

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**



**Análisis de la competencia entre las cepas comunes de
Legionella pneumophila ST1, ST23 Y ST587**

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Alumno

Itziar Ainhoa Sánchez López

Tutor

María Antonia Ferrús Pérez

Director de Empresa

Fernando González Candelas

Curso Académico

2013 – 2014

Valencia, septiembre de 2014.

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**



**Análisis de la competencia entre las cepas comunes de
Legionella pneumophila ST1, ST23 Y ST587**

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Alumno

Itziar Ainhoa Sánchez López

Tutor

María Antonia Ferrús Pérez

Director de Empresa

Fernando González Candelas

Curso Académico

2013 – 2014

Valencia, septiembre de 2014.

Autor: Alumna Itizar Ainhoa Sánchez López.

Tutor: Prof. Dña. Maria Antonia Ferrús Pérez.

Director de empresa: Prof. D. Fernando González Candela.

Valencia, Septiembre de 2014

Título de TFG: Análisis de la competencia entre las cepas comunes de *Legionella pneumophila* ST1, ST23 y ST578

Resumen:

L. pneumophila es una bacteria gram-positiva que vive en ambientes húmedos y se transmite por el aire. Se trata de una bacteria patógena para el ser humano. Existe una gran variedad de cepas, siendo la más frecuente la ST1.

Analizando aislados tanto clínicos como ambientales mediante técnicas de secuenciación del ADN se han encontrado diferencias en cuanto a la presencia mayoritaria de varias cepas. En concreto, la ST1 se localiza, principalmente, en las muestras ambientales, mientras que la ST23 y ST578 en muestras clínicas de Calpe y Alcoy, respectivamente, lo que complica la identificación de las fuentes ambientales de los brotes de legionelosis. Estos resultados sugieren que existe un tipo de selección que se origina durante el cultivo de los aislados en el laboratorio.

El trabajo presentado consiste en realizar un ensayo sobre la eficacia relativa ("*relative fitness*") de estas tres cepas en competencia, para determinar si existen diferencias entre ellas entre las frecuencias iniciales y las detectadas tras someterlas a condiciones de cultivo *in vitro* estándar.

Los resultados preliminares dejan entrever una posible competencia entre las distintas cepas, siendo la ST1 la que predomina sobre las otras dos y la ST23 predomina a su vez sobre la ST578. Esto explicaría la hipótesis de partida sobre las conclusiones extraídas de los aislados de Calpe y Alcoy. Sin embargo, todavía queda un largo trabajo de comprobación y de extraer más resultados para confirmar la hipótesis.

Palabras claves: *Legionella pneumophila*, eficacia relativa, competencia, cuantificación relativa, qPCR.

Abstract:

L. pneumophila is a gram-positive bacterium that lives in moist environments and is transmitted through the air. It is a pathogenic bacterium to humans. There are a variety of strains, being ST1 the most frequent one.

From the analysis of clinical isolates and environmental by DNA sequencing techniques, we found differences in the abundance of the different strains. Specifically, the ST1 is mainly found in environmental samples, while ST23 and ST578 prevail in clinical samples from Calpe and Alcoy, respectively. This complicates the identification of the environmental sources of legionellosis outbreaks. These results suggest that there is a certain type of selection that originates during cultivation of the isolates in the laboratory.

The goal of this work is to conduct a trial on the relative fitness of these three strains in competition in order to determine the possible existence of differences between their initial and final frequencies after growth in standard *in vitro* laboratory conditions.

Our preliminary results point to a possible competition between these strains, with the ST1 outcompeting the other two and ST23 also outcompeting ST578. This would explain the assumptions made about the conclusions of isolates from Calpe and Alcoy. However, there is still a long process of testing and obtaining more results to confirm the hypothesis.

Key words: *Legionella pneumophila*, relative fitness, relative quantification, qPCR.

Agradecimientos

En estas líneas quisieras plasmar mi más sincero agradecimiento a:

.. mi madre por todo el apoyo que me ofrece día tras día, ya que sin él hoy no estaría aquí. Siempre ha sido mi ejemplo a seguir y estoy muy orgullosa de ella por todo su esfuerzo. A lo largo de mi vida ha sido mi principal pilar, me ha brindado todo su cariño, dedicación, riqueza, etc. por lo mismo espero no defraudarla ;) . Desde siempre hemos sido ella y yo tanto para disfrutar de los momentos buenos como superar los no tan buenos. Sabes lo mucho que te quiero, no?

.. Fernando González por confiar en mi desde el primer contacto que tuvimos, de eso ya hace más de un año. Gracias por toda la paciencia. Ha sido una gran oportunidad poder participar en este proyecto, en el cual he aprendido.

.. Leo. Me has ayudado en todo desde el principio tanto dentro del laboratorio como fuera. Decirte que me has enseñado un montón de cosas y de trucos del laboratorio. Pero sobre todo gracias a tu forma de ser y acogerme, haciéndome sentir como una más de la sala I. Gracias a ellos también.

.. Concha, por su gran ayuda a la hora de preparar el medio de cultivo.

.. María Antonia, mi tutora. Gracias por tu atención y ayuda, sobre todo en estos últimos días.

.. ellas, Lara y Celia. Gracias por dejarme ser vuestra amigas y por darme apoyo siempre. Este último año ha sido un gran año, pero los que vienen serán mejores. Sé que nuestra amistad a pesar de los años y las decisiones que tomemos perdurará.

.. mi familia gaditana. Vosotros sois mi gran familia, sois mi rayito de luz.

.. mi otra familia, la colombiana. Estáis lejos, pero siempre os tengo presente. Sois mis raíces y siempre disfruto de vuestra compañía y amor.

.. mis amigas amigas de la uni, Raquel, Isa y Sandra. Tan solo cuatro años han sido necesarios para que fuésemos verdaderas amigas. No olvidar a Alba, Cris, Alejandro y David con quienes he compartido momentos inolvidables.

En definitiva, a todas las personas con las que me he cruzado en el camino porque de un modo u otro han hecho posible el que me encuentre aquí escribiendo estas palabras. También agradecer a quien lea este trabajo, de antemano.

Ainhoa S.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Legionella pneumophila</i>	1
1.1.1. <i>Historia y características</i>	1
1.1.2. <i>Ecosistema</i>	2
1.1.3. <i>Nutrición</i>	2
1.1.4. <i>Replicación</i>	3
1.1.5. <i>Genómica</i>	5
1.2. <i>Legionelosis</i>	7
1.3. <i>Evolución y selección</i>	9
1.4. <i>Tipado genético y análisis de brotes</i>	9
2. OBJETIVO	11
3. MATERIAL Y METODOS	12
3.1. <i>Microorganismo</i>	12
3.2. <i>Medio de cultivo</i>	12
3.3. <i>Caracterización del crecimiento microbiano mediante densidad óptica</i>	13
3.4. <i>Eficacia</i>	14
3.5. <i>qPCR</i>	14
3.5.1. <i>Diseño de los cebadores y sondas</i>	15
3.5.2. <i>Recta de calibrado</i>	18
3.5.3. <i>Cuantificación de la competencia</i>	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1. <i>Curva de crecimiento para la aproximación de la dinámica de crecimiento</i>	20
4.2. <i>Funcionalidad de los cebadores</i>	22
4.3. <i>Cuantificación de la OD durante el ensayo de la competencia</i>	23
4.4. <i>Análisis de la competencia</i>	26
5. CONCLUSIÓN	34
6. REFERENCIAS	36
8. ANEXOS	41
8.1. <i>Script Python para obtener secuencias únicas de cada ST</i>	41
8.2. <i>Lista de proteínas única</i>	42
8.3. <i>Peso molecular</i>	44
8.4. <i>Curvas de crecimiento</i>	45
8.5. <i>Valores de la cuantificación absoluta</i>	54
8.6. <i>Cuantificación relativa</i>	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Morfología de <i>L. pneumophila</i> a 37 °C en cultivo.....	1
Figura 1.2. Curva de crecimiento bifásico.....	3
Figura 1.3. Ciclo de vida <i>L. pneumophila</i> en protozoo y macrófago humano.	5
Figura 1.4. Incidencia de Legionelosis por 100,000 habitantes (España).	8
Figura 3.1. Monitorización de la qPCR con sonda de hidrólisis.	15
Figura 3.2. Curva de amplificación durante la qPCR.	19
Figura 3.3. Obtención de la recta de calibrado.	19
Figura 4.1. Crecimiento de la ST1.....	20
Figura 4.2. Crecimiento de la ST23.....	21
Figura 4.3. Crecimiento de la ST578.....	21
Figura 4.4. Funcionalidad de los cebadores.....	22
Figura 4.5. PCR a distintas temperaturas y uso de cebadores cruzados.....	23
Figura 4.6. Crecimiento ST1.....	24
Figura 4.7. Crecimiento ST23.....	24
Figura 4.8. Crecimiento ST578.	25
Figura 4.9. Crecimiento de las tres ST con la misma concentración de partida (1:1:1).....	25
Figura 4.10. Recta de calibrado utilizada para la cuantificación.	26
Figura 4.11. qPcr ST1-ST578 (90:10).	27
Figura 4.12. qPCR ST1-ST578 (70:30).	27
Figura 4.13. qPCR ST1-ST578 (50:50).	28
Figura 4.14. qPCR ST1-ST578 (30:70).	28
Figura 4.15. Recta extrapolación para la cuantificación de la ST1.	29
Figura 4.16. Recta extrapolación para la cuantificación de la ST23.....	29
Figura 4.17. Recta extrapolación para la cuantificación de la ST578.....	30
Figura 4.18. Progreso de la cantidad de ADN de la ST23.....	31
Figura 4.19. Progreso de la cantidad de ADN de la ST578.....	31
Figura 8.1. Script python para tomar las proteínas únicas.....	41
Figura 8.2. Marcador de peso molecular.	44
Figura 8.3. Curva de crecimiento de los tres competidores (1:4:4).	45
Figura 8.4. Curva de crecimiento de los tres competidores (4:1:4).	45
Figura 8.5. Curva de crecimiento de los tres competidores (4:1:4).	46
Figura 8.6. Curva de crecimiento ST1-ST23 (90:10).....	46
Figura 8.7. Curva de crecimiento ST1-ST23 (70:30).....	47
Figura 8.8. Curva de crecimiento ST1-ST23 (50:50).	47

Figura 8.9. Curva de crecimiento ST1-ST23 (30:70).	48
Figura 8.10. Curva de crecimiento ST1-ST23 (10:90).	48
Figura 8.11. Curva de crecimiento ST1-ST578 (90:10).	49
Figura 8.12. Curva de crecimiento ST1-ST578 (70:30).	49
Figura 8.13. Curva de crecimiento ST1-ST578 (50:50).	50
Figura 8.14. Curva de crecimiento ST1-ST578 (30:70).	50
Figura 8.15. Curva de crecimiento ST1-ST578 (10:90).	51
Figura 8.16. Curva de crecimiento ST23-ST578 (90:10).	51
Figura 8.17. Curva de crecimiento ST23-ST578 (70:30).	52
Figura 8.18. Curva de crecimiento ST23-ST578 (50:50).	52
Figura 8.19. Curva de crecimiento ST23-ST578 (30:70).	53
Figura 8.20. Curva de crecimiento ST23-ST578 (10:90).	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Cepas de <i>L. pneumophila</i> secuenciadas.	5
Tabla 1.2. Principales rasgos del genoma de 5 cepas de <i>L. pneumophila</i>	6
Tabla 3.1. Descripción de las cepas utilizadas para estudiar la competencia en <i>L. pneumophila</i>	12
Tabla 3.2. Ficheros de salida de Prokka.....	16
Tabla 3.3. Cebadores empleados.	17
Tabla 3.4. Sondas empleadas.	18
Tabla 4.1. Datos de la recta de calibrado.	26
Tabla 4.2. Cuantificación relativa ST23 - ST578.....	32
Tabla 4.3. Cuantificación relativa de las tres ST.	33
Tabla 8.1. Lista de proteínas únicas. (Las marcadas en rojo son las utilizadas).	42
Tabla 8.2. Cuantificación tres competidores con filtro de HEX (ST1).	54
Tabla 8.3. Cuantificación tres competidores con filtro de FAM (ST23).....	55
Tabla 8.4. Cuantificación tres competidores con filtro de Cy5 (ST578).	56
Tabla 8.5. Cuantificación ST1-ST23 con filtro HEX (ST1).....	57
Tabla 8.6. Cuantificación ST1-ST23 con filtro FAM (ST23).	58
Tabla 8.7. Cuantificación ST1-ST578 con filtro HEX (ST1).	59
Tabla 8.8. Cuantificación ST1-ST578 con filtro Cy5 (ST578).	60
Tabla 8.9. Cuantificación ST23-ST578 con filtro FAM (ST23).....	61
Tabla 8.10. Cuantificación ST23-ST578 con filtro Cy5 (ST578).....	62
Tabla 8.11. Cuantificación relativa de los tres competidores	63
Tabla 8.12. Cuantificación relativa ST1-ST23.....	64
Tabla 8.13. Cuantificación relativa ST1-ST578.....	64
Tabla 8.14. Cuantificación relativa ST23-ST578	64

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y NOMENCLATURAS

3'	Extremo 3 prima
5'	Extremo 5 prima
ACES	[Ácido N-(2-acetamida)-2-aminoetano sulfúrico]
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BAS	Aspirado broncoalveolar
BCYE	Medio tamponado con extracto de levadura y carbon activo, del inglés <i>Buffered Charcoal Yeast Extract</i>
BMPA	Medio selectivo con Cefamandol, Polimixina B y Anisomicina.
Cp	<i>Crossing point</i>
Cys	Cisteína
EWGLI	Grupo de Trabajo Europeo de Infecciones de Legionella
GC o G+C	Guanina y Citosina
GVPC	Medio selectivo con Glicina, Vancomicina, Polimixina B y Cicloheximida
H2O	Agua
H2SO4	Ácido sulfúrico
ID	Código de identificación
KOH	Hidróxido de potasio
L.	<i>Legionella</i>
LCV	Vacuola contenedora de Legionella
MIF	Forma madura infecciosa
MWY	Medio selectivo con Glicina, Vancomicina, Polimixina B y Anisomicina
Mb	Megabases
OD	Densidad óptica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en Gel de Campo Pulsado, del inglés <i>Pulsed Field Gel electrophoresis</i>
SBT	<i>Sequence-Based Typing</i>
SPF	Forma de la fase estacionaria
ST	<i>Sequence Type</i>
UFC	Unidad formadora de colonia
VC	Viable cultivable
VNC	Viable no cultivable
mL	Mililitros
ng	Nanogramos
pb	Pares de base
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
uL	Microlitros
°C	Grados Celsius

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Legionella pneumophila*

1.1.1. Historia y características

El género *Legionella* pertenece a la familia de bacterias Gram negativas conocido como *Legionellaceae*. Han sido descritas más de 50 especies diferentes (Newton et al. 2010) como por ejemplo *Legionella longbeache*, *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* y *L. pneumophila*; al menos 24 especies son patógenas para el ser humano, siendo *L. pneumophila* la que causa más infecciones. A su vez, se pueden encontrar distintas cepas dentro de esta especie que, tradicionalmente, se han agrupado en distintos serogrupos; hasta el momento se han descrito 15 en *L. pneumophila*. Se trata de una bacteria con forma de bacilo (Figura 1.1) cuyas dimensiones oscilan entre 1.5 – 5 mm de ancho. Puede presentar uno o más flagelos.

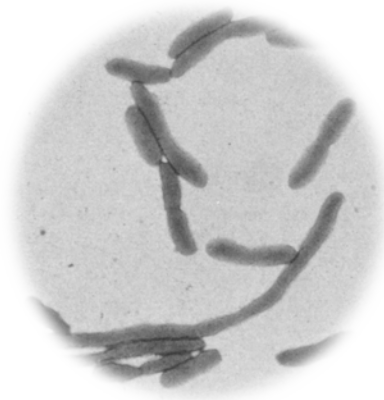


Figura 1.1. Morfología de *L. pneumophila* a 37 °C en cultivo (Mauchline et al. 1992).

Este género fue descrito por primera vez en 1976, en Filadelfia (Estados Unidos), tras un brote epidémico que ocasionó 182 casos, incluyendo 29 fallecidos (Fraser et al. 1977). La enfermedad producida por esta bacteria se denominó Legionelosis o enfermedad del Legionario, dado que la mayoría de las víctimas de ese brote eran miembros de la Legión extranjera reunidos con ocasión de una convención. En este caso la especie responsable fue *L. pneumophila*, especie que está involucrada en más del 80% de los casos a nivel mundial (Muder and Yu 2002). Sin embargo, en Australia y Nueva Zelanda la especie patogénica predominante es *L. longbeache* con un 30% de los casos allí registrados (Yu et al. 2002). Esta bacteria también puede producir

una forma más leve de neumonía, con síntomas parecidos a los de un resfriado y sin carácter mortal, que se conoce como fiebre de Pontiac.

1.1.2. Ecosistema

L. pneumophila es una bacteria mundialmente distribuida y ubicua, tanto en medios naturales como antrópicos, donde predomine la humedad y una temperatura entre 25 °C y 42 °C, siendo 35 °C su temperatura óptima de crecimiento (Richards et al. 2013). En el caso de aguas de ríos y lagos, *Legionella*, por lo general, se asocia a amebas y protozoos, en los que su crecimiento se ve favorecido, ya que los microorganismos proporcionan nutrientes necesarios para su desarrollo. Especialmente en el caso de los protozoos, *Legionella* tiene una gran capacidad para multiplicarse en el interior de amebas incluida en biopelículas microbianas (Rogers et al. 1994). Desde estas fuentes naturales es capaz de colonizar sistemas de abastecimiento de agua de las ciudades, pasando entonces a dispositivos con aguas estancadas en los que proliferan los *biofilms*, como las torres de refrigeración, desde los que puede dispersarse en el ambiente a través de los aerosoles generados. Además, la presencia de limos, sedimentos, desechos de corrosión, etc., favorece la persistencia de la bacteria en el medio (RED NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2011).

1.1.3. Nutrición

Muchos estudios han destacado la importancia del hierro para la replicación de la bacteria tanto *in vivo* como *in vitro* (James et al. 1995; Reeves et al. 1981). Recientemente, se ha descubierto que la bacteria secreta una molécula transportadora de hierro durante una etapa del crecimiento cuando hay limitaciones de este elemento (Liles, Scheel, and Cianciotto 2000). También es imprescindible la presencia del aminoácido cisteína, ya que constituye una fuente de carbono y de energía (Richards et al. 2013). Se trata de un microorganismo auxótrofo para la cisteína, arginina, isoleucina, leucina, metionina, valina y treonina.

El medio de cultivo por excelencia para *Legionella* es el BCYE (medio tamponado con extracto de levadura y carbón activo). Son muchos los estudios donde se han comparado distintos medios para el aislamiento de la bacteria (Edelstein 1982). Por ejemplo, si se suplementa el medio BCYE con antibióticos; añadiendo cefamandol, polimixina B y anisomicina, se obtiene el

medio BMPA. También están el GVPC, que contiene glicina, vancomicina, polimixina B y cicloheximida, y el MWY, que contiene glicina, vancomicina, polimixina B y anisomicina (Descours et al. 2014). Hay que tener presente que se ha visto que la presencia de glicina y cefamandol en el medio puede inhibir el crecimiento de otras especies de *Legionella* diferente a *L. pneumophila* (Lee et al. 1993).

1.1.4. Replicación

El crecimiento de *L. pneumophila* consta de un ciclo replicativo bifásico (Figura 1.2) (Richards et al. 2013). Este tipo de crecimiento se caracteriza por presentar dos etapas exponenciales separadas por una meseta, debido al cambio de la fuente de carbono. Este cambio se produce porque el sustrato principal se agota y comienza a utilizar un sustrato diferente. Mientras se adapta al nuevo sustrato, no hay un crecimiento exponencial. Cuando las condiciones nutritivas son las adecuadas, la bacteria se encuentra en fase replicativa y expresa pocos genes asociados a la virulencia. No obstante, cuando las condiciones son limitantes entra en fase transmisiva y comienza a adquirir movilidad y resistencia antes diversos estreses.

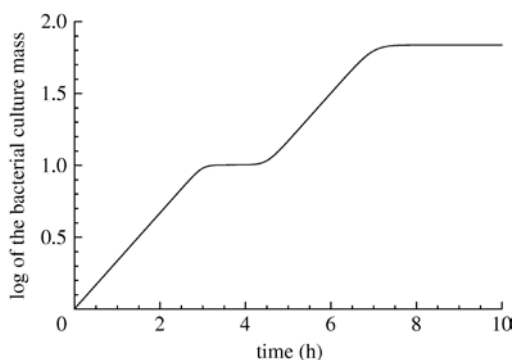


Figura 1.2. Curva de crecimiento bifásico.

L. pneumophila es una bacteria difícil de cultivar *in vitro* empleando la metodología clásica. El éxito reportado cubre un amplio rango que va desde menos del 10% hasta el 80% (Murdoch 2003). Por tanto, en algunos casos se recurre al co-cultivo con amebas o protozoos ciliados (García et al. 2007; Steinert et al. 1997), ya que son hospedadores naturales. Se conocen 14 especies de amebas y dos de protozoos ciliados que ofrecen soporte intracelular para la replicación de la bacteria (Molmeret et al. 2005). *Dictyostelium discoideum* se ha establecido como sistema modelo para el estudio de la interacción *L. pneumophila*-ameba (Hägele et al.

2000). Se observan cambios tanto en la bioquímica y fisiología como en la virulencia al comparar el crecimiento *in vitro* respecto a en ameba (Abu Kwaik et al. 1998).

Se ha observado que *Legionella* es un microorganismo que presenta pleomorfismo, es decir, presenta dos o más morfologías diferentes a lo largo de su ciclo natural. Principalmente, se distinguen las formas viables cultivables (VC) y las viables no cultivables (VNC). Esta distinción es sumamente importante debido a que dependiendo de la forma se podrá detectar de un modo u otro. En el caso de la forma VNC no se puede reproducir su crecimiento *in vitro* y por tanto su morfología no puede ser caracterizada de manera simple. Una alternativa sería mediante microscopía de transmisión electrónica y el modo de confirmar su presencia mediante PCR.

Se han obtenido formas VNC a partir de células en forma de fase estacionaria (SPFs, Stationary Phase Forms) y en forma madura infecciosa (MIFs, Mature Infectious Forms) (Al-Bana, Haddad, and Garduño 2014). La SPF presenta inclusiones citoplasmáticas, flagelos, y se caracteriza por presentar motilidad y citotoxicidad; las MIFs también tienen inclusiones citoplasmáticas y además tiene una alta capacidad infecciosa (Garduño et al. 2002).

Se ha demostrado que el co-cultivo con amebas puede aumentar la virulencia de las cepas de *L. pneumophila* e incluso mejorar la culturabilidad (Descours et al. 2012). El mecanismo que utiliza la bacteria para introducirse en las amebas es el mismo que en los macrófagos alveolares, por el que es capaz de infectar humanos y causarles neumonía. Este mecanismo es conocido como “*coiling*” fagocitosis (Horwitz 1984). Consiste en la formación de un pseudópodo que envuelve a la bacteria previamente a la internalización. Una vez en el interior, para la supervivencia generan un compartimento especializado donde quedan reclutadas: es lo que se conoce como la vacuola contenedora de *Legionella* (LCV). Esta vacuola es capaz de escapar de la degradación gracias a la acción del sistema Dot/Icm y en ella se produce la proliferación (Figura 1.3). Hoy en día, se conocen al menos cinco proteínas implicadas en este mecanismo de infección que son EnhC, LpnE, RtxA, LvH2 y HtpB (Cirillo et al. 2001; Cirillo, Lum, and Cirillo 2000; Newton et al. 2006; Ridenour et al. 2003).

Al tratarse de un agente patógeno, se han propuestos diversos modelos animales para el estudio de los mecanismos de infección. El principal modelo es el ratón; sin embargo, también se han utilizado las cobayas (McDade et al. 1977).

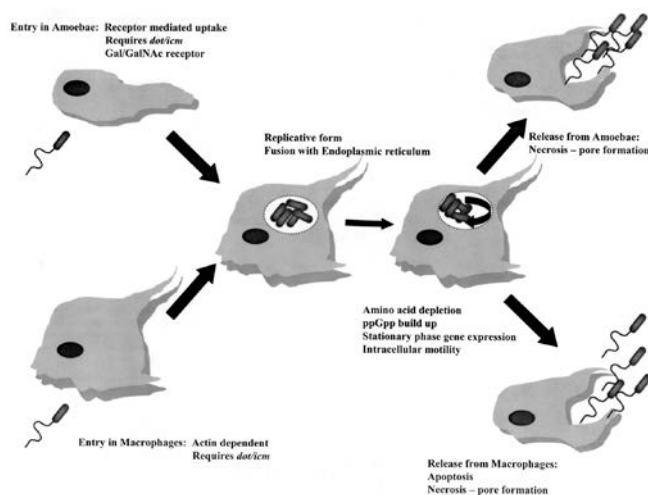


Figura 1.3. Ciclo de vida *L. pneumophila* en protozoo y macrófago humano (Fields, Benson, and Besser 2002).

1.1.5. Genómica

Conocer el genoma de un ser vivo está a la orden día. Se secuencian masivamente microorganismos, pero también organismos superiores como plantas o el ser humano. En el ámbito microbiológico, la secuenciación del genoma es útil para distintos fines como, por ejemplo, la reconstrucción filogenética de la historia de un patógeno para poder localizar su origen durante un estudio epidemiológico. Comparar los distintas secuencias genómicas permite concluir relaciones que desvelan procesos evolutivos, mecanismos patogénicos, diferencias metabólicas o funcionales, etc. (Khan et al. 2013; Rao, Benhabib, and Ensminger 2013).

Hasta el momento se han secuenciado 12 cepas clínicas y ambientales (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Bacteria/>) de *L. pneumophila*, y análisis genómicos con parte de estas cepas (Tabla 1.1) han permitido demostrar la transferencia de material genético de protozoos a esta bacteria (Gomez-Valero, Rusniok, Jarraud, et al. 2011).

Tabla 1.1. Cepas de *L. pneumophila* secuenciadas (Reuter et al. 2013).

Nombre	Origen Biológico	Tipo de muestra	Serogrupo	Tipo secuencia (ST)
LP Philadelphia	EEUU 1974	Clínica	1	ST36
LP ATCC 43290	EEUU	Clínica	12	ST187
LP Alcoy	España	Clínica	1	ST578

LP Corby	Reino Unido	Clínica	1	ST51
LP Lens	Francia	Clínica	1	ST15
LP 130B	EEUU	Clínica	1	ST42
LP Paris	Francia	Clínica	1	ST1
LP Lorraine	Francia	Clínica	1	ST47
LPHL06041035	Francia	Ambiental	1	ST734

A pesar de la diversidad que existe entre cepas de *L. pneumophila*, se pueden definir una serie de características generales del genoma. El tamaño se conserva entorno 3.3 - 3.5 Mb y el contenido en G+C es 38 % (aproximadamente). El 90% de la secuencia es codificante y se corresponde con un total de unos 3001 – 3259 genes (Newton et al. 2010). En general, el orden de los genes de los cromosomas se mantiene entre cepas, es decir, existe sintenia; sin embargo, también hay reordenamientos como por ejemplo entre Lens y Paris hay una inversión de 260 kb (Newton et al. 2010).

Como se ha mencionado, entre cepas hay diferencias genéticas; se considera que el 80% de los genes son comunes a todas, lo que se conoce como el “core” genómico, y un 10% de los genes son específicos de cepa (Gomez-Valero, Rusniok, and Buchrieser 2009). Comparando los resultados de la secuenciación del genoma de distintas cepas se observan diferencias a nivel del número de genes, del porcentaje de G+C, etc. (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Principales rasgos del genoma de 5 cepas de *L. pneumophila* (D’Auria et al. 2010).

Característica	Philadelphia	Paris	Lens	Corby	Alcoy
Tamaño del genoma (pb)	3397754	3503610	3345687	3576470	3516335
Contenido GC (%)	38,27	38,37	38,42	38,48	38,38
Genes codificantes CODIFICANTES (%)	88	87	86	96	86
Plásmidos	0	1	1	0	0

Gracias a estudios llevados a cabo (Cazalet et al. 2008) se ha determinado que la mayoría de los factores involucrados con la habilidad de la bacteria de infectar células eucariotas están codificados por el “core”. Hoy en día, se ha comprobado la adquisición de genes eucariotas en esta bacteria mediante transferencia horizontal (TGH) (Al-Quadri, Price, and Abu Kwaik 2012; de Felipe et al. 2005; Gomez-Valero, Rusniok, Cazalet, et al. 2011).

1.2. Legionelosis

La legionelosis es una enfermedad oportunista de origen estrictamente ambiental, sin que se haya descrito hasta el momento ningún caso de transmisión persona-persona (RED NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2011).

Clínicamente se distinguen dos modos de la enfermedad, la no neumónica y la neumónica. En el primer caso se conoce también como fiebre de Pontiac (Glick et al. 1978), y la neumónica, conocida como la enfermedad del legionario o legionelosis es la forma más grave (Fraser et al. 1977). Se trata de una enfermedad distribuida globalmente; sin embargo, es en los países desarrollados donde la incidencia es mayor.

El periodo de incubación suele ser de dos a diez días; sin embargo hay excepciones donde en pocas horas o pasadas dos semanas se muestran los primeros síntomas característicos de la enfermedad. A la hora de desarrollar la enfermedad existe una gran variedad debido a la propia susceptibilidad del hospedador y a la cantidad de inóculo de patógeno que llega a los alveolos pulmonares. Además hay que tener en cuenta factores como la patogenicidad y virulencia del mismo. Por otro lado, el estilo de vida del paciente, junto con otras enfermedades que alteren las vías respiratorias, juega un papel importante en la evolución de la enfermedad. El único modo de transmisión es por vía aérea, mediante la inhalación de aerosoles infectados. En algunos casos, poco frecuentes, se ha descrito como vía la microaspiración (RED NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2011) de agua contaminada.

Desde 1995, se trata de una enfermedad de declaración obligatoria, por lo que los brotes deben notificarse al Centro Nacional de Epidemiología a través de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Los órganos competentes de Salud Pública dirigen sus esfuerzos a controlar la colonización, proliferación y dispersión de *Legionella* para prevenir posibles infecciones. Cuando se produce un brote, las investigaciones se orientan a la identificación de la fuente de infección ambiental, para así intentar interrumpir la propagación. Este tipo de investigación

comprende tanto un estudio epidemiológico como ambiental y microbiológico, siendo en el último caso donde se pretende confirmar la identidad de la cepa infectante en los pacientes. Atendiendo al lugar donde se produzca el brote se distinguen brotes nosocomiales, comunitarios y relacionados con viajes.

En los últimos años, la media anual de casos declarados en España es de 1,236 (CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGÍA, 2009). Por lo general, la incidencia se ha mantenido con pequeñas oscilaciones. No obstante, se observó un aumento considerable entre 1997 y 2001 (Figura 1.4). Esto se debe a que el número de casos diagnosticados incrementó, ya que los métodos de detección mejoraron al introducirse una prueba comercial de antigenuria.

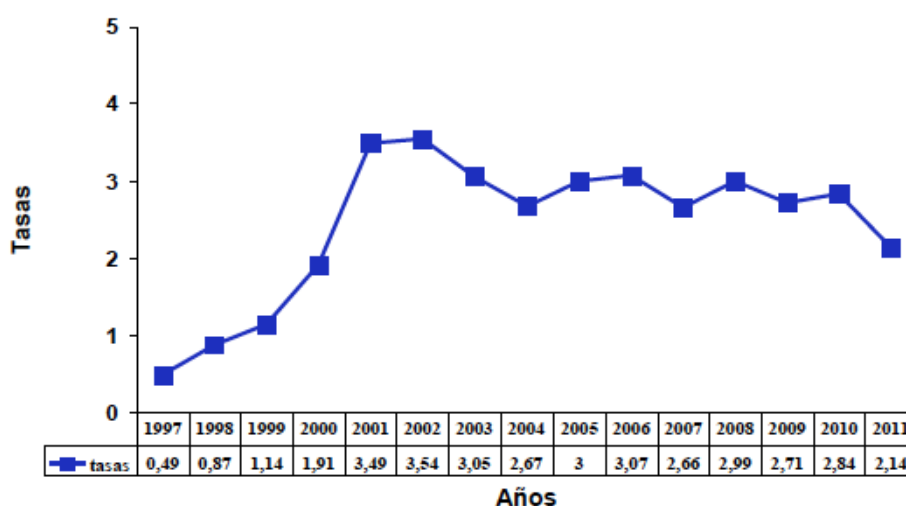


Figura 1.4. Incidencia de Legionelosis por 100,000 habitantes (España).

A pesar de haber mejorado el diagnóstico, el número de aislados clínicos que se obtienen es todavía escaso. Si se consiguiesen más muestras clínicas, se podrían hacer comparaciones con los aislados ambientales. Esto contribuiría a la identificación de la fuente de infección. Asimismo, la práctica clínica emplea preferentemente el cultivo de la muestra biológica para determinar el agente infeccioso. En el caso de las formas VNC de *Legionella* este método no es factible. No obstante, hoy en día se cuenta con métodos genéticos que se pueden aplicar sobre muestras directas. Las empresas han diseñado kits comerciales para determinar la presencia o ausencia de distintos patógenos para el ser humano mediante test inmunológicos. También se puede extraer el ADN y secuenciarlo para tipar el microorganismo.

1.3. Evolución y selección

Conocer la dinámica evolutiva de un patógeno y los cambios de la misma es importante para científicos y epidemiólogos. Para estudiar los mecanismos de evolución, los biólogos llevan a cabo experimentos en los cuales, controlando la dinámica de replicación de un organismo, tratan de probar la hipótesis de partida propuesta.

En los últimos años, los experimentos evolutivos se centran en un amplio rango de organismos, como las plantas, vertebrados y microorganismos. Estos últimos ofrecen una serie de características ventajosas para los estudios sobre la evolución (Elena y Lenski 2003).

1. Fácil de propagar.
2. Reproducción rápida.
3. Grandes poblaciones en espacios mínimos.
4. Pueden ser almacenados y posteriormente revivirlos.
5. Asexuales, conservación del material genética.
6. Manipulación de variables ambientales.
7. Hay información abundante sobre biología molecular y genómica.

1.4. Tipado genético y análisis de brotes

El tipado genético de un microorganismo permite concretar y determinar con gran precisión su identidad. Como se ha mencionado anteriormente, el género *Legionella* está compuesto por muchas especies y dentro de cada una se pueden distinguir distintos serogrupos. Es decir, dentro de la especie se pueden hacer agrupaciones de los aislados en función de los antígenos presentes en su superficie celular. Sin embargo, en microbiología se utiliza el término cepa para el cual no hay una definición estándar. Pero se podría asignar el nivel cepa a cada aislado que se cultiva y caracteriza.

Para la caracterización o tipado del microorganismo se emplean distintas técnicas como, por ejemplo, inmunológicas, PFGE (Feiková and Klement 2007), SBT (Sequence-Based Typing), etc.

El tipado basado en la secuencia del ADN permite asignar a cada cepa de *Legionella* un perfil genético que se conoce como Sequence Type (ST). Este perfil se basa en la secuenciación de 7 genes (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* y *neuA*) y en función del alelo se le asigna un perfil. Los miembros del Grupo de Trabajo Europeo de Infecciones de *Legionella* (EWGLI) han creado

una base de datos donde se carga la información de nuevos aislados (http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php).

La base de datos del SBT es útil para el estudio de brotes, ya que cada vez que se produce uno se reporta en la base de datos. Esto permite comprobar o descartar la fuente ambiental, comparando los ST de los aislados clínicos y ambientales. También el STB es aplicable a muestras directas (como esputos, BAS, *biofilms*) para casos de cepas VNC.

Un ejemplo donde se ha utilizado el SBT es en un brote ocurrido en la localidad de Calpe (Alicante, España) (Vanaclocha et al, 2012). En este caso, se encontraron en un mismo hotel cepas de varios STs mediante métodos moleculares aplicados sobre muestras directas (esputos, biopelículas microbianas, etc.). Sin embargo, en cultivo sólo se detectó ST23 cultivable en agua del spa y en casos clínicos, y ST1 cultivable también en agua, mientras que mediante el SBT directo de biopelículas también se encontró ST578 no cultivable en las habitaciones y ST578 no cultivable en un caso clínico.

2. OBJETIVO

La supervivencia de *Legionella* y la persistencia de la misma en el medio dependen de varios factores, como se ha comentado anteriormente. Por tanto, el éxito de supervivencia de una cepa será distinto en un ambiente u otro.

Asimismo, a pesar de darse las condiciones adecuadas de crecimiento en un mismo ambiente, se pueden dar diferencias en el modo de crecimiento entre distintas cepas, es decir, la eficacia de crecimiento o de adaptación de la cepa puede ser diferente. Debido a esto existe gran variabilidad dentro de una misma fuente, condicionando su transmisibilidad y dificultando el diagnóstico y el seguimiento epidemiológico de los brotes en humanos.

En el brote de Calpe mencionado anteriormente se observó que, tras el cultivo, se detectaban cepas con los tipos ST1 o ST23, pero no ST578, que sin embargo sí se detectaba directamente en la muestra.

Como consecuencia de estas observaciones se plantea la hipótesis de la posible competencia entre cepas utilizadas al cultivar una muestra clínica o ambiental. No existen demasiados datos en la bibliografía sobre la posible existencia de fenómenos de competencia entre cepas que pudieran explicar estas diferencias en la eficacia de crecimiento en un mismo ambiente.

El objetivo del proyecto es, por tanto, revelar la posible existencia de competencia entre tres cepas de *L. pneumophila* con distintos perfiles genéticos, ST1, ST23 y ST578, originada cuando se cultivan juntas en condiciones *in vitro*, debido a diferencias en la eficacia relativa de cada una de ellas en ese ambiente.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Microorganismo

En el estudio se empleó la bacteria *L. pneumophila*, concretamente tres cepas de la misma. El código de identificación (ID) de las muestras empleadas es 6886, 4029 y 490456, que corresponden a los perfiles genéticos ST1, ST23 y ST578, respectivamente.

Se trata de muestras (Tabla 3.1) obtenidas en estudios de brotes producidos en Alcoy y Calpe en 2012, que en su día se almacenaron a -80°C en glicerol al 15 %. Previamente, se había obtenido la secuencia del genoma de las tres cepas mediante la tecnología SOLiD 5500XL de Applied Biosystems (Sánchez-Busó et al., en prensa).

Tabla 3.1. Descripción de las cepas utilizadas para estudiar la competencia en *L. pneumophila*.

ID	ST	Origen	Localidad
6886	1	Ambiental	Calpe
4029	23	Ambiental	Calpe
490456	578	Clínica	Alcoy

3.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado fue el BCYE (*Buffered charcoal yeast extract*) + Cys que se trata de un medio tamponado compuesto por extracto de levadura, carbón activo y suplementado con tampón ACES ([ácido N-(2-acetamida)-2-aminoetano sulfúrico]), hidróxido de potasio (KOH), pirofosfato férrico, glicina, cisteína (Cys) y α -cetoglutarato. Se recurrió a la preparación del mismo siguiendo la siguiente receta para 500 mL:

- 1) Disolver 5 g de ACES en 250 mL de agua (H_2O) destilada (disolución A) en un baño a 45°C .
- 2) Disolver 1.4 g de KOH en 240 mL de H_2O destilada (disolución B).
- 3) Mezclar las disoluciones A y B.
- 4) A continuación, añadir 1 g de carbón activo y 5 g de extracto de levadura.
- 5) Adicionar 0.5 g α -cetoglutarato y 1.5 g de glicina.
- 6) Una vez obtenida una mezcla homogénea autoclavar durante 15 minutos a 121°C .

- 7) Tras el autoclavado, filtrar para eliminar el carbón activo.
- 8) Colocar el medio en un baño a 45°C y, después de atemperar, añadir 5 mL de pirofosfato férrico y otros 5 mL de cisteína.
 - a. Disolución pirofosfato férrico: 10 mL H₂O y 0.125 g pirofosfato férrico
 - b. Disolución cisteína: 10 mL H₂O y 0.2 g de cisteína.

NOTA: el pH debe estar en torno a 6.9 ± 0.4 . De no ser así, ajustarlo con KOH o ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0.1 M.

3.3. Caracterización del crecimiento microbiano mediante densidad óptica

La densidad óptica (OD) es un parámetro al cual se suele recurrir frecuentemente para estudiar el crecimiento de una población bacteriana. Exactamente, la OD es una medida de la absorción de un elemento por unidad de distancia para una longitud de onda dada. Esta magnitud es medida por un espectrofotómetro, donde se cuantifica el grado de opacidad de un material semitransparente.

Cuanto mayor sea el número de bacterias presentes, la OD será mayor, al haber más turbidez. Según la escala de Mc Farland, una OD=0.125 a 550 nm corresponde a una concentración del orden 1.5×10^8 UFC/mL. La cuantificación del crecimiento se hace en UFC, que son unidades formadoras de colonias.

El crecimiento se realizó en el Infinite® 200 PRO de la casa comercial TECAN (www.tecan.com). Se trata de un instrumento que permite la incubación del microorganismo y, a la vez, va tomando medida de la OD. En nuestro caso, la temperatura seleccionada para el crecimiento fue 37°C y se dejó durante 7 días y medio. La toma de medidas fue cada 3 horas.

Se emplearon placas de 96 pocillos, Nunclon™ Surface. La capacidad de cada pocillo es de 400 µL; sin embargo el volumen final utilizado para el crecimiento fue 200 µL. De este modo se aseguró la disponibilidad de aire, el cual es necesario para el crecimiento de la bacteria al tratarse de un microorganismo aerobio.

Las proporciones de medio e inóculo bacteriano empleadas fueron seis (1:200, 5:200, 10:200, 15:200, 30:200 y 50:200) y cada una de ellas por duplicado. Además, como controles se emplearon agua y también medio sin inóculo. De este modo, se determinó la curva de crecimiento característica de *L. pneumophila*.

3.4. Eficacia

El ensayo consistió en la competencia entre dos o tres cepas de *L. pneumophila* para analizar la eficacia de cada una de ellas en presencia de las otras, ya que la capacidad de proliferación de la misma puede verse influida tanto positiva como negativamente por la existencia de otros microorganismos o por cambios físico-químicos en el medio.

Para el análisis de la eficacia relativa se realizaron 19 cultivos por triplicado, haciendo un total de 57 cultivos líquidos de 5 mL. La densidad óptica de partida para cada uno de los inóculos fue OD=0.235 (2,82E+05 UFC/mL), OD=0.228 (2,74E+05 UFC/mL) y OD=0.189 (2,27E+05 UFC/mL) para ST1, ST23 y ST578, respectivamente. De la competencia entre la ST1 y ST23 se pusieron cinco cultivos con proporciones iniciales relativas 1:9, 3:7, 1:1, 7:3 y 9:1 de cada una de las ST, siendo el volumen final de inóculo 25 µL; del mismo modo se establecieron las competencias entre ST1-ST578 y ST23-ST578. Además, incluimos cuatro cultivos más con las tres ST conjuntamente. Las proporciones fueron 1:1:1, 1:4:4, 4:1:4 y 4:4:1, al igual que antes el volumen final de inóculo 25 µL. Cada uno de los cultivos se llevó a cabo por triplicado.

Se tomaron 10 medidas del cultivo, las 8 primeras cada 12 horas y las dos últimas cada 24 horas. De este modo, se pretendía abarcar un amplio rango de crecimiento que fuese representativo. De cada una de las tomas se hacían dos alícuotas, una de 100 µL y otra de 200 µL. La primera fue empleada para la medida de la OD y la segunda para realizar posteriormente una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

3.5. qPCR

La qPCR permite amplificar el ADN y cuantificar el producto amplificado en un mismo experimento. El instrumento utilizado para la PCR a tiempo real ha sido el LightCycler® 480 Real-Time PCR Instrument II (Roche). El LightCycler permite detectar la fluorescencia de distintos modos, como ensayos de hibridación o hidrólisis de la sonda. De esta manera se puede detectar simultáneamente distintas muestras, ya que cada una es marcada con un fluoróforo.

Se realizó utilizando sondas de hidrólisis, oligonucleótidos marcados en 5' con un fluoróforo que permite la medición de fluorescencia tras su excitación con luz de una longitud de onda determinada. Estas sondas contienen en el extremo 3' un *quencher* o silenciador de fluorescencia, que silencia al fluoróforo hasta que durante la amplificación se separa del

mismo y permite la fluorescencia (Figura 3.1). También se puede detectar utilizando fluorocromos como SYBR Green, pero la cuantificación derivada de esta medida no es tan específica como la que puede obtenerse utilizando sondas.

El kit para la qPCR utilizado fue KAPA PROBE FAST qPCR (Kappa-BioSystems) y en el programa de qPCR que se aplicó se distinguen tres etapas: activación del enzima (tres minutos a 95 °C), PCR y enfriamiento (cinco minutos a 40 °C). La fase de PCR se divide en tres etapas de 10, 30 y 20 segundos cada una y, a 95, 58 y 72 °C, respectivamente. La fluorescencia se cuantifica en la segunda etapa de la PCR. Se tomó un 1 µL de ADN que procedía de la alícuota de 200 µL, de donde se había extraído mediante choque térmico.

En la qPCR se distinguen principalmente dos técnicas de cuantificación, que son la absoluta y la relativa. La elección de una u otra dependerá del objetivo final. La cuantificación absoluta permite cuantificar una única secuencia y el resultado es un valor absoluto, mientras que la relativa compara los niveles de dos secuencias diferentes, dando como resultado el *ratio* de los dos valores de la cuantificación.

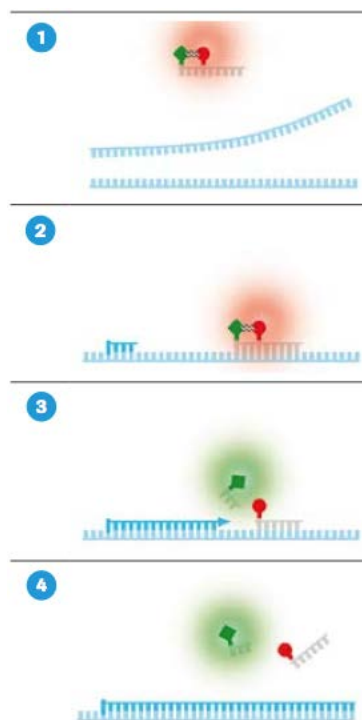


Figura 3.1. Monitorización de la qPCR con sonda de hidrólisis. (Manual LightCycler 480).

3.5.1. Diseño de los cebadores y sondas

En cuanto al diseño de los cebadores se pretendía conseguir cebadores específicos a cada una de las ST, para así poder distinguir cada uno de los perfiles durante la qPCR. Esto fue posible porque se contaba con la secuencia del genoma de cada cepa usada en el experimento en forma de *contigs*.

En primer lugar, se utilizó el programa informático Prokka (<http://www.vicbioinformatics.com/software/prokka.shtml>) que permite la anotación de genomas procariotas. El software devuelve un total de 11 ficheros de texto (Tabla 3.2), de lo que sólo se utilizó el fichero .ffn, que tiene un formato multi-FASTA, y en el que, el nombre de cada secuencia es el nombre de la proteína que codifica.

Tabla 3.2. Ficheros de salida de Prokka.

Extensión	Descripción
output.err	Anotaciones erróneas
output.faa	FASTA de la proteína obtenido de la traducción de las secuencias CDS
output.ffn	FASTA con todas las secuencias anotadas, no sólo CDS
output.fna	FASTA con las secuencias de entrada.
output.fsa	FASTA con las secuencias de entrada empleado por tbl2asn para crear el archivo .sqn.
output.gbk	Archivo estándar del Genbank.
output.gff	Anotación en formato GFF3, contiene tanto las secuencias como las anotaciones.
output.log	Contiene el resumen de todos los procesos que se producen durante que se ejecuta Prokka.
output.sqn	Archivo tipo "Sequin" necesario para Genbank.
output.tbl	Tabla utilizada por tbl2asn para crear el archivo .sqn.
output.txt	Relaciones estadísticas de las características anotadas.

Ejecutamos el programa con cada una de las secuencias genómicas completas de las cepas empleadas en el estudio. El número de proteínas de cada ST que devolvía estaba en torno a 1500, por lo que para hacer un filtrado de las proteínas únicas de cada ST se recurrió a un script de Python (**anexo 8.1**) (lenguaje informático). Mediante sets, se consiguió obtener las proteínas únicas de cada ST (**anexo 8.2**). Los *sets* son una estructura que almacena objetos que pueden ser números o letras ("*strings*"), es decir, caracteres alfanuméricos. La

peculiaridad de los sets es que no se pueden repetir los elementos, por lo que cada uno de los elementos que conformen el set será único. Además, para asegurar y corroborar los resultados, se hizo un BLASTN en local, aunque en la web también se puede ejecutar (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=MicrobialGenomes). Esta herramienta permite alinear secuencias de nucleótidos frente a una base de datos también nucleotídica. El principal uso es para comparar secuencias nucleotídicas filogenéticamente cercanas. Se llevó a cabo en local para crear la propia base de datos con las secuencias de los tres genomas. El objetivo fue cuantificar la similitud de las secuencias únicas seleccionadas (previamente) contra la base de datos creada. El programa devuelve, entre otros parámetros, el porcentaje de identidad, la longitud del alineamiento y del gen. Con estos datos se puede calcular la cobertura y junto con la similitud, se puede determinar genes únicos delimitando un umbral. Por ejemplo la cobertura $\geq 80\%$ y el porcentaje de identidad $\geq 90\%$. Con estos valores se es flexible y se permite ciertos errores del ensamblado.

Del listado de proteínas únicas, se seleccionó una de cada ST. Estas fueron *Sporulation kinase E*, *putative DNA helicase* y *Ser-Thr-rich glycosyl-phosphatidyl-inositol-anchored membrane family protein*, de la ST1, ST23 y ST578 respectivamente. A partir de estas secuencias se diseñaron tres parejas de cebadores y tres sondas específicas (Tabla 3.3 y Tabla 3.4).

Tabla 3.3. Cebadores empleados.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
ST1_FW2	5'-CAA TGT TAG AGG CGA GGA TTG CG -3'	58,2
ST1_RV	5'-TCG CGA ATG ACC AGT GGC AAG A -3'	61.2
ST23_FW	5'-AGC ATC GTA CTT CTG CGC GTG A -3'	61.1
ST23_RV	5'- TTG GGA TCC CCC ACC ACA ACC A -3'	63.3
ST578_FW	5'-TCA AGC ACT TGC TGC GGA GAC G -3'	62.2
ST578_RV	5'-TCG CCG CTG GTA TAA GGC TGG T -3'	62.9

Tabla 3.4. Sondas empleadas.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Longitud de onda (nm)
ST1	5'- /5HEX/AA CTC CTT TTT GAT AAG GGG TT/3BHQ_1/ -3'	52.1	533-580
ST23	5'- /56-FAM/GA GAT GGG ACA ATG GAA ATG GT/3BHQ_1/ -3'	55.1	465-510
ST578	5'- /5Cy5/TA CTG TCA ACA GGG TCA ACG /3IAbrQSp/ -3'	54.5	618-660

3.5.2. Recta de calibrado

Previamente al análisis de la competencia mediante la cuantificación de cada una de las ST, es necesario realizar una recta de calibrado. Esto se hace mediante cuantificación absoluta.

La eficiencia de la qPCR está influenciada por muchos factores y la amplificación suele describirse del siguiente modo:

$$T_n = T_0 \times E^n$$

T_n es la cantidad de ADN en el ciclo n , T_0 es la cantidad inicial de ADN, n es el número de ciclos de amplificación y E es la eficiencia de la amplificación. Si la amplificación es perfecta, E tiene valor 2.

El instrumento representa los resultados en un tipo de gráfica característica que se muestra a continuación (Figura 3.2).

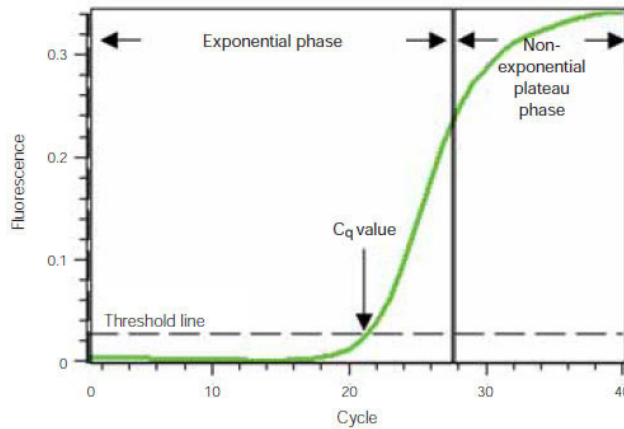


Figura 3.2. Curva de amplificación durante la qPCR. (Bio-Rad).

El punto en donde la fluorescencia aumenta sobre la fluorescencia generada por el ruido de fondo se conoce como *threshold* o umbral. El ciclo en el que ocurre esto es conocido como C_p (*crossing point*). Las rectas de calibrado se realizan a partir de cantidades de ADN de partida conocidas y el valor del C_p de cada una (Figura 3.3), donde se representa C_p en función del logaritmo de la concentración.

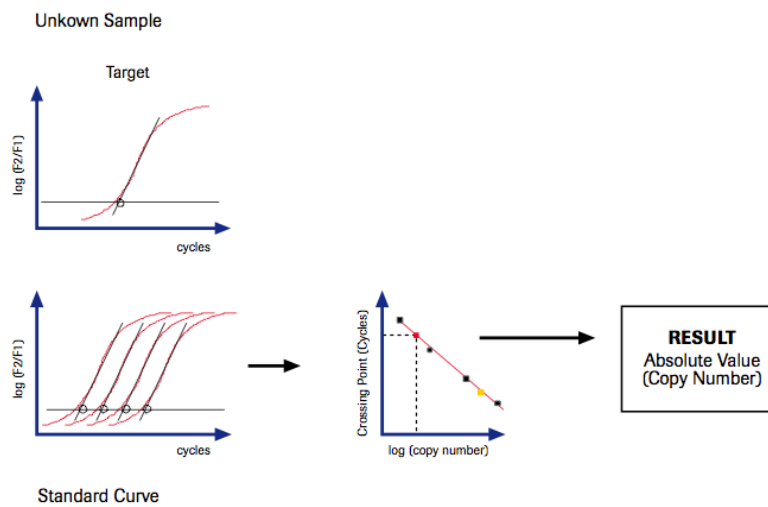


Figura 3.3. Obtención de la recta de calibrado. (Manual del LightCycler 480).

3.5.3. Cuantificación de la competencia

Para establecer la posible existencia de competencia entre las tres cepas se realiza una cuantificación absoluta del ADN en nanogramos (ng) de cada una de las ST. Esto es posible

gracias a que cada una queda marcada con un fluoróforo. A continuación, se determina la cantidad de ADN total de la muestra y se realizan los ratios de la proporción de cada ST en función del total, a lo largo del tiempo. Los resultados se van comparando con la proporción inicial de cada ST para ver si una ST desplaza a la otra ST durante el cultivo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Curva de crecimiento para la aproximación de la dinámica de crecimiento

Para determinar la dinámica de crecimiento de las cepas utilizadas en este trabajo se cultivaron las tres cepas con distintas ST por separado durante una semana, a distintas diluciones de partida, para ver si ésta se veía influenciada por la cantidad de masa microbiana de partida. La dinámica de crecimiento se estudió mediante la cuantificación de la OD por duplicado cada tres horas. Los valores de la OD quedan representados a continuación para cada ST (Figura 4.1, Figura 4.2 y Figura 4.3).

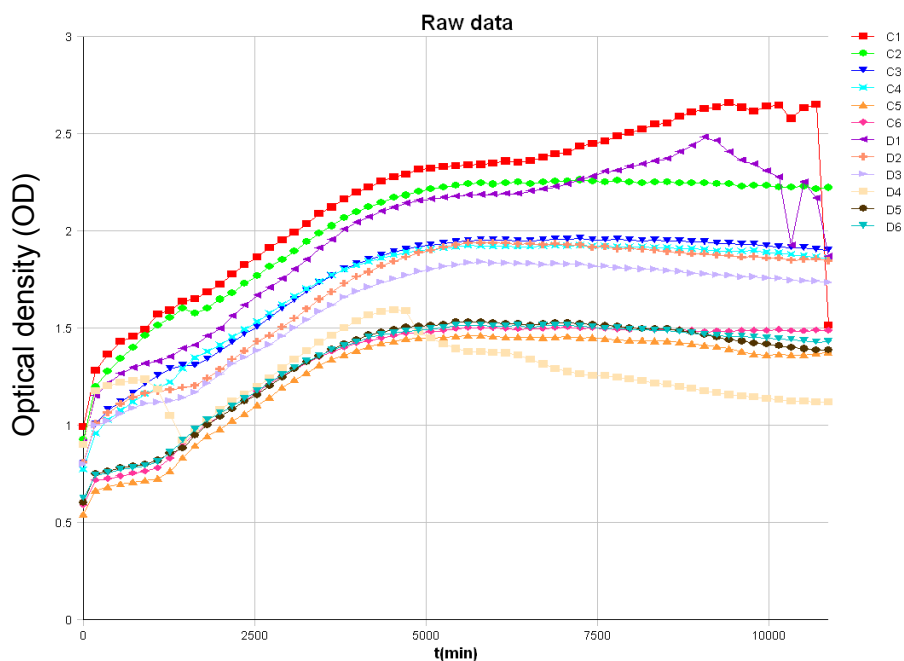


Figura 4.1. Crecimiento de la ST1. Las Ds son réplicas de las Cs.

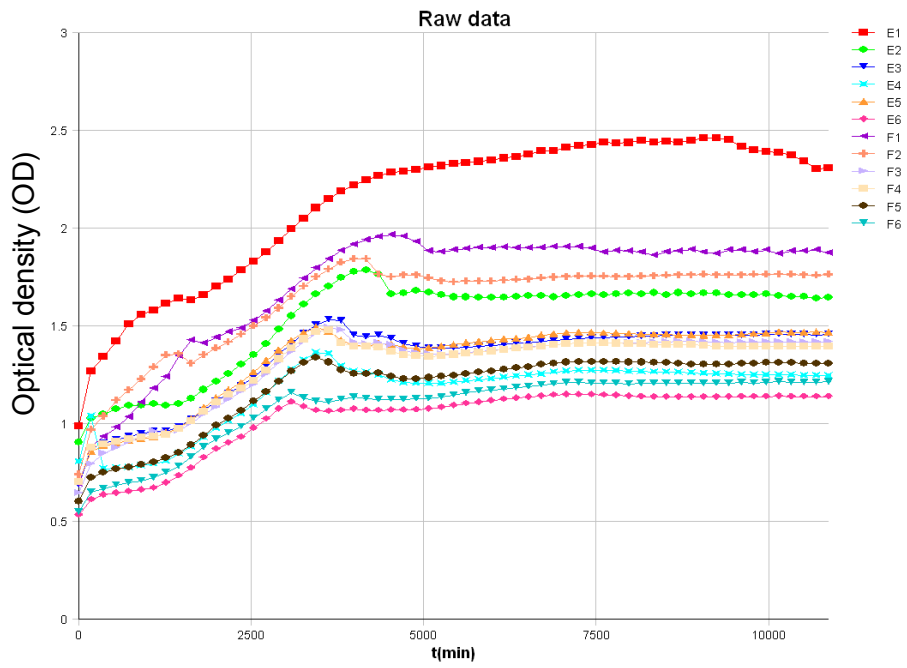


Figura 4.2. Crecimiento de la ST23. Las Fs son réplicas de las Es.

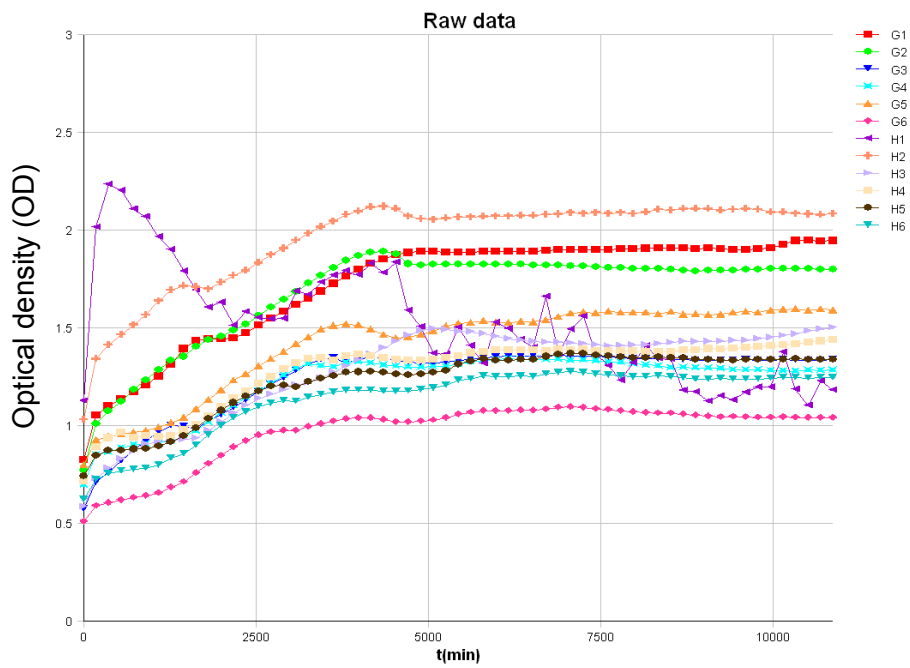


Figura 4.3. Crecimiento de la ST578. Las Hs son réplicas de las Gs.

Como se puede ver en las tres figuras anteriores, la tendencia de crecimiento para las tres STs es similar. Los números de las leyendas (1-6) hacen referencia a la concentración del inóculo inicial. Estas concentraciones fueron 1:200, 5:200, 10:200, 15:200, 30:200 y 50:200 (en orden de la 1 a la 6). Teniendo esto en cuenta, se puede apreciar que el crecimiento es mejor cuanto más diluido estaba el inóculo, como en el caso de las proporciones 1:200 y 5:200.

También destacar que la [Figura 4.3](#) la muestra H1 presenta valores inesperados, que se deben a fallos experimentales. Por tanto no debe ser tomado en cuenta.

4.2. Funcionalidad de los cebadores

Se comprobó la funcionalidad de los cebadores específicos para cada ST diseñados mediante una PCR normal y posterior visualización mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% ([Figura 4.4](#)). El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler DNA Ladder Mix ([anexo 8.3](#)) de Thermo Scientific.



Figura 4.4. Funcionalidad de los cebadores. P: patrón de peso molecular, C1: Control negativo, C2: Cebador ST1 con ADN procedente de la ST1, C3: Cebador ST23 con ADN procedente de la ST23, C4: Cebador ST578 con ADN procedente de la ST578, C5: Cebador ST1 con ADN procedente de la ST1, ST23 y ST578, C6: Cebador ST23 con ADN procedente de la ST1, ST23 y ST578, C7: Cebador ST578 con ADN procedente de la ST1, ST23 y ST578, C8: Cebador ST1 con ADN procedente de la ST23 y ST578, C9: Cebador ST23 con ADN procedente de la ST1 y ST578, C10: Cebador ST578 con ADN procedente de la ST1 y ST23.

Como se puede observar en la [Figura 4.4](#), sólo funcionaron correctamente los cebadores para ST23 y ST578, ya que el cebador de la ST1 hibrida también con las cepas ST23 y ST578. En

consecuencia, se diseñó otra pareja de cebadores, que tampoco funcionó. Como alternativa se planteó probar distintas temperaturas durante la PCR y cruzar los cebadores (Figura 4.5), es decir, utilizar el cebador directo 1 junto con el reverso 2 y viceversa.

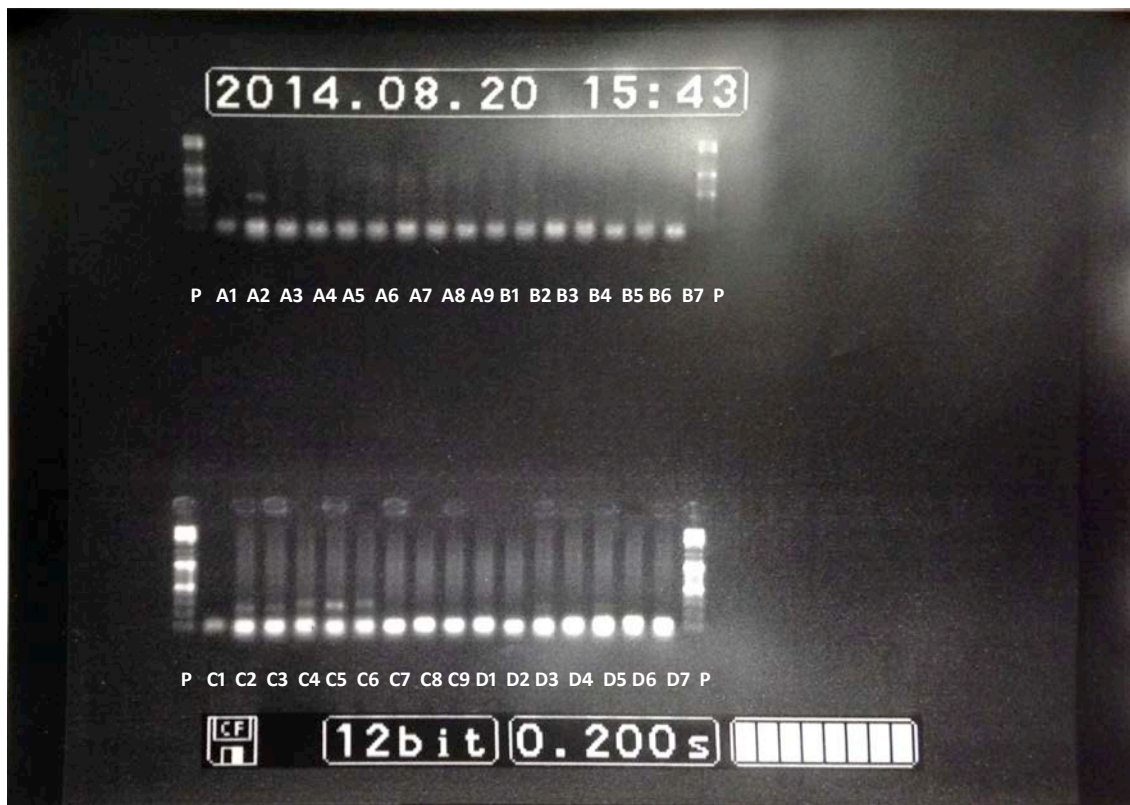


Figura 4.5. PCR a distintas temperaturas y uso de cebadores cruzados. P: patrón de peso molecular, A-B cebador directo 1 y directo 2, C-D cebador directo 2 y directo 1, A1 y C1 controles negativos, A2-A6 y C2-C6 ADN de la ST1 a 54, 56, 58, 60 y 62 °C, A7-B2 y C7-D2 ADN de la ST23 a 54, 56, 58, 60 y 62 °C, B3-B7 y D3-D7 ADN de la ST578 a 54, 56, 58, 60 y 62 °C.

Como se ve en la Figura 4.5, el único caso donde se observa banda es en C2-C6. Por lo que se puede decir que la combinación cebador directo 2 y reverso 1 a cualquiera de las temperaturas probadas es específica.

4.3. Cuantificación de la OD durante el ensayo de la competencia

Durante el crecimiento para el estudio de la competencia, se extrajo una alícuota de 100 µL de cada experimento. Para cada una de las alícuotas se midió la OD en el Infinite® 200 PRO, para visualizar si la dinámica de crecimiento de cada ST en los experimentos en 5 mL de cultivo se veía afectada con respecto a las mediciones automáticas en 200 µL mostradas anteriormente

en el apartado 4.1. En este caso los resultados se muestran en Log UFC/mL (Figura 4.6, Figura 4.7 y Figura 4.8).

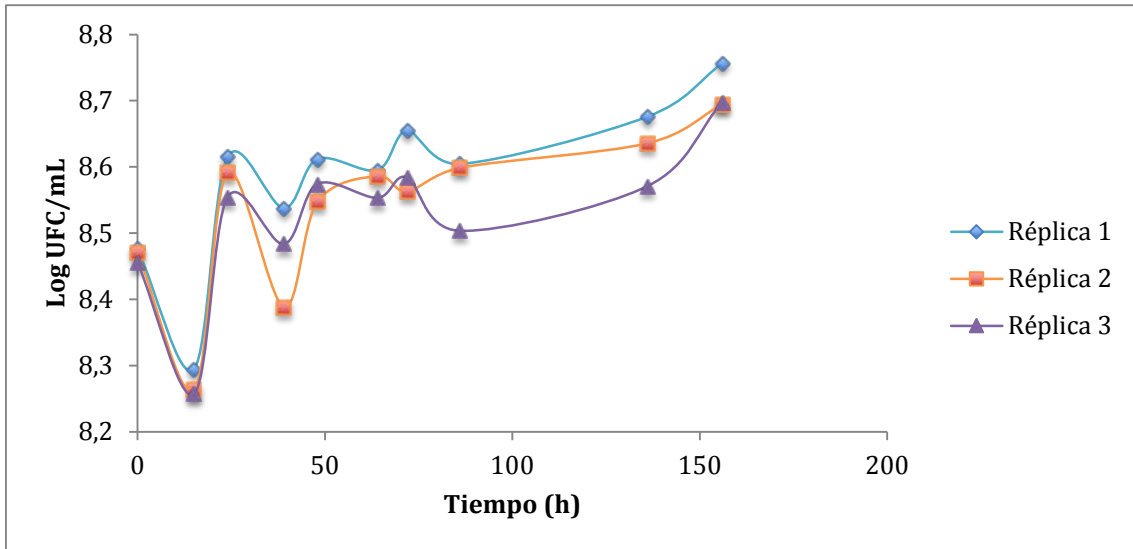


Figura 4.6. Crecimiento ST1.

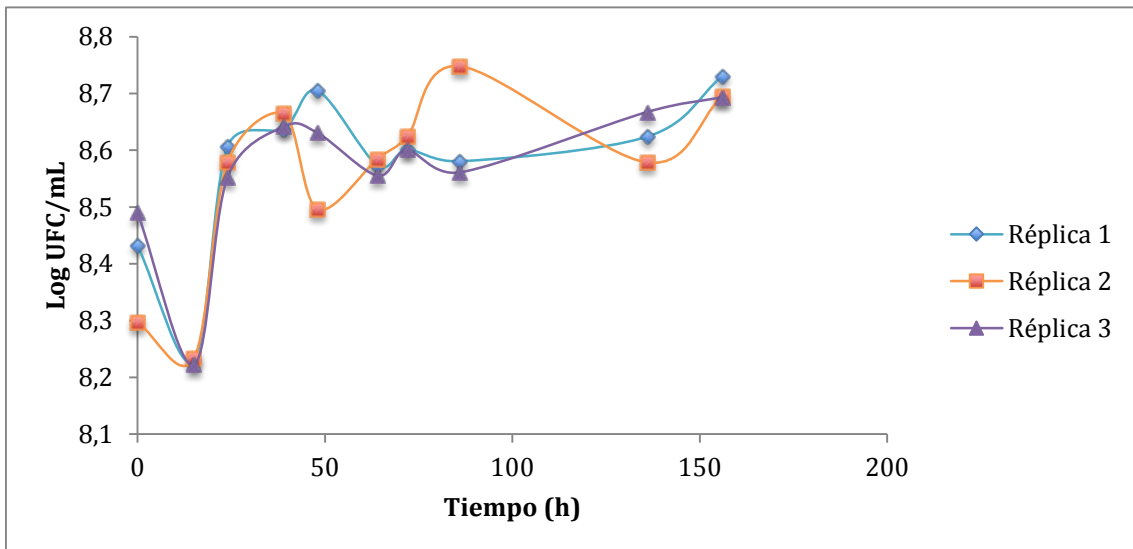


Figura 4.7. Crecimiento ST23.

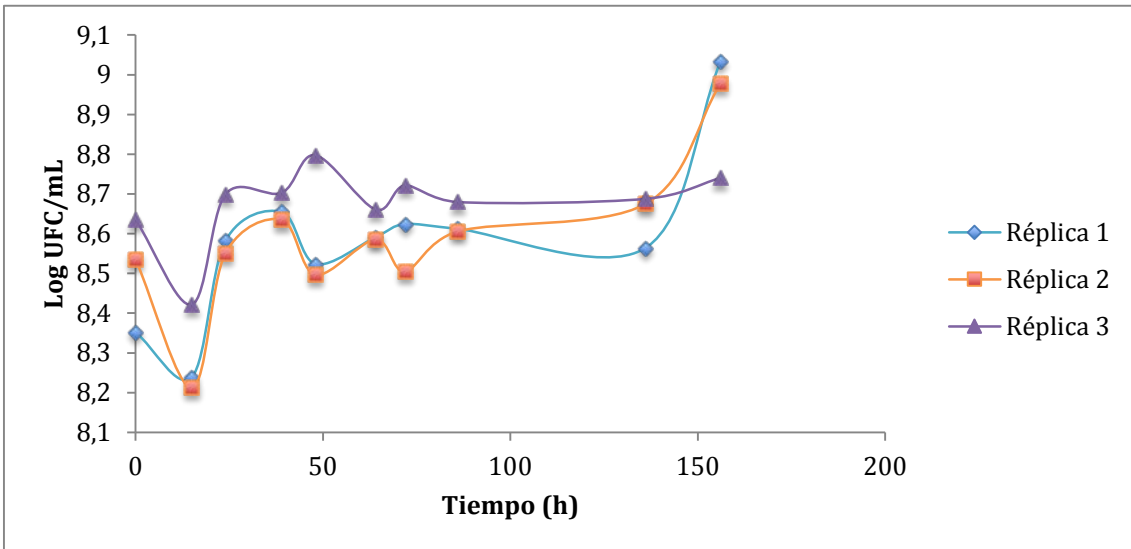


Figura 4.8. Crecimiento ST578.

Además, en esta parte del trabajo también se cuantificó las distintas competencias en distintas proporciones iniciales de los competidores. En la Figura 4.9 se muestra un ejemplo de estas dinámicas, que se encuentra ampliado en el **anexo 8.4**.

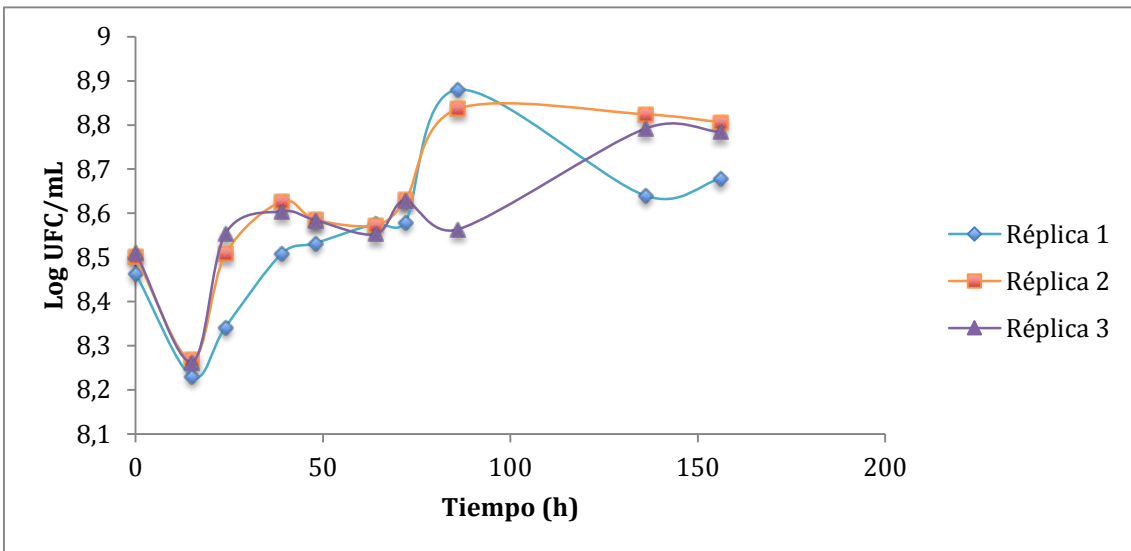


Figura 4.9. Crecimiento de las tres ST con la misma concentración de partida (1:1:1).

El principal motivo por el que las curvas no son coincidentes entre réplicas es la opacidad del medio de cultivo, debido a la presencia de carbón activo.

4.4. Análisis de la competencia

La recta de calibrado (Figura 4.10) utilizada tenía una eficiencia de 1.9. Este valor es muy próximo a 2, indicando que la PCR era eficiente.

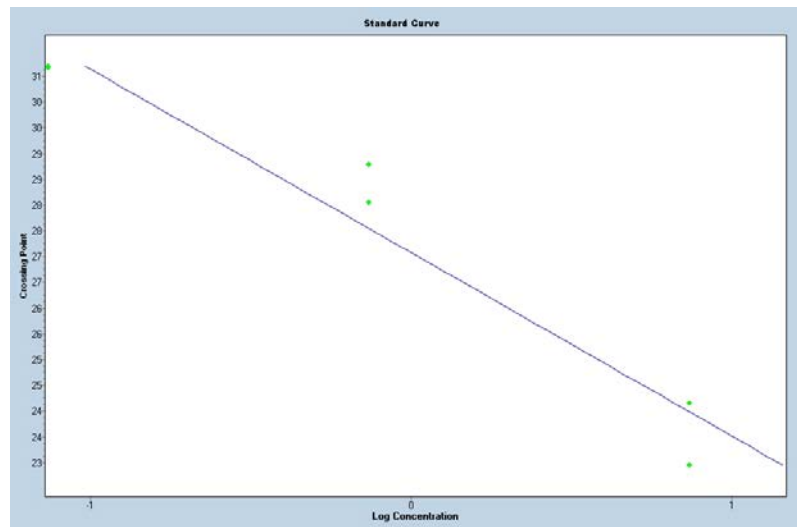


Figura 4.10. Recta de calibrado utilizada para la cuantificación.

No se tomaron más puntos debido a que la cantidad de partida de ADN era muy pequeña, por lo que sólo se pudieron hacer dos diluciones que dieran resultados detectables (1:10 y 1:100), además de la de stock (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Datos de la recta de calibrado.

Concentración (ng)	Cp
7.4	23.55
0.74	28.41
0.074	30.675

En las siguientes figuras (Figura 4.11, Figura 4.12, Figura 4.13 y Figura 4.14) se puede ver algunas amplificaciones:

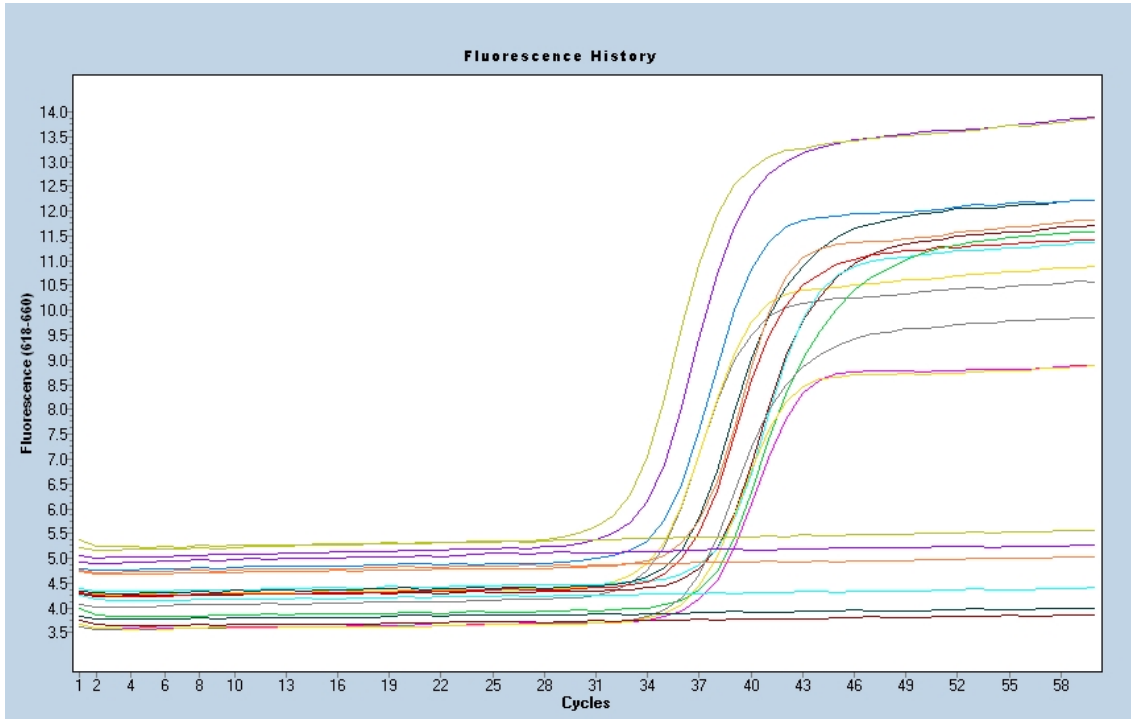


Figura 4.11. qPcr ST1-ST578 (90:10).

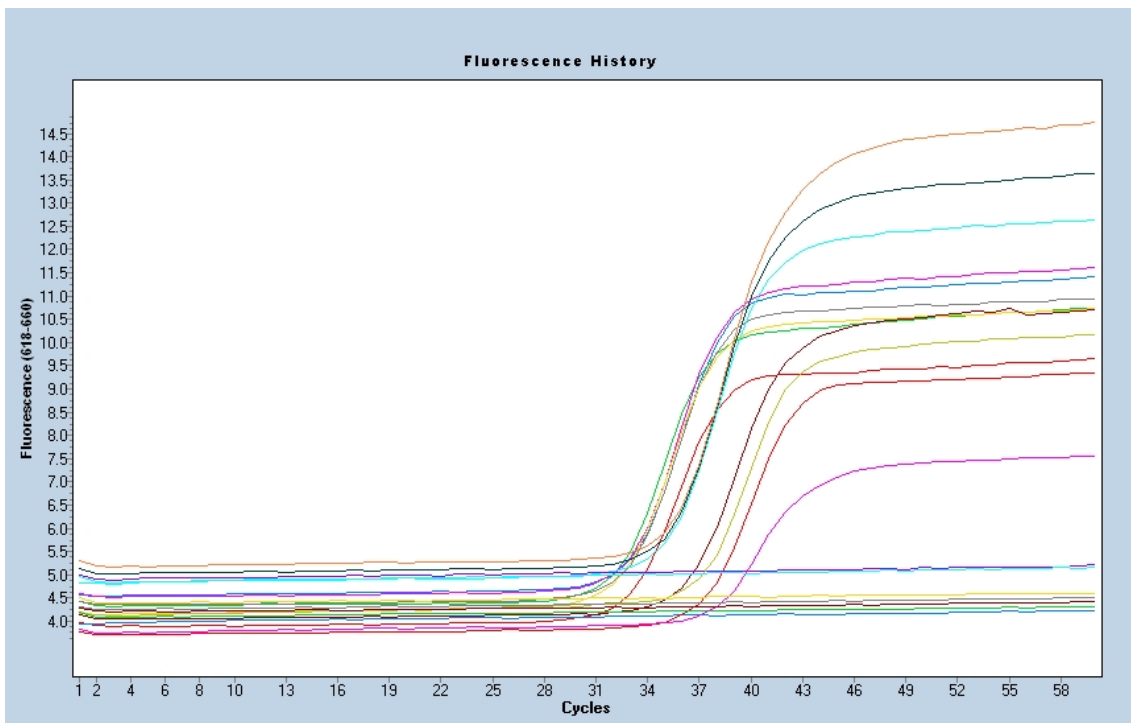


Figura 4.12. qPCR ST1-ST578 (70:30).

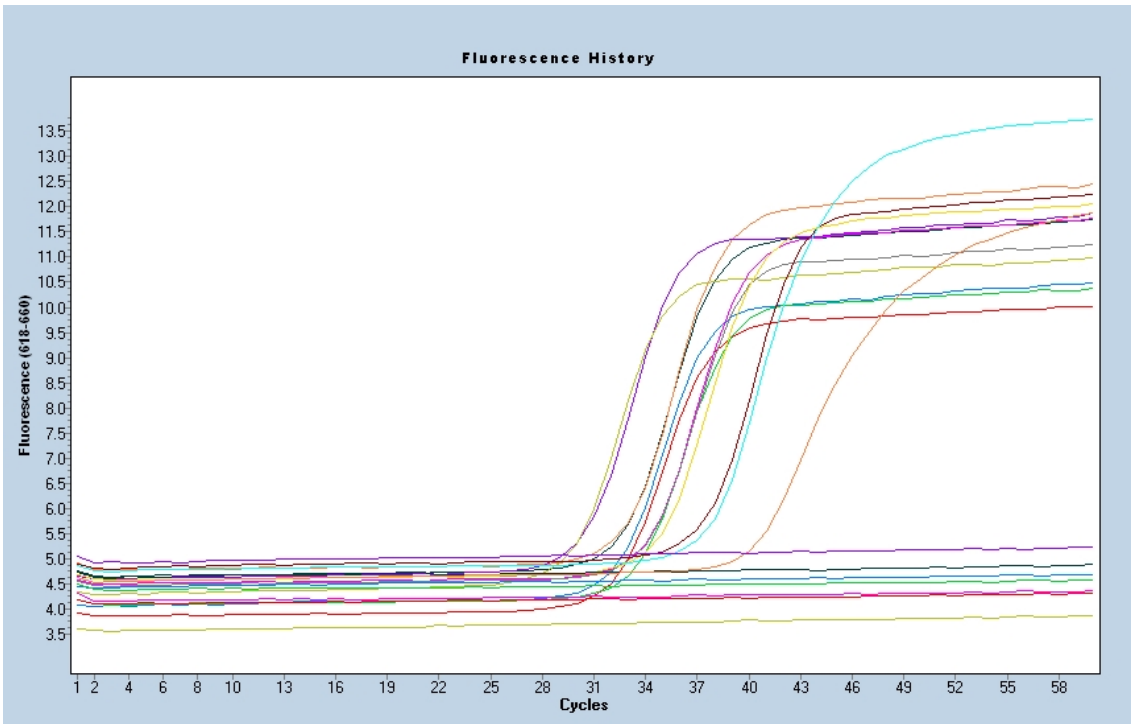


Figura 4.13. qPCR ST1-ST578 (50:50).

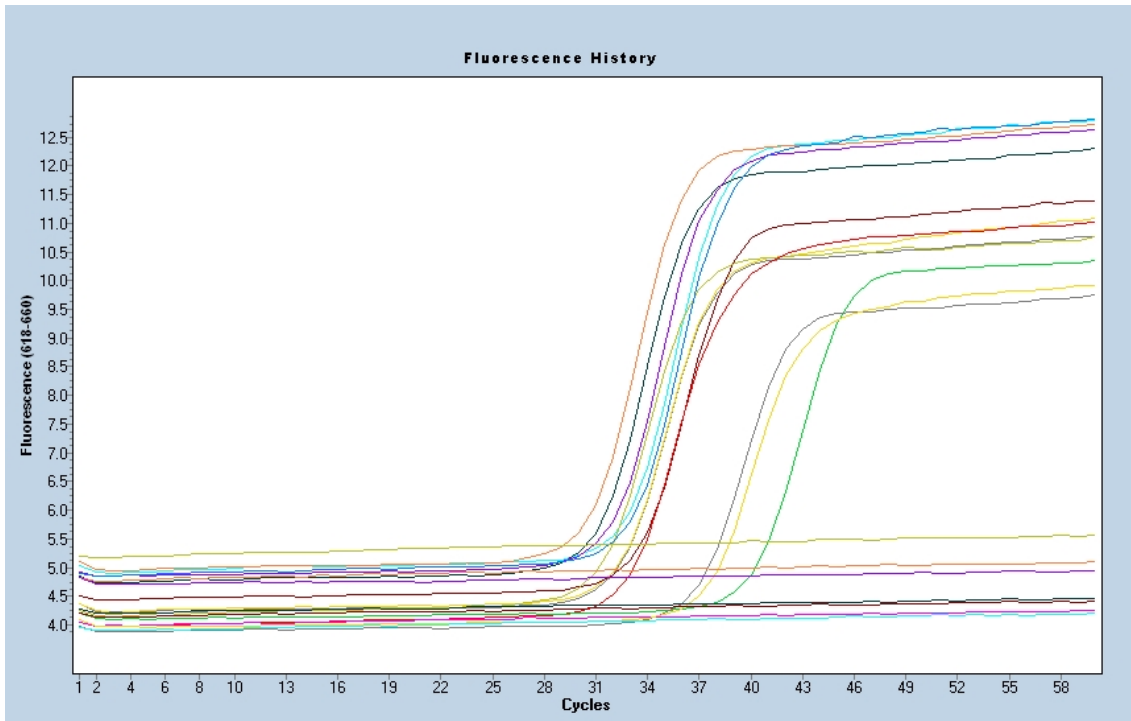


Figura 4.14. qPCR ST1-ST578 (30:70).

La cuantificación de las muestras se realizó tomando como referencia la recta de calibrado mostrada en la Figura 4.10. En algunos puntos, el *software* no fue capaz de realizar una cuantificación debido a que esta se salía del rango de la recta de calibrado. Para solucionar este problema, se realizaron tres rectas patrón (Figura 4.15, Figura 4.16 y Figura 4.17) para cada una de los ST tomando los datos de la concentración y Cp. De este modo, en los casos donde se tenía el valor del Cp, pero no de la concentración, se realizó una extrapolación.

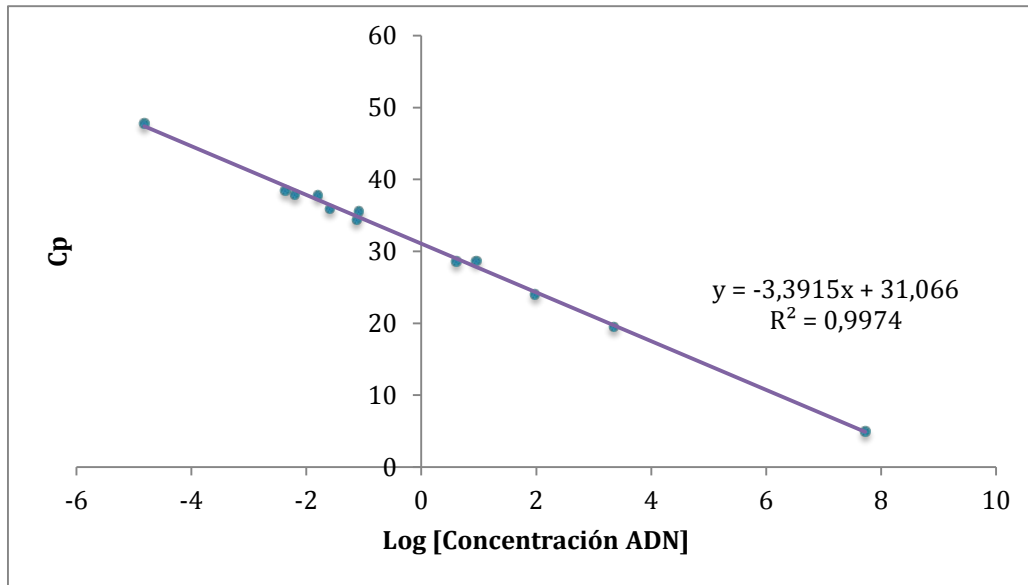


Figura 4.15. Recta extrapolación para la cuantificación de la ST1.

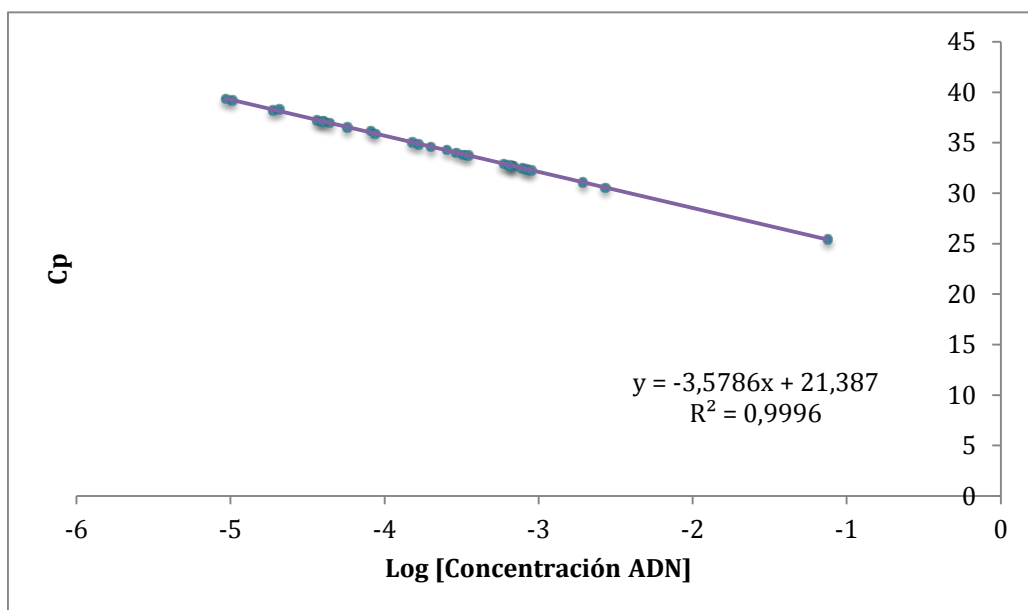


Figura 4.16. Recta extrapolación para la cuantificación de la ST23.

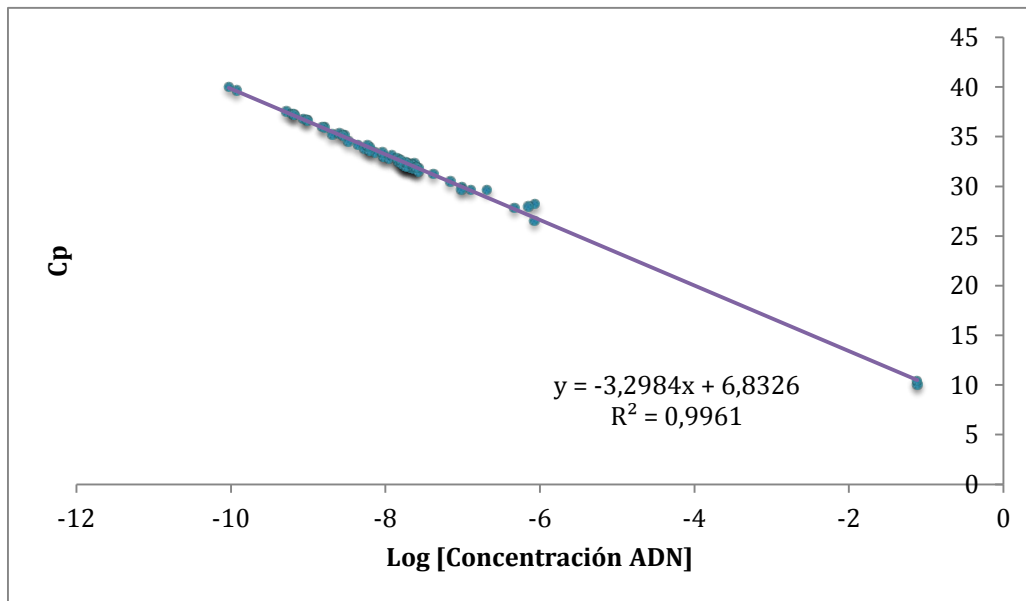


Figura 4.17. Recta extrapolación para la cuantificación de la ST578.

Todos los valores de las cuantificaciones se encuentran en el **anexo 8.5**.

La cuantificación con la sonda de la ST1 falló en la mayoría de los casos. Esto puede deberse a que se diseñó para la pareja de cebadores 1 y no para la combinación de los cebadores 1 y 2 que es la que se utilizó finalmente. Teniendo en cuenta las secuencias de los cebadores utilizados se sabe que la sonda no presenta mucha complementariedad, sólo hibrida en tres bases. Analizando la sonda en OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) se puede ver que es posible que forme un *hairpin*. Por falta de tiempo, no se pudo diseñar una sonda nueva y pedirla. Como consecuencia, la cuantificación relativa (**anexo 8.6**) de la mayoría de los estudios no se ha podido realizar, por lo que no se pueden extraer conclusiones robustas. En consecuencia sólo nos centraremos en la competencia ST23-ST578 (Figura 4.18, Figura 4.19 y Tabla 4.2).

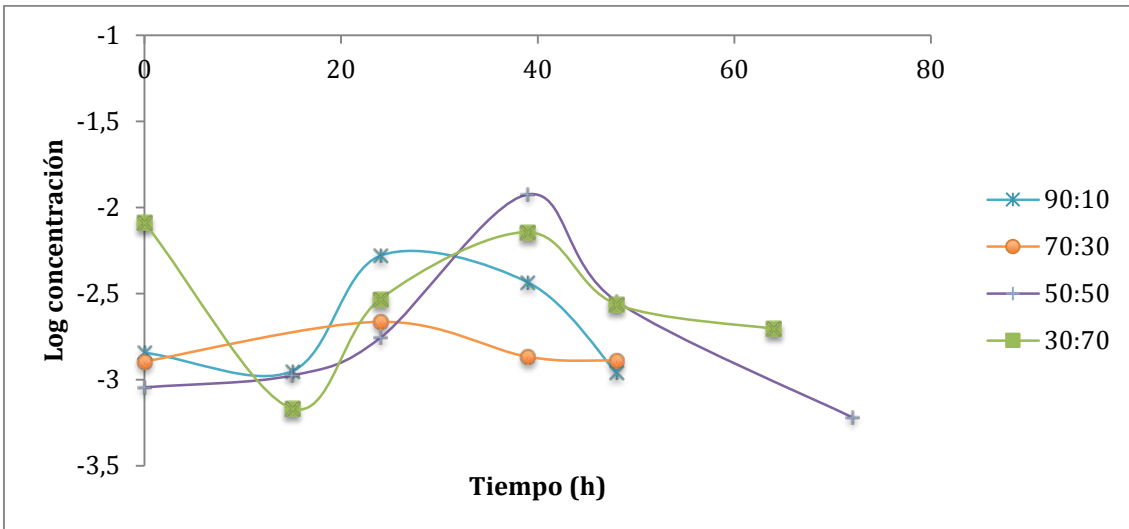


Figura 4.18. Progreso de la cantidad de ADN de la ST23.

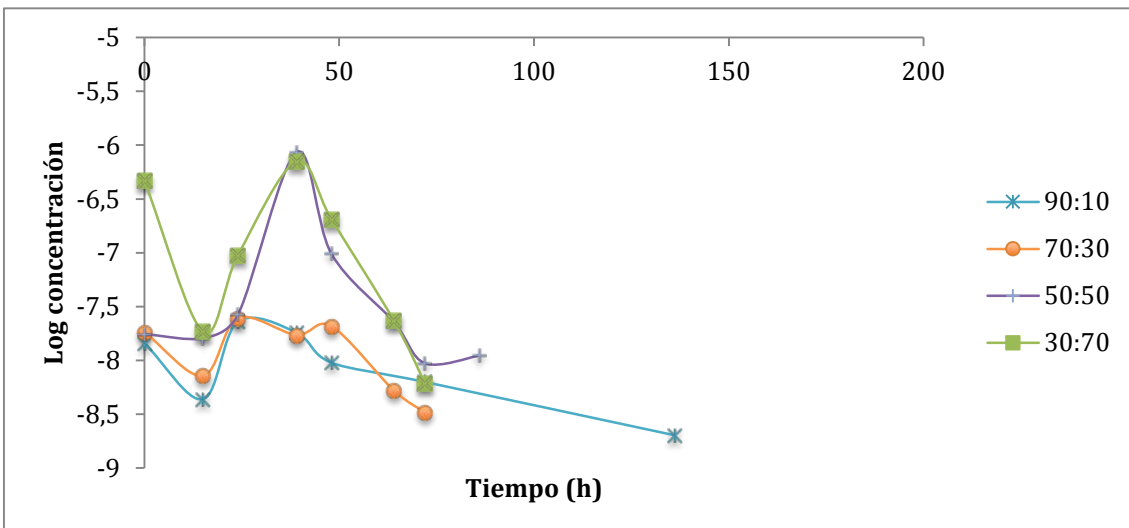


Figura 4.19. Progreso de la cantidad de ADN de la ST578.

Como se ve en las Figura 4.18 y Figura 4.19 durante las 20 primeras horas la cantidad de ADN que se va detectando va disminuyendo. Una vez superado este período la concentración de ADN aumenta hasta un máximo que se alcanza alrededor de las 40 horas de crecimiento. Tras este punto se produce el descenso de la cantidad de ADN.

Tabla 4.2. Cuantificación relativa ST23 - ST578.

23-578		Cantidad ADNt (ng)	% ST23	% ST578
90:10	t ₀	1,43E-03	99,998991489	1,01E-03
	t ₁	1,12E-03	99,999611194	3,89E-04
	t ₂	5,25E-03	99,999563463	4,37E-04
	t ₃	3,67E-03	99,999505171	4,95E-04
	t ₄	1,10E-03	99,999133625	8,66E-04
	t ₅	-		
	t ₆	6,30E-09		
	t ₇	-		
	t ₈	2,02E-09		
	t ₉	-		
70:30	t ₀	1,27E-03	99,998566701	1,43E-03
	t ₁	7,19E-09		
	t ₂	2,17E-03	99,998862882	1,14E-03
	t ₃	1,36E-03	99,998732076	1,27E-03
	t ₄	1,29E-03	99,998385718	1,61E-03
	t ₅	1,56E-02	99,999966241	3,38E-05
	t ₆	3,29E-09		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
50:50	t ₀	9,01E-04	99,998053140	1,95E-03
	t ₁	1,06E-03	99,998479102	1,52E-03
	t ₂	1,75E-03	99,998486797	1,51E-03
	t ₃	1,19E-02	99,992788710	7,21E-03
	t ₄	2,86E-03	99,996576762	3,42E-03
	t ₅	2,29E-08		
	t ₆	6,04E-04	99,998442155	1,56E-03
	t ₇	1,11E-08		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
30:70	t ₀	8,17E-03	99,994287331	5,71E-03
	t ₁	6,81E-04	99,997273330	2,73E-03
	t ₂	2,94E-03	99,996776817	3,22E-03
	t ₃	7,18E-03	99,990166506	9,83E-03
	t ₄	2,74E-03	99,992523905	7,48E-03
	t ₅	1,97E-03	99,998809591	1,19E-03
	t ₆	6,14E-09		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	8,40E-07		

La cantidad de ADN total (ADNt) se calculó sumando las distintas cantidades de ADN detectas por cada fluoróforo. El porcentaje de ADN de la ST23 detectado es del 99% en todos los casos. Esto era lo que se esperaba para la frecuencia 90:10 a tiempo inicial, ya que en el inóculo había 9 veces más de esta cepa respecto a la ST578. Sin embargo, con el transcurso del tiempo este porcentaje podía o bien mantenerse o disminuir en el caso de que la ST578 desplazase a la ST23. No obstante, a lo largo del tiempo se mantiene la predominancia de la ST23.

Fijándonos en las distintas frecuencias de partida (t_0), se observa que no se corresponden con los porcentajes es la misma en las cuatro proporciones. Siempre se detecta más cantidad de ST23, incluso en las proporciones donde domina ST578. Este hecho puede explicarse bien porque la eficiencia de cada sonda a la hora de emitir la fluorescencia varía mucho, y la cuantificación no es correcta o también podría deberse a que la cuantificación mediante la OD no es precisa y no se han introducido las cantidades adecuadas de cada ST para conseguir las distintas proporciones de partida.

Por otro lado, centrándonos en dos tiempos en concreto (cada uno corresponde a una proporción distinta) de la competencia de las tres cepas simultáneamente (Tabla 4.3) se puede ver como la ST1 predomina sobre las otras dos. También se ve que la ST23 predomina sobre la ST578, con diferencias de hasta cuatro órdenes de magnitud.

Tabla 4.3. Cuantificación relativa de las tres ST.

		Cantidad ADNt (ng)	% ST1	% ST23	% ST578
1:4:4	t_4	4.10	99.95	0.053	2.1933E-06
4:4:1	t_5	0.64	99.67	0.334	3.1214E-06

Al igual que ocurría con el ST23 en la competencia ST23 – ST578, el porcentaje de ST1 es del 99%. Esto puede deberse también a lo comentado previamente sobre la eficacia de la sonda o sobre la precisión de la cuantificación mediante la OD. Los tiempos tomados son intermedios por lo que los crecimientos ya estaban establecidos. Además, se ve como a pesar de partir de menor cantidad de ST1 (1:4:4) con el tiempo, el porcentaje es igual que el cultivo 4:4:1 donde se partía de una cantidad superior.

5. CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos hasta el momento son resultado preliminares, ya que para sacar conclusiones fiables habría que modificar algunos pasos y corroborar otros. Sin embargo, a pesar de la escasez de datos se puede entrever la existencia de competencia en cultivo entre cepas, siendo la ST1 la que mejor se adapta y por tanto su presencia desplaza el crecimiento de los otras dos ST. A su vez, la ST23 desplazaría a la ST578.

No existe ningún trabajo previo que muestre la existencia de este tipo de competencia *in vitro*, y los resultados preliminares mostrados aquí abren la posibilidad de que esto ocurra, y por tanto una nueva línea de trabajo. Si realmente ocurre, este hecho tendría una gran importancia tanto durante el análisis de brotes como durante los protocolos de vigilancia epidemiológica rutinaria. El hecho de que el ST1 desplace al resto es congruente con el conocimiento ampliamente establecido de que este perfil de *L. pneumophila* es el más extendido a nivel mundial. Independientemente de si la muestra procede de un paciente o de una fuente ambiental, si ST1 está presente, aunque haya otros en el mismo medio, podría ser que desplazase al resto en cultivo y sólo se detectase este perfil. Por tanto, los resultados que se estarían obteniendo en el diagnóstico clínico y ambiental estarían muy sesgados, pues se estaría mostrando sólo una pequeña parte de la variabilidad real de *L. pneumophila* en una misma fuente, tanto ambiental como clínica. Además, ya se ha demostrado experimentalmente la presencia de distintos STs en una misma fuente ambiental, como en el caso del brote ocurrido en Calpe (Vanaclocha et al., 2012) pero también de infecciones mixtas en pacientes afectados de legionelosis (Coscollá et al., 2013; Wewalka et al., 2013).

Esta competencia también tendría una importante repercusión para el estudio de brotes, ya que dificultaría el establecimiento de una relación entre las fuentes y el brote. Podría darse el caso de que una muestra ambiental/clínica, al cultivarla, revelase la presencia de *L. pneumophila* ST1, mientras que si se analiza otra muestra mediante SBT directa (por ejemplo, PCR a partir de extracción de ADN total de esputo sin pasar por cultivo) se detectara también la presencia de ST23 o ST578 en forma de perfiles completos o mixtos. Una situación similar a esta descrita es con la que se encuentra en el brote descrito en Vanaclocha et al. (2012).

Igualmente, las condiciones dentro de los macrófagos alveolares son distintas a las condiciones *in vitro*, por tanto en los casos clínicos, la eficacia de las distintas ST en este ambiente también pueden variar, introduciendo una dificultad añadida a la posible competencia en cultivo microbiológico. Un paso futuro para el estudio de la competencia de las cepas clínicas sería realizar el crecimiento en macrófagos.

El trabajo presentado tiene una serie de limitaciones y habría que plantearse algunas modificaciones previas a la qPCR para optimizar los resultados. Por un lado, volver a diseñar unos cebadores y sonda para la ST1. Por otro lado, comprobar la exactitud de la cuantificación mediante la OD. En cuanto a la qPCR, realizar de nuevo una curva de calibrado utilizando otra muestra para partir de una concentración mayor. De este modo, abarcar un mayor rango de concentraciones. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, este trabajo abre un campo de estudio muy interesante en la epidemiología de este patógeno ambiental, del que aún queda mucho que estudiar para poder llegar a entender completamente su dinámica en el ambiente, su dispersión e infección oportunista a humanos.

6. REFERENCIAS

- ABU KWAIK, YOUSEF, LIAN-YONG GAO, BARBARA J. STONE, CHANDRASEKAR VENKATARAMAN, AND OMAR S. HARB. 1998. "Invasion of Protozoa by *Legionella pneumophila* and Its Role in Bacterial Ecology and Pathogenesis." *Appl. Envir. Microbiol.* 64(9):3127–33. (<http://aem.asm.org/content/64/9/3127>).
- AL-BANA, BADI H., MOREEN T. HADDAD, AND RAFAEL A. GARDUÑO. 2014. "Stationary Phase and Mature Infectious Forms of *Legionella pneumophila* Produce Distinct Viable but Non-Culturable Cells." *Environmental microbiology* 16(2):382–95. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23968544>).
- AL-QUADAN, TASNEEM, CHRISTOPHER T. PRICE, AND YOUSEF ABU KWAIK. 2012. "Exploitation of Evolutionarily Conserved Amoeba and Mammalian Processes by *Legionella*." *Trends in microbiology* 20(6):299–306. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3603140&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- CAZALET, CHRISTEL et al. 2008. "Multigenome Analysis Identifies a Worldwide Distributed Epidemic *Legionella pneumophila* Clone That Emerged within a Highly Diverse Species." *Genome research* 18(3):431–41. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2259107&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGÍA, 2009. "Brotos de legionelosis notificados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Años 1999 a 2009" Visitado el 27 de Agosto, 2014 (http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/Legionelosis_informe_brotos_RENAVE.pdf).
- CIRILLO, S. L., L. E. BERMUDEZ, S. H. EL-ETR, G. E. DUHAMEL, AND J. D. CIRILLO. 2001. "*Legionella pneumophila* Entry Gene *rtxA* Is Involved in Virulence." *Infection and immunity* 69(1):508–17. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=97910&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- CIRILLO, S. L., J. LUM, AND J. D. CIRILLO. 2000. "Identification of Novel Loci Involved in Entry by *Legionella pneumophila*." *Microbiology (Reading, England)* 146 (Pt 6):1345–59. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10846213>).
- D'AURIA, GIUSEPPE, NURIA JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ, FRANCESC PERIS-BONDIA, ANDRÉS MOYA, AND AMPARO LATORRE. 2010. "*Legionella pneumophila* Pangenome Reveals Strain-Specific Virulence Factors." *BMC Genomics* 11(1):181. (<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/181>).
- DESCOURS, G. et al. 2012. "Contribution of Amoebic Coculture to Recovery of *Legionella* Isolates from Respiratory Samples: Prospective Analysis over a Period of 32 Months." *Journal of clinical microbiology* 50(5):1725–26. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3347135&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

- DESCOURS, G. et al. 2014. "Evaluation of BMPA, MWY, GVPC and BCYE Media for the Isolation of *Legionella* Species from Respiratory Samples." *Journal of microbiological methods* 98:119–21. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24462808>).
- EDELSTEIN, P. H. 1982. "Comparative Study of Selective Media for Isolation of *Legionella pneumophila* from Potable Water." *Journal of clinical microbiology* 16(4):697–99. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=272448&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- ELENA, SANTIAGO F., AND RICHARD E. LENSKI. 2003. "Evolution Experiments with Microorganisms: The Dynamics and Genetic Bases of Adaptation." *Nature reviews. Genetics* 4(6):457–69. (<http://dx.doi.org/10.1038/nrg1088>).
- FEIKOVÁ, S., AND C. KLEMENT. 2007. "[Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Its Practical Use]." *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství* 13(6):236–41. Retrieved August 27, 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18320503>).
- DE FELIPE, KARIM SUWWAN et al. 2005. "Evidence for Acquisition of *Legionella* Type IV Secretion Substrates via Interdomain Horizontal Gene Transfer." *Journal of bacteriology* 187(22):7716–26. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1280299&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- FIELDS, BARRY S., ROBERT F. BENSON, AND RICHARD E. BESSER. 2002. "*Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation." *Clinical microbiology reviews* 15(3):506–26. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=118082&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- FRASER, D. W. et al. 1977. "Legionnaires' Disease: Description of an Epidemic of Pneumonia." *The New England journal of medicine* 297(22):1189–97. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/335244>).
- GARCÍA, MARÍA TERESA, SNAKE JONES, CARMEN PELAZ, RICHARD D. MILLAR, AND YOUSEF ABU KWAIK. 2007. "*Acanthamoeba polyphaga* Resuscitates Viable Non-Culturable *Legionella pneumophila* after Disinfection." *Environmental microbiology* 9(5):1267–77. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17472639>).
- GARDUÑO, RAFAEL A., ELIZABETH GARDUÑO, MARGOT HILTZ, AND PAUL S. HOFFMAN. 2002. "Intracellular Growth of *Legionella pneumophila* Gives Rise to a Differentiated Form Dissimilar to Stationary-Phase Forms." *Infection and immunity* 70(11):6273–83. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=130304&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- GLICK, T. H. et al. 1978. "Pontiac Fever. An Epidemic of Unknown Etiology in a Health Department: I. Clinical and Epidemiologic Aspects." *American journal of epidemiology* 107(2):149–60. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/623097>).
- GOMEZ-VALERO, L., C. RUSNIOK, AND C. BUCHRIESER. 2009. "*Legionella pneumophila*: Population Genetics, Phylogeny and Genomics." *Infection, genetics and evolution* :

journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 9(5):727–39. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19450709>).

GOMEZ-VALERO, LAURA, CHRISTOPHE RUSNIOK, SOPHIE JARRAUD, et al. 2011. “Extensive Recombination Events and Horizontal Gene Transfer Shaped the *Legionella pneumophila* Genomes.” *BMC genomics* 12:536. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3218107&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

GOMEZ-VALERO, LAURA, CHRISTOPHE RUSNIOK, CHRISTEL CAZALET, AND CARMEN BUCHRIESER. 2011. “Comparative and Functional Genomics of *Legionella* Identified Eukaryotic like Proteins as Key Players in Host-Pathogen Interactions.” *Frontiers in microbiology* 2:208. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3203374&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

HÄGELE, S. et al. 2000. “*Dictyostelium discoideum*: A New Host Model System for Intracellular Pathogens of the Genus *Legionella*.” *Cellular microbiology* 2(2):165–71. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207573>).

HORWITZ, M. A. 1984. “Phagocytosis of the Legionnaires’ Disease Bacterium (*Legionella pneumophila*) Occurs by a Novel Mechanism: Engulfment within a Pseudopod Coil.” *Cell* 36(1):27–33. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6692469>).

JAMES, B. W., W. S. MAUCLINE, R. B. FITZGEORGE, P. J. DENNIS, AND C. W. KEEVIL. 1995. “Influence of Iron-Limited Continuous Culture on Physiology and Virulence of *Legionella pneumophila*.” *Infection and immunity* 63(11):4224–30. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=173600&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

KHAN, MOHAMMAD ADIL et al. 2013. “Comparative Genomics Reveal That Host-Innate Immune Responses Influence the Clinical Prevalence of *Legionella pneumophila* Serogroups.” *PloS one* 8(6):e67298. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3694923&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

LEE, T. C., R. M. VICKERS, V. L. YU, AND M. M. WAGENER. 1993. “Growth of 28 *Legionella* Species on Selective Culture Media: A Comparative Study.” *Journal of clinical microbiology* 31(10):2764–68. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=266009&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

LILES, M. R., T. A. SCHEEL, AND N. P. CIANCOTTO. 2000. “Discovery of a Nonclassical Siderophore, Legiobactin, Produced by Strains of *Legionella pneumophila*.” *Journal of bacteriology* 182(3):749–57. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=94339&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

MAUCLINE, W. S. et al. 1992. “Physiology and Morphology of *Legionella pneumophila* in Continuous Culture at Low Oxygen Concentration.” *Journal of general microbiology* 138(11):2371–80. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1479356>).

- MCDADE, J. E. et al. 1977. "Legionnaires' Disease: Isolation of a Bacterium and Demonstration of Its Role in Other Respiratory Disease." *The New England journal of medicine* 297(22):1197–1203. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/335245>).
- MOLMERET, MAËLLE, MATTHIAS HORN, MICHAEL WAGNER, MARINA SANTIC, AND YOUSEF ABU KWAIK. 2005. "Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens." *Applied and environmental microbiology* 71(1):20–28. (<http://aem.asm.org/content/71/1/20.full>).
- MUDER, ROBERT R., AND VICTOR L. YU. 2002. "Infection due to *Legionella* Species Other than *L. pneumophila*." *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 35(8):990–98. (<http://cid.oxfordjournals.org/cgi/content/long/35/8/990>).
- MURDOCH, DAVID R. 2003. "Diagnosis of *Legionella* Infection." *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 36(1):64–69. R (<http://cid.oxfordjournals.org/cgi/content/long/36/1/64>).
- NEWTON, HAYLEY J., DESMOND K. Y. ANG, IAN R. VAN DRIEL, AND ELIZABETH L. HARTLAND. 2010. "Molecular Pathogenesis of Infections Caused by *Legionella pneumophila*." *Clinical microbiology reviews* 23(2):274–98. Retrieved July 24, 2014 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2863363&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- NEWTON, HAYLEY J., FIONA M. SANSOM, VICKI BENNETT-WOOD, AND ELIZABETH L. HARTLAND. 2006. "Identification of *Legionella pneumophila*-Specific Genes by Genomic Subtractive Hybridization with *Legionella micdadei* and Identification of IpnE, a Gene Required for Efficient Host Cell Entry." *Infection and immunity* 74(3):1683–91. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1418643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- RAO, CHITONG, HADAS BENHABIB, AND ALEXANDER W. ENSMINGER. 2013. "Phylogenetic Reconstruction of the *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 Laboratory Strains through Comparative Genomics." *PloS one* 8(5):e64129. R (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3661481&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- RED NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2011. "Protocolo de Vigilancia de Legionelosis." Visitado el 27 de Agosto, 2014 (https://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/287209-PROTOCOLO_DE_VIGILANCIA_DE_LEGIONELOSIS.pdf).
- REEVES, M. W., L. PINE, S. H. HUTNER, J. R. GEORGE, AND W. K. HARRELL. 1981. "Metal Requirements of *Legionella pneumophila*." *Journal of clinical microbiology* 13(4):688–95. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=273860&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- REUTER, SANDRA et al. 2013. "A Pilot Study of Rapid Whole-Genome Sequencing for the Investigation of a *Legionella* Outbreak." *BMJ open* 3(1):e002175–. (<http://bmjopen.bmj.com/cgi/content/long/3/1/e002175>).

- RICHARDS, ASHLEY M., JUANITA E. VON DWINGELO, CHRISTOPHER T. PRICE, AND YOUSEF ABU KWAIK. 2013. "Cellular Microbiology and Molecular Ecology of *Legionella*-Amoeba Interaction." *Virulence* 4(4):307–14. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3710333&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- RIDENOUR, DENNIS A., SUAT L. G. CIRILLO, SHENG FENG, MUSTAPHA M. SAMRAKANDI, AND JEFFREY D. CIRILLO. 2003. "Identification of a Gene That Affects the Efficiency of Host Cell Infection by *Legionella pneumophila* in a Temperature-Dependent Fashion." *Infection and Immunity* 71(11):6256–63. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=219575&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- ROGERS, J., A. B. DOWSETT, P. J. DENNIS, J. V LEE, AND C. W. KEEVIL. 1994. "Influence of Temperature and Plumbing Material Selection on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in a Model Potable Water System Containing Complex Microbial Flora." *Applied and Environmental Microbiology* 60(5):1585–92. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=201521&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- SÁNCHEZ-BUSÓ, L., I. COMAS, G. JORQUES, F. GONZÁLEZ-CANDELAS. 2014. Recombination drives genome evolution in outbreak-related *Legionella pneumophila* isolates. *Nature Genetics* (En prensa).
- STEINERT, M., L. EMODY, R. AMANN, AND J. HACKER. 1997. "Resuscitation of Viable but Nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba Castellanii*." *Appl. Environ. Microbiol.* 63(5):2047–53. (<http://aem.asm.org/cgi/content/long/63/5/2047>).
- VANACLOCHA H., S. GUIRAL, V. MORERA, M.A. CALATAYUD, M. CASTELLANOS, V. MOYA, G. JEREZ, F. GONZÁLEZ. 2012. Preliminary report: Outbreak of Legionnaires' disease in a hotel in Calp, Spain, update on 22 February 2012. *Eurosurveillance* 17(8):pii=20093.
- WEWALKA, G., D. SCHMID, T.G. HARRISON, S.A. ULUM, C. LÜCK. 2013. Dual infections with different *Legionella* strains. *Clin. Microbiol. Infect.* <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12311>.
- YU, VICTOR L. et al. 2002. "Distribution of *Legionella* Species and Serogroups Isolated by Culture in Patients with Sporadic Community-Acquired Legionellosis: An International Collaborative Survey." *The Journal of Infectious Diseases* 186(1):127–28. (<http://jid.oxfordjournals.org/cgi/content/long/186/1/127>).

8. ANEXOS

8.1. Script Python para obtener secuencias únicas de cada ST

```
#!/usr/bin/python
import sys

## open data file ##
infile1=open(sys.argv[1]) #ST1 file
infile2=open(sys.argv[2]) #ST23 file
infile3=open(sys.argv[3]) #ST578 file

##create a list for each file where I keep protein ##
lista1=[]
lista2=[]
lista3=[]
set1=set()
set2=set()
set3=set()

##read line each file ##
for line in infile1:
    if '>PROKKA' in line:
        if not 'hypothetical protein' in line:
            protein=line.strip().split()[1:]
            lista1.append(' '.join(protein))
            set1.add(' '.join(protein))
for line in infile2:
    if '>PROKKA' in line:
        if not 'hypothetical protein' in line:
            protein=line.strip().split()[1:]
            lista2.append(' '.join(protein))
            set2.add(' '.join(protein))
for line in infile3:
    if '>PROKKA' in line:
        if not 'hypothetical protein' in line:
            protein=line.strip().split()[1:]
            lista3.append(' '.join(protein))
            set3.add(' '.join(protein))

## proteins in 1 but not in set2 ##
set12= set1 - set2
set123= set12 -set3

## proteins in 3 but not in set1 ##
set31= set3 - set1
set312= set31 - set2

## proteins in 2 but not in set3 ##
set23= set2 - set3
set231= set23 - set1

## create outfile ##
outfile1=open('ST1.txt','w')
outfile2=open('ST23.txt','w')
outfile3=open('ST578.txt','w')

for i in set123:
    outfile1.write(i+'\n')
for i in set231:
    outfile2.write(i+'\n')
for i in set312:
    outfile3.write(i+'\n')
```

Figura 8.1. Script python para tomar las proteínas únicas.

8.3. Peso molecular

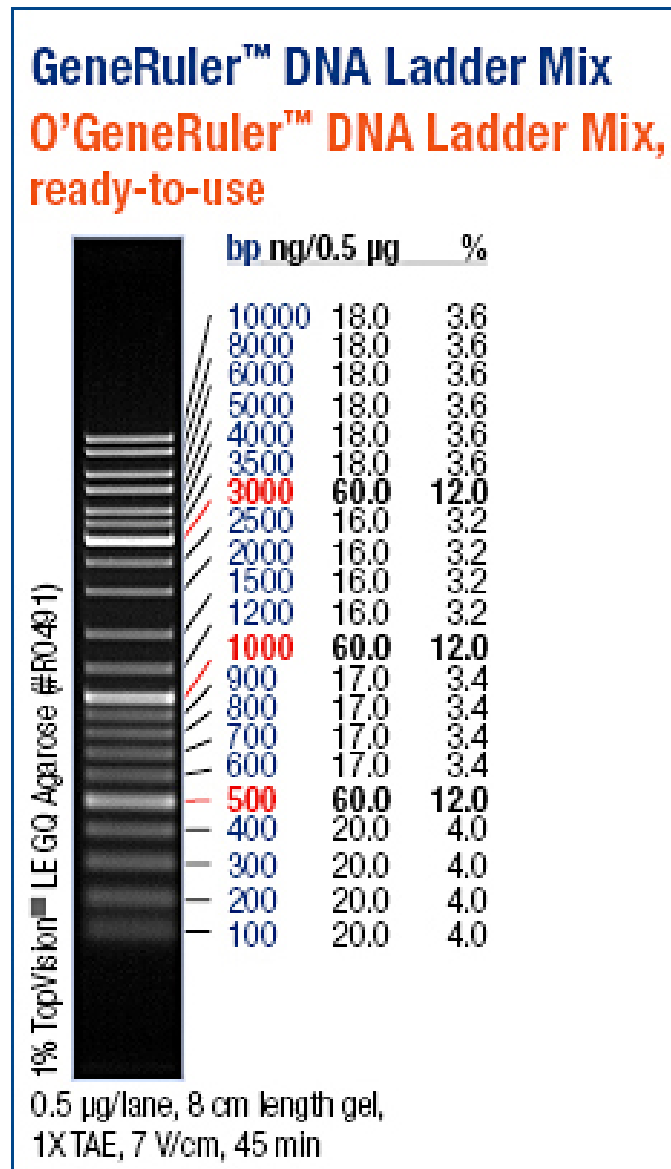


Figura 8.2. Marcador de peso molecular.

8.4. Curvas de crecimiento

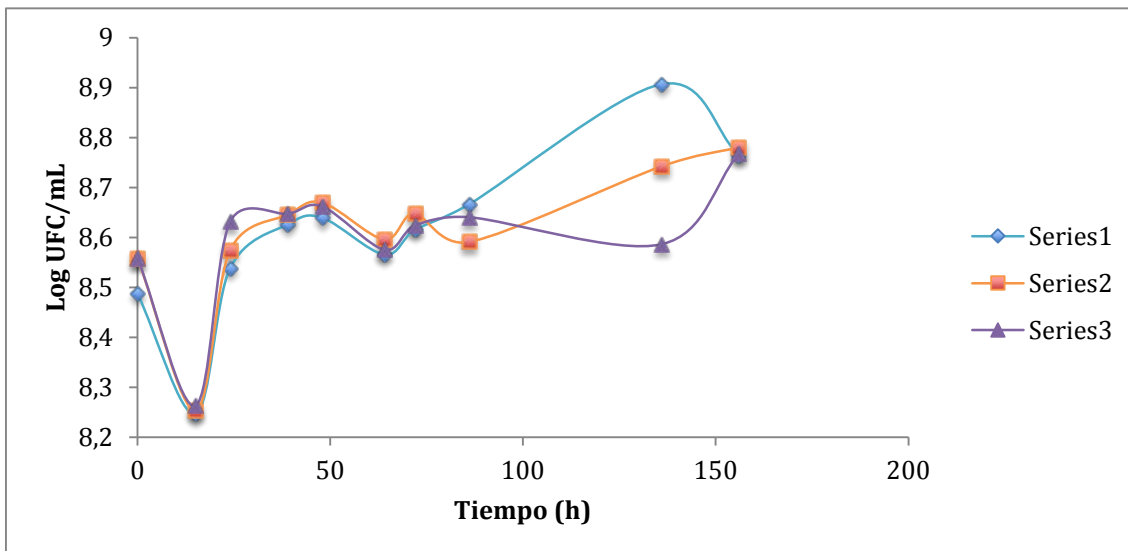


Figura 8.3. Curva de crecimiento de los tres competidores (1:4:4).

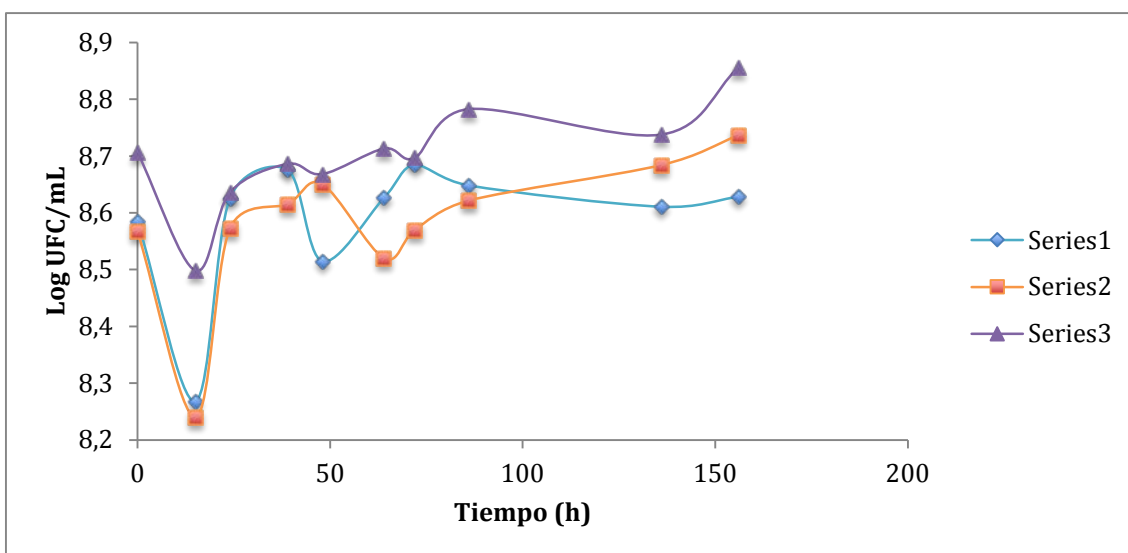


Figura 8.4. Curva de crecimiento de los tres competidores (4:1:4).

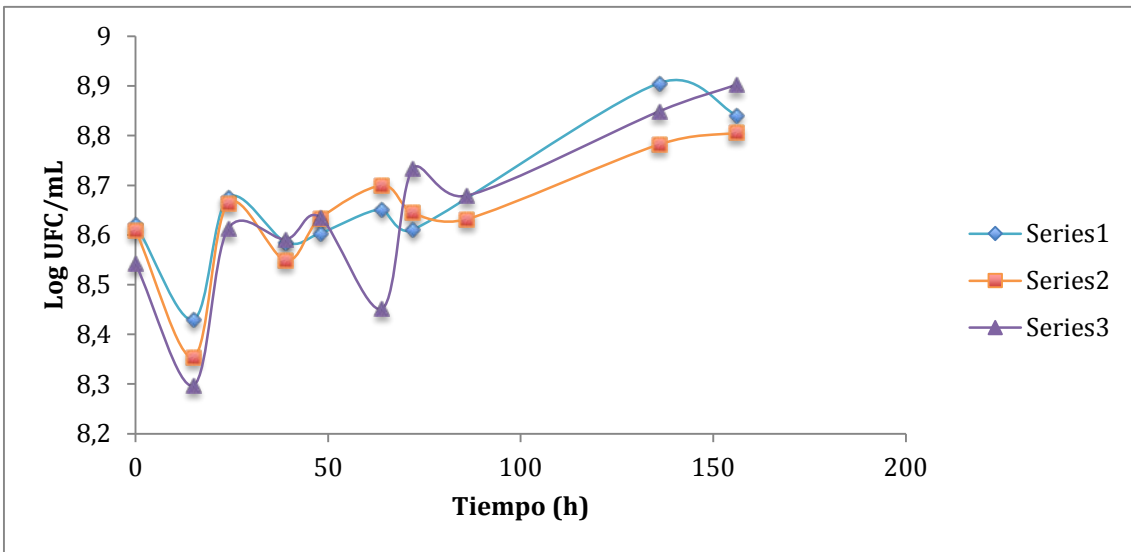


Figura 8.5. Curva de crecimiento de los tres competidores (4:1:4).

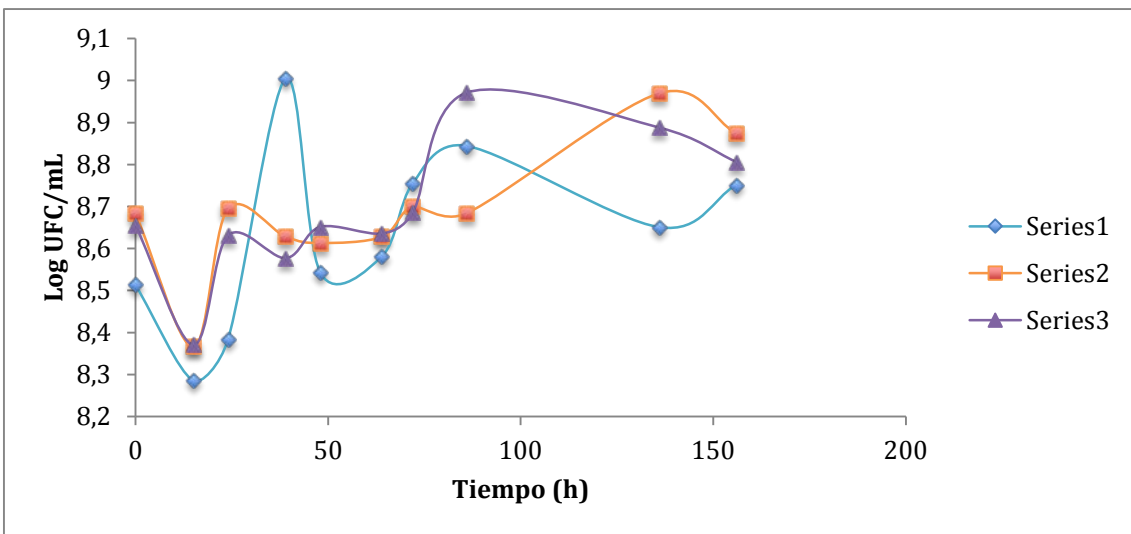


Figura 8.6. Curva de crecimiento ST1-ST23 (90:10).

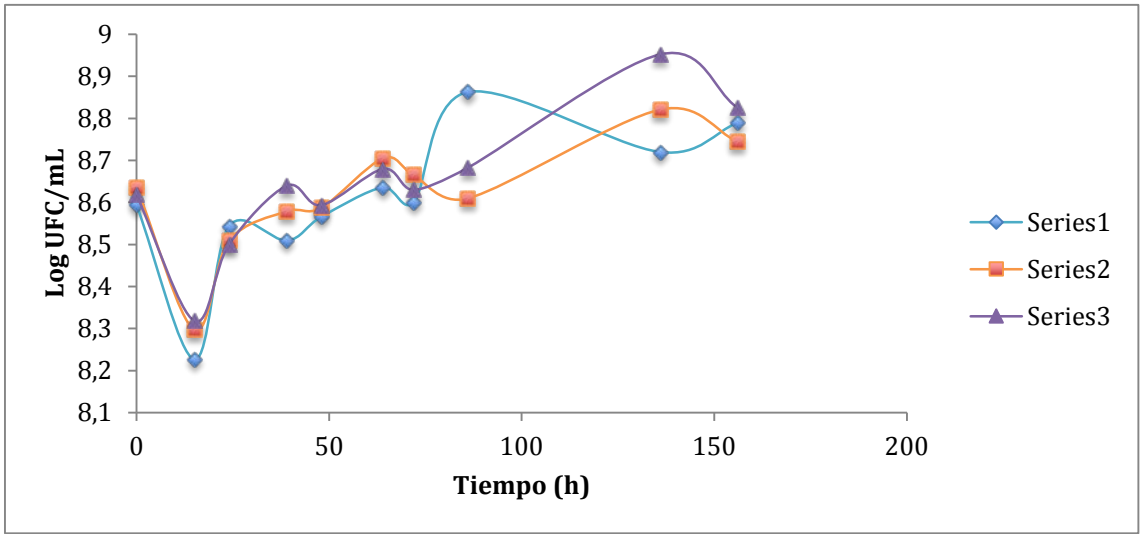


Figura 8.7. Curva de crecimiento ST1-ST23 (70:30).

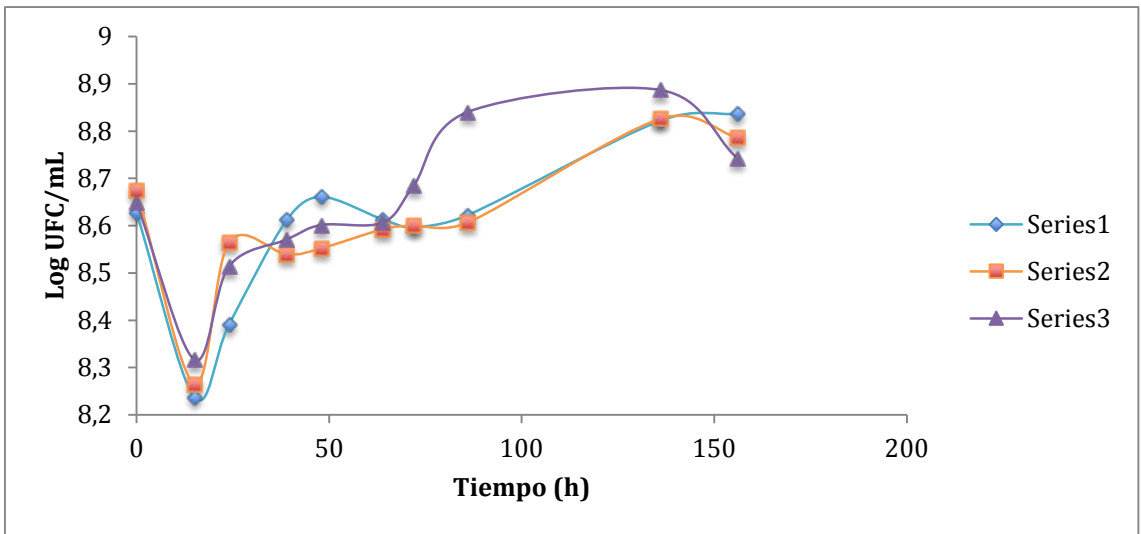


Figura 8.8. Curva de crecimiento ST1-ST23 (50:50).

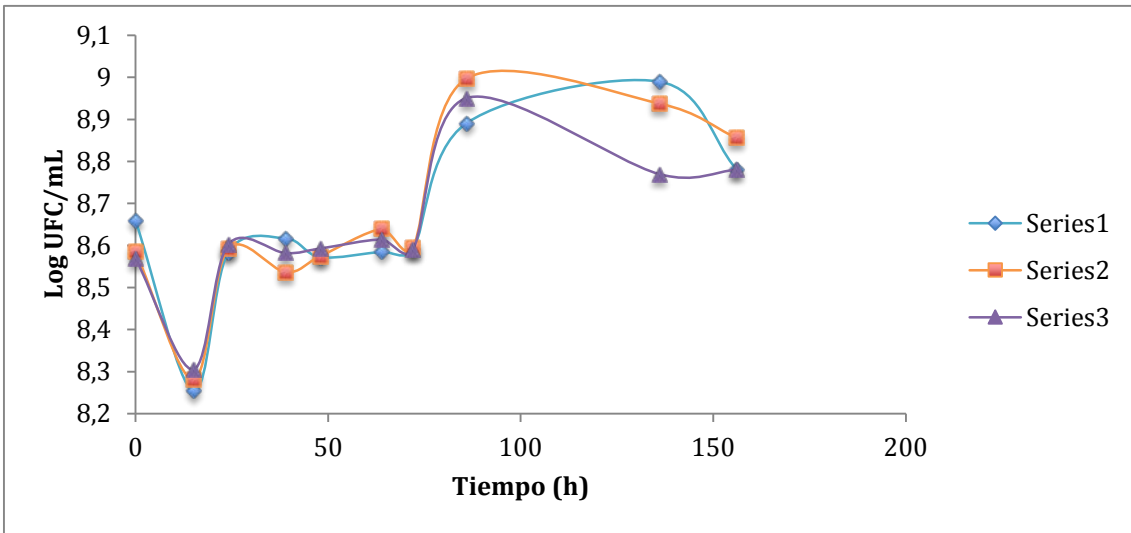


Figura 8.9. Curva de crecimiento ST1-ST23 (30:70).

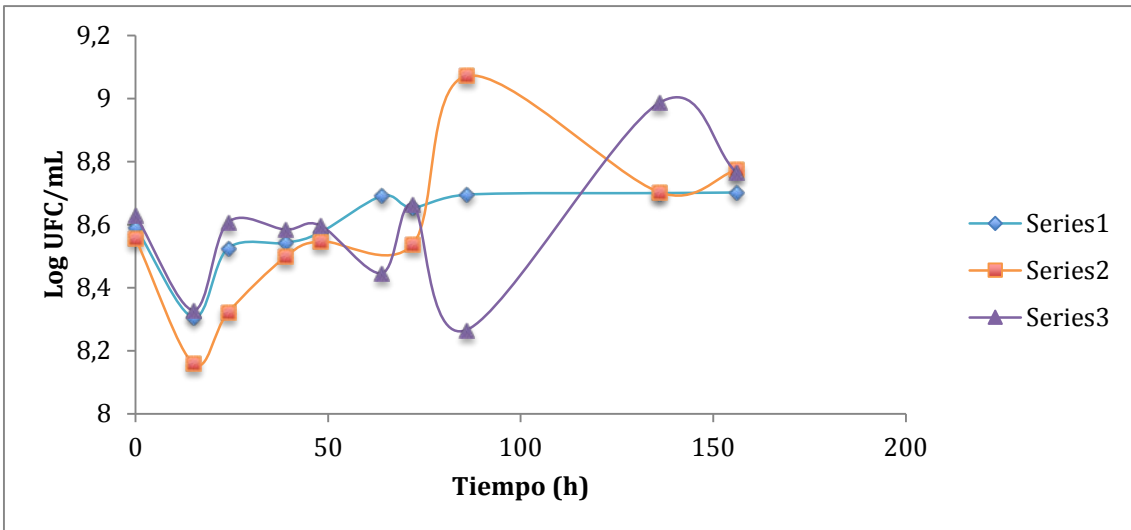


Figura 8.10. Curva de crecimiento ST1-ST23 (10:90).

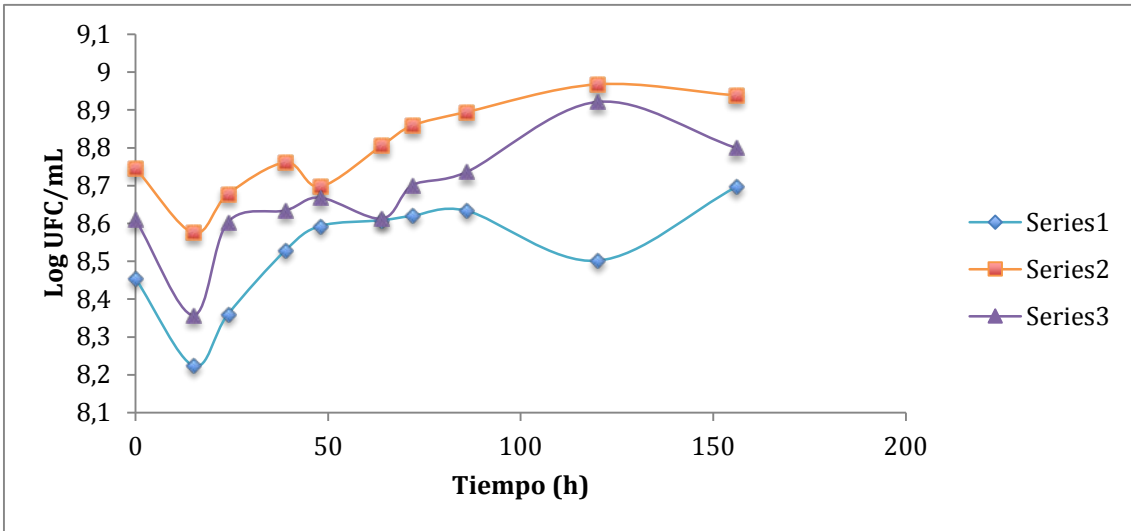


Figura 8.11. Curva de crecimiento ST1-ST578 (90:10).

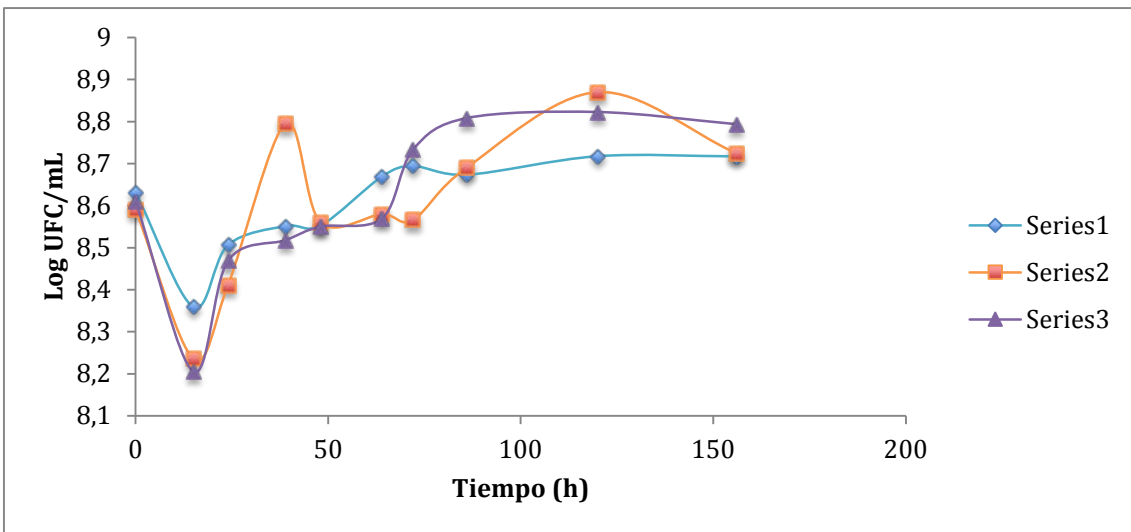


Figura 8.12. Curva de crecimiento ST1-ST578 (70:30).

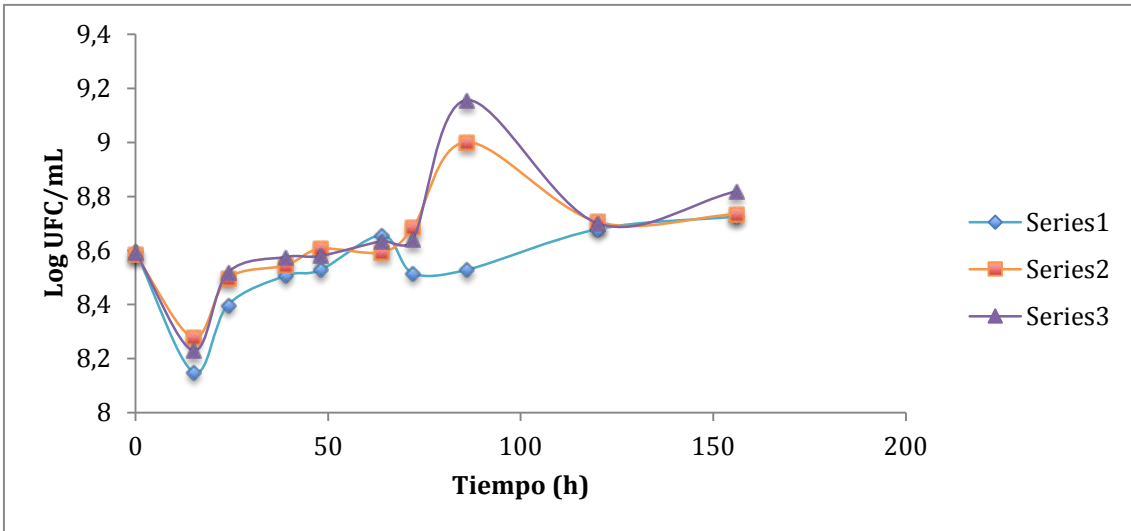


Figura 8.13. Curva de crecimiento ST1-ST578 (50:50).

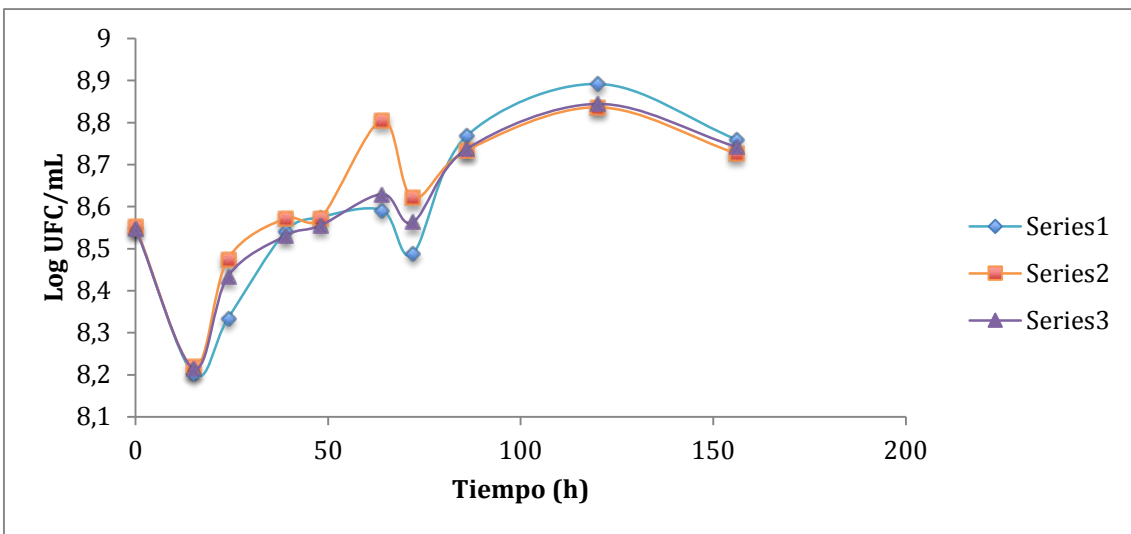


Figura 8.14. Curva de crecimiento ST1-ST578 (30:70).

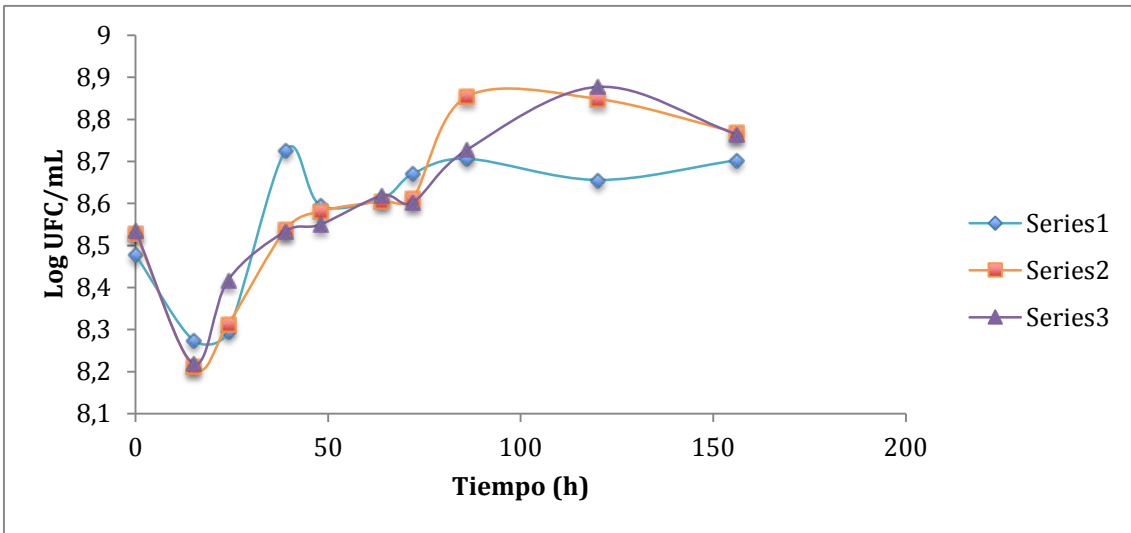


Figura 8.15. Curva de crecimiento ST1-ST578 (10:90).

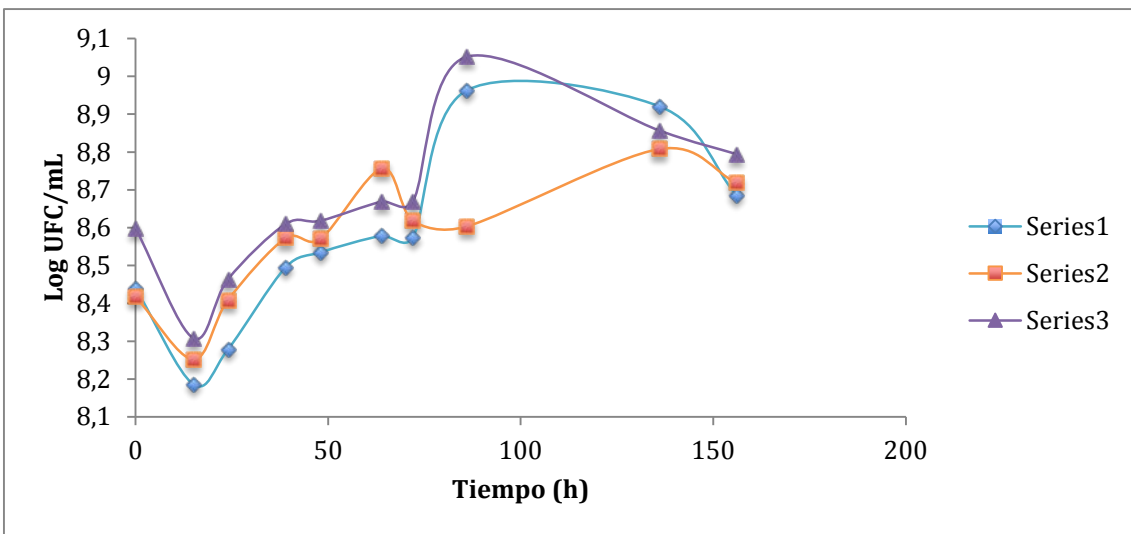


Figura 8.16. Curva de crecimiento ST23-ST578 (90:10).

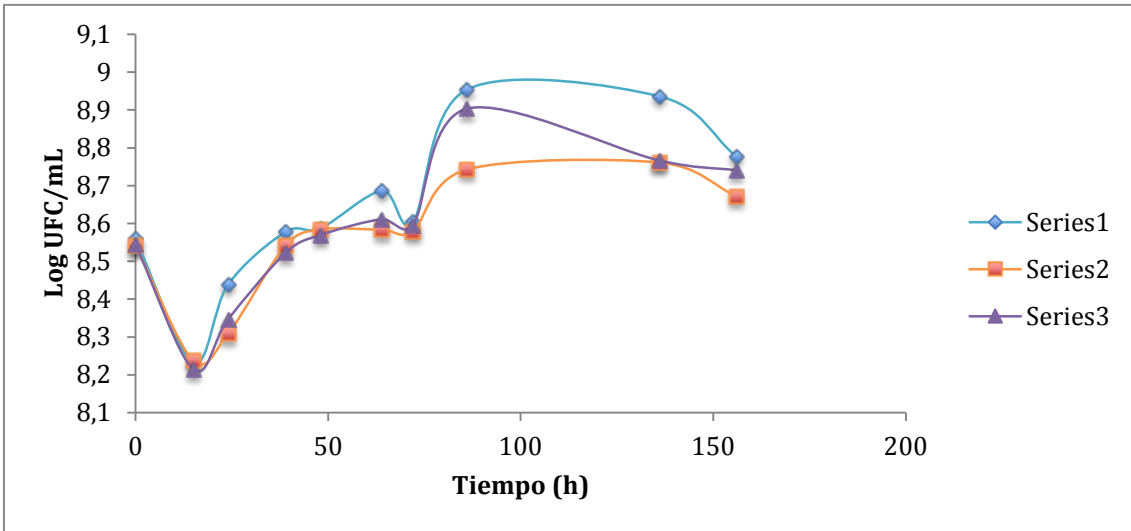


Figura 8.17. Curva de crecimiento ST23-ST578 (70:30).

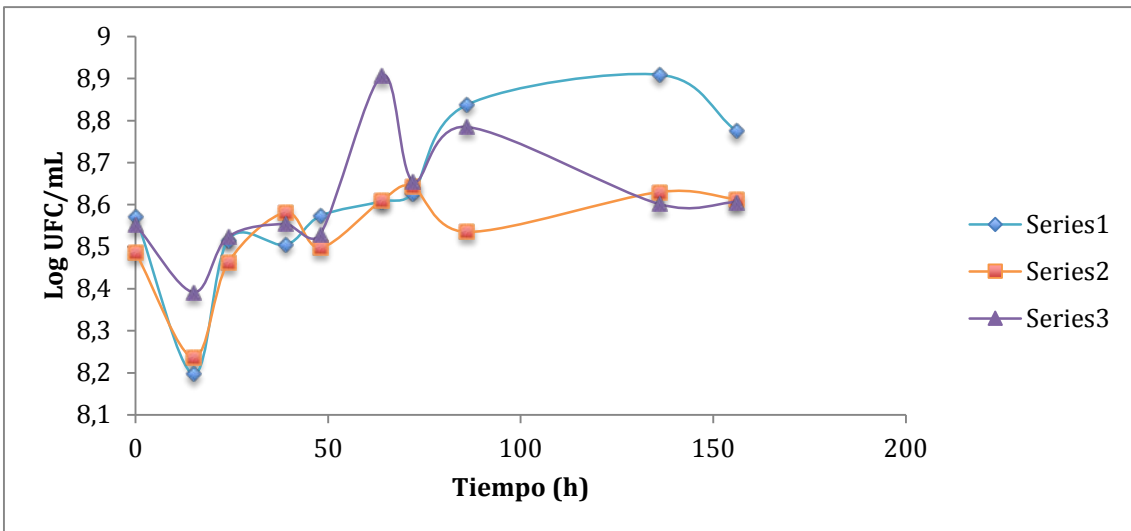


Figura 8.18. Curva de crecimiento ST23-ST578 (50:50).

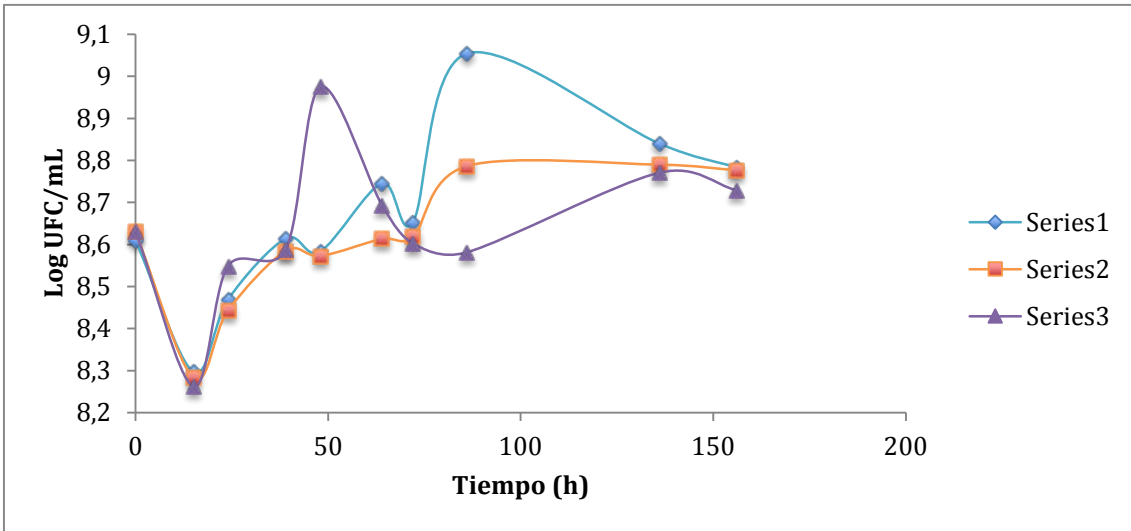


Figura 8.19. Curva de crecimiento ST23-ST578 (30:70).

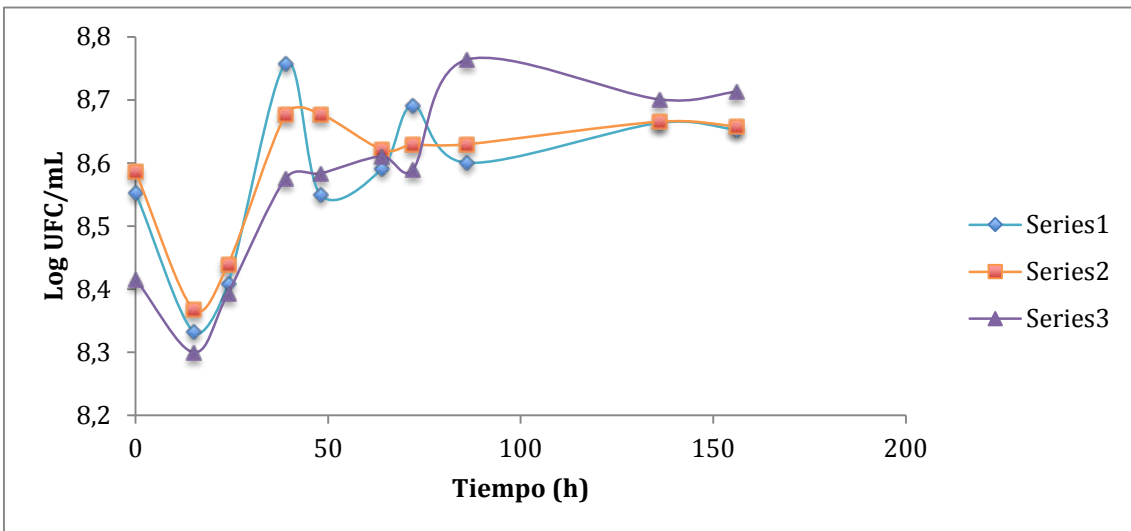


Figura 8.20. Curva de crecimiento ST23-ST578 (10:90).

8.5. Valores de la cuantificación absoluta

NOTA 1: la concentración está en ng.

NOTA 2: la concentración en verde la ha proporcionado el LightCycler 480 y la concentración en azul se ha calculado con la extrapolación.

Tabla 8.2. Cuantificación tres competidores con filtro de HEX (ST1).

HEX		Cp media	Concentración media	Log Concentración
1:1:1	t ₀	-		
	t ₁	-		
	t ₂	-		
	t ₃	-		
	t ₄	-		
	t ₅	-		
	t ₆	-		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
1:4:4	t ₀	-		
	t ₁	-		
	t ₂	-		
	t ₃	-		
	t ₄	28,98833274	4,098530723	0,612628195
	t ₅	-		
	t ₆	-		
	t ₇	48,79972951	5,90161E-06	-5,229029165
	t ₈	-		
	t ₉	-		
4:1:4	t ₀	-		
	t ₁	-		
	t ₂	-		
	t ₃	-		
	t ₄	-		
	t ₅	46,93869459	2,08796E-05	-4,680277935
	t ₆	48	1,01574E-05	-4,99321814
	t ₇	-		
	t ₈	27,78006221	9,309000327	0,968903046
	t ₉	37,27500507	0,014763563	-1,830808832
4:4:1	t ₀	-		
	t ₁	-		
	t ₂	-		
	t ₃	31,72074409	0,64112082	-0,19306012
	t ₄	-		
	t ₅	-		
	t ₆	-		
	t ₇	-		
	t ₈	33,36471664	0,209987003	-0,677807585
	t ₉	-		

Tabla 8.3. Cuantificación tres competidores con filtro de FAM (ST23).

FAM		Cp media	Concentración media	Log Concentración
1:1:1	t ₀	30,3680173	0,003092819	-2,509645476
	t ₁	31,01126893	0,002044584	-2,689394996
	t ₂	30,48172231	0,002874623	-2,541419078
	t ₃	29,81627901	0,004410945	-2,355468341
	t ₄	30,43688525	0,002958763	-2,528889858
	t ₅	30,90615127	0,002187656	-2,660021032
	t ₆	31,06450401	0,001975737	-2,704270946
	t ₇	31,14924048	0,001870899	-2,727949613
	t ₈	-		
	t ₉	-		
1:4:4	t ₀	29,90815971	0,004157733	-2,381143383
	t ₁	30,37519262	0,003078573	-2,511650539
	t ₂	30,8554991	0,002260129	-2,645866846
	t ₃	30,47920886	0,002879276	-2,540716723
	t ₄	30,91295439	0,0021781	-2,661922091
	t ₅	31,40649842	0,001585486	-2,799837485
	t ₆	31,22145159	0,00178596	-2,748128202
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
4:1:4	t ₀	31,53233117	0,001462177	-2,835000049
	t ₁	31,85435261	0,001188542	-2,92498536
	t ₂	31,63295728	0,001370507	-2,863118896
	t ₃	30,58021402	0,002698103	-2,568941492
	t ₄	-		
	t ₅	-		
	t ₆	-		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
4:4:1	t ₀	30,50050078	0,002840099	-2,546666512
	t ₁	30,56814932	0,002719129	-2,565570145
	t ₂	29,2627936	0,006297918	-2,200802995
	t ₃	30,93553574	0,002146682	-2,668232197
	t ₄	31,11680548	0,001910355	-2,718886012
	t ₅	31,91896736	0,001140142	-2,943041235
	t ₆	-		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		

Tabla 8.4. Cuantificación tres competidores con filtro de Cy5 (ST578).

Cy5	Cp media	Concentración media	Log Concentración	
1:1:1	t ₀	30,72082823	5,7231E-08	-7,24236849
	t ₁	31,52908885	3,25526E-08	-7,487414761
	t ₂	30,98326559	4,76504E-08	-7,32193354
	t ₃	30,01001729	9,40012E-08	-7,026866751
	t ₄	29,89313487	1,01993E-07	-6,991430655
	t ₅	30,73350948	5,67266E-08	-7,246213158
	t ₆	30,86654526	5,16956E-08	-7,286546586
	t ₇	31,1127938	4,35308E-08	-7,361203552
	t ₈	34,22974901	4,9409E-09	-8,306193613
	t ₉	-		
1:4:4	t ₀	30,10617865	8,78981E-08	-7,056020692
	t ₁	31,03734596	4,5885E-08	-7,338329482
	t ₂	31,21024055	4,0668E-08	-7,390747196
	t ₃	30,77657216	5,50467E-08	-7,259268784
	t ₄	30,07329137	8,99394E-08	-7,046050014
	t ₅	30,85557905	5,20929E-08	-7,283221881
	t ₆	30,72710661	5,69807E-08	-7,244271955
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
4:1:4	t ₀	31,11489466	4,3467E-08	-7,361840488
	t ₁	32,0457862	2,26952E-08	-7,644065668
	t ₂	31,351418	3,68511E-08	-7,433548995
	t ₃	30,23682104	8,02364E-08	-7,095628498
	t ₄	32,67933565	1,45833E-08	-7,83614348
	t ₅	-		
	t ₆	-		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
4:4:1	t ₀	32,08536066	2,20768E-08	-7,656063747
	t ₁	32,37995915	1,7973E-08	-7,74537932
	t ₂	30,63092257	6,09381E-08	-7,215111135
	t ₃	32,2212401	2,00789E-08	-7,697259308
	t ₄	32,31254046	1,88391E-08	-7,724939505
	t ₅	34,5942863	3,83078E-09	-8,416713043
	t ₆	31,64210152	3,00831E-08	-7,521677638
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		

Tabla 8.5. Cuantificación ST1-ST23 con filtro HEX (ST1).

HEX		Cp media	Concentración media	Log Concentración
90:10	t ₀	28,62148013	4,081361409	0,610805054
	t ₁	-		
	t ₂	38,5158839	0,004288375	-2,367707271
	t ₃	-		
	t ₄	-		
	t ₅	37,96855146	0,00626695	-2,202943789
	t ₆	-		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
70:30	t ₀	-		
	t ₁	-		
	t ₂	-		
	t ₃	-		
	t ₄	19,54625737	2201,503196	3,34271932
	t ₅	-		
	t ₆	-		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
50:50	t ₀	-		
	t ₁	-		
	t ₂	-		
	t ₃	-		
	t ₄	-		
	t ₅	-		
	t ₆	-		
	t ₇	-		
	t ₈	24,08715419	94,5743075	1,97577317
	t ₉	-		
30:70	t ₀	5	52671915,63	7,721579114
	t ₁	-		
	t ₂	-		
	t ₃	-		
	t ₄	-		
	t ₅	-		
	t ₆	-		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	35,94771841	0,025432413	-1,594612426

Tabla 8.6. Cuantificación ST1-ST23 con filtro FAM (ST23).

FAM		Cp media	Concentración media	Log Concentración
90:10	t ₀	33,85212781	0,000323239	-3,490476516
	t ₁	36,20360593	8,13E-05	-4,089861913
	t ₂	32,93287092	0,000591065	-3,22836465
	t ₃	35,03539711	0,000150655	-3,822017602
	t ₄	35,91541237	8,70E-05	-4,060654406
	t ₅	37,22973367	3,64E-05	-4,438853868
	t ₆	36,99120725	4,41E-05	-4,355791648
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
70:30	t ₀	33,74236444	0,000346909	-3,459783953
	t ₁	34,01537318	0,000291334	-3,535608363
	t ₂	32,6888102	0,000686412	-3,163415073
	t ₃	34,30595724	0,000253485	-3,596046923
	t ₄	36,53667348	5,71E-05	-4,243068731
	t ₅	-		
	t ₆	38,25123235	1,88E-05	-4,725632341
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
50:50	t ₀	32,50083912	0,000782597	-3,106461919
	t ₁	31,0873923	0,00193554	-2,713197823
	t ₂	32,73971138	0,000667393	-3,175618092
	t ₃	34,88507883	0,000166639	-3,778222438
	t ₄	37,20651287	3,97E-05	-4,400714344
	t ₅	39,18974685	1,03E-05	-4,989113597
	t ₆	39,34450202	9,28E-06	-5,032560008
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
30:70	t ₀	32,38062752	0,000838098	-3,076705368
	t ₁	32,2862136	0,000897076	-3,047170618
	t ₂	30,57532821	0,002691815	-2,569954856
	t ₃	32,78277864	0,000645237	-3,190280909
	t ₄	34,59631059	0,000199738	-3,699539106
	t ₅	38,3166996	2,07E-05	-4,683493387
	t ₆	37,11158143	3,93E-05	-4,405683467
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		

Tabla 8.7. Cuantificación ST1-ST578 con filtro HEX (ST1).

HEX	Cp media	Concentración media	Log Concentración	
90:10	t ₀	-		
	t ₁	-		
	t ₂	-		
	t ₃	-		
	t ₄	-		
	t ₅	-		
	t ₆	-		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	47,87097961	1,52E-05	-4,819053486
70:30	t ₀	-		
	t ₁	-		
	t ₂	-		
	t ₃	-		
	t ₄	-		
	t ₅	-		
	t ₆	-		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
50:50	t ₀	-		
	t ₁	28,70853782	8,90053847	0,949416282
	t ₂	-		
	t ₃	-		
	t ₄	-		
	t ₅	-		
	t ₆	-		
	t ₇	37,84950005	0,015765671	-1,802287537
	t ₈	-		
	t ₉	-		
30:70	t ₀	-		
	t ₁	-		
	t ₂	-		
	t ₃	-		
	t ₄	-		
	t ₅	-		
	t ₆	-		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		

Tabla 8.8. Cuantificación ST1-ST578 con filtro Cy5 (ST578).

Cy5	Cp media	Concentración media	Log Concentración	
90:10	t ₀	34,00716745	6,12E-09	-8,213441559
	t ₁	37,56579364	5,19E-10	-9,284433632
	t ₂	35,94332409	1,63E-09	-8,788905054
	t ₃	33,11038294	1,21E-08	-7,917409276
	t ₄	35,21022352	2,94E-09	-8,531867603
	t ₅	37,22887227	6,60E-10	-9,180321824
	t ₆	36,01805839	1,52E-09	-8,817167586
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
70:30	t ₀	32,73017464	1,48E-08	-7,829929891
	t ₁	32,22608464	2,18E-08	-7,661347817
	t ₂	32,35985176	1,93E-08	-7,714177895
	t ₃	35,37274711	2,53E-09	-8,596968463
	t ₄	35,13930304	2,79E-09	-8,554628004
	t ₅	36,67104286	9,62E-10	-9,016917951
	t ₆	36,82446577	8,65E-10	-9,06310285
	t ₇	37,3155846	6,15E-10	-9,210944349
	t ₈	-		
	t ₉	-		
50:50	t ₀	32,42214561	1,84E-08	-7,735638104
	t ₁	29,67424802	1,26E-07	-6,898057065
	t ₂	31,89149296	2,64E-08	-7,578123214
	t ₃	33,47327025	9,08E-09	-8,041828159
	t ₄	34,1439957	5,76E-09	-8,239431972
	t ₅	37,26004507	6,46E-10	-9,189938372
	t ₆	40,0271948	9,39E-11	-10,02722036
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
30:70	t ₀	31,96512535	2,51E-08	-7,600282498
	t ₁	32,82459656	1,41E-08	-7,851096173
	t ₂	30,52812608	6,89E-08	-7,161862842
	t ₃	31,27644872	4,19E-08	-7,378191793
	t ₄	32,63850924	1,58E-08	-7,801655626
	t ₅	39,69858573	1,18E-10	-9,928299168
	t ₆	36,70545388	9,53E-10	-9,02074613
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		

Tabla 8.9. Cuantificación ST23-ST578 con filtro FAM (ST23).

FAM		Cp media	Concentración media	Log Concentración
90:10	t ₀	31,56243349	0,001434129	-2,843411805
	t ₁	31,94672729	0,001119958	-2,950798437
	t ₂	29,54668829	0,005246453	-2,280134211
	t ₃	30,10063771	0,003673422	-2,434929221
	t ₄	31,97690471	0,001098421	-2,959231182
	t ₅	-		
	t ₆	-		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
70:30	t ₀	31,74526737	0,001274962	-2,894502703
	t ₁	-		
	t ₂	30,91940918	0,002169073	-2,663725808
	t ₃	31,64724186	0,001357968	-2,867110564
	t ₄	31,72939888	0,001288047	-2,89006843
	t ₅	27,85381365	0,015592681	-1,807079206
	t ₆	-		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
50:50	t ₀	32,28411423	0,00090141	-3,045077469
	t ₁	32,03631136	0,001057227	-2,97583171
	t ₂	31,25320623	0,00174984	-2,757001686
	t ₃	28,27372777	0,011900918	-1,92441954
	t ₄	30,49074659	0,00285798	-2,543940812
	t ₅	-		
	t ₆	32,90630379	0,00060403	-3,218941427
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
30:70	t ₀	28,85782709	0,008172603	-2,087639604
	t ₁	32,71918576	0,000681313	-3,166653373
	t ₂	30,4451099	0,002943146	-2,531188145
	t ₃	29,0588981	0,007180808	-2,143826663
	t ₄	30,55473357	0,002742703	-2,561821263
	t ₅	31,06531465	0,001974706	-2,70449747
	t ₆	-		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		

Tabla 8.10. Cuantificación ST23-ST578 con filtro Cy5 (ST578).

Cy5	Cp media	Concentración media	Log Concentración	
90:10	t ₀	32,53241569	1,45E-08	-7,839726578
	t ₁	34,19864209	4,35E-09	-8,361064041
	t ₂	31,76866231	2,29E-08	-7,640111637
	t ₃	32,12436832	1,82E-08	-7,7404718
	t ₄	33,01904524	9,52E-09	-8,021521635
	t ₅	-		
	t ₆	33,62358393	6,30E-09	-8,200712791
	t ₇	-		
	t ₈	35,24568761	2,02E-09	-8,695179914
	t ₉	-		
70:30	t ₀	32,07178317	1,83E-08	-7,738159635
	t ₁	33,43096379	7,19E-09	-8,143406786
	t ₂	31,74716729	2,47E-08	-7,607915283
	t ₃	32,15256948	1,72E-08	-7,764011882
	t ₄	31,91770749	2,08E-08	-7,682081882
	t ₅	33,86214745	5,26E-09	-8,278692827
	t ₆	34,53930427	3,29E-09	-8,482537341
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
50:50	t ₀	32,13683089	1,75E-08	-7,755734308
	t ₁	32,26446468	1,61E-08	-7,793725035
	t ₂	31,5330264	2,65E-08	-7,57709791
	t ₃	28,25638451	8,58E-07	-6,066375238
	t ₄	29,94133666	9,78E-08	-7,009488795
	t ₅	31,91000309	2,29E-08	-7,640895387
	t ₆	33,03286658	9,41E-09	-8,026410398
	t ₇	32,78361464	1,11E-08	-7,9540221
	t ₈	-		
	t ₉	-		
30:70	t ₀	27,85672288	4,67E-07	-6,330775733
	t ₁	32,04881137	1,86E-08	-7,731008935
	t ₂	29,69083179	9,49E-08	-7,022889181
	t ₃	28,00283035	7,06E-07	-6,151076083
	t ₄	29,6614078	2,05E-07	-6,688113975
	t ₅	32,31742806	2,35E-08	-7,628796176
	t ₆	33,64014395	6,14E-09	-8,211863115
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	26,54370603	8,40E-07	

8.6. Cuantificación relativa

Tabla 8.11. Cuantificación relativa de los tres competidores

		Cantidad ADNt (ng)	% ST1	% ST23	% ST578
1:1:1	t ₀	0,003092876			
	t ₁	0,002044617			
	t ₂	0,002874671			
	t ₃	0,004411039			
	t ₄	0,002958865			
	t ₅	0,002187712			
	t ₆	0,001975788			
	t ₇	0,001870943			
	t ₈	4,9409E-09			
	t ₉	-			
1:4:4	t ₀	0,004157821			
	t ₁	0,003078619			
	t ₂	0,002260169			
	t ₃	0,002879331			
	t ₄	4,100708913	99,9468826	0,05311522	2,19326E-06
	t ₅	0,001585538			
	t ₆	0,001786017			
	t ₇	5,90161E-06			
	t ₈	-			
	t ₉	-			
4:1:4	t ₀	0,00146222			
	t ₁	0,001188565			
	t ₂	0,001370543			
	t ₃	0,002698183			
	t ₄	1,45833E-08			
	t ₅	2,08796E-05			
	t ₆	1,01574E-05			
	t ₇	-			
	t ₈	9,309000327			
	t ₉	0,014763563			
4:4:1	t ₀	0,002840121			
	t ₁	0,002719147			
	t ₂	0,006297979			
	t ₃	0,643267522	99,6662815	0,33371535	3,1214E-06
	t ₄	0,001910373			
	t ₅	0,001140145			
	t ₆	3,00831E-08			
	t ₇	-			
	t ₈	0,209987003			
	t ₉	-			

Tabla 8.12. Cuantificación relativa ST1-ST23

1-23		Cantidad ADNt (ng)	% ST1	% ST23
90:10	t ₀	4,081684648	99,99208075	0,00791925
	t ₁	8,13089E-05		
	t ₂	0,00487944	87,88661896	12,11338104
	t ₃	0,000150655		
	t ₄	8,69652E-05		
	t ₅	0,006303353	99,42247011	0,577529895
	t ₆	4,40766E-05		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
70:30	t ₀	0,000346909		
	t ₁	0,000291334		
	t ₂	0,000686412		
	t ₃	0,000253485		
	t ₄	2201,503254	99,9999974	2,59545E-06
	t ₅	-		
	t ₆	1,88091E-05		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
50:50	t ₀	0,000782597		
	t ₁	0,00193554		
	t ₂	0,000667393		
	t ₃	0,000166639		
	t ₄	3,97453E-05		
	t ₅	1,02538E-05		
	t ₆	9,27769E-06		
	t ₇	-		
	t ₈	94,5743075		
	t ₉	-		
30:70	t ₀	52671915,63	99,999999998	1,59117E-09
	t ₁	0,000897076		
	t ₂	0,002691815		
	t ₃	0,000645237		
	t ₄	0,000199738		
	t ₅	2,07256E-05		
	t ₆	3,92931E-05		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	0,025432413		

Tabla 8.13. Cuantificación relativa ST1-ST578

1-578	Cantidad ADNt (ng)	% ST1	% ST578	
90:10	t ₀	6,12E-09		
	t ₁	5,19E-10		
	t ₂	1,63E-09		
	t ₃	1,21E-08		
	t ₄	2,94E-09		
	t ₅	6,60E-10		
	t ₆	1,52E-09		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	1,52E-05		
70:30	t ₀	1,48E-08		
	t ₁	2,18E-08		
	t ₂	1,93E-08		
	t ₃	2,53E-09		
	t ₄	2,79E-09		
	t ₅	9,62E-10		
	t ₆	8,65E-10		
	t ₇	6,15E-10		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
50:50	t ₀	1,84E-08		
	t ₁	8,90E+00	99,999998579	1,42078E-06
	t ₂	2,64E-08		
	t ₃	9,08E-09		
	t ₄	5,76E-09		
	t ₅	6,46E-10		
	t ₆	9,39E-11		
	t ₇	1,58E-02		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
30:70	t ₀	2,51E-08		
	t ₁	1,41E-08		
	t ₂	6,89E-08		
	t ₃	4,19E-08		
	t ₄	1,58E-08		
	t ₅	1,18E-10		
	t ₆	9,53E-10		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		

Tabla 8.14. Cuantificación relativa ST23-ST578

23-578	Cantidad ADNt (ng)	% ST23	% ST578	
90:10	t ₀	1,43E-03	99,998991489	1,01E-03
	t ₁	1,12E-03	99,999611194	3,89E-04
	t ₂	5,25E-03	99,999563463	4,37E-04
	t ₃	3,67E-03	99,999505171	4,95E-04
	t ₄	1,10E-03	99,999133625	8,66E-04
	t ₅	-		
	t ₆	6,30E-09		
	t ₇	-		
	t ₈	2,02E-09		
	t ₉	-		
70:30	t ₀	1,27E-03	99,998566701	1,43E-03
	t ₁	7,19E-09		
	t ₂	2,17E-03	99,998862882	1,14E-03
	t ₃	1,36E-03	99,998732076	1,27E-03
	t ₄	1,29E-03	99,998385718	1,61E-03
	t ₅	1,56E-02	99,999966241	3,38E-05
	t ₆	3,29E-09		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
50:50	t ₀	9,01E-04	99,998053140	1,95E-03
	t ₁	1,06E-03	99,998479102	1,52E-03
	t ₂	1,75E-03	99,998486797	1,51E-03
	t ₃	1,19E-02	99,992788710	7,21E-03
	t ₄	2,86E-03	99,996576762	3,42E-03
	t ₅	2,29E-08		
	t ₆	6,04E-04	99,998442155	1,56E-03
	t ₇	1,11E-08		
	t ₈	-		
	t ₉	-		
30:70	t ₀	8,17E-03	99,994287331	5,71E-03
	t ₁	6,81E-04	99,997273330	2,73E-03
	t ₂	2,94E-03	99,996776817	3,22E-03
	t ₃	7,18E-03	99,990166506	9,83E-03
	t ₄	2,74E-03	99,992523905	7,48E-03
	t ₅	1,97E-03	99,998809591	1,19E-03
	t ₆	6,14E-09		
	t ₇	-		
	t ₈	-		
	t ₉	8,40E-07		