múltiplex (560 nm, sonda Hex). La amplificación mostrada corresponde al control positivo de *L. anisa*.

La presencia de las especies estudiadas, no es habitual, y menos en este tipo de muestras, pero realizar un estudio con un número importante de muestras y que a su vez procedieran de distintas plantas de aguas podría aumentar el conocimiento de los posibles reservorios de las mismas y si en realidad podrían suponer un peligro de Salud Pública.

• CONCLUSIONES

La detección de especies distintas de *L. pneumophila* es limitado debido a la falta de métodos de diagnóstico disponibles para el análisis de muestras, especialmente para muestras ambientales y/o clínicas. Mediante el desarrollo de este ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección de dos especies no *pneumophilas* clínicamente relevantes de una manera rápida y confiable se abren nuevas puertas para diagnósticos más eficientes. Este ensayo permite la detección y cuantificación de células viables de especies de *Legionella* no *pneumophila* mediante el tratamiento con PMA y el posterior análisis con qPCR gracias al uso de un conjunto de iniciadores conservados junto con dos sondas de hidrólisis marcadas de forma única. Normalmente, los ensayos de qPCR multiplex en tiempo real requieren tres oligonucleótidos (dos iniciadores y una sonda) para cada objetivo de la reacción. Al dirigir los iniciadores a la región espaciadora intergénica 23S-5S, que tiene regiones conservadas y variables, es posible amplificar una sola región diana para cualquier *Legionella* spp. y detectar la señal fluorescente de cada sonda marcada de forma única cuando esta se une a su objetivo específico de especie reduciendo así la reactividad cruzada. Por otra parte, el uso de propidio de monoácido (PMA) en el pretratamiento de las muestras permite mejorar, gracias a su papel intercalante con el ADN de células de membrana dañada, la cuantificación real de las células viables y por tanto infectivas. Este método a su vez podría modificarse para permitir la detección de otras especies de *Legionella* mediante el diseño de diferentes sondas de hidrólisis específicas para las especies objetivo, lo que podría permitir la individualización del ensayo para examinar otras especies de interés.

• BIBLIOGRAFIA

- Barker, J.; Brown, M. R.; Collier, P. J.; Farrel, I.; Gilbert, P. 1992. Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**:2420–2425
- Cross, K. E.; Mercante, J. W.; Benitez, A. J.; Brown, E. W.; Diaz, M. H.; Winchell, J. M. 2016. Simultaneous detection of *Legionella* species and *L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. longbeachae* and *L. micdadei* using conserved primers and multiple probes in a multiplex real-time PCR assay. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, **85**(3): 295-301
- Ditommaso, S.; Ricciardi, E.; Giacomuzzi, M.; Rivera, S. R. A.; Zotti, C. M. 2015. *Legionella* in water samples: how can you interpret the results obtained by quantitative PCR. *Molecular and cellular probes*, **29**(1): 7-12
- Dupuy, M.; Mazoua, S.; Berne, F.; Bodet, C.; Garrec, N.; Herbelin, P.; Wallet, F. 2011. Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water research*, **45**(3): 1087-1094
- Fittipaldi, M.; Nocker, A.; Codony, F. 2012. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of microbiological methods*, **91**(2): 276-289
- Grattard, F.; Ginevra, C.; Riffard, S.; Ros, A.; Jarraud, S.; Etienne, J.; Pozzetto, B. 2006. Analysis of the genetic diversity of *Legionella* by sequencing the 23S-5S ribosomal intergenic spacer region: from phylogeny to direct identification of isolates at the species level from clinical specimens. *Microbes and infection*, **8**(1), 73-83
- Kubota, F.; Murakami, T.; Mogi, K.; Yorifuji, H. 2007. Cadherin-6 is required for zebrafish nephrogenesis during early development. *The International journal of developmental biology*. **51**(2):123-129
- Moreno, C, C. 2002. Evaluación de nuevos métodos de detección, subtipificación y erradicación de *Legionella pneumophila*. Disponible file:///C:/Users/Acer/Downloads/Moreno-Camacho-Carmen%20(1).pdf
- Murder, R. R; Yu, V. L. 2002. Infection due to *Legionella* species other than *L.pneumophila*. *Clinical Infectious Diseases*, **35**(8):990-8
- Nkuipou-Kenfack, E.; Engel, H.; Fakih, S.; Nocker, A. 2013. Improving efficiency of viability-PCR for selective detection of live cells. *Journal of microbiological methods*, **93**(1), 20-24
- Norma UNE-EN ISO 11731. Calidad del agua. Recuento de *Legionella*. (ISO 11731:2017)
- Panicker, G.; Vickery, M. C.; Bej, A. K. 2004. Multiplex PCR detection of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in shellfish. *Canadian journal of microbiology*, **50**(11): 911-922
- Peralta, R, M. L.; Ayala Oviedo, J. D. J. 2009. Amibas de vida libre en seres humanos. *Salud Uninorte*, 280-292
- Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE). Informe de la situación de la legionelosis en España en 2015. Resultados de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
- Salihah, N. T.; Hossain, M. M.; Ahmed, M. U. 2018. A fast and sensitive real-time PCR assay to detect *Legionella pneumophila* with the ZEN™ double-quenched probe. *Scientia Bruneiana*, **17**(1)
- Valster, R. M.; Wullings, B. A.; Van den Berg, R.; Van der Kooij, D. 2011. Relationships between free-living protozoa, cultivable *Legionella* spp., and water quality characteristics in three drinking water supplies in the Caribbean. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(20): 7321-7328
- Wiley, H.; Taylor, M. 2016. *Legionella* detection by culture and qPCR: comparing apples and oranges. *Critical reviews in microbiology*, **42**(1): 65-74
- Wingender, J.; Flemming, H. C. 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International journal of hygiene and environmental health*, **214**(6), 417-423
- Yamamoto, H.; Hashimoto, Y.; Ezaki, T. 1993. Comparison of detection methods for *Legionella* species in environmental water by colony isolation, fluorescent antibody staining, and polymerase chain reaction. *Microbiology and immunology*, **37**(8): 617-622

- Yáñez, M. A.; Nocker, A.; Soria-Soria, E.; Múrtula, R.; Martínez, L.; Catalán, V. 2011. Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *Journal of microbiological methods*, **85**(2): 124-130
- Zhou, G.; Wen, S.; Liu, Y.; Li, R.; Zhong, X.; Feng, L.; Cao, B. 2011. Development of a DNA microarray for detection and identification of *Legionella pneumophila* and ten other pathogens in drinking water. *International journal of food microbiology*, **145**(1): 293-300
- Azizyan, M.R.; Hassen, W.M.; Sharma, H.; Shirzaei Sani, E.; Annabi, N.; Frost, E.H.; Dubowski, J.J. 2020. Sodium dodecyl sulfate decorated *Legionella pneumophila* for enhanced detection with a GaAs/AlGaAs nanoheterostructure biosensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **304**:127007

ANEXO I

TABLA 1. Cepas de *Legionella* spp. utilizadas.

Organismo	Identificación de cepa	Fuente
<i>L. pneumophila</i>	ATCC 33152	Colección
<i>L. pneumophila</i>	CCUG 44898	Colección
<i>L. pneumophila</i>	1934	Ambiental
<i>L. pneumophila</i>	1936	Ambiental
<i>L. parisiensis</i>	CCM 58	Colección
<i>L. anisa</i>	CECT 8177	Colección
<i>L. bozzemaniai</i>	CECT 7276	Colección
<i>L. micdadei</i>	CECT 7770	Colección
<i>L. dumoffi</i>	CECT 7349	Colección
<i>L. longbeacheae</i>	CCUG 46623	Colección

TABLA 2. Secuencias de iniciadores y sondas para *Legionella* spp., *L. micdadei* y *L. anisa*.

Nombre iniciador/sonda	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Nmol
Pan- <i>Legionella</i> F	GTA CTA ATT GGC TGA TTG TCT TG	59	15.3
Pan- <i>Legionella</i> R	TTC ACT TCT GAG TTC GAG ATG G	60	14.4
<i>L. micdadei</i> (sonda)	6-Fam-AGC TGA TTG GTT AAT AGC CCA ATC GG-BHQ-1	66	6.6
<i>L. anisa</i> (sonda)	Hex-CTC AAC CTA CGC AGA ACT ACT TGA GG-BHQ-1	68	5.3

F: forward, R: reverse, BHQ: Black Hole Quencher.

TABLA 3. Condiciones q-PCR (Termociclador LightCycler 2.0 Roche) para detección de *Legionella* spp.

Modo de análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo (mm:ss)	Modo de adquisición
Preincubación					
None	1	-	95	10:00	None
Amplificación					
Cuantificación	45	Desnaturalización	95	00:10	None
		Alineamiento	57 - 60	00:05	None
		Extensión	72	00:03 - 00:05	Simple
Curva de fusión					
Curvas de fusión	1	Desnaturalización	95	00:00	None
		Alineamiento	65	00:15	None
		Fusión	95 (0.1°C/s)	00:00	Continuo
Enfriamiento					
None	1	-	40	00:30	None

TABLA 4. Condiciones qPCR (Termociclador LightCycler 2.0 Roche) para detección y cuantificación de *L. anisa* y *L. micdadei*.

Nombre Programa	Ciclos	Tipo análisis	Temperatura (°C)	Tiempo	Rampa (°C/s)	Tª Modo Adquisición
Desnaturalización	1	Ninguno	95	00:10:00	20	Ninguno
Amplificación	40	Cuantificación	95	00:00:10	20	Ninguno
			57 - 60	00:00:05-20	20	Ninguno
			72	00:00:01	20	Sencilla
Enfriamiento	1	Ninguno	40	00:00:30	20	Ninguno

TABLA 5. Pesos moleculares del genoma de *L.micdadei* y *L.anisa*

Organismo	Código GenBank	Número copias/g en	Pares de bases
<i>L. micdadei</i>	CP020615 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP020615	3	3250164
<i>L. anisa</i>	CP029563 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP029563	3	4164783

TABLA 6. Condiciones óptimas de qPCR para el análisis para *Legionella* spp. (Termociclador LightCycler 2.0 Roche).

Modo de análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura (°C)	Tiempo (mm:ss)	Modo de adquisición
Preincubación					
None	1	-	95	10:00	None
Amplificación					
Cuantificación	40	Desnaturalización	95	00:10	None
		Alineamiento	60	00:05	None
		Extensión	72	00:09	Single
Curva de fusión					
Curvas de fusión	1	Desnaturalización	95	00:00	None
		Alineamiento	65	00:15	None
		Fusión	95 (0.1°C/s)	00:00	Continuo
Enfriamiento					
None	1	-	40	00:30	None

TABLA 7. Concentraciones óptimas qPCR *Legionella* spp.

Nombre	Concentración	Volumen por muestra (µL)
Pan- <i>Legionella</i> F	3 µM	1
Pan- <i>Legionella</i> R	3 µM	1

Agua	-	12.4
MgCl ₂	3 mM	1.6
Master Mix SYBR Green	10x	2
ADN Muestra	-	2
Volumen final	-	20

TABLA 8. Concentraciones qPCR para *L. micdadei*.

Nombre	Concentración	Volumen por muestra (µL)
Pan- <i>Legionella</i> F	3 µM	1
Pan- <i>Legionella</i> R	3 µM	1
Agua	-	8
Sonda <i>L. micdadei</i>	1 µM	2
Master Mix TaqMan	5x	4
ADN Muestra <i>L. micdadei</i>	-	4
Volumen final	-	20

TABLA 9. Concentraciones qPCR *L. anisa*.

Nombre	Concentración	Volumen por muestra (µL)
Pan- <i>Legionella</i> F	3 µM	1
Pan- <i>Legionella</i> R	3 µM	1
Agua	-	9
Sonda <i>L. anisa</i>	1 µM	1
Master Mix TaqMan	5x	4
ADN Muestra <i>L. anisa</i>	-	4
	-	20

TABLA 10. Condiciones de qPCR para el análisis de *L. anisa* y *L. micdadei*. (Termociclador LightCycler 2.0 Roche).

Programa	Ciclos	Tipo análisis	Temperatura (°C)	Tiempo	Rampa (°C/s)	Tª Modo Adquisición
Desnaturalización	1	Ninguno	95	00:10:00	20	Ninguno
Amplificación	40	Cuantificación	95	00:00:10	20	Ninguno
			60	00:00:20	20	Ninguno

			72	00:00:01	20	Sencilla
Enfriamiento	1	Ninguno	40	00:00:30	20	Ninguno

TABLA 11. Condiciones Termociclador LightCycler 2.0 Roche

Nombre Programa	Ciclos	Tipo análisis	Temperatura (°C)	Tiempo	Rampa (°C/s)	Tª Modo Adquisición
Desnaturalización	1	Ninguno	95	00:10:00	20	Ninguno
Amplificación	40	Cuantificación	95	00:00:10	20	Ninguno
			60	00:00:20	20	Ninguno
			72	00:00:01	20	Sencilla
Enfriamiento	1	Ninguno	40	00:00:30	20	Ninguno

TABLA 12. Concentraciones qPCR Multiplex.

Nombre	Concentración	Volumen por muestra (µL)
Pan-<i>Legionella</i> F	3 µM	1
Pan-<i>Legionella</i> R	3 µM	1
Sonda <i>L. micdadei</i>	2 µM	1
Sonda <i>L. anisa</i>	1 µM	1
Agua	-	1
Master Mix TaqMan	5x	7
ADN Muestra		
<i>L. micdadei</i>	-	4
<i>L. anisa</i>	-	4
Volumen final	-	20

TABLA 13. Resultados del tratamiento de las suspensiones, con y sin PMA mediante qPCRm de células procedentes de cultivo favorable (24 h/ 37°C).

	A + C Multiplex qPCR				B + D Multiplex qPCR			
	PMA		no PMA		PMA		no PMA	
	A	C	A	C	B	D	B	D
CP (qPCR)	20.33	22.10	21.87	21.50	32.05	33.25	21.01	21.33
EG (qPCR)	5.71E3	4.28E3	5.07E3	4.86E3	1.55E1	6.87E0	4.89E3	3.58E3
EG suspensión	4.53E5	6.35E5	5.08E6	7.31E6	3.88E2	5.62E2	4.35E6	3.95E6

A: suspensión de células vivas de *L. anisa*, **B:** suspensión de células muertas de *L. anisa*, **C:** suspensión de células vivas de *L. micdadei* y **D:** suspensión de células muertas de *L. micdadei*,

TABLA 14. Resultados del tratamiento de las suspensiones, con y sin PMA mediante qPCRm de células procedentes de cultivo desfavorable. (7 días/ 37°C).

	A + C Multiplex qPCR				B + D Multiplex qPCR			
	PMA		no PMA		PMA		No PMA	
	A	C	A	C	B	D	B	D
CP (qPCR)	28.97	26.98	25.14	23.60	>35.00	>35.00	>35.00	>35.00
EG (qPCR)	8.55E2	4.90E2	9.05E3	4.02E3	>3.22 E1	>1.13 E1	>6.61E 1	>4.22 E1
EG suspensión	3.21E5	1.84E5	6.47E10 6	8.25E10 6	-	-	-	-

A: suspensión de células vivas de *L. anisa*, **B:** suspensión de células muertas de *L. anisa*, **C:** suspensión de células vivas de *L. micdadei* y **D:** suspensión de células muertas de *L. micdadei*,

ANEXO II

Alineamientos *L. anisa* y *L. micdadei*

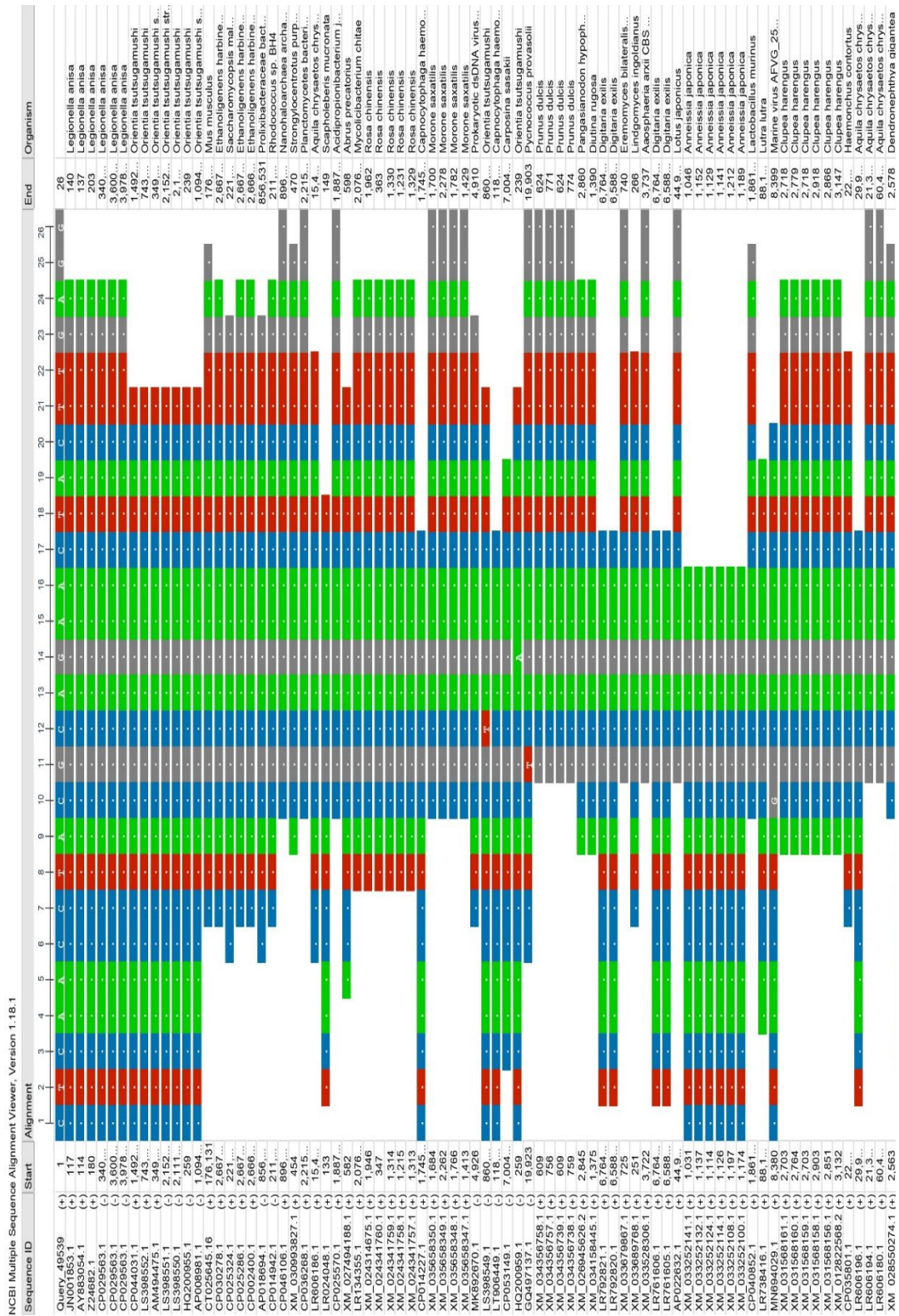


FIGURA 14. Alineamientos específicos para la sonda de *L. anisa*.

NCBI Multiple Sequence Alignment Viewer, Version 1.18.1

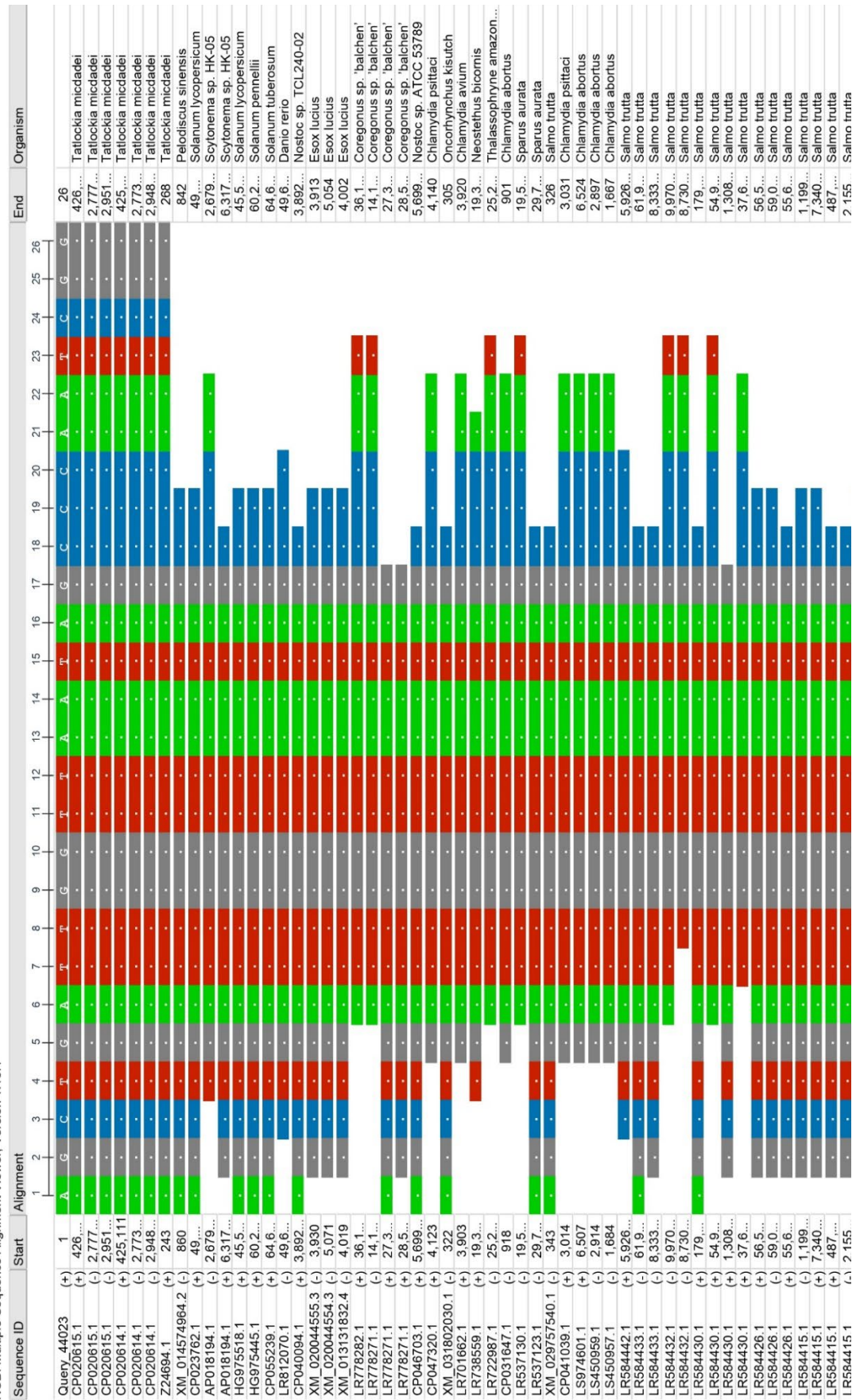


FIGURA 15. Alineamientos específicos para la sonda de *L. micdadei*.