

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



DESARROLLO DE MARCADORES PARA LOS LINAJES A Y B DEL ST578 DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: YAIZA M^a ARENAS ORTIZ

TUTOR/A: DRA. MARÍA ANTONIA FERRÚS PÉREZ

TUTOR DE EMPRESA: DR. FERNANDO GONZÁLEZ CANDELAS

COTUTORA DE EMPRESA: DRA. LEONOR SÁNCHEZ BUSÓ

Curso Académico: 2014-2015

VALENCIA, JULIO 2015

Licencia Creative Commons "Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada"



Autor: Alumna Yaiza M^a Arenas Ortiz.

Tutora: Prof. Dña. María Antonia Ferrús Pérez.

Tutor de empresa: Prof. D. Fernando González Candelas.

Cotutora de empresa: Prof. Dña. Leonor Sánchez Busó.

Valencia, Julio 2015

Título del TFG: Desarrollo de marcadores para los linajes A y B del ST578 de *Legionella pneumophila*.

Resumen:

Legionella pneumophila es una bacteria patógena Gram negativa estrictamente ambiental la cual se extiende por el aire y puede infectar a los humanos causando la enfermedad del Legionario. Estas bacterias, además del proceso de mutación, han desarrollado estrategias específicas para intercambiar e incorporar genes y plásmidos de fuentes externas permitiendo nuevas adaptaciones.

En la Comunidad Valenciana, provoca frecuentes brotes y casos esporádicos de legionelosis, por lo que son necesarios métodos de control y vigilancia de la misma. En la actualidad, estos métodos se basan en la caracterización genética de las variantes de la bacteria. En la localidad de Alcoy (Alicante), el tipo asociado con mayor frecuencia a los casos clínicos es el ST578. Este tipo presenta dos subtipos de cepas, denominadas sublinajes A y B, que tienen dinámicas epidémicas diferentes.

Este trabajo se centra en disponer de un método de identificación que sea capaz de distinguir ambas cepas de forma rápida y fiable. Para ello, se parte de la secuencia genómica completa de aislados de ambos linajes para buscar genes con presencia diferencial entre los mismos o, en su defecto, genes con alelos lo suficientemente divergentes como para lograr una amplificación específica de cada linaje. El proyecto se completará con el diseño de cebadores, puesta a punto de las reacciones de amplificación y comprobación de los resultados con un panel de aislados de los dos linajes mencionados.

Palabras Clave:

Legionella pneumophila, ST578, vigilancia epidemiológica, genómica, PCR, cebadores.

Abstract:

Legionella pneumophila is a strictly environmental Gram negative bacterial pathogen which spreads through the air and can infect humans causing Legionnaire's disease. These bacteria, in addition to the mutation process, have developed specific strategies to exchange genes and plasmids and incorporate external sources allowing new adaptations.

In the Valencian Community, it causes frequent outbreaks and sporadic cases of Legionnaires' disease, for which methods for its control and surveillance are needed. Currently, these methods rely on the genetic characterization of the variants of the bacterium. In the city of Alcoy (Alicante), the most often associated type with clinical cases is the ST578. Such strain has two subtypes, designated A and B sublineages, which have different epidemic dynamics.

This work focuses on having an identification method that is able to distinguish the two strains quickly and reliably. To do this, it starts with the complete genomic sequence from both isolated lineages to search for genes with differential presence between them or, failing this, genes with divergent enough alleles to achieve specific amplification of each lineage. The

project will be completed with primer design, development of amplification reactions and verification of the results with a panel of these two isolated lineages.

Key words:

Legionella pneumophila, ST578, epidemiological surveillance, genomics, PCR, primers.

Agradecimientos

En primer lugar, gracias a mi familia, novio y amigos por confiar en mí desde el primer momento, brindarme su apoyo de manera constante e incondicional y darme siempre buenos consejos y ánimos. Sois mi principal pilar y sin vosotros el camino sería más difícil.

Agradecer a Fernando González por permitirme formar parte de su grupo de investigación, ayudarme siempre que lo he necesitado así como darme buenos asesoramientos y opiniones en todo momento.

Gracias a Paula y Leo por su apoyo y paciencia durante el proyecto, por dejarme aprender de vosotras dándome siempre recomendaciones y trucos en el laboratorio y acogerme tan bien desde el primer día.

Finalmente, agradezco a todos los profesores especialmente, a M^a Antonia Ferrús que me han ayudado en algún momento de esta bonita etapa y comenzar en el mundo de la investigación.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Legionella pneumophila</i>	1
1.1.1. Descubrimiento y características.....	1
1.1.2. Ecología y ecosistema.....	3
1.1.3. Biología.....	4
1.1.4. Cultivo y nutrición.....	4
1.1.4.1. Metabolismo de aminoácidos.....	5
1.1.4.2. Metabolismo de polisacáridos y carbohidratos.....	6
1.1.4.3. Requerimiento de micronutrientes.....	6
1.1.5. Replicación.....	6
1.1.6. Estructura genómica.....	9
1.2. Legionelosis.....	11
1.2.1. Modo de transmisión.....	12
1.2.2. Periodo de incubación y susceptibilidad.....	12
1.2.3. Diagnóstico.....	13
1.3. Sistema de tipado genético.....	13
1.4. Variación genética y recombinación	14
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Análisis genómico de los sublinajes A y B.....	18
3.1.1. Comparación genómica.....	18
3.1.2. Estudio de los alineamientos.....	19
3.1.3. Extracción y alineamiento génico.....	20
3.2. Diseño de los cebadores.....	21
3.3. Obtención y preparación de las muestras.....	21
3.4. Amplificación por PCR.....	22
3.4.1. PCR.....	22
3.4.2. “Touchdown” PCR.....	23
3.4.3. PCR en gradiente.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. Análisis de las secuencias.....	24
4.2. Comparación y alineamientos de las secuencias.....	24
4.3. Funcionalidad de los cebadores.....	25

5. CONCLUSIÓN.....	31
6. BIBLIOGRAFÍA.....	32
7. ANEXO.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>L. pneumophila</i>	1
Figura 2. Ciclo de vida medioambiental de <i>L. pneumophila</i> en protozoos.....	9
Figura 3. Incidencia por 100.000 habitantes en España.....	13
Figura 4. Reconstrucción filogenética mediante máxima verosimilitud del núcleo del genoma de las cepas de <i>L. pneumophila</i> y del genoma de referencia.....	15
Figura 5. Eventos de recombinación en las cepas ST578 tanto del sublinaje A como B.....	16
Figura 6. Comparación de los genomas del sublinaje A y B con la herramienta ACT.....	19
Figura 7. Script de Python para visualizar los hits de cada uno de los alineamientos.....	20
Figura 8. PCR en gradiente.....	23
Figura 9. Longitud del alineamiento y porcentaje de identidad de cada cepa del sublinaje A para una secuencia única.....	24
Figura 10. Longitud del alineamiento y porcentaje de identidad de cada cepa del sublinaje B para una secuencia única.....	25
Figura 11. Funcionalidad de los cebadores de los genes <i>lpa03704</i> , <i>lpa02172</i> y <i>lpa03873</i> respectivamente.....	26
Figura 12. PCR a 56°C con el cebador correspondiente al gen <i>lpa03704</i>	26
Figura 13. PCR a 56°C con el cebador correspondiente al gen <i>lpa02172</i>	27
Figura 14. Touchdown PCR del gen <i>lpa03873</i>	28
Figura 15. Touchdown PCR del gen <i>lpa02172</i>	28
Figura 16. PCR a 59.9°C del gen <i>lpa03873</i>	29
Figura 17. PCR a 63.5°C del gen <i>lpa02172</i>	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas secuencias de <i>L. pneumophila</i>	10
Tabla 2. Principales características de los genomas de <i>L. pneumophila</i>	10
Tabla 3. Archivos de entrada para cada cepa tanto del sublinaje A como B.....	18
Tabla 4. Cebadores diseñados para la amplificación.....	21
Tabla 5. Cepas utilizadas pertenecientes al sublinaje B de ST578.....	22
Tabla 6. Cepas utilizadas pertenecientes al sublinaje A de ST578.....	22
Tabla 7. Nombre del gen y la localización de los SNPs para el correcto diseño de los cebadores.....	25

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y NOMENCLATURAS

ADN o DNA: Ácido desoxirribonucleico

ACT: Herramienta de comparación Artemis, del inglés Artemis comparison tool

BCYE: Medio tamponado con extracto de levadura y carbón activo, del inglés Buffered Charcoal Yeast Extract

Cys: Cisteína

3': Extremo 3 prima

5': Extremo 5 prima

EWGLI: Grupo de Trabajo Europeo de Infecciones de Legionella

G+C: Guanina y Citosina

H₂O: agua

ID: Código de identificación

LCV: Vacuola contenedora de *Legionella*

LCP: Fagosoma contenedora de *Legionella*

L.: *Legionella*

Mb: Megabases

mL: Mililitros

mm: Milímetros

MLST: *Multilocus Sequence Typing*

ng: Nanogramos

Pb: Pares de base

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RER: Retículo endoplasmático rugoso

SBT: *Sequence-Based Typing*

ST: *Sequence Type*

TGH: Transferencia horizontal de genes

T_m: Temperatura de *melting*

UFC: Unidad formadora de colonias

uL: Microlitros

VC: Viables cultivables

VNC: Viables no cultivables

°C: Grados Celsius

1. Introducción

1.1. *Legionella pneumophila*

1.1.1. Descubrimiento y características

L. pneumophila, clasificada como una bacteria Gamma-Proteobacteria, pertenece a la familia *Legionellaceae*, género *Legionella*, en la que se han descrito más de 50 especies y subespecies (Hilbi et al., 2010) y más de 70 serogrupos (Gomez-Valero, Rusniok and Buchrieser, 2009). *L. pneumophila* está asociada con la infección humana, al igual que otras 40 especies de este género, siendo una de las especies más importantes en este aspecto por sus implicaciones médicas. Son microorganismos aeróbicos estrictos que necesitan oxígeno para su supervivencia y en general, son poco activos.

L. pneumophila es una bacteria patógena, facultativa intracelular y la principal agente causante de la enfermedad del Legionario, una forma grave de neumonía aguda (Dolezal et al., 2012). Como parte de su patogenicidad, la bacteria evita la fusión del fagolisosoma replicándose dentro de los macrófagos alveolares y de las células epiteliales en una vacuola que presenta muchas de las características del retículo endoplásmico (Newton et al., 2010). Se trata de una bacteria que es capaz de sobrevivir en un amplio rango de condiciones físico-químicas, multiplicándose entre 20°C y 45°C siendo su temperatura óptima de crecimiento de 35°C a 37°C y muere a los 70°C (Richards et al., 2013). Es pleomórfica y flagelada con dimensiones que oscilan entre 0,3 y 0,9 µm de ancho, y de 1,5 a 5 µm de longitud (Figura 1).

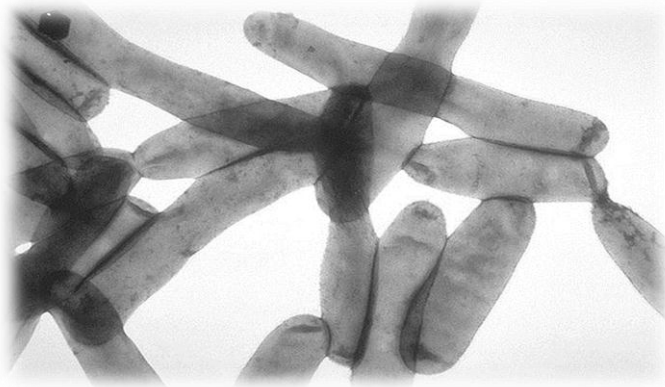


Figura 1. Morfología de *L. pneumophila* (Centers for Disease Control and Prevention, part of the United States Department of Health and Human Services).

L. pneumophila fue descrita por primera vez en 1976 debido a un brote de neumonía grave de la Legión Americana en Filadelfia, Pensilvania (EEUU). Ocasionó 29 muertes de los 182 casos de infección así como que 147 personas fueran hospitalizadas (Fraser et al., 1977). Tras una minuciosa investigación, se identificó el agente causal como un bacilo Gram negativo (Brenner et al., 1979). A partir de ese momento, la forma severa de neumonía causada por esta bacteria se describió como la Enfermedad del Legionario. El nicho ecológico de la bacteria no se localizó; sin embargo, el análisis epidemiológico sugirió que la exposición a la bacteria había sucedido en el área que rodeaba el hotel en el cual estaban reunidos (Fraser et al., 1977).

También existe otro tipo de legionelosis, llamada fiebre de Pontiac, que es una enfermedad autolimitada que da lugar a un cuadro clínico similar al de la gripe (Glick et al., 1978).

Por tanto, *L. pneumophila* es un patógeno oportunista de los seres humanos, cuyas fuentes de infección son, por lo general, sistemas de aguas artificiales contaminados. Estas bacterias son capaces de colonizar los sistemas de abastecimiento de las ciudades e incorporarse a sistemas que requieren agua para su funcionamiento, tales como las fuentes ornamentales, torres de refrigeración, condensadores evaporativos, etc. Dichos sistemas pueden llegar a provocar su dispersión en el aire formando parte de aerosoles y, al ser inhalados, causar una infección en el sistema respiratorio. Por ello, es necesario descubrir la fuente de infección cuando se produce un brote de legionelosis causada por la bacteria que nos concierne (Farhat et al., 2012).

Existen diferentes cepas dentro de dicha especie las cuales se han agrupado en diferentes serogrupos describiéndose 15 en *L. pneumophila*. El 84% de los casos de legionelosis a nivel mundial y el 95% en Europa están causados por el serogrupo 1 de *L. pneumophila* (Muder and Yu, 2002; Fields et al., 2002). El hecho de que este serogrupo sea el más frecuente no es por su alta prevalencia en el ambiente sino, al parecer, por su mayor virulencia en humanos, aunque los factores genéticos responsables se desconocen actualmente (Marston et al., 1997; Parthuisot et al., 2010).

Se han descrito ensayos rápidos y fiables para la detección e identificación de la bacteria en el agua así como en muestras clínicas, por lo que son identificadas por sus antígenos O a través de métodos inmunológicos. Recientemente, se ha desarrollado un microarray de DNA específico del serogrupo O para la detección de todas las formas diferentes de dicho antígeno de la bacteria de O1 a O15 (Cao et al., 2013).

Hay estudios que han proporcionado pruebas sólidas de que *L. pneumophila* es la especie de este género más patógena para los seres humanos. Por tanto, el impacto que presenta en la salud pública refleja el mayor foco de investigación en este organismo. *Legionella bozemanai*, *Legionella micdadei* y *Legionella longbeachae* son los siguientes agentes etiológicos más comunes de la enfermedad del legionario, y en conjunto, representan aproximadamente el 2-7% de las infecciones por *Legionella* en todo el mundo (Muder and Yu, 2002). Curiosamente, esta tendencia no es cierta para Australia y Nueva Zelanda, donde aproximadamente el 30% de la enfermedad del Legionario se atribuye a *L. longbeachae*, cuya patogénesis es diferente (Yu et al., 2002; Asare et al., 2007).

Cabe destacar la existencia de una clasificación de las bacterias basada en un esquema de tipificación de siete alelos conocida como Sequence-Based Typing (SBT), que se comentará posteriormente con más detalle y que ha tenido mucho éxito en el suministro de los medios necesarios para atribuir brotes de *L. pneumophila* a una fuente o fuentes en particular, es decir, como una técnica de tipado a nivel epidemiológico. Los tipos de secuencias particulares descritas por este esquema se conoce que presentan fenotipos específicos. De las especies que causan enfermedades humanas, se piensa que algunas de ellas es más probable que causen una enfermedad más grave. Todo ello se debe a que la base genética de estas diferencias se heredan verticalmente asociándose con determinados linajes genéticos dentro de la población (Underwood et al., 2013).

Una de las características importantes a comentar es la capacidad que presenta para multiplicarse intracelularmente en protozoos de agua dulce. Esta co-evolución duradera entre el huésped eucariota y *L. pneumophila* ha llevado a la selección de un amplio número de factores de virulencia, los cuales permiten explotar importantes procesos celulares durante la infección. La importancia que presentan los protozoos en la evolución de la bacteria se ha conocido gracias al análisis de la secuenciación completa del genoma. Así, un rasgo clave en los genomas de *L. pneumophila* es la presencia de un número elevado y gran variedad de características eucariotas, como son las proteínas y sus dominios, que probablemente han sido adquiridas a través de la transferencia horizontal de genes y / o la evolución convergente (Gomez-Valero et al., 2011).

1.1.2. Ecología y Ecosistema

L. pneumophila, siendo el agua su principal reservorio, es una bacteria ambiental que infecta y se multiplica dentro de protozoos acuáticos como es el caso de *Acanthamoeba castellanii* y de los macrófagos alveolares humanos causando neumonía ya que su nicho natural son las aguas superficiales como lagos, ríos, estanques, formando parte de su flora bacteriana. Otras bacterias que comparten propiedades similares son *Coxiella burnetii* y *Brucella* (McDade et al., 1977; Fields et al., 2002). Se localiza tanto en aguas dulces naturales como en los sistemas de aguas artificiales, los cuales se definen como hábitats estresantes (Loza-Correa et al., 2014). Estas bacterias que viven en condiciones aeróbicas deben ser capaces de hacer frente a los efectos tóxicos del oxígeno, que se pueden generar de forma exógena o endógena. En las aguas naturales, la radiación solar puede iniciar una serie de reacciones fotoquímicas que producen lo que se conoce como especies reactivas de oxígeno perjudiciales, tales como el peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (Scully et al., 2003). La persistencia de la bacteria se favorece si en el medio donde se encuentra existen desechos cálcicos y corrosivos, sedimentos, materia orgánica, etc. (RED NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2011).

Por una parte, se encuentra con especies reactivas de oxígeno en el medio ambiente del agua dulce, así como en el medio ambiente intracelular, debido a una explosión oxidativa ejercida y provocada por las células huésped (Newton et al., 2010). Por tanto, la respuesta al estrés oxidativo y de compuestos tóxicos es un determinante clave para la supervivencia, la propagación y virulencia de *L. pneumophila*. De hecho, es capaz de codificar enzimas diferentes para defenderse de estos factores de estrés como catalasa-peroxidasa 2 (KatA) localizada en el periplasma, y KatB, que se localiza en el citoplasma (Bandyopadhyay and Steinman, 2000).

Por otra parte, estas enzimas codificadas exhiben una fuerte actividad peroxidasa, pero débil actividad hidropoxidasa. Además, *L. pneumophila* codifica dos superóxido dismutasas: una es Cu/Zn dependiente, que se encuentra en el periplasma y la otra es Mn/Fe dependiente, situada en el citoplasma. Éstas se expresan diferencialmente en función de la fase de crecimiento. La superóxido dismutasa Cu/Zn se expresa después de la fase de crecimiento exponencial y está regulada por un factor sigma de estrés conocido como RpoS; sin embargo, la superóxido dismutasa Mn/Fe se expresa altamente durante el crecimiento exponencial (Bruggemann et al., 2006).

Teniendo en cuenta que *L. pneumophila* es un patógeno acuático encontrado en la naturaleza de forma ubicua, está ampliamente distribuida en los sistemas de agua naturales y antrópicos y que se transmite por inhalación de aerosoles contaminados producidos por una amplia variedad de dispositivos. Como se ha comentado anteriormente, las bacterias se replican dentro del medio ambiente de los protozoos pero cabe destacar que la colonización de múltiples especies microbianas y la persistencia en su entorno natural están mediadas por la formación de biofilms. En general, en su medio natural, la bacteria se encuentra en bajas concentraciones, pero en número suficiente para contaminar circuitos de agua artificiales, en los cuales encuentra condiciones favorables para su multiplicación y diseminación. Estas instalaciones, a veces, favorecen el estancamiento de agua y la acumulación de productos que sirven de nutrientes para la bacteria, como lodos, amebas etc., formando un biofilm.

Actualmente existen evidencias de que algunos brotes de legionelosis se relacionan con la presencia de estos biofilms (Murga et al., 2001). Por tanto, la prevención de la formación de biofilms aparece como una de las estrategias para reducir la contaminación del sistema de agua. Sin embargo, falta información sobre las condiciones químicas y biofísicas, así como los mecanismos moleculares que permiten la producción de biofilms por *L. pneumophila* (Abdel-Nour et al., 2013).

Así pues, la co-evolución con varias especies de protozoos se ha traducido en el desarrollo de mecanismos que permiten que *L. pneumophila* ocupe una gama de huéspedes muy amplia y sea capaz de infectar células humanas (Molmeret et al., 2005).

En cuanto a su interacción con amebas, protozoos ciliados y huéspedes naturales, es imprescindible ya que, además de jugar un papel central en la ecología bacteriana así como en la infectividad, su crecimiento se ve favorecido por el aporte de nutrientes que le facilitan los microorganismos (Richards et al., 2013). La comprensión de la ecología de este patógeno puede ayudar a determinar métodos para prevenir su difusión ambiental y la transmisión de la legionelosis.

1.1.3. Biología

Una característica biológica de *L. pneumophila* es su capacidad de crecer de forma intracelular en protozoos y en macrófagos humanos. La presencia de amebas en ambientes e instalaciones concretas es un mecanismo de supervivencia de *Legionella* en condiciones ambientales desfavorables que hacen más complicada su eliminación. Esta particularidad les confiere una gran resistencia en su hábitat natural, se multiplican en el interior de diversos protozoos de vida libre mientras que en el medio libre, gracias a su división extracelular se encuentran formando parte de complejos biofilms microbianos. Esta oportunidad de multiplicación intracelular la protege contra la acción de los antibióticos y desinfectantes, de forma que sólo responde a antibióticos capaces de penetrar en las células. El riesgo de infección aumenta, por tanto, con su proliferación.

1.1.4. Cultivo y Nutrición

Al ser *Legionella* un microorganismo pleomórfico, presenta dos o más formas morfológicas distintas a lo largo de su ciclo de vida. Empleando métodos clásicos de cultivo,

que son los únicos legislados por las autoridades sanitarias, se pueden cuantificar las unidades formadoras de colonias. Aquellas que han crecido en el medio de cultivo son las células que se han reproducido y dan como resultado una colonia, se conocen como “viables cultivables” (VC). Mientras que las “viables no cultivables” (VNC) no se pueden cuantificar y no producen colonias. Distinguir cada una de las formas de *Legionella* es importante para su posterior detección de una manera eficaz. Una alternativa a estos métodos, debido a que dan falsos negativos y subestimaciones, son los métodos moleculares. Los más conocidos son el recuento directo de células viables combinado con un fluoróforo marcador y posterior identificación y recuento (DVC- FISH) y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

En cuanto al cultivo, requiere medios especiales, un procesamiento adecuado así como una experiencia técnica. Para que de un resultado positivo se necesitan varios días (Murdoch, 2003). Se consiguió aislar mediante el uso de agar Mueller-Hinton suplementado con hemoglobina e IsoVitalex (MH-IH). El componente esencial de la hemoglobina era una forma soluble del hierro mientras que la L-cisteína era el aminoácido esencial proporcionado por IsoVitalex. Estos refinamientos condujeron al desarrollo del agar Feeley-Gorman, que proporcionaba una mejor recuperación del organismo a partir del tejido (Feeley et al., 1978).

Hoy en día, el medio utilizado para el cultivo de *Legionella* es un medio tamponado con extracto de levadura y carbón activo (BCYE). Estos medios se pueden preparar con o sin colorantes indicadores, que proporcionan un color específico para ciertas especies de *Legionella* (Vickers et al., 1981). Aunque la mayoría de las especies de *Legionella* crecen fácilmente en agar BCYE, algunos requieren la suplementación con albúmina de suero bovino para mejorar el crecimiento (Fields et al., 2002).

Cabe destacar que, como *L. pneumophila* sobrevive en diversos nichos ambientales, es capaz de explotar numerosas fuentes de carbono y de energía diferentes. Además, el medio intracelular es una fuente rica para los patógenos y, como las células huésped eucariotas contienen muchos nutrientes diferentes, son potencialmente accesibles a los patógenos intracelulares (Abu Kwaik and Bumann, 2013).

1.1.4.1. Metabolismo de aminoácidos

L. pneumophila es un microorganismo auxótrofo para varios aminoácidos que incluyen la cisteína, arginina, isoleucina, leucina, treonina, valina y metionina (Maris and Michele, 2014). Dicha auxotrofia se debe a que los genes implicados en la biosíntesis de cisteína y otros genes anabólicos se encuentran ausentes en el genoma de *L. pneumophila* (Cazalet et al., 2004; D'Auria et al., 2010; Schroeder et al., 2010) y de *L. longbeachae* (Cazalet et al., 2010).

El crecimiento de la bacteria depende del exceso de cisteína presente en el medio; sin embargo, la cantidad de cisteína que se añade al medio BCYE es mayor que la que se requiere para soportar el crecimiento. Así pues, la mayor parte de cisteína se oxida rápidamente a cistina y deja de estar disponible para *L. pneumophila*, ya que es incapaz de utilizar dicho compuesto. La concentración restante de cisteína es de 0,5mM aproximadamente y es suficiente para soportar su crecimiento (Ewann and Hoffman, 2006).

L. pneumophila también es auxótrofo para la arginina, ya que las bacterias carecen de enzimas que permiten la síntesis de la arginina a partir del glutamato. Sin embargo, las bacterias producen arginina en medios químicamente definidos y suplementados con ornitina o citrulina, que son precursores de arginina en los pasos posteriores de la síntesis de glutamato (Tesh and Miller, 1983; Hovel-Miner et al., 2010). Además, se ha observado que mutantes de *L. pneumophila* que carecen del represor arginina (ArgR) dejan de replicarse dentro de células huésped, por lo que ArgR puede detectar la disponibilidad de arginina dentro del huésped y conducir a la expresión de genes (muchos de ellos no implicados en el metabolismo de la arginina) que se requieren para el crecimiento intracelular (Manske and Hilbi, 2014).

1.1.4.2. Metabolismo de polisacáridos y carbohidratos

Mientras que los aminoácidos parecen representar la fuente de carbono preferida, *L. pneumophila* también puede metabolizar hidratos de carbono, compuestos orgánicos pequeños así como nutrientes complejos.

Por un lado, los primeros estudios revelaron que la glucosa, α -cetoglutarato, piruvato, glicerol y acetato son metabolizados, pero sólo algunos de ellos estimulaban el crecimiento bacteriano extracelular (Tesh et al., 1983). Durante la infección de los macrófagos, se observó que el glicerol jugaba un papel importante en el crecimiento intracelular de *L. pneumophila*, al igual que sucede en otras bacterias intracelulares tales como *Legionella monocytogenes* (Eylert et al., 2008) y *Salmonella enterica* (Steeb et al., 2013).

Por otro lado, la glucosa no estimula el crecimiento de *Legionella*, pero los genomas de *L. pneumophila* (Schroeder et al., 2010), así como de *L. longbeachae* (Cazalet et al., 2010; Kozak et al., 2010) codifican las vías necesarias para el metabolismo de hidratos de carbono, incluyendo la vía Emden-Meyerhof-Parnas (EMP), el Entner-Doudoroff (ED), así como una vía incompleta de pentosa fosfato (PP).

1.1.4.3. Requerimiento de micronutrientes

En cuanto al hierro, es un micronutriente esencial para la mayoría de las bacterias ya que es un cofactor de enzimas del metabolismo central formando parte de grupos prostéticos como es el grupo hemo. La disponibilidad del hierro es especialmente importante para los patógenos, debido a que la limitación de hierro juega un papel clave en la defensa del huésped contra las infecciones (Manske and Hilbi, 2014). Para *L. pneumophila*, el hierro representa un nutriente esencial y tiene que ser suplementado en altas concentraciones en el medio de crecimiento. A bajas concentraciones de hierro, se observó una disminución de la virulencia ya que la supervivencia de la bacteria se veía afectada (James et al., 1995). Además, las células huésped tratadas con quelantes de hierro no apoyan el crecimiento de *L. pneumophila* debido a la limitación de hierro. A la inversa, la adición de diferentes formas de hierro como por ejemplo, el hierro-transferrina o hierroférrico-nitrilotriacetato, producen inhibición del crecimiento (Viswanathan et al., 2000).

1.1.5. Replicación

Para sobrevivir dentro de sus nichos extra e intracelulares, *L. pneumophila* emplea un ciclo replicativo bifásico, donde se alterna entre dos formas diferentes en respuesta a

estímulos tanto ambientales como metabólicos en los que puede cambiar la motilidad, forma, superficie y el almacenamiento de polímeros ricos en energía. Todo ello conlleva a cambios en el transcriptoma y modulaciones fenotípicas (Richards et al., 2013). Dicho crecimiento viene representado por una fase exponencial seguido de una meseta y otra fase exponencial. La meseta es debida a que se produce un agotamiento del sustrato y las bacterias empiezan a usar otro distinto con un periodo de adaptación. Si las condiciones nutritivas son buenas, las bacterias se replican y la expresión de genes asociados a la virulencia se reduce. Sin embargo, si no son adecuadas, entran en fase de transmisión adquiriendo movilidad, resistencia y citotoxicidad. La forma de transmisión es móvil y resiste el estrés ambiental, como puede ser la falta de nutrientes o infecciones de las células huésped (Manske and Hilbi, 2014).

El análisis de diferenciación de *L. pneumophila* se ha acelerado debido al descubrimiento de que muchos aspectos del ciclo de vida del patógeno pueden ser modelizados. La identificación de elementos reguladores es muy importante para el desarrollo de herramientas genéticas, incluyendo la mutagénesis de transposones, la transformación a través de la competencia natural, conjugación y la electroporación (Molofsky and Swanson, 2004).

En cuanto a la temperatura, cuando aumenta en el medio ambiente acuático se produce un cambio de equilibrio entre las bacterias y las amebas, que conlleva a una rápida multiplicación de *Legionella*. Como resultado de la proliferación dentro de protozoos, ya que hay un aumento en el número de *L. pneumophila* en el agua, aumenta la probabilidad de transmisión y de manifestación de la enfermedad (Ohno et al., 2008).

La capacidad innata que presenta *Legionella* para replicarse dentro de diferentes protozoos, ha equipado a las bacterias con la capacidad para replicarse en macrófagos alveolares humanos. La interacción de *L. pneumophila* con células eucariotas es clave para entender la capacidad que posee el patógeno para causar la enfermedad. Esta relación se ha estudiado para una amplia variedad de protozoos y células huésped de mamífero. En particular, *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis*, *Naegleria* y *Dictyostelium discoideum* se han utilizado para estudiar la asociación de *L. pneumophila* con un huésped ambiental (Newton et al., 2010).

Por otra parte, al crecer y replicarse en las amebas del medio ambiente y en los macrófagos alveolares dentro de un único compartimiento de membrana llamado vacuola contenedora de *Legionella* (VCL), se favorece la supervivencia ya que escapa de la degradación, y las bacterias están expuestas a señales ambientales incluyendo pequeñas moléculas de señalización de las células eucariotas. Los compuestos adrenérgicos inhiben el crecimiento extra e intracelular de *L. pneumophila* y conllevan una mejora potencial para combatir las infecciones que causa (Harrison et al., 2015).

La capacidad que presenta *L. pneumophila* para entrar, sobrevivir y replicarse en células monocíticas es esencial para la patogénesis. Las diferencias en los mecanismos utilizados para introducirse en los monocitos se relacionan con la supervivencia intracelular y la replicación posterior. Además, se ha demostrado que el mecanismo de entrada de las bacterias y / o la expresión de factores tempranos alteran el tráfico intracelular (Roy et al., 1998). Un sello distintivo importante de la patogénesis de esta bacteria es su capacidad para manipular los procesos de la célula huésped, creando un nicho replicativo específico dentro de ella. Genera un "fagosoma contenedor de *Legionella*" (LCP) para asociarse de manera secuencial con vesículas lisas, mitocondrias y el retículo endoplasmático rugoso (RER) para formar un

compartimiento llamado un fagosoma replicativo. LCP se caracteriza biológicamente por un retraso en la acidificación y una baja tendencia a fusionarse con los lisosomas. El establecimiento de estos fagosomas especializados está mediado por el sistema de secreción Icm/Dot Tipo IV (son genes que juegan un papel esencial en el transporte fagosómico), que es esencial para el crecimiento intracelular de *L. pneumophila* ya que lo utiliza para inyectar moléculas efectoras bacterianas en el citosol de la célula huésped y así sobrevivir y replicarse en el compartimiento intracelular (Miyake, 2008; Terry Alli et al., 2000).

L. pneumophila entra en las amebas y macrófagos alveolares por un mecanismo poco común, llamado “coiling” fagocitosis (Horwitz, 1984), además de la fagocitosis típica realizada por la mayoría de otras especies bacterianas. En el “coiling” fagocitosis, por una parte, se produce la emisión de un pseudópodo por parte de la célula hospedadora envolviendo así a la bacteria en forma de espiral, mientras que por otra parte, se crea en la zona de la ingestión como una cola. Cabe destacar, que los factores bacterianos y los componentes de la célula huésped en cuestión, se desconocen (Cirillo et al., 2001).

En cuanto al ciclo celular en los protozoos (al igual que lo realiza en macrófagos alveolares), tal y como se observa en la figura 2, en primer lugar el flagelo que presenta *L. pneumophila* es capaz de infectar a los protozoos en el medio acuático. LCV invade la vía endosoma-lisosoma para su degradación y, a continuación, en condiciones de estrés desfavorables como es la privación de nutrientes, la proliferación bacteriana no se produce. En condiciones de crecimiento permisivo para la ameba, la LCV está decorada con proteínas poli-ubiquitinadas, las cuales son objeto de la degradación proteasomal provocando altos niveles celulares de aminoácidos. Durante las últimas etapas de la infección, la LCV se altera dando lugar a la salida de bacterias en el citosol donde se completan las últimas rondas de proliferación. Tras el agotamiento de nutrientes, se favorece la lisis de la ameba y, por tanto, el escape de bacterias de la célula huésped. Por último, se produce la transmisión a los seres humanos a través de aerosoles generados por dispositivos e instalaciones tales como torres de refrigeración y bañeras de hidromasaje. En el cuerpo humano, *Legionella* en vez de ser destruida por los macrófagos, se reproduce en ellos, en el interior de vacuolas fagocíticas que crecen hasta romper el macrófago y liberarse al exterior para repetir el ciclo (Richards et al., 2013).

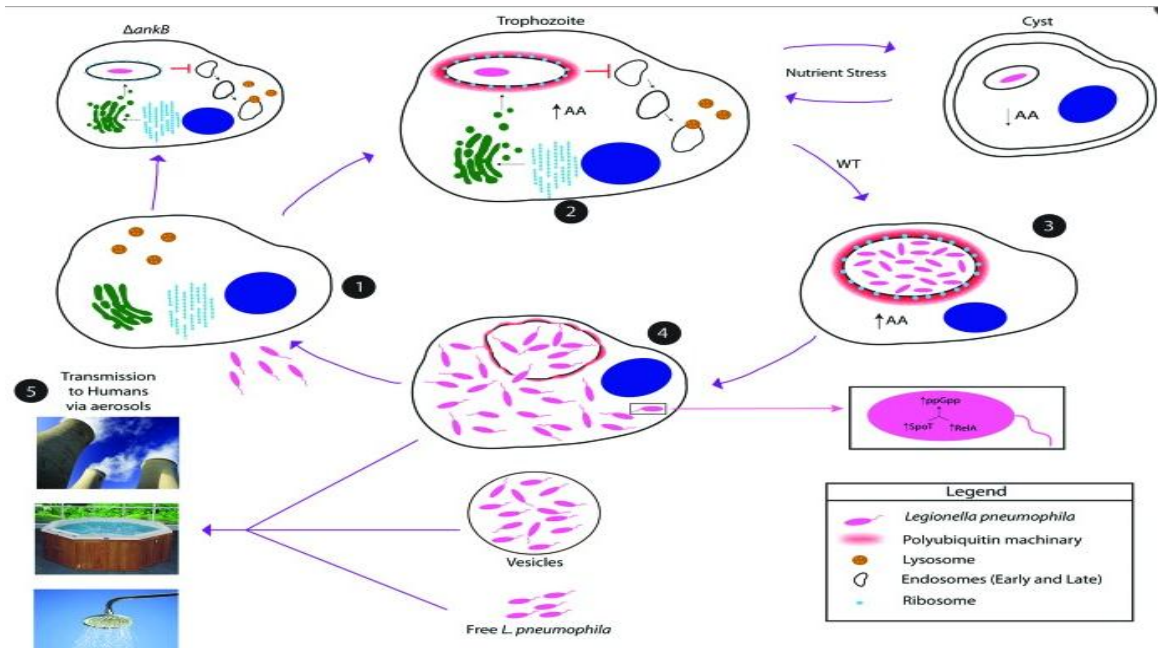


Figura 2. Ciclo de vida medioambiental de *L. pneumophila* en protozoos (Richards et al., 2013)

Actualmente se conocen al menos cinco proteínas implicadas en el mecanismo de infección que son EnhC, LpnE, RtxA, HtpB, Lvhb2 (Cirillo et al., 2001). Se ha demostrado que *L. pneumophila* no induce apoptosis en el huésped protozoario, pero induce la formación de poros mediante la citólisis después de terminar la replicación intracelular (Gao and Kwaik, 2000).

1.1.6. Estructura Genómica

El genoma, además de ser una valiosa e importante referencia para la epidemiología molecular y el análisis filogenético de *L. pneumophila*, es imprescindible para obtener información acerca de los mecanismos de patogénesis y la evolución de dicho patógeno (Newton et al., 2010).

Existe una gran cantidad de proteínas y dominios eucariotas en el genoma de *L. pneumophila* adquiridas a través de la transferencia horizontal de genes (TGH) y la evolución convergente. Gracias al desarrollo de métodos de tipificación distintos, se ha investigado la epidemiología molecular y, al tener acceso a las secuencias de todo el genoma de varias cepas de *L. pneumophila*, se ha conseguido llevar a cabo estudios genómicos comparativos usando arrays de DNA (Gomez-Valero, Rusniok and Buchrieser, 2009).

Hoy en día se han secuenciado 12 cepas ambientales y clínicas de *L. pneumophila* (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Bacteria/>) y éstas se han seleccionado acorde a las características epidemiológicas, permitiendo así estudiar la dinámica del genoma en relación con la virulencia (tabla 1). Mediante el análisis de la transferencia horizontal de genes, elementos genéticos móviles y recombinación a nivel de todo el genoma, se observa tanto la dinámica del genoma como su evolución (Gomez-Valero et al., 2011).

Tabla 1. Cepas secuencias de *L. pneumophila* (Reuter et al., 2013)

Número de muestra	Origen Biológico	Tipo de muestra	Serogrupo	Tipo de 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
LP HL06041035	Francia	Ambiental	1	ST734

En cuanto a las características generales del genoma, se conserva en tamaño que va desde 3.3 a 3.5 Mb, el contenido en guaninas y citosinas es aproximadamente un 38%, el número de genes predichos son de 3001 a 3259 y el porcentaje de regiones codificantes es de 88-90,2% (Chien et al., 2004).

A pesar de la diversidad existente entre cepas, existe sintenia, es decir, el orden genético en el cromosoma se conserva. Sin embargo, entre las cepas Lens y París, Philadelphia y Corby se interrumpe debido a reordenamientos, existiendo una inversión de 260 kb (Newton et al., 2010). Las cepas comparten alrededor del 80% de los genes que constituyen el núcleo del genoma, llamado *core*, mientras que aproximadamente el 10% del genoma es específico para cada una de las cepas (Gomez-Valero, Rusniok and Buchrieser, 2009). Gran parte del contenido genético específico de cada cepa está presente en regiones genómicas asociadas con diferentes contenidos en G+C que pueden representar lo que se conoce como islas de patogenicidad (Steinert et al., 2007).

Una filogenia basada en Multi Locus Sequence Typing (MLST) mostró que todas las cepas están estrechamente relacionadas, siendo Alcoy y Corby las más cercanas. Las secuencias se obtuvieron por el método de Sanger y la tecnología Roche-454, por lo que, después de la secuenciación del genoma de estas cepas de *L. pneumophila*, se observan diferencias significativas (tabla 2) (D'Auria et al., 2010).

Tabla 2. Principales características de los genomas de *L. pneumophila* (D'Auria et al., 2010).

Rasgos	Alcoy	Corby	Philadelphia	París	Lens
Longitud del genoma (pb)	3,516,335	3,576,470	3,397,754	3,503,610	3,345,687

Plásmidos	0	0	0	1	1
Contenido en GC (%)	38.38	38.48	38.27	38.37	38.42
Genes codificantes (%)	86	86	88	87	86
Promedio en GC de las islas (%)	37.75	37.43	36.01	38.17	37.66

En cuanto a la virulencia y persistencia de *L. pneumophila*, se deben principalmente a unos mecanismos específicos que están codificados por el núcleo del genoma, haciendo que sea capaz de infectar, sobrevivir y replicarse en los macrófagos (Gomez-Valero, Rusniok and Buchrieser, 2009).

La cepa Corby ha sido descrita como una de las cepas más virulentas; la cepa París es responsable de casos esporádicos, pero cabe destacar que se reconoce con frecuencia; la cepa Lens ha sido responsable de brotes importantes en Francia con 17 muertes registradas mientras que la cepa Philadelphia fue la primera en aislarse, pero es menos virulenta. La genómica comparativa de las cinco cepas aisladas en diferentes partes del mundo de *L. pneumophila* revelaron que sucedían eventos de recombinación (D'Auria et al., 2010).

1.2. Legionelosis

La legionelosis es una enfermedad infecciosa de origen ambiental. Posee una presentación estacional, es decir, se produce con mayor frecuencia a finales de verano y en otoño.

El término genérico de legionelosis se usa para describir las distintas maneras de presentación de la enfermedad, por lo que la infección puede manifestarse clínicamente de dos formas diferentes. La fiebre de Pontiac, que es la forma más leve de infección y se conoce como no neumónica, el paciente se recupera de manera espontánea de 2 a 5 días (Glick et al., 1978). Mientras que la forma más grave y severa de la infección se conoce como neumónica y es la enfermedad del Legionario, presenta una evolución rápida y potencialmente fatal si no se instaura el tratamiento adecuado además de cursar con una neumonía atípica y síndrome febril muy elevado (Fraser et al., 1997).

Al ser una enfermedad de distribución mundial, constituye un problema de salud pública. Se presenta en forma de casos esporádicos u origina brotes con un amplio rango de magnitud dependiendo de la fuente de infección. Cabe destacar que los brotes que presentan un mayor impacto en la población son los producidos por las torres de refrigeración, ya que los aerosoles que se generan poseen una gran capacidad de dispersión. Sin embargo, otros brotes se restringen a establecimientos y lugares cerrados como son los hospitales, hoteles, etc., (RED NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2011).

La legionelosis es una enfermedad de declaración obligatoria en España, donde los casos y brotes son vigilados por las comunidades autónomas y notificados a través de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica al Centro Nacional de Epidemiología. Cuando se produce un brote, las investigaciones van enfocadas a encontrar la fuente de infección con el objetivo de interrumpir la propagación así como la prevención de nuevos casos. Según el lugar donde se produce el brote, se diferencian en brotes comunitarios, nosocomiales y relacionados con viajes (RED NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2011).

1.2.1. Modo de transmisión

La forma de transmisión es por vía aérea mediante la inhalación de aerosoles, que son gotitas diminutas que contienen un número suficiente de bacterias como para causar enfermedad, de agua contaminada con la bacteria *L. pneumophila*. Sólo se ha descrito la transmisión ambiente-humanos y no se han dado casos de persona-persona ni existe evidencia de reservorios animales. Además no se transmite por beber agua o ingerir alimentos. También se ha definido la microaspiración del agua contaminada con la bacteria pero es poco frecuente dándose en pacientes hospitalizados. Para que sea capaz de infectar a las personas se tienen que cumplir una serie de requisitos tales como que exista una vía de entrada para la bacteria con un ambiente favorable, se disperse en forma de aerosol y contenga un número elevado de bacterias viables y que la cepa sea virulenta para el ser humano (CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA, 2009).

1.2.2. Período de incubación y susceptibilidad

En cuanto al período de incubación, es de 2 a 10 días, pero en algunos brotes se han descrito casos con períodos hasta 14 días. En el caso de la Fiebre de Pontiac, el período de incubación es menor, siendo de 5 a 66 horas.

El desarrollo y curso de la enfermedad dependen de tres factores: la susceptibilidad del paciente, la cantidad de inóculo de la bacteria que es capaz de llegar a los alvéolos pulmonares y de los factores de virulencia y patogenicidad de la bacteria en cuestión. Al ser una enfermedad oportunista, afecta sobre todo a personas de edad avanzada, que presenten alteraciones de la vía respiratoria como puede ser el tabaco o una enfermedad pulmonar crónica, e incluso, afecta a personas inmunodeprimidas por la afectación de la inmunidad celular (RED NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2011).

Por otra parte, en los últimos años se ha declarado una media anual de 1.263 casos de legionelosis a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Presenta una tendencia estable aunque con pequeñas oscilaciones, mientras que en el año 2011 se observa un descenso considerable (figura 3). Sin embargo, el incremento que se observa en el periodo de 1997 a 2002 se debe a la introducción de técnicas rápidas de diagnóstico por la detección de un mayor número de casos diagnosticados (CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA, 2009).

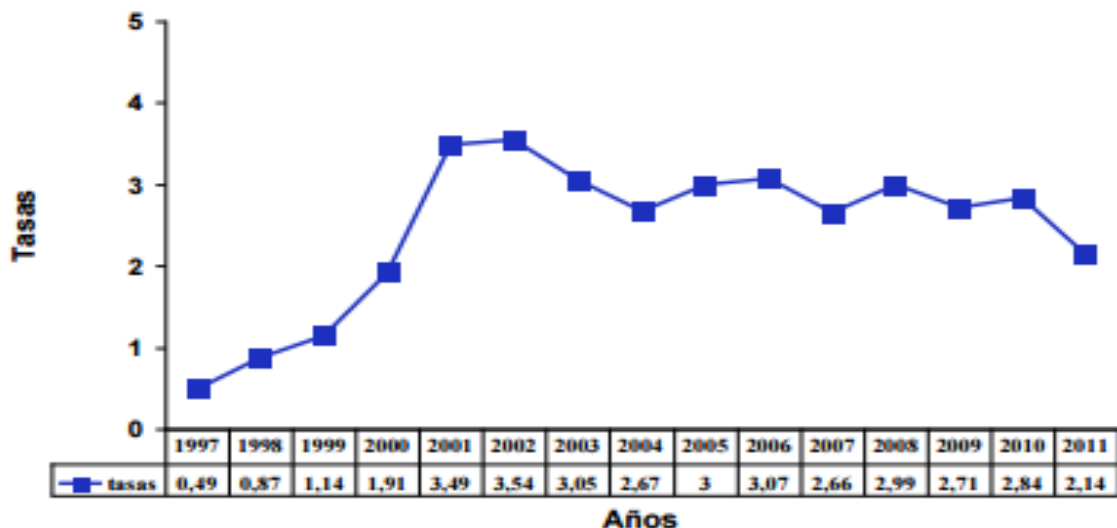


Figura 3. Incidencia por 100.000 habitantes en España (CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA, 2009).

1.2.3. Diagnóstico

A pesar de su fácil crecimiento en los medios acuáticos, es difícil cultivar *in vitro*. Como consecuencia, el diagnóstico de *L. pneumophila* se basa principalmente en técnicas serológicas para detectar un aumento en el número de anticuerpos. Se distinguen varias técnicas: la observación directa en muestras respiratorias por inmunofluorescencia directa (IFD), pruebas antigenuria, que consiste en la detección de antígenos de *Legionella* en orina por inmunoanálisis, titulación en suero de anticuerpos anti-*L. pneumophila* por inmunofluorescencia indirecta (IFI), cultivo de la bacteria en medios selectivos, etc., (Murdoch, 2003).

1.3. Sistema de tipado genético

El tipado de un microorganismo permite definir de forma clara su identidad. Para ello, se utilizaban técnicas como MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*), PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) etc. Sin embargo, en algunos laboratorios no fueron capaces de identificar el 100% de las cepas analizadas por lo que se propuso el *Sequence-Based Typing* (SBT), que se puede aplicar tanto en cepas obtenidas de fuentes ambientales como en casos clínicos, usada hoy en día y es una variante de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (Afshar et al., 2005).

El método estándar para la tipificación y caracterización de cepas de *L. pneumophila* está propuesto por los miembros del Grupo de Trabajo Europeo de Infecciones de *Legionella* (EWGLI), se basa en el perfil alélico obtenido a partir de las secuencias de nucleótidos de siete loci que codifican proteínas (Coscollá and González-Candelas, 2009).

El esquema SBT está basado en una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación de 7 loci; es decir, se basa en la asignación de un determinado alelo a regiones de siete genes concretos de la bacteria, que son *fliC*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* y *neuA*. De los siete loci, únicamente *asd* y *neuA* son considerados como genes *housekeeping*; el resto están implicados en la virulencia de *L. pneumophila* (Sánchez-Busó et al., 2013). Al

generarse para cada aislado un perfil alélico genético, conocido como *Sequence Type* (ST) definido por un número y que permite comparar la cepa de *L. pneumophila* que ha infectado a un paciente con las que se encuentran en el ambiente para localizar o descartar el foco de infección.

1.4. Variación genética y recombinación (Sánchez Busó et al., 2014)

Debido a los mecanismos de transmisión horizontal, las bacterias han adquirido nuevos genes y variantes favoreciendo nuevas adaptaciones. Estos procesos, son los que determinan la tasa de evolución adaptativa bajo condiciones medioambientales que cambian de manera rápida.

Gracias a la realización de un estudio basado en un análisis de secuenciación masiva, se ha obtenido un análisis genómico de las cepas de *L. pneumophila* aisladas en 13 brotes diferentes en Alcoy (Alicante, España) desde 1999 hasta 2010. En esta ciudad, han sido declarados 18 brotes por las autoridades de salud pública y que afectaron a 343 individuos. Se han aislado cepas clínicas y ambientales de *L. pneumophila* a través de métodos microbiológicos. Una variante particular, identificada como ST578, se ha visto que puede ser la cepa causante de los brotes. Además, se ha conseguido observar que algunos de brotes no eran causados por una única fuente biológica. Observaron que las relaciones evolutivas de los aislados del subtipo ST578 producían dos hechos a destacar:

- Los aislados del mismo brote no conformaban grupos monofiléticos e incluso se mostró distancia dentro de la agrupación de ST578.
- Los aislados clínicos y ambientales de este ST están agrupados en dos clusters diferentes denominados como sublinaje A y sublinaje B.

Las cepas aisladas de los brotes entre 1999-2004 se encuentran agrupadas en el sublinaje A, mientras que los aislados de brotes posteriores 2009 y 2010 están agrupados tanto en el sublinaje A como B, ya que se observó un aumento de la variabilidad genética (figura 4). Los diferentes colores de la figura representan los aislados ya sean relacionados a distintos brotes epidemiológicamente o a casos esporádicos mientras que los círculos en rojo son los nodos que indican valores de *bootstrap* mayor a 90% por lo que presenta una elevada probabilidad de ser fiable.

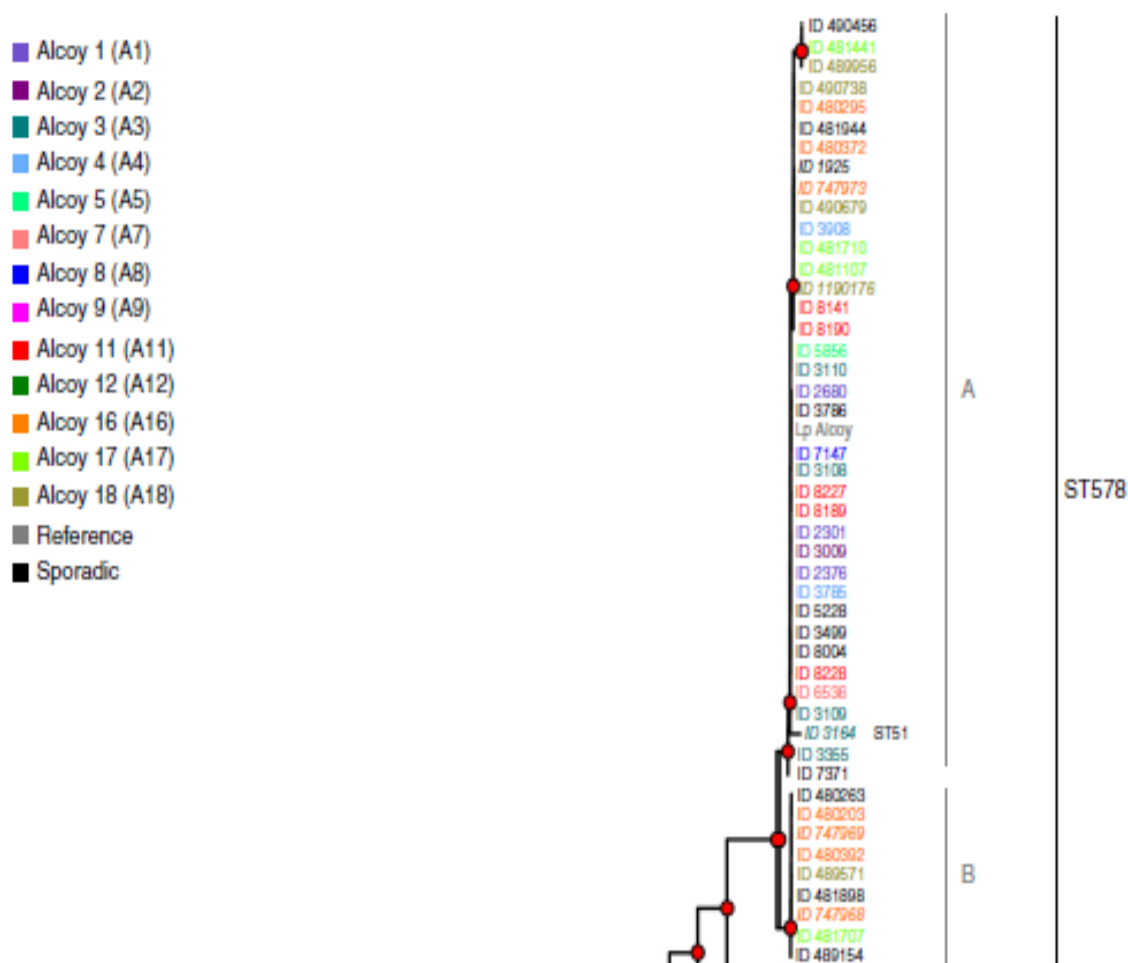


Figura 4. Reconstrucción filogenética mediante máxima verosimilitud del núcleo del genoma de las cepas de *L. pneumophila* y del genoma de referencia (Sánchez-Busó et al. 2014).

En cuanto a la evolución de las cepas ST578 en Alcoa, se observan al menos 16 eventos de recombinación en 5 ramas diferentes en los que se ha tenido en cuenta los SNPs y los genes involucrados en estos eventos de recombinación detectados. En el artículo citado, han obtenido un árbol bayesiano de máxima credibilidad usando BEAST con información temporal previa de los 2.202 SNPs en el núcleo del genoma de cepas ST578 (Figura 5).

El gradiente de color en las ramas representan las tasas medias de sustitución, los cuadrados naranjas representan eventos de recombinación y los círculos de colores representan los metadatos asociados. Cabe destacar que las ramas que conducen a las cepas del brote más reciente (desde 2009 y 2010) mostraron convergencia de los genes implicados en dos eventos de recombinación F y J. Ambos eventos incluyen un conjunto de 14 genes que codifican diferentes subunidades de la NADH deshidrogenasa tipo I.

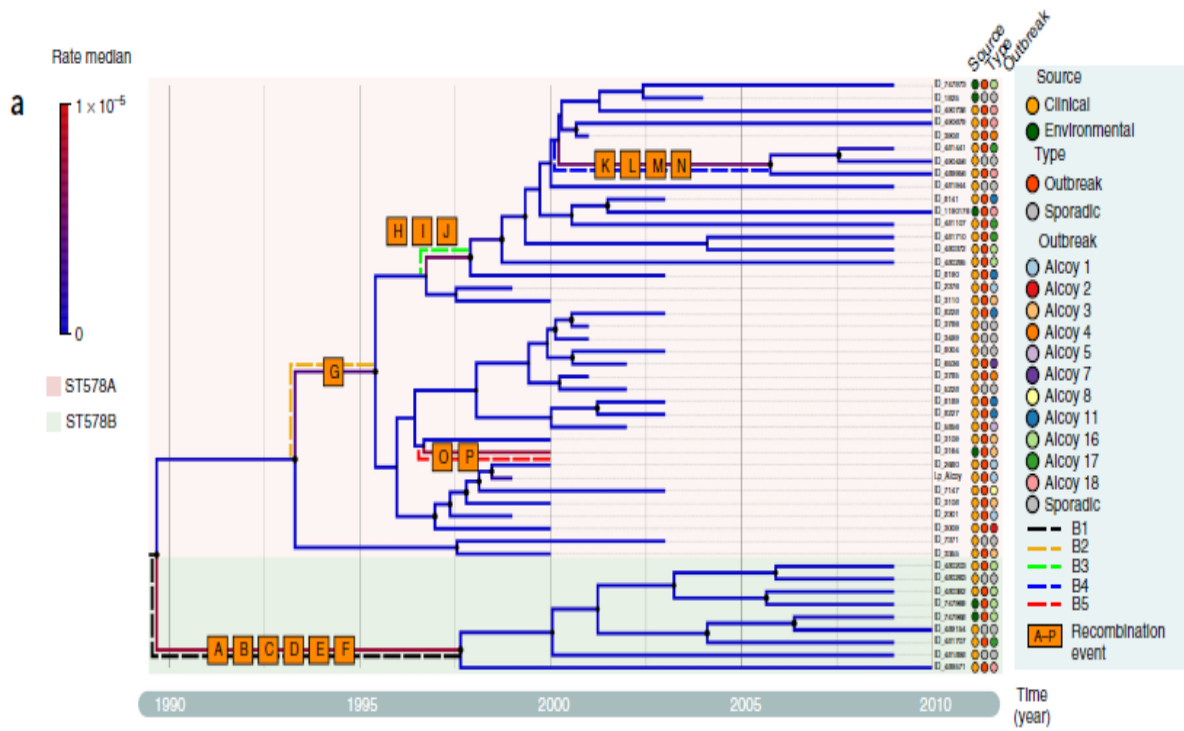


Figura 5. Eventos de recombinación en las cepas ST578 tanto del sublinaje A como B (Sánchez-Busó et al. 2014).

Por último, los resultados de dicho estudio demostraron que la evolución de ST578 se vio fomentada por la introducción de una nueva variante con el mismo perfil.

2. Objetivos

El principal factor que genera la diversidad y variación genética son las mutaciones. Sin embargo, no todas las variantes localizadas en *L. pneumophila* son el resultado de mutaciones puntuales o estructurales. Se debe a que las bacterias han sido capaces de desarrollar de forma específica estrategias tanto para incorporar como para intercambiar segmentos genómicos y plasmídicos.

Por tanto, la diversidad genética ha ido aumentando desde que se aislaron las primeras cepas en 1999 en Alcoy y han sido capaces de adquirir nuevos genes y variantes, lo cual podría alterar la clonalidad en los brotes dificultando así su investigación.

En Alcoy, la variante asociada con mayor frecuencia a los casos clínicos es el tipo ST578, que presenta dos subtipos con dinámicas epidémicas distintas, los sublinajes A y B.

El objetivo del proyecto se enmarca en el campo de investigación de la epidemiología molecular de *L. pneumophila*. Al cambiar la dinámica poblacional del ST578 (Sánchez-Busó et al., 2014), es indispensable disponer de biomarcadores de identificación para discernir entre los sublinajes A y B de manera rápida y fiable, encontrando zonas o genes únicos en cada uno de los mismos.

3. Materiales y métodos

3.1. Análisis genómico de los sublinajes A y B

En cuanto a los archivos de entrada proporcionados de ambos sublinajes, los ficheros de la secuencia genómica completa obtenidos (Sánchez-Busó et al., 2014) fueron facilitados por Sánchez Busó y disponibles en la correspondiente bases de datos GenBank. Por lo que el fichero de contigs procede del ensamblado de las lecturas con Velvet mientras que el resto de la anotación se realizó utilizando el software PROKKA (tabla 3) con el objetivo de obtener la lista de genes presentes en cada una de las cepas analizadas. Se utilizó el Input.ffn de cada una de las cepas dentro de los dos sublinajes diferentes ya que se trataba de secuencias de nucleótidos.

Tabla 3. Archivos de entrada para cada cepa tanto del sublinaje A como B.

Extensión	Descripción
Input_contigs.fas	Contigs como resultado del ensamblado
Input.faa	Archivo Multifasta con las secuencias de las proteínas
Input.ffn	Archivo Multifasta con las secuencias nucleotídicas
Input.gff	Anotación de los contigs en formato GFF
Input.fsa	Scaffold del genoma

En cuanto a las secuencias de los genomas de *L. pneumophila*, proceden de secuenciar el DNA con la tecnología SOLiD 5500XL que son secuencias de 75 pb, single-end y ensambladas con Velvet.

3.1.1. Comparación genómica

A partir de las secuencias de *L. pneumophila* del perfil genético ST578 tanto del sublinaje A como del B, se realizó una comparación genómica con WebACT (<http://www.webact.org/WebACT/home>) de la cepa de referencia Alcoy, que está incluida en el sublinaje A, con la del sublinaje B con el código de identificación (ID) ID_747969, ambas en formato EMBL.

WebACT proporciona una base de datos y permite realizar comparaciones entre secuencias genómicas de organismos procariotas gracias a la herramienta de comparación Artemis (ACT) desarrollada por el Instituto Sanger. Además, permite la visualización de dichas comparaciones. Éstas se realizan empleando Blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) y pueden observarse entre secuencias genómicas previamente procesadas, cuya información se encuentra almacenada dentro de la base de datos, o ser proporcionadas por el usuario (Abbott et al., 2005).

La herramienta ACT es un programa para la visualización de dos o más genomas de forma gráfica. Gracias a que usa un algoritmo (Blastn o tBlastx) es capaz de generar un archivo de comparación entre los genomas de interés. La información que se genera en dicho archivo se utiliza en ACT con el objetivo de representar de manera gráfica el grado de similitud entre los genomas.

En cuanto a la interpretación de los resultados, los bloques de color rojo son las secuencias conservadas en ambos genomas y que se encuentran en el mismo sentido, mientras que las secuencias conservadas pero que están invertidas en un genoma con respecto al otro, se muestran como bloques azules. Por otra parte, las secuencias que están presentes en un genoma pero no en el otro se ven como bloques de color blanco (Figura 6).

Así pues, se comparó el genoma de ambas cepas para identificar zonas únicas tanto en el sublinaje A como B observando, sobre todo, los bloques de color blanco. Las zonas de secuencias únicas encontradas se guardaron en formato Fasta con diferentes nombres.

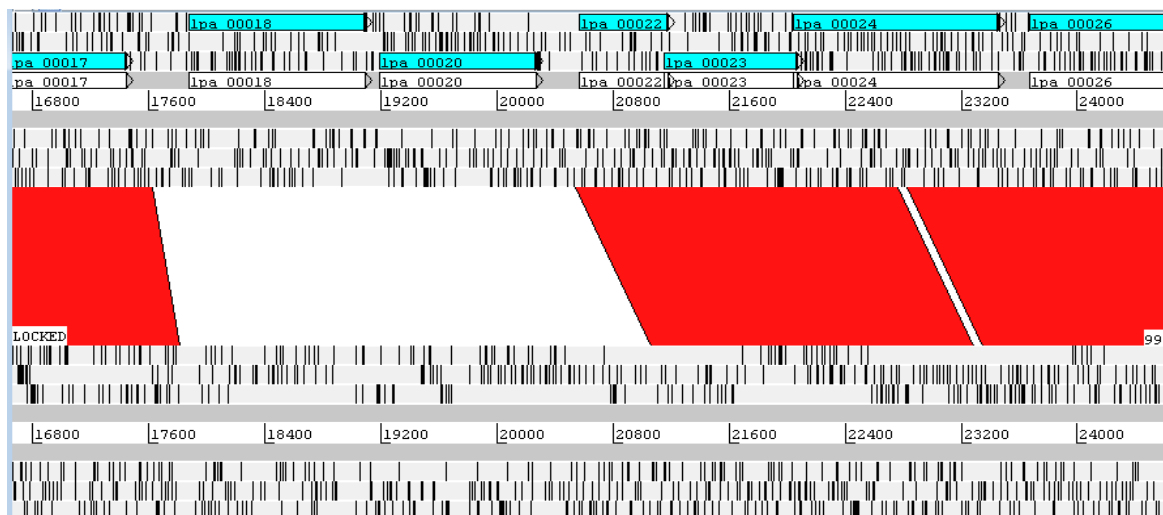


Figura 6. Comparación de los genomas del sublinaje A y B con la herramienta ACT.

3.1.2. Estudio de los alineamientos

Se descargó el programa informático de alineamiento de secuencias Blast+ (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastNews) y se instaló por línea de comandos (Oracle VM VirtualBox) para su correcta utilización.

Una vez facilitados los genomas de ambos sublinajes de ST578 en formato ffn, se concatenaron las cepas correspondientes al sublinaje A y las del sublinaje B en formato fasta para crear para sendas bases de datos con makeblastdb (archivos de entrada en formato fasta en una base de datos de BLAST). A continuación, las regiones únicas que fueron seleccionadas manualmente con ACT, se compararon con cada una de las bases de datos creadas anteriormente para visualizar si una región única en A se encontraba en todas las cepas del sublinaje A y no en el sublinaje B y viceversa.

Así pues, para este último paso era necesario utilizar y ejecutar en la línea de comandos Blastn con cada una de las regiones únicas, ya que compara una secuencia de nucleótidos contra una base de datos que contiene también secuencias nucleotídicas que son filogenéticamente cercanas.

El objetivo fue cuantificar la similitud de cada una de las secuencias únicas obtenidas contra las dos bases de datos creadas. El programa permite visualizar parámetros tal como el porcentaje de identidad, la longitud del alineamiento, el score así como el e-value.

Por último, para observar el score de cada uno de los archivos de salida creados y ver el resultado, se realizó un script con Python (Figura 7).

```
#!/usr/bin/env python
n = 0
query = raw_input ("que archivo?")
archi = open (query)
query2 = raw_input ("output?")
output = open (query2, "w")
for line in archi:
    if ">" in line:
        if not n == 0:
            output.write("\n")
        lista = line.split("|")
        ID = lista [0]
        output.write(ID+"\t")
        n = 1
    if "Identities" in line:
        laist = line.split(" ")
        AD = laist [2:5]
        for elemento in AD:
            if not elemento == "=":
                output.write(elemento+"\t")
```

Figura 7. Script de Python para visualizar los hits de cada uno de los alineamientos.

3.1.3. Extracción y alineamiento génico

Para la extracción de las secuencias génicas en las que se conocía la posición inicial y final de cada gen se utilizó el software EMBOSS (*The European Molecular Biology Open Software Suite*) y se obtuvieron archivos en formato Fasta de las secuencias de cada uno de los genes (27 en total) para todos los genomas de las cepas de ST578 tanto del sublinaje A como B ya que se deseaba buscar genes implicados en la separación de ambos linajes.

Para el alineamiento múltiple se utilizó el programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) ya que es capaz de destacar regiones de similitud, divergencia e incluso mutaciones con el alineamiento por homología que realiza. Con la finalidad de obtener para cada gen el alineamiento adecuado, primero se ordenaban las secuencias de DNA de las cepas del sublinaje A frente a las del B.

Una vez realizado el alineamiento, se observaron bloques de *gaps* que fuesen significativos en cada uno de los sublinajes, así como los SNPs para diferenciar ambos sublinajes con el fin de encontrar marcadores específicos de cada uno de ellos.

Por último, se analizaron los SNPs que estaban presentes en las secuencias de los genes y se escogieron aquellos genes que tuviesen dos o más SNPs juntos para un funcionamiento correcto y específico de los cebadores a diseñar así como de la amplificación alelo específica.

3.2. Diseño de cebadores

Gracias a la herramienta online OligoAnalyzer 3.1 de IDT (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES) (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) se comprobó que los cebadores diseñados eran correctos (tabla 4).

Los parámetros utilizados para el diseño de los cebadores fueron: tipo DNA, una concentración de oligonucleótidos de 0.20 μ M, de Sodio (Na^+) de 50 mM, de Magnesio (Mg^{++}) 2mM y por último de dNTPs 0,2 mM. También se observó que no se formasen bucles en horquilla (hairpin), self-dimer o hetero-dimer ya que podrían complicar la reacción de PCR. Se aconsejó un valor de Delta G menor a -9 Kcal/mol ya que un valor mayor es problemático.

Cabe destacar que en el diseño de los cebadores los SNPs se encontraban en la zona 3' para una mayor especificidad a la hora de amplificar.

Tabla 4. Cebadores diseñados para la amplificación

Gen	Sublinaje	Cebadores-Secuencia	Tm (°C)
Lpa03704	Cepa 8228_A	F: 5' TAC ATA ACC ACC AGT GGG 3' R: 5' TAA GTT CAA ATT CTT GGC 3'	57.7 52.6
	Cepa 480392_B	F: 5' TAC ATA ACC ACT AGC GGA 3' R: 5' TAA GTT CAA ATT CTT GGC 3'	56.5 52.6
Lpa02172	Cepa 8228_A	F : 5' CAG AAT CGC ATT GCT GCG C 3' R: 5' TTA AAA TTT GAA TTT CAG T 3'	64.1 48.9
	Cepa 480392_B	F: 5' CAG AAT CGC ATT GCT GCA T 3' R: 5' TTA AAA TTT GAA TTTCAGC 3'	61 50.3
Lpa03873	Cepa 8228_A	F: 5' GCT TGA CGT CGT TTC GCA 3' R: 5' CAA GGT GAA GCA ACT GTT 3'	62.6 57.5
	Cepa 480392_B	F: 5' GCT TGA CGT CGT TTC GTG 3' R: 5' CAA GGT GAA TCA ACT GTC 3'	60.6 55

3.3. Obtención y preparación de las muestras

Las muestras utilizadas son cultivos puros de *L. pneumophila* procedentes de brotes, casos esporádicos y programas de vigilancia epidemiológica en la localidad de Alcoy del tipo ST578. El DNA se extrajo por choque térmico y se guardó a -20°C.

Se analizaron un total de 46 muestras (tabla 5 y 6) pero, al proceder de cultivos puros, se realizó una cuantificación del DNA utilizando el espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (*Thermo Scientific*) y las concentraciones se ajustaron a un rango entre 50-100 ng/μL aproximadamente mediante diluciones para evitar saturar la reacción de PCR o, incluso, inhibirla debido a que las muestras estaban muy concentradas.

Tabla 5. Cepas utilizadas pertenecientes al sublinaje A de ST578.

ID_481107	ID_1190176	ID_8141	ID_8190	ID_5856	ID_3110
ID_3786	ID_7147	ID_3108	ID_8227	ID_8189	ID_3009
ID_3785	ID_5228	ID_490456	ID_481441	ID_489956	ID_490738
ID_480295	ID_480372	ID_481944	ID_1925	ID_747973	ID_490679
ID_3908	ID_481710	ID_2376	ID_3499	ID_8004	ID_8228
ID_6536	ID_3109	ID_3164	ID_3355	ID_7371	ID_2301
ID_2680					

Tabla 6. Cepas utilizadas pertenecientes al sublinaje B de ST578.

ID_480203	ID_747968	ID_489571
ID_480263	ID_489154	ID_480392
ID_747969	ID_481898	ID_481707

Por otra parte, se llevó a cabo una resuspensión de los cebadores, ya que estaban liofilizados (Stock 100 μM). Para ello, se añadió a cada uno de los cebadores el volumen de H₂O ultra pura correspondiente según la fórmula establecida: Volumen_{H₂O} (μL) = n° nanomoles x 10 y a continuación, se realizó una dilución 1:10 en la cual se introdujo 10 μL de cebador con 90 μL de H₂O ultra pura.

3.4. Amplificación por PCR

3.4.1. PCR

Cada reacción de amplificación contenía 2.5 μL de tampón MgCl₂ a 10X, 2.5 μL de Taq DNA polimerasa *Biotoools* (1U/μL), 0.5 μL de dNTPs a 10 mM, 0,5 de cebadores a 10 μM, aproximadamente 100 ng de ADN y H₂O ultra pura hasta un volumen final de 25 μL.

En cuanto al programa de amplificación, cada reacción se sometió a un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura de anillamiento apropiada y favorable para cada par de cebadores y 30 segundos de extensión a 72°C. Por último, se sometió a un paso de extensión final de 7 minutos a la misma temperatura y las muestras se mantuvieron a 8°C hasta ser recuperadas del termociclador donde después fueron almacenadas en refrigeración a 4°C.

Para la comprobación de la amplificación, se realizó una electroforesis de 20 minutos a 120 voltios. Así pues, los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.4% al tratarse de fragmentos pequeños; como marcador se utilizó el GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (anexo) de Thermo Scientificy tampón de carga, el cual está compuesto por una mezcla de 100µL de Load Buffer al 3X y 0.4 µL de GelRed (agente intercalante). A continuación se visualizó en el transiluminador.

3.4.2. “Touchdown” PCR o amplificación con rampa decreciente de temperaturas

Una variante de la PCR utilizada con el fin de reducir el fondo inespecífico, fue la “touchdown” PCR, que emplea una rampa decreciente de la temperatura de anillamiento a lo largo del progreso de la PCR.

Se empieza con una temperatura de anillamiento mayor que la temperatura de *melting* (T_m) de los cebadores y se va disminuyendo de manera progresiva y gradual hasta la temperatura de hibridación óptima de los cebadores, evitando así amplificaciones inespecíficas y dímeros de cebadores (McPherson and Møller, 2007).

Cabe destacar que se utilizaron diferentes formas de programar la “touchdown” PCR. Una de ellas fue empezar con una temperatura de anillamiento elevada y bajar un grado la temperatura cada dos ciclos hasta la temperatura óptima deseada dónde continúa el resto de ciclos de la PCR. Otra forma trataba de empezar con una temperatura de anillamiento elevada y bajar -0.2°C por cada ciclo de PCR.

3.4.3. PCR en gradiente

Otra variante, conocida como PCR en gradiente, se utilizó para seleccionar las condiciones térmicas óptimas de cada reacción, ya que usa un proceso de control tanto de tiempo como de temperaturas. Permite llevar a cabo diferentes temperaturas de anillamiento para optimizar las reacciones de PCR (figura 8).

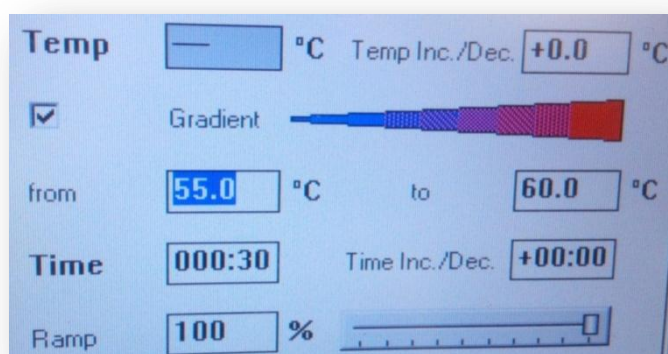


Figura 8. PCR en gradiente de 55°C a 60°C.

4. Resultados y Discusión

4.1. Análisis de las secuencias

Gracias al programa WebACT, se obtuvieron un total de 80 regiones nucleotídicas únicas de ambos sublinajes fijándose, en su mayoría, en los bloques blancos que diferenciaban el sublinaje A del B. Éstas se filtraron, es decir, se eliminaron las “n” de cada una de las secuencias, ya que significaba que no había sido posible determinar el nucleótido existente en una posición concreta de la secuencia, y, además, se escogieron aquellas secuencias que tuviesen 100 pb o más. Por tanto, se obtuvieron finalmente como secuencias válidas, 20 de las 80 secuencias inicialmente encontradas.

4.2. Comparación y alineamiento de secuencias

Se comprobó con Blast+ y Blastn, mediante el uso de los comandos correspondientes en cada caso, si las secuencias únicas comparadas con cada una de las cepas de ST578 tenían un hit de aproximadamente 100% en una de las dos bases de datos y no en la otra. Pero, sin embargo, las 20 secuencias que se usaron como “query” presentaban un hit del 100% con ambas bases de datos, tanto del linaje A como del B, por lo que estaban presentes en ambos sublinajes y no servían como marcadores del linaje.

La visualización del resultado fue facilitada por la realización de un script, el cual, para cada secuencia única, proporcionaba la longitud del alineamiento y el porcentaje de identidad para cada cepa de cada sublinaje (Figura 9 y figura 10).

```
> ID_8141 785/785 (100%), 28/28 (100%),
> ID_8004 785/785 (100%),
> ID_747973 785/785 (100%),
> ID_7147 785/785 (100%),
> ID_481441 785/785 (100%),
> ID_481107 785/785 (100%),
> ID_480372 785/785 (100%),
> ID_3785 785/785 (100%),
> ID_3110 785/785 (100%),
> ID_3109 785/785 (100%),
> ID_2680 785/785 (100%),
> ID_3108 784/784 (100%),
> ID_8189 783/783 (100%),
> ID_2376 783/783 (100%),
> ID_489956 782/782 (100%),
> ID_1190176 781/781 (100%),
> ID_8228 784/786 (99%),
> ID_3786 779/779 (100%),
> ID_8190 777/777 (100%),
> ID_8227 783/786 (99%),
> ID_6536 780/785 (99%),
> ID_3009 756/756 (100%),
> ID_7371 755/755 (100%),
> ID_5228 755/755 (100%), 27/27 (100%),
> ID_480295 758/761 (99%),
> ID_490738 741/741 (100%),
> ID_481944 738/738 (100%), 28/28 (100%),
> ID_2301 719/719 (100%),
> ID_3355 708/708 (100%),
> ID_5856 705/705 (100%),
> ID_3908 701/701 (100%), 28/28 (100%),
> ID_481710 650/650 (100%),
> ID_3499 608/608 (100%),
> ID_1925 466/466 (100%), 347/347 (100%), 39/42 (93%),
```

Figura 9. Longitud del alineamiento y porcentaje de identidad de cada cepa del sublinaje A para una secuencia única.

> ID_747969	785/785	(100%),		
> ID_481707	785/785	(100%),		
> ID_480203	779/779	(100%),		
> ID_481898	769/769	(100%),	53/54	(98%),
> ID_489154	756/757	(99%),		
> ID_480392	754/754	(100%),		
> ID_480263	747/747	(100%),		
> ID_489571	743/743	(100%),		
> ID_747968	734/737	(99%),		

Figura 10. Longitud del alineamiento y porcentaje de identidad de cada cepa del sublinaje B para una secuencia única.

Tras este primer resultado negativo, buscamos otra alternativa. La extracción de las secuencias de los genes con el programa EMBOSS y el posterior alineamiento con MEGA no reveló bloques de *gaps* significativos, posiblemente debido a un error en el mapeo. Sin embargo, sí que se encontraron SNPs que diferenciaban ambos sublinajes.

Se escogieron 3 de los 27 genes con SNPs significativos para el diseño específico de los cebadores (tabla 7).

Tabla 7. Nombre del gen y la localización de los SNPs para el correcto diseño de los cebadores.

Gen	Posición SNPs
Lpa03704	828-831-834
Lpa02172	144-145
Lpa03873	138-139

4.3. Funcionalidad de los cebadores

En primer lugar, se eligieron tres genes con SNPs significativos y se diseñaron los cebadores tanto el *forward* como el *reverse* con una distancia mínima entre ellos de 200 pb para cada sublinaje y para cada gen. De cada gen se escogió el par de cebadores del sublinaje correspondiente que tuviese una mejor proporción de C+G.

Para el gen Lpa03704 y Lpa02172, se eligió el par de cebadores que amplificarían el sublinaje A y no las cepas del sublinaje B, mientras que para el gen Lpa03873 se escogió el par de cebadores que amplificarían el sublinaje B y no el A.

En segundo lugar, para comprobar la funcionalidad de los cebadores diseñados para cada sublinaje, se realizó una prueba con una PCR normal a una temperatura de anillamiento de 56°C con 4 muestras para cada gen (2 cepas del B y 2 del A) y posterior electroforesis para su visualización (Figura 11).

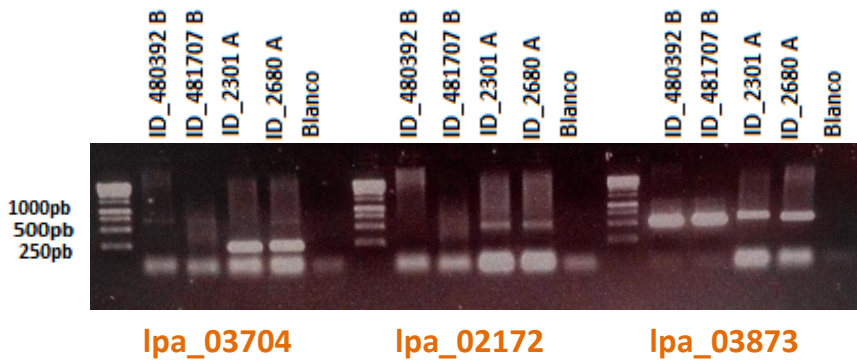


Figura 11. Funcionalidad de los cebadores de los genes *lpa03704*, *lpa02172* y *lpa03873* respectivamente. Los pocillos 1, 7 y 13 corresponden al patrón de pesos moleculares, 2, 3, 8, 9, 14 y 15 pertenecen a muestras del sublinaje B con los cebadores correspondientes a cada gen mientras que los pocillos 4, 5, 10, 11, 16 y 17 pertenecen a muestras del sublinaje A. Los pocillos 6, 12, 18 se corresponde al control negativo (blanco).

Como se observa en la figura 11, en cuanto al gen *lpa03704*, el par de cebadores diseñados amplifican las muestras correspondientes al sublinaje A y no las del B, por lo que funcionan correctamente con un tamaño de 250 pb. Los cebadores diseñados para el gen *lpa02172* también amplifican el sublinaje A, como era de esperar, pero no se observa una banda clara como en los otros casos, por lo que puede ser un subproducto de la amplificación ya que la PCR es sensible a la contaminación y hay que tener precaución a la hora de preparar los reactivos y las muestras o un problema de especificidad. Por último, los cebadores para el gen *lpa03873*, que tendrían que amplificar el sublinaje B, amplifican tanto el A como B, por lo que una alternativa será probar con una temperatura de anillamiento más elevada, es decir, más restrictiva para el sublinaje B.

Cabe decir que debajo de las bandas amplificadas se encuentran fragmentos que copurifican con el molde, llamados *primer-dimers*, los cuales presentan sitios de unión para los cebadores de secuenciación. Mientras que en la zona de arriba hay "*smears*" que puede ser DNA degradado o que esté muy concentrado y cuya solución es una dilución mayor.

Una vez realizada la prueba, se realizó otra PCR en las mismas condiciones para el gen *lpa03704* y *lpa02172* con todas las cepas de ST578 disponibles (figura 12 y figura 13).

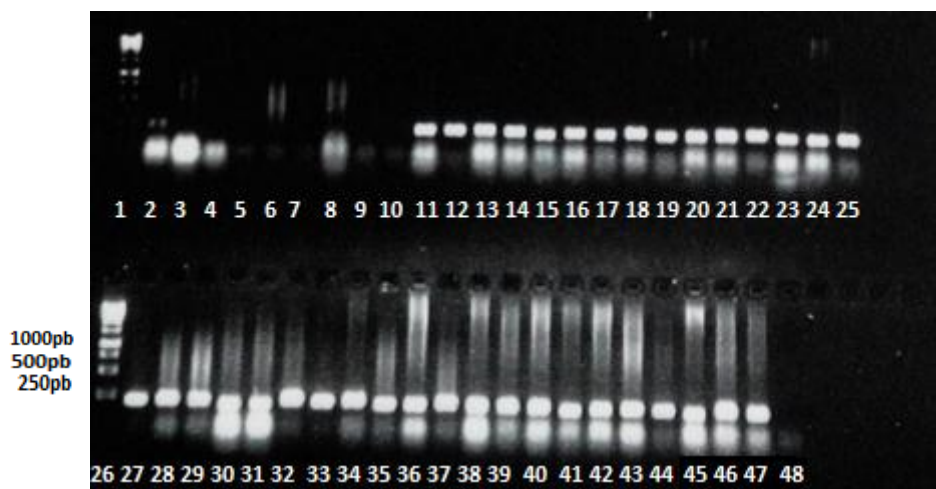


Figura 12. PCR a 56°C con el cebador correspondiente al gen *lpa03704*. Los pocillos 1 y 26 son el marcador de pesos moleculares, del 2 al 10 se corresponde con las cepas de ST578 del sublinaje B, del 11 al 47 pertenecen al sublinaje A y el último pocillo 48 pertenece al control negativo.

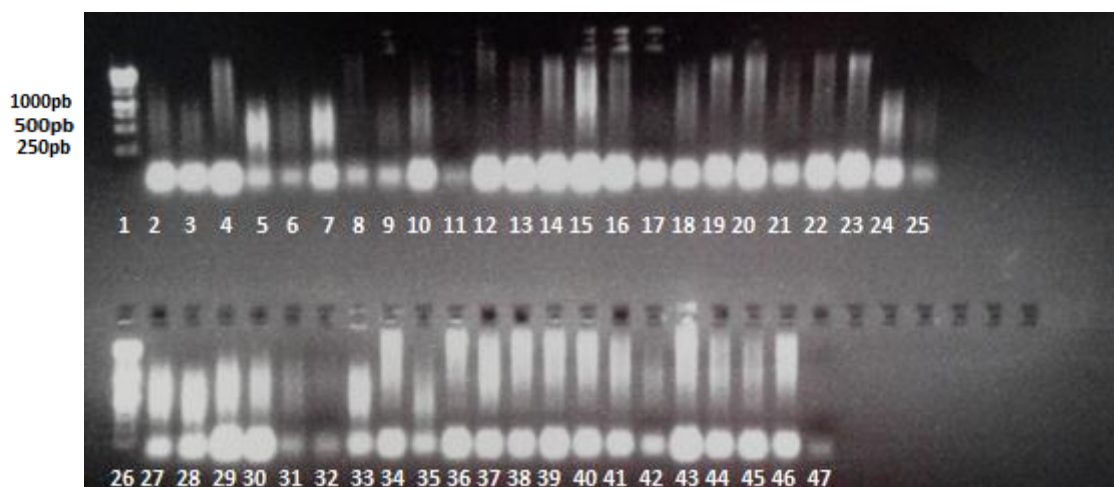


Figura 13. PCR a 56°C con el cebador correspondiente al gen *lpa02172*. Los pocillos 1 y 26 son el marcador de pesos moleculares, del pocillo 2 al 10 se corresponde con las cepas de ST578 del sublinaje B, del 11 al 46 al sublinaje A (a excepción de la muestra ID_747973 A) con el último pocillo 47 perteneciente al control negativo

Tal y como se observa en la figura 12, los cebadores vuelven a funcionar de manera correcta, amplificando todas las cepas del sublinaje A con un tamaño de 250 pb y ninguna del B, por lo tanto, están bien diseñados y son específicos para un sublinaje. Como se ve en la figura 13, los cebadores no amplifican adecuadamente el sublinaje A, además de haber una gran cantidad de "smears" y primer-dimers. Como alternativa a este caso, se realizó una dilución 1:10 de las muestras de cada cepa ya que había una gran cantidad de DNA. Se repitió la PCR pero el resultado volvió a ser negativo, no amplificando el sublinaje que le correspondía.

Así pues, se realizó una PCR en gradiente con una temperatura de anillamiento de 57 a 61°C para el gen *lpa02172* y para el gen *lpa03873* una PCR más restrictiva a 60,1°C. El resultado para ambos fue negativo: no había amplificación ni del sublinaje A ni del B, respectivamente.

Por consiguiente, se cuantificaron las muestras de DNA y se hizo una nueva dilución específica para cada muestra. Se realizó otra PCR en gradiente para el gen *lpa02172* en un rango de temperaturas de anillamiento de 55 a 60°C, así como una touchdown-PCR de 55 a 59°C en el que cada ciclo se disminuía 0.2°C para el gen *lpa03873* (figura 14).

El resultado fue negativo para el gen *lpa02172* pero positivo para el gen *lpa03873*, ya que amplificaba las cepas del sublinaje B y a medida que la temperatura iba aumentando, las bandas eran más específicas con un tamaño de 500 pb.

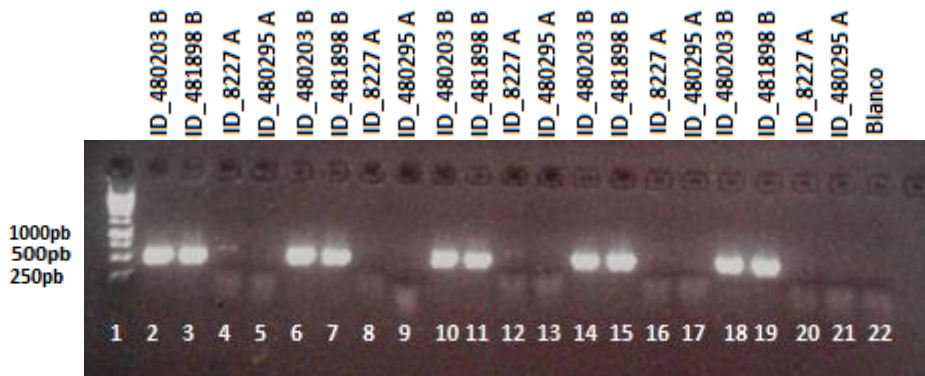


Figura 14. Touchdown PCR del gen *lpa03873*. El primer pocillo es el marcador de pesos moleculares, los pocillos 2,3,6,7,10,11,14,15,18,19 pertenecen al sublinaje B, los pocillos 4,5,8,9,12,13,16,17,20,21 pertenecen al sublinaje A y el pocillo 22 al control negativo.

A continuación, se realizó una PCR normal a una temperatura de anillamiento de 55.9°C, una PCR en gradiente con un rango de temperaturas de 52 a 54°C y una PCR touchdown a 56°C en la que cada ciclo se reducía 0.2°C para el gen *lpa02172*.

El resultado en los tres casos fue negativo, sin ninguna amplificación. Por lo tanto, como última opción se llevó a cabo una manera diferente de programar la touchdown en la cual cada dos ciclos de la PCR se bajaba un grado la temperatura hasta llegar a 55°C donde sucedían el resto de ciclos de anillamiento y se realizó para tres concentraciones distintas (figura 15).

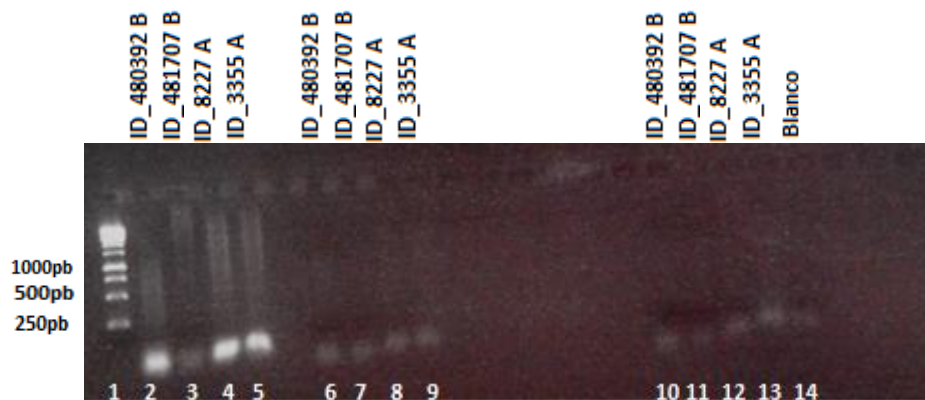


Figura 15. PCR touchdown para *lpa02172*. El primer pocillo es el patrón de pesos moleculares, los cuatro pocillos siguientes presentan una concentración más elevada de DNA siendo dos muestras del B y dos del A respectivamente, los cuatro siguientes tienen una menor concentración y los cuatro últimos del final presentan una concentración aún menor que los dos anteriores. El último pocillo es el control negativo.

Tal y como se observa en la figura 15, y como ha pasado en los otros casos comentados anteriormente, no hay una amplificación del sublinaje A con los cebadores diseñados para el gen *lpa02172*. Por lo que las alternativas serían utilizar una polimerasa que fuese más procesiva, pero es más cara; añadir DMSO, que facilita de manera indirecta una mejor hibridación de los cebadores al molde de DNA; o la más factible, volver a rediseñar los cebadores, ya que la T_m no parece adecuada al existir una gran diferencia entre las T_m óptimas del cebador *forward* y del *reverse*, que hace que la PCR no funcione correctamente. Se descarta el factor sensibilidad, debido a que se comprobó con tres concentraciones de DNA previamente cuantificadas.

En cuanto al gen *lpa03873*, se realizó una PCR en gradiente de 55 a 60°C donde los cebadores diseñados sí que amplificaban el sublinaje B, como era de esperar; pero con una temperatura más restrictiva de 59.9°C, las bandas eran más específicas. Por tanto, se realizó una PCR a 59.9°C para todas las cepas y el resultado fue positivo, amplificando el sublinaje B con un tamaño aproximado de 500 pb y no el sublinaje A (figura 16).



Figura 16. PCR a 59.9°C del gen *lpa03873*. Los pocillos 1 y 26 corresponden al patrón de pesos moleculares, los ocho pocillos siguientes se corresponden al sublinaje B (a excepción de la muestra ID_747968 B), del pocillo 10 al 46 pertenecen al sublinaje A (a excepción de la muestra ID_747973 A) y el pocillo 47 perteneciente al control negativo.

En cuanto al gen *lpa02172*, la mejor opción al resultado negativo fue rediseñar un cebador *reverse* con una T_m que no se diferenciase en más de 5 grados del *forward*. El nuevo cebador obtenido de la cepa ID_8228 del sublinaje A fue: 5' CTT CTG CCA AAG TTG CCA A 3' con una T_m de 60.8°C. Primeramente, se realizó una PCR en gradiente a distintas temperaturas a modo de prueba (61, 62, 63 y 64°C) y se observó una amplificación absoluta del sublinaje A y no del B en cualquiera de las temperaturas, por lo que se realizó una PCR más restrictiva a 63.5°C de todas las muestras de *L. pneumophila* (figura 17).

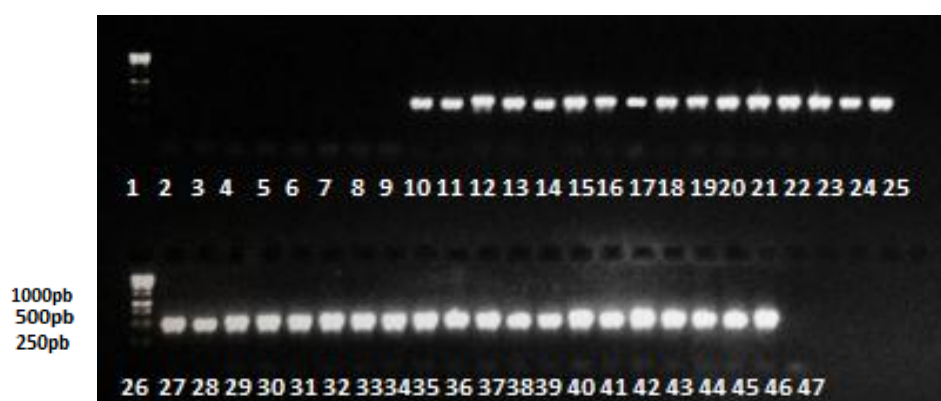


Figura 17. PCR a 63.5°C del gen *lpa02172*. Los pocillos 1 y 26 corresponden al patrón de pesos moleculares, del 2 al 9 se corresponden al sublinaje B (a excepción de la muestra ID_747968 B), del pocillo 10 al 46 pertenecen al sublinaje A (a excepción de la muestra ID_747973 A) y el pocillo 47 perteneciente al control negativo.

En la figura 17, se observa una amplificación correcta del sublinaje A, como era de esperar con un tamaño de 500 pb, y no del sublinaje B, por lo que el nuevo par de cebadores utilizados ha funcionado de manera adecuada y el problema del cebador anterior era la baja Tm que presentaba.

Finalmente, los cebadores diseñados para los genes *lpa03704*, *lpa03873* y *lpa02172* sí que funcionaron. Estos genes codifican las proteínas descarboxilasa 5-carboxivanilato, exonucleasa ABC subunidad C (UvrC) y la adenilatociclasa, respectivamente.

5. CONCLUSIÓN

- Los resultados de este experimento, han demostrado que existen dos sublinajes, A y B, dentro del tipo ST578 de *L. pneumophila* con características genéticas distintas y que pueden ser distinguidos mediante una prueba sencilla (PCR específica de cada linaje) gracias al diseño de marcadores específicos.
- Al diseñar cebadores que diferencian ambos sublinajes, se permite la obtención de un método más resolutivo y rápido en el cual si hay un nuevo brote en la zona de Alcoy podemos distinguir cada sublinaje de manera rápida con un mejor control y presenta la ventaja de que no es necesario realizar un secuenciación masiva a nivel genómico para lograr ese objetivo.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. ABBOTT J. C., D. M. AANENSEN, K. RUTHERFORD, S. BUTCHER AND B. G. SPRATT. 2005. WebACT—an online companion for the Artemis Comparison Tool. *Genome Analysis*, 21:3665-3666.
2. ABDEL-NOUR MENA, CARLA DUNCAN, DONALD E. LOW, AND CYRIL GUYARD. 2013. Biofilms: The Stronghold of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11): 21660–21675.
3. ABU KWAIK Y., BUMANN D. 2013. Microbial quest for food *in vivo*: ‘nutritional virulence’ as an emerging paradigm. *Cellular Microbiology*, 15(6):882–890.
4. AFSHAR B, LUCK PC, MEUGNIER H, ETIENNE J, PEDUZZI R, HARRISON TG, WITH GAIA V, NORMAN. 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5):2047.
5. ASARE R, SANTIC M, GOBIN I, DORIC M, SUTTLES J, GRAHAM JE, PRICE CD, ABU KWAIK Y. 2007. Genetic susceptibility and caspase activation in mouse and human macrophages are distinct for *Legionella longbeachae* and *L. pneumophila*. *Infection and Immunity*, 75(4):1933-45.
6. BANDYOPADHYAY, P. AND STEINMAN, H.M. 2000. Catalase-Peroxidases of *Legionella pneumophila*: Cloning of the *katA* Gene and Studies of KatA Function. *Journal of Bacteriology*, 182:6679-668.
7. BRENNER, D. J., A. G. STEIGERWALT, AND J. E. MCDADE. 1979. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. *Annals of Internal Medicine*, 90:656-658.
8. BRÜGGEMANN H, HAGMAN A, JULES M, SISMEIRO O, DILLIES MA, GOUYETTE C, *et al.* 2006. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the *in vivo* transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cellular Microbiology*, 8(8):1228-40.
9. CAO BOYANG, FANGFANG YAO, XIANGQIAN LIU, LU FENG, AND LEI WANG. 2013. Development of a DNA Microarray Method for Detection and Identification of All 15 Distinct O-Antigen Forms of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(21): 6647–6654.
10. CAZALET C, GOMEZ-VALERO L, RUSNIOK C, LOMMA M, DERVINS-RAVAULT D, NEWTON HJ, *et al.* 2010. Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. *PLOS Genetics*, 6(2):e1000851.
11. CAZALET C, RUSNIOK C, BRÜGGEMANN H, ZIDANE N, MAGNIER A, MA L, *et al.* 2004. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nature Genetics*, 36(11):1165-1173.
12. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, PART OF THE UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Legionella_pneumophila_01.jpg)
13. CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGÍA. 2009. Brotes de Legionelosis notificados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Visto el 19 Mayo de 2014. (http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/Legionelosis__brotes_1999-2011.pdf)
14. CHIEN M, MOROZOVA I, SHI S, SHENG H, CHEN J, GOMEZ SM, *et al.* 2004. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science*, 305(5692):1966-8.
15. CIRILLO SUAT L. G., LUIZ E. BERMUDEZ, SAHAR H. EL-ETR, GERALD E. DUHAMEL, AND JEFFREY D. CIRILLO. 2001. *Legionella pneumophila* Entry Gene *rtxA* Is Involved in Virulence. *Infection and Immunity*, 69(1): 508–517.
16. COSCOLLÁ MIREIA AND FERNANDO GONZÁLEZ-CANDELAS. 2009. Direct Sequencing of *Legionella pneumophila* from Respiratory Samples for Sequence-Based Typing Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(9): 2901–2905.

17. 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*, 11:181.
18. DOLEZAL PAVEL, MARGARETA AILI, JANETTE TONG, JHIH-HANG JIANG, CARLO M. MAROBBIO, SAU FUNG LEE, et al. 2012. *Legionella pneumophila* Secretes a Mitochondrial Carrier Protein during Infection. *PLOS Pathogen*, 8(1): e1002459.
19. EWANN F, HOFFMAN PS. 2006. Cysteine metabolism in *Legionella pneumophila*: characterization of an L-cystine-utilizing mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6):3993-4000.
20. EYLERT E, SCHÄR J, MERTINS S, STOLL R, BACHER A, GOEBEL W, et al. 2008. Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages. *Molecular Microbiology*, 69(4):1008-17.
21. FEELEY JC, GORMAN GW, WEAVER RE, MACKEL DC, SMITH HW. 1978. Primary isolation media for Legionnaires disease bacterium. *Journal of Clinical Microbiology*, 8(3):320-5.
22. FIELDS, BARRY S., ROBERT F. BENSON, AND RICHARD E. BESSER. 2002. Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3):506-526.
23. FRASER DW, TSAI TR, ORENSTEIN W, PARKIN WE, BEECHAM HJ, SHARRAR RG, et al. 1977. Legionnaires' Disease: Description of an Epidemic of Pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 297(22):1189-1197.
24. GAO L-Y, ABU KWAIK Y. 2000. The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology*, 2:79-90.
25. GLICK TH, GREGG MB, BERMAN B, MALLISON GF, RHODES JR WW, KASSANOFF I. 1978. Pontiac Fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *American Journal of Epidemiology*, 107(2):149-160.
26. GOMEZ-VALERO LAURA, CHRISTOPHE RUSNIOK, SOPHIE JARRAUD, BENOIT VACHERIE, ZOÉ ROUY, VALERIE BARBE, et al. 2011. Extensive recombination events and horizontal gene transfer shaped the *Legionella pneumophila* genomes. *BMC Genomics*, 12: 536.
27. GOMEZ-VALERO L, RUSNIOK C, BUCHRIESER C. 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.
28. HARRISON CF, KICKA S, KRANJC A, FINSEL I, CHIRIANO G, OUERTATANI-SAKOUHI H, et al. 2015. Adrenergic antagonists restrict replication of *Legionella*. *Microbiology*, doi: 10.1099.
29. HILBI HUBERT, SOPHIE JARRAUD, ELIZABETH HARTLAND, AND CARMEN BUCHRIESER. 2011. Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control. *Molecular Microbiology*, 76(1): 1-11.
30. HORWITZ MA. 1984. Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cellular*, 36(1):27-33.
31. HOVEL-MINER G, FAUCHER SP, CHARPENTIER X, SHUMAN HA. 2010. ArgR-regulated genes are derepressed in the *Legionella*-containing vacuole. *Journal of Bacteriology*, 192(17):4504-16.

32. JAMES BW, MAUCLINE WS, FITZGEORGE RB, DENNIS PJ, KEEVIL CW. 1995. Influence of iron-limited continuous culture on physiology and virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, 63(11):4224-30.
33. KOZAK NA, BUSS M, LUCAS CE, FRACE M, GOVIL D, TRAVIS T, et al. 2010. Virulence factors encoded by *Legionella longbeachae* identified on the basis of the genome sequence analysis of clinical isolate D-4968. *Journal of Bacteriology*, 192(4):1030-44.
34. LOZA-CORREA MARIA, TOBIAS SAHR, MONICA ROLANDO, CRAIG DANIELS, PIERRE PETIT, TANIA SKARINA, et al. 2014. The *Legionella pneumophila* kai operon is implicated in stress response and confers fitness in competitive environments. *Environmental Microbiology*, 16(2): 359–381.
35. MAHA FARHAT, MARINA MOLETTA-DENAT, JACQUES FRÈRE, SÉVERINE ONILLON, MARIE-CÉCILE TROUILHÉ, AND ENRIC ROBINE. 2012. Effects of Disinfection on *Legionella* spp., Eukarya, and Biofilms in a Hot Water System. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19): 6850–6858.
36. MANSKE CHRISTIAN AND HUBERT HILBI. 2014. Metabolism of the vacuolar pathogen *Legionella* and implications for virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4:125.
37. MARSTON, B. J., J. F. PLOUFFE, T. M. FILE, JR., B. A. HACKMAN, S. J. SALSTROM, H. B. LIPMAN, et al. 1997. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance study in Ohio. *Archives of Internal Medicine*. 157:1709-1718.
38. MCDADE JE, SHEPARD CC, FRASER DW, TSAI TR, REDUS MA, DOWDLE WR. 1977. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *New England Journal of Medicine*, 297(22):1197-203.
39. MIYAKE M. 2008. Intracellular survival and replication of *legionella pneumophila* within host cells. *Yakugaku Zasshi*, 128(12):1763-70.
40. MOLMERET M, HORN M, WAGNER M, SANTIC M, ABU KWAIK Y. 2005. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1):20-8.
41. MOLOFSKY A. B., SWANSON M. S. 2004. Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Molecular Microbiology*, 53(1):29-40.
42. 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):990-998.
43. MURDOCH DR. 2003. Diagnosis of Legionella infection. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 36(1):64-9.
44. MURGA R, FORSTER TS, BROWN E, PRUCKLER JM, FIELDS BS, DONLAN RM. 2001. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology*, 147(11):3121-6.
45. NEWTON, HAYLEY J., DESMOND K. Y. ANG, IAN R. VAN DRIEL, AND ELIZABETH L. HARTLAND. 2010. Molecular Pathogenesis of Infectious Caused by *Legionella penumophila*. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2):274-298.

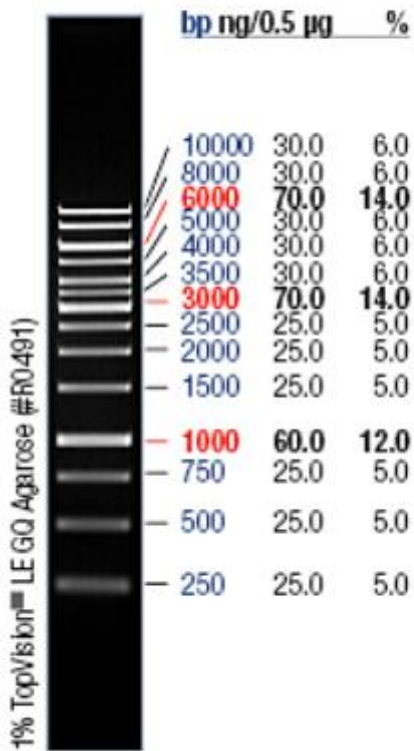
46. OHNO A, KATO N, SAKAMOTO R, KIMURA S, YAMAGUCHI K. 2008. Temperature-dependent parasitic relationship between *Legionella pneumophila* and a free-living amoeba (*Acanthamoeba castellanii*). *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14):4585-8.
47. PARTHUISOT N, WEST NJ, LEBARON P, BAUDART J. 2010. High diversity and abundance of *Legionella* spp. in a pristine river and impact of seasonal and anthropogenic effects. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:8201–8210.
48. RED NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA. 2011. Protocolo de vigilancia de Legionelosis. Visto el 19 de Mayo de 2014. (www.murciasalud.es/recursos/ficheros/287209-PROTOCOLO_DE_VIGILANCIA_DE_LEGIONELOSIS.pdf).
49. REUTER SANDRA, TIMOTHY G HARRISON, CLAUDIO U KÖSER, MATTHEW J ELLINGTON, GEOFFREY P SMITH, JULIAN PARKHILL, *et al.* 2013. A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a *Legionella* outbreak. *BMJ*, 3(1).
50. 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): 307–314.
51. ROY CR, BERGER KH, ISBERG RR. 1998. *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Molecular Microbiology*, 28(3):663-74.
52. SÁNCHEZ-BUSÓ, LEONOR, COMAS, IÑAKI, JORQUES, GUILLERMO, GONZÁLEZ-CANDELAS, FERNANDO. 2014. Recombination drives genome evolution in outbreak-related *Legionella pneumophila* isolates. *Nature Genetics*, 46(11): 1205-1211.
53. SÁNCHEZ-BUSÓ, LEONOR, COSCOLLÁ, MIREIA, PINTO-CARBÓ, MARTA, CATALÁN, VICENTE, GONZÁLEZ-CANDELAS, FERNANDO. 2013. Genetic characterization of *Legionella pneumophila* isolated from a common watershed in Comunidad Valenciana, Spain. *PLOS ONE*, 8(4): e61564.
54. SCHROEDER GN, PETTY NK, MOUSNIER A, HARDING CR, VOGRIN AJ, WEE B, *et al.* 2010. *Legionella pneumophila* strain 130b possesses a unique combination of type IV secretion systems and novel Dot/Icm secretion system effector proteins. *Journal of Bacteriology*, 192(22):6001-16.
55. SCULLY NM, COOPER WJ, TRANVIK LJ. 2003. Photochemical effects on microbial activity in natural waters: the interaction of reactive oxygen species and dissolved organic matter. *FEMS Microbiology Ecology*, 46(3):353-7.
56. STEEB B, CLAUDI B, BURTON NA, TIENZ P, SCHMIDT A, FARHAN H, *et al.* 2013. Parallel exploitation of diverse host nutrients enhances *Salmonella* virulence. *PLOS Pathogens*, 9(4):e1003301.
57. STEINERT M, HEUNER K, BUCHRIESER C, ALBERT-WEISSENBERGER C, GLÖCKNER G. 2007. *Legionella* pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(7-8):577-87.
58. TERRY ALLI O. A., LIAN-YONG GAO, LISA L. PEDERSEN, STEVEN ZINK, MARINA RADULIC, MILJENKO DORIC, *et al.* 2000. Temporal Pore Formation-Mediated Egress from Macrophages and Alveolar Epithelial Cells by *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, 68(11): 6431–6440.

59. TESH MJ, MILLER RD. 1983. Arginine biosynthesis in *Legionella pneumophila*: absence of N-acetylglutamate synthetase. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(9):1230-3.
60. TESH MJ, MORSE SA, MILLER RD. 1983. Intermediary metabolism in *Legionella pneumophila*: utilization of amino acids and other compounds as energy sources. *Journal of Bacteriology*, 154(3):1104-9.
61. UNDERWOOD ANTHONY P, GARAN JONES, MASSIMO MENTASTI, NORMAN K FRY, AND TIMOTHY G HARRISON. 2013. Comparison of the *Legionella pneumophila* population structure as determined by sequence-based typing and whole genome sequencing. *BMC Microbiology*, 13:302.
62. VICKERS RM, BROWN A, GARRITY GM. 1981. Dye-containing buffered charcoal-yeast extract medium for differentiation of members of the family *Legionellaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 13(2):380-2.
63. VISWANATHAN VK, EDELSTEIN PH, POPE CD, CIANCOTTO NP. 2000. The *Legionella pneumophila* iraAB locus is required for iron assimilation, intracellular infection, and virulence. *Infection and Immunity*, 68(3):1069-79.
64. YU, V. L., J. F. PLOUFFE, M. C. PASTORIS, J. E. STOUT, M. SCHOUSBOE, A. WIDMER, J. SUMMERGILL, T. FILE, C. M. HEATH, D. L. PATERSON, AND A. CHERESHKY. 2002. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *Journal of Infectious Diseases*, 186:127-128.

7. ANEXO

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use



0.5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TAE, 7 V/cm, 45 min

7.1 Marcador de peso molecular