

Resumen

Legionella pneumophila es un patógeno oportunista estrictamente ambiental capaz de causar neumonía debido a la inhalación de aerosoles con suficiente carga bacteriana. Los brotes y casos esporádicos suelen producirse en ambientes templados y los reservorios encontrarse en zonas con agua donde pueden crearse biopelículas microbianas. La existencia de formas no cultivables de la bacteria aumenta el riesgo para la salud pública, ya que los métodos estándar basados en cultivo microbiológico no pueden detectarlas, complicando las investigaciones ambientales.

La clasificación genética basada en el método *Sequence-Based Typing* (SBT) permite un mayor poder de discriminación entre cepas de *L. pneumophila* en comparación con métodos previos. Los datos derivados del SBT pueden utilizarse para estudios de variabilidad genética y estructura poblacional. Sin embargo, puede llevarse a cabo un análisis más exhaustivo mediante técnicas de secuenciación genómica de alto rendimiento.

Esta tesis describe la utilización tanto de SBT como de secuenciación genómica para evaluar e incluso proponer soluciones a diferentes necesidades en salud pública relacionadas con la epidemiología de *L. pneumophila*. Nos centramos en la Comunidad Valenciana (CV), la segunda región en España con mayor incidencia de legionelosis, con especial interés en la localidad de Alcoy, donde ocurren brotes de forma recurrente.

En primer lugar, utilizamos datos derivados de SBT para conocer mejor la variabilidad y la distribución de los perfiles genéticos (*Sequence Types*, ST) en el área de la CV. Mostramos que el nivel de variabilidad en sólo esta región es comparable a la de otros países, con perfiles extendidos local y globalmente. Aproximadamente la mitad de la diversidad genética observada se estima que procede de estructuración geográfica y temporal.

En segundo lugar, la detección de *L. pneumophila* a partir de fuentes ambientales sigue suponiendo un reto para la salud pública. En esta tesis realizamos una comparación entre la detección mediante *touchdown PCR* (TD-PCR) a partir de muestras de agua y biopelículas microbianas y mostramos que estas últimas proporcionan un aumento del 10 veces en la tasa de detección de la bacteria. Este método permitió evaluar la diversidad no cultivable de *L. pneumophila* en la localidad de Alcoy y la investigación a tiempo real de un brote en un hotel en Calpe (Sudeste de España) en 2012.

A continuación, aplicamos la secuenciación genómica a 69 cepas aisladas durante 13 brotes ocurridos en Alcoy en el período 1999-2010, principalmente el recurrente ST578. Se observó mayor variabilidad entre cepas de un mismo brote que la esperada, lo cual apunta a la existencia potencial de múltiples fuentes en esta área, o alta diversidad ambiental. Además, se observó que más del 98% de la variabilidad genómica fue introducida por procesos de recombinación y no de mutación puntual.

Finalmente, se realizó un análisis metagenómico de biopelículas ambientales recogidas en Alcoy. Se encontró que la comunidad está dominada por *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*. A pesar del conocido endemismo de *Legionella* en el área, este género sólo se encontró en una abundancia relativa entre 0.01-0.07%, lo cual explica su baja tasa de recuperación a partir de muestras ambientales.

En resumen, los resultados de esta tesis pueden ser de utilidad para los programas de control de este patógeno llevados a cabo por las autoridades de salud pública, ya que proporcionan una nueva percepción de su epidemiología molecular, con aplicación inmediata a la vigilancia e investigación de brotes.