



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Facultad de Medicina

Departamento de Genética y Microbiología

***Legionella* en redes de distribución de agua potable y
torres de refrigeración en España**

**Memoria presentada para optar
al grado de Doctor por la Universidad de Murcia**

Carme Salvador García

Murcia, 2011

*“Vivir no es sólo existir,
sino existir y crear,
saber gozar y sufrir
y no dormir sin soñar.*

Descansar, es empezar a morir.”

Gregorio Marañón (1887-1960)

A mis abuelos, *in memoriam*

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecerle al Dr. Manuel Segovia, director de esta tesis doctoral, sus enseñanzas y su paciencia, la confianza depositada en mí, la oportunidad que me ha brindado para iniciar mi formación en el campo de la investigación y la transmisión de un especial entusiasmo por este mundo.

A la Dra. Genoveva Yagüe, codirectora de esta tesis, por todos sus conocimientos y sus correcciones, por su carácter pragmático y positivo, por su complicidad en mis proyectos tanto profesionales como personales y por todo lo que ella es.

También quiero expresar mis agradecimientos a Miguel Ángel Rojo, a Arturo Petrel y, especialmente, a Carlos Audibert por su colaboración en la recogida y envío de muestras.

Al Dr. Ginés Ortiz por su participación activa en el estudio epidemiológico.

A la Dra. Carmen Pelaz por sus sugerencias y comentarios para la realización de esta memoria.

Al Dr. Francisco Torrella por su disposición.

A la Dra. M^o Carmen Martínez-Toldos por su disposición, optimismo y apoyo en las primeras etapas de la investigación.

A mis adjuntos y compañeros Antonio y Asun, quienes me han transmitido su inquietud por evolucionar y aprender y me han ofrecido su confianza, su apoyo y ánimo constantes, demostrando algo más que compañerismo.

La realización de esta trabajo tampoco hubiera sido posible sin la colaboración del gran colectivo humano que forma el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Quiero agradecer a todos los facultativos del Servicio de Microbiología sus consejos y el tiempo que han dedicado en mi formación, en particular al Dr. Hernández-Cardona por su disposición para ayudar en todo momento, sus historias y su compañía. Gracias a mis compañeros y amigos los residentes por “cuidar” el CHEFF durante sus guardias.

A mis padres, que me muestran su apoyo incondicional. Gracias por vuestra continúa preocupación.

A Maite y Maria, por sus cifras y letras y por lo más importante, su amistad.

A Vicent, porque siempre hay una respuesta.

A Jovi, por enseñarme que nada es imposible y ayudarme a entender que nuestros sueños no tienen más límites que los que nos ponemos nosotros mismos. Gracias por estar siempre ahí.

A mis amigos y familiares, especialmente a mis padrinos, quienes me han animado durante todo este tiempo.

A todas las personas que habiéndome prestado su colaboración haya podido omitir de forma involuntaria. A todos simplemente gracias.

Abreviaturas

AEMET	Agencia Estatal de Metereología
AFLP	“Amplified Fragment Length Polymorphism”
ATCC	“American Type Culture Collection”
BAL	lavado broncoalveolar
BCYE	”buffered charcoal yeast extract”
BMS	Boletín Microbiológico Semanal
BOE	Boletín Oficial del Estado
c.c.	centro ciudad
CNE	Centro Nacional de Epidemiología
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
EIA	enzimoinmunoanálisis
EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EWGLI	“European Working Group for <i>Legionella</i> Infections”
ICT	inmunocromatografía de membrana
IFD	inmunofluorescencia directa
IFI	inmunofluorescencia indirecta
ISO	“International Organization for Standardization”
Lnp	<i>Legionella no-pneumophila</i>
Lps1	<i>Legionella pneumophila</i> serogrupo 1
Lps2-14	<i>Legionella pneumophila</i> serogrupo 2-14
MLST	“Multilocus Sequence Typing”
MSC	Ministerio de Sanidad y Consumo
NAC	neumonía adquirida en la comunidad
ND	no detectado
NI	no identificado
OMS	Organización Mundial de la Salud
p.i.	polígono industrial
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (reacción en cadena de la polimerasa)
PFGE	“Pulsed Field Gel Electrophoresis” (electroforesis en campo de pulsos)
ppm	partes por millón

PYG	“peptone-yeast extract-glucose”
RD	Real Decreto
rpm	revoluciones por minuto
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute”
s.	serogrupo
SBF	suero bovino fetal
SBT	“Sequence Based Typing”
ST	secuencia tipo
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
T _m	temperatura de anillamiento
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
ufc	unidades formadoras de colonias

Índice

1.	Introducción	1
1.1.	Reseña histórica.	3
1.2.	Descripción de <i>Legionella</i>	5
1.3.	Ecología.	9
1.4.	Patogenia.	12
1.5.	Aspectos clínicos.	17
1.6.	Epidemiología y control.	28
2.	Objetivos	45
3.	Material y métodos	51
3.1.	Muestras ambientales en España.	53
3.1.1.	Puntos de muestreo.	53
3.1.2.	Análisis del agua.	55
3.2.	Muestras clínicas.	57
3.3.	Electroforesis en campo de pulsos.	58
3.4.	Tipificación de <i>L. pneumophila</i> mediante “Sequence-Based Typing” (SBT). 60	
3.5.	Genes de virulencia.	63
3.6.	Crecimiento intracelular.	65
3.6.1.	Crecimiento intracelular en <i>A. polyphaga</i>	65
3.6.2.	Crecimiento intracelular en células “ <i>macrophages-like</i> U-937”.	67
3.7.	Análisis estadístico.	68
3.8.	Consideraciones éticas.	69
4.	Resultados	71
4.1.	Colonización del agua por <i>Legionella</i> spp.	73
4.1.1.	Estudio de colonización por <i>Legionella</i> spp. en agua de consumo humano.	74
4.1.2.	Distribución estacional de los aislamientos de <i>Legionella</i> spp. en agua de consumo humano.	77

4.1.3.	Estudio de colonización por <i>Legionella</i> spp. en torres de refrigeración...	78
4.1.4.	Distribución estacional de los aislamientos de <i>Legionella</i> spp. en torres de refrigeración.....	82
4.2.	Distribución de los aislamientos de <i>Legionella</i> spp. en las distintas comunidades autónomas.....	84
4.2.1.	Agua de consumo humano.....	84
4.2.2.	Torres de refrigeración.....	93
4.3.	Variabilidad genética de las cepas ambientales.....	108
4.3.1.	Agua de consumo humano.....	108
4.3.2.	Torres de refrigeración.....	113
4.3.3.	Comparación de patrones moleculares de <i>Legionella</i> spp. aislada en agua de consumo humano y torres de refrigeración.....	124
4.4.	Detección de los genes de virulencia <i>lvh</i> y <i>rtxA</i> en cepas ambientales de <i>Legionella</i> spp.....	125
4.5.	Investigación epidemiológica de un caso clínico fatal de legionelosis en Murcia.....	129
5.	Discusión	135
6.	Conclusiones	171
7.	Anexos	175
8.	Bibliografía	207

1. Introducción

1.1. Reseña histórica.

En 1976 se produjo un brote de una infección respiratoria de etiología desconocida entre los asistentes a una convención de la Legión Americana, celebrada en el hotel Bellevue Stratford de Filadelfia, que afectó a un elevado número de personas asistentes a la misma. Se diagnosticaron 182 casos, de los cuales 29 fueron mortales (Fraser, 1977; McDade *et al.*, 1977).

En un principio, y a pesar de la intensa investigación, la causa de la infección no fue detectada. El estudio epidemiológico determinó que la enfermedad era, probablemente, de transmisión aérea y el foco de infección el hotel donde se había celebrado la reunión. Aproximadamente diez meses más tarde, dos investigadores del Centro de Control y Prevención de la enfermedad de los Estados Unidos, Joseph McDade y Carlos Shepard, publicaron el descubrimiento del agente etiológico (McDade *et al.*, 1977). Un nuevo microorganismo al que se denominó *Legionella pneumophila* en honor a los legionarios afectados y a su tropismo pulmonar. A la infección se le llamó enfermedad de los legionarios.

Sin embargo, la historia de esta enfermedad había comenzado unos 30 años antes del brote de Filadelfia. El re-análisis de sueros de pacientes con neumonía de etiología no filiada reveló que *L. pneumophila* había sido el agente etiológico de varios casos de neumonía durante la década de los 50. En 1947 se aisló un microorganismo denominado “agente *Rickettsia* like”, actualmente conocido como cepa “Olda” de *L. pneumophila*, de un paciente afecto de un proceso infeccioso pulmonar (McDade *et al.*, 1979). En 1957, apareció un brote de la enfermedad de los legionarios entre los trabajadores de una planta de empaquetamiento de carne en Austin (Minnesota, USA) (Osterholm *et al.*, 1983).

Al igual que con la enfermedad de los legionarios, *Legionella* también fue identificada como el agente etiológico de una epidemia no resuelta de enfermedad febril no neumónica acontecida en el año 1968 en Pontiac, Michigan (Glick, 1978). Este cuadro clínico se denominó fiebre de Pontiac en conmemoración al lugar donde sucedió.

A estas dos formas clínicas, enfermedad de los legionarios (infección pulmonar) y fiebre de Pontiac (proceso febril autolimitado), se les denomina globalmente con el término “legionelosis”.

Desde 1976 son numerosos los brotes epidémicos descritos de enfermedad de los legionarios, como el ocurrido en Holanda en marzo de 1999 en el transcurso de una exposición floral con 106 casos confirmados (van Steebergen *et al.*, 1999). Un año más tarde, en abril del año 2000, se confirmaron 125 casos de enfermedad de los legionarios que se relacionaron con el agua del acuario de Melborune, Australia (Greig *et al.*, 2004).

En España, al igual que en otros países, se describió de forma retrospectiva un pequeño brote de enfermedad de los legionarios en 5 turistas escoceses alojados en un hotel de Benidorm en el año 1973 (Boyd *et al.*, 1978). Posteriormente, se han registrado otros brotes relevantes en cuanto al número de afectados, como el de Almuñécar en el año 1991 con 91 casos (BMS, 1991), Alcalá de Henares en el año 1997 con 224 casos (CNE, 1997) o Barcelona con 56 y 54 casos en los años 1988 y 2000 respectivamente (Caylá *et al.*, 1989; Jansá *et al.*, 2002). Pero el más importante a nivel mundial en cuanto a su magnitud, tuvo lugar en Murcia a principios de julio del año 2001, con 449 casos confirmados y alrededor de 800 casos con sospecha. A pesar del elevado número de afectados, destacó su baja mortalidad inferior al 1% (García-Fulgueiras *et al.*, 2003). A partir de ese momento, la legionelosis se convirtió en uno de los problemas prioritarios de la salud pública de España. El Ministerio de Sanidad y Consumo publicó, con el respaldo de la Comisión de Salud Pública, el primer Real Decreto (RD) de prevención y control de la legionelosis, como normativa básica del Estado (RD 909/2001 de 27 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis) que, posteriormente fue sustituido por el RD 865/2003, de 4 de julio, con el mismo enunciado (BOE, 2003a). A pesar de la aplicación de este Real Decreto, la legionelosis sigue siendo un problema sanitario importante en nuestro país, que presenta la mayor tasa de incidencia registrada en Europa (Ricketts y Joseph, 2007).

1.2. Descripción de *Legionella*.

Taxonomía

Aunque el estudio de la legionelosis se inició en el año 1976, la primera clasificación del género y su inclusión en una nueva familia bacteriana fueron propuestas en el Primer Simposium Internacional sobre enfermedad del legionario celebrado en Atlanta (USA) en noviembre del año 1978. En el año 1979, los estudios de hibridación ADN-ADN realizados por Brenner demostraron que el agente etiológico de la enfermedad de los legionarios constituía un nuevo género bacteriano, el género *Legionella*, que fue incluido dentro de la familia *Legionellaceae* (Brenner *et al.*, 1979).

Coxiella burnetti, el agente etiológico de la fiebre Q, es el organismo más cercano a la familia *Legionellaceae* según los estudios filogenéticos basados en la secuencia del ARNr 16S. Tanto las bacterias de la familia *Legionellaceae* como *Coxiella burnetti* son microorganismos intracelulares y tienen genes en común relacionados con los procesos de infección en los huéspedes.

Algunos investigadores propusieron tres géneros separados (*Legionella*, *Fluoribacter* y *Tatlockia*) atendiendo a las características fenotípicas de algunas especies de la familia *Legionellaceae* (Brown *et al.*, 1981; Garrity *et al.*, 1980). Sin embargo, otros estudios basados en el análisis del ARN 16S ribosómico concluyen que la familia *Legionellaceae* forma un único grupo con una relación entre especies del 96% (Fry *et al.*, 1991).

Actualmente, el género *Legionella* incluye más de 50 especies con más de 70 serogrupos. Los estudios de muestras medioambientales han permitido el descubrimiento de nuevas especies y es muy probable que el número de especies y serogrupos continúe aumentando. Hasta el momento, se han identificado como mínimo 24 especies causantes de enfermedad en el hombre (Tabla 1). Entre ellas destaca *L. pneumophila*, la primera especie descrita, que comprende 16 serogrupos.

Tabla 1. Especies y serogrupos de *Legionella* y su patogenicidad en humanos.

Especies de Legionella	Nº de serogrupos	Patogenicidad en humanos	Especies de Legionella	Nº de serogrupos	Patogenicidad en humanos
<i>L. adelaidensis</i>	1	-	<i>L. londiniensis</i>	2	-
<i>L. anisa</i>	1	+ ^a	<i>L. longbeachae</i>	2	+ ^a
<i>L. beliardensis</i>	1	-	<i>L. lytica</i>	1	+ ^a
<i>L. birminghamensis</i>	1	+ ^a	<i>L. maceachernii</i>	1	+ ^a
<i>L. bozemanii</i>	2	+ ^a	<i>L. micdadei</i>	1	+ ^a
<i>L. brunensis</i>	1	-	<i>L. moravica</i>	1	-
<i>L. busanensis</i>	1	-	<i>L. nautarum</i>	1	-
<i>L. cherrii</i>	1	-	<i>L. oakridgensis</i>	1	+ ^a
<i>L. cincinnatiensis</i>	1	+ ^a	<i>L. parisienses</i>	1	+ ^a
<i>L. drankourtii</i>	1	-	<i>L. pneumophila</i>	16	+ ^a
<i>L. drozanskii</i>	1	-	<i>L. quateirensis</i>	1	-
<i>L. dumoffii</i>	1	+ ^a	<i>L. quinlivanii</i>	2	+ ^b
<i>L. erythra</i>	1	+ ^a	<i>L. rowbothamii</i>	1	-
<i>L. fairfieldensis</i>	1	-	<i>L. rubrilucens</i>	1	+ ^b
<i>L. fallonii</i>	1	-	<i>L. sainthelensi</i>	2	+ ^a
<i>L. feeleeii</i>	2	+ ^a	<i>L. santicrucis</i>	1	-
<i>L. geestiana</i>	1	-	<i>L. shakespearei</i>	1	-
<i>L. gormanii</i>	1	+ ^a	<i>L. spiritensis</i>	2	-
<i>L. gratiana</i>	1	-	<i>L. steigerwaltii</i>	1	-
<i>L. gresilensis</i>	1	-	<i>L. taurinensis</i>	1	-
<i>L. hackeliae</i>	2	+ ^a	<i>L. tucsonensis</i>	1	+ ^a
<i>L. impletisoli</i>	1	-	<i>L. wadsworthii</i>	1	+ ^a
<i>L. israelensis</i>	1	-	<i>L. waltersii</i>	1	+ ^a
<i>L. jamestowniensis</i>	1	-	<i>L. worsleiensis</i>	1	+ ^b
<i>L. jordanis</i>	1	+ ^a	<i>L. yabuuchiae</i>	1	-
<i>L. lansingensis</i>	1	+ ^a			

Modificada de: German Collection of Microorganism and Cell Cultures. (http://dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature:info.php?genus=LEGIONELLA)

+^a, relacionada con infecciones humanas; +^b, presuntamente relacionada con infecciones humanas; -, no relacionada con infecciones humanas.

Aproximadamente, el 90% de las infecciones están originadas por *L. pneumophila* y, a pesar de la descripción de al menos 16 serogrupos, *L. pneumophila* serogrupo 1 es responsable de alrededor del 85% de los casos de legionelosis diagnosticados en todo el mundo (Marston *et al.*, 1997). Un estudio realizado en Francia, demostró que el 28% de los aislamientos ambientales fueron identificados como *L. pneumophila* serogrupo 1, aumentando este porcentaje al 95% en el caso de los aislamientos clínicos (Doleans *et al.*, 2004). Este estudio sugiere que *L. pneumophila* es más patógena para el hombre que otras especies de *Legionella* como *L. bozemanii*, *L. micdadei* y *L. longbeachae*, que son las responsables del 2-7% de las infecciones ocasionadas por *Legionella* (Marston *et al.*, 1997). Este porcentaje, sin embargo, no se observa en Australia y Nueva Zelanda, dónde, aproximadamente, el 30% de las infecciones por *Legionella* son atribuidas a *L. longbeachae* (Yu *et al.*, 2002).

Características morfológicas y fisiológicas

Las bacterias del género *Legionella* son bacilos gramnegativos, aerobios estrictos, no esporulados ni capsulados. Miden de 0.3 a 0.9 μm de ancho y de 2 a 20 μm de longitud. Su morfología puede ser bacilar o pleomórfica, a veces con formas filamentosas que pueden alcanzar una longitud de hasta 20 μm en algunos medios de cultivo (Figura 1). Se caracterizan por su movilidad (excepto *L. oakridgensis*), al estar dotadas de uno o más flagelos, polares o subpolares (Ott *et al.*, 1991). Además, se ha demostrado que algunas cepas procedentes de aislamientos primarios poseen fimbrias (Rodgers *et al.*, 1980).

Legionella presenta la estructura característica de un bacilo gramnegativo, con una pared bacteriana con membrana externa, un polímero de peptidoglicano que contiene ácido m-diaminopimélico y una membrana citoplasmática. En contraste con la mayor parte de las bacterias gramnegativas, en el lipopolisacárido de la pared de *Legionella* se encuentran grandes cantidades de ácidos grasos de cadena ramificada y ubiquinonas (coenzima Q) con 9-14 unidades de isoprenoides en la cadena lateral, como se demuestra por cromatografía de gas líquido (Moss y Dees, 1979). Aunque

estructuralmente se considera una bacteria gramnegativa, *Legionella* se observa con dificultad mediante la tinción de Gram. La técnica de Giménez es tan rápida como la tinción de Gram y tiñe el microorganismo de forma más efectiva (McDade *et al.*, 1977).

En relación a su metabolismo, las bacterias del género *Legionella* son quimiorgano-tróficas, poco sacarolíticas y, en general, metabólicamente poco activas, por lo que las pruebas bioquímicas convencionales no resultan útiles para la identificación de especies. Son oxidasa variable, catalasa positiva débil y las reacciones de reducción de nitrato y ureasa son negativas (Pine *et al.*, 1984).

A diferencia de otras bacterias acuáticas, utilizan los aminoácidos y otros compuestos orgánicos como el almidón como principal fuente de energía. Por esta razón, son incapaces de crecer en los medios de cultivo empleados habitualmente. En condiciones de laboratorio crecen lentamente sobre medios sólidos con una combinación específica de nutrientes. La L-cisteína es el componente necesario para su aislamiento, siendo éste además favorecido por la adición de sales de hierro, aunque este compuesto no es un factor esencial. Actualmente, el medio más utilizado para el cultivo de *Legionella* es agar BCYE- α ("buffered charcoal yeast extract") enriquecido con alfa-cetoglutarato con o sin agentes selectivos añadidos. No obstante, algunas especies de *Legionella* (*L. jordanis*, *L. oakridgensis* y *L. spiritensis*) pueden crecer sin L-cisteína, ya que pierden esta dependencia tras varios pases en placa (Orrison *et al.*, 1983).

Inicialmente, estas necesidades nutricionales tan inusuales parecen contradecir la amplia distribución de *Legionella* en ambientes acuáticos, ya que, la cantidad de nutrientes que *Legionella* requiere para su crecimiento se encuentra raramente en el agua dulce y, si estuvieran presentes, sólo servirían para amplificar bacterias de crecimiento rápido que podrían competir con ella. En realidad, estos nutrientes se presentan en un ambiente intracelular. Este aspecto es el que relaciona íntimamente a *Legionella* con los protozoos de vida libre como parásito intracelular.

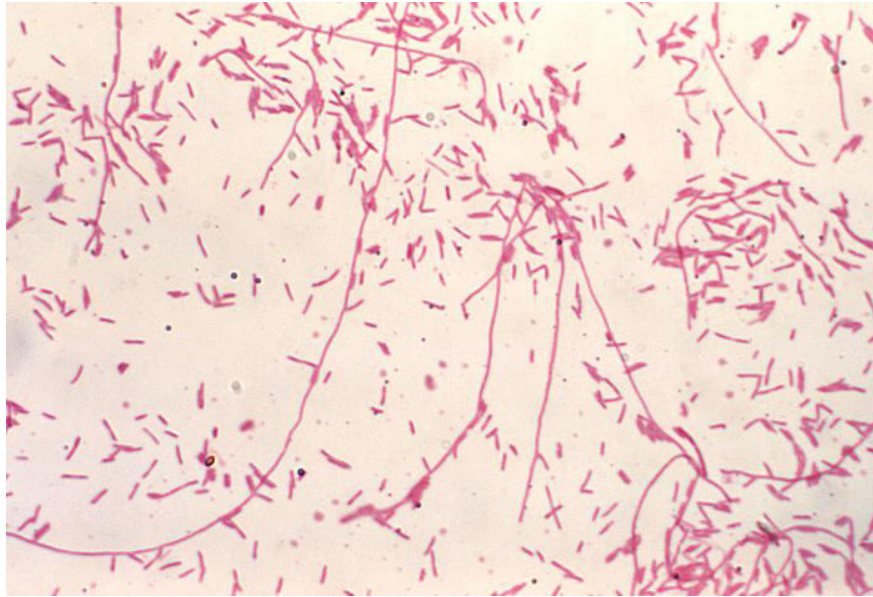


Figura 1. Tinción de Gram de *L. pneumophila*.

1.3. Ecología.

Legionella es un microorganismo ubicuo, distribuido por todo el mundo, cuyo hábitat son los ambientes acuáticos naturales y artificiales. Se encuentra en ambientes naturales tan diversos como lagos, ríos, estanques, aguas termales, entre otros (Brooks *et al.*, 2004; Ortiz-Roque y Hazen, 1987; Riffard *et al.*, 2001). *L. longbeachae* constituye la excepción de este nicho ecológico acuático. Esta especie se encuentra en la tierra húmeda y lodos y la infección se asocia, con frecuencia, a exposiciones a abonos comerciales (Rowbotham, 1980).

Legionella sobrevive en los ambientes acuáticos naturales a concentraciones bajas de forma simbiótica o parasitaria con algas, amebas o protozoos ciliados. Todos ellos le ayudan a soportar las variaciones ambientales de temperatura, pH y oxígeno disuelto. Desde estos reservorios la bacteria puede colonizar diferentes instalaciones acuáticas artificiales como son los sistemas de abastecimiento y distribución de agua de las ciudades. Posteriormente, se incorpora al agua sanitaria doméstica y a otros sistemas que requieran agua para su funcionamiento tales como torres de refrigera-

ción, duchas, bañeras de hidromasaje y humidificadores, entre otros.

Factores que afectan al crecimiento de *Legionella*

Parece contradictorio que *Legionellae* precise de tantos requerimientos nutricionales para crecer en los medios de cultivo artificiales de laboratorio y por otro lado sobreviva y se multiplique en el agua. Las temperaturas elevadas y la formación de biofilms en las aguas estancadas de las instalaciones artificiales favorecen la replicación de *Legionella* hasta alcanzar niveles infectantes para el hombre (Rowbotham, 1980).

Influencia de la temperatura

Legionella es una bacteria termotolerante, capaz de multiplicarse entre los 20 y 45°C, con un crecimiento óptimo alrededor de los 37°C. Permanece latente, sin multiplicarse, a temperaturas inferiores a 20°C y se inactiva por encima de los 70°C (Dennis *et al.*, 1984; Yee y Wadowsky, 1982). Así, *Legionella* es capaz de sobrevivir durante largos períodos de tiempo a bajas temperaturas. Cuando la temperatura aumenta y el resto de condiciones son favorables la bacteria puede proliferar. La temperatura de crecimiento óptimo o temperaturas superiores son inusuales en la naturaleza, aunque son frecuentes en instalaciones y dispositivos acuáticos artificiales (Figura 2).

Presencia de otros microorganismos

Legionella requiere sustancias nutritivas para su crecimiento. El agua, por si sola, no permite la proliferación de *Legionella*. Estas sustancias son suministradas, directa o indirectamente, por otras bacterias o microorganismos (algas, cianobacterias y protozoos) asociados a la degradación de componentes orgánicos (Tesh y Miller, 1981; Yee y Wadowsky, 1982). Así lo demostraron algunos estudios donde *L. pneumophila* era capaz de sobrevivir largos períodos de tiempo sin multiplicarse en agua del grifo estéril (Fields *et al.*, 1984; Skaliy y McEachern, 1979). Por otra parte, en otro estudio similar realizado con agua del grifo no estéril se observó que *L. pneumophila* sobrevivía y, además, proliferaba (Yee y Wadowsky, 1982).

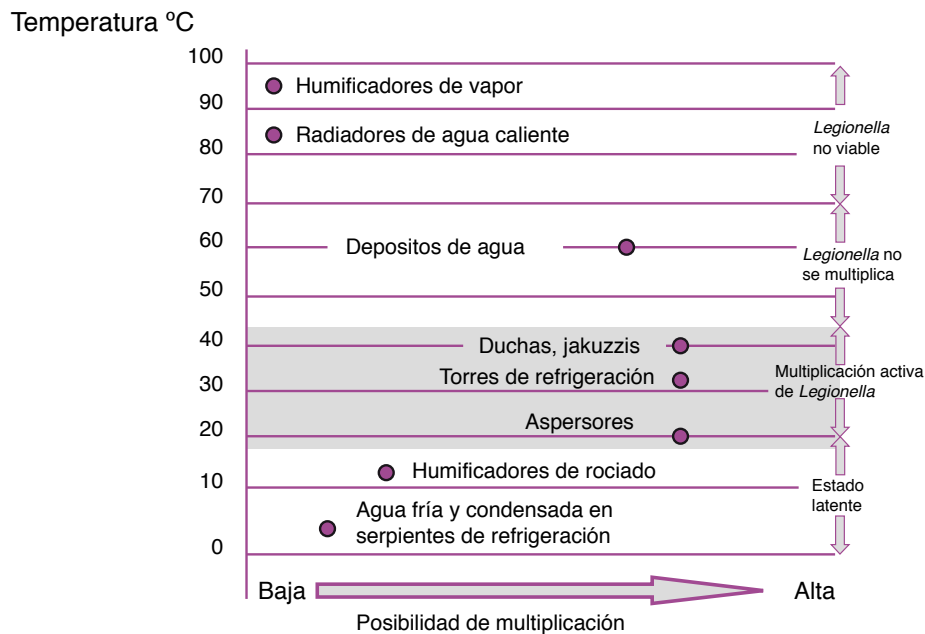


Figura 2. Esquema del desarrollo de *Legionella* a diferentes temperaturas y en distintas instalaciones. Modificada de Bandrés y Lluch, 2007.

Legionella no es una bacteria acuática de vida libre en el ambiente natural, sino que parasita o tiene una relación simbiótica con amebas de vida libre. Es capaz de multiplicarse intracelularmente en el interior de muchas especies de protozoos. Esta relación entre *Legionella* y algunos protozoos es el eje central de la ecología de la bacteria (Rowbotham *et al.*, 1980). *Legionella* puede multiplicarse en 14 especies de protozoos. Entre ellos se incluyen los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Hartmannella*; además de algunos ciliados tales como *Tetrahymena pyriformis* y *Tetrahymena vorax* (Fields *et al.*, 1984; Rowbotham *et al.*, 1980; Rowbotham, 1986; Wadowsky *et al.*, 1991). Además de proporcionar un nicho replicativo, esta relación con los protozoos aumenta la capacidad de *Legionella* para soportar el estrés provocado por la acción de los biocidas, antibióticos, así como osmolaridades y temperaturas extremas.

La colonización y actividad microbiana asociada a las superficies, o la formación de biofilms, está descrita en muchos de tipos de superficies, entre ellas los ambientes

acuáticos naturales y artificiales. Los biofilms son ecosistemas sumamente complejos y heterogéneos compuestos de bacterias, algas y protozoos. Los microorganismos están integrados en una matriz extracelular que proporciona estructura, estabilidad, nutrientes y protección de las temperaturas extremas, de los biocidas y de los posibles efectos tóxicos que puede producir la corrosión del propio sustrato sobre el que se sitúa el biofilm (Allison, 2003; Wimpenny *et al.*, 2000). En los sistemas artificiales, *Legionella* se encuentra casi exclusivamente formando parte de los biofilms que se forman con mayor frecuencia donde hay poco flujo de agua y ésta se puede estancar (Rogers *et al.*, 1994). Los microorganismos se adhieren a la superficie mediante un polisacárido extracelular generado por polimerasas y que es secretado por las células (Morton, 1998). Posteriormente, los microorganismos se multiplican formando microcolonias. Éstas se protegen por una capa de glicocalix pero, aún así, algunas partes pueden desprenderse por la presión y los movimientos del agua (Eighmy y Bishop, 1985; Trulear y Characklis, 1982). Si esto ocurre, los microorganismos integrados en el biofilm se resuspenden de nuevo en el agua del sistema pudiendo colonizar otras partes del mismo si las condiciones son las apropiadas (Rowbotham *et al.*, 1980).

1.4. Patogenia.

La ecología y patogénesis de *Legionella* están muy relacionadas. En 1980 se demostró que *L. pneumophila* podía infectar amebas y también se describió el ciclo de vida de *Legionella* en el interior de las amebas (Rowbotham, 1980). Unos años más tarde, se observó que *L. pneumophila* se multiplica intracelularmente en macrófagos humanos evitando la fusión del fagosoma-lisosoma (Horwitz, 1983). Los procesos de infección de protozoos y células fagocíticas de mamíferos por *Legionella* son similares y, utilizan genes y productos génicos parecidos (Gao *et al.*, 1997). Se ha postulado que la capacidad de replicación en el interior de células de mamíferos es el resultado de una previa adaptación a nichos intracelulares como pueden ser los protozoos.

A pesar que desde un punto de vista genético aún no se conoce con exactitud la patogénesis de *L. pneumophila*, se están realizando continuamente descubrimientos en este campo (Bruggemann *et al.*, 2006b). *L. pneumophila* es una bacteria patógena intracelular facultativa y su patogénesis está directamente relacionada con su capacidad de invadir y multiplicarse en un gran número de células eucariotas, incluidos fagocitos mononucleares, fundamentalmente monocitos, macrófagos alveolares humanos y también diversas células epiteliales y fibroblastos humanos de animales. No obstante, no todas las especies de *Legionella* son capaces de infectar macrófagos (Cirillo *et al.*, 1994; Cirillo *et al.*, 1999).

Ciclo celular

Los mecanismos de virulencia de *L. pneumophila* son complejos y poco conocidos. Sin embargo, se ha demostrado que muchas proteínas se inducen durante la replicación intracelular (Bruggemann *et al.*, 2006a).

La interacción de *Legionella* con las células fagocíticas se divide en diferentes etapas:

- a) adhesión del microorganismo a los receptores de la superficie de las células,
- b) endocitosis y penetración del microorganismo en los fagocitos,
- c) vacuolización y escape del ataque bactericida,
- d) formación de la vacuola replicativa,
- e) multiplicación intracelular y,
- f) liberación de las bacterias y muerte celular.

Los macrófagos alveolares fagocitan a *Legionella* cuando ésta entra en el pulmón de la persona afectada y las bacterias se mantienen intactas dentro de los fagosomas. No se conoce con exactitud el mecanismo de entrada de *Legionella* en la célula. En la mayoría de los casos, parece que la bacteria es fagocitada mediante fagocitosis convencional. También se ha observado el mecanismo de fagocitosis en espiral (“coiling phagocytosis”) en distintas células y amebas (Abu Kwaik, 1996). Los

fagosomas maduran normalmente en las vacuolas a través de la vía endocítica. Esto implica una interacción progresiva con el endosoma, permitiendo la acidificación de la vacuola y, en consecuencia, la destrucción de la mayoría de los microorganismos fagocitados (Garin *et al.*, 2001). Sin embargo, durante la fagocitosis, *Legionella* inicia una cascada compleja de actividades, que incluyen: inhibición del estrés oxidativo, reducción de la acidificación del fagosoma, bloqueo de la maduración del fagosoma y cambios en el tráfico de orgánulos. Estos procesos permiten que las cepas virulentas de *Legionella* puedan inhibir la fusión de los fagosomas con los lisosomas y que transformen el fagolisosoma en un nicho adecuado para su replicación en el interior de los fagocitos (Cianciotto, 2001; Fields *et al.*, 2002; Swanson y Hammer, 2000).

Una fase esencial en el desarrollo de la infección y progreso de la enfermedad es la habilidad de *Legionella* para salir del macrófago alveolar, una vez se ha replicado intracelularmente. La disrupción de los organelos citoplasmáticos y la desintegración de la membrana, probablemente a través de un poro, facilitan la lisis osmótica de la célula (Alli *et al.*, 2000; Molmeret y Abu Kwaik, 2002). Esto conduce a la muerte del macrófago y a la liberación de un gran número de bacterias que pueden infectar otros macrófagos, de manera que se inicia de nuevo el ciclo celular con el consecuente aumento de la concentración de bacterias en el pulmón (Figura 3).

Factores de virulencia

No se han definido de forma clara los factores individuales biológicos e inmunológicos que median en la virulencia de *Legionella*. No obstante, el análisis del proceso de infección en protozoos y células huésped humanas han ayudado a identificar algunos factores que pueden afectar a la virulencia.

Las estructuras de superficie de membrana son importantes en la patogenia de *Legionella* (Cianciotto, 2001). La adherencia seguida de la entrada de la bacteria en la célula huésped es un paso crucial en el ciclo de infección. Ciertas proteínas de superficie de membrana junto con el lipopolisacárido, el flagelo y el *pili* tipo IV, están involucradas en la adherencia y entrada de *Legionella* en macrófagos alveolares y

protozoos. Estas proteínas incluyen, entre otras, a la proteína principal de la membrana externa (“major outer membrane protein”, MOMP), las proteínas de choque térmico (“heat shock protein”, Hsp60), la proteína potenciadora de la infectividad (“major infectivity potentiator”, Mip) y la toxina implicada en la formación del poro (“pore-formation protein”, RtxA).

La MOMP es una porina que se une al componente C3 de complemento, y media la entrada de *L. pneumophila* vía receptores de macrófagos de complemento CR1 y CR3 (Bellinger-Kawahara y Horwitz, 1990). Sin embargo, la fagocitosis de *L. pneumophila* también puede producirse por un mecanismo independiente de complemento (Weissgerber *et al.*, 2003).

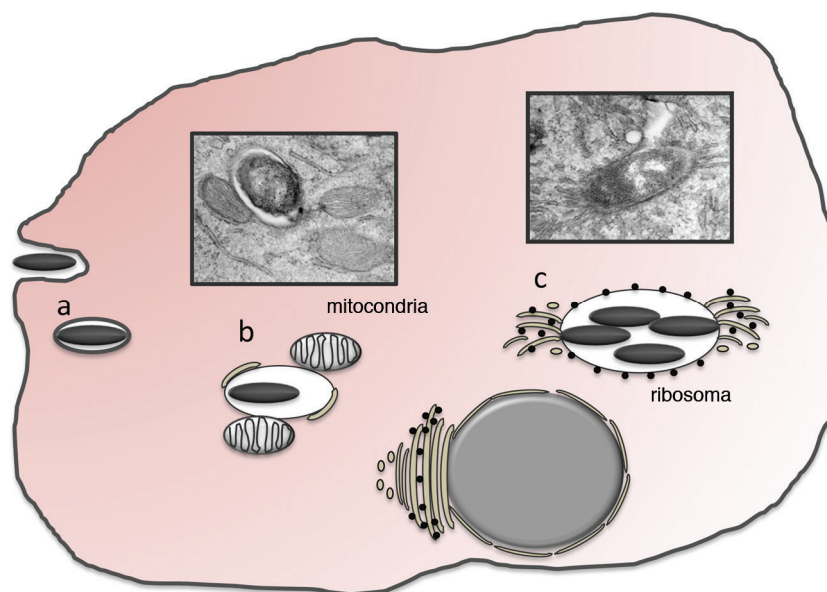


Figura 3. Biogénesis de *Legionella*. Penetración de *Legionella* en los fagocitos (a), vacuolización y escape del ataque bactericida (b), formación de la vacuola replicativa y multiplicación intracelular (c). Modificada de Newton *et al.*, 2010.

La proteína Hsp60 aumenta la invasión en células epiteliales (Garduño *et al.*, 1998).

La proteína Mip, codificada por el gen *mip* es un producto claramente relacionado con la virulencia de *Legionella* (Fields, 1996). Esta proteína interviene en los estadios de infección temprana y es necesaria para una infección eficiente tanto en las células fagocíticas humanas como en los protozoos (Cianciotto y Fields, 1992). Se piensa que la proteína Mip está conservada en todo el género (Cianciotto *et al.*, 1989), e incluso se utiliza la secuencia del gen *mip* para identificar especies de *Legionella* (Ratcliff *et al.*, 1998).

La toxina RtxA, perteneciente a la familia Rtx (repeats-in-toxin) y codificada por el gen *rtxA*, participa en la adherencia, entrada de *Legionella* en la célula huésped y formación del poro, así como en la supervivencia intracelular de la misma (Cirillo *et al.*, 2002; D'Auria *et al.*, 2008).

Otro aspecto importante en la virulencia de *Legionella* es la capacidad de secretar citotoxinas y proteasas destructoras de tejido al medio extracelular (Aragón *et al.*, 2000). La secreción de proteínas se realiza mediante los sistemas de secreción tipo II y tipo IV. Mutaciones en los genes codificantes para el sistema de secreción tipo II producen una disminución en la capacidad de infectar macrófagos, protozoos y otras células fagocíticas. El sistema de secreción tipo IV A de *Legionella* conocido también como "*Legionella vir* homologue" (Lv_h) está relacionado con el crecimiento intracelular de *Legionella* en macrófagos y amebas y, además, está implicado en la infección de la célula huésped a 30°C (Ridenour *et al.*, 2003). El sistema de secreción tipo IV B, conocido como Dot/Icm, promueve la infección intracelular por varias vías. Primero, incrementa la entrada de la *L. pneumophila* en las células huésped (Hilbi *et al.*, 2001). Segundo, es esencial para mantener la capacidad de *Legionella* de inhibir la fusión lisómica/fagoendolisosómica y establecer su nicho replicativo (Dumenil y Isberg, 2001; Joshi *et al.*, 2001). Finalmente, el sistema Dot/Icm es importante para la apoptosis y la regresión de la célula huésped (Molmeret *et al.*, 2002; Zink *et al.*, 2002). Por tanto, las mutaciones en el locus *dot/icm* conducen a una pérdida de la

virulencia (Marra *et al.*, 1992).

1.5. Aspectos clínicos.

Presentación clínica

La infección por *Legionella* se puede presentar con un espectro clínico muy variable, desde cuadros asintomáticos, a procesos leves o enfermedad grave que puede llevar a la insuficiencia respiratoria y fallo multiorgánico (Segovia, 2005). Es probable que esta variabilidad clínica tenga relación con el tamaño del inóculo del microorganismo, la forma de transmisión y con algunos factores del huésped.

Clásicamente se diferencian dos formas clínicas, la fiebre de Pontiac y la enfermedad de los legionarios.

La fiebre de Pontiac es una enfermedad leve y autolimitada. El período de incubación suele oscilar entre 5 horas y 5 días. La clínica es similar a la de un proceso gripal. Se caracteriza por la presentación de fiebre con afectación del estado general y artromialgias. Este cuadro inespecífico hace que en la mayoría de los casos no se llegue al diagnóstico etiológico. Dura de dos a cinco días y únicamente requiere tratamiento sintomático (Yu y Feng-Yee, 2001). Las especies de *Legionella* implicadas en la mayoría de casos de fiebre de Pontiac han sido *L. pneumophila* serogrupos 1, 4 y 6 (Modi *et al.*, 2008), *L. micdadei* (Huhn *et al.*, 2005) y *L. anisa* (Jones *et al.*, 2003).

La enfermedad de los legionarios es un proceso neumónico potencialmente grave que no cursa con una sintomatología bien definida, aunque algunos estudios demuestran que hay ciertos datos clínicos especialmente útiles (Gupta *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 1987). El período de incubación suele oscilar entre 2 y 15 días (WHO, 2004). Esta enfermedad se caracteriza, al principio, por fiebre asociada con escalofríos, anorexia, malestar y letargo; en algunas ocasiones se puede desarrollar una tos leve y no productiva. Aproximadamente la mitad de los pacientes producen un esputo purulento y alrededor de un tercio desarrolla hemoptisis. Puede aparecer dolor torácico en un 30% de los pacientes. Radiológicamente la legionelosis es indis-

tinguible de otras causas de neumonía (Mülazimoglu y Yu, 2001). Los cambios radiológicos son visibles a partir del tercer día tras el inicio de enfermedad. Por lo general, comienzan con acumulación de fluido en el pulmón, que puede progresar a los lóbulos, formando una masa o un nódulo (Figura 4). La acumulación de fluido aparece aproximadamente en un cuarto de los pacientes. Excepcionalmente, en pacientes inmunodeprimidos los abscesos pueden causar empiema o una fístula broncopleural.

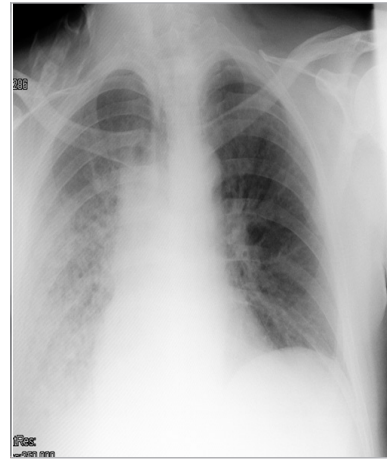


Figura 4. Radiografía de tórax de un paciente con legionelosis.

También son habituales los síntomas gastrointestinales. La mitad de pacientes padecen diarrea y, el 10-30% sufren náuseas, vómitos y dolores abdominales. Es frecuente encontrar durante la primera semana de la enfermedad trastornos relacionados con el sistema nervioso, tales como confusión, delirio, depresión, desorientación y alucinaciones. El examen físico puede revelar temblor en las extremidades, reflejos hiperactivos y signos de disfunción cerebral. Además, existen algunos datos de laboratorio sugestivos de la enfermedad del legionario como son el incremento de las transaminasas, la hiponatremia y el incremento de la creatinquinasa (Kirby *et al.*, 1980).

La enfermedad de los legionarios se incluye en el diagnóstico diferencial de la neumonía atípica, junto con las infecciones producidas por *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Coxiella burnetii* y algunos virus (Yu y Feng-Yee, 2001). El diagnóstico microbiológico proporciona un diagnóstico definitivo. Una información muy valiosa que se debe recabar durante la anamnesis es la relacionada con algunos factores de riesgo predisponentes y antecedentes epidemiológicos, tales como viajes a países con una incidencia elevada de legionelosis, estancia en hospitales y exposición a sistemas generadores de aerosoles (Tabla 2).

Con un tratamiento correcto al inicio de la infección se llega a la curación total de

ésta. Sin embargo, es posible que queden algunas secuelas como enfermedad restrictiva pulmonar, debilidad, fallo en la memoria y fatiga, entre otros que, en ocasiones, permanecen durante varios meses. La enfermedad de los legionarios puede ser mortal si no se trata correctamente durante la primera semana.

Existen formas extrapulmonares de infección no asociadas a neumonías y que a menudo son dramáticas. La afectación cardíaca es la más frecuente (Stout y Yu, 1997). Se han descrito casos de pericarditis, miocarditis y endocarditis asociada a válvula prostética (Chen *et al.*, 1996). También se relaciona con casos de sinusitis, celulitis, pancreatitis, peritonitis y pielonefritis (Stout y Yu, 1997). El sistema nervioso se afecta excepcionalmente en contacto con este microorganismo. Las manifestaciones neurológicas descritas hasta la fecha son encefalomiелitis y neuropatía periférica (Shelburne *et al.*, 2004). Es probable que en estos casos la vía de entrada siga siendo respiratoria, la vía de diseminación sea hematológica y que la expresividad clínica pulmonar sea mínima o inexistente. Esto contrasta con la infección de heridas por *Legionella*, en las que el mecanismo de transmisión es por inoculación directa de la bacteria o por el uso de agua contaminada en los lavados.

Tabla 2. Factores de riesgo para la adquisición de infección por *Legionella*.

Factores de riesgo clínicos mayores

- Trasplante
 - Diálisis
 - Inmunodepresión farmacológica
 - Glucocorticoides
 - Neoplasias
 - Tabaquismo
-

Factores de riesgo clínicos menores

- EPOC*
 - Alcoholismo
 - Diabetes
 - Sexo masculino
 - Edad > 50 años
-

Factores de riesgo ambientales

- Exposición a duchas y/o aerosoles generados por agua caliente sanitaria
 - Exposición a aerosoles generados por las torres de refrigeración
 - Exposición a aerosoles generados por excavaciones
 - Estancia en hotel
 - Estancia en hospital
-

*EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Modificada de Pedro-Botet *et al.*, 2008.

Inmunidad

La defensa frente a *Legionella* depende fundamentalmente de la inmunidad celular vehiculada, sobre todo, por macrófagos activados por la acción de los linfocitos Th1 (Friedman *et al.*, 1998). De este modo, los factores de riesgo citados previamente (Tabla 2) son predisponentes bien porque afectan localmente a la vía respiratoria (tabaquismo y EPOC) o bien porque afectan directamente a la inmunidad celular (corticoides, inmunosupresores). Este tipo de inmunidad es la que controla la infección por *Mycobacterium tuberculosis* y *Leishmania*, entre otros microorganismos. La importancia de la inmunidad celular contrasta con el hecho de que la legionelosis no es frecuente en enfermos con déficits humorales puros o déficits del complemento, lo cual constata que ni la opsonización ni la activación del complemento “in vitro” son letales para *L. pneumophila*.

Diagnóstico microbiológico de legionelosis

Desde un punto de vista clínico, es difícil distinguir la neumonía causada por *Legionella* de otras neumonías, por lo que resulta necesario recurrir a procedimientos específicos de laboratorio. La sospecha diagnóstica se basa, principalmente, en el contexto epidemiológico y en algunos datos clínicos. Suele incidir en pacientes adultos, más frecuentemente en varones, y con alguno de los factores predisponentes señalados en la tabla 2.

Desde el primer momento se evidenció la dificultad de *Legionella* para crecer en medios de cultivo convencionales. Por este motivo, los diagnósticos fueron poco frecuentes y la legionelosis se consideró una causa infrecuente de neumonía, ligada casi exclusivamente a brotes comunitarios o nosocomiales (Salleras, 2002).

Este concepto cambió cuando, a mediados de la década de los 90 se introdujo en el mercado una prueba diagnóstica relativamente simple que permitía confirmar un caso de legionelosis a partir de una muestra de orina. Este nuevo método diagnóstico provocó un aumento en la incidencia de la enfermedad y un cambio en algunos

conceptos sobre la clínica y la epidemiología establecidos hasta entonces. Los casos esporádicos pasaron a ser más frecuentes y la infección por *Legionella* se convirtió en la segunda o tercera causa de neumonía de etiología bacteriana (Salleras, 2002).

El diagnóstico de la legionelosis se basa, en la actualidad, en el cultivo de muestras respiratorias, inmunofluorescencia directa, serología y detección de antígeno en orina. A pesar de la variedad de técnicas que pueden emplearse, es difícil establecer ciertos datos epidemiológicos como son la incidencia o la proporción de casos de la enfermedad. Uno de los motivos es que cada una de las pruebas diagnósticas presenta unos valores de sensibilidad distintos, de manera que la frecuencia de la enfermedad varía en función de la prueba utilizada (Sabria, 2002).

Cultivo

El aislamiento del microorganismo por cultivo está considerado la técnica de referencia en el diagnóstico microbiológico de la legionelosis. Proporciona un diagnóstico de confirmación de la infección causada por cualquier especie y serogrupo de *Legionella*. Para su realización a partir de muestras clínicas se utiliza el medio de cultivo específico BCYE- α . Contiene, entre otros compuestos, extracto de levadura, L-cisteína, pirofosfato férrico y α -cetoglutarato. También lleva carbón activado como neutralizante de compuestos tóxicos y tampón ACES (ácido N-2-acetamido-2-aminoetanosulfónico) que confiere al medio un pH óptimo (Szénási *et al.*, 2001). La adición de suplementos antibacterianos y/o antifúngicos aumenta su selectividad. Asimismo, el pretratamiento térmico (50°C durante 30 minutos) o ácido (pH de 2.2 durante 5 minutos) de las muestras respiratorias aumenta la sensibilidad ya que ayudan a eliminar la microbiota acompañante.

Para obtener el aislamiento de las bacterias, las placas deben incubarse a 35-37°C en condiciones de aerobiosis y humedad. En estos medios de cultivo selectivos las colonias son pequeñas, grisáceas-azuladas y brillantes (Figura 5). Aunque el crecimiento de la bacteria generalmente empieza a ser visible a partir del tercer día de incubación, los cultivos se deben mantener en estas condiciones 10-12 días antes

de considerarlos negativos.

El cultivo, a pesar de tener una alta especificidad (100%), presenta tres problemas fundamentales: una baja sensibilidad del 20-80% según las series consideradas (Lück *et al.*, 2002; Sabria y Yu, 2008; Stout y Yu, 1997), un largo tiempo de incubación (mínimo de 72 horas) y la dificultad de conseguir una muestra respiratoria cuando el paciente no desarrolla una tos productiva (Tabla 3). La baja sensibilidad se debe, entre otros, a la propia naturaleza de la bacteria que crece con dificultad aún en medios selectivos y posee una supervivencia limitada en las muestras clínicas, a la aplicación de una terapia antibiótica previa a la toma de muestra y a la experiencia microbiológica requerida para su aislamiento. Aunque se puede considerar un método tedioso e incluso de difícil realización, es muy recomendable su utilización de forma habitual, ya que permite realizar posteriores estudios que ayudan a mejorar el conocimiento de la bacteria, como las investigaciones epidemiológicas para detectar las posibles fuentes de infección o la realización de estudios de sensibilidad frente a antimicrobianos.

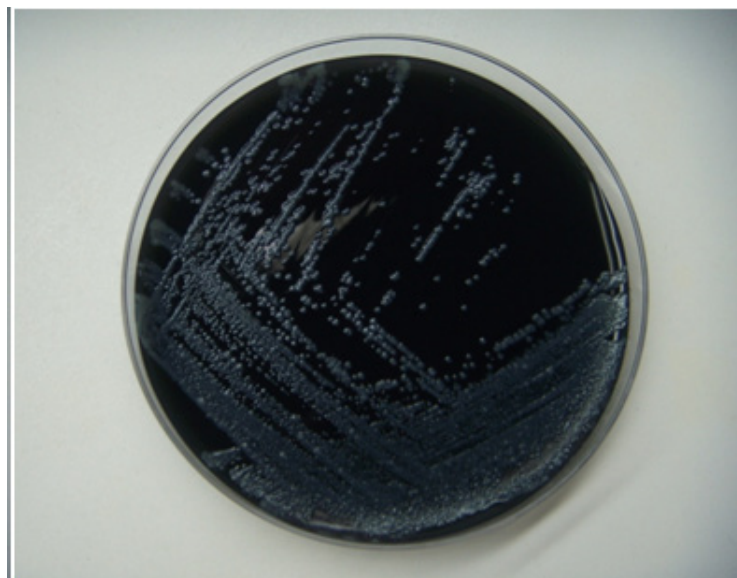


Figura 5. Placa de BCYE con colonias de *L. pneumophila*.

Inmunofluorescencia directa

La inmunofluorescencia directa (IFD) fue el primer método utilizado para detectar *Legionella* en tejidos y secreciones respiratorias (Fields *et al.*, 2002). Algunas de sus ventajas es proporcionar un resultado en 2-4 horas y la detección de la bacteria varios días después de comenzar el tratamiento antimicrobiano (Fields *et al.*, 2002). Sin embargo, requiere el empleo de una técnica relativamente compleja que debe llevarse a cabo por personal de laboratorio experimentado (Murdoch, 2003).

La sensibilidad de la IFD es variable según distintos estudios pero siempre considerablemente menor que la del cultivo, y, además, poco conocida para especies distintas a *L. pneumophila*. Por ejemplo, en secreciones del tracto respiratorio inferior, se han obtenido sensibilidades desde un 25% (Zuravleff *et al.*, 1983) hasta un 68% (Saravolatz *et al.*, 1981) en el mejor de los casos. La especificidad de la IFD se estima que es de alrededor del 95% (Fields *et al.*, 2002) (Tabla 3). Se pueden obtener resultados falsos positivos al producirse reacciones cruzadas con otras bacterias, entre las que se encuentran *Bacteroides fragilis* y especies de *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Flavobacterium*.

La sensibilidad variable y las reacciones cruzadas han limitado el uso de la IFD. Por eso, un resultado negativo no excluye la posibilidad de que el paciente esté infectado por *Legionella* y un resultado positivo debe interpretarse como un diagnóstico presuntivo en ausencia de otra prueba que apoye la evidencia de una infección por la bacteria (Murdoch, 2003).

Serología

Las técnicas serológicas se deben utilizar con finalidad diagnóstica siempre en combinación con técnicas de diagnóstico directo. La necesidad de estudiar la presencia de anticuerpos en dos muestras de suero recogidas en la fase aguda y la fase de convalecencia, respectivamente, convierten a la serología en una técnica de diagnóstico retrospectivo (López *et al.*, 2001). Por otro lado, existen reacciones cruzadas

con otras bacterias que hacen que la serología se considere como una técnica de valor diagnóstico meramente presuntivo. Se han desarrollado una variedad de pruebas para detectar anticuerpos específicos en muestras de suero, incluyendo inmunofluorescencia indirecta (IFI), microaglutinación y métodos de enzimo-inmunoensayo (ELISA). De todas ellas, la IFI ha sido el método diagnóstico más utilizado durante años y, por ello, el más evaluado, principalmente para *L. pneumophila* serogrupo 1. La sensibilidad de la IFI se encuentra entre 70-90% y la especificidad es del 99% (Fields *et al.*, 2002; Sabria y Yu, 2008) tal y como se indica en la tabla 3.

La seroconversión medida por IFI, definida como un incremento del título de anticuerpos frente a *Legionella* igual o superior a 4 veces, entre un suero de la fase aguda y un suero de fase la convaleciente es diagnóstica de legionelosis. Cuando se obtiene un título superior a 1/256 durante la fase aguda, en ausencia de un segundo suero y en un contexto epidemiológico adecuado es, asimismo, altamente sugestivo. El tiempo transcurrido hasta que se produce la seroconversión varía. Se puede producir en la primera semana tras el inicio de los síntomas o puede requerir hasta 2 meses e incluso no producirse (Wilkinson *et al.*, 1981).

En los últimos años ha disminuido el uso de la IFI como prueba diagnóstica por sus limitaciones y el tiempo requerido hasta obtener un resultado. Sin embargo es de gran utilidad para realizar diagnósticos retrospectivos y para realizar investigaciones epidemiológicas.

Antigenuria

Sin duda, el mayor avance en el diagnóstico de la enfermedad de los legionarios ha sido la detección del antígeno en orina, que ha permitido el reconocimiento precoz de algunos brotes epidémicos (Castilla *et al.*, 2008; García-Fulgueiras *et al.*, 2003). Las técnicas disponibles utilizan metodologías de enzimo-inmunoanálisis (EIA) y de inmunocromatografía de membrana (ICT) que permiten detectar el antígeno soluble termoestable del lipopolisacárido de la pared celular de *L. pneumophila* serogrupo 1. Estas técnicas han revolucionado el diagnóstico de esta enfermedad por su rapidez

y han mostrado ser extraordinariamente útiles, ya que permiten la detección de un mayor número de casos y la aplicación de un tratamiento antibiótico específico en las fases iniciales de la enfermedad (Blázquez *et al.*, 2005b; Jansá *et al.*, 2002).

La sensibilidad de las técnicas de EIA empleando orina concentrada es del 80-90% y la especificidad es del 98-100% (López *et al.*, 2001) (Tabla 3). El diseño propio de estas técnicas y la baja incidencia de infecciones por *Legionella* en algunas áreas provoca que se tenga tendencia a acumular muestras hasta tener un número suficiente para optimizar los pocillos, con el consecuente retraso en la obtención de los resultados, lo cual atenta directamente contra la principal ventaja de estas técnicas. Por el contrario, la ICT es técnicamente menos compleja que las técnicas de EIA, ya que no requiere equipamiento específico y se realiza de forma individualizada. Los resultados obtenidos son absolutamente equiparables con los de las técnicas de EIA en cuanto a sensibilidad y especificidad (Guerrero *et al.*, 2004). Aunque la sensibilidad varía en función de la gravedad del paciente (85.7% en pacientes con neumonía grave frente a 37.9% en pacientes con neumonía leve o moderada) (Blázquez *et al.*, 2005b) y disminuye al 40-70%, dependiendo del proveedor utilizado, cuando se utiliza orina no concentrada (Muñoz *et al.*, 2009).

La antigenuria de *Legionella* puede ser detectada desde un día después del comienzo de los síntomas y persiste de días a semanas. Según un estudio prospectivo que analiza la duración del antígeno bacteriano en 61 muestras de orina, la persistencia del mismo no supera los 60 días en la mayoría de los pacientes y es mayor en pacientes inmunodeprimidos (Sopena *et al.*, 2002).

La prueba del antígeno en orina es actualmente una herramienta establecida y válida para el diagnóstico de la enfermedad del legionario, particularmente en las regiones donde *L. pneumophila* serogrupo 1 es la causa más común de la enfermedad. En los lugares donde sólo una parte de las infecciones son causadas por esta bacteria, el test presenta una menor contribución y puede llevar a infravalorar el diagnóstico de neumonías producidas por otros serogrupos de *L. pneumophila* u otras especies.

Métodos moleculares

Como se ha comentado anteriormente, el cultivo es el método de referencia ya que es la única manera de obtener el microorganismo para realizar estudios de caracterización con fines taxonómicos y/o epidemiológicos. Sin embargo, la realización del cultivo presenta una serie de limitaciones mencionadas anteriormente. Para solventar estos inconvenientes, se han desarrollado métodos de diagnóstico basados en la detección del ADN de *Legionella* en muestras humanas (lavados broncoalveolares, exudados nasofaríngeos, orina, suero y sangre periférica) utilizando métodos de hibridación con sondas génicas específicas o basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ADN bacteriano (Murdoch y Chambers, 2000; Socan *et al.*, 2000). Se han desarrollado métodos dirigidos principalmente a tres dianas del cromosoma bacteriano: el gen *mip* (*macrophage infectivity potentiator*), los genes 5S ARNr y 16S ARNr del ribosoma y la región espaciadora 23S-5S del ribosoma (Hayden *et al.*, 2001). Estas técnicas han revolucionado el campo diagnóstico de las enfermedades infecciosas debido a su gran rapidez, sensibilidad, especificidad y versatilidad (Tabla 3).

Además, la posible aplicación de la técnica PCR en muestra no-respiratorias es atractiva, ya que solucionaría el problema de la dificultad de conseguir esputos de los pacientes con tos no productiva. Otra ventaja de esta técnica es, que al igual que el cultivo, se puede diagnosticar infecciones causadas por cualquier especie y serogrupo de *Legionella*.

El empleo de diferentes sondas marcadas fluorogénicamente en un sistema de PCR a “tiempo real” está desplazando el uso de la PCR convencional (Ballard *et al.*, 2000). Este método permite la cuantificación del número de células presentes en la muestra. Sin embargo, todavía no se disponen de datos suficientes para poder estimar la sensibilidad y especificidad real de la PCR o de validación de esta técnica frente a otros métodos y por ello todavía no se utiliza de forma rutinaria en el diagnóstico de infecciones causadas por *Legionella*.

Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de diferentes pruebas utilizadas en el diagnóstico de la infección por *Legionella*.

Prueba Muestra	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Comentarios	Referencias
Cultivo				
Espuito	5-70	100	Técnica de referencia Aislamiento Identificación de especies y serogrupos Requiere 4-10 días	Stout y Yu 1997; Lück <i>et al.</i> , 2002;
BAL o BAS	30-90	100	Baja sensibilidad Elevada especificidad	Sabria y Yu, 2008.
Biopsia pulmón	90-99	100	Requiere personal experimentado Dificultad expectoración	
Sangre	10-30	100	Tratamiento antibiótico previo	
Serología				
Seroconversión	70-90	95-99	No aislamiento Sólo para <i>L. pneumophila serogrupo 1</i> Requiere 3-9 semanas	Stout y Yu, 1997; Fields <i>et al.</i> , 2002; Lück <i>et al.</i> , 2002;
Muestra única	----	50-70		Sabria y Yu, 2008.
Antigenuria				
Orina	80-90	98-100	Sólo para <i>L. pneumophila serogrupo 1</i> Rápido (15 minutos-3 horas)	López <i>et al.</i> , 2001.
IFD				
Espuito y BAL	25-70	95-99	No aislamiento Rápido (2-4 horas) Sensibilidad limitada Falsos positivos	Stout y Yu, 1997; Fields <i>et al.</i> , 2002; Sabria y Yu, 2008.
Biopsia pulmonar	80-90	99	Requiere personal experimentado	
PCR				
Muestra respiratoria	85-92	94-99	No aislamiento Rápido (3 horas) Detecta todas las especies de <i>Legionella</i>	Fields <i>et al.</i> , 2002; Lück <i>et al.</i> , 2002;
Orina o suero	33-70	98	Metodología no estandarizada	Diederer <i>et al.</i> , 2007.

BAL, lavado broncoalveolar; BAS, aspirado broncoalveolar; IFD, inmunofluorescencia directa; PCR, reacción en cadena de la polimerasa. Modifica de WHO, 2007.

Tratamiento

El tratamiento efectivo de la enfermedad del legionario está condicionado por la naturaleza intracelular de este patógeno. Extracelularmente, *Legionella* es susceptible a muchos antibióticos. Sin embargo, en la infección, cuando el microorganismo está en el interior de los macrófagos alveolares, los únicos agentes antibióticos que son clínicamente aceptables son aquellos que alcanzan altas concentraciones intracelulares como macrólidos, quinolonas, rifampicina, cotrimoxazol y tetraciclinas. No se dispone de estudios clínicos randomizados sobre el tratamiento de la enfermedad del legionario, por lo que el conocimiento de la eficacia de los diferentes antibióticos disponibles se basa en modelos experimentales y en estudios clínicos retrospectivos

observacionales.

Los estudios clínicos observacionales sugieren que la monoterapia con fluorquinolonas (levofloxacino) es más segura y eficaz que el tratamiento con macrólidos (claritromicina), incluso en pacientes con neumonía grave (Blázquez *et al.*, 2005a; Sabriá *et al.*, 2005). Además, el tratamiento conjunto con rifampicina no aporta un beneficio adicional (Blázquez *et al.*, 2005a).

El tratamiento antibiótico de la neumonía por *Legionella* debe iniciarse lo más precozmente posible, ya que el retraso en su administración se asocia a un peor pronóstico (Frias *et al.*, 1998). Un estudio realizado recientemente en nuestro país indica que el 75% de las neumonías adquiridas en la comunidad (NAC) diagnosticadas en los servicios de Urgencias de los hospitales españoles se tratan empíricamente con antibióticos activos frente a *Legionella* (fluorquinolonas o macrólidos) (Martínez *et al.*, 2009). Aunque la vía oral puede ser adecuada en casos leves, debe iniciarse por vía parenteral hasta obtener una respuesta clínica, que habitualmente se produce al 3º-5º día. La duración del tratamiento depende del antibiótico, el grado de inmunodepresión, la presencia continua de infección y el curso clínico del paciente, aunque normalmente se recomienda un tratamiento de 10-15 días.

La recuperación de la infección aguda puede ser lenta y afectada por fatiga, pérdida de memoria, desórdenes de stress post-traumático, complicaciones comunes en muchos tipos de NAC.

1.6. Epidemiología y control.

Incidencia

La incidencia mundial de legionelosis es desconocida ya que cada país utiliza diferentes métodos diagnósticos y distintos sistemas de declaración de la enfermedad.

En España, la legionelosis es una enfermedad de declaración obligatoria desde 1996 (BOE, 1995). En 1997, primer año en que se disponen de datos del Sistema de

Enfermedades de Declaración Obligatoria, se declararon 201 casos de legionelosis en 11 comunidades autónomas, lo que supone una tasa de 0.51 casos por 100000 habitantes.

Desde el año 1997 al 2002 la incidencia de legionelosis en nuestro país ha experimentado un continuo crecimiento, atribuible, en parte, a la mejora de las técnicas diagnósticas a causa de la implantación de la detección del antígeno en orina y a la progresiva sensibilización y conocimiento en la comunidad científica de esta enfermedad. En el año 2001 la tasa de incidencia notificada fue de 3.5 casos por 100000 habitantes. El aumento de la incidencia con respecto a otros años fue debido a los casos del brote de Murcia. En el año 2004 se observa una tendencia descendente con una tasa de incidencia del 2.88 por 100000 habitantes. Desde entonces, la incidencia se mantiene en torno a 3 casos por 100000 habitantes (CNE).

Cadena epidemiológica

El reservorio primario de *Legionella* es el ambiente natural acuático. Este hábitat hace que *Legionella* esté considerada como una bacteria ambiental. Entre los aislamientos obtenidos de muestras ambientales se han identificado especies o serogrupos no asociados a enfermedad en el ser humano (Tabla 1).

Legionella, desde su ambiente acuático natural, se introduce en la vida urbana a través de los sistemas de distribución del agua y coloniza sistemas hídricos e instalaciones construidos por el hombre (Figura 6). Hay que tener en cuenta que, aunque la enfermedad del legionario es de distribución mundial, los edificios que cuentan con circuitos complejos de suministro de agua y con sistemas de acondicionamiento de aire se hallan más extendidos en los países desarrollados y es en éstos donde la enfermedad presenta una mayor incidencia y constituye un notable problema de salud pública (Vaqué, 2002). Si bien, durante todo el año hay notificaciones, la mayor parte de los casos esporádicos y brotes comunitarios se producen a finales del verano y durante el otoño, debido, presumiblemente, a que el microorganismo prolifera mejor en los reservorios acuáticos durante los meses de calor.

La cadena epidemiológica de la enfermedad del legionario incluye un reservorio primario que comprende el medio acuático natural y otro secundario formado por los sistemas hídricos artificiales. A partir de éstos últimos, la bacteria puede llegar al hospedador humano mediante varios mecanismos de transmisión. Entre estos se han propuesto la inhalación de aerosoles, microaspiración de agua colonizada por *Legionella* y la aplicación directa.

La inhalación de aerosoles (partículas menores de 5 μm de diámetro) se considera la vía de transmisión de mayor transcendencia epidemiológica (Fitzgeorge *et al.*, 1983). Existe una amplia documentación de legionelosis asociadas a la inhalación de aerosoles diseminados por torres de refrigeración (de Olalla *et al.*, 2008; Jansá *et al.*, 2002), especialmente en las que funcionan de manera discontinua o irregular y mantienen agua estancada durante largos períodos de tiempo. En general, los aerosoles de las torres de refrigeración pueden transmitir la infección dentro de un área limitada de unos 200 metros. Con todo, en determinadas circunstancias meteorológicas, como vientos y corrientes de aire favorables, los aerosoles que transportan *Legionella* pueden llegar hasta 3.2 km (Addis *et al.*, 1989). Esta vía de diseminación tiene especial importancia en los brotes de legionelosis comunitaria y en los casos esporádicos, pero es menos relevante en el ámbito hospitalario (Vaqué, 2002). Por otra parte, también se forman aerosoles cuando el flujo de agua se rompe o se fragmenta porque impacta sobre una superficie dura (ASHRAE, 2000). De este modo, dispositivos ubicados en el interior de edificios como duchas, nebulizadores y bañeras de hidromasaje, entre otros, se convierten en posibles fuentes de infección de legionelosis (Den Boer *et al.*, 2002; Greig *et al.*, 2004).

Otros autores defienden la microaspiración como mecanismo principal de transmisión, apoyándose más en evidencias circunstanciales que en pruebas experimentales claras (Yu y Feng-Yee, 2001). Algunas publicaciones defienden que la adquisición de la enfermedad se puede producir por aspiración como consecuencia de la ventilación mecánica y la terapia respiratoria (Marrie *et al.*, 1991; Venezia *et al.*, 1994).

Mediante estas dos vías de transmisión (aspiración de aerosoles y microaspiración), las partículas microbianas son capaces de llegar al alveolo pulmonar donde quedan retenidas y producen la enfermedad (Vaqué, 2002).

El último modo posible de transmisión es la aplicación directa del microorganismo en áreas corporales susceptibles. Aunque es muy infrecuente, este mecanismo de transmisión se puede dar en determinadas situaciones como, por ejemplo, la aplicación de agua contaminada durante el lavado de una herida quirúrgica (Brabender *et al.*, 1983; Lowry, 1991). Las infecciones por *L. longbeachae* se han relacionado con abono de jardinería (Speers y Tribe, 1994).

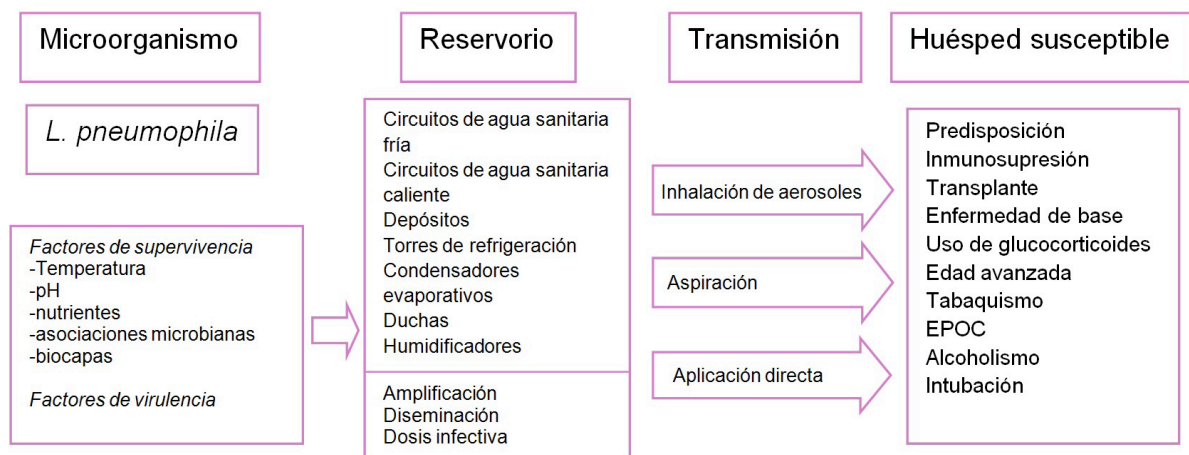


Figura 6. Esquema de la cadena epidemiológica de la enfermedad de los legionarios. EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Modificada de Fields *et al.*, 2002.

No se conoce bien cuál es el inóculo necesario para el desarrollo de una infección y la ubicación de la bacteria en el aerosol. Se presume que los aerosoles infecciosos pueden estar compuestos por *Legionella* en estado libre, fragmentos de biofilm conteniendo *Legionella*, vacuolas o vesículas de amebas o amebas completas infectadas con *Legionella*. Aunque *L. pneumophila* replicada dentro de las amebas es de 10 a 1000 veces más invasiva que cuando crece en agar (Cirillo *et al.*, 1994), no parece probable que la ameba entera sea el vehículo de transporte debido a su tamaño, demasiado grande, para alcanzar el alveolo del pulmón. De estos posibles

mecanismos, *Legionella* contenida en las vesículas de amebas parece ser la forma de transporte más aceptada (Rowbotham, 1986).

Es conocido que *Legionella* afecta fundamentalmente a personas susceptibles con factores de riesgo (Carratala *et al.*, 1994; Roig *et al.*, 1991) y no hay evidencia de transmisión de persona-persona.

Transmisión de la enfermedad de los legionarios a través de torres de refrigeración

Las torres de refrigeración son estructuras de transferencia de calor en las cuales el agua caliente se enfría por la evaporación en el aire atmosférico. Estos dispositivos garantizan el funcionamiento de los aires acondicionados de grandes edificios y proporcionan la refrigeración en cámaras frigoríficas y en una amplia variedad de procesos industriales.

Como se muestra en la figura 7 las torres de refrigeración reciben agua a una temperatura elevada y producen la evaporación de una parte de la misma, devolviendo el resto de agua al circuito. El principio físico en el que se basa se denomina enfriamiento evaporativo. Con el fin de conseguir la evaporación, se crea una fuerte corriente de aire mediante el empleo de ventiladores. Esta corriente de aire se dirige en dirección contraria a la del agua. El diseño más extendido de torres de refrigeración es aquel en el que el agua más caliente es pulverizada desde la parte superior y la corriente de aire discurre en sentido contrario, de abajo a arriba. Para conseguir una mayor eficiencia en estos aparatos, se emplea un entramado en su interior, denominado relleno, cuyo fin es el de aumentar la superficie de contacto entre el agua y el aire. A su vez, para evitar pérdidas de agua por el arrastre de gran cantidad de gotitas por la corriente de aire, se emplea un dispositivo denominado separador de gotas, situado a la salida de la corriente de aire. En la parte inferior se sitúa una bandeja cuya misión es la de recoger todo el agua que cae una vez fría. Generalmente en la bandeja se instala un flotador o boya, similar al de una cisterna, que regula el nivel del agua, de tal forma que permite la entrada de agua de renovación a medida que

se producen pérdidas en el circuito (Bandrés y Lluch, 2007).

Los aerosoles formados durante el funcionamiento de las torres de refrigeración son capaces de transmitir la enfermedad de los legionarios. Se han descrito numerosos brotes relacionados con torres de refrigeración. Entre ellos destaca el brote más importante a nivel mundial en cuanto a magnitud ocurrido en Murcia, en el que las torres de refrigeración instaladas en un hospital situado al norte de la ciudad se detectaron como el posible foco de infección tras el estudio epidemiológico (García-Fulgueiras *et al.*, 2003).

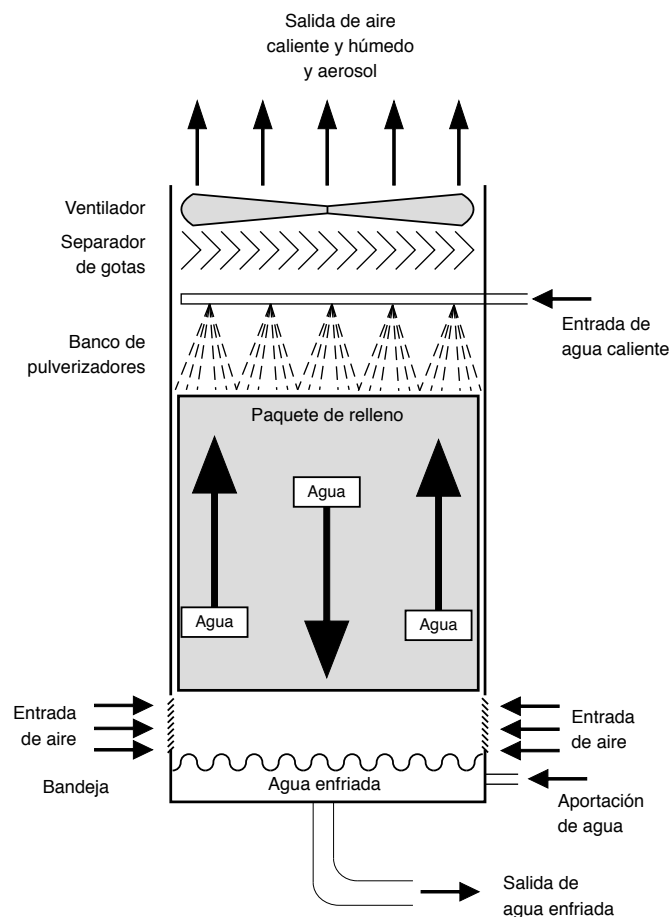


Figura 7. Esquema del funcionamiento de una torre de refrigeración.

Formas de presentación

La infección por *Legionella* puede ser adquirida en distintos ámbitos (comunitario, relacionado con viajeros y hospitalario).

La enfermedad de los legionarios se ha identificado como una causa de NAC requiriendo hospitalización en el 2-8% de los casos según estudios realizados en Norteamérica y Europa. *Legionella* es el segundo agente causal de neumonía grave adquirida en la comunidad después de *Streptococcus pneumoniae* (Rello *et al.*, 2003).

Otra forma de adquisición de la infección es la asociada con los viajes, ya que *Legionella* está presente en las torres de refrigeración y sistemas de distribución de agua de hoteles, apartamentos, campings y barcos (Caylá *et al.*, 2001; Infuso *et al.*, 1997; Joseph *et al.*, 1996). Su incidencia sobre grandes colectividades (hoteles y cruceros) genera una gran alarma social que afecta al sector turístico. Por este motivo, se creó el “European Working Group for *Legionella* Infections” (EWGLI) cuyos objetivos principales son reducir la incidencia de la enfermedad de los legionarios asociada a viajes, prevenir los casos de legionelosis identificando y controlando las fuentes de infección e informar a los sistemas de salud pública.

Por último, la legionelosis de adquisición nosocomial constituye una pequeña proporción del total (Uriel *et al.*, 1988). Sin embargo, la proporción de los casos mortales es mucho más alta en infecciones nosocomiales (hasta el 50%) que en infecciones adquiridas en la comunidad, ya que en los hospitales hay enfermos con diferentes tipos de inmunodepresión y, por tanto, con un riesgo mayor de desarrollar formas graves de legionelosis (Yu y Stout, 2000). Paradójicamente, la incidencia de legionelosis nosocomial en los enfermos con SIDA es similar a la de la población no infectada por el VIH, aunque, la enfermedad suele ser más grave (Ausina *et al.*, 2005).

Mortalidad

El índice de mortalidad de esta enfermedad depende, entre otros factores, de la edad del paciente, comorbilidad, gravedad de la enfermedad, diagnóstico precoz, adecua-

ción y tiempo del tratamiento antibiótico inicial (García-Fulgueiras *et al.*, 2003). Un estudio que evaluó los factores pronósticos de casos de neumonía grave producida por *Legionella* en pacientes ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) demostró que el único elemento independiente relacionado con la mortalidad fue presentar un índice de comorbilidad elevado en el momento de la admisión (el Ebiary *et al.*, 1997).

La mortalidad del brote de Filadelfia fue del 16% (29 de los 182 pacientes fallecieron) (Fraser, 1977). Actualmente, el índice de mortalidad global en Europa es de aproximadamente un 12% según la información facilitada por EWGLI. Sin embargo, un diagnóstico rápido y un tratamiento antibiótico precoz se asocia a una menor mortalidad, como fue el caso del brote de Murcia en el año 2001 en el que se alcanzó un índice de mortalidad inferior al 1% (García-Fulgueiras *et al.*, 2003).

Vigilancia epidemiológica de la enfermedad

La legionelosis es una enfermedad de declaración obligatoria en la mayoría de los países desarrollados. Existen diferencias en los sistemas de vigilancia de salud pública por la distinta capacidad técnica para identificar casos. Dichos factores se ven influenciados por valores históricos, sociales y culturales de los sistemas de salud pública de cada país (WHO, 1999). Sin embargo, se realiza una vigilancia internacional por EWGLI. Esta se basa en el uso de definiciones y procedimientos unificados desde el año 1987. Actualmente son 30 los países que pertenecen a este grupo de trabajo e informan, anualmente y de forma estandarizada, de las infecciones causadas por *Legionella*.

Además, en nuestro país, existe un sistema de vigilancia estatal a través de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, creada en 1996, que engloba tanto los sistemas básicos de vigilancia como los sistemas especiales. Su objetivo es conocer la evolución de la incidencia y los posibles cambios en el patrón de presentación de la enfermedad en la comunidad, mediante la detección de casos esporádicos, brotes y casos relacionados, que permitan identificar las fuentes de infección y tomar las

medidas de control adecuadas.

Control de los sistemas acuáticos artificiales

En España se publicó una ley específica para la prevención y control de la legionelosis, el Real Decreto 865/2003, de 4 de julio (BOE, 2003a). En él se establecen diversas medidas en orden a la prevención y control de la legionelosis en aquellas instalaciones que utilicen agua en su funcionamiento, produzcan aerosoles y se encuentren ubicadas en el interior o exterior de los edificios de uso colectivo o instalaciones industriales o medios de transporte que puedan ser susceptibles de convertirse en focos de propagación de la enfermedad durante su funcionamiento, pruebas de servicio o mantenimiento. Este RD cita, explícitamente, como instalaciones con mayor probabilidad de proliferación y dispersión de *Legionella* a las torres de refrigeración y condensadores evaporativos, así como otras instalaciones. Específicamente recoge diversas obligaciones para los titulares de las torres de refrigeración y los condensadores evaporativos, tales como notificar a la administración sanitaria el número y características técnicas de las mismas o las modificaciones que afecten al sistema, además de establecer las medidas preventivas y tratamientos. También, se especifican las acciones a realizar ante la detección de *Legionella* en estas instalaciones, si las concentraciones detectadas son superiores a 100 ufc/l (unidades formadoras de colonias por litro de agua) e inferiores a 1000 ufc/l se debe revisar el programa de mantenimiento y realizar las correcciones oportunas. Si el recuento de colonias es superior a 1000 e inferior a 10000 ufc/l, se debe realizar una limpieza y desinfección manteniendo una concentración máxima de cloro libre residual de 5 mg/l con un pH entre 7 y 8. Después de 15 días se debe analizar otra muestra de agua. Por último, si las concentraciones detectadas superan las 10000 ufc/l, se debe parar el funcionamiento de la instalación para limpiar y realizar un tratamiento de choque con altas concentraciones de cloro residual libre.

Ese mismo año, también se aprobó el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano

(BOE, 2003b). El Artículo 1 establece los criterios sanitarios que deben cumplir las aguas de consumo humano y las instalaciones que permiten su suministro desde la captación del agua hasta el grifo del consumidor y el control de ésta, garantizando su salubridad, calidad y limpieza (sin contener ningún tipo de microorganismo, parásito o sustancia, en una cantidad o concentración que pueda suponer un riesgo para la salud humana, según el Artículo 5 de dicho real decreto), sin hacer ninguna referencia explícita a *Legionella*.

Eficacia de los tratamientos desinfectantes

Actualmente para lograr una descontaminación selectiva de *Legionella*, se emplea una acción coordinada de los biocidas junto con choques térmicos. Los métodos más comúnmente empleados para prevenir y erradicar *Legionella* son la hipercloración y la elevación de la temperatura por su sencillez y coste-beneficio (Kim *et al.*, 2002). El control y la completa erradicación de *Legionella* en ambientes acuáticos artificiales es difícil de conseguir (Kool *et al.*, 1998). Aunque, *Legionella* no se detecta tras la desinfección, la misma cepa reemerge al poco tiempo, pero el mecanismo de recolonización se desconoce (Borella *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2008). Distintos estudios sugieren que los biofilms y la interacción con los protozoos (trofozoitos y quistes) ayudan a la supervivencia de la bacteria (Kim *et al.*, 2002). Existen numerosos métodos químicos (García y Pelaz, 2008), físicos y térmicos utilizados en la desinfección de las aguas que son efectivos frente a *L. pneumophila* pero ineficaces para la eliminación de los protozoos. Éstos ofrecen mayor resistencia a la erradicación por la composición química de su membrana, los diferentes estadios y los mecanismos de transporte intracelular, entre otros. Algunos estudios han sugerido que los protozoos, especialmente los quistes, pueden proteger intracelularmente a *Legionella* de la acción de los biocidas (Storey *et al.*, 2004). Esta forma enquistada de las amebas muestra una elevada resistencia ante situaciones de estrés, sobreviviendo, por ejemplo, a una exposición térmica de 80°C durante 10 minutos o a una concentración de 100 ppm de cloro libre, condiciones en las que se debería erradicar a la mayoría

de legionelas presentes en el agua (Storey *et al.*, 2004). Por otro lado, otros estudios sugieren que son las formas trofozoíticas de las amebas las que protegen a *Legionella* de la acción desinfectante del cloro (García *et al.*, 2007).

Además, las bacterias bajo situaciones de estrés ambiental activan la expresión de determinados genes de resistencia. El estrés que suponen los agentes químicos o físicos a todas las bacterias que componen el biofilm hace que se produzca una resistencia global a antibióticos, biocidas y detergentes (Hammer y Bassler, 2003) y el polisacárido excretado por las bacterias en la formación del biofilm impide la penetración de algunos agentes químicos y físicos (Campanac *et al.*, 2002).

Por tanto, los tratamientos empleados para la desinfección deben ser activos frente a los protozoos y el biofilm.

Métodos de detección de Legionella en muestras ambientales

El cultivo es la técnica de referencia para la detección de *Legionella* en muestras ambientales. En 1998, se desarrolló una norma estándar internacional, ISO 11731:1998, que describe el método de cultivo para el aislamiento y recuento de *Legionella* en muestras ambientales. Este método se puede aplicar a todo tipo de muestras ambientales (aguas naturales, potables e industriales) y materiales asociados (sedimentos, depósitos y lodos). Al igual que con las muestras clínicas, en las muestras ambientales se realiza un pretratamiento térmico o químico para eliminar los microorganismos acompañantes y aumentar la sensibilidad. Para realizar el cultivo primario se utiliza el medio de cultivo selectivo GVPC compuesto por la base BCYE- α suplementada con glicina, vancomicina, polimixina y cicloheximida. Cuando se aísla una presunta colonia de *Legionella*, ésta se identifica con los mismos métodos de identificación que se utilizan en la identificación de colonias procedentes de cultivos de origen humano.

Sin embargo, aprovechando los avances en la tecnología de los ácidos nucleicos, se desarrollaron a mediados de la década de los 80, diversos métodos de hibridación

de ADN que empleaban sondas marcadas con enzimas o con isótopos (Engleberg *et al.*, 1986; Grimont *et al.*, 1985). La especificidad de estos métodos era muy elevada y su sensibilidad permitía detectar aproximadamente 10^3 ufc/l. Si bien, este nivel de detección no es práctico en el caso de muestras de carácter medioambiental. Unos años después, se comenzó a aplicar la técnica de amplificación de ácidos nucleicos mediante la técnica de PCR para detectar *Legionella* en muestras ambientales (Bej *et al.*, 1990; Bej *et al.*, 1991). Esta técnica se dirige fundamentalmente al gen *mip* y a los genes ribosómicos 5S ARNr y 16S ARNr. Estos métodos moleculares, presentan la ventaja de ser extremadamente rápidos, posibilitando la detección de la bacteria en un tiempo inferior al necesario con los métodos de aislamiento en cultivo, pero tiene el inconveniente de ser una técnica cualitativa.

La tecnología de PCR a “tiempo real” basada en la detección fluorescente, está ganando terreno a la PCR convencional ya que permite cuantificar la concentración del microorganismo investigado en pocas horas (Bonetta *et al.*, 2010). A pesar de que la PCR a tiempo real ha solventado el problema de la cuantificación, persiste el inconveniente de poder discriminar entre células viables y no viables. Además, la presencia de inhibidores, especialmente los que afectan a las ADN polimerasas, dificultan o bloquean la reacción. Entre las sustancias inhibidoras más comunes en muestras ambientales destacan los ácidos húmicos y fúlvicos, compuestos fenólicos, metales pesados, etc. En la actualidad se están realizando estudios para solventar estos inconvenientes.

Siguiendo en esta línea de desarrollo, que conjuga la microbiología con la biología molecular, la biotecnología y la nanotecnología, se trabaja en el desarrollo de plataformas automatizadas que integren las ventajas de la PCR cuantitativa y el análisis basado en “microchips” con tecnología de microcanales (microfluidics) para la identificación múltiple y simultánea de patógenos. Además, también se están realizando estudios de desarrollo de dispositivos de medición de *Legionella* “in situ” a modo de biosensor colocado directamente en la instalación a investigar, mediante la detección de ácidos nucleicos y/o antígenos de *Legionella* (Yaradou *et al.*, 2007).

Actualmente no existe un método universal aceptado que permita obtener resultados reproducibles en todo tipo de muestras, por lo que resulta necesario seguir desarrollando nuevos métodos de eliminación de inhibidores de la reacción y de diferenciación entre células vivas y muertas.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que, desde el punto de vista de salud pública, el cultivo es importante porque permite obtener cepas procedentes de distintas instalaciones para realizar estudios posteriores, como ensayos de sensibilidad frente a antimicrobianos y biocidas, además de poder realizar un estudio epidemiológico comparando cepas de *Legionella* de los casos humanos con los aislados ambientales en caso de un brote de legionelosis.

Investigación epidemiológica molecular

La presencia habitual de *Legionella* tanto en medios acuáticos naturales como en medios acuáticos artificiales ha complicado el establecimiento de un nexo epidemiológico entre los aislados medioambientales y los obtenidos de individuos afectados por la enfermedad. Mediante el estudio epidemiológico molecular se corrobora la hipótesis establecida inicialmente en el estudio epidemiológico y ambiental y se adoptan las medidas de prevención adecuadas. Para realizar la investigación de epidemiología molecular es imprescindible contar con cultivos del mayor número de pacientes y con cultivos del mayor número de posibles instalaciones relacionadas con la infección. Se ha demostrado la coexistencia de varias cepas de *Legionella* diferentes en una misma instalación, por lo que es importante identificar al menos 5 o 6 colonias de cada muestra analizada (Ausina *et al.*, 2005).

Las primeras investigaciones dirigidas a la comparación de cepas clínicas con cepas ambientales de *Legionella* se basaron en la determinación del serogrupo (Tobin *et al.*, 1980). Posteriormente, cuando se observó que la mayoría de aislamientos pertenecían al serogrupo 1 de *L. pneumophila*, esta determinación dejó de ser un marcador epidemiológico y pasó a ser un rasgo meramente taxonómico.

Los métodos de subtipado de *Legionella* spp. se clasifican en técnicas fenotípicas y técnicas genotípicas.

Entre las técnicas fenotípicas, la que se utiliza con más frecuencia y, siempre de forma complementaria con las técnicas genotípicas, es la tipificación mediante anticuerpos monoclonales. Su principal inconveniente es la falta de antisueros para la tipificación de cepas diferentes a *L. pneumophila* serogrupo 1.

Las técnicas genotípicas se basan en el análisis de ADN cromosómico y/o elementos genéticos extracromosómicos. Estos métodos se caracterizan por su elevado grado de sensibilidad y especificidad, estableciendo con gran exactitud relaciones epidemiológicas. Se han utilizado muchas técnicas para discriminar los aislados de *Legionella* como el análisis de plásmidos, la electroforesis de proteínas (PAGE) o el análisis multienzimático. Entre estas técnicas destaca el estudio de la digestión del ADN cromosómico con un enzima de restricción. Se obtienen distintos fragmentos, con diferente tamaño, denominados polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción o RFLP. Un cambio por mutación o recombinación, en uno de estos lugares de restricción, lo hace irreconocible para el enzima y se traduce en una variación del perfil de fragmentos de restricción que es el responsable del polimorfismo existente entre las distintas cepas. Este perfil también variará si existen deleciones o inserciones de ADN entre dos lugares de restricción. La comparación de cepas para detectar el polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción se consigue separando los fragmentos obtenidos mediante una electroforesis en un gel de agarosa que se tiñe con bromuro de etidio.

La digestión del ADN cromosómico con enzimas de restricción de corte poco frecuente permite la macrorrestricción del ADN de la bacteria y la división del ADN en pocos fragmentos (entre 10 y 30). Muchos de estos fragmentos son de gran tamaño, más de 40 Kb, y no pueden separarse por técnicas de electroforesis convencional, sino que requieren técnicas de electroforesis en campo de pulsos ("Pulse Field Gel Electrophoresis", PFGE). Esta es la técnica candidata como mejor herramienta en

epidemiología molecular, hasta el momento, debido a su elevado poder discriminatorio aunque es un método laborioso.

También se han utilizado para estudios epidemiológicos diferentes tipos de amplificación del ADN como la amplificación de secuencias arbitrarias (AP-PCR) o la amplificación de regiones repetidas en el cromosoma (REP-PCR).

Actualmente, la necesidad de disponer de métodos de caracterización molecular que ofrezcan resultados rápidos y reproducibles, con la posibilidad de ser comparados en tiempo real por diferentes laboratorios, ha llevado al desarrollo de métodos de secuenciación de genes basados en técnicas de MLST (*multilocus sequence typing*). La técnica de MLST consiste en el análisis mediante secuenciación del ADN de fragmentos internos de un número determinado de genes codificantes de distintos enzimas metabólicos bacterianos (*housekeeping genes*). La comparación de estas secuencias entre distintos aislados permite establecer identidades o diferencias clonales de utilidad en el análisis epidemiológico. Una variante de esta técnica es el SBT (*sequence-based typing*) en la que se emplean tanto genes “housekeeping” como genes de virulencia. Se realiza la amplificación y posterior secuenciación de siete genes (*flaA*, *pilE*, *Asd*, *mip*, *mompS*, *proa* y *neuA*) para la tipificación molecular de *L. pneumophila* (Ratzow *et al.*, 2007). Paralelamente, se ha desarrollado una base de datos de diferentes aislados comparando su diversidad alélica. Esta técnica posee un alto poder discriminatorio y destaca por su capacidad para comparar resultados entre distintos laboratorios.

2. Objetivos

El primer brote de legionelosis ocurrido en España, diagnosticado retrospectivamente, se produjo en 1973 entre un grupo de escoceses alojados en un hotel de Benidorm. Desde entonces, se han originado numerosos casos y brotes de la enfermedad en nuestro país. Entre ellos destaca el brote sucedido en Murcia a principios de julio del año 2001. Éste ha sido el brote más importante en cuanto a magnitud producido a nivel mundial, en el que se confirmaron más de 400 casos de legionelosis. A pesar de considerarse como una enfermedad infecciosa potencialmente erradicable aplicando las medidas higiénico-sanitarias establecidas por la legislación vigente, la incidencia de legionelosis en España se sitúa por encima de la media europea. En los últimos años se ha observado tanto una estabilización de la tasa de incidencia como una disminución de la mortalidad, debido en parte, a la introducción de métodos de diagnóstico rápidos y a la administración del correcto tratamiento. La aparición de casos de legionelosis en forma de brotes en nuestro país provoca un elevado interés en los medios de comunicación social, una alarma entre la población y, sobre todo, una gran preocupación de las autoridades sanitarias. Además, la fuente de infección de la enfermedad no se llega a detectar en la tercera parte de los casos de legionelosis declarados aún realizando intensas investigaciones epidemiológicas. Actualmente, se consideran las torres de refrigeración como la fuente de infección relacionada con mayor frecuencia con la aparición de brotes, asociándose en gran medida a un mantenimiento deficiente de estas instalaciones. A parte de la presentación de legionelosis en forma de brotes, en los últimos años se está detectando un incremento de casos esporádicos comunitarios. En éstos, existe poca información acerca de las posibles fuentes de infección, desconociéndose la importancia que pueda tener la red de distribución de agua de consumo humano como reservorio de estos microorganismos y cuyo estudio no está contemplado en los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano establecidos por la legislación.

Con estos antecedentes, el presente trabajo pretende determinar la contaminación por *Legionella* tanto de agua de consumo humano como de torres de refrigeración, mantenidas correctamente según indica la legislación vigente, localizadas en distin-

tos puntos de la geografía española.

Con este propósito se proponen los siguientes objetivos:

1. Conocer la prevalencia y grado de colonización por *Legionella* en el agua de consumo humano y en torres de refrigeración distribuidas por toda la geografía española durante un periodo de tres años (2006-2008), comprobando la distribución estacional y geográfica de los aislamientos.
2. Conocer las especies y serogrupos de *Legionella* dominantes en el ambiente y establecer su variabilidad genotípica.
3. Comprobar la persistencia en el periodo estudiado de los distintos genotipos de *Legionella* en cada una de las instalaciones.
4. Estudiar la virulencia de las cepas de *Legionella* aisladas en muestras ambientales y en muestras humanas detectando la presencia de genes de virulencia y el crecimiento intracelular en *Acanthamoeba polyphaga* y células “macrophages-like U-937”.

3. Material y métodos

3.1. Muestras ambientales en España.

3.1.1. Puntos de muestreo.

Agua de consumo humano de edificios públicos

Se establecieron 157 puntos de muestreo distribuidos por toda España para la obtención de muestras de agua de consumo humano. La figura 8 presenta el número de puntos de muestreo analizados por comunidades autónomas y provincias. El Anexo 1 contiene la información detallada acerca de la localización de cada uno de estos puntos. El agua se recogió justo en la entrada de edificios públicos de un grifo colocado exactamente en la acometida (tubería que enlaza la instalación interior de inmueble y la llave de paso correspondiente con la red de distribución). Cada punto se muestreó mensualmente desde enero de 2006 a mayo de 2008.

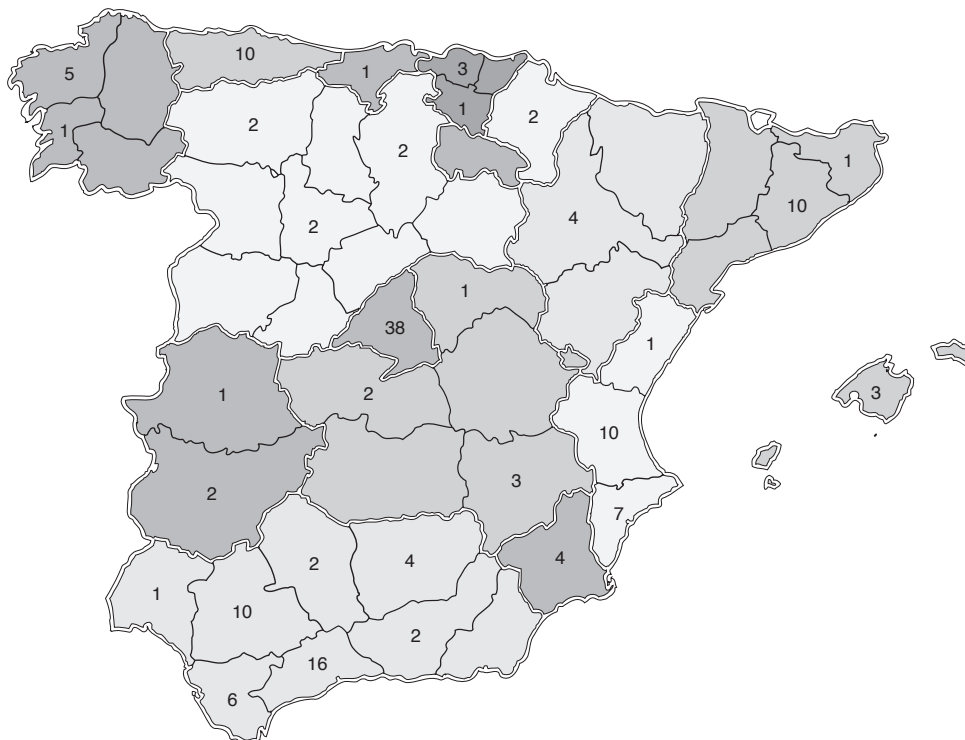


Figura 8. Distribución geográfica por comunidades autónomas y provincias de los puntos de muestreo de agua de consumo humano analizados.

Torres de refrigeración

Se analizó agua procedente de 309 torres de refrigeración situadas en 81 edificios públicos distribuidos por toda España. La figura 9 presenta el número de torres de refrigeración estudiadas por comunidades autónomas y provincias. El Anexo 2 recoge la ubicación exacta de cada una de las torres de refrigeración investigadas. Las torres de refrigeración se trataron con un polímero de N-metilenmetanamina con (cloro-metil) oxirano y cloruro de amonio cuaternario y/o con THPS (sulfato de tetra-kishidroximetilfosfonio) dosificados en choques 1-3 veces por semana para alcanzar al menos 150 ppm de producto durante una hora. En el momento del muestreo todas las torres cumplían con los niveles de biocida según las especificaciones del fabricante y según los parámetros indicadores de la calidad del agua incluidos en los criterios higiénico-sanitarios establecidos por el Real Decreto 865/2003 para la prevención y control de la legionelosis (BOE, 2003a). Cada torre de refrigeración se muestreó mensualmente desde enero de 2006 a diciembre de 2008.

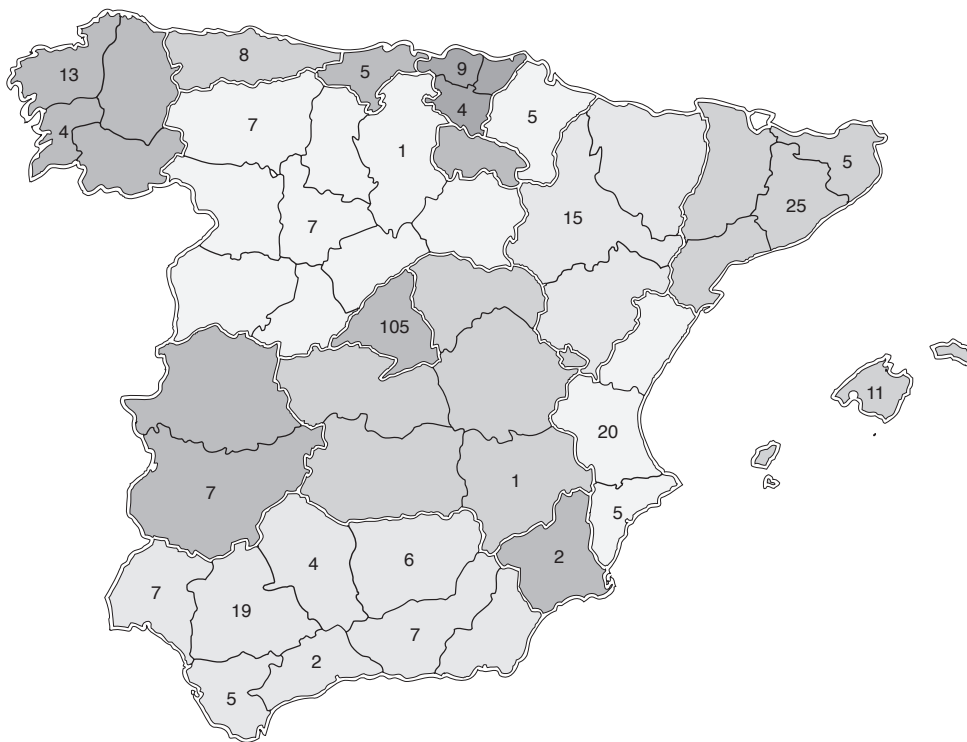


Figura 9. Distribución geográfica por comunidades autónomas y provincias de las torres de refrigeración analizadas.

Agua de consumo humano de domicilios

Se realizó el análisis del agua de consumo humano procedente del domicilio, localizado en La Alberca (Murcia), de un paciente diagnosticado de legionelosis en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca en septiembre de 2008. Las muestras de agua se recogieron en septiembre de 2008 del grifo de agua caliente de la cocina, grifo más cercano al calentador, y del grifo de agua caliente de la ducha.

3.1.2. Análisis del agua.

Para realizar el aislamiento y recuento de *Legionella* se siguió la Norma Internacional ISO 11731:1998.

Se recogió 1 litro de agua en un recipiente de vidrio con tapón de rosca tratado previamente en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Se añadió tiosulfato sódico para la inactivación de los biocidas oxidantes presentes en las muestras de agua recogidas en las torres de refrigeración. Las muestras se transportaron al laboratorio de microbiología en un tiempo inferior a 24 horas y se mantuvieron a una temperatura de 2-8°C.

Una vez en el laboratorio, se procedió a la concentración y a los pretratamientos, térmico y químico, de cada una de las muestras ambientales para eliminar los microorganismos acompañantes y aumentar la sensibilidad.

Concentración: las muestras se agitaron para resuspender cualquier depósito que pudiera haber sedimentado. Se centrifugaron 200 ml de cada muestra a 2000 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos a una temperatura de 25°C. Se desechó el sobrenadante en condiciones asépticas. El sedimento se resuspendió con 20 ml de agua destilada estéril.

Tratamiento térmico: se añadió 1 ml de muestra concentrada a un recipiente estéril y se introdujo en un baño de agua a 50°C durante 30 minutos.

Tratamiento ácido: se añadió 1 ml de tampón ácido a 10 ml de muestra concentrada.

Se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó 5 ml de sobrenadante y se resuspendió añadiendo 5 ml de tampón ácido. Se dejó en reposo durante 5 minutos. El tampón ácido se preparó mezclando 3.9 ml de ácido clorhídrico (0.2 mol/l) con 25 ml de cloruro potásico (0.2 mol/l). El pH se ajustó a 2.2 antes de su uso.

El cultivo se realizó en una placa de medio tamponado de extracto levadura y carbón activo con suplementos selectivos (GVPC) (Biomerieux). Se inoculó 0.1 ml de la fracción de muestra concentrada sin tratar, 0.1 ml de la fracción de muestra inmediatamente tras el tratamiento térmico y 0.1 ml de la fracción de muestra inmediatamente tras el tratamiento ácido. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ durante 10 días. El cultivo se examinó cada dos días.

Para la confirmación de las colonias de *Legionella* se seleccionaron cuatro colonias características de *Legionella* crecidas en el medio GVPC. Se realizaron subcultivos de estas colonias en placas de medio tamponado de agar, extracto de levadura y carbón activo (BCYE) (Biomerieux) y en placas de medio agar sangre (Biomerieux). Se incubaron a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ durante 4-5 días. Se consideraron colonias de *Legionella* aquellas que crecieron en medio BCYE pero no lo hicieron en medio agar sangre.

Para estimar el número de unidades formadoras de colonias (ufc) de *Legionella* en la muestra de agua original se seleccionó la placa de medio GVPC que tuvo el máximo número de colonias. Se contaron el número de colonias de dicha placa y se multiplicó por el factor de dilución. El límite de detección inferior fue de 50 ufc/l y el límite de detección superior fue de 10000 ufc/l.

Las especies y serogrupos de las cepas aisladas se determinaron mediante *Legionella* Látex Test Kit (Oxoid), el cual se basa en la microaglutinación con partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos específicos de conejo frente a los antígenos de *L. pneumophila* serogrupo 1, *Legionella pneumophila* serogrupos 2-14 y *Legionella no-pneumophila* (grupo que incluye: *Legionella longbeachae* serogrupos 1 y 2, *Legionella bozemanii* serogrupos 1 y 2, *Legionella dumoffii*, *Legionella gormanii*, *Legio-*

nella jordanis, *Legionella micdadei* y *Legionella anisa*). La determinación se realizó a las cuatro colonias seleccionadas de cada placa original. Los reactivos se atemperaron y se dispensó una gota de cada uno de ellos en cada tarjeta de reacción; a continuación se añadió una gota de diluyente. Con un asa de siembra se recogieron 3-4 colonias y se disolvieron con la gota de diluyente dispensada previamente sobre las tarjetas. La suspensión de colonias se mezcló bien con cada reactivo realizando movimientos circulares durante 1 minuto. Se interpretó como resultado positivo cuando se observó aglutinación sobre la tarjeta.

Las cepas ambientales de *Legionella* aisladas durante los tres años de estudio se congelaron a una temperatura de -20°C conservadas en leche descremada.

3.2. Muestras clínicas.

El Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca es el hospital de referencia de la Región de Murcia. El Servicio de Microbiología cubre a una población de más de 250000 habitantes. Durante el periodo de estudio, y como se realiza de forma habitual en el laboratorio de Microbiología, se trató de diagnosticar todas las neumonías cuyo agente causal pudiera ser *Legionella*.

Se realizó la prueba de detección del antígeno urinario de *L. pneumophila* serogrupo 1 (Inverness Medical) como técnica urgente a todos los pacientes con sospecha clínica de legionelosis. Este ensayo se basa en una inmunocromatografía de membrana con la que se detecta el antígeno soluble de *L. pneumophila* serogrupo 1. La orina se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. A continuación, se concentró 25x mediante ultrafiltración selectiva (Minicon B15, Millipore Corp., Bedford, Mass). La torunda proporcionada en el dispositivo se sumergió en la orina concentrada y se colocó en el panel derecho, tal y como indica el fabricante. El resultado de la prueba se interpretó a los 15 minutos.

Independientemente del resultado obtenido en la prueba de antigenuria, las muestras respiratorias (esputo y/o BAL) de pacientes con sospecha clínica de legionelosis

se inocularon en placas BCYE (Biomerieux). Algunas muestras precisaron un tratamiento previo con L-acetil-cisteína 20% (Pharmazam) por su consistencia y viscosidad. Las placas se incubaron 10 días en estufa a 37°C con una atmósfera del 5% de CO₂ que se examinaron cada dos días. Las colonias con características de *Legionella* se subcultivaron en placas de medio agar sangre (Biomerieux). Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ durante 48 horas. Se consideraron como *Legionella* aquellas colonias que crecieron en medio BCYE pero no lo hicieron en medio agar sangre.

La identificación de la especie y serogrupo, en el caso de ser *L. pneumophila*, de las cepas clínicas se determinó mediante *Legionella* Látex Test Kit (Oxoid), realizando el procedimiento que se detalla previamente para las cepas ambientales.

Se estableció un protocolo de recogida de datos de los pacientes con legionelosis en el que se incluyeron datos demográficos (edad, sexo, residencia habitual, lugar y/o puesto de trabajo, fumador/exfumador...), antecedentes epidemiológicos (viajes, estancia en hotel/barco, hospitalización en los 30 días previos...), antecedentes clínicos (patologías previas, patologías crónicas, tratamiento actual...), datos clínicos actuales (motivo de consulta, informe radiológico, resultados de laboratorio...).

3.3. Electroforesis en campo de pulsos.

El polimorfismo del ADN de los aislamientos se analizó mediante el estudio de los fragmentos de restricción de su genoma generados con una endonucleasa de baja frecuencia de corte (*Sfi*I) y su posterior separación mediante PFGE.

Las cepas a estudio se descongelaron y se cultivaron en medio BCYE. Tras la incubación en estufa a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ durante 72 horas, se prepararon los bloques de agarosa. A partir del cultivo en placa se realizaron suspensiones de 5-7 colonias de *Legionella* en 3 ml de solución SE (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 7.4) en un tubo estéril y con tapón. La suspensión de *Legionella* se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se decantó. El sedimen-

to se resuspendió con 3 ml de solución SE. La suspensión se centrifugó de nuevo a 3500 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se añadió otros 3 ml de SE para resuspender el sedimento. Se ajustó la concentración a una densidad óptica de 1.5 a 600 nm (Lück *et al.*, 1994). Se centrifugó 1 ml de la solución con la concentración ajustada a 3500 rpm durante 10 minutos. El sedimento obtenido tras la centrifugación se resuspendió con 300 µl de solución SE. A continuación, se preparó una solución de agarosa (Conda) al 1.6% en SE. Esta solución se calentó en el microondas hasta su total disolución e inmediatamente se añadieron 300 µl a los 300 µl de la suspensión celular. Seguidamente se dejó solidificar en los moldes para bloques.

Los bloques, una vez solidificados, se incubaron en baño a 37°C durante 3 horas con el primer tampón de lisis (6mM Tris-HCl pH 7.6, 1M NaCl, 100mM EDTA), Brij 58 al 0.5% (Sigma), ácido desoxicólico al 0.2% (Sigma), N-Lauril Sarcosina sal sódica al 0.5% (Sigma) y lisozima a una concentración de 1 mg/ml (Sigma). Tras las 3 horas de incubación se retiró el tampón con ayuda de una gasa e inmediatamente se añadió el segundo tampón de lisis (10mM Tris-HCl pH 8, 0.5M EDTA) con N-Lauril Sarcosina sal sódica al 1% y proteinasa K a una concentración de 2 mg/ml (Roche). Seguidamente, los bloques se incubaron con este segundo tampón en un baño a 50°C durante 8-10 horas. El empleo de estos agentes garantiza la lisis celular así como la eliminación de enzimas que podrían degradar el ADN.

A continuación, se procedió a los lavados de los bloques. Se realizaron un total de 4 lavados. Para el primero de ellos se utilizó una solución de TE (10mM Tris-HCl pH 7.6, 1mM EDTA) con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma) al 0.02% incubando a 37°C durante 1 hora. Para realizar el segundo lavado se empleó la misma solución a temperatura ambiente durante 1 hora. Los dos últimos lavados se efectuaron con solución TE (10mM Tris-HCl pH 7.6, 1mM EDTA) a temperatura ambiente durante 45 minutos. Al finalizar los lavados, los bloques se conservaron en esta misma solución TE a 4°C.

Los bloques se cortaron para conseguir el tamaño adecuado tras los sucesivos lavados. Seguidamente se incubaron con 200 µl de tampón G 1X (10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 0.1 mg/ml suero bovino fetal) (Fermentas) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de los 30 minutos, se retiró este tampón y se añadieron otros 200 µl. La digestión se realizó utilizando 5 unidades del enzima de restricción *Sfi*I (5´...G G C C N N N N ↓ N G G C C...3´) (Fermentas) durante 8-10 horas a 50°C.

Para el análisis de los fragmentos de ADN se prepararon geles de agarosa al 1% disueltos en tampón TBE 0.5X (Tris-Borato-EDTA) (Sigma). La solución de agarosa se calentó en un microondas hasta su total disolución y se dejó solidificar en el molde adecuado. Cada bloque se colocó en un pocillo, dejando un pocillo libre para el marcador de peso molecular. Como marcador de peso molecular se utilizó ADN de concatámeros del fago lambda cl857Sam7 (0.05-1Mb) (Bio-Rad). Los pocillos se sellaron con agarosa al 0.08% diluida en tampón TBE (0.5X). Para realizar la PFGE se utilizó el CHEF-DR[®] II (Bio-Rad) con 2 litros de tampón TBE (0.5X). La electroforesis se realizó bajo las condiciones de una distribución lineal de pulsos entre 5 y 50 segundos durante 22 horas, con un voltaje de 5 v/cm y una temperatura de 12°C.

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma) y se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador conectado a un equipo de captación de imágenes (U:Genius, Syngene). Los patrones de PFGE se consideraron iguales cuando fueron indistinguibles según los criterios de Tenover (Tenover *et al.*, 1995); es decir, si los patrones diferían en una o más bandas se consideraron como patrones moleculares diferentes. Los patrones electroforéticos se designaron con una letra mayúscula.

3.4. Tipificación de *L. pneumophila* mediante “Sequence-Based Typing” (SBT).

Para la caracterización epidemiológica de *L. pneumophila* en muestras clínicas y ambientales se utilizó el análisis molecular SBT descrito por el “European Working Group for *Legionella* infections” (EWGLI) (Gaia *et al.*, 2003; Gaia *et al.*, 2005; Ratzow

et al., 2007). Para la tipificación de *L. pneumophila*, EWGLI recomienda el estudio mediante secuenciación del ADN de los fragmentos internos de 7 genes (“house-keeping genes”): *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* y *neuA*. La técnica consta de tres etapas: 1) extracción del ADN cromosómico bacteriano, 2) amplificación de los genes, 3) reacción de secuenciación.

Las cepas se cultivaron en placas BCYE (Biomérieux) tras su descongelación y se incubaron durante 72 horas a 37°C. Para la extracción del ADN se resuspendieron 5-6 colonias en 500 µl de agua de grado PCR (Sigma). Esta suspensión se calentó a 100°C durante 8 minutos y posteriormente se enfrió en hielo durante 5 minutos. A continuación, se centrifugó a 13000 rpm durante 30 segundos. El sobrenadante obtenido se recogió y se utilizó como extraído de ADN para realizar la secuenciación.

Las reacciones en cadena de la polimerasa se realizaron en un volumen total de 50 µl, en tubos de 200 µl, que contenía tampón 1X de PCR (Roche), 2.5 mM MgCl₂ (Roche), 200 µM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (Roche), oligonucleótidos específicos (Sigma) para la amplificación a una concentración final de 10 pmoles (Tabla 4), 2.5 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Roche) y 5 µl de ADN genómico.

La amplificación se realizó en un termociclador (Mastercycler epgradient, Eppendorf) con un programa de 1 ciclo de 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 40 segundos a 72°C y por último un ciclo de 10 minutos a 72°C.

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa (Conda) disueltos en tampón TBE 0.5X (Sigma) a una concentración del 2%. La solución se calentó en microondas hasta total disolución y se dejó solidificar en la cubeta de electroforesis. Las muestras se cargaron en los pocillos del gel con ayuda del tampón de carga (6X) (Sigma). Para determinar el tamaño del producto amplificado se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (“DNA ladder 100pb”, Invitrogen). La electroforesis se realizó con las siguientes condiciones: 140 voltios, 60 minutos. Por último los geles se tiñeron con bromuro de etidio durante 10-

15 minutos y se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador conectado a un equipo de captación de imágenes (U:Genius, Syngene).

Tabla 4. Oligonucleótidos específicos para la realización del SBT.

Gen	Nombre	Posición (pb)	Secuencia (5´ - 3´)
<i>flaA</i>	<i>flaA</i> -587F	568-587	GCG TAT TGC TCA AAA TAC TG
	<i>flaA</i> -960R	981-960	CCA TTA ATC GTT AAG TTG TAG G
<i>pilE</i>	<i>pilE</i> -35F	12-35	CAC AAT CGG ATG GAA CAC AAA CTA
	<i>pilE</i> -453R	471-453	GCT GGC GCA CTA GGT ATC T
<i>asd</i>	<i>asd</i> -511F	487-511	CCC TAA TTG CTC TAC CAT TCA GAT G
	<i>asd</i> -1039R	1062-1039	CGA ATG TTA TCT GCG ACT ATC CAC
<i>mip</i>	<i>mip</i> -74F	58-74	GCT GCA ACC GAT GCC AC
	<i>mip</i> -595R	616-595	CAT ATG CAA GAC CTG AGG GAA C
<i>mompS</i>	<i>mompS</i> -450	430-450	TTG ACC ATG AGT GGG ATT GG
	<i>mompS</i> -1126R	1140-1126	TGG ATA AAT TAT CCA GCC GGA CTT C
	<i>mompS</i> -1015R*	1032-1015	CAG AAG CTG CGA AAT CAG
<i>proA</i>	<i>proA</i> -1107F	1090-1107	GAT CGC CAA TGC AAT TAG
	<i>proA</i> -1553R	1570-1553	ACC ATA ACA TCA AAA GCC
<i>neuA</i>	<i>neuA</i> -196F	176-196	CCG TTC AAT ATG GGG CTT CAG
	<i>neuA</i> -611R	634-611	CGA TGT CGA TGG ATT CAC TAA TAC

mompS-1015R* se utilizó para la reacción de secuenciación reversa.

Los productos de PCR, con tamaños comprendidos entre 394 y 710 pb, se purificaron por el método comercial ExoSAP-IT® (USB). Este método puede purificar fragmentos entre 100 pb y 20 Kb. Se mezclaron 2 µl de ExoSAP-IT® con 5 µl de producto amplificado. Se incubó 15 minutos a 37°C para eliminar los restos de cebadores y nucleótidos. Posteriormente se incubó a 80°C durante 15 minutos para inactivar ExoSAP-IT®.

El producto resultante se utilizó para la secuenciación de los fragmentos de ADN. Para ello se realizó una reacción de PCR en un volumen final de 10 µl, añadiendo 4 µl de tampón BigDye (“BigDye terminator cycle sequencing ready reaction system”, Applied Biosystem), 3 µl de ADN a secuenciar (150 ng), 1 µl del primer elegido (2 µM). La secuenciación de ADN se llevó a cabo en el secuenciador automático ABI

Prism 337-DNA sequencer (Applied Biosystem) en el laboratorio de Sistemas Genómicos, Valencia. El termociclador fue programado con 30 ciclos de 20 segundos a 96°C, 20 segundos a 50°C y 4 minutos a 60°C.

La secuencia se analizó mediante la base de datos “Sequence Quality Tool”, disponible en la página web de EWGLI (www.ewgli.org). Las secuencias “forward” y “reverse” se combinaron y se alinearon para dar una única secuencia consenso. Para cada aislamiento se obtuvo el perfil de los siete alelos, cada uno de ellos definido por un dígito en un orden predeterminado (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proa* y *neuA*) y la correspondiente secuencia tipo (ST) representada por un número.

3.5. Genes de virulencia.

Para el estudio de los genes de virulencia se seleccionaron dos genes *lvh* y *rtxA*, ya que están implicados con mayor frecuencia en infecciones causadas por *Legionella* según estudios previos (Samrakandi *et al.*, 2002). Se utilizaron seis pares de oligonucleótidos, *lvh1/prpA-lvh2/prpA*, *lvh3/lvhB3-lvh4/lvhB4*, *lvh5/lvhB8-lvh6/lvhB9* y *lvr1/lvrE-lvr2/prpE* para la detección de la región *lvh* y *rtx1/rtxA-rtx2/rtxA* y *rtx3/rtxA-rtx4/rtxA* para la detección de la región *rtxA*.

La extracción de ADN se realizó tal y como se indica en el apartado 3.4. Para realizar la cuantificación del ADN genómico se comparó la intensidad de tinción con bromuro de etidio de la muestra a analizar, con la obtenida por diluciones de concentraciones conocidas (50 ng/μl, 10 ng/μl y 2 ng/μl) de ADN del fago lambda. Las diluciones se realizaron en tampón TE mezclado con tampón de carga en proporción 1:5 y se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 0.8%. Las intensidades relativas de las distintas bandas de la muestra se compararon con la del patrón (fago lambda) para determinar la concentración del ADN problema.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50 μl, en tubos de 200 μl, que contenía tampón 1X de PCR (Roche), 2.5 mM MgCl₂ (Roche), 5 mM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (Roche), oligonucleótidos específicos (Sigma) para

la amplificación a una concentración final de 10 pmoles (Tabla 5), 2.5 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Roche) y 25-50 ng de ADN genómico.

La amplificación se realizó en un termociclador (MasterCycler epgradient, Eppendorf) con un programa de 1 ciclo de 3 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 60 segundos a 94°C, 60 segundos a la temperatura de anillamiento (T_m) adecuada (Tabla 5), 60 segundos a 72°C y por último un ciclo de 10 minutos a 72°C.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa del 2% disueltos en tampón TBE 0.5X. La solución se calentó en un microondas hasta la total disolución y se dejó solidificar en la cubeta de electroforesis. Las muestras se cargaron en los pocillos del gel con ayuda del tampón de carga (6X). Para determinar el tamaño del producto amplificado se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (“DNA ladder 100pb”, Invitrogen). La electroforesis se realizó con las siguientes condiciones: 140 voltios, 60 minutos. Por último, los geles se tiñeron con bromuro de etidio durante 10-15 minutos y se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador conectado a un equipo de captación de imágenes (U:Genius, Syngene).

Tabla 5. Oligonucleótidos específicos para el estudio de los genes de virulencia.

Gen	Nombre	Secuencia (5' - 3')	T_m (°C)
<i>lvh</i>	<i>lvh1/prpA</i>	GTT TTA ATC CCC CAG CAA GC	57.1
	<i>lvh2/prpA</i>	AAT ATC CCT ACT CAT CCT CG	
<i>lvh</i>	<i>lvh3/lvhB3</i>	GGC TAG GAG GTT CTT GTG	57.3
	<i>lvh4/lvhB4</i>	ATT GGC CGA GAT GTC CTT	
<i>lvh</i>	<i>lvh5/lvhB8</i>	CCT CTA CGC ATT ACA ACG CC	64.4
	<i>lvh6/lvhB9</i>	GTG GTG GTA AAG GGA ATG CC	
<i>lvh</i>	<i>lvr1/lvrE</i>	GGT CCA ATG GGT CCA GCA GG	64.3
	<i>lvr2/lvrE</i>	AGT GGC TGA TTC TGG AGT GG	
<i>rtxA</i>	<i>rtx1/rtxA</i>	GAT CCG CAA GTA GCG CTC AC	65.8
	<i>rtx2/rtxA</i>	TGT AAT GCT GGC ATT AGG CG	
<i>rtxA</i>	<i>rtx3/rtxA</i>	CTG ATG CTG CTA CGG AAC AC	63.5
	<i>rtx4/rtxA</i>	CCG CAG TCA TTA CAC CTG CG	

3.6. Crecimiento intracelular.

El estudio del crecimiento intracelular de *L. pneumophila* se realizó con amebas (*Acanthamoeba polyphaga*) y con la línea celular U-937 (ATCC CRL-1593.2). Las amebas fueron proporcionadas por el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias. La infección se realizó por triplicado para cada cepa de *L. pneumophila* estudiada y en cada intervalo de tiempo.

3.6.1. Crecimiento intracelular en *A. polyphaga*.

A. polyphaga se mantuvo en medio de peptona-extracto de levadura-glucosa (PYG) (Tabla 6) incubado a 37°C. El medio de cultivo se cambió semanalmente. Para ello se centrifugó el medio con las amebas a 600 rpm durante 5 minutos. A continuación, se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 10 ml de medio PYG.

Tabla 6. Composición del medio de cultivo PYG.

Compuesto	Cantidad
Proteosa-peptona	20 g
Extracto de levadura	2 g
Glucosa (anhidra)	18 g
Mg SO ₄ ·7H ₂ O	0.980 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.059 g
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O	1 g
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	0.02 g
KH ₂ PO ₄	0.34 g
Na ₂ HPO ₄	0.355 g
Agua destilada	cantidad suficiente para 1 L

El medio se autoclavó 20 minutos a 121°C tras la disolución de todos los compuestos en agua destilada. Posteriormente se dejó enfriar varias horas y se conservó a 4°C durante 90 días.

Justo antes de empezar la infección la concentración de amebas se ajustó a 1x10⁵ células/ml en medio PYG. Se utilizó una placa de 24 pocillos por cepa estudiada. Se añadió 1 ml de medio con la concentración ajustada a 16 de los 24 pocillos de las

placas. Las placas se incubaron 1 hora a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Mientras tanto se preparó una suspensión de *L. pneumophila* en medio PYG con una densidad óptica de 1.6-1.8 a 600 nm (OD₆₀₀) lo que equivale a una concentración de 1x10⁹ células/ml (Miyake *et al.*, 2005). Tras la hora de incubación, se añadió 1 µl de la suspensión de *Legionella* para obtener un índice de infectividad de 1:10 (Figura 10). Las placas se centrifugaron a 700 rpm durante 10 minutos para favorecer el contacto de la bacteria con la monocapa de *A. polyphaga*. Al finalizar esta centrifugación se designó el tiempo cero (Figura 10). Las placas se incubaron en estufa a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ durante 1 hora para que se produjera la infección de las amebas por *L. pneumophila*. Al finalizar el periodo de infección, cada pocillo se lavó tres veces con medio PYG. Se añadió 1 ml de medio PYG con 100 µg/ml de gentamicina y se incubó 1 hora más en la estufa para eliminar las bacterias extracelulares (Figura 10). Se retiró el medio PYG con gentamicina y entonces se lavaron tres veces todos los pocillos con medio PYG para eliminar la gentamicina. Las placas se mantuvieron en estufa hasta la lisis.

La lisis de las amebas se realizó a intervalos de tiempo de 2, 4, 16 y 24 horas (Figura 10). Para la lisis se añadió 0.04% de Tritón X-100 al medio PYG (Miyake *et al.*, 2005) y seguidamente se pasó 5 veces por una aguja del calibre 29 G x 1/2''.

Para obtener el recuento de bacterias intracelulares se inocularon 100 µl, 50 µl y 25 µl de la suspensión lisada en placas BCYE. Las placas se incubaron a 37°C durante 72 horas. El número de bacterias intracelulares se expresó en ufc/ml.

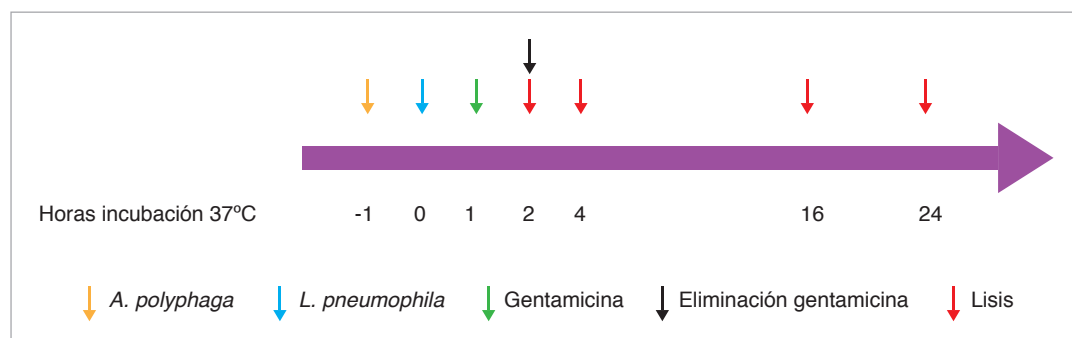


Figura 10. Esquema de trabajo para el estudio del crecimiento intracelular en *A. polyphaga*.

3.6.2. Crecimiento intracelular en células “*macrophages-like U-937*”.

Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma) con un 10% de suero bovino fetal (SBF) (Sigma), 1% de L-glutamina (Sigma) y 1% de antibiótico (penicilina y estreptomycin) (Eurolone). Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ en un frasco de cultivo de 75 cm² en posición horizontal. Las células se mantuvieron a una concentración entre 2x10⁵ y 1x10⁶ células/ml. Esta concentración se ajustó cada 2-3 días centrifugando el caldo de cultivo a 1000 rpm durante 5 minutos, resuspendiendo el sedimento en 1 ml de RPMI y realizando el recuento de las células viables con azul tripán en una cámara de Neubauer. Se añadieron los mililitros necesarios de medio RPMI para conseguir una concentración de 2x10⁵ células/ml, calentando el medio previamente en baño a 37°C durante 15 minutos para alcanzar un pH de 7.0-7.6.

Para proceder con la infección, la concentración de células se ajustó a 1x10⁵ células/ml en medio RPMI con 10% de SBF sin antibiótico. Se utilizó una placa de 24 pocillos por cepa estudiada. Se añadió 1 ml de medio con la concentración ajustada a 16 de los 24 pocillos de las placas. Se añadió 50 ng/ml de acetato de forbol miristato (PMA) (Sigma) para la obtención de la diferenciación de las células U-937 a macrófagos (Figura 11) (Gao *et al.*, 1997). Las placas se incubaron 48 horas a 37°C. Tras las 48 horas de incubación, se preparó una suspensión de *L. pneumophila* en medio RPMI con una densidad óptica de 1.6-1.8 a 600 nm (OD₆₀₀) lo que equivale a una concentración de 1x10⁹ células/ml (Miyake *et al.*, 2005). Se añadió 1 µl de la suspensión de *Legionella* para obtener un índice de infectividad de 1:10 (Figura 11). Las placas se centrifugaron a 500 rpm durante 20 minutos para favorecer el contacto de la bacteria con la monocapa de U-937 (Miyake *et al.*, 2005). Al finalizar esta centrifugación se designó el tiempo cero (Figura 11). Las placas se incubaron en estufa a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ durante 1 hora para que se produjera la infección de las células. Al finalizar el periodo de infección, cada pocillo se lavó tres veces con medio RPMI. Se añadió 1 ml de medio RPMI con 50 µg/ml de gentamicina y se incubó 1 hora más en la estufa para eliminar las bacterias (*L. pneumophila*) extracelulares (Gao *et al.*,

1997). Se retiró el medio RPMI con gentamicina y entonces se lavaron tres veces todos los pocillos con medio RPMI para eliminar el antibiótico (Figura 11). Las placas se mantuvieron en estufa hasta la lisis.

La lisis de las células se realizó a intervalos de tiempo de 2, 4, 16 y 24 horas (Figura 11). Se realizó una lisis hipotónica retirando el medio RPMI y añadiendo 1 ml de agua destilada a cada pocillo. Posteriormente se pasó 5 veces por una aguja del calibre 29 G x 1/2´´.

Para obtener el recuento de bacterias intracelulares se inocularon 100 µl, 50 µl y 25 µl en placas BCYE. Las placas se incubaron a 37°C durante 72 horas. El número de bacterias intracelulares se expresó en ufc/ml.

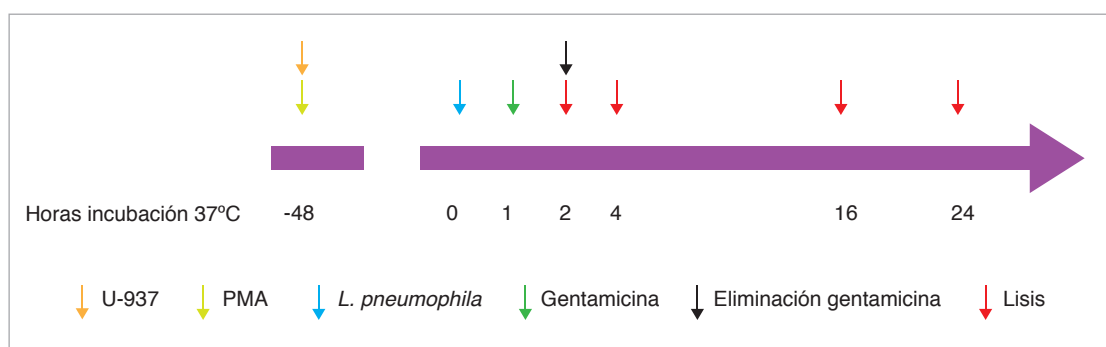


Figura 11. Esquema de trabajo para el estudio del crecimiento intracelular en U-937.

3.7. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa “*Statistical Package for the Social Sciences*” (13.0, SPSS S.L. Madrid).

El estudio de la relación entre variables bivariantes se realizó comparando los porcentajes con la prueba de Chi-cuadrado de Pearson. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0.05.

Las diferencias entre variables categóricas se analizaron con el test F de Snedecor con un intervalo de confianza del 99%.

3.8. Consideraciones éticas.

Las muestras clínicas con sospecha de legionelosis se analizaron en el laboratorio de Microbiología según el protocolo establecido en el laboratorio para el diagnóstico habitual de neumonías, manteniendo en todo momento la garantía de confidencialidad; por consiguiente, no ha sido necesario someter este estudio a la consideración del Comité Ético del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.

4. Resultados

4.1. Colonización del agua por *Legionella* spp.

Durante el periodo de estudio (2006-2008) se aislaron un total de 467 cepas de *Legionella* en 466 puntos distribuidos por toda España (Figuras 8 y 9). De éstos, 157 fueron puntos de muestreo de agua de consumo humano y 309 fueron torres de refrigeración. Un 31.5% (147 puntos) estuvieron colonizados por *Legionella* en algún momento del estudio.

El total de muestras analizadas, recogidas tanto de puntos de agua de consumo humano como de torres de refrigeración, fue de 15677. *Legionella* se aisló en 442 muestras (2.8%). En 25 muestras se aislaron dos especies o serogrupos distintos de *Legionella* de este modo, el número de cepas totales obtenidas fueron 467 (Figura 12). Como se muestra en la figura 12, casi la mitad de los aislamientos, 49%, fueron *Legionella pneumophila* serogrupo 1 (229 cepas), el 20.3% de los aislamientos fueron *L. pneumophila* serogrupo 2-14 (95 cepas) y *Legionella* spp. diferente a *L. pneumophila* representó el 29.8% de los aislamientos (139 cepas). En cuatro aislamientos no se llegó a la identificación de especie (Figura 12).

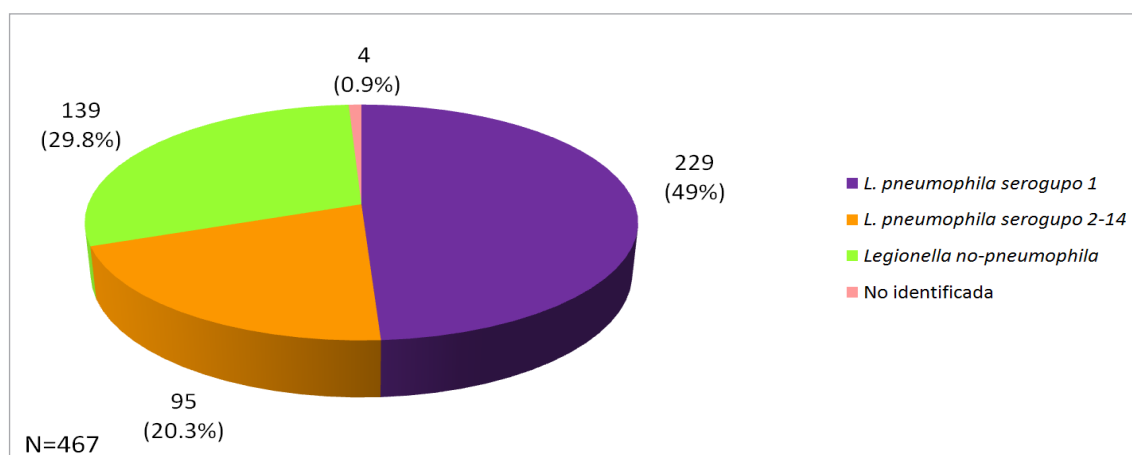


Figura 12. Número (porcentaje) de aislamientos de *Legionella* distribuidos según las distintas especies y serogrupos en el total de muestras estudiadas.

4.1.1. Estudio de colonización por *Legionella* spp. en agua de consumo humano.

Se aislaron 97 cepas de *Legionella* en los 157 puntos de agua de consumo humano analizados (Figura 13). Se detectó colonización por *Legionella* en 32 de ellos (20.3%). La figura 14 muestra los puntos analizados y colonizados por comunidades autónomas. En el anexo 1 se recoge la información detallada respecto a la localización de cada uno de los puntos de muestreo.

El total de muestras analizadas de agua de consumo humano fue de 4553. De ellas, en 92 (2%) se obtuvo cultivo positivo para *Legionella*. El número de cepas aisladas fue de 97, ya que 5 muestras recogidas de 3 puntos diferentes presentaron cultivo mixto, con dos especies o serogrupos distintos de *Legionella*. En uno de estos puntos de muestreo se detectó coexistencia de dos especies de *Legionella* en tres muestras recogidas en distintos meses del estudio (Anexo 1). Es de destacar que un 92.7% (90/97) de los aislamientos se obtuvieron en el sur de España (Andalucía, Murcia y en el sur de Extremadura y de la Comunidad Valenciana) (Figura 15). La distribución por comunidades autónomas de los aislamientos de *Legionella* se explica en el capítulo siguiente.

De los 97 aislamientos, más de la mitad (58.7%, 57 cepas) pertenecieron a la especie *L. pneumophila* y el 41.2% (40 cepas) a otras especies diferentes a *L. pneumophila*. Dentro de *L. pneumophila*, el serogrupo más prevalente fue el serogrupo 1, con un 91.2% de los aislamientos. Únicamente 5 cepas (8.8%) fueron clasificadas como *L. pneumophila* serogrupo 2-14 (Figura 13).

El recuento de la población bacteriana se realizó a partir de la placa primaria del medio selectivo GVPC. Las concentraciones fluctuaron entre 50 ufc/l (unidades formadoras de colonias por litro) (límite de detección inferior) y más de 10000 ufc/l (límite de detección superior). Tal como queda reflejado en la tabla 7, en el 53.6% de las muestras (52 muestras) el número de *Legionellas* aisladas fue inferior a 10^3 ufc/l y en el 46.4% de las muestras restantes (45 muestras) los recuentos fueron superiores

a esta concentración, límite permitido en el agua de la red de distribución pública según las autoridades de algunos países. La concentración de las distintas especies de *Legionella* se muestra en la tabla 7. Es de destacar que en 25 muestras se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1 con resultado superior a 10^3 ufc/l.

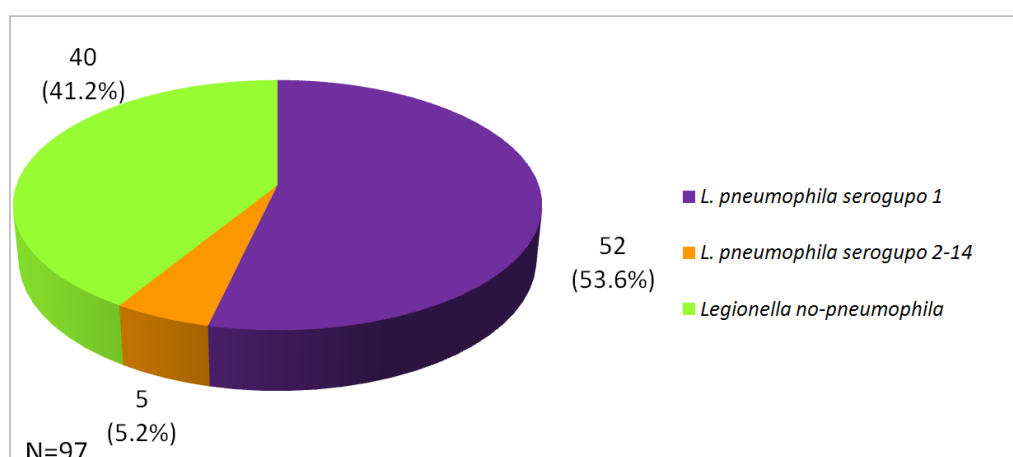


Figura 13. Número (porcentaje) total de aislamientos de las distintas especies y serogrupos de *Legionella* obtenidos en agua de consumo humano.

Tabla 7. Concentración (ufc/l) de *Legionella* en las 92 muestras positivas de agua de consumo humano.

	Número de aislamientos (%) de <i>Legionella</i> spp. y concentración detectada en agua de consumo humano (ufc/l)				Total
	< 10^2	10^2 - 10^3	10^3 - 10^4	> 10^4	
<i>L. pneumophila</i> s.1	4 (4.1)	23 (23.7)	15 (15.5)	10 (10.3)	52
<i>L. pneumophila</i> s. 2-14	-	4 (4.1)	1 (1)	-	5
<i>Legionella</i> no-pneumophila	5 (5.2)	16 (16.5)	15 (15.5)	4 (4.1)	40
Total	9 (9.3)	43 (44.3)	31 (32)	14 (14.4)	97

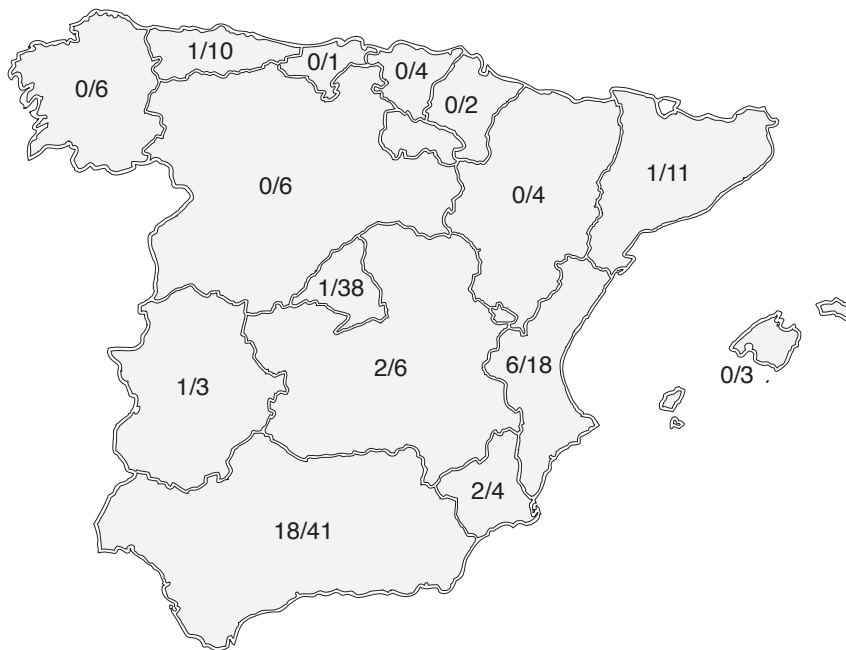


Figura 14. Distribución geográfica por comunidades autónomas de los puntos de muestreo de agua de consumo humano colonizados por *Legionella* (n) en algún momento del estudio y puntos de muestreo totales analizados (n₁), (n/n₁).

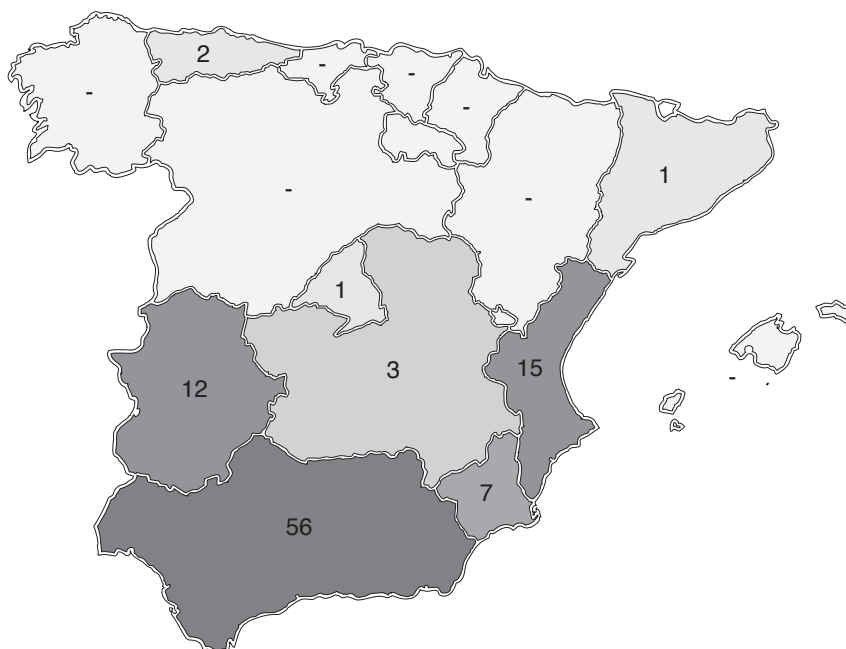


Figura 15. Distribución geográfica por comunidades autónomas del número total de aislamientos de *Legionella* obtenidos en muestras de agua de consumo humano.

4.1.2. Distribución estacional de los aislamientos de *Legionella* spp. en agua de consumo humano.

En el año 2006 se detectaron 63 aislamientos en agua de consumo humano. La principal especie identificada fue *L. pneumophila*. Se aislaron 37 cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1 (58.7%) y 3 cepas de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 (4.8%). Los 23 aislamientos restantes se identificaron como especies de *Legionella* distintas a *L. pneumophila* (36.5%). En el año 2007 se detectaron únicamente 27 aislamientos, menos de la mitad de aislamientos que en el año anterior. De ellos, 13 fueron identificados como *L. pneumophila* (48.1%) y 14 como especies de *Legionella* distintas a *L. pneumophila* (51.9%). Entre las cepas de *L. pneumophila*, 12 se clasificaron dentro del serogrupo 1 (44.4%) y 1 dentro del serogrupo 2-14 (3.7%). En el año 2008 se analizaron muestras en los meses de enero a mayo. Se identificaron 3 cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1, 1 cepa de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 y 3 cepas de especies de *Legionella* distintas a *L. pneumophila* (Figura 16).

Como se aprecia en la figura 16, el número total de aislamientos varió de unos meses a otros. El número máximo de aislamientos detectados en un mes fueron 12 y se obtuvieron en el mes de octubre del año 2006. Sin embargo, en algunos meses no se detectó *Legionella* en ningún punto analizado de toda la geografía española (febrero y julio de 2007 y marzo y abril de 2008).

Al estudiar la variabilidad estacional, se detectaron más aislamientos en otoño que en el resto de estaciones, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Figura 16). No se pudo realizar la variabilidad estacional en función de la especie y serogrupo de *Legionella*, ya que únicamente se detectaron 5 aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 durante el período de estudio.

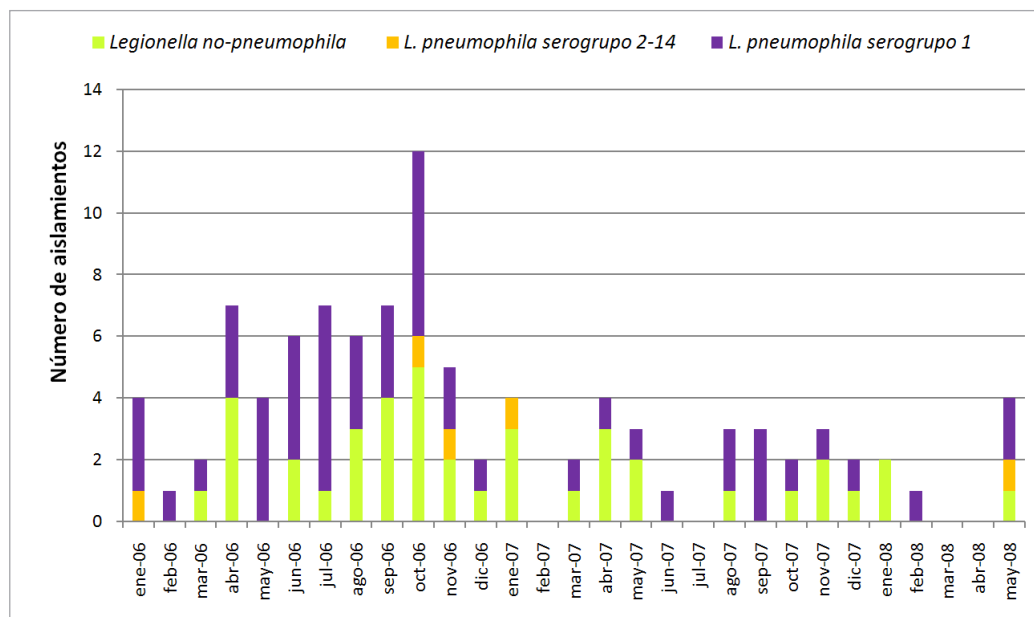


Figura 16. Distribución de especies y serogrupos de *Legionella* aisladas en agua de consumo humano en cada mes del estudio.

4.1.3. Estudio de colonización por *Legionella* spp. en torres de refrigeración.

Se aislaron un total de 370 cepas de *Legionella* (Figura 17). Se estudiaron 309 torres de refrigeración situadas en 81 edificios. De éstos, más de la mitad, 43 edificios (53%), presentaron, al menos, una torre de refrigeración colonizada a lo largo del estudio. Se detectó *Legionella* en 115 de las 309 torres de refrigeración investigadas (37.2%). De éstas, 50 torres presentaron únicamente una muestra positiva (43.5%) y en las 65 torres restantes (56.5%) se observó más de una muestra positiva (Figura 18).

En la figura 19 se observa el número de torres de refrigeración totales colonizadas y analizadas por comunidades autónomas. El anexo 2 contiene la información detallada de cada uno de los edificios analizados y en el capítulo siguiente se indica la distribución de los aislamientos de *Legionella* en las distintas comunidades autónomas.

Se recogieron un total de 11124 muestras en las torres de refrigeración, de las cuales, 350 (3.1%) tuvieron cultivo positivo para *Legionella*. El número de cepas aisladas fue de 370 (Figura 17), ya que 20 muestras presentaron cultivo mixto con dos especies

o serogrupos distintos de *Legionella*. Predominó la coexistencia de *L. pneumophila* serogrupo 1 y especies distintas a *L. pneumophila* (14/20). Cabe mencionar que la mayor parte de los aislamientos (361/370) se obtuvieron en la zona sur y este de España (Andalucía, Región de Murcia, Comunidad Valenciana, Baleares, Cataluña y Aragón) y Madrid (Figura 20).

Casi una tercera parte de los 370 aislamientos (72.2%, 267 cepas) pertenecieron a la especie *L. pneumophila* y el 26.8% (99 cepas) a otras especies diferentes a *L. pneumophila*. El serogrupo más prevalente de *L. pneumophila* fue el serogrupo 1, con 177 aislamientos. Las 90 cepas restantes se clasificaron como *L. pneumophila* serogrupo 2-14. No se llegó a la identificación de especie en cuatro aislamientos (Figura 17).

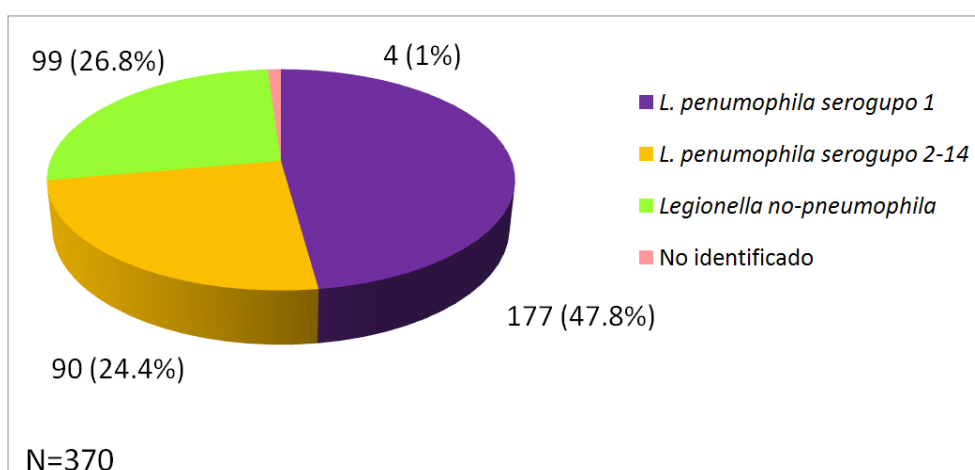


Figura 17. Número (porcentaje) total de aislamientos de las distintas especies y serogrupos de *Legionella* obtenidos en agua de torres de refrigeración.

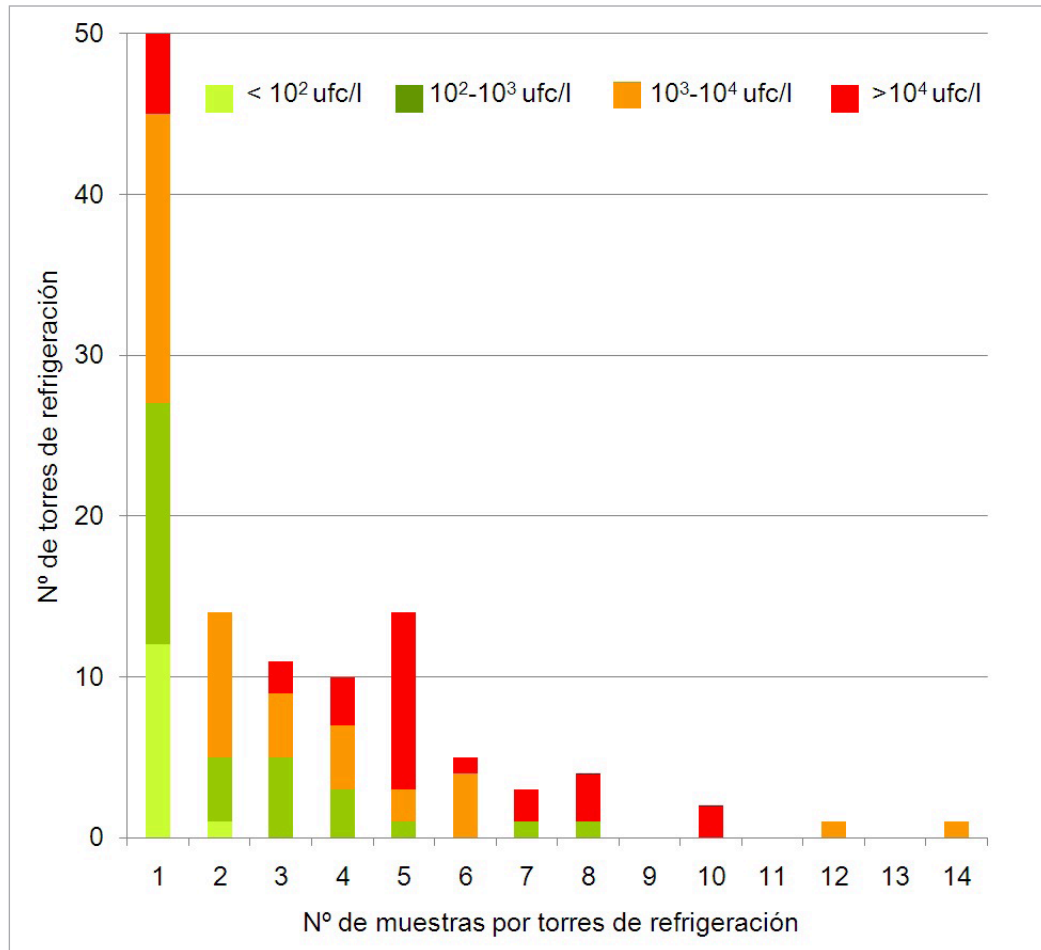


Figura 18. Número de torres de refrigeración con número de muestras positivas y concentración máxima (ufc/l) detectada.

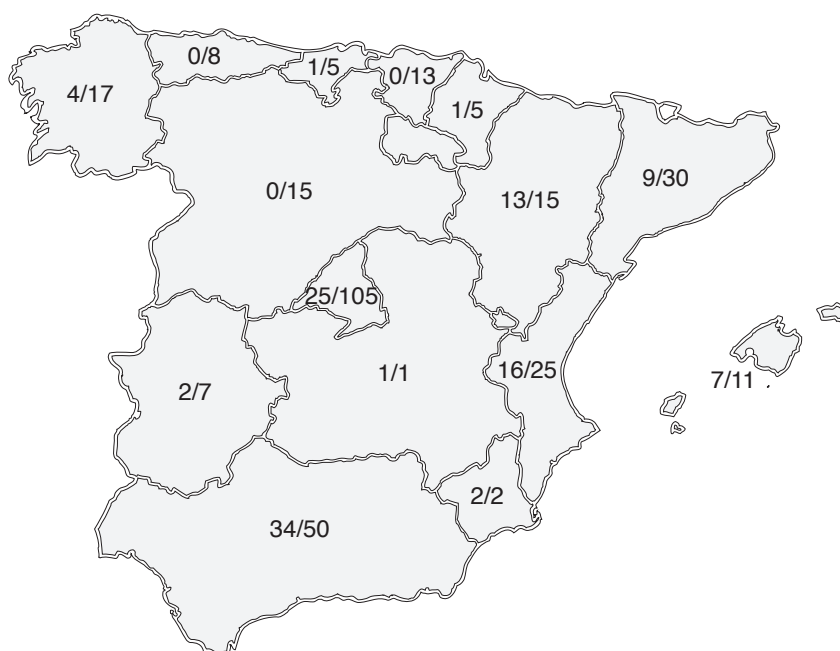


Figura 19. Distribución geográfica por comunidades autónomas de las torres de refrigeración colonizadas por *Legionella* (n) en algún momento del estudio y torres de refrigeración totales analizadas (n_i), (n/n_i).

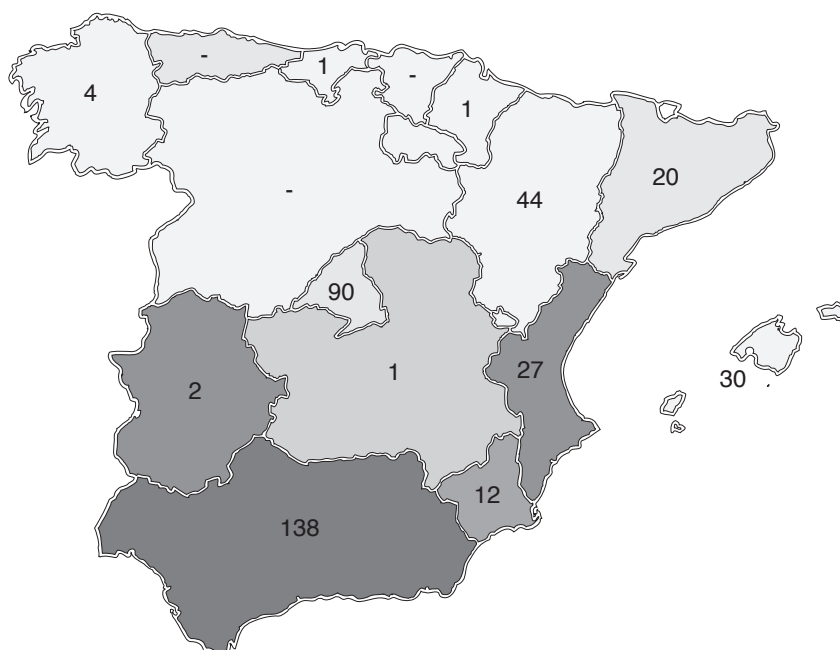


Figura 20. Distribución geográfica por comunidades autónomas del número total de aislamientos de *Legionella* obtenidos en muestras de agua recogidas de torres de refrigeración.

El recuento de la población bacteriana se realizó, al igual que para el agua de consumo humano, a partir de la placa primaria del medio de cultivo GVPC. Las concentraciones fluctuaron entre 50 ufc/l (límite de detección inferior) y más de 10000 ufc/l (límite de detección superior). Como se observa en la tabla 8, los recuentos fueron inferiores a 10^3 ufc/l en el 59.8% de las muestras (221 muestras) y en el 38.3% de las muestras (142 muestras) superiores a dichos niveles. Las torres de refrigeración se deben limpiar y desinfectar de acuerdo con el anexo 4b establecido en el RD 865/2003 cuando se superan las 10^3 ufc/l (BOE, 2003a). La tabla 8 refleja las concentraciones de las distintas especies de *Legionella*. Destacan las 52 muestras donde se aislaron especies diferentes a *L. pneumophila* en cantidades superiores a 10^3 ufc/l. En la figura 18 se observa que los recuentos son superiores en aquellas torres de refrigeración donde se detectaron más muestras positivas durante el periodo de estudio.

Tabla 8. Concentración (ufc/l) de *Legionella* en las 350 muestras positivas de agua de torres de refrigeración.

	Número de aislamientos (%) de <i>Legionella</i> spp. y concentración detectada en agua de torres de refrigeración (ufc/l)					
	<10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴		
<i>L. pneumophila</i> s.1	35 (9.5)	89 (24)	38 (10.2)	15 (4)	-	177 (47.8)
<i>L. pneumophila</i> s.2-14	10 (2.7)	45 (12.2)	19 (5.1)	16 (4.4)	-	90 (24.4)
<i>Legionella no-pneumophila</i>	12 (3.2)	28 (7.7)	43 (11.6)	9 (2.4)	7 (1.9)	99 (26.8)
No identificada	2 (0.6)	-	2 (0.6)	-	-	4 (1)
Total	59 (16)	162 (43.8)	102 (27.5)	40 (10.8)	7 (1.9)	370

4.1.4. Distribución estacional de los aislamientos de *Legionella* spp. en torres de refrigeración.

El año 2006 fue el año de estudio en el que se detectaron más aislamientos de *Legionella* en torres de refrigeración (149 aislamientos). Se aislaron 69 cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1 (46.3%) y 36 cepas de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 (24.2%).

Los 43 aislamientos restantes se identificaron como especies de *Legionella* distintas a *L. pneumophila* (28.9%), además de una cepa que no se llegó a su identificación. En el año 2007 se detectaron 95 aislamientos, un tercio menos que el año anterior. De ellos, 72 fueron identificados como *L. pneumophila* (75.8%) y únicamente 20 como especies de *Legionella* distintas a *L. pneumophila* (21.1%). Entre las cepas de *L. pneumophila*, 39 se clasificaron dentro del serogrupo 1 (41.1%) y 33 dentro del serogrupo 2-14 (34.7%). Tres cepas no se pudieron identificar. Se obtuvieron 126 aislamientos durante el año 2008. Se identificaron 69 cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1 (54.8%), 21 cepas de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 (16.6%) y 36 cepas de especies de *Legionella* distintas a *L. pneumophila* (28.6%).

La figura 21 representa el número total de aislamientos en los distintos meses del estudio. Se observa que los aislamientos variaron de unos meses a otros. El número máximo de aislamientos (33 aislamientos) se obtuvo en agosto del año 2008, seguido de los 30 y 26 aislamientos detectados en octubre y agosto del año 2006 respectivamente. Sin embargo, en algunos meses se detectaron sólo 2 o 3 aislamientos de *Legionella*.

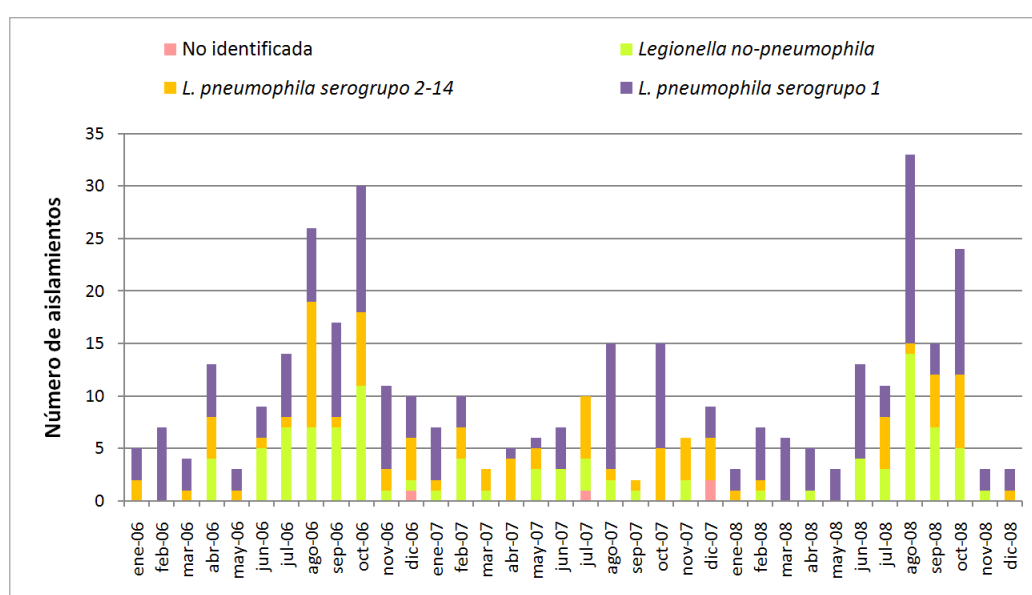


Figura 21. Distribución de especies y serogrupos de *Legionella* aisladas torres de refrigeración en cada mes del estudio.

Al estudiar la variabilidad estacional, se detectaron más aislamientos en verano (138 aislamientos) y en otoño (123 aislamientos) que en invierno (61 aislamientos) y primavera (48 aislamientos), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Figura 21). También se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la variabilidad estacional (verano y otoño) en función de la especie y serogrupo de *Legionella* (Figura 21).

4.2. Distribución de los aislamientos de *Legionella* spp. en las distintas comunidades autónomas.

4.2.1. Agua de consumo humano.

4.2.1.a. Andalucía.

Se estudiaron muestras de todas las provincias de esta Comunidad Autónoma excepto de Almería. Se investigaron un total de 41 puntos (Málaga, 16 puntos; Sevilla, 10 puntos; Cádiz, 6 puntos; Jaén, 4 puntos; Granada y Córdoba, 2 puntos y Huelva, 1 punto). De éstos, en 18 se detectó colonización por *Legionella*, presentando todas las provincias investigadas al menos un punto colonizado en algún momento del estudio (Figura 22).

El total de muestras analizadas fue de 1189 con 56 aislamientos de *Legionella* (4.7%). *L. pneumophila* serogrupo 1 se aisló en 26 muestras procedentes de todas las provincias andaluzas excepto de Huelva y Cádiz. Sólo tres aislamientos obtenidos en Córdoba y Sevilla se identificaron como *L. pneumophila* serogrupo 2-14 y 27 cepas aisladas en todas las provincias fueron clasificadas como *Legionella no-pneumophila* (Figura 23). Destacó el elevado número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1 en Sevilla. Diecinueve de las 26 cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1 se aislaron de tres puntos localizados en esta provincia (A1a, A35a y A36a). Los recuentos fueron superiores a 10^4 ufc/l en las muestras obtenidas en septiembre del año 2006 en el punto A1a y en septiembre y octubre del año 2006 en el punto A35a. En el resto de muestras se obtuvieron recuentos inferiores a 10^4 ufc/l. Cuatro de las 27 mues-

tras en las que se aisló *Legionella no-pneumophila* presentaron también recuentos superiores a 10^4 ufc/l. Estas muestras se recogieron en Sevilla (A8a) en octubre del año 2006, en Málaga (A2a) en marzo del año 2007 y en Córdoba (A6a) en abril y diciembre del año 2007. Se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1 en el 54.9% (17/31) de las muestras en las que se obtuvo un recuento inferior a 10^3 ufc/l y en el 36% (9/25) de las muestras en las que el recuento fue superior o igual a 10^3 ufc/l (Tabla 9). La única muestra de Andalucía en la que se obtuvo cultivo mixto (*L. pneumophila* serogrupo 1 y *Legionella no-pneumophila*) fue obtenida del punto A16a en octubre del año 2006. No se detectaron más muestras positivas en este punto a lo largo del estudio (Anexo 1).

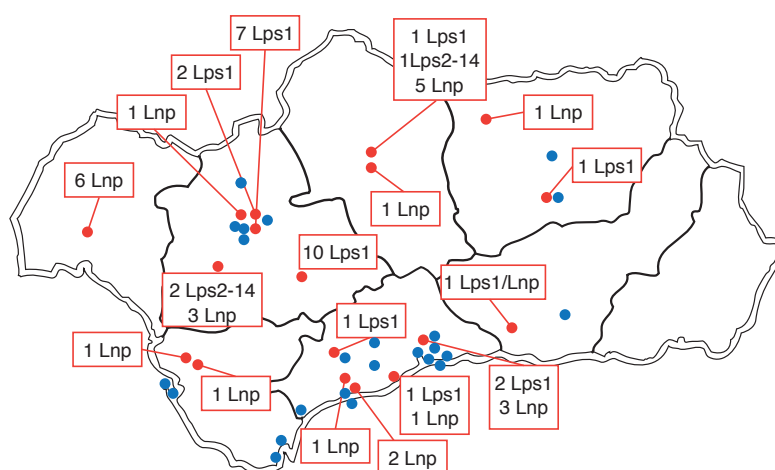


Figura 22. Distribución geográfica de los puntos analizados en Andalucía. ● Puntos no colonizados por *Legionella*. ● Puntos colonizados por *Legionella*. n Lps1, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1; n Lps2-14, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 2-14; n Lnp, número de aislamientos de especies distintas a *L. pneumophila*. nLx/Ly, especies y/o serogrupos de *Legionella* aisladas en cultivo mixto.

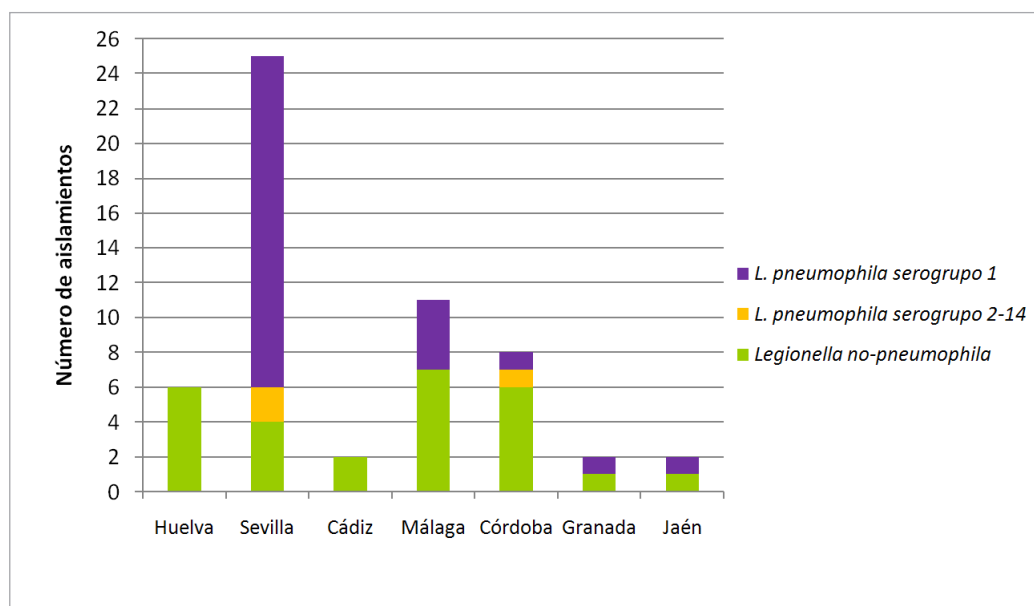


Figura 23. Distribución de especies y serogrupos de *Legionella* en las provincias de Andalucía.

Tabla 9. Muestras totales analizadas, número de aislamientos y concentración (ufc/l) según especie y serogrupo de *Legionella* en el agua de consumo humano de las provincias de Andalucía.

Provincias	Nº cepas aisladas/ Nº muestras analizadas	Especie/serogrupo	Total cepas	Cuantificación (ufc/l)			
				<10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴
Huelva	6/29	<i>Legionella no-pneumophila</i>	6	-	3	3	-
		<i>L. pneumophila</i> s.1	19	1	10	5	3
Sevilla	25/290	<i>L. pneumophila</i> s. 2-14	2	-	1	1	-
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	4	-	1	2	1
Cádiz	2/174	<i>Legionella no-pneumophila</i>	2	-	2	-	-
Málaga	11/464	<i>L. pneumophila</i> s.1	4	1	2	1	-
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	7	-	2	4	1
		<i>L. pneumophila</i> s.1	1	-	1	-	-
Córdoba	8/58	<i>L. pneumophila</i> s. 2-14	1	-	1	-	-
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	6	1	2	1	2
Granada	2/58	<i>L. pneumophila</i> s.1	1	-	1	-	-
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	1	-	-	1	-
Jaén	2/116	<i>L. pneumophila</i> s.1	1	-	1	-	-
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	1	1	-	-	-
Total	56/1189		56	4	27	18	7

4.2.1.b. Extremadura.

En Extremadura se analizaron 87 muestras recogidas de tres puntos, dos de ellos situados en Badajoz y uno en Cáceres. Sólo uno de los puntos de Badajoz (E2a) presentó colonización y únicamente se detectaron nueve muestras positivas durante el año 2006. Como se observa en la figura 24, en 8 muestras se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1 (marzo, junio, julio, agosto, septiembre, octubre, noviembre y diciembre). En tres de estas muestras (julio, noviembre y diciembre) se obtuvo cultivo mixto (*L. pneumophila* serogrupo 1 y *Legionella* spp. distinta a *L. pneumophila*). El recuento de *L. pneumophila* serogrupo 1 fue superior a 10^3 ufc/l en la mitad de las muestras (4/8) y el de *Legionella* spp. distinta a *L. pneumophila* fue inferior a 10^3 ufc/l en todas las muestras (Tabla 10).

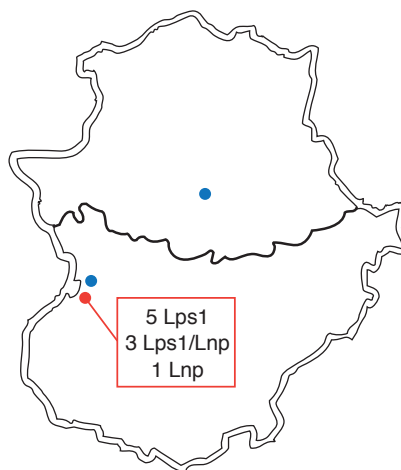


Figura 24. Distribución geográfica de los puntos analizados en Extremadura. ● Puntos no colonizados por *Legionella*. ● Puntos colonizados por *Legionella*. n Lps1, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1; n Lnp, número de aislamientos de especies distintas a *L. pneumophila*. nLx/Ly, especies y/o serogrupos de *Legionella* aisladas en cultivo mixto.

Tabla 10. Muestras totales analizadas, número de aislamientos y concentración (ufc/l) según especie y serogrupo de *Legionella* en el agua de consumo humano de las provincias de Extremadura.

Provincias	Nº cepas aisladas/ Nº muestras analizadas	Especie/serogrupo	Total cepas	Cuantificación (ufc/l)			
				<10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴
Cáceres	0/29	-	-	-	-	-	-
Badajoz	12/58	<i>L. pneumophila</i> s.1	8	1	3	3	1
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	4	-	4	-	-
Total	12/87		12	1	7	3	1

4.2.1.c. Región de Murcia.

En la Región de Murcia se estudiaron un total de 4 puntos de agua de consumo humano. Dos puntos se localizaron en el centro de la ciudad (MU1a y MU2a) y los dos restantes se situaron en dos grandes poblaciones de la Región de Murcia (MU3a y MU4a), como se refleja en la figura 25. Dos de los cuatro puntos (MU1a y MU3a) estuvieron colonizados.

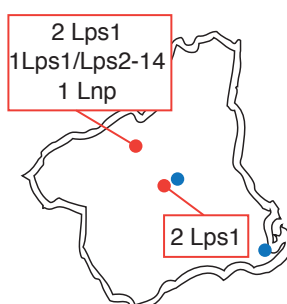


Figura 25. Distribución geográfica de los puntos analizados en la Región de Murcia. ● Puntos no colonizados por *Legionella*. ● Puntos colonizados por *Legionella*. n Lps1, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1; n Lps2-14, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 2-14; n Lnp, número de aislamientos de especies distintas a *L. pneumophila*. nLx/Ly, especies y/o serogrupos de *Legionella* aisladas en cultivo mixto.

Se analizaron un total de 116 muestras de las que 6 fueron positivas (5.2%) con 7 aislamientos de *Legionella*. La mayoría de los aislamientos (6 aislamientos) pertenecieron a la especie *L. pneumophila*. Cinco de ellos se clasificaron como *L. pneumophila* serogrupo 1 y uno como *L. pneumophila* serogrupo 2-14. El aislamiento restante se identificó como *Legionella no-pneumophila*. Los recuentos obtenidos quedan reflejados en la tabla 11. La única muestra que presentó un recuento superior a 10^4 ufc/l se recogió en el punto MU3a en septiembre del año 2007. La especie encontrada en esta muestra fue *L. pneumophila* serogrupo 1. La muestra analizada en mayo de 2008 en este mismo punto presentó cultivo mixto de *L. pneumophila* serogrupo 1 y serogrupo 2-14 con recuentos inferiores a 10^3 ufc/l.

Tabla 11. Muestras totales analizadas, número de aislamientos y concentración (ufc/l) según especie y serogrupo de *Legionella* en el agua de consumo humano de la Región de Murcia.

Provincias	Nº cepas aisladas/ Nº muestras analizadas	Especie/serogrupo	Total cepas	Cuantificación (ufc/l)			
				<10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴
R. Murcia	7/116	<i>L. pneumophila</i> s.1	5	-	3	1	1
		<i>L. pneumophila</i> s.2-14	1	-	1	-	-
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	1	-	-	1	-
Total	7/116		7	-	4	2	1

4.2.1.d. Comunidad Valenciana.

Se obtuvieron muestras de 18 puntos ubicados en las tres provincias de la Comunidad Valenciana (Alicante, 7 puntos; Valencia, 10 puntos; Castellón, 1 punto). En uno de los puntos de Valencia (V1a) y en 5 de Alicante (V2a, V3a, V4a, V5a y V8a) se detectó colonización por *Legionella* (Figura 26).

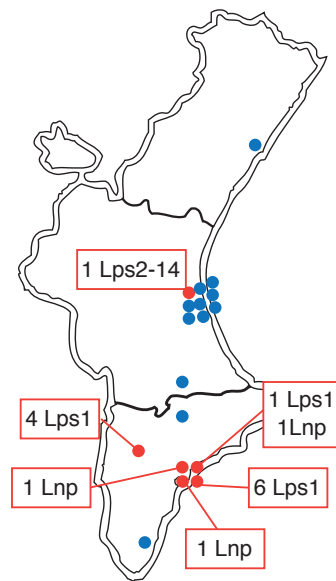


Figura 26. Distribución geográfica de los puntos analizados en la Comunidad Valenciana. ● Puntos no colonizados por *Legionella*. ● Puntos colonizados por *Legionella*. n Lps1, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1; n Lps2-14, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 2-14; n Lnp, número de aislamientos de especies distintas a *L. pneumophila*.

El total de muestras analizadas fue de 522 con 15 aislamientos de *Legionella* (2.8%). *L. pneumophila* serogrupo 1 se aisló en 11 muestras, en una se aisló *L. pneumophila* serogrupo 2-14 y en 3 muestras los aislamientos fueron especies distintas a *L. pneumophila* (Figura 26). Destacaron las 11 muestras positivas en las que se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1 con recuentos superiores a 10^3 ufc/l. De éstas, 5 superaron las 10^4 ufc/l (mayo y junio de 2007 en V1a y septiembre, octubre y noviembre de 2007 en V2a) (Tabla 12).

Tabla 12. Muestras totales analizadas, número de aislamientos y concentración (ufc/l) según especie y serogrupo de *Legionella* en el agua de consumo humano de la Comunidad Valenciana.

Provincias	Nº cepas aisladas/ Nº muestras analizadas	Especie/serogrupo	Total cepas	Cuantificación (ufc/l)			
				<10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴
Alicante	14/203	<i>L. pneumophila</i> s.1	11	1	1	4	5
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	3	2	-	1	-
Valencia	1/290	<i>L. pneumophila</i> s.2-14	1	-	1	-	-
Castellón	0/29	-	-	-	-	-	-
Total	15/522		15	3	2	5	5

4.2.1.e. Otras comunidades autónomas.

En Madrid se analizaron un total de 1102 muestras obtenidas de 38 puntos. Sólo una de estas muestras fue positiva (punto M32a, septiembre 2006) con el aislamiento de una cepa de *Legionella no-pneumophila* con un recuento muy bajo (350 ufc/l) (Figura 27a)

De los 11 puntos estudiados en Cataluña se analizaron un total de 319 muestras. Al igual que en Madrid, sólo una muestra fue positiva (punto CT7a, enero 2007) donde se aisló una cepa de *Legionella no-pneumophila* y su cuantificación fue inferior a 10³ ufc/l (Figura 27b)

En Asturias se muestrearon 10 puntos y se analizaron 290 muestras. Sólo un punto (AS1a) estuvo colonizado por *L. pneumophila* serogrupo 1 en dos meses del estudio (junio y octubre del año 2006). Los recuentos obtenidos fueron de 100 y 1100 ufc/l respectivamente (Figura 27c)

En Castilla La Mancha se obtuvieron 174 muestras de 6 puntos. Se encontró colonización por especies de *Legionella* spp. distinta a *L. pneumophila* en dos puntos (CM1a y CM3a) (Figura 27d) (Tabla 13).

En el resto de las comunidades autónomas estudiadas (Galicia, Cantabria, País Vasco, Navarra, Castilla-León, Aragón y Baleares) no se detectó colonización por *Legio-*

nella en el agua de consumo humano (Tabla 13).

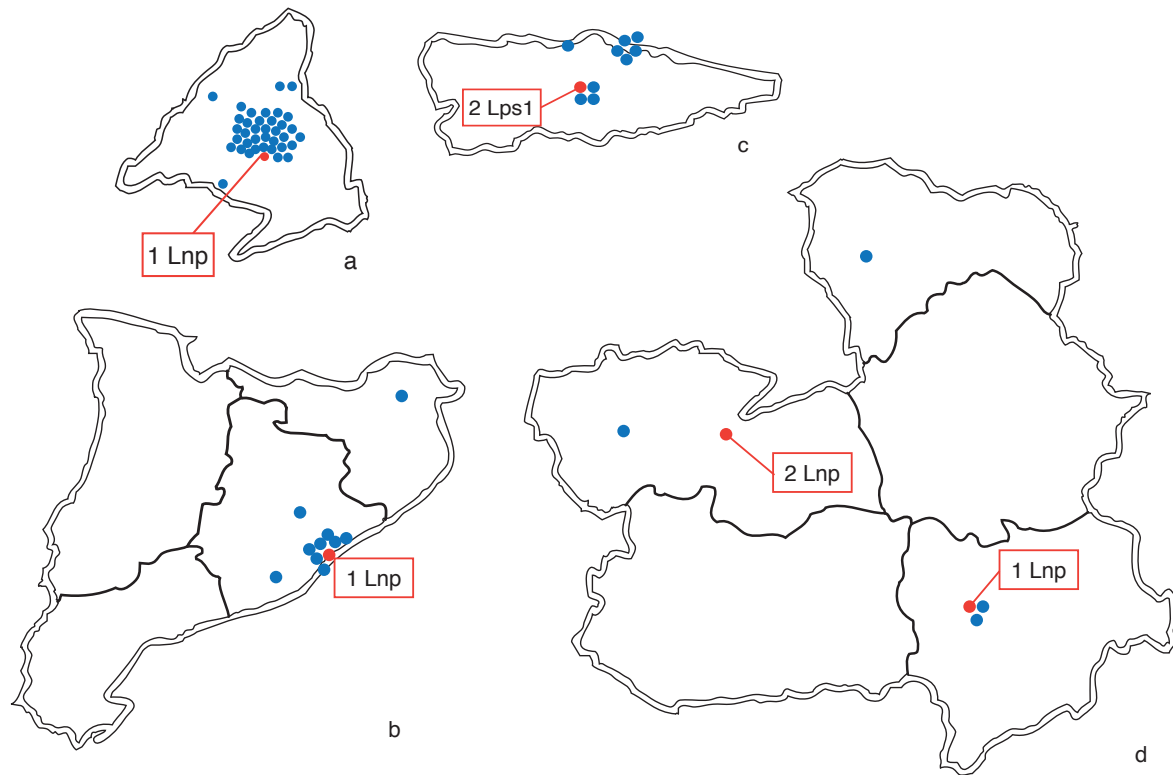


Figura 27. Distribución geográfica de los puntos analizados en la Comunidad de Madrid (a), Cataluña (b), Asturias (c) y Castilla La Mancha (d). ● Puntos no colonizados por *Legionella*. ● Puntos colonizados por *Legionella*. n Lps1, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1; n Lnp, número de aislamientos de especies distintas a *L. pneumophila*.

Tabla 13. Muestras totales analizadas, número de aislamientos y concentración (ufc/l) según especie y serogrupo de *Legionella* en el agua de consumo humano de Asturias, Castilla La Mancha, Cataluña, C. Madrid, Galicia, Cantabria, País Vasco, Castilla-León, Navarra, Aragón y Baleares.

Provincias	Nº cepas aisladas/ Nº muestras analizadas	Especie/serogrupo	Total cepas	Cuantificación (ufc/l)			
				<10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴
Asturias	2/290	<i>L. pneumophila</i> s.1	2	-	1	1	-
Castilla La Mancha	3/174	<i>Legionella no-pneumophila</i>	3	1	-	2	-
Cataluña	1/319	<i>Legionella no-pneumophila</i>	1	-	1	-	-
C. Madrid	1/1102	<i>Legionella no-pneumophila</i>	1	-	1	-	-
Galicia	0/174	-	-	-	-	-	-
Cantabria	0/29	-	-	-	-	-	-
País Vasco	0/116	-	-	-	-	-	-
Castilla-León	0/174	-	-	-	-	-	-
Navarra	0/58	-	-	-	-	-	-
Aragón	0/116	-	-	-	-	-	-
Baleares	0/87	-	-	-	-	-	-

4.2.2. Torres de refrigeración.

4.2.2.a. Andalucía.

Se analizaron muestras de todas las provincias excepto de Almería. Se estudiaron 50 torres de refrigeración ubicadas en 14 edificios (Málaga, 2 torres de refrigeración en 1 edificio; Sevilla, 19 torres de refrigeración en 5 edificios; Cádiz, 5 torres de refrigeración en 1 edificio; Jaén, 6 torres de refrigeración en 2 edificios; Granada, 7 torres de refrigeración en 2 edificios; Córdoba, 4 torres de refrigeración en 2 edificios; Huelva, 7 torres de refrigeración en 1 edificio).

De éstos, en 34 torres de refrigeración de 12 edificios se detectó colonización por *Legionella*, presentando todas las provincias investigadas al menos un edificio colonizado en algún momento del estudio (Figura 28).

Destaca que la mayoría, y en algunos casos la totalidad, de las torres de refrigera-

ción estudiadas de un mismo edificio estuvieron colonizadas por *Legionella*. Con la excepción del edificio A13t situado en Sevilla y el edificio A5t de Granada en los que se observó colonización de una de las 4 y 5 torres de refrigeración respectivamente (Anexo 2).

El total de muestras analizadas fue de 1800. Se detectaron 126 muestras positivas, en las que se aislaron 138 *Legionella*. Se obtuvieron 78 *L. pneumophila* serogrupo 1 (en todas las provincias excepto en Cádiz), 35 *L. pneumophila* serogrupo 2-14 (en Córdoba y Sevilla) y 23 *Legionella no-pneumophila* (en Jaén, Málaga, Sevilla, Cádiz y Huelva). No se obtuvo la identificación de especie de dos aislamientos de *Legionella* (Figura 29). En Cádiz sólo se aislaron especies distintas a *L. pneumophila*. Sevilla fue la única provincia en la que se identificaron *L. pneumophila* serogrupo 1, *L. pneumophila* serogrupo 2-14 y especies distintas a *L. pneumophila*. Destacan las 18 muestras donde se aisló *L. pneumophila* con recuento superior a 10^4 ufc/l (7 *L. pneumophila* serogrupo 1 y 11 *L. pneumophila* serogrupo 2-14) (Tabla 14).

Se obtuvo cultivo mixto en 12 muestras de Andalucía. La coexistencia de *L. pneumophila* serogrupo 1 y *L. pneumophila* serogrupo 2-14 se observó en 3 muestras, *L. pneumophila* serogrupo 1 y otras especies distintas a *L. pneumophila* se detectó en 8 muestras y *L. pneumophila* serogrupo 2-14 y otras especies distintas a *L. pneumophila* en 1 muestra.

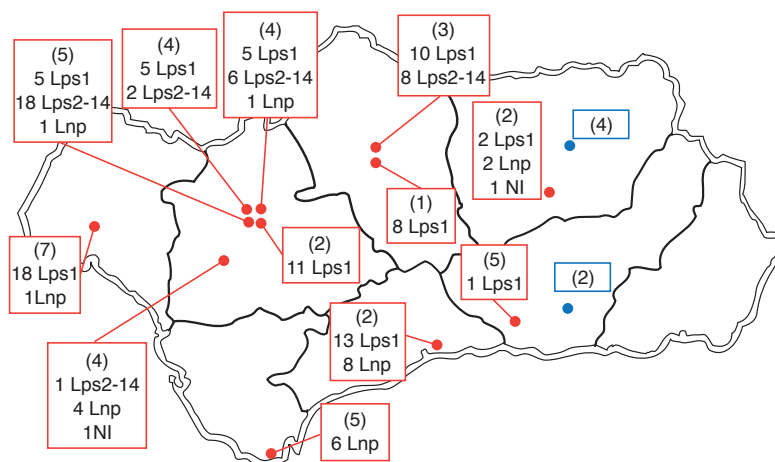


Figura 28. Distribución geográfica de los edificios analizados en Andalucía. ● Edificios no colonizados por *Legionella*. ● Edificios colonizados por *Legionella*. (N), torres de refrigeración analizadas por edificio. n Lps1, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1; n Lps2-14, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 2-14; n Lnp, número de aislamientos de especies distintas a *L. pneumophila*. n NI, número de aislamientos de *Legionella* no identificada.

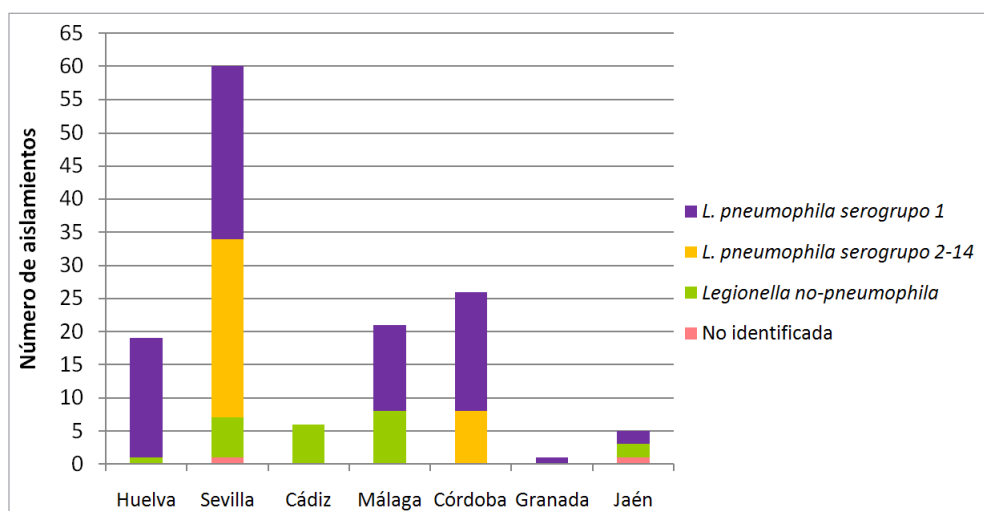


Figura 29. Distribución de especies y serogrupos de *Legionella* en las provincias de Andalucía.

Tabla 14. Muestras totales analizadas, número de aislamientos y concentración (ufc/l) según especie y serogrupo de *Legionella* en las torres de refrigeración de las provincias de Andalucía.

Provincias	Nº cepas aisladas/ Nº muestras analizadas	Especie/serogrupo	Total cepas	Cuantificación (ufc/l)			
				<10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴
Huelva	19/252	<i>L. pneumophila</i> s.1	18	5	9	2	2
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	1	-	1	-	-
Sevilla	60/684	<i>L. pneumophila</i> s.1	26	6	11	6	3
		<i>L. pneumophila</i> s. 2-14	27	3	12	5	7
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	6	3	1	2	-
		No identificada	1	-	-	1	-
Cádiz	6/180	<i>Legionella no-pneumophila</i>	6	-	2	4	-
Málaga	21/72	<i>L. pneumophila</i> s.1	13	2	9	2	-
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	8	4	4	-	-
Córdoba	26/144	<i>L. pneumophila</i> s.1	18	4	10	2	2
		<i>L. pneumophila</i> s. 2-14	8	-	3	1	4
Granada	1/252	<i>L. pneumophila</i> s.1	1	-	1	-	-
		<i>L. pneumophila</i> s.1	2	-	2	-	-
Jaén	5/216	<i>Legionella no-pneumophila</i>	2	-	2	-	-
		No identificada	1	-	-	1	-
Total	138/1800		138	27	67	26	18

4.2.2.b. Región de Murcia.

En la Región de Murcia se investigaron un total de 2 torres de refrigeración instaladas en 1 edificio situado en el centro de la ciudad de Murcia (MU1t). Las dos torres de refrigeración estuvieron colonizadas por *Legionella* durante el periodo de estudio (Figura 30).

Se analizaron un total de 72 muestras y 12 de ellas fueron positivas. *L. pneumophila* serogrupo 1 se detectó en las dos torres de refrigeración estudiadas en los mismos meses (noviembre y diciembre de 2007, enero, mayo, octubre y noviembre de 2008) (Anexo 2). Las concentraciones detectadas en ambas torres de refrigeración fueron similares, con un recuento máximo de 9000 ufc/l (Tabla 15).

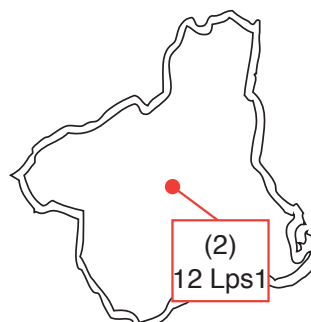


Figura 30. Distribución geográfica de los edificios analizados en la Región de Murcia. ● Edificios colonizados por *Legionella*. (N), torres de refrigeración analizadas por edificio. n Lps1, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1.

Tabla 15. Muestras totales analizadas, número de aislamientos y concentración (ufc/l) según especie y serogrupo de *Legionella* en las torres de refrigeración de la Región de Murcia.

Provincias	Nº cepas aisladas/ Nº muestras analizadas	Especie/serogrupo	Total cepas	Cuantificación (ufc/l)			
				<10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴
R. Murcia	12/72	<i>L. pneumophila</i> s.1	12	2	6	4	-
Total	12/72		12	2	6	4	-

4.2.2.c. Comunidad Valenciana.

Se analizaron 25 torres de refrigeración ubicadas en 6 edificios (Valencia, 20 torres de refrigeración en 4 edificios; Alicante, 5 torres de refrigeración en 2 edificios). De éstos, en 16 torres de refrigeración de 5 edificios se detectó colonización por *Legionella*, presentando las dos provincias investigadas al menos un edificio colonizado en el tiempo de estudio (Figura 31).

Se analizaron un total de 900 muestras y 27 fueron positivas. En ellas se aislaron 14 *L. pneumophila* serogrupo 1 y 13 *Legionella* no-*pneumophila* (Figura 32).

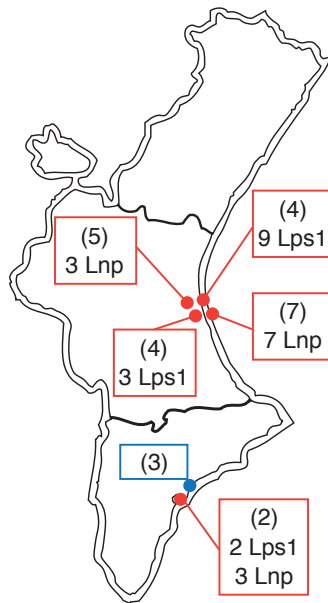


Figura 31. Distribución geográfica de los edificios analizados en la Comunidad Valenciana. ● Edificios no colonizados por *Legionella*. ● Edificios colonizados por *Legionella*. (N), torres de refrigeración analizadas por edificio. n Lps1, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1; n Lnp, número de aislamientos de especies distintas a *L. pneumophila*.

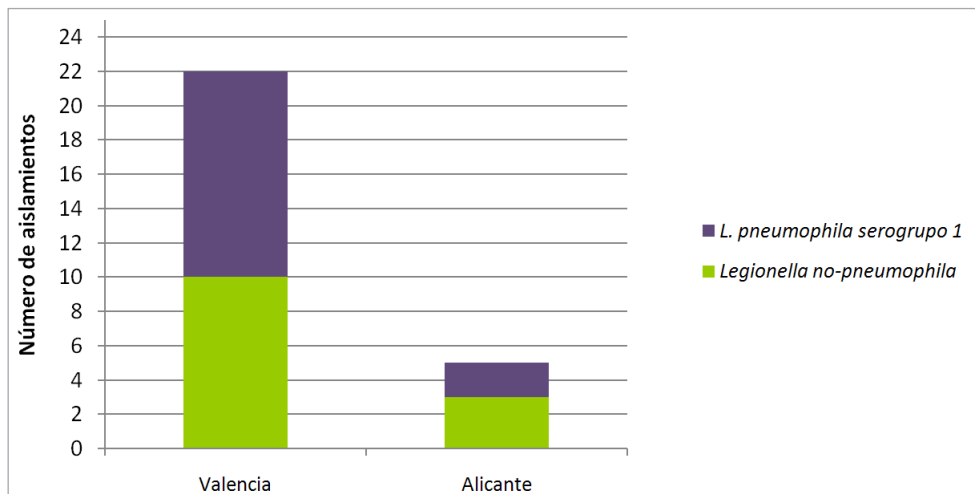


Figura 32. Distribución de especies y serogrupos de *Legionella* en las provincias de la Comunidad Valenciana.

Las torres de refrigeración de cada uno de los cuatro edificios de Valencia estaban colonizadas por una única especie de *Legionella* (V1t y V4t estuvieron colonizado por *L. pneumophila* serogrupo 1, y V1t y V2t colonizados por especies distintas a *L. pneumophila*). Destaca que en 10 de las 11 muestras con recuentos superiores a 10^3 ufc/l se aislaron especies de *Legionella* distinta a *L. pneumophila*. De ellas, ninguna muestra superó las 5000 ufc/l (Tabla 16).

Tabla 16. Muestras totales analizadas, número de aislamientos y concentración (ufc/l) según especie y serogrupo de *Legionella* en las torres de refrigeración de la C. Valenciana.

Provincias	Nº cepas aisladas/ Nº muestras analizadas	Especie/serogrupo	Total cepas	Cuantificación (ufc/l)			
				<10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴
Alicante	5/180	<i>L. pneumophila</i> s.1	2	1	1	-	-
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	3	-	1	2	-
Valencia	22/720	<i>L. pneumophila</i> s.1	12	2	9	1	-
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	10	-	2	8	-
Total	27/900		27	3	13	11	-

4.2.2.d. Baleares.

Se analizaron muestras tomadas de 11 torres de refrigeración distribuidas en 3 edificios de Mallorca (Figura 33). De éstos, en 2 edificios (IB1t e IB3t) se detectó colonización por *Legionella* en más de la mitad de sus torres de refrigeración, sumando un total de 7.

El total de muestras analizadas fue de 396. Las muestras positivas fueron 29, en las que se aislaron 35 *Legionella*. Se obtuvieron 8 *L. pneumophila* serogrupo 1, 23 *L. pneumophila* serogrupo 2-14 y 4 *Legionella no-pneumophila*. Sólo 7 de las 29 muestras positivas superaron recuentos de 10^3 ufc/l (Tabla 17). En el edificio IBt3 se detectaron 6 muestras con cultivo mixto. La coexistencia de *L. pneumophila* serogrupo 1 y *L. pneumophila* serogrupo 2-14 se observó en 2 muestras y *L. pneumophila* serogrupo 1 y otras especies distintas a *L. pneumophila* en 4 muestras (Anexo 2).

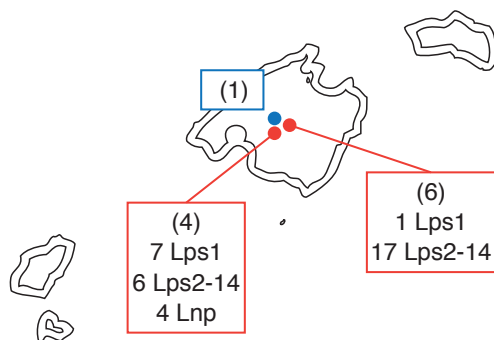


Figura 33. Distribución geográfica de los edificios analizados en Baleares. ● Edificios no colonizados por *Legionella*. ● Edificios colonizados por *Legionella*. (N), torres de refrigeración analizadas por edificio. n Lps1, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1; n Lps2-14, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 2-14; n Lnp, número de aislamientos de especies distintas a *L. pneumophila*.

Tabla 17. Muestras totales analizadas, número de aislamientos y concentración (ufc/l) según especie y serogrupo de *Legionella* en las torres de refrigeración de Baleares.

Provincias	Nº cepas aisladas/ Nº muestras analizadas	Especie/serogrupo	Total cepas	Cuantificación (ufc/l)			
				<10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴
Mallorca	35/396	<i>L. pneumophila</i> s.1	8	1	6	1	-
		<i>L. pneumophila</i> s.2-14	23	3	18	2	-
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	4	-	-	1	3
Total	35/396		35	4	24	4	3

4.2.2.e. Cataluña.

Se investigaron 30 torres de refrigeración ubicadas en 7 edificios (Barcelona, 25 torres de refrigeración en 6 edificios; Gerona, 5 torres de refrigeración en 1 edificio). Se detectó colonización por *Legionella* en 9 torres de refrigeración de 4 edificios, presentando las dos provincias investigadas como mínimo un edificio colonizado a lo largo del estudio (Figura 34). En los edificios de Barcelona se detectó colonización por *Legionella* únicamente en una o dos torres de refrigeración de cada uno de los edificios. Sin embargo, todas las torres de refrigeración ubicadas en el edificio CT7t

de Gerona estuvieron colonizadas.

Del total de las 1080 muestras analizadas, 20 fueron positivas. En ellas se aislaron 20 *Legionella* que se identificaron como 12 *L. pneumophila* serogrupo 1, 2 *L. pneumophila* serogrupo 2-14 y 4 *Legionella no-pneumophila*. No se obtuvo la identificación de especie de dos aislamientos de *Legionella* spp. La figura 35 muestra las especies y serogrupos de *Legionella* por provincia.

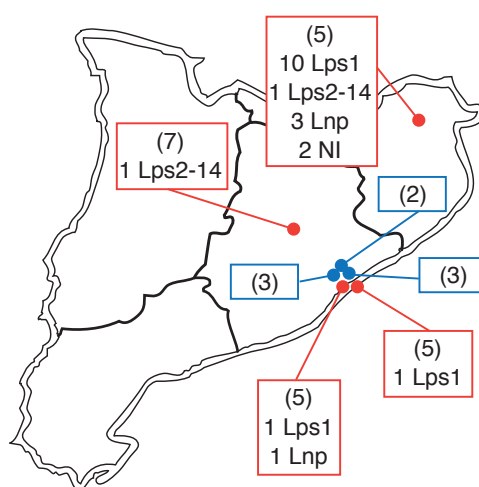


Figura 34. Distribución geográfica de los edificios analizados en Cataluña. ● Edificios no colonizados por *Legionella*. ● Edificios colonizados por *Legionella*. (N), torres de refrigeración analizadas por edificio. n Lps1, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1; n Lps2-14, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 2-14; n Lnp, número de aislamientos de especies distintas a *L. pneumophila*. n NI, número de aislamientos de *Legionella* no identificada.

Sólo en 2 de las 20 muestras positivas se observaron recuentos superiores a 10^3 ufc/l (Tabla 18). Las dos muestras se tomaron del edificio analizado en Gerona (CT7t). Se debe señalar que la concentración máxima alcanzada en las torres de refrigeración de los edificios de la provincia de Barcelona fue de 200 ufc/l (Anexo 2).

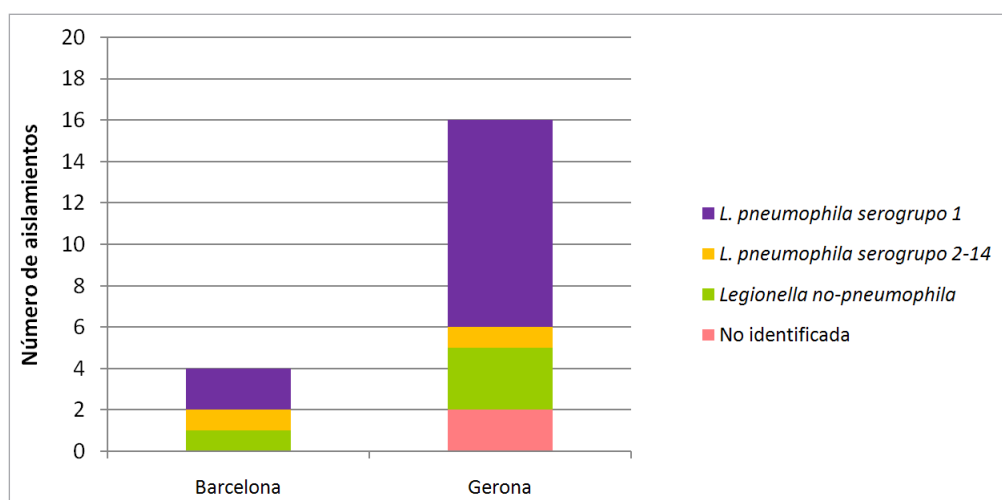


Figura 35. Distribución de especies y serogrupos de *Legionella* en las provincias de Cataluña.

Tabla 18. Muestras totales analizadas, número de aislamientos y concentración (ufc/l) según especie y serogrupo de *Legionella* en las torres de refrigeración de Cataluña.

Provincias	Nº cepas aisladas/ Nº muestras analizadas	Especie/serogrupo	Total cepas	Cuantificación (ufc/l)			
				<10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴
Barcelona	4/900	<i>L. pneumophila</i> s.1	2	1	1	-	-
		<i>L. pneumophila</i> s. 2-14	1	1	-	-	
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	1	1	-	-	
Gerona	16/180	<i>L. pneumophila</i> s.1	10	3	6	-	1
		<i>L. pneumophila</i> s. 2-14	1	-	-	1	-
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	3	-	3	-	-
		No identificada	2	2	-	-	-
Total	20/1080		20	8	10	1	1

4.2.2.f. Aragón.

Se estudiaron 15 torres de refrigeración situadas en 3 edificios de Zaragoza. Se detectó colonización por *Legionella* en 13 torres de refrigeración distribuidas en los 3 edificios investigados (Figura 36).

Se analizaron un total 540 muestras y 42 fueron positivas. Se aislaron 44 *Legionella*, 10 *L. pneumophila* serogrupo 1, 4 *L. pneumophila* serogrupo 2-14 y 30 *Legionella* no-*pneumophila*. En uno de los edificios (AR3t) sólo se observaron especies distintas a *L. pneumophila*. Destacaron las 16 muestras en las que se aisló especies distintas a *L. pneumophila* con recuentos superiores a 10^3 ufc/l (Tabla 19). En dos muestras recogidas del edificio AR1t (junio y agosto de 2008) se obtuvo cultivo mixto (*L. pneumophila* serogrupo 1 y *Legionella* spp. distinta a *L. pneumophila*) (Anexo 2).

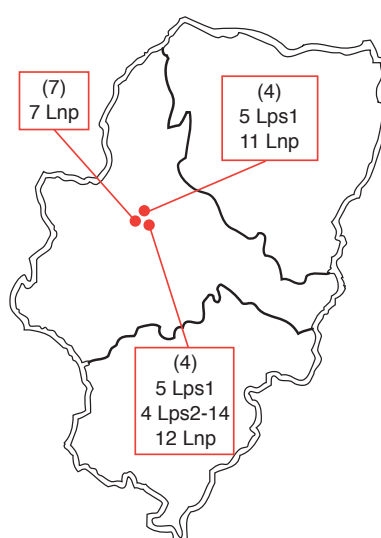


Figura 36. Distribución geográfica de los edificios analizados en Aragón. ● Edificios colonizados por *Legionella*. (N), torres de refrigeración analizadas por edificio. n Lps1, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1; n Lps2-14, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 2-14; n Lnp, número de aislamientos de especies distintas a *L. pneumophila*.

Tabla 19. Muestras totales analizadas, número de aislamientos y concentración (ufc/l) según especie y serogrupo de *Legionella* en las torres de refrigeración de Aragón.

Provincias	Nº cepas aisladas/ Nº muestras analizadas	Especie/serogrupo	Total cepas	Cuantificación (ufc/l)			
				<10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴
Zaragoza	44/540	<i>L. pneumophila</i> s.1	10	-	6	1	3
		<i>L. pneumophila</i> s.2-14	4	-	2	1	1
		<i>Legionella</i> no- <i>pneumophila</i>	30*	1	6	13	3
Total	44/540		44	1	14	15	7

*No se dispone de la cuantificación de 7 aislamientos obtenidos en Aragón al no registrarse el recuento durante el análisis.

4.2.2.g. Comunidad de Madrid.

En la Comunidad de Madrid se muestrearon un total de 105 torres de refrigeración instaladas en 29 edificios. Se detectó colonización por *Legionella* en 25 torres de refrigeración distribuidas en 10 edificios. De éstos, 5 estaban en el centro de la ciudad (M3t, M5t, M6t, M9t y M13t), 1 en los alrededores de la ciudad (M16t) y 4 en distintas poblaciones estudiadas (M23t, M24t, M25t y M29t) (Figura 37).

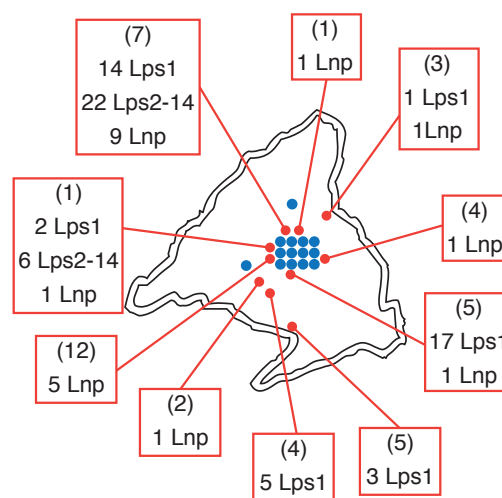


Figura 37. Distribución geográfica de los edificios analizados en la Comunidad de Madrid. ● Edificios no colonizados por *Legionella*. ● Edificios colonizados por *Legionella*. (N), torres de refrigeración analizadas por edificio. n Lps1, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1; n Lps2-14, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 2-14; n Lnp, número de aislamientos de especies distintas a *L. pneumophila*.

Se analizaron un total de 3780 muestras. De ellas, 90 fueron positivas (2.4%). Se aislaron 42 *L. pneumophila* serogrupo 1, 28 *L. pneumophila* serogrupo 2-14 y 20 *Legionella no-pneumophila*. En 49 muestras (54.4%) el recuento bacteriano fue superior a 10^3 ufc/l, como indica la tabla 20. Destaca que 16 de las 20 muestras en las que se aislaron especies distintas a *L. pneumophila* presentaron recuento superior a 10^3 ufc/l. Ninguna muestra presentó cultivo mixto.

Tabla 20. Muestras totales analizadas, número de aislamientos y concentración (ufc/l) según especie y serogrupo de *Legionella* en las torres de refrigeración de la Comunidad de Madrid.

Provincias	Nº cepas aisladas/ Nº muestras analizadas	Especie/serogrupo	Total cepas	Cuantificación (ufc/l)			
				<10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴
C. Madrid	90/3780	<i>L. pneumophila</i> s.1	42	8	12	18	4
		<i>L. pneumophila</i> s.2-14	28	3	14	9	2
		<i>Legionella no-pneumophila</i>	20	2	2	13	3
Total	90/3780		90	13	28	40	9

4.2.2.h. Galicia.

Un total de 612 muestras recogidas de 17 torres de refrigeración ubicadas en 3 edificios fueron analizadas. De ellas, 4 torres de refrigeración situadas en dos edificios (G2t y G3t) presentaron colonización por *Legionella* (Figura 38).

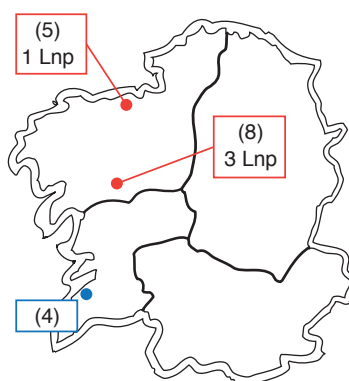


Figura 38. Distribución geográfica de los edificios analizados en Galicia. ● Edificios no colonizados por *Legionella*. ● Edificios colonizados por *Legionella*. (N), torres de refrigeración analizadas por edificio. n Lnp, número de aislamientos de especies distintas a *L. pneumophila*.

Cuatro muestras, recogidas en agosto de 2008, fueron positivas. Se aisló *Legionella no-pneumophila* en todas las muestras y los recuentos bacterianos fueron inferiores a 400 ufc/l (Tabla 21).

Tabla 21. Muestras totales analizadas, número de aislamientos y concentración (ufc/l) según especie y serogrupo de *Legionella* en las torres de refrigeración de Galicia.

Provincias	Nº cepas aisladas/ Nº muestras analizadas	Especie/serogrupo	Total cepas	Cuantificación (ufc/l)			
				<10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴
La Coruña	4/468	<i>Legionella no-pneumophila</i>	4	1	3	-	-
Pontevedra	0/144	-	-	-	-	-	-
Total	4/612		4	1	3	-	-

4.2.2.i. Otras comunidades autónomas.

En Navarra se investigaron 5 torres de refrigeración ubicadas en un único edificio (Figura 39a). Se analizaron un total de 180 muestras. Sólo una de estas muestras fue positiva (junio de 2006) con aislamiento de *L. pneumophila* serogrupo 1 y un recuento de 2100 ufc/l (Tabla 22).

En Extremadura se tomaron muestras de agua de un total de 7 torres de refrigeración instaladas en dos edificios de Badajoz (Figura 39b). Se detectó colonización por *Legionella* en 2 torres de refrigeración de uno de los edificios (E1t). Se analizaron un total de 252 muestras de las que dos fueron positivas (marzo de 2007) con aislamiento de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 con un recuento superior a 10⁴ ufc/l (Tabla 22).

En Cantabria, al igual que en Navarra, se analizaron 5 torres de refrigeración instaladas en un edificio. Se obtuvo un único aislamiento de *L. pneumophila* serogrupo 1 (septiembre de 2006) con recuento muy bajo (150 ufc/l) (Figura 39c) (Tabla 22).

En Castilla La Mancha se estudió una sola torre de refrigeración. Una de las 36 muestras analizadas presentó *Legionella no-pneumophila* con recuento inferior a 10³ ufc/l (junio de 2006) (Figura 39d) (Tabla 22).

En el resto de las comunidades autónomas estudiadas (Asturias, País Vasco y Castilla-León) no se detectó colonización por *Legionella* en el agua de torres de refrigeración (Tabla 22).

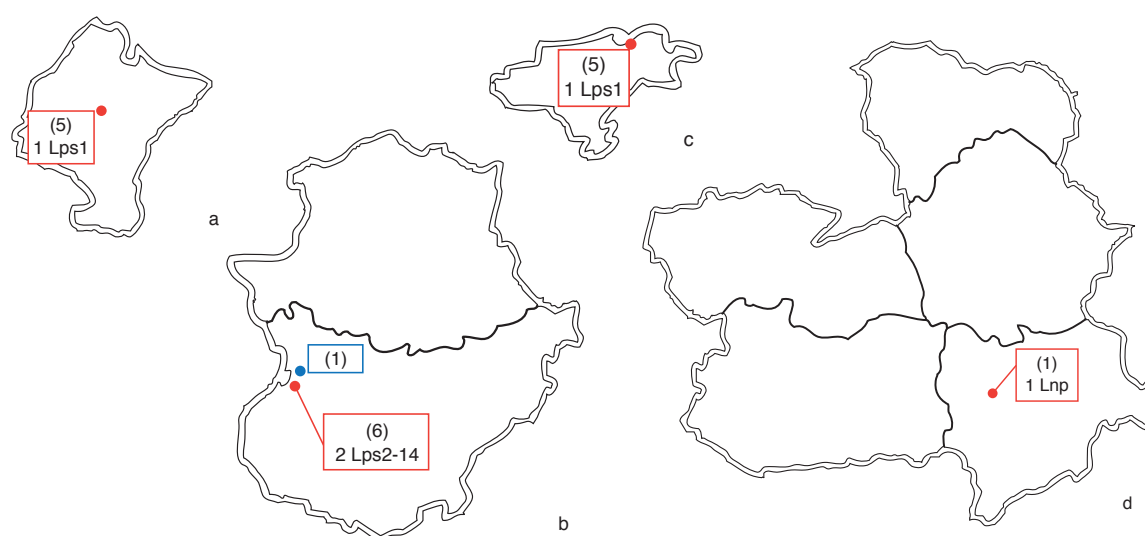


Figura 39. Distribución geográfica de los edificios analizados en Navarra (a), Extremadura (b), Cantabria (c) y Castilla La Mancha (d). ● Edificios no colonizados por *Legionella*. ● Edificios colonizados por *Legionella*. (N), torres de refrigeración analizadas por edificio. n Lps1, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 1; n Lps2-14, número de aislamientos de *L. pneumophila* serogrupo 2-14; n Lnp, número de aislamientos de especies distintas a *L. pneumophila*.

Tabla 22. Muestras totales analizadas, número de aislamientos y concentración (ufc/l) según especie y serogrupo de *Legionella* en el agua de torres de refrigeración de Cantabria, Castilla La Mancha, Extremadura, Navarra, País Vasco, Castilla-León y Asturias.

Provincias	Nº cepas aisladas/ Nº muestras analizadas	Especie/serogrupo	Total cepas	Cuantificación (ufc/l)			
				<10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	>10 ⁴
Cantabria	1/180	<i>L. pneumophila</i> s.1	1	-	1	-	-
Castilla La Mancha	1/36	<i>Legionella no-pneumophila</i>	1	-	1	-	-
Extremadura	2/252	<i>L. pneumophila</i> s.2-14	2	-	-	-	2
Navarra	1/180	<i>L. pneumophila</i> s.1	1	-	-	1	-
País Vasco	0/468	-	-	-	-	-	-
Castilla-León	0/540	-	-	-	-	-	-
Asturias	0/288	-	-	-	-	-	-

4.3. Variabilidad genética de las cepas ambientales.

La tipificación molecular se realizó a 179 cepas de *Legionella* aisladas en los años 2007 y 2008. Ocho cepas aisladas en el agua de consumo humano y 68 cepas aisladas en torres de refrigeración no se analizaron molecularmente por problemas en la recuperación de las cepas tras la congelación.

En este trabajo se definió “persistencia” como la observación del mismo patrón molecular en dos o más muestras recogidas en el mismo punto de agua de consumo humano o en la misma torre de refrigeración en momentos diferentes del estudio, o bien muestras obtenidas de distintos puntos de agua de consumo humano abastecidos por la misma red de distribución.

4.3.1. Agua de consumo humano.

La tipificación molecular se realizó a 26 cepas (13 *L. pneumophila* serogrupo 1, 1 *L. pneumophila* serogrupo 2-14 y 12 *Legionella no-pneumophila*) aisladas en muestras de agua de consumo humano recogidas de 14 puntos de muestreo. Se detectaron un total de 7 patrones moleculares distintos (AA-AG). Los patrones electroforéticos se muestran en la figura 40.

Las 13 cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1 presentaron el mismo patrón molecular (AA), como ilustra la figura 40, a pesar de proceder de puntos de muestreo situados en comunidades autónomas y áreas geográficas diferentes. Así, estas cepas se aislaron en dos puntos de la Región de Murcia (MU1a y MU3a), en dos puntos de la C. Valenciana (V1a y V2a) y en un punto de Andalucía (A1a) (Figura 41).

La red de distribución municipal que suministra agua a los puntos MU1a y MU3a es distinta, a pesar de su proximidad (10 Km). En ambos puntos de muestreo se detectó *Legionella* serogrupo 1 en meses diferentes (marzo y agosto de 2007 en MU1a, y Agosto y Septiembre de 2007 en MU3a). El perfil molecular observado fue el mismo, por lo que se comprobó la persistencia de *L. pneumophila* serogrupo 1 en ambos puntos (Tabla 23).

Los puntos V1a (Alicante) y V2a (Petrer) se abastecieron por la misma red de distribución (C.Valenciana I) aunque están separados 40 Km. En ambos puntos se detectó *L. pneumophila* serogrupo 1 con patrón molecular AA en varias muestras. Así, se confirmó la persistencia de *L. pneumophila* serogrupo 1 en dicha red de distribución en distintos meses en el periodo comprendido desde abril a diciembre de 2007 con recuentos elevados en 5 de las 8 muestras (Anexo 1). Por otro lado, en el punto V3a (Alicante) sólo se detectó la presencia de *Legionella no-pneumophila* en una única muestra recogida en agosto de 2007 con recuento de 1500 ufc/l y patrón molecular AE, aunque este punto se abasteció por la misma red de distribución (C.Valenciana I) (Tabla 23).

Finalmente, también se detectó el patrón molecular AA en una cepa de *L. pneumophila* serogrupo 1 aislada en el punto A1a, localizado en Dos Hermanas (Sevilla). En cambio, en el punto A8a (San Juan de Aznalfarache), situado a poco más de 15 Km del punto A1a y abastecido por la misma red de distribución (Andalucía I), se aisló una cepa de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 (L.p 2-14.1) en enero de 2007 cuyo patrón molecular (AG) se observa en la figura 40.

Entre los 12 aislados de *Legionella no-pneumophila* se encontraron 5 patrones moleculares distintos (AB-AF), como se aprecia en la figura 40. Diez de estas cepas se aislaron en Andalucía (A2a, A3a, A4a, A5a, A6a y A7a), una en la C. Valenciana (V3a) y otra en Castilla La Mancha (CM1a) (Figura 41).

Tres cepas procedentes de 3 puntos de muestreo de Andalucía (A3a, A4a, A5a) presentaron el mismo perfil de bandas (AC). Dos de estos puntos (Aa3 y A4a) estuvieron situados en la misma ciudad (Marbella) y se abastecieron de la misma red de agua potable. El otro punto (A5a) se localizó en otra ciudad diferente (Jerez de la Frontera) y recibió agua de otra red de distribución. De forma sorprendente, este mismo patrón molecular también lo mostró la cepa (Ln-p10) aislada en un punto de Castilla La Mancha (CM1a) (Figura 40).

Los patrones AB y AD (Figura 41) se presentaron, cada uno de ellos, en 3 cepas

aisladas, en momentos diferentes, de los mismos puntos de muestreo de Andalucía (A2a y A6a). El perfil AB persistió en los meses de enero, marzo y mayo de 2007 en el punto A2a y el perfil AD se detectó en abril, octubre y diciembre del mismo año en el punto A6a (Tabla 23).

Como se ha comentado anteriormente, en el punto V3a de la Comunidad Valenciana se aisló *Legionella no-pneumophila* en una única muestra a la que se le asignó el patrón molecular AE (Tabla 23). Por último, el patrón molecular AF se asoció a una única cepa de *Legionella no-pneumophila* aislada en enero de 2008 en Jaén en el punto A7a (Tabla 23).

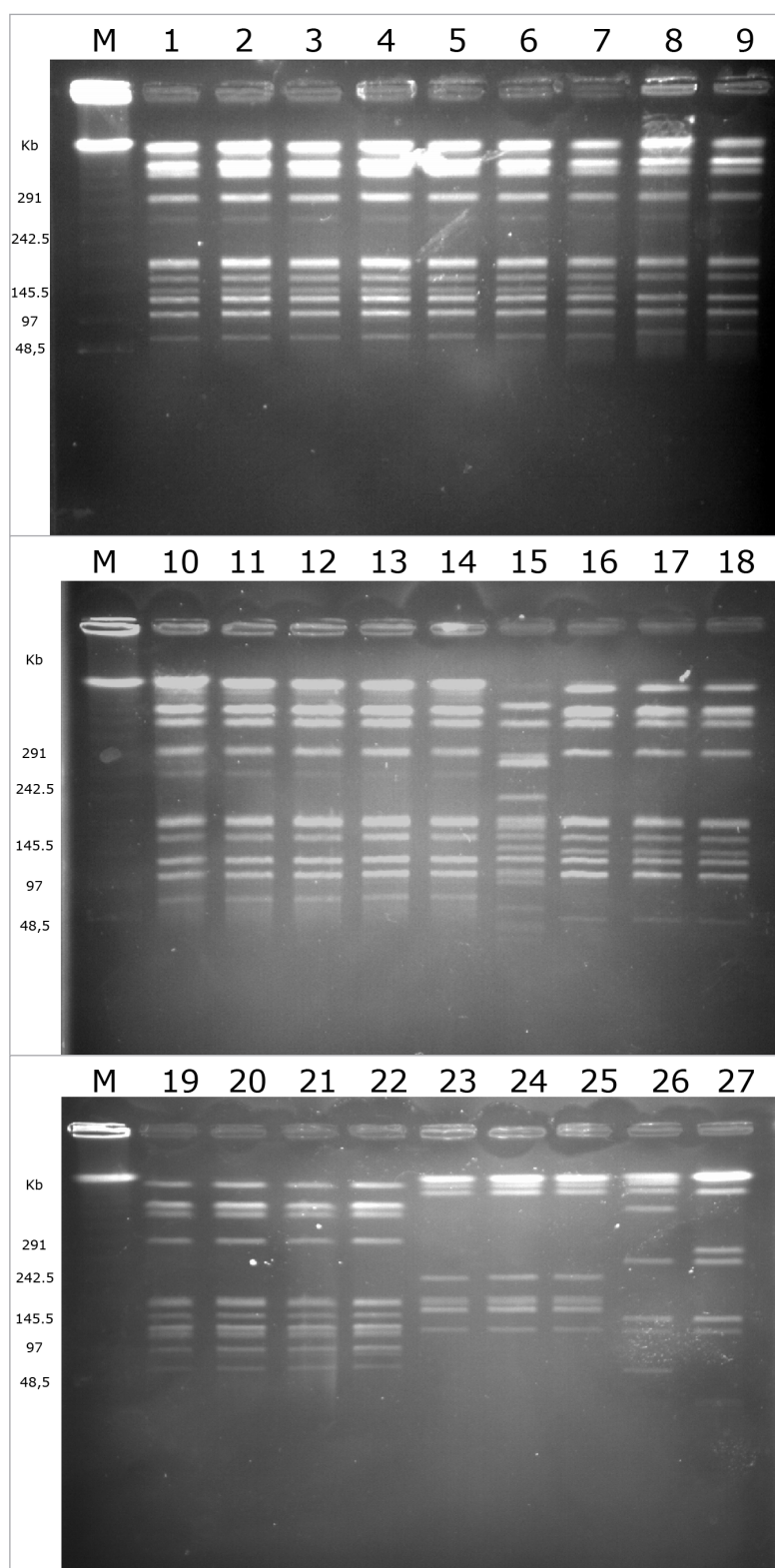


Figura 40. Patrones moleculares de cada una de las cepas de *Legionella*. aisladas en muestras de agua de consumo humano detectados mediante PFGE. Calles 1-14, *L. pneumophila* serogrupo 1 (cepas Lp 1.1-Lp 1.13); calle 15, *L. pneumophila* serogrupo 2-14 (cepa Lp 2-14.1); calles 16-27, *Legionella* no-*pneumophila* (cepas Ln-p1-Ln-p12); calles M, marcador de peso molecular concatámeros del fago λ .

Tabla 23. Patrones moleculares detectados de cada una de las cepas de *Legionella* aisladas en agua de consumo humano, redes de distribución y puntos de muestreo.

Patrón molecular	Red de distribución	Puntos de muestreo	Especies y serogrupos	Cepa	Mes de aislamiento	Calles de la figura 40
AA	Murcia I	MU1a	Lps1	L.p 1.1	Marzo 07	1
		MU1a	Lps1	L.p 1.2	Agosto 07	2
	Murcia II	MU3a	Lps1	L.p 1.3	Agosto 07	3
		MU3a	Lps1	L.p 1.4	Septiembre 07	4
	C.Valenciana I	V1a	Lps1	L.p 1.5	Abril 07	5
		V1a	Lps1	L.p 1.6	Mayo 07	6
		V1a	Lps1	L.p 1.7	Junio 07	7
		V1a	Lps1	L.p 1.8	Septiembre 07	8
		V2a	Lps1	L.p 1.9	Septiembre 07	9/10
		V2a	Lps1	L.p 1.10	Octubre 07	11
		V2a	Lps1	L.p 1.11	Noviembre 07	12
	Andalucía I	V2a	Lps1	L.p 1.12	Diciembre 07	13
		A1a	Lps1	L.p 1.13	Mayo 08	14
AB	Andalucía II	A2a	Lnp	L. n-p1	Enero 07	16
		A2a	Lnp	L. n-p2	Marzo 07	17
		A2a	Lnp	L. n-p3	Mayo 07	18
AC	Andalucía III	A3a	Lnp	L. n-p4	Abril 07	19
		A4a	Lnp	L. n-p5	Noviembre 07	20
AD	Andalucía IV	A5a	Lnp	L. n-p6	Noviembre 07	21
		A6a	Lnp	L. n-p7	Abril 07	23
		A6a	Lnp	L. n-p8	Octubre 07	24
AD	Andalucía V	A6a	Lnp	L. n-p9	Diciembre 07	25
		AC	Castilla La Mancha I	CM1a	Lnp	L. n-p10
AE	C.Valenciana I	V3a	Lnp	L. n-p11	Agosto 07	26
AF	Andalucía VI	A7a	Lnp	L. n-p12	Enero 08	27
AG	Andalucía I	A8a	Lps2-14	L.p 2-14.1	Enero 07	15

Lps1, *L. pneumophila* serogrupo 1; Lps2-14, *L. pneumophila* serogrupo 2-14; Lnp, *Legionella* no-*pneumophila*.

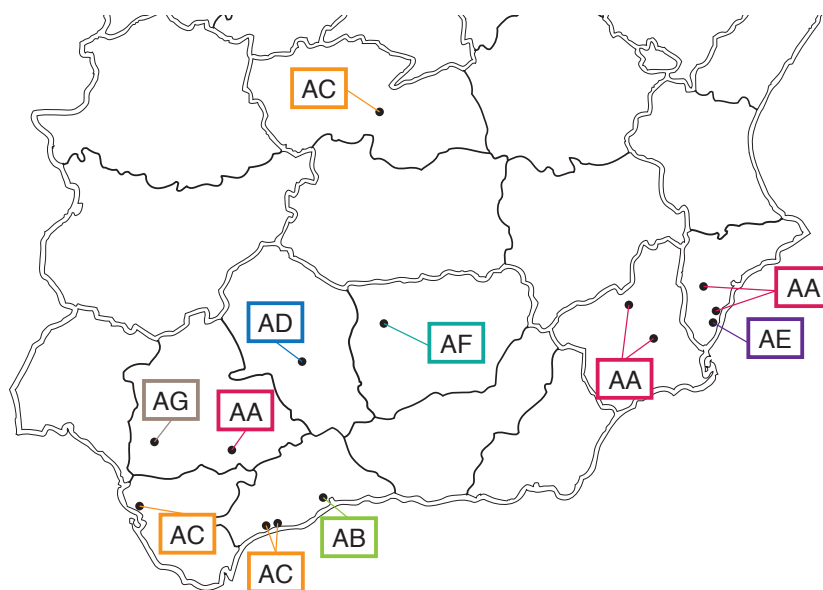


Figura 41. Distribución geográfica de los patrones moleculares detectados en agua de consumo humano.

4.3.2. Torres de refrigeración.

La tipificación molecular se realizó a 153 cepas aisladas en el agua de 55 torres de refrigeración situadas en 21 edificios. De las cepas analizadas, 86 fueron *L. pneumophila* serogrupo 1, 41 *L. pneumophila* serogrupo 2-14 y 26 *Legionella no-pneumophila*. Se observaron un total de 28 patrones moleculares distintos (TA-TZ) (Figuras 42, 43, 44).

El 78.2% de las torres de refrigeración (43 torres) presentaron un único patrón molecular durante el periodo estudiado, el 9% (5 torres) presentaron dos patrones moleculares y el 12.8% (7 torres) tres patrones moleculares distintos (Anexo 2).

Las 86 cepas tipificadas de *L. pneumophila* serogrupo 1 presentaron 12 patrones moleculares diferentes (TA-TL), como se observa en la figura 42. Estas cepas se aislaron en Andalucía, en Cataluña, en la Comunidad de Madrid, en Baleares y en la Región de Murcia.

El patrón molecular TD fue el más frecuente y se detectó en todas las comunidades autónomas en las que se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1. Fue el perfil molecular de

42 cepas aisladas en 17 torres de refrigeración situadas en 8 edificios distintos ubicados en Andalucía (3 edificios), en Cataluña (1 edificio), en la Comunidad de Madrid (1 edificio), en Baleares (2 edificios) y en la Región de Murcia (1 edificio) (Tabla 24).

En Andalucía se observaron 7 patrones moleculares diferentes (TA-TG) en 6 edificios (Tabla 24). El patrón molecular TA se detectó en una única muestra recogida en el punto A2t (Córdoba) en octubre de 2007. En la misma torre de refrigeración se observó un patrón molecular diferente (TB) en tres cepas aisladas en marzo, julio y agosto del año 2008. De este modo, se confirmó la persistencia de *L. pneumophila* serogrupo 1 con el perfil TB en dicho edificio. En el punto A3t, localizado también en Córdoba y abastecido por la misma red de agua potable que el punto A2t (Andalucía V), se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1 y serogrupo 2-14 en las tres torres de refrigeración analizadas durante el periodo de estudio. Aunque sólo se realizó la tipificación molecular de una de las cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1, el perfil de bandas observado fue diferente (TC).

El patrón molecular TD se observó en tres edificios de Andalucía (A6t, A9t y A11t). La red de distribución municipal que suministró agua a estos edificios fue distinta. En los edificios A6t (Huelva) y A11t (Sevilla) de Andalucía, se analizaron 7 y 2 torres de refrigeración respectivamente. En todas se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1 con patrón molecular TD en varias muestras recogidas de la misma torre de refrigeración en distintos meses, por lo que se comprobó la persistencia de *L. pneumophila* serogrupo 1 en ambos edificios a lo largo del estudio (Tabla 24). Este mismo patrón TD se detectó en una única muestra (agosto de 2008) recogida de una de las dos torres de refrigeración analizadas en el edificio A9t de Málaga. En las dos torres de refrigeración (T1 y T2) de este mismo edificio también se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1 con el perfil molecular denominado TE en varias muestras obtenidas desde abril a noviembre de 2008. Así que coexistieron cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1 con perfiles de bandas distintos en muestras recogidas en meses diferentes. El patrón TD se detectó en una de las torres de refrigeración (T1) en la muestra analizada en agosto de 2008, tal como se ha comentado anteriormente y un nuevo patrón, TF, en

la otra torre de refrigeración (T2) en octubre de 2008. Asimismo, en ambas torres de refrigeración, junto a *L. pneumophila* serogrupo 1, se aislaron cepas de *Legionella* no-*pneumophila* en muestras recogidas en diferentes meses con un mismo patrón molecular (TS).

En el edificio A12t (Sevilla) se observó el patrón molecular TG en una única muestra recogida en abril de 2008.

En Cataluña se detectaron 2 patrones diferentes (TD y TH) en el edificio CT7t (Gerona). Las 5 torres de refrigeración analizadas en este edificio estuvieron colonizadas por *L. pneumophila* serogrupo 1 en algún momento de la investigación. El patrón molecular TD se observó en una de las torres de refrigeración (T4) en agosto y octubre de 2007. Un perfil diferente, TH, se observó en tres de las torres de refrigeración (T1-T3) del mismo edificio durante los meses de verano del año 2007 y 2008. Tanto el perfil molecular TD como en TH persistieron en el edificio CT7t (Tabla 24). La cepa obtenida de la quinta torre de refrigeración (T5) no fue tipificada.

En la Comunidad de Madrid se observaron 5 patrones diferentes (TD, TI-TL) en 5 edificios. En el edificio M24t (Leganés) se estudiaron 4 torres de refrigeración diferentes y en tres de ellas se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1 con patrón TD. Este patrón se mantuvo en dos muestras recogidas en los meses de agosto y octubre de 2007 en una de las torres (T1). En las otras dos torres de refrigeración (T2 y T3) no se pudo comprobar la persistencia de la cepa porque sólo se realizó la tipificación molecular a un aislamiento. Este edificio fue el único de la Comunidad de Madrid que presentó el patrón molecular TD (Tabla 24). El patrón molecular TK se observó en las cinco torres de refrigeración analizadas en el edificio M3t en varias muestras recogidas durante el año 2008. En el edificio M13t se estudiaron 7 torres de refrigeración. En cuatro de ellas se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1 en varios meses. Se observó el patrón molecular TJ en tres de las cuatro torres de refrigeración (T5-T7) en junio y octubre del año 2008. La cepa aislada de la torre de refrigeración T3 no se analizó molecularmente. Los edificios M25t y M16t presentaron los patrones moleculares TI

y TL de *L. pneumophila* serogrupo 1 en una única muestra recogida en junio de 2007 y septiembre de 2008 respectivamente.

En Baleares se detectó *L. pneumophila* serogrupo 1 con patrón molecular TD en varias muestras recogidas de las torres de refrigeración de los edificios IB1t y IB3t (Tabla 24). Ambos edificios recibieron agua de la misma red de distribución.

En Murcia se estudiaron dos torres de refrigeración situadas en el mismo edificio (MU1t). En ambas se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1 con patrón molecular TD en las muestras analizadas en octubre y diciembre de 2007 y en enero, mayo, octubre y noviembre de 2008 (Tabla 24).

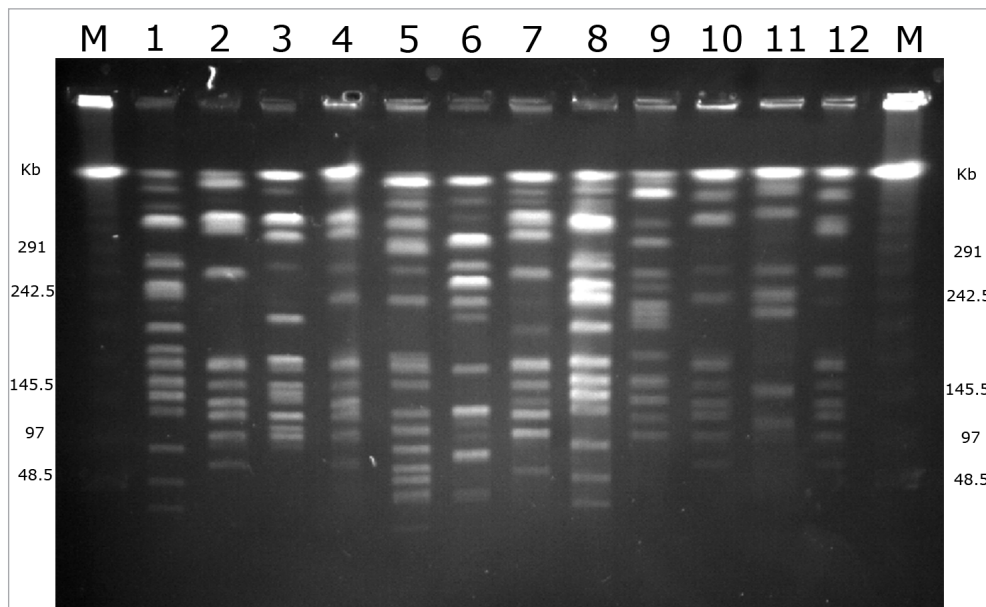


Figura 42 . Patrones moleculares de *L. pneumophila* serogrupo 1 detectados mediante PFGE en torres de refrigeración. Calle 1-12, patrón molecular TA-TL; calles M, marcador de peso molecular concatámeros del fago λ .

Por tanto, entre las distintas comunidades autónomas se observa que en Andalucía aparecieron 7 patrones moleculares diferentes de *L. pneumophila* serogrupo 1 (TA-TG), en la Comunidad de Madrid 5 patrones distintos (TD, TI-TL), en Cataluña dos patrones (TD y TH) y en la Región de Murcia y Baleares sólo un patrón (TD) (Tabla 24).

Tabla 24 . Patrones moleculares de *L. pneumophila* serogrupo 1 detectados en torres de refrigeración por comunidad autónoma y mes de detección.

Comunidad autónoma	Ciudad	Edificio muestreo	Mes y año de aislamiento																								
			E07	F07	M07	A07	J07	J07	A07	S07	O07	N07	D07	E08	F08	M08	A08	M08	J08	J08	A08	S08	O08	N08	D08		
ANDALUCÍA	Córdoba	A2t																									
		A3t																									
	Huelva	A6t																									
		A9t																									
Málaga	A11t																										
	A12t																										
CATALUÑA	Gerona	C7t																									
		M3t																									
	Madrid	M13t																									
		M16t																									
C. MADRID	Leganés	M24t																									
		M25t																									
	Valdemoro	IB1t																									
		IB3t																									
	MU1t																										
BALEARES	Mallorca	IB3t																									
		MU1t																									
R. MURCIA	Murcia	MU1t																									
		MU1t																									

Entre los 41 aislados de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 se observaron 7 patrones moleculares distintos (TLL-TQ), como se observa en la figura 43. Estas cepas se aislaron en Andalucía, en Aragón, en la Comunidad de Madrid y en Baleares (Tabla 25).

L. pneumophila serogrupo 2-14 no compartió ningún patrón molecular entre las distintas Comunidades Autónomas, a diferencia de *L. pneumophila* serogrupo 1 con patrón molecular TD que se observó en todas las Comunidades Autónomas en las que se aisló este serogrupo de *L. pneumophila*.

En Andalucía sólo se tipificaron 8 cepas de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 aisladas de las tres torres de refrigeración instaladas en el edificio A3t (Córdoba) en varios meses. Todas las cepas presentaron el mismo perfil de bandas denominado TLL (Tabla 25). En una de estas torres de refrigeración (T3) también coexistió una cepa de *L. pneumophila* serogrupo 1 con patrón TC en una única muestra, como se explica previamente.

En Aragón se aisló *L. pneumophila* serogrupo 2-14 con patrón molecular TM en dos de las tres torres de refrigeración situadas en el edificio AR1t (Zaragoza) en abril de 2007 (T3) y en julio de 2007 y de 2008 (T1) (Tabla 25).

En la Comunidad de Madrid, se observaron 3 patrones moleculares diferentes en dos edificios, a pesar de estar abastecidos por la misma red de distribución. En el edificio M13t se estudiaron 7 torres de refrigeración. Se aisló *L. pneumophila* serogrupo 2-14 en tres de ellas (T5-T7) en varias muestras detectándose el patrón molecular TO. Además, en la torre de refrigeración T7 se detectó un perfil de bandas distinto (TP) en diciembre de 2007. La única torre de refrigeración analizada del edificio M16t presentó el patrón electroforético TQ en los meses de septiembre, octubre y noviembre de 2007, verificando de esta manera su persistencia (Tabla 25). Asimismo, un año más tarde (septiembre de 2008), se detectó *L. pneumophila* serogrupo 1 con el perfil de bandas TL en esta torre de refrigeración, tal y como se menciona con anterioridad.

Los dos edificios de Baleares (IB1t y IB3t) colonizados por *L. pneumophila* serogrupo

2-14 se localizaron en la misma ciudad y se suministraron por la misma red de distribución de agua. En ambos se detectaron los perfiles de bandas denominados TN y TÑ. En el edificio IB1t se analizaron 6 torres de refrigeración y en 5 de ellas se aisló *L. pneumophila* serogrupo 2-14. En estas cinco torres de refrigeración se detectó el perfil molecular TÑ durante varios meses (Tabla 25). Sin embargo, el patrón molecular TN sólo se observó en dos torres de refrigeración en diciembre de 2007 (T1) y en noviembre y diciembre de 2007 (T4). Además, en la torre de refrigeración T1 también se detectó el perfil molecular TD de *L. pneumophila* serogrupo 1 en noviembre de 2007. En el edificio IB3t se estudiaron dos torres de refrigeración y en ambas se detectó el perfil TN en diciembre de 2007 y enero de 2008 y el patrón de bandas TÑ en octubre de 2008, junto con el patrón molecular TD de *L. pneumophila* serogrupo 1.

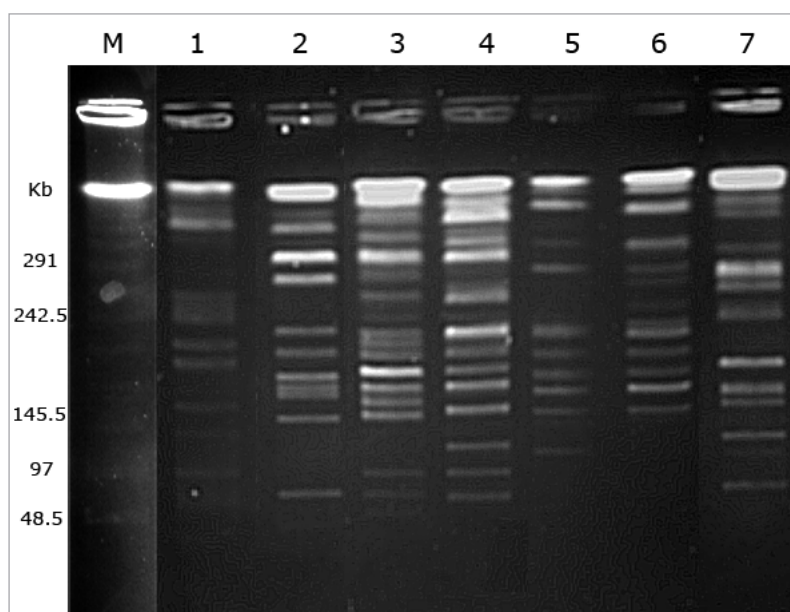


Figura 43 . Patrones moleculares de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 detectados mediante PFGE en torres de refrigeración. Calles 1-7, patrón molecular TLL-TQ, calle M, marcador de peso molecular concatámeros del fago λ .

Tabla 25 . Patrones moleculares de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 detectados en torres de refrigeración por comunidad autónoma y mes de detección.

Comunidad autónoma	Ciudad	Edificio muestreo	Mes y año de aislamiento																									
			E07	F07	M07	A07	M07	J07	J07	A07	S07	O07	N07	D07	E08	F08	M08	A08	M08	J08	J08	A08	S08	O08	N08	D08		
ANDALUCÍA	Córdoba	A3t				TLL																						
ARAGON	Zaragoza	AR1t			TM																							
C. MADRID	Madrid	M13t			TO																							
		M16t					TO	TO																				
BALEARES	Mallorca	IB1t																										
		IB3t																										TÑ

Las 26 cepas tipificadas de *Legionella no-pneumophila* presentaron 9 patrones moleculares distintos (TR-TZ) (Figura 44). Las cepas se aislaron en Andalucía, en Aragón, en la Comunidad Valenciana y en la Comunidad de Madrid.

Cada comunidad autónoma y cada edificio mostró su propio patrón molecular de *Legionella no-pneumophila*, tal y como se observa en la tabla 26.

En Andalucía se observaron 2 patrones diferentes (TR y TS). El patrón molecular TR se detectó en tres de las 5 torres de refrigeración del edificio A1t (Algeciras) en varios meses del año 2007. Se prueba así la persistencia de este perfil en las torres de refrigeración colonizadas (Tabla 26). En las dos torres de refrigeración estudiadas en el edificio A9t (Málaga) se observó el patrón molecular TS en cepas aisladas en varios meses. Asimismo, se detectó simultáneamente *L. pneumophila* serogrupo 1 con el perfil de bandas TE, como se comenta con anterioridad. De este modo, queda de manifiesto la coexistencia y persistencia de ambos perfiles electroforéticos en las torres de refrigeración instaladas en dicho edificio durante los meses de junio, julio y agosto de 2008 en la torre de refrigeración T1 y en abril y agosto de 2008 en la torre de refrigeración T2.

En Aragón, aunque se aisló *Legionella no-pneumophila* en las torres de refrigeración de los tres edificios analizados, sólo se realizó la tipificación molecular a algunas cepas aisladas en el edificio AR2t (Zaragoza). Se detectó el patrón molecular TT en tres de las cuatro torres de refrigeración analizadas en este edificio (febrero y mayo de 2007 en las torres de refrigeración T1 y T2 y enero y febrero del mismo año en la torre de refrigeración T3). Por otro lado, se detectó *Legionella no-pneumophila* con un patrón molecular diferente (TU) en la única muestra positiva obtenida para *Legionella no-pneumophila* en la torre de refrigeración T4 durante el periodo de estudio (febrero de 2007) (Tabla 26).

El perfil de bandas denominado TV se asoció a una única cepa de *Legionella no-pneumophila* aislada en noviembre de 2007 en el edificio V5t de la C. Valenciana (Tabla 26).

En la C. Madrid, se detectaron 4 patrones moleculares diferentes (TW, TX ,TY y TZ) en tres edificios. En el edificio M5t se aisló una única cepa de *Legionella no-pneumophila* con perfil TW en septiembre de 2008. En el edificio M9t se analizaron 12 torres de refrigeración. En cuatro (T1-T4) se aisló *Legionella no-pneumophila*. En las torres de refrigeración T1 y T2 se observó el patrón molecular TY en la única muestra con aislamiento de *Legionella no-pneumophila* (julio de 2007). Un perfil de bandas distinto (TZ) se observó en la torre de refrigeración T4 de este mismo edificio en septiembre y octubre de 2008. La cepa obtenida de la torre de refrigeración T3 no fue tipificada. En cuatro de las siete torres de refrigeración analizadas en el edificio M13t se aislaron 9 cepas de *Legionella no-pneumophila* (T1, T5, T6 y T7). Sólo se analizó molecularmente una cepa (septiembre de 2008) que presentó el perfil de bandas denominado TX (Tabla 26).

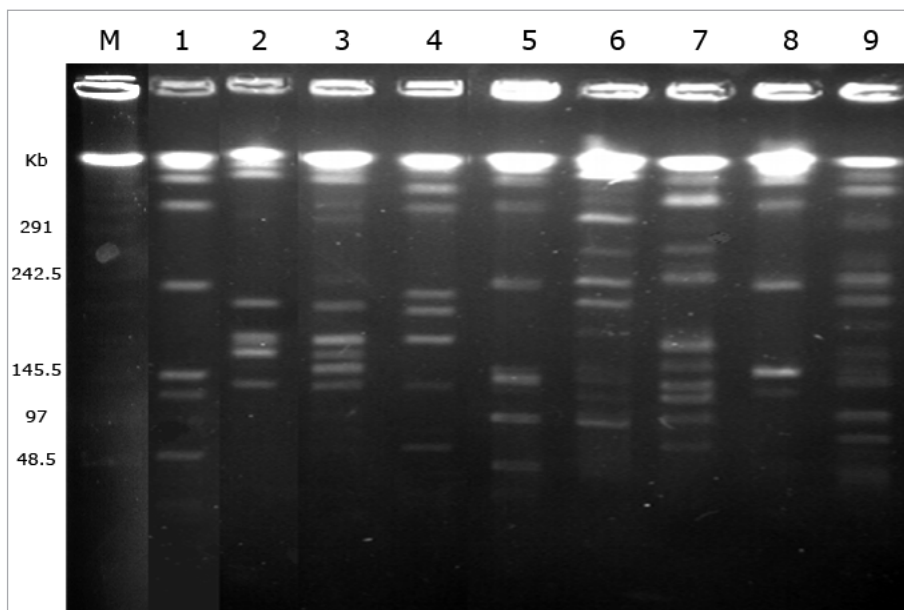


Figura 44 . Patrones moleculares de *Legionella no-pneumophila* detectados mediante PFGE en torres de refrigeración. Calles 1-9, patrón molecular TR-TZ, calle M, marcador de peso molecular concatámeros del fago λ .

Tabla 26 . Patrones moleculares de *Legionella no-pneumophila* detectados en torres de refrigeración por comunidad autónoma y mes de detección.

Comunidad autónoma	Ciudad	Edificio muestreo	Mes y año de aislamiento																									
			E07	F07	M07	A07	M07	J07	J07	A07	S07	O07	N07	D07	E08	F08	M08	A08	M08	J08	J08	A08	S08	O08	N08	D08		
ANDALUCÍA	Algeciras	A1t						TR																				
	Málaga	A9t																TS										
ARAGÓN	Zaragoza	AR2t																										
C.VALENCIANA	Alicante	V5t																										
C. MADRID		M5t																										
		M9t																										
		M13t																										

Algunos edificios abastecidos por la misma red de agua potable presentaron torres de refrigeración colonizadas por *Legionella* spp. con distinto perfil electroforético. Un ejemplo bien representativo es la Comunidad de Madrid. Todas las torres de refrigeración estuvieron suministradas por el agua procedente del Canal de Isabel II y se observaron patrones moleculares diferentes en cada edificio analizado.

Por otra parte, también se observó que las distintas torres de refrigeración de un mismo edificio estuvieron colonizadas por cepas que mostraron distinto patrón molecular. En el edificio CT7t se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1 en agosto del año 2007 con el perfil TH en tres torres de refrigeración (T1, T2, y T3) y con el perfil TD en otra torre de refrigeración (T4).

4.3.3. Comparación de patrones moleculares de *Legionella* spp. aislada en agua de consumo humano y torres de refrigeración.

Con el fin de comprobar la posible procedencia/entrada de las cepas de *Legionella* aisladas en las torres de refrigeración desde la red de distribución de agua potable de las ciudades, se compararon los patrones moleculares de las cepas de *Legionella* en aquellas instalaciones en las que se obtuvieron aislamientos tanto de las torres de refrigeración como en la acometida del agua de cada edificio. De los 81 edificios estudiados, en un 44.4% de los edificios (36/81) no se detectó *Legionella* en el agua de consumo humano ni en las torres de refrigeración. El 40.7% de los edificios (33/81) presentaron *Legionella* spp. en sus torres de refrigeración, pero no se observó ningún aislamiento de la bacteria en el agua de consumo humano. La situación inversa, es decir, detección de *Legionella* en agua de consumo y no en las torres de refrigeración se produjo únicamente en el 2.5% de los edificios (2/81). Se encontró *Legionella* tanto en el agua de consumo humano como en las torres de refrigeración en el 12.4% de los edificios estudiados (10/81).

El perfil molecular AA de *L. pneumophila* serogrupo 1, detectado en el agua de consumo humano, y el patrón electroforético TD, observado en las torres de refrigeración, fueron idénticos. Sólo en el edificio MU1t, localizado en Murcia, se pudo

comprobar que las cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1 detectadas en el agua de consumo humano presentaron el mismo perfil molecular (AA) que las cepas aisladas en las torres de refrigeración (TD) durante parte del estudio (octubre 2007- noviembre 2008).

En el edificio A6t se observó el perfil TD/AA en las torres de refrigeración, pero en el agua de consumo humano se aisló *Legionella no-pneumophila*. En las torres de refrigeración de los edificios A9t, A11t, CT7t, M24t, IB1t y IB3t se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1 con perfil molecular TD/AA. Sin embargo, en el agua de consumo humano recogida en la entrada de dichos edificios no se detectó *Legionella* durante el periodo de estudio.

Por otro lado se detectó el patrón electroforético AA/TD en agua de consumo humano del edificio V6t pero no se obtuvo ningún aislamiento de *Legionella* en las tres torres de refrigeración investigadas. Además, este mismo perfil se observó en el agua de consumo humano en los puntos V1a y A1a, no obstante en estos puntos no se investigaron torres de refrigeración.

En dos de los 10 edificios en los que se detectó *Legionella* en agua de consumo humano y en torres de refrigeración, A2t y At13, se detectaron especies distintas en los dos tipos de agua analizada (Anexo 1 y 2).

El resto de edificios (A3t, A5t, A10t, A14t, CM1t y M9t) presentaron *L. pneumophila* serogrupo 1, *L. pneumophila* serogrupo 2-14 o *Legionella no-pneumophila* tanto en agua de consumo humano recogida en la acometida como en las torres de refrigeración de cada uno de estos 7 edificios. Sin embargo, no se pudo comprobar la relación entre las cepas aisladas en ambos dispositivos porque se obtuvieron en el año 2006.

4.4. Detección de los genes de virulencia *lvh* y *rtxA* en cepas ambientales de *Legionella* spp.

La presencia de los genes de virulencia *lvh* y *rtxA* en cepas de *L. pneumophila* ha mostrado una fuerte asociación con el desarrollo de legionelosis en el ser humano.

Mediante PCR y utilizando un set de 6 oligonucleótidos específicos descritos por Samrakandi (2002) se estudió la presencia de estos genes en una cepa de *Legionella* representante de cada uno de los patrones moleculares observados entre los aislamientos, tanto de agua de consumo humano como de torres de refrigeración. En total se analizaron 35 cepas, 7 obtenidas de agua de consumo humano y 28 de torres de refrigeración. En las figuras 45 y 46 se muestran los productos de PCR obtenidos tras la amplificación de los dos "loci", *rtxA* y *lvh* en agua de consumo humano y torres de refrigeración.

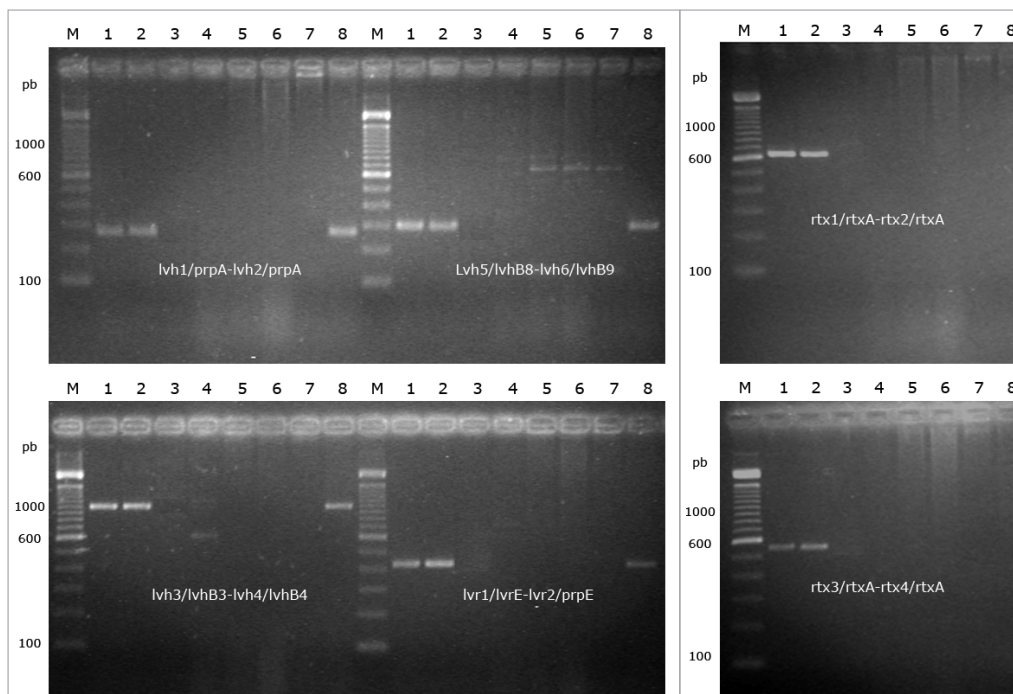


Figura 45. Productos de PCR de los genes de virulencia *lvh* y *rtxA* de las cepas de *Legionella* aisladas en agua de consumo humano para los seis pares de oligonucleótidos. Calles 1 y 2, cepas con patrón molecular AA; calle 3, cepas con patrón molecular AB; calle 4, cepas con patrón molecular AC; calle 5, cepas con patrón molecular AD; calle 6, cepas con patrón molecular AE; calle 7, cepas con patrón molecular AF; calle 8, cepas con patrón molecular AG; calle M, peso molecular de 100 pb (DNA ladder 100 pb, Invitrogen).

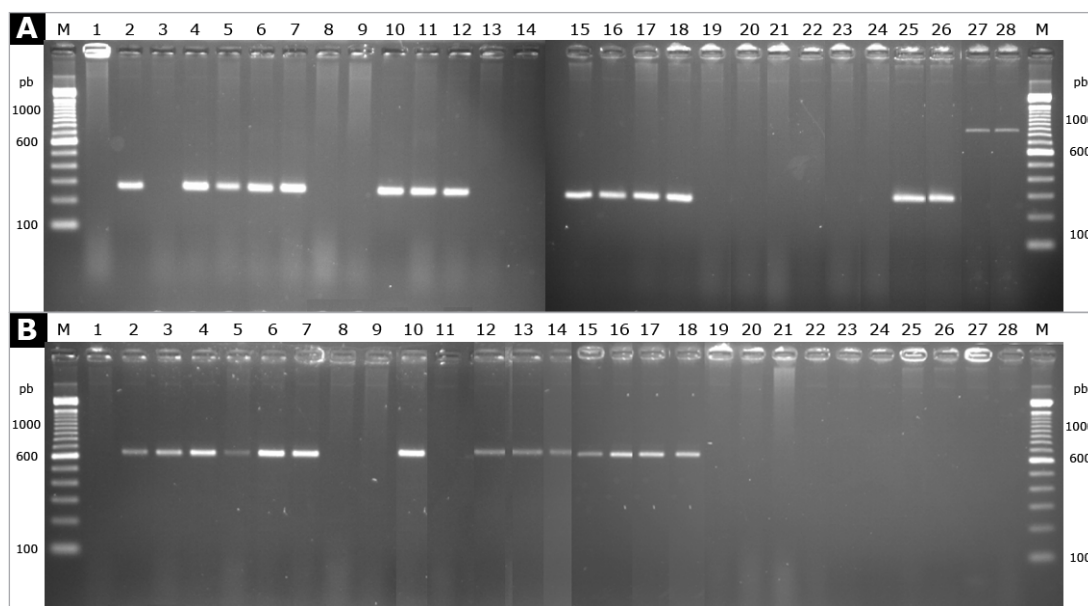


Figura 46A. Productos de PCR en las cepas aisladas de *Legionella* en torres de refrigeración para *lvh1/prpA-lvh2/prpA*. Calles 1-28, cepas con patrón molecular TA-TZ; calle M, peso molecular de 100 pb (DNA ladder 100 pb, Invitrogen). **Figura 46B.** Productos de PCR en las cepas aisladas de *Legionella* en torres de refrigeración para *rtx1/rtxA-rtx2/rtxA*. Calles 1-28, cepas con patrón molecular TA-TZ; calle M, peso molecular de 100 pb (DNA ladder 100 pb, Invitrogen).

Un total de 19 de las 35 cepas analizadas presentaron ambos o uno de los genes estudiados. La figura 47 representa la presencia de los genes de virulencia investigados en las 13 cepas analizadas de *L. pneumophila* serogrupo 1. Como se observa en dicha figura, en 8 cepas se detectaron los dos genes, 2 presentaron un único gen (1 cepa presentó el gen *lvh* y otra el *rtxA*) y en 3 no se detectó ningún gen. El patrón electroforético AA/TD, único detectado en agua de consumo humano y ampliamente distribuido en las torres de refrigeración de varias comunidades autónomas, presentaron tanto el gen de virulencia *lvh* como el gen *rtxA*. Entre las 8 cepas analizadas de *L. pneumophila* serogrupo 2-14, la mitad (4 cepas) presentaron ambos genes, 3 cepas un único gen (37.5%, 2 cepas presentaron el gen *rtxA* y 1 cepa el gen *lvh*) y en 1 (12.5%) no se detectó ningún gen, como se aprecia en la figura 48. La única cepa de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 analizada en agua de consumo humano presentó el gen *lvh*. Destacar que en ninguna de las 14 cepas de *Legionella* no-*pneumophila* estudiadas se detectaron los genes *lvh* y *rtxA* de forma conjunta. Sólo 2 (14.3%)

presentaron uno de los dos genes, siendo éste el gen *lvh* en ambas cepas (Figura 49). Las 5 cepas analizadas en agua de consumo humano no presentaron genes de virulencia.

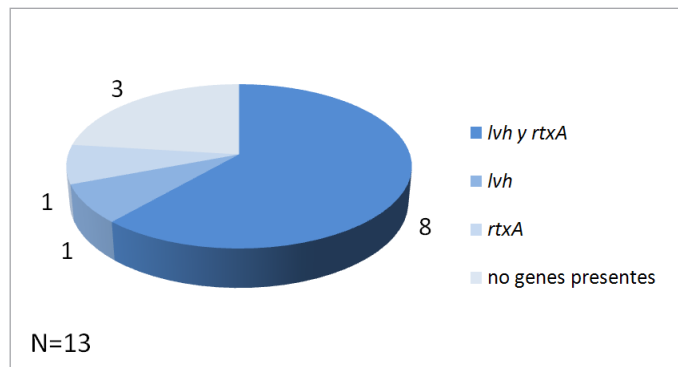


Figura 47. Distribución de los genes de virulencia *lvh* y *rtxA* en las cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1.

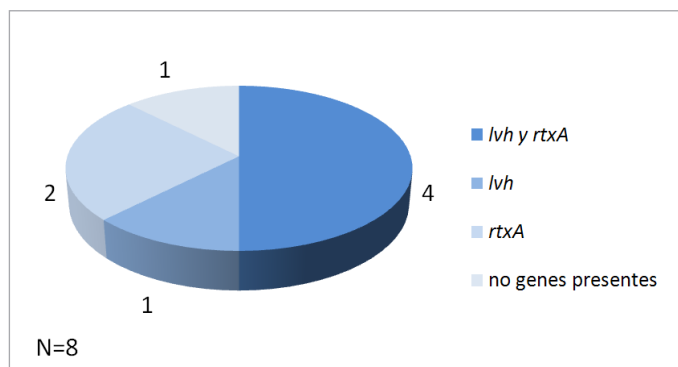


Figura 48. Distribución de los genes de virulencia *lvh* y *rtxA* en las cepas de *L. pneumophila* serogrupo 2-14.

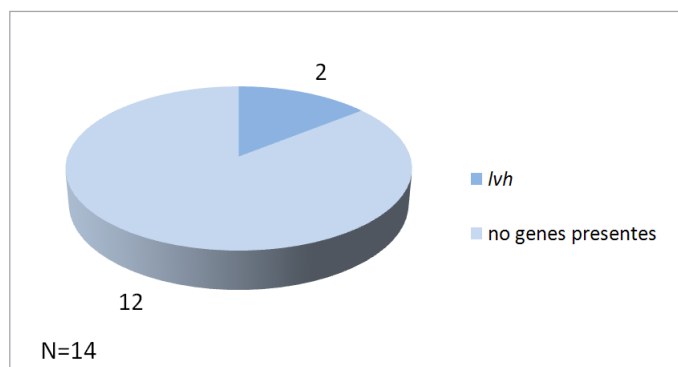


Figura 49. Distribución de los genes de virulencia *lvh* y *rtxA* en las cepas de *Legionella* no-*pneumophila*.

4.5. Investigación epidemiológica de un caso clínico fatal de legionelosis en Murcia.

En el Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia se realizaron un total de 4530 tests de detección del antígeno urinario de *L. pneumophila* serogrupo 1 durante los años de estudio. Se obtuvieron 30 resultados positivos, entre ellos un caso clínico de legionelosis rápidamente mortal atendido en septiembre de 2008. En el laboratorio de Microbiología se aisló una cepa de *L. pneumophila* serogrupo 1 en una muestra respiratoria de este caso y seguidamente se procedió a la investigación epidemiológica así como al estudio de virulencia del aislamiento.

Caso clínico.

Mujer de 44 años con enfermedad del tejido conectivo con características de lupus eritematoso sistémico (artritis, leucopenia, úlceras orales y miopericarditis). Tratada crónicamente con ácido acetilsalicílico, metilprednisolona, azatioprina y captopril. En septiembre de 2008 acudió a la puerta de urgencias del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia, por presentar fiebre (39°C), tos no productiva, disnea y malestar generalizado de tres días de evolución. La clínica no había mejorado tras el tratamiento con cefuroxima prescrito un día antes de forma ambulatoria. En urgencias la paciente presentó una frecuencia respiratoria de 50 respiraciones por minuto y una frecuencia cardíaca de 150 latidos por minuto. La radiografía de tórax reveló un infiltrado pulmonar bilateral. Con la sospecha clínica de neumonía adquirida en la comunidad, se solicitó la antigenuria para *S. pneumoniae* y *L. pneumophila* serogrupo 1. Los resultados del hemograma, bioquímica y gasometría de urgencia fueron: hematocrito 33%, leucocitos 21240/ μ l, plaquetas 281000/ μ l, proteína C-reactiva 40 mg/dl, sodio 134 mEq/l, potasio 4.2 mEq/l, creatinina 0.8 mg/dl, glucosa 104 mg/dl y urea 36 mg/dl, pH 7.08, PaO₂ 52mmHg, PaCO₂ 47mmHg, HCO₃ 13mmHg, SaO₂ 66%. Se instauró tratamiento empírico con piperazilina-tazobactam y ciprofloxacino y se ingresó a la paciente en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) por necesitar

ventilación mecánica. En UCI, tras recibir el informe de antigenuria positiva para *L. pneumophila* serogrupo 1 emitido por el laboratorio de microbiología se cambió el tratamiento inicial a levofloxacino y rifampicina y se realizó un lavado bronquial para estudio microbiológico. La paciente falleció el primer día de ingreso en el hospital. El cultivo del lavado bronquial fue positivo para *L. pneumophila* serogrupo 1 en placas BCYE- α al quinto día de incubación.

Investigación epidemiológica

Tras el fallecimiento de la paciente se llevó a cabo una investigación epidemiológica, según el RD 2210/1995 (BOE, 1995), para averiguar el origen de la infección. Se tomaron dos muestras del domicilio de la paciente 5 días después de su fallecimiento. El agua procedía de los grifos de agua caliente de la cocina (grifo más próximo al calentador) y de la ducha. Las muestras se analizaron según indica la Norma Internacional ISO 11731:1998 para aislamiento y recuento de *Legionella*. Se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1 en ambas muestras con recuentos superiores a 10^4 ufc/l. Para conocer la relación entre la cepa clínica y las cepas aisladas en el domicilio se compararon los patrones moleculares obtenidos mediante PFGE. Igualmente, se compararon con los perfiles moleculares de las cepas ambientales aisladas en Murcia durante ese periodo tanto en aguas de consumo humano (agosto 2007) como en torres de refrigeración (octubre de 2007 y diciembre de 2008). Se observó que los perfiles genéticos de la cepa clínica y de los aislamientos ambientales eran indistinguibles (Figura 50).

Adicionalmente, se realizó la técnica de SBT, recomendada por el “European Working Group for *Legionella* Infections” a las mismas cepas: cepa clínica y cepas ambientales de *L. pneumophila* serogrupo 1. Tras la secuenciación y posterior análisis a través de la base de datos “on line” disponible en la página web del EWGLI, se determinó el perfil de la combinación de los siete alelos. Como resultado final se obtuvo el perfil 1-4-3-1-1-1-1 en todas cepas analizadas que corresponde la secuencia tipo 1 (ST1).

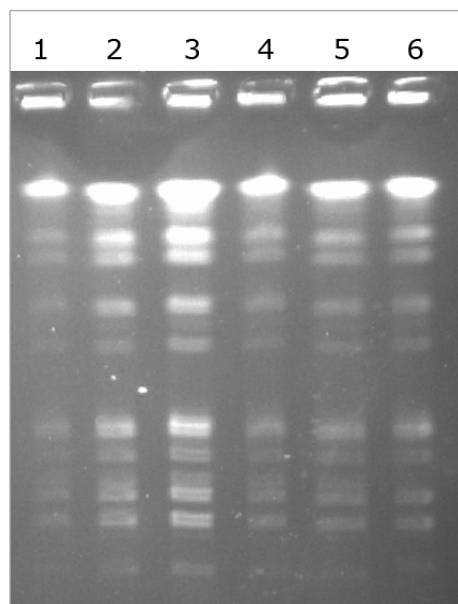


Figura 50 . Patrones moleculares de *L. pneumophila* serogrupo 1 detectados mediante PFGE durante el estudio epidemiológico. Calle 1, cepa clínica; calles 2 y 3, cepas ambientales aisladas en el domicilio de la paciente; calle 4, cepa ambiental aislada en el agua de consumo humano en el punto MU1a durante el estudio; calles 5 y 6, cepas ambientales aisladas en las dos torres de refrigeración de edificio MU1t durante el estudio.

Por consiguiente, los resultados de tipificación mediante PFGE y SBT confirman que el aislado clínico y las cepas ambientales, tanto del domicilio de la paciente como de las aisladas en agua de red de distribución y torres de refrigeración de un edificio público de la ciudad de Murcia fueron indistinguibles. Este resultado es un fuerte argumento de que el agua del domicilio de la paciente fue la fuente de infección más probable y que la cepa infectante puede proceder de la red de distribución de agua potable de la ciudad de Murcia y es capaz de persistir en las torres de refrigeración durante varios meses.

Estudio de virulencia

Para comprobar las posibles diferencias de virulencia entre el aislamiento clínico y los aislamientos ambientales se estudió el crecimiento intracelular de las distintas cepas en *Acanthamoeba polyphaga* y células U-937. Se examinó la proliferación intracelular de la cepa clínica, de una de las cepas ambientales procedente del domi-

cilio de la paciente y de dos cepas ambientales aisladas, una en agua de consumo humano y otra en las torres de refrigeración, durante el periodo de estudio.

Se determinó el número de bacterias después del crecimiento en placa a distintos intervalos de tiempo (2, 4, 16 y 24 horas). Todas las cepas exhibieron proliferación intracelular de *L. pneumophila* serogrupo 1 tanto en *A. polyphaga* como en células U-937. El crecimiento intracelular de todas ellas en amebas y macrófagos fue similar, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas (Figura 51 y 52). Por tanto, el origen de la cepa no tiene un efecto detectable en la proliferación intracelular tanto en *A. polyphaga* como en células U-937 y puede tratarse de un clon seleccionado en el cual la capacidad de proliferación dentro de las amebas haya aumentado la capacidad de infectividad en el ser humano.

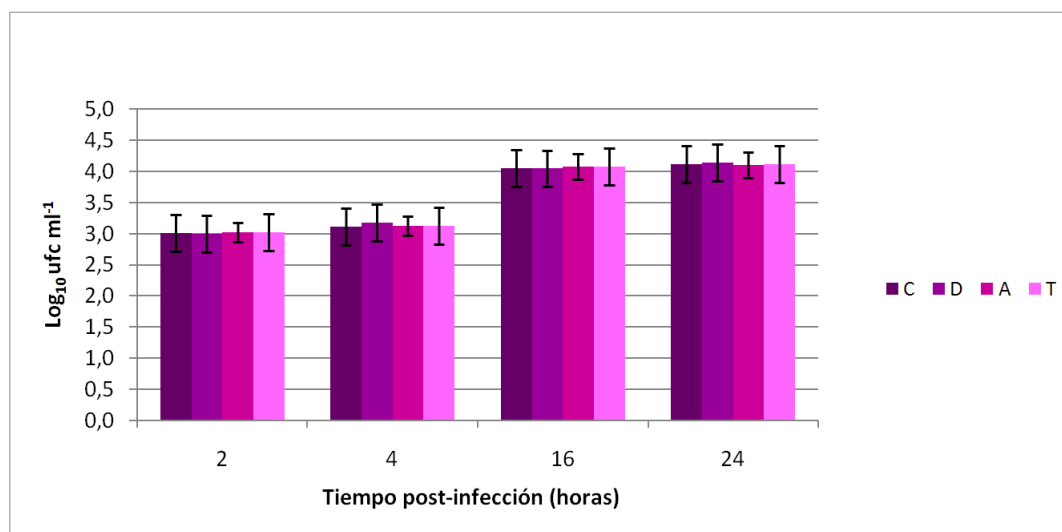


Figura 51. Crecimiento intracelular de *L. pneumophila* serogrupo 1 en *A. polyphaga* a distintos intervalos de tiempo. C, cepa clínica; D, cepa ambiental del domicilio; A, cepa ambiental de agua de consumo humano; T, cepa ambiental de la torre de refrigeración.

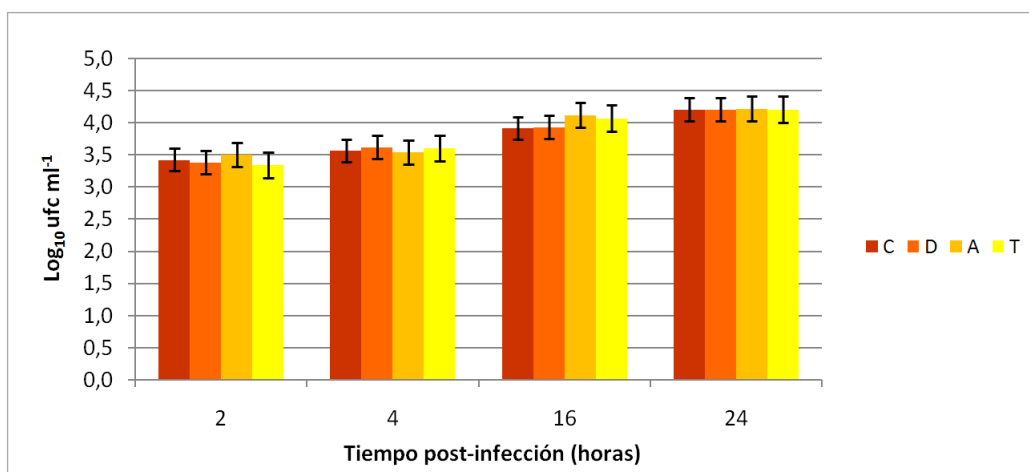


Figura 52. Crecimiento intracelular de *L. pneumophila* serogrupo 1 en U-937 a distintos intervalos de tiempo. C, cepa clínica; D, cepa ambiental del domicilio; A, cepa ambiental de agua de consumo humano; T, cepa ambiental de la torre de refrigeración.

5. Discusión

Legionella es una causa importante de neumonía comunitaria y nosocomial. Actualmente se considera el segundo agente etiológico, después de *Streptococcus pneumoniae*, de neumonías graves adquiridas en la comunidad. Además se asocia a otro cuadro no neumónico conocido como fiebre de Pontiac. Las legionelas son unas bacterias que se encuentran ampliamente distribuidas en ecosistemas acuáticos naturales como ríos, lagos, fuentes termales, entre otras, (Fliermans *et al.*, 1981; Ortiz-Roque y Hazen 1987; Veríssimo *et al.*, 1991). La bacteria puede colonizar distintas instalaciones artificiales a través de los sistemas de abastecimiento de agua de las ciudades (Colbourne y Trew, 1986; Voss *et al.*, 1985). En estas instalaciones, en ocasiones se favorece el estancamiento del agua y la acumulación de productos que sirven de nutrientes para la bacteria, como lodos, materia orgánica, material de corrosión y amebas, formando un biofilm (Barbaree *et al.*, 1986). La presencia de este biofilm y la temperatura elevada del agua permiten la multiplicación de *Legionella*. Si en la instalación existe un mecanismo productor de aerosoles, las gotas de agua que contienen la bacteria pueden dispersarse en el aire y penetrar por inhalación en el aparato respiratorio provocando la infección (Fitzgeorge *et al.*, 1983).

La literatura científica recoge una gran variedad de instalaciones relacionadas con casos/brotos de legionelosis, como son condensadores evaporativos, equipos de terapia respiratoria, piscinas climatizadas con movimiento de agua, aguas termales en centros de rehabilitación y recreo, cruceros, barcos, fuentes ornamentales, viviendas particulares, humidificadores, máquinas productoras de hielo, etc. Sin embargo, la legionelosis, tanto en forma de casos esporádicos como en forma de brotes, se ha relacionado más frecuentemente con la red de distribución de agua sanitaria (caliente o fría) y torres de refrigeración de edificios públicos como hospitales y hoteles (Castellani *et al.*, 1997; Garcia-Fulgueiras *et al.*, 2003; Joseph *et al.*, 1996; Marrie *et al.*, 1992; Stout *et al.*, 1992). Por una parte, en los centros sanitarios coinciden varios factores tales como pacientes de alto riesgo, uso de agua caliente sanitaria y complejidad de la red interna de tuberías, que favorecen la incidencia y gravedad de la legionelosis, constituyendo una creciente preocupación para las autoridades

sanitarias. Por la otra, la incidencia de *Legionella* en grandes colectividades, principalmente en hoteles y cruceros, no sólo implica un problema en el ámbito de la salud pública, sino también una transcendencia económica en determinados sectores productivos como el turístico.

La mayoría de los estudios ambientales se han basado en la investigación de *Legionella*, especialmente de *L. pneumophila* serogrupo 1, en el agua caliente sanitaria y torres de refrigeración de hospitales y hoteles (Bonetta *et al.*, 2010; Martinelli *et al.*, 2001). Sin embargo, existe poca información de la colonización del agua en la red de distribución municipal que abastece las ciudades antes de pasar a la red interna de un edificio y a las distintas instalaciones donde existen condiciones favorables para la proliferación de la bacteria. Esto puede deberse a que es asumido que *Legionella* llega a las diferentes instalaciones de agua a través de la red de distribución principal aunque a concentraciones indetectables mediante los métodos habituales de laboratorio (García-Nuñez *et al.*, 2008). Además, se supone que la red de abastecimiento público debe cumplir con la legislación vigente y, por tanto, el agua debe poseer un desinfectante residual que la proteja de la contaminación microbiológica (MSC, 2008). No obstante, algunos autores han descrito el aislamiento de cepas de *L. pneumophila* directamente del suministro externo de agua potable de dos hospitales (Stout *et al.*, 1982; Tanzi *et al.*, 2006).

Este estudio pretende conocer, durante un periodo de tres años (2006-2007-2008), el estado de contaminación por *Legionella* del agua de consumo humano de distintas redes de distribución justo a la entrada de edificios públicos localizados por la geografía española, así como la colonización de distintas torres de refrigeración abastecidas por dichas redes de distribución. Dicha torres de refrigeración tenían una estructura física similar independientemente de su localización geográfica y los controles y tratamientos microbiológicos se realizaron según los criterios establecidos en el RD 865/2003 (BOE, 2003b).

Colonización por *Legionella* del agua de consumo humano y torres de refrigeración.

Durante el periodo de estudio se encontró que el 20.3% (32/157) de los puntos de muestreo de la red de distribución de agua potable estaban colonizados por *Legionella* en algún momento, a concentraciones detectables por la técnica de cultivo cuyos límites de detección estuvieron entre 50 y más de 10000 ufc/l. Nuestros resultados proporcionan evidencias del aporte de *Legionella* a concentraciones altas a partir de las redes externas a los sistemas de distribución de agua caliente sanitaria, torres de refrigeración, spas, fuentes ornamentales, entre otros. En estos sistemas, las legionelas se pueden amplificar y posteriormente diseminar a la colectividad aumentando el riesgo de infección.

Del total de muestras de agua de consumo humano analizadas un 2% fueron positivas (92/4553). Dos estudios similares al nuestro, realizados en Londres y recientemente en Holanda, observaron que el 2.4% y 2.2% de las muestras de agua potable analizadas estuvieron contaminadas respectivamente (Colbourne y Trew, 1986; Diederer *et al.*, 2007). Algunos autores indican en sus trabajos, realizados en España, que un 19.6 y 41% de las muestras analizadas se detectó *Legionella* (Rivera *et al.*, 2007; Sabria *et al.*, 2001). Los datos mostrados en estos estudios fueron superiores a los nuestros posiblemente porque las muestras se tomaron de la red de distribución de agua caliente sanitaria donde se alcanzaron temperaturas óptimas para la multiplicación de la bacteria y/o de agua fría que había estado almacenada en depósitos donde la formación de biofilm puede favorecer la proliferación de la bacteria. Por tanto, estos resultados no son comparables con los nuestros ya que el diseño de los estudios es totalmente diferente.

En cuanto al estudio de torres de refrigeración, se detectó *Legionella* en el 37.2% (115/309) de las torres investigadas. El 43.5% de éstas (50/115) presentaron únicamente una muestra positiva y en el 56.5% (65/115) restante se detectó más de un aislamiento. Los porcentajes de colonización de las torres de refrigeración en otros estudios publicados son muy variables; así, en Grecia se observó que el 48.9% de

las torres de refrigeración tenían *Legionella*, justificando estas cifras porque sólo el 22.3% de éstas se limpiaban y desinfectaban correctamente (Mouchtouri *et al.*, 2010). Sin embargo, una investigación realizada en torres de refrigeración de hospitales españoles (Ragull *et al.*, 2007) demostró que en el 86.6% de las torres de refrigeración analizadas se aisló la bacteria incluso realizando los tratamientos microbiológicos establecidos por el RD 865/2003 (BOE, 2003b). Además, se detectaron concentraciones de *Legionella* superiores a 10^4 ufc/l en el 15% de las muestras analizadas. De hecho, se han descrito brotes de legionelosis en España asociados a torres de refrigeración mantenidas correctamente según la legislación vigente. Un ejemplo de ello es el brote de legionelosis ocurrido recientemente en Navarra en el que se encontró la bacteria con un recuento superior a 10^4 ufc/l en la torre de refrigeración relacionada con el brote en el momento en el que se realizó la investigación epidemiológica (Castilla *et al.*, 2008). Algunos autores han sugerido que las medidas de control establecidas en España pueden ser insuficientes para garantizar la integridad de la salud (Castilla *et al.*, 2008).

La especie aislada con mayor frecuencia en agua de consumo humano fue *L. pneumophila* serogrupo 1, identificándose en un 53.6% (52/97) de las muestras positivas seguida en frecuencia por *Legionella no-pneumophila* que se detectó en un 41.2% (40/97). Sin embargo, únicamente se detectó *L. pneumophila* serogrupo 2-14 en un 5.2% (5/97). Estos datos coinciden con estudios previos realizados en el agua potable de hoteles de Italia y barcos de Grecia en los que *L. pneumophila* serogrupo 1 fue también la especie más frecuente (Borella *et al.*, 2005; Goutziana *et al.*, 2008). En contraste, una investigación realizada a partir del agua potable en 6 hospitales de Polonia detectó mayoritariamente *L. pneumophila* serogrupo 2-14 (Stojek *et al.*, 2008) y en el agua de consumo humano analizada en Holanda predominaron especies distintas a *L. pneumophila* (Diederer *et al.*, 2007).

Al igual que en el agua de consumo humano, prácticamente en la mitad de las muestras procedentes de las torres de refrigeración (47.8%) se detectó *L. pneumophila* serogrupo 1. El resto de serogrupos de *L. pneumophila* se detectaron en el 24.4%

(90/370) y especies distintas a *L. pneumophila* en el 26.8% de las muestras. Varios autores observaron que *L. pneumophila* serogrupo 1 fue la especie identificada con mayor frecuencia en torres de refrigeración (Mouchtouri *et al.*, 2010; Pelaz *et al.*, 1992; Rivera *et al.*, 2007; Yong *et al.*, 2010). No obstante, otros autores constataron en sus resultados un predominio de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 en las torres de refrigeración analizadas (Sabriá *et al.*, 2001).

Esta diversidad en la frecuencia de las distintas especies y serogrupos de *Legionella* observada en la distribución ambiental de la bacteria puede ser debido tanto a la variación en la composición de los diferentes hábitats acuáticos, a la utilización de diferentes desinfectantes, al estado de la instalación o a los diferentes métodos diagnósticos utilizados para la detección de la bacteria. Un dato a destacar es la presencia de especies o serogrupos distintos a *L. pneumophila* serogrupo 1 en la mitad de las muestras ambientales analizadas, tanto en agua de consumo humano como en torres de refrigeración. Este hecho justifica la necesidad de obtener un diagnóstico microbiológico en aquellos casos de neumonía de etiología desconocida, ya que no se conoce el alcance de otras especies y serogrupos distintos a *L. pneumophila* serogrupo 1 como agentes patógenos en humanos. Esto se puede deber en parte porque la prueba del antígeno urinario, ampliamente utilizada en la actualidad como técnica diagnóstica de la infección, sólo detecta aquellas infecciones producidas por *L. pneumophila* serogrupo 1 (Fields *et al.*, 2002) y a que el estudio de *Legionella* en muestras respiratorias no es una práctica habitual para diagnosticar neumonías adquiridas en la comunidad. La dificultad que tienen algunos pacientes para expectorar es un problema añadido para conseguir un diagnóstico de laboratorio. En este sentido, para subsanar este obstáculo y mejorar el diagnóstico microbiológico, se debe establecer una labor conjunta entre clínico y microbiólogo. Parece que las infecciones causadas por *Legionella* distintas a *L. pneumophila* serogrupo 1 son poco frecuentes y se han asociado principalmente a pacientes inmunodeprimidos. No está claro si las especies distintas a *L. pneumophila* serogrupo 1 son menos patógenas o clínicamente están infradiagnosticadas ya que muchas de ellas se multiplican dentro

de las amebas y comparten genes de virulencia con *L. pneumophila* (Murder y Yu, 2002).

Un hecho frecuente en los estudios ambientales es aislar más de una cepa perteneciente a distintas especies de *Legionella* o a serogrupos distintos de *L. pneumophila* en la misma muestra, hecho que dificulta la realización de los estudios epidemiológicos (Diederer *et al.*, 2007). Sin embargo, en nuestro estudio se encontraron sólo 5 muestras de agua de consumo humano, cuatro de ellas recogidas en el mismo punto de muestreo (E2a), y 20 muestras de torres de refrigeración en las que coexistían dos aislados de *Legionella*. En el caso del agua de consumo humano, el hecho de observar pocos cultivos mixtos se puede explicar si se asume que en las tuberías el agua fluye constantemente y la posibilidad de estancamiento es prácticamente nula. En consecuencia, la formación del biofilm y a su vez la probabilidad de encontrar distintas especies de *Legionella* disminuye. Sin embargo, esta justificación no se puede aplicar en el caso de las torres de refrigeración donde el estancamiento del agua y la corrosión de la instalación permiten la formación del biofilm donde, normalmente, confluyen distintas especies/serogrupos de *Legionella*. El motivo por el cual se ha detectado un porcentaje bajo de cultivos mixtos puede que sea una limitación del propio estudio. Debido a que sólo se han analizado cuatro colonias diferentes de cada una de las muestras positivas, tal y como se comenta en material y métodos, y dada la apariencia similar entre las colonias, no se puede descartar que otras especies o serogrupos de *Legionella* coexistan simultáneamente en la misma instalación. Para evitar esta situación se puede realizar una técnica molecular basada, por ejemplo, en la detección del gen *mip* (Diederer *et al.*, 2007) con la que se detectan incluso “*Legionella* Like Amoebal Pathogens”. Sin embargo, el objetivo fundamental de este estudio era conocer la presencia *Legionella* y su concentración en el agua de consumo humano, justo antes de la entrada de los edificios, y en torres de refrigeración controladas y tratadas microbiológicamente según la legislación vigente. De este modo, se realizó la detección de la bacteria mediante cultivo, menos sensible que las técnicas moleculares pero con una elevada especificidad, ya que es la técnica que

se aconseja en la Norma Internacional ISO 11731:1998 para la detección y recuento de *Legionella* en muestras ambientales.

La importancia de incluir la cuantificación de la concentración de *Legionella* en los estudios de vigilancia ambiental se justifica por la necesidad de establecer un umbral crítico de contaminación que represente riesgo de infección. Estos niveles son difíciles de determinar ya que la posibilidad de infección depende de otros factores tales como la capacidad de producción de aerosoles de los distintos sistemas artificiales, la existencia de protozoos con su función protectora frente a los desinfectantes en estos sistemas (García *et al.*, 2007), las condiciones climáticas favorables para la transmisión del microorganismo (Engelhart *et al.*, 2008), la virulencia de la cepa (García-Nuñez *et al.*, 2009; Harrison *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2004), entre otros. Igualmente, no se conoce cuál es la dosis infectiva para el ser humano que depende, a su vez, del estado inmunológico del huésped. En relación con esta apreciación, muchos países Europeos han propuesto unas guías de acciones de control basadas en resultados o datos cuantitativos de *Legionella* procedentes de cultivos ambientales (DVGW, 2004; HSE, 2004; Ministère de la Sante et des Solidarités, 2005; VROM, 2002). En España existe una guía (MSC, 2008) donde se establece que a partir de 10^3 ufc/l, nivel de colonización fijado por la mayoría de guías europeas, deben aplicarse medidas de desinfección concretas, a pesar de que no existe evidencia científica de que la cuantificación en un punto se correlacione con la aparición o no de casos.

En este trabajo, el 46.4% de las muestras de agua de consumo humano positivas se encontraron a concentraciones de *Legionella* superiores a 10^3 ufc/l. La concentración permitida por las autoridades francesas y alemanas en las tuberías de instalaciones públicas es de 10^3 ufc/l. Por tanto, considerando que prácticamente la mitad de las muestras con resultado positivo en la red de suministro municipal de agua superaron esta concentración, sería necesario aplicar unas medidas correctoras en algunos de los puntos analizados. Además, esto significa que existe un aporte continuo de *Legionella* a concentraciones elevadas a las instalaciones consideradas por el RD

865/2003 como “instalaciones de mayor probabilidad de proliferación y dispersión de *Legionella*” (BOE, 2003b). Publicaciones previas encontraron también un porcentaje elevado de muestras ambientales con concentraciones superiores al límite establecido. Estudios realizados en barcos de Grecia, hospitales de Polonia y hoteles de Italia obtuvieron concentraciones de *Legionella* superiores a 10^3 ufc/l en el 41.1%, 41.8% y 62.5% de las muestras de agua con cultivo positivo respectivamente (Borella *et al.*, 2005; Goutziana *et al.*, 2008; Stojek *et al.*, 2008).

En hospitales se ha determinado que el riesgo de adquirir legionelosis está más relacionado con el número de puntos de agua colonizados por *Legionella* que con la concentración de la bacteria detectada en un punto. Varios autores correlacionan la aparición de casos de legionelosis nosocomial con la detección de *Legionella* en más del 30% de los puntos de consumo muestreados (Best *et al.*, 1983; Kohler *et al.*, 1999; Kool *et al.*, 1998). Algunas guías hospitalarias (ACHD, 1997; MSWG, 2000) recomiendan la desinfección sistemática de los sistemas de agua sanitaria fría y caliente partir de este porcentaje de puntos de muestreo positivos. Este criterio puede reflejar un incremento de la probabilidad de adquisición de la enfermedad en el paciente inmunodeprimido más que un argumento científico. A pesar de que no hay evidencia científica de que sea un punto de corte correcto, la detección de *Legionella* en más del 30% de los puntos de muestreo obligará a realizar un tratamiento inmediato del agua sanitaria caliente, reforzando los programas de mantenimiento higiénico-sanitario, de limpieza y desinfección (DOGC, 2004). Estas recomendaciones se aplican exclusivamente en el ámbito hospitalario donde hay personas susceptibles de adquirir la infección y además es factible realizar un muestreo representativo de todos los puntos de consumo. No obstante, estos criterios no se pueden emplear para realizar una valoración del riesgo de legionelosis en otros ámbitos en los que el muestreo no esté delimitado a un edificio o área concreta.

El RD 140/2003 (BOE, 2003a) manifiesta que es responsabilidad o competencia de los municipios asegurar que el agua suministrada a través de la red de distribución en su ámbito territorial sea apta para el consumo humano. Esta responsabilidad fina-

liza en el punto de entrega a otro gestor o en la llave de paso general de la acometida del consumidor. Por su parte, la Organización Mundial de la Salud declara que la responsabilidad del manejo del riesgo de legionelosis pertenece al dueño o responsable de agua potable o responsable de la instalación del edificio (WHO, 2007). Nuestro estudio demuestra la presencia de *Legionella* a concentraciones elevadas en el agua de consumo humano de algunas regiones de España. El muestreo no se realizó a la salida de la planta potabilizadora, donde el municipio garantiza la salubridad del agua y posiblemente los cultivos hubieran sido negativos obteniendo así resultados totalmente distintos a los mostrados en este trabajo. Como se ha comentado, el agua se tomó justo en un punto localizado en la acometida de edificios públicos. Desconocemos el trayecto realizado por las tuberías de la red de distribución municipal y el estado de éstas desde la planta potabilizadora hasta el punto de muestreo. No obstante, suponemos que el trayecto fue de varios kilómetros, ya que la toma de muestra se realizó, en la mayoría de casos, en edificios céntricos donde, en nuestro conocimiento, no hay plantas potabilizadoras cercanas. Debido al largo recorrido de las tuberías, éste puede ser tortuoso y tener recodos, así el agua puede quedar estancada en algunas zonas. Además, existe la posibilidad de que las tuberías sean viejas o se encuentren en mal estado, ocasionando la corrosión de los materiales a partir de los poros o grietas. Bajo estas circunstancias, se favorece en todo momento la formación del biofilm y, en consecuencia, la proliferación de *Legionella*. De este modo, aunque el propietario de inmueble es responsable de mantener la instalación interior a efectos de evitar modificaciones en la calidad del agua de consumo humano desde la acometida hasta el grifo, el agua puede llegar a los edificios con *Legionella* a niveles elevados.

En cuanto a las torres de refrigeración, en el 38.3% de las muestras positivas se encontraron recuentos de *Legionella* superiores a 10^3 ufc/l. Según el RD 865/2003 a partir de 10^3 ufc/l se debe realizar una limpieza y desinfección de la instalación siguiendo el protocolo establecido (BOE, 2003b). En un estudio similar en el que se estudiaron las torres de refrigeración de edificios públicos franceses se encontró que

en el 48.3% de las muestras las concentraciones de *Legionella* fueron superiores a 10^3 ufc/l (Doleans *et al.*, 2004). Si se aplicaran los criterios establecidos por Miller y Kenepp (Miller y Kenepp, 1993), que permiten clasificar las torres de refrigeración en cuatro categorías según el riesgo potencial de adquirir legionelosis basados en la concentración de *L. pneumophila* (entre 10^3 ufc/l y 10^4 ufc/l se clasifican como instalaciones de “alto riesgo” y las instalaciones que superan las 10^4 ufc/l son consideradas instalaciones de “muy alto riesgo”), el 18.2% (21/115) de las torres de refrigeración colonizadas por *L. pneumophila* se clasificarían en la categoría de “alto riesgo” y el 11.3% (13/115) estarían en la categoría de “muy alto riesgo”.

Hay que señalar que en este estudio se han observado variaciones importantes en la concentración de *Legionella* en muestras consecutivas recogidas de un mismo punto, tanto en agua de consumo humano como en torres de refrigeración. Es decir, se detectó una concentración del orden de 10^2 ufc/l y al mes siguiente la concentración aumentó a más de 10^4 ufc/l, o viceversa. Estos resultados son similares a las observaciones realizadas por otros autores (Bentham, 2000; Lüch *et al.*, 1995; Ragull *et al.*, 2007; Visca *et al.*, 1999) y demuestran que las concentraciones de *Legionella* pueden variar considerablemente en cortos periodos de tiempo, produciéndose fluctuaciones importantes a lo largo del año. Este hecho dificulta la posibilidad de establecer normas y guías para controlar de manera eficiente las instalaciones y evitar casos de legionelosis. Este problema se observa en los criterios establecidos en el RD 865/2003 en el que se dictamina una frecuencia mínima trimestral de muestreo en torres de refrigeración para el estudio de *Legionella* (BOE, 2003b). Esta periodicidad puede ser insuficiente para detectar oscilaciones en la concentración de *Legionella* que puedan representar un riesgo para la salud.

En nuestro estudio observamos que en nueve puntos de agua de consumo humano de los 32 colonizados y en 15 de los 43 puntos con torres de refrigeración colonizadas se detectó *Legionella* en algún momento a concentraciones superiores a 10^4 ufc/l. Se debe añadir que en 16 de los 24 puntos se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1. Estos resultados pueden sugerir que el riesgo de adquisición de legionelosis es,

al menos, preocupante, tal y como se demuestra en investigaciones epidemiológicas donde el 52% de las instalaciones relacionadas con casos de legionelosis tenían una concentración de *Legionella* superior a 10^4 ufc/l (Rota et al., 2004).

Distribución estacional y geográfica de los aislamientos de *Legionella*.

Se observó una distribución estacional y geográfica en la detección de los aislados ambientales de *Legionella*. En el agua de consumo humano un 25.5% (23/90) de las muestras positivas se detectaron en verano y el 35.5% (32/90) en otoño. Asimismo, en las torres de refrigeración el 37.3% (138/370) de los aislamientos de *Legionella* se obtuvieron en verano y el 33.2% (123/370) en otoño. Además, si se analizan por separado las torres de refrigeración donde sólo se detectó una muestra positiva a lo largo del estudio se observa que el 38% (19/50) de los aislamientos de *Legionella* fueron en verano y el 48% (24/50) en otoño. La distribución estacional de la colonización de las torres de refrigeración se ha demostrado en otros trabajos previos. Un estudio realizado en el sur de Australia en el que se analizaron más de 30 torres de refrigeración mostró que el 80% estaban colonizadas en verano y sólo el 20% en invierno (Bentham y Broadbent, 1993). Igualmente, en los análisis realizados en el agua de las torres de refrigeración del País de Gales durante 21 meses se detectó un pico en la colonización por *Legionella* durante los meses de verano y otoño (Pinna, 1994). En nuestro estudio también se observó que las concentraciones de *Legionella* fueron superiores en estos meses. Estos datos coinciden con los mostrados en los trabajos de Türetgen (Türetgen et al., 2005) realizados en 50 torres de refrigeración de Estambul durante 5 años. Se observó que *L. pneumophila* se detectó en las torres de refrigeración con recuentos más elevados durante los meses de verano (Türetgen et al., 2005). Esta variación estacional se puede justificar por la multiplicación rápida de la bacteria a las temperaturas elevadas que se alcanzan en verano. Además, el mayor uso de las torres de refrigeración en esta época favorece la diseminación de la bacteria, aumentando el riesgo de infección (Bhopal y Fallon, 1991; Wéry et al., 2008). Según Li, el aumento de la humedad relativa y la disminución de la intensidad

de la luz solar del otoño podrían prolongar la viabilidad de la bacteria en los aerosoles en esta estación (Li *et al.*, 2002).

Algunos estudios sugieren que existe una relación entre el clima y legionelosis. Las elevadas temperaturas, la dirección del viento, las precipitaciones abundantes y consecuentemente un incremento de la humedad ambiental pueden contribuir a aumentar el número de casos de legionelosis adquiridos en la comunidad (Jansá *et al.*, 2002; Ricketts *et al.*, 2008). Naik (Naik *et al.*, 2009) sugirió que las condiciones ambientales, tales como una primavera cálida y altas precipitaciones, afectaron al número de infecciones en el Reino Unido.

La variabilidad estacional que se observa en la presencia de *Legionella* en muestras ambientales puede explicar el aumento de la incidencia de la infección en los meses de otoño y verano, tal y como indican los datos facilitados por el Centro Nacional de Epidemiología (CNE, 2010a). En los tres años de estudio (2006-2008), el número de casos de legionelosis declarados en España fue mayor en otoño. En el año 2006 se declararon 402 casos de legionelosis en verano y 509 casos en otoño. Esta relación se mantuvo en los dos años siguientes (371 y 385 casos en verano y 409 y 443 casos en otoño). Otros países como Estados Unidos y Australia también refieren esta variación estacional en la incidencia de la enfermedad, apareciendo un pico en otoño (Li *et al.*, 2002; Neil y Berkelman, 2008), como se ha comentado anteriormente.

Esta relación entre clima y legionelosis podría explicar la distribución geográfica de los puntos de agua de consumo humano colonizados por *Legionella* que se encuentran mayoritariamente en la zona sur de España (Andalucía, Extremadura, Murcia y Alicante). Esta distribución puede deberse principalmente al efecto de la temperatura. La guía técnica para la prevención y control de la legionelosis en instalaciones (MSC, 2008) aconseja mantener la temperatura del agua de consumo humano por debajo de los 20°C, siempre que las condiciones climáticas lo permitan. Según los datos facilitados por la Agencia Estatal de Meteorología (AEMET, 2010a), las temperaturas medias alcanzadas en estas zonas geográficas se encontraron alrededor

de los 20°C durante los tres años de estudio (la temperatura media alcanzada en Andalucía en el año 2006, 2007 y 2008 fue de 18.5°C, 18°C y 18°C respectivamente; en Murcia fue de 19.4°C, 18.8°C y 18.9°C respectivamente y en la Comunidad Valenciana fue de 18.8°C, 18.4°C y 18.2°C respectivamente), 2 o 3 grados por encima de la media registrada en el resto de comunidades autónomas. La temperatura es un factor importante que no solo implica la multiplicación del microorganismo a temperaturas superiores a 20°C, sino que también favorece la corrosión y la formación del biofilm. Además, a elevadas temperaturas el cloro disuelto en el agua, que supuestamente debe de estar a niveles que garanticen la calidad microbiológica del agua, se evapora progresivamente hasta desaparecer por completo, y en consecuencia *Legionella* puede proliferar en estos sistemas.

Esta distribución geográfica no fue tan evidente en las torres de refrigeración, ya que se encontraron torres colonizadas por *Legionella* distribuidas por todo el país excepto en Asturias, País Vasco y Castilla-León. Aunque sólo se detectó *Legionella* en el agua de consumo humano de las comunidades autónomas de la zona sur de España, puede que la bacteria llegara a las torres de refrigeración del resto de comunidades autónomas a través del sistema de distribución del agua municipal a niveles indetectables mediante el cultivo. Una vez que las bacterias llegan a este tipo de instalaciones encuentran las condiciones favorables para su proliferación, influyendo en menor medida la temperatura ambiental. También puede que la entrada de la bacteria a estos dispositivos sea, con ayuda del viento, a través de las zonas abiertas de las torres de refrigeración, o bien a través del suelo o aguas naturales, como el agua de lluvia, durante su construcción o mientras se realizan las reparaciones pertinentes (Coulbourne y Trew, 1986; Sakamoto *et al.*, 2009).

La AEMET informó en el resumen anual climatológico (AEMET, 2010b) que el año 2006 tuvo un carácter térmico extremadamente cálido, con una temperatura media registrada superior la máxima del periodo 1971-2000. El factor temperatura puede que sea determinante en la relación *Legionella*-legionelosis y clima, ya que en este mismo año se observó una colonización mayor de las instalaciones analizadas en

este estudio. Se detectaron el 60% (63/90) de los aislamientos de *Legionella* en agua de consumo humano (años incluidos 2006-2007) y el 40.2% (149/370) en torres de refrigeración (años incluidos 2006-2008). Además, y como consecuencia de las elevadas temperaturas y alto grado de colonización, el CNE informó más casos de legionelosis en el año 2006 que en los dos años siguientes de estudio (CNE, 2010b).

No obstante, la incidencia de legionelosis en España se sitúa en los últimos años entre 2.5 y 3 casos por 100000 habitantes según los datos del CNE (CNE, 2010b), con una variación importante entre las distintas comunidades autónomas. Por ejemplo, en el año 2007 Aragón y Baleares superaron los 5 casos por 100000 habitantes. Sin embargo, Extremadura no alcanzó 1 caso por 100000 habitantes. Las diferencias en los casos declarados de legionelosis entre distintas comunidades autónomas pueden deberse a las diferencias en las condiciones climáticas entre distintas regiones, como se ha comentado con anterioridad. También pueden contribuir las características físico-químicas del agua como dureza y pH elevado, ya que favorecen la presencia y proliferación de *Legionella* en el agua (Lasheras *et al.*, 2006), así como la colonización por especies de *Legionella* virulentas. Por otra parte, la introducción de la inmunocromatografía como método de detección del antígeno soluble termoestable del lipopolisacárido de la pared celular de *L. pneumophila* serogrupo 1 a finales de los años 90 ha desencadenado un aumento en el diagnóstico de legionelosis. Puede que en aquellas áreas donde no se utilice dicha prueba diagnóstica de forma habitual se declaren menos casos de la infección.

Andalucía y Madrid presentaron una tasa baja de incidencia de legionelosis (alrededor de 1.5 casos de legionelosis por 100000 habitantes) durante el tiempo de estudio (CNE, 2010b). Sin embargo, en nuestro estudio, Andalucía presentó gran parte de los aislamientos obtenidos tanto en muestras procedentes de agua de consumo humano como en torres de refrigeración. Asimismo, Madrid presentó un número elevado de torres de refrigeración colonizadas por *Legionella*. En ambas comunidades, alrededor del 50% de las muestras positivas presentaron especies distintas a *L. pneumophila* serogrupo 1. Tal y como sugirió Doleans, *L. pneumophila* serogrupo

1 es más virulenta que otras especies y serogrupos de *Legionella* (Doleans *et al.*, 2004). Este es un factor que puede explicar la baja incidencia clínica declarada en estas dos comunidades, a pesar de la elevada colonización del agua de consumo humano en Andalucía y de las torres de refrigeración en la Comunidad de Madrid.

En junio del año 2006 se produjo un brote de legionelosis en Navarra, con 146 casos confirmados (Castilla *et al.*, 2008). En consecuencia, la tasa de incidencia de legionelosis de esta comunidad autónoma aumentó de 3.35 casos por 100000 habitantes en el año 2005 a 30.94 casos por 100000 habitantes en el año 2006 (CNE, 2010b). Según las investigaciones epidemiológicas, el 45% de los afectados residían en el distrito 2 de Pamplona, el 50% trabajaban en esta zona o la habían visitado durante el periodo de incubación y el 5% restante no habían transitado por esta área durante el periodo de incubación pero vivían cerca de dicho distrito (Castilla *et al.*, 2008). Es una zona céntrica donde se concentran grandes edificios que albergan parte de la actividad comercial, financiera y administrativa de la ciudad. La investigación ambiental detectó una torre de refrigeración, localizada en la sección 2 del distrito 2 de la ciudad, contaminada con una cepa *L. pneumophila* serogrupo 1 idéntica molecularmente a las aisladas en las muestras clínicas de varios pacientes (Castilla *et al.*, 2008). Sorprendentemente, en nuestro estudio se detectó la única muestra positiva de esta región procedente de una torre de refrigeración ubicada en un edificio de la sección 2 del distrito 2 de Pamplona en junio del año 2006. Se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1 a una concentración superior a 10^3 ufc/l pero los aislados no se pudieron comparar molecularmente ya que no se disponen de las cepas aisladas de las muestras respiratorias de los pacientes con legionelosis.

En nuestro estudio se analizó mensualmente el agua de consumo humano procedente de la red de suministro municipal de Alcoy (Comunidad Valenciana). Esta población es una de las zonas donde se han producido más brotes de legionelosis (Fernández *et al.*, 2002), habiéndose registrado más de 15 brotes desde 1999 con casi 400 casos. En ningún momento de este trabajo se detectó la bacteria en el agua de consumo humano. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en la

investigación epidemiológica que se realizó en el brote ocurrido en agosto del año 2009, donde no se detectó la bacteria ni en la red de agua potable, ni en las torres de refrigeración de la población, ni en los domicilios de los pacientes. Curiosamente, durante el estudio epidemiológico se comprobó mediante la técnica de “*sequence based typing*” (SBT) que el perfil alélico de las cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1 aisladas en las muestras clínicas era idéntico al de la cepa de *L. pneumophila* serogrupo 1 aislada en los depósitos de las máquinas pavimentadoras que trabajaban en las calles del centro de la ciudad (Coscollá *et al.*, 2010). Estas máquinas generan aerosoles que están en contacto directo con las personas en las áreas urbanas. En este caso, el agua utilizada procedía de un manantial natural cuya agua no estaba tratada (Coscollá *et al.*, 2010).

Variabilidad genética y persistencia de las cepas ambientales.

La variabilidad genética y la persistencia clonal son conceptos importantes en epidemiología porque ayudan a determinar la fuente de infección tanto de casos esporádicos como de brotes de legionelosis. El análisis genotípico mediante electroforesis en campo de pulsos (PFGE) ha demostrado ser útil en la investigación epidemiológica de infecciones causadas por *Legionella* (Lück *et al.*, 1998; Visca *et al.*, 1999). De este modo, la demostración del mismo patrón molecular en muestras clínicas y ambientales durante un brote de legionelosis es epidemiológica y legalmente relevante. Aunque detectar la presencia y persistencia de un mismo patrón molecular en un sistema acuático no implica necesariamente estar involucrado en la aparición de la enfermedad, es interesante establecer un mapeo de patrones de *Legionella* en cada zona que ayude a determinar rápidamente la fuente de infección ante un caso o brote de la enfermedad.

Se analizaron molecularmente un total de 26 cepas aisladas en el agua de consumo humano (13 *L. pneumophila* serogrupo 1, 1 *L. pneumophila* serogrupo 2-14 y 12 *Legionella no-pneumophila*) y 153 cepas obtenidas de torres de refrigeración (86 *L.*

pneumophila serogrupo 1, 41 *L. pneumophila* serogrupo 2-14 y 26 *Legionella* no-*pneumophila*). Sorprendentemente, las 13 cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1 aisladas en el agua de consumo humano mostraron el mismo perfil molecular mediante PFGE, denominado AA en este trabajo. Estas cepas también se analizaron mediante la técnica de SBT, ya que es la técnica molecular que recomienda el EWGLI para comparar cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1. La secuencia tipo obtenida en todas las cepas, tras el análisis con la base de datos facilitada por el EWGLI, fue la ST1 que corresponde a la combinación alélica 1-4-3-1-1-1-1, a pesar de aislarse en tres comunidades autónomas distintas (Andalucía, Región de Murcia y Comunidad Valenciana) y en puntos de muestreo alejados y abastecidos por redes de distribución diferentes, tal y como se comenta en resultados. De forma similar, casi la mitad de las cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1 analizadas molecularmente procedentes de torres de refrigeración (48.8%, 42/86) mostraron el mismo patrón molecular mediante PFGE, denominado TD y siendo idéntico al patrón molecular AA observado las cepas del agua de consumo humano. Estas cepas se aislaron de 7 edificios distintos ubicados en 6 provincias de España (Huelva, Sevilla, Gerona, Madrid, Palma de Mallorca y Murcia). Los estudios de Casini y Ginevra (Casini *et al.*, 2008; Ginevra *et al.*, 2009) indican que los resultados obtenidos mediante PFGE y SBT se correlacionan al 100%. Con esta premisa se puede aceptar que el patrón electroforético TD observado en las cepas aisladas en las torres de refrigeración corresponde también a la ST1. De este modo, se pone de manifiesto que la cepa de *L. pneumophila* serogrupo 1 con patrones moleculares AA/TD y perfil ST1 está ampliamente distribuida por toda la geografía española tanto en el agua de consumo humano como torres de refrigeración.

Nuestras observaciones están de acuerdo con la base internacional de datos facilitada por el “European Working Group for *Legionella* Infections” (EWGLI) donde se informa que esta secuencia es la más observada tanto en muestras clínicas como en muestras ambientales. Un estudio realizado con 84 aislamientos de muestras clínicas de *L. pneumophila* serogrupo 1 procedentes de la colección de cepas del Instituto

de Microbiología de Dresden demostró que el 23.8% de las cepas presentaron dicho perfil alélico (Borchardt *et al.*, 2008). Varios estudios mostraron que la ST1 fue también el perfil alélico predominante en cepas ambientales procedentes de sistemas artificiales. Un trabajo realizado en Canadá con 73 cepas ambientales procedentes de torres de refrigeración, sistemas de distribución de agua potable de edificios, aviones y barcos demostró que el 34.2% de las cepas analizadas correspondían a dicho perfil (Reimer *et al.*, 2010). También se detectó como secuencia mayoritaria en un estudio realizado en Inglaterra y en el País de Gales en el que se analizaron 276 muestras procedentes del muestreo rutinario de sistemas acuáticos artificiales (Harrison *et al.*, 2009). Otros resultados que constatan la prevalencia de la ST1 entre cepas procedentes de muestras clínicas y de muestras ambientales fueron los obtenidos con la investigación epidemiológica realizada tras un brote de legionelosis ocurrido en Italia en el año 2005 en la que se detectó el perfil ST1 (Scaturro *et al.*, 2005). Eso quiere decir, que la cepa de *L. pneumophila* serogrupo 1 aislada con mayor frecuencia en las muestras clínicas es idéntica a la cepa aislada mayoritariamente en el ambiente.

El predominio clínico de cepas de *L. pneumophila* con determinados perfiles alélicos mediante la técnica de SBT sugiere una mayor capacidad de estas cepas para provocar la infección (Borchardt *et al.*, 2008). Aunque no hay datos que relacionen la patogenicidad de *L. pneumophila* con la presencia o ausencia de elementos genéticos establecidos, es razonable asumir que estos clones son más virulentos que otros (Harrison *et al.*, 2007). Reimer, por su parte, sugiere que la elevada prevalencia del ST1 entre las cepas aisladas de pacientes se puede deber, al menos en parte, a la capacidad que poseen estos clones para colonizar y propagarse en los ambientes acuáticos manipulados por el hombre, ya que se ha observado una mayor prevalencia de estas cepas entre los ambientes acuáticos artificiales (34.2%) que entre fuentes acuáticas naturales (7.7%) (Reimer *et al.*, 2010). También se podría explicar esta prevalencia clínica si se asume que la cepa de *L. pneumophila* serogrupo 1 con dicho perfil fuera más resistente a los tratamientos de desinfección, de esta forma se encontraría con mayor frecuencia entre ambientes acuáticos y consecuentemente

sería la principal cepa aislada entre muestras clínicas (Harrison *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta dos estudios publicados recientemente en los que se sugiere que la colonización de los sistemas de distribución de agua de edificios en particular por *L. pneumophila* serogrupo 1 con determinadas ST puede provocar serios problemas de salud pública (García-Nuñez *et al.*, 2009; Harrison *et al.*, 2009), se deberían aplicar las medidas de control necesarias en los sistemas de distribución de agua potable, no sólo en respuesta de un caso esporádico o un brote de legionelosis, sino de forma regular para controlar la infección e impedir la transmisión de la enfermedad. Sobre todo porque la ST1, cepa aislada con mayor frecuencia de muestras clínicas según datos recientes (Reimer *et al.*, 2010), está ampliamente distribuida en las muestras ambientales analizadas en este estudio por toda España.

Los resultados obtenidos mediante el estudio molecular de *L. pneumophila* serogrupo 1 coinciden con las observaciones realizadas previamente por Darelid, quien identificó el mismo patrón molecular de *L. pneumophila* serogrupo 1 mediante AFLP en 3 de 6 hospitales suecos localizados en un área de 100 Km (Darelid *et al.*, 2004). De la misma forma, Lawrence describió una amplia distribución de un mismo patrón electroforético de *L. pneumophila* serogrupo 1 en el área de París, en que el 25% (15/64) de los aislados ambientales obtenidos de los 43 puntos analizados demostraron el mismo patrón molecular (Lawrence *et al.*, 1999). Además, otros estudios posteriores identificaron como idénticos o similares los patrones electroforéticos encontrados en los aislados clínicos de *L. pneumophila* serogrupo 1 procedentes de grandes áreas geográficas de Francia y los EE.UU., respectivamente, sugiriendo que algunas de estas cepas están ampliamente distribuidas en el ambiente (Aurell *et al.*, 2003; Drenning *et al.*, 2001). Sin embargo, nuestros datos contrastan con los estudios previos realizados por Sánchez en los que se observó una gran variabilidad de patrones PFGE de *L. pneumophila* serogrupo 1 en los sistemas de distribución de agua de los hospitales de Cataluña, este resultado todavía discrepa más del nuestro si se tiene en cuenta la pequeña área geográfica donde se realizaron las investigaciones (Sánchez *et al.*, 2008). Un estudio realizado en 10 torres de refrigeración localizadas en

Japón mostró 30 patrones electroforéticos diferentes de *L. pneumophila* serogrupo 1, corroborando así, y contrastando con nuestros resultados, una amplia diversidad genética (Amemura-Maekawa *et al.*, 2005). Destacan las discrepancias en cuanto a la variabilidad genética de *L. pneumophila* serogrupo 1, concretamente, al comparar nuestros resultados con los obtenidos por Sánchez (Sánchez *et al.*, 2008). Resulta interesante observar que en distintas áreas geográficas de España se detectó con frecuencia la misma cepa de *L. pneumophila* serogrupo 1 y en un área concreta de España se demostró lo contrario, una gran variabilidad genética. Es lógico justificar estas diferencias si se hubiera realizado el análisis molecular con distintas técnicas moleculares, con distinta capacidad de discriminación. Sin embargo, el estudio molecular de ambos trabajos se realizó mediante la técnica de FGE para determinar el perfil molecular de las cepas. Los desinfectantes utilizados podrían explicar esta contradicción. En nuestro estudio, todas las instalaciones analizadas estuvieron tratadas con los mismos biocidas y seguían las mismas pautas de control. Puede que la cepa predominante de *L. pneumophila* serogrupo 1 sea resistente o más resistente a los biocidas utilizados que otras cepas, y consecuentemente permanezca en las instalaciones bien como única cepa o bien como cepa mayoritaria en gran parte de las torres de refrigeración. No obstante, es sólo una conjetura, ya que desconocemos cómo se han tratado las instalaciones en el estudio realizado en un área concreta de Cataluña (Sánchez *et al.*, 2008).

En cuanto al resto de serogrupos de *L. pneumophila* y especies de *Legionella no-pneumophila* se observó que las 12 cepas de *Legionella no-pneumophila* aisladas en agua de consumo humano presentaron 6 patrones moleculares distintos (AB-AF). Cabe destacar que el patrón molecular AC aparece en cuatro de las doce cepas de *Legionella no-pneumophila* analizadas. Estos aislamientos se obtuvieron en muestras recogidas en cuatro puntos distintos, 3 de ellos se localizaron en Andalucía (2 en Málaga, con la misma red de distribución, y 1 en Cádiz) y el otro se situó en Castilla La Mancha. Sin embargo, las 67 cepas de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 y *Legionella no-pneumophila* procedentes de torres de refrigeración sometidas a la in-

investigación molecular mostraron una gran variabilidad genética, encontrando incluso algunas torres de refrigeración abastecidas por la misma red de distribución y situadas en el mismo edificio que mostraron patrones electroforéticos distintos. Además, otro aspecto interesante de nuestro estudio, es la constatación que cada uno de los edificios tenía su propio patrón molecular o sus propios patrones moleculares y que no estaban relacionados en ningún caso con los de otros edificios, con la excepción de los edificios IB1t e IB3t con varias torres de refrigeración abastecidas por la misma red de distribución en los que se detectaron los mismos patrones electroforéticos. Sabriá y Garcia-Núñez (Garcia-Núñez *et al.*, 2008; Sabriá *et al.*, 2001) observaron también, en estudios realizados en torres de refrigeración hospitalarias, que cada hospital tenía un patrón molecular.

La calidad del agua o los continuos procesos de desinfección a que están sometidos los sistemas de distribución de agua podrían influir en la variabilidad genética. Debido a que esta bacteria está ampliamente distribuida en muestras ambientales y que existe una gran diversidad de especies y serogrupos de *Legionella*, es muy común aislar más de una cepa de la bacteria en muestras ambientales analizadas durante investigaciones epidemiológicas. No es por lo tanto extraño observar que diversas especies o serogrupos de *Legionella* representativos de diferentes patrones electroforéticos puedan cohabitar en la red de distribución de agua potable en el mismo edificio (Bezanson *et al.*, 1992; Lück *et al.*, 1998). Sin embargo, el 100% de los puntos de agua de consumo humano analizados y aproximadamente el 80% de las torres de refrigeración tenían un único patrón electroforético. Esto sugiere una mayor resistencia a los desinfectantes o una mayor expresión de los genes de virulencia de estas cepas, al menos ambientalmente, desplazando así y eliminando otras posibles cepas que inicialmente habían coexistido con la cepa detectada. O bien, dado que el análisis se realizó a cuatro aislados ambientales, no se puede descartar la posibilidad que otros patrones moleculares estuvieran presentes simultáneamente con los detectados.

El concepto de variabilidad genética es importante en estudios de epidemiología

cuando se declara un brote de legionelosis en la comunidad (Greig *et al.*, 2004). Los resultados de este estudio mostraron que algunos edificios presentaron varios perfiles electroforéticos simultáneamente. Esto implica, como se ha comentado anteriormente, que para realizar un estudio epidemiológico es necesario analizar molecularmente más de un aislado de cada uno de los puntos colonizados. No obstante, y a pesar de este hecho, conocer los patrones moleculares de *Legionella* en cada área geográfica podría ser clínica y epidemiológicamente significativo, siempre que se demostrara su persistencia ambiental. Esta premisa contiene por sí misma la salvedad que conlleva la detección de la cepa de *L. pneumophila* serogrupo 1 correspondiente a la ST1. Debido a su amplia distribución en el ambiente no constituiría una ventaja epidemiológica conocer “a priori” dónde se encuentra. En estos casos, la escasa variabilidad genética puede limitar los estudios epidemiológicos, que se deberían basar en estudios estadísticos para delimitar la fuente de infección más que en análisis microbiológicos. Sin embargo, puede ser interesante establecer las zonas donde está presente esta cepa, ya que se asocia con frecuencia a legionelosis, y por tanto se pueden aumentar en estas áreas tanto las inspecciones sanitarias ambientales como la necesidad de obtener un diagnóstico ante un paciente con neumonía de etiología desconocida.

Cuando un clon de *Legionella* llega a una instalación, puede sufrir un proceso de adaptación dependiendo de su habilidad para responder a presiones ambientales. Las presiones ambientales hacen que la respuesta adaptativa sea similar en áreas cercanas donde existen los mismos cambios climáticos y el mismo tipo de agua (Ragull *et al.*, 2007). De este modo, se ha observado la persistencia de un clon de *L. pneumophila* serogrupo 1 durante 17, 10 y 5 años en un hospital, un hotel y un barco, respectivamente (García *et al.*, 2008). En nuestro estudio se detectó la persistencia o aparición y/o desaparición de *L. pneumophila* serogrupo 1 en la mitad de las torres de refrigeración colonizadas a lo largo del período de estudio, a pesar del mantenimiento correcto. Del mismo modo, las cepas de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 persistieron en todas las torres de refrigeración colonizadas, excepto en tres ca-

Los lugares donde el aislamiento fue esporádico. Sin embargo, la persistencia observada de los aislamientos de *Legionella* no-*pneumophila* fue inferior a la de *L. pneumophila*. Parece que *L. pneumophila* muestra una habilidad especial para colonizar ambientes “limpios” y sobrevivir bajo condiciones de “stress” tales como elevadas temperaturas y altos niveles de biocidas (Perola *et al.*, 2005).

No se conocen los factores responsables asociados a la persistencia, así como aquellos relacionados en la aparición y/o desaparición de algunos patrones moleculares en el ambiente. Algunos autores lo han atribuido a las medidas de desinfección utilizadas (Darelid *et al.*, 2004; Perola *et al.*, 2005). Se ha demostrado la existencia de mutantes resistentes al cloro en cepas de *Legionella*. En estos casos se requiere, por tanto, utilizar altas dosis de desinfectante con largos tiempos de contacto para asegurar la desinfección, en perjuicio de los sistemas que muestran procesos de degradación de sus materiales debido a la acción oxidante de los desinfectantes. Además, el poder de los desinfectantes habitualmente empleados poseen poco poder de penetración en los biofilms y protozoos, de este modo la bacteria puede permanecer intacta tras el proceso de desinfección pudiendo liberarse para re-colonizar los sistemas (Donlan y Costerton, 2002).

Detección de los genes de virulencia *lvh* y *rtxA*.

En principio se ha relacionado la presencia y concentración de *Legionella* en instalaciones de riesgo con la posibilidad de producir la infección. No obstante, y tal como se muestra en este estudio, la erradicación completa de *Legionella* en los sistemas de distribución de agua es muy difícil con los métodos actuales de desinfección. Por tanto, la presencia y concentración de la bacteria pueden ser indicadores necesarios pero no suficientes para determinar el riesgo de infección. Un factor que podría considerarse como marcador del riesgo potencial de una instalación para producir infección está relacionado con las diferencias genéticas entre especies y serogrupos que colonizan dicha instalación, ya que estas diferencias pueden afectar a la capacidad de supervivencia de *Legionella* en el ambiente y a la capacidad de causar la in-

fección (Samrakandi *et al.*, 2002). Algunos estudios han sugerido que determinados genes de virulencia están relacionados con la infectividad potencial de una cepa y, por lo tanto, se pueden utilizar como indicadores de riesgo para producir la enfermedad (Huang *et al.*, 2006). El conocimiento de determinados genes de virulencia de los aislados ambientales de *Legionella* podría ser muy útil para evaluar el riesgo de legionelosis en una zona geográfica concreta.

La patogenicidad de *Legionella* se asocia a ciertos genes de virulencia. Entre ellos se incluyen el sistema de secreción tipo IV *icm/dot* (Vogel y Isberg, 1999), *tra1* (Samrakandi *et al.*, 2002) y *lvh* (Segal *et al.*, 1999); tipo IV “pilus genes” *pi/DE* (Fields *et al.*, 2002), y otros genes como *mip* (“macrophage infectivity potentiator”) (Cianciotto *et al.*, 1989), *rtxA*, y *enhC*, necesarios para la interacción de *Legionella* con la célula huésped (Cirillo *et al.*, 2000). También se ha identificado otros “loci” como *mak* (“macrophage killing”), *mil* (“macrophage-specific infectivity loci”) y *pmi* (“protozoan and macrophage infectivity”) (Fields *et al.*, 2002). El estudio realizado por Samrakandi (Samrakandi *et al.*, 2002) demostró que las cepas que presentan los genes *lvh* y *rtxA* están implicadas con mayor frecuencia en la producción de infección que aquellas que no poseen dichos genes. El gen *lvh* es necesario para el crecimiento intracelular en macrófagos humanos y protozoos y el gen *rtxA* es importante para el ataque a los monocitos y células epiteliales, la citotoxicidad y el crecimiento intracelular. A partir de las consideraciones de Samrakandi se han realizado varios estudios para determinar la relación entre la virulencia y los distintos patrones moleculares de cepas ambientales y clínicas de *L. pneumophila* serogrupo 1 obtenidos mediante AFLP, estudiando la presencia o ausencia de los genes *lvh* y *rtxA* (Huang *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2006). En estos estudios se observó que el patrón dominante entre los aislados de muestras clínicas y ambientales era el mismo y presentaba los dos genes de virulencia. Además, se observó la persistencia de dicho clon durante más de 10 años. Por otra parte, el segundo perfil detectado con mayor frecuencia en muestras ambientales no se detectó en muestras clínicas y no presentó los genes de virulencia investigados. Estos datos apoyan la hipótesis que las cepas con ambos

genes parecen ser más virulentas y capaces de provocar la infección, tal y como sugirió Samrakandi (Samarakandi *et al.*, 2002).

Por este motivo se buscó la presencia de estos dos genes de virulencia en 13 cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1 (1 cepa aislada en agua de consumo humano y 12 en torres de refrigeración), en 8 cepas de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 (1 cepa aislada en agua de consumo humano y 7 en torres de refrigeración) y en 14 *Legionella no-pneumohila* (5 cepas aisladas en agua de consumo humano y 9 en torres de refrigeración). Se detectó la presencia de ambos genes en 8 de las 13 cepas analizadas de *L. pneumophila* serogrupo 1 y se detectó uno de los dos genes estudiados en 2 de las 13 cepas analizadas de *L. pneumophila* serogrupo 1. El estudio de los genes de virulencia para *L. pneumophila* serogrupo 2-14 mostró la presencia de ambos genes en 4 de las 8 cepas analizadas y 3 cepas de las 8 cepas analizadas presentaron un sólo gen. Sin embargo, únicamente 2 cepas de *Legionella no-pneumohila* presentaron el gen *lvh*, el resto de cepas no presentaron ninguno de los dos genes analizados. Según estos resultados, parece que el grado de virulencia se correlaciona con *L. pneumophila* y más concretamente con el serogrupo 1. Diversos estudios implican a *L. pneumophila* como agente etiológico del 90% de los casos de legionelosis acontecidos en Europa y América (Benin *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002) y a *L. pneumophila* serogrupo 1 como responsable de alrededor del 80% de estos casos (Helbig *et al.*, 2002). Consecuentemente, se ha formulado la hipótesis que el serogrupo 1 es más virulento que otros serogrupos de la especie *L. pneumophila* (Alli *et al.*, 2003; Luck *et al.*, 1994). Así, no existe una asociación entre los aislados ambientales obtenidos en este estudio y las especies asociadas a casos clínicos, principalmente en lo que respecta a *Legionella no-pneumohila*. De acuerdo con las observaciones de Doleans, la baja incidencia de *Legionella no-pneumohila* entre aislados clínicos asociada a su elevada frecuencia ambiental implica que estas especies son menos virulentas y patogénicas que *L. pneumophila* serogrupo 1 (Doleans *et al.*, 2004). Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar la virulencia de *Legionella no L. pneumophila* serogrupo 1. En el caso que las especies o serogrupos distintos de *L. pneu-*

mophila serogrupo 1 sean virulentos y capaces de provocar infección en humanos, sería necesario aplicar métodos de laboratorio distintos a la ICT para el diagnóstico de legionelosis, porque esta técnica sólo detecta *L. pneumophila* serogrupo 1. Por otra parte, si se demostrara que especies y serogrupos de *Legionella* distintos a *L. pneumophila* serogrupo 1 no son capaces de provocar infección en humanos o su capacidad de infección es menor, en las áreas geográficas donde no se aislara *L. pneumophila* serogrupo 1, como por ejemplo en Cádiz, no sería necesario realizar el diagnóstico de legionelosis de forma rutinaria.

Legionella es capaz de sobrevivir en ambientes acuáticos bajo condiciones de “stress” tales como elevadas temperaturas, altas concentraciones de biocidas, radiaciones ultravioletas, pH extremo y ausencia o limitación de nutrientes. La bacteria posee estrategias para adaptarse y poder vivir bajo estas condiciones ambientales. Entre estas habilidades destaca la capacidad de vivir en un estado viable pero no cultivable, la multiplicación en el interior de protozoos, la supervivencia como organismo libre en el biofilm e inhibir la presencia de otras bacterias. Estas condiciones ambientales extremas en los sistemas de distribución de agua colonizados por *Legionella* activan la expresión o aumentan las características de virulencia de *Legionella* en estudios “in vitro” (Byrne y Swanson, 1998). Esto se traduce como un aumento en la patogenicidad para infectar células humanas. Por lo tanto, las condiciones adversas en el ambiente acuático podrían aumentar los caracteres de virulencia y, por consiguiente, inducir un crecimiento o multiplicación mayor del patrón más virulento que desplazaría a los otros, pudiendo producir un brote de legionelosis. De hecho, algunos autores han sugerido la importancia de la virulencia de la cepa en la aparición de casos de legionelosis nosocomial, ya que el aislado de la muestra clínica se corresponde genótipicamente con la cepa más virulenta en aquellos hospitales colonizados con más de un genotipo de la bacteria (Bezanson *et al.*, 1994; Bollin *et al.*, 1985). Siguiendo esta hipótesis, el 38.5% de los puntos de agua de consumo humano y el 49% de las torres de refrigeración investigados en nuestro estudio pueden ser focos potenciales de infección porque las cepas detectadas en ellos presentaron *Legione-*

lla con ambos genes de virulencia, *lvh* y *rtxA*. Resultados similares se observaron en dos estudios realizados en Australia y en Malasia donde el 57.7% y 57.6% de las torres de refrigeración estudiadas estaban contaminadas por cepas con los genes *lvh* y *rtxA* (Arushothy y Ahmad, 2008; Huang *et al.*, 2004).

Estudio clínico-epidemiológico.

Como parte de nuestro trabajo se realizó un estudio con el fin de detectar la presencia de *Legionella* en el domicilio de una paciente que falleció de legionelosis en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. La paciente era una mujer de 44 años con enfermedad del tejido conectivo con características de lupus eritematoso sistémico que acudió al hospital en septiembre de 2008 por presentar fiebre, tos no productiva y malestar generalizado. La prueba de antígenuria solicitada por el Servicio de Urgencias fue positiva para *L. pneumophila* serogrupo 1. Al quinto día se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1 en el cultivo del lavado bronquial. La paciente falleció tras su primer día en el hospital.

Cinco días después del fallecimiento, se llevó a cabo una investigación epidemiológica centrada en el domicilio de la paciente de forma independiente a la investigación realizada por los técnicos de sanidad ambiental. Se tomaron dos muestras del domicilio. El agua procedía de los grifos de agua caliente de la cocina y de la ducha. Las muestras se analizaron, como se comenta en material y métodos, para el aislamiento y recuento de *Legionella*. Los análisis revelaron la presencia de *L. pneumophila* serogrupo 1 en las dos muestras de agua procedentes de la casa de la paciente, ambas a concentraciones superiores a 10^4 ufc/l. El análisis molecular mediante la técnica de PFGE y SBT reveló el mismo patrón electroforético y el mismo perfil alélico en la cepa aislada del lavado bronquial de la paciente y en las dos muestras de agua tomadas de su domicilio. Asimismo, se compararon estas cepas con algunos de los aislamientos ambientales obtenidos en Murcia durante el periodo de estudio (2006-2008). Estas cepas se aislaron en el agua de consumo humano del punto MU1a en agosto de 2007 y en las torres de refrigeración del edificio MU1t

en octubre de 2007 y diciembre de 2008. Los estudios moleculares mostraron que los patrones electroforéticos obtenidos mediante la técnica de PFGE y los perfiles moleculares hallados mediante la técnica de SBT fueron también indistinguibles, es decir se detectó el patrón electroforético AA/TD, según la nomenclatura utilizada en nuestro trabajo, y el perfil molecular ST1. Estos resultados indican que el agua del domicilio de la paciente fue, con toda probabilidad, la fuente de infección del caso de legionelosis descrito en resultados y que la cepa de *L. pneumophila* serogrupo 1 responsable del caso mortal procedía de la red de distribución de agua potable que abastece a todo el municipio de Murcia. Este clon se detectó en un edificio público del centro de la ciudad en los análisis realizados durante el estudio ambiental y en el domicilio de la paciente. Entre ambos edificios existe una distancia de unos 5-6 Km, aunque el suministro de agua potable es el mismo. Lo cual quiere decir, que una población importante susceptible de adquirir la enfermedad puede estar continuamente expuesta a esta cepa. Estudios previos han identificado al agua de consumo humano de los domicilios de los pacientes como la fuente de infección de casos de legionelosis, principalmente en pacientes inmunodeprimidos (Luck *et al.*, 2008; Mineshita *et al.*, 2005). Sin embargo, como se ha comentado, *L. pneumophila* serogrupo 1 con ST1 está ampliamente distribuida en el ambiente y cuando sea la responsable de casos de legionelosis puede resultar más difícil identificar la fuente de infección. Según Borchard, su predominio entre muestras clínicas se podría explicar por su mayor capacidad para producir infección (Borchardt *et al.*, 2008). Otros autores sugieren que la elevada prevalencia de *L. pneumophila* serogrupo 1 con dicho perfil molecular se puede deber a la capacidad que poseen estos clones para colonizar y propagarse en los ambientes acuáticos (Reimer *et al.*, 2010) o por su alta resistencia a los tratamientos de desinfección (Harrison *et al.*, 2009). Aunque no se puede conocer el tiempo que estuvo la cepa en la red interna de distribución de agua del edificio antes de producirse la infección, dada la naturaleza de la cepa, se puede asumir que este clon ha permanecido en el sistema de agua potable de Murcia. Además, durante el estudio, se observó que *L. pneumophila* serogrupo 1 con perfil molecular ST1 fue

capaz de persistir en las torres de refrigeración analizadas, a pesar de los controles y tratamientos microbiológicos realizados según se establece en el RD 865/2003 (BOE, 2003a), desde octubre de 2007 hasta noviembre de 2008. Por tanto, esta cepa ha demostrado una mejor adaptación a los nichos ecológicos estudiados. Se debe añadir que, en nuestro caso, *L. pneumophila* serogrupo 1 con ST1 ha provocado la muerte de una paciente. Así pues, conviene resaltar que en este trabajo se observó una amplia distribución y persistencia de dicha cepa virulenta, en general, por toda la geografía española, y en nuestro caso particular en el área de Murcia.

La manifestación de la enfermedad no depende únicamente de la presencia de la bacteria en los sistemas acuáticos artificiales. A pesar de que algunos clones de *L. pneumophila* serogrupo 1 están ampliamente distribuidos y además persisten en el ambiente, como se observa en este estudio, se desconoce porqué se produce en un momento determinado la infección. Parece ser que pueden influir factores tanto relacionados con la susceptibilidad del huésped como condiciones ambientales. El riesgo de contraer la enfermedad depende del estado de salud de las personas afectadas, aumentando el riesgo en inmunodeprimidos, diabéticos, pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, en personas de edad avanzada, así como en fumadores y alcohólicos (Marston *et al.*, 1994). Además, la mayoría de casos esporádicos de legionelosis mortales se describen en este tipo de pacientes (García *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 2009), por lo que podría ser una práctica interesante conocer la contaminación por *Legionella* del agua de consumo humano a la que están expuestos estos pacientes con el fin de disminuir el riesgo de infección. Por otra parte, se ha postulado, que además de la susceptibilidad del huésped, pueden intervenir algunas condiciones ambientales como una concentración elevada de la bacteria en el agua, la persistencia de un clon en el ambiente y la virulencia de la cepa (Kool *et al.*, 1999; Stout y Yu, 1997). Como se ha comentado previamente las fluctuaciones en el recuento de *Legionella* en los sistemas de agua potable hacen realmente difícil establecer una correlación entre la concentración de bacterias en muestras ambientales y el riesgo de adquisición de la enfermedad. Luck (Luck *et al.*, 2008) indica que

la contaminación de los sistemas de agua potable incluso a concentraciones inferiores de 10^3 ufc/l podrían ser relevantes en personas inmunodeprimidas, mientras que no se conoce el verdadero riesgo que supondría tales concentraciones en personas inmunocompetentes. Las concentraciones alcanzadas en el domicilio de la paciente fueron superiores a 10^3 ufc/l, lo cual puede ser significativo en la adquisición de legionelosis en personas inmunodeprimidas, como bien ilustra el caso que nos ocupa.

Otro de los factores relacionados con la infección pulmonar puede ser la expresión de determinados factores de virulencia (Alli *et al.*, 2003). Tanto la cepa aislada de la muestra respiratoria de la paciente como las cepas aisladas en las muestras de agua del estudio epidemiológico poseían los genes de virulencia *lvh* y *rtxA* y, según las indicaciones Samrakandi y Huang (Huang *et al.*, 2004; Samrakandi *et al.*, 2002), esta cepa sería potencialmente virulenta y capaz de provocar el caso mortal aquí expuesto. Por lo tanto, se debe señalar que *L. pneumophila* serogrupo 1 presente en la red de distribución de agua potable de Murcia es potencialmente virulenta, ya que se ha demostrado la persistencia y adaptación a su hábitat pudiendo desplazar a otras cepas y presenta los genes de virulencia *rtxA* y *lvh* relacionados con la aparición de la enfermedad.

Se intentó comprobar en este trabajo las posibles diferencias en la capacidad infectiva entre la cepa de la muestra clínica, las cepas aisladas en las muestras del domicilio de la paciente y los aislamientos ambientales obtenidos en Murcia durante el estudio, con el objetivo de justificar el caso mortal de legionelosis. Como se ha comentado anteriormente, estas cepas fueron genéticamente idénticas y todas ellas presentaron los genes de virulencia *rtxA* y *lvh*, por este motivo se realizó un ensayo de citopatogenicidad. Para lo cual se estudió el crecimiento intracelular de *L. pneumophila* serogrupo 1 en *Acanthamoeba polyphaga* y células U-937 de la cepa procedente de la muestra clínica (C), de una de las cepas ambientales procedente del domicilio de la paciente (D) y de dos cepas ambientales aisladas, una en agua de consumo humano (A) y otra en las torres de refrigeración (T), durante el periodo de estudio. Todas las cepas ensayadas se multiplicaron intracelularmente en *A. po-*

lyphaga y en células U-937, presentado un crecimiento intracelular similar tanto en amebas como en macrófagos. Según algunos ensayos “in vitro” (Byrne y Swanson, 1998), algunas situaciones de “stress”, tales como elevadas temperaturas, pH extremo, altas concentraciones de desinfectantes o escasos nutrientes, incrementan la virulencia de *Legionella*. Las cepas procedentes de las torres de refrigeración y del domicilio de la paciente han estado sometidas a concentraciones altas de desinfectantes en las torres de refrigeración y a temperaturas elevadas en el domicilio de la paciente, ambas condiciones desfavorables y consideradas como situaciones de “stress”. Dichas cepas, según los trabajos de Byrne (Byrne y Swanson, 1998), deberían ser más virulentas que los aislamientos procedentes del agua de consumo humano. Bien el efecto de la temperatura, bien los biocidas o bien algún otro factor o condición desconocido que se hubiera presentado en el domicilio de la paciente podrían aumentar la patogenicidad de las bacterias para infectar a las células humanas y causar el caso mortal de legionelosis descrito en esta memoria. Sin embargo, no se ha detectado ninguna diferencia en la infección de *A. polyphaga* y de células U-937 entre las cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1 ensayadas procedentes de distintos orígenes. Estos datos son similares a los obtenidos por García, donde se observa que las cepas precedentes de muestras clínicas y las cepas relacionadas procedentes de muestras ambientales mostraron una multiplicación similar en *A. polyphaga* (García *et al.*, 2007). De este modo, dado que el agua de consumo humano de Murcia presenta altas concentraciones de *L. pneumophila* serogrupo 1, cabría esperar un número mayor de casos comunitarios de legionelosis, principalmente en pacientes que presenten factores de riesgo. Por tanto, nuestros resultados sugieren que el origen del aislamiento no afecta a la replicación intracelular en *A. polyphaga* y U-937 y en el estado actual de conocimiento puede que los estudios de citopatogenicidad y la detección de los genes de virulencia no sean suficientes para determinar la capacidad infectiva y la virulencia de determinadas cepas de *Legionella* en humanos. En este estudio se ha detectado la presencia de *Legionella* a elevadas concentraciones en el agua de consumo humano que entra directamente a los edificios a través

de la red de distribución municipal y en las torres de refrigeración de España, aún estando mantenidas correctamente. Como consecuencia, la comunidad está expuesta continuamente a la bacteria. Este hecho constituye un riesgo potencial de transmisión de la legionelosis, especialmente en personas que presenten factores predisponentes. Aunque sólo se producen casos o brotes de legionelosis en algunas ocasiones, y hasta que no se conozcan con exactitud las causas que determinan el aumento de patogenicidad de *Legionella* y la aparición de la enfermedad, se deberían extremar las medidas control y prevención de la legionelosis en el agua de consumo humano; y de esta forma, disminuir las posibilidades de infección y a su vez minimizar las implicaciones epidemiológicas y legales que suponen esta enfermedad.

6. Conclusiones

1. *Legionella* se detectó en el 20.3% de los puntos de muestreo de la red de distribución de agua potable y en el 37.2% de la torres de refrigeración, aún estando mantenidas correctamente siguiendo los criterios higiénico-sanitarios establecidos por la legislación española. De éstas, en el 56.5% se aisló *Legionella* en más de una ocasión.
2. *Legionella* se detectó en el agua de consumo humano únicamente en la zona sur y este de España y en la mayoría de las torres de refrigeración situadas en diferentes áreas geográficas.
3. Los aislamientos de *Legionella* se obtuvieron principalmente en verano y otoño, observándose además las concentraciones más elevadas en estas épocas.
4. Las concentraciones de *Legionella* superaron las 10^3 ufc/l en el 46.4% de las muestras positivas obtenidas en agua de consumo humano y en el 38.3% de las muestras positivas obtenidas en torres de refrigeración.
5. Tanto en agua de consumo humano como en torres de refrigeración, la especie predominante fue *L. pneumophila*, siendo el serogrupo 1 el más frecuente y el genotipo ST1 el mayoritario. Por su parte, los aislados de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 y *Legionella no-pneumophila* en torres de refrigeración presentaron una gran diversidad genética.
6. *L. pneumophila*, principalmente *L. pneumophila* serogrupo 1, persistió durante varios meses en la mitad de los puntos de agua de consumo humano y de las torres de refrigeración.
7. En el 81% de las cepas de *L. pneumophila* y en el 14.3% de las cepas de *Legionella no-pneumophila* se detectaron los genes de virulencia *lvh* y/o *rtxA*.
8. El agua de consumo humano fue la fuente de infección de un caso de legionelosis mortal ocurrido en Murcia. Además, no se encontraron diferencias en la capacidad de replicación intracelular en *A. polyphaga* y células “*macrophages-like* U-937” entre los aislamientos procedentes de muestras clínicas y muestras ambientales, lo que hace pensar de la posible importancia del agua de consumo humano como reservorio y fuente de infección, especialmente en pacientes inmunodeprimidos.

Anexo 1. Puntos de muestreo de agua de consumo humano: localización y resumen de resultados.

C. autónoma	Ciudad	Punto de muestreo	Especie	Fecha aislamiento	[] (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
Andalucía	Dos Hermanas	A1a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ene, feb, may, jun, jul, ago, sep, oct, nov 2006. may' 2008	50->10000	AA ¹	<i>lvh+rtxA+¹</i>
Andalucía	Málaga	A2a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	abr, jul 2006	330-6000	ND	ND
Andalucía	Marbella	A3a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	ene ¹ , mar ¹ , may ¹ 2007	1800->10000	AB ¹	<i>lvh-rtxA-¹</i>
Andalucía	Marbella	A4a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	abr 2007	300	AC	<i>lvh-rtxA-</i>
Andalucía	Marbella	A4a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	ago 2006. nov ¹ 2007	1200-4900	AC ¹	<i>lvh-rtxA-¹</i>
Andalucía	Jerez de la Frontera	A5a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	ago 2006. nov ¹ 2007	200	AC	<i>lvh-rtxA-</i>
Andalucía	Córdoba	A6a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	abr 2006	600	ND	ND
Andalucía	Córdoba	A6a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	ene 2006	900	ND	ND
Andalucía	Córdoba	A6a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jun, oct 2006. abr ¹ , oct ¹ , dic ¹ 2007	100->10000	AD ¹	<i>lvh-rtxA-¹</i>
Andalucía	Andújar	A7a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	ene 2008	50	AF	<i>lvh-rtxA-</i>
Andalucía	San Juan de Aznalfarache	A8a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	nov 2006. ene ¹ 2007	400-2100	AG ¹	<i>lvh+rtxA-¹</i>
Andalucía	Cádiz	A9a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	abr, ago, oct 2006	1000->10000	ND	ND
Andalucía	Algeciras	A10a	-	-	-	-	-
Andalucía	Jerez de la Frontera	A11a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	mar 2006	100	ND	ND
Andalucía	San Roque	A12a	-	-	-	-	-
Andalucía	San Fernando	A13a	-	-	-	-	-
Andalucía	Córdoba	A14a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	oct 2006	55	ND	ND
Andalucía	Granada	A15a	-	-	-	-	-

C. autónoma	Ciudad	Punto de muestreo	Especie	Fecha aislamiento	[] (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
Andalucía	Genil	A16a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	oct 2006	100	ND	ND
Andalucía	Jaén	A17a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	oct 2006	1400	ND	ND
Andalucía	Linares	A18a	-	-	-	-	-
Andalucía	Jaén	A19a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	oct 2006	650	ND	ND
Andalucía	Huelva	A20a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	abr, jun, nov 2006. ene, may 2007. ene 2008.	110-2000	ND	ND
Andalucía	Málaga c.c.	A21a	-	-	-	-	-
Andalucía	Málaga c.c.	A22a	-	-	-	-	-
Andalucía	Málaga c.c.	A23a	-	-	-	-	-
Andalucía	Málaga c.c.	A24a	-	-	-	-	-
Andalucía	Málaga p.i.	A25a	-	-	-	-	-
Andalucía	Coín	A26a	-	-	-	-	-
Andalucía	Mijas	A27a	-	-	-	-	-
Andalucía	Fuengirola	A28a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	feb 2008	490	ND	ND
Andalucía	San Pedro Alcántara	A29a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	sep 2006	440	ND	ND
Andalucía	San Pedro Alcántara	A30a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	abr 2006	50	ND	ND
Andalucía	Estepona	A31a	-	-	-	-	-
Andalucía	Marbella	A32a	-	-	-	-	-
Andalucía	Marbella	A33a	-	-	-	-	-
Andalucía	Sevilla c.c.	A34a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	abr 2006	820	ND	ND

C. autónoma	Ciudad	Punto de muestreo	Especie	Fecha aislamiento	[] (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
Andalucía	Sevilla c.c.	A35a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ene, may, jun, jul, ago, sep, oct 2006	200->10000	ND	ND
Andalucía	Sevilla c.c.	A36a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ene, may 2006	350-650	ND	ND
Andalucía	Sevilla c.c.	A37a	-	-	-	-	-
Andalucía	Sevilla c.c.	A38a	-	-	-	-	-
Andalucía	Sevilla c.c.	A39a	-	-	-	-	-
Andalucía	Sevilla p.i.	A40a	-	-	-	-	-
Andalucía	Castilleja de la Cuesta	A41a	-	-	-	-	-
Aragón	Zaragoza c.c.	AR1a	-	-	-	-	-
Aragón	Zaragoza c.c.	AR2a	-	-	-	-	-
Aragón	Zaragoza c.c.	AR3a	-	-	-	-	-
Aragón	Zaragoza p.i.	AR4a	-	-	-	-	-
Asturias	Oviedo	AS1a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	jun, oct 2006	100-1100	ND	ND
Asturias	Oviedo	AS2a	-	-	-	-	-
Asturias	Oviedo	AS3a	-	-	-	-	-
Asturias	Oviedo	AS4a	-	-	-	-	-
Asturias	Gijón	AS5a	-	-	-	-	-
Asturias	Gijón	AS6a	-	-	-	-	-
Asturias	Gijón	AS7a	-	-	-	-	-
Asturias	Gijón	AS8a	-	-	-	-	-
Asturias	Gijón	AS9a	-	-	-	-	-
Asturias	Avilés	AS10a	-	-	-	-	-
Cantabria	Santander	C1a	-	-	-	-	-

C. autónoma	Ciudad	Punto de muestreo	Especie	Fecha aislamiento	[] (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
Castilla-León	Burgos	CL1a	-	-	-	-	-
Castilla-León	Burgos	CL2a	-	-	-	-	-
Castilla-León	León	CL3a	-	-	-	-	-
Castilla-León	León	CL4a	-	-	-	-	-
Castilla-León	Valladolid	CL5a	-	-	-	-	-
Castilla-León	Valladolid	CL6a	-	-	-	-	-
Castilla la Mancha	Toledo	CM1a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	abr ¹ 2007, may 2008	50-1400	AC ¹	<i>lvh-rtxA-1</i>
Castilla la Mancha	Talavera de la Reina	CM2a	-	-	-	-	-
Castilla la Mancha	Albacete	CM3a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	ago 2006	3500	ND	ND
Castilla la Mancha	Albacete	CM4a	-	-	-	-	-
Castilla la Mancha	Albacete	CM5a	-	-	-	-	-
Castilla la Mancha	Guadalajara	CM6a	-	-	-	-	-
Cataluña	Barcelona c.c.	CT1a	-	-	-	-	-
Cataluña	Barcelona c.c.	CT2a	-	-	-	-	-
Cataluña	Barcelona c.c.	CT3a	-	-	-	-	-
Cataluña	Barcelona c.c.	CT4a	-	-	-	-	-
Cataluña	Barcelona c.c.	CT5a	-	-	-	-	-
Cataluña	Barcelona c.c.	CT6a	-	-	-	-	-
Cataluña	Barcelona p.i	CT7a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	ene 2007	330	ND	ND
Cataluña	Barcelona p.i.	CT8a	-	-	-	-	-
Cataluña	Sabadell	CT9a	-	-	-	-	-
Cataluña	Cornellá	CT10a	-	-	-	-	-

C. autónoma	Ciudad	Punto de muestreo	Especie	Fecha aislamiento	[] (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
Cataluña	Gerona	CT11a	-	-	-	-	-
Extremadura	Badajoz	E1a	-	-	-	-	-
Extremadura	Badajoz	E2a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	mar, jun, jul, ago, sep, oct, nov, dic 2006.	50->10000	ND	ND
			<i>Legionella no-pneumophila</i>	jul, sep, nov, dic 2006	700-900	ND	ND
Extremadura	Cáceres	E3a	-	-	-	-	-
Galicia	La Coruña	G1a	-	-	-	-	-
Galicia	La Coruña	G2a	-	-	-	-	-
Galicia	Santiago de Compostela	G3a	-	-	-	-	-
Galicia	El Ferrol	G4a	-	-	-	-	-
Galicia	Vigo	G5a	-	-	-	-	-
Galicia	Pontevedra	G6a	-	-	-	-	-
Baleares	Mallorca	IB1a	-	-	-	-	-
Baleares	Mallorca	IB2a	-	-	-	-	-
Baleares	Mallorca	IB3a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M1a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M2a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M3a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M4a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M5a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M6a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M7a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M8a	-	-	-	-	-

C. autónoma	Ciudad	Punto de muestreo	Especie	Fecha aislamiento	[] (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
C. Madrid	Madrid c.c.	M9a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M10a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M11a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M12a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M13a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M14a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M15a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M16a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M17a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M18a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M19a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid p.i.	M20a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid p.i.	M21a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid p.i.	M22a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid p.i.	M23a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid p.i.	M24a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid p.i.	M25a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid p.i.	M26a	-	-	-	-	-
C. Madrid	El Escorial	M27a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Boadilla del Monte	M28a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Alcalá de Henares	M29a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Alcalá de Henares	M30a	-	-	-	-	-

C. autónoma	Ciudad	Punto de muestreo	Especie	Fecha aislamiento	[] (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
C. Madrid	Arroyomolinos	M31a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Alcorcón	M32a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	sep 2006	350	ND	ND
C. Madrid	Alcorcón	M33a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Leganés	M34a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Leganés	M35a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Getafe	M36a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Valdemoro	M37a	-	-	-	-	-
C. Madrid	Valdemoro	M38a	-	-	-	-	-
R. Murcia	Murcia	MU1a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	mar ¹ , ago ¹ 2007	930-1100	AA ¹	<i>lvh+rtxA+</i>
R. Murcia	Murcia	MU2a	-	-	-	-	-
R. Murcia	Molina de Segura	MU3a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ago ¹ , sep ¹ 2007, may 2008	100->10000	AA ¹	<i>lvh+rtxA+</i>
R. Murcia	Molina de Segura	MU3a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	may 2008	440	ND	ND
R. Murcia	Cartagena	MU4a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	sep 2006	1100	ND	ND
Navarra	Pamplona	N1a	-	-	-	-	-
Navarra	Huarte	N2a	-	-	-	-	-
País Vasco	Bilbao	PV1a	-	-	-	-	-
País Vasco	Bilbao	PV2a	-	-	-	-	-
País Vasco	Galdácano	PV3a	-	-	-	-	-
País Vasco	Vitoria	PV4a	-	-	-	-	-
C. Valenciana	Alicante c.c.	V1a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	may, jul 2006, abr ¹ , may ¹ , jun ¹ , sep ¹ 2007	200->10000	AA ¹	<i>lvh+rtxA+</i>
C. Valenciana	Petrer	V2a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	sep ¹ , oct ¹ , nov ¹ , dic ¹ 2007	5000->10000	AA ¹	<i>lvh+rtxA+</i>

C. autónoma	Ciudad	Punto de muestreo	Especie	Fecha aislamiento	[] (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
C. Valenciana	Alicante c.c.	V3a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	jul 2006	50	ND	ND
C. Valenciana	Alicante c.c.	V4a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	ago 2007	1500	AE	<i>lvh-rtxA-</i>
C. Valenciana	Alicante p.i.	V5a	<i>Legionella no-pneumophila</i>	abr 2006	50	ND	ND
C. Valenciana	Eliche	V6a	-	-	-	-	-
C. Valenciana	Alcoy	V7a	-	-	-	-	-
C. Valenciana	Valencia c.c.	V8a	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	oct 2006	400	ND	ND
C. Valenciana	Valencia c.c.	V9a	-	-	-	-	-
C. Valenciana	Valencia c.c.	V10a	-	-	-	-	-
C. Valenciana	Valencia c.c.	V11a	-	-	-	-	-
C. Valenciana	Valencia c.c.	V12a	-	-	-	-	-
C. Valenciana	Valencia c.c.	V13a	-	-	-	-	-
C. Valenciana	Valencia c.c.	V14a	-	-	-	-	-
C. Valenciana	Valencia c.c.	V15a	-	-	-	-	-
C. Valenciana	Valencia p.i.	V16a	-	-	-	-	-
C. Valenciana	Onteniente	V17a	-	-	-	-	-
C. Valenciana	Castellón	V18a	-	-	-	-	-

[] (ufc/l), rango de concentraciones de *Legionella* en agua de consumo humano expresado en unidades formadoras de colonias por litro. c.c., centro ciudad. p.i., polígono industrial. *lvh+rtxA+*, presencia de los genes de virulencia *lvh* y *rtxA*. *lvh+rtxA-*, presencia del gen de virulencia *lvh* y ausencia del gen de virulencia *rtxA*. *lvh-rtxA+*, ausencia del gen de virulencia *lvh* y presencia del gen de virulencia *rtxA*. *lvh-rtxA-*, ausencia de los genes de virulencia *lvh* y *rtxA*. ND, no detectado.

Anexo 2. Torres de refrigeración analizadas: localización y resumen de resultados.

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	CFU (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
			T1	-	-	-	-	-
			T2	<i>Legionella no-pneumophila</i>	may ¹ , jun ¹ , ago ¹ 2007	750-1200	TR ¹	<i>lh-/rtxA-¹</i>
Andalucía	Algeciras	A1t	T3	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jun ¹ 2007	1400	TR ¹	<i>lh-/rtxA-¹</i>
			T4	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jun ¹ , ago ¹ 2007	650-1700	TR ¹	<i>lh-/rtxA-¹</i>
			T5	-	-	-	-	-
Andalucía	Córdoba	A2t	T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	jul, ago, oct, nov 2006. oct ¹ 2007. mar ² , jul ² , ago ² 2008	50->10000	TA ¹ /TB ²	<i>lh-/rtxA-¹</i> <i>lh+/rtxA+²</i>
			T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	feb, abr, oct 2006	200-650	ND	ND
			T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	oct ¹ 2007. oct ¹ 2008	1200->10000	TLL ¹	<i>lh-/rtxA+¹</i>
			T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	abr, oct, nov, dic 2006	50-600	ND	ND
Andalucía	Córdoba	A3t	T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	ago ¹ , oct ¹ 2007. ago ¹ , sep ¹ , 2008	380->10000	TLL	<i>lh-/rtxA+¹</i>
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	feb, dic 2006. ago ¹ 2008	50-650	TC ¹	<i>lh-/rtxA+¹</i>
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	feb ¹ 2007. oct ¹ 2008	750->10000	TLL	<i>lh-/rtxA+¹</i>
Andalucía	Granada	A4t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
Andalucía	Genil	A5t	T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
			T5	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	oct 2006	100	ND	ND

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	CFU (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
			T1	-	-	-	-	-
			T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ago 2007	850	TD	<i>lvh+/rtxA+</i>
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ago 2007	750	TD	<i>lvh+/rtxA+</i>
			T4	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ago 2007	1700	TD	<i>lvh+/rtxA+</i>
Andalucía	Huelva	A6t	T5	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	feb, ago 2006. ago ¹ , oct ¹ 2007. abr ¹ , ago ¹ , oct ¹ 2008	50->10000	TD ¹	<i>lvh+/rtxA+</i> ¹
			T6	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	feb, abr, ago 2006. ago ¹ 2007. oct ¹ 2008	50->10000	TD ¹	<i>lvh+/rtxA+</i> ¹
			T7	<i>Legionella no-pneumophila</i>	abr 2006	100	ND	ND
			T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ago ¹ , dic ¹ 2007. oct ¹ 2008	50-700	TD	<i>lvh+/rtxA+</i> ¹
			T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	oct 2006	350	ND	ND
			T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	oct 2006	330	ND	ND
Andalucía	Jaén	A7t	T1	NI	jul 2007	1100	ND	ND
			T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	oct 2006	800	ND	ND
			T2	<i>Legionella no-pneumophila</i>	oct 2006	160	ND	ND
			T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
Andalucía	Linares	A8t	T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	CFU (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
Andalucía	Málaga	A9t	T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	may, ago, sep, oct 2006. jun ² , jul ² , ago ¹ 2008	50-400	TD ¹ /TE ²	<i>lvh+/rtxA+¹</i> <i>lvh+/rtxA+²</i>
				<i>Legionella no-pneumophila</i>	abr 2006. jun ³ , jul ³ , ago ³ 2008	50	TS ³	<i>lvh-/rtxA-³</i>
			T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	abr ² , jul ² , ag ² , sep ² , oct ⁴ , nov ² 2008	250-200	TE ² /TF ⁴	<i>lvh+/rtxA+²</i> <i>lvh+/rtxA+⁴</i>
				<i>Legionella no-pneumophila</i>	abr 2006. sep ³ 2007. abr ³ , ago ³ 2008.	100-380	TS ³	<i>lvh-/rtxA-³</i>
Andalucía	Sevilla c.o.	A10t	T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	nov 2006	3000	ND	ND
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	oct 2006	50	ND	ND
			T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	abr, oct 2006	50	ND	ND
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	abr, oct 2006	100-150	ND	ND
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	nov 2006. ene 2007	3200->10000	ND	ND
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	abr 2006. jul 2007	200->10000	ND	ND
Andalucía	Sevilla c.o.	A11t	T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	abr 2006	200	ND	ND
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	abr 2006	200	ND	ND
			T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ene, sep, oct 2006. ene ¹ , feb ¹ 2007	50-4000	TD ¹	<i>lvh+/rtxA+¹</i>
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ene, feb, sep oct 2006. ene ¹ , feb ¹ 2007	50-2400	TD ¹	<i>lvh+/rtxA+¹</i>

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	[I] (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
Andalucía	Sevilla c.c.	A12t	T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	abr 2008	>10000	TG	<i>/vh+/rtxA+</i>
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	ago, oct, dic 2006. dic 2007. abr 2008.	150->10000	ND	ND
			T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	mar 2006	100	ND	ND
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	ene, ago, oct, dic 2006	100->10000	ND	ND
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	ene, ag, oct, dic 2006	50->10000	ND	ND
Andalucía	Sevilla p.i.	A13t	T4	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ene, mar 2006	50-2000	ND	ND
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	ago 2006	>10000	ND	ND
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	feb 2006	>10000	ND	ND
			T5	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	mar, abr, ago, nov, dic 2006	450->10000	ND	ND
Andalucía	Sevilla p.i.	A14t	T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	mar 2007	8000	ND	ND
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	mar, abr, jun, oct, nov 2006	50-950	ND	ND
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	ago, oct 2006	1100-5000	ND	ND
			T2	-	-	-	-	-
Andalucía	San Juan Aznalfrache	A14t	T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
			T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	oct 2006	55	ND	ND
			T2	<i>Legionella no-pneumophila</i>	oct 2006	50	ND	ND
Andalucía	San Juan Aznalfrache	A14t	T3	NI	dic 2006	2000	ND	ND
			T4	<i>Legionella no-pneumophila</i>	oct 2006	50	ND	ND
Andalucía	San Juan Aznalfrache	A14t	T3	<i>Legionella no-pneumophila</i>	oct 2006	50	ND	ND
			T4	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	oct 2006	50	ND	ND
Andalucía	San Juan Aznalfrache	A14t	T4	<i>Legionella no-pneumophila</i>	oct 2006	1200	ND	ND

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	CFU (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	jun 2008	2400	ND	ND
			T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	jul ¹ 2007. jul ¹ 2008	825->10000	TM ¹	<i>lh-rtxA+</i> ¹
				<i>Legionella no-pneumophila</i>	jun, jul 2006. jun 2007	100->10000	ND	ND
			T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	nov, dic 2006. ago 2008	100-700	ND	ND
				<i>Legionella no-pneumophila</i>	ago 2008	700	ND	ND
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	jun 2006	>10000	ND	ND
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	jul 2006. abr ¹ 2007	100-2000	TM ¹	<i>lh-rtxA+</i> ¹
				<i>Legionella no-pneumophila</i>	ago, sep, oct 2006	1400->10000	ND	ND
			T4	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jun, ago, sep, oct, nov 2006	3700->10000	ND	ND
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	jul 2008	>10000	ND	ND
			T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jun 2006. feb ¹ , may ¹ 2007	4000	TT ¹	<i>lh-rtxA-</i> ¹
			T2	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jun, ago 2006. feb ¹ , may ¹ 2007.	200-2800	TT ¹	<i>lh-rtxA-</i> ¹
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	jun, jul 2008	950->10000	ND	ND
				<i>Legionella no-pneumophila</i>	jun 2006. ene ¹ , feb ¹ 2007	330	TT ¹	<i>lh-rtxA-</i> ¹
			T4	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	abr 2007. jun 2008	125-300	ND	ND
				<i>Legionella no-pneumophila</i>	feb 2007	ND	TU	<i>lh-rtxA-</i>
Aragón	Zaragoza c.c.	AR1t						
Aragón	Zaragoza c.c.	AR2t						

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	CFU (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
Aragón	Zaragoza p.i.	AR3t	T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	sep 2006	3700	ND	ND
			T2	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jul 2006	1500	ND	ND
			T3	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jul, sep 2006	150-7000	ND	ND
			T4	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jul 2006	7000	ND	ND
			T5	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jul, ago 2006	50-150	ND	ND
			T6	-	-	-	-	-
			T7	-	-	-	-	-
Asturias	Oviedo	AS1t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
Asturias	Avilés	AS2t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
Cantabria	Santander	C1t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	sep 2006	150	ND	ND
			T4	-	-	-	-	-
			T5	-	-	-	-	-
Castilla-León	Burgos	CL1t	T1	-	-	-	-	-

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	CFU (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
			T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
Castilla-León	León	CL2t	T4	-	-	-	-	-
			T5	-	-	-	-	-
			T6	-	-	-	-	-
			T7	-	-	-	-	-
			T1	-	-	-	-	-
Castilla-León	Valladolid	CL3t	T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
			T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
Castilla-León	Valladolid	CL4t	T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
Castilla La Mancha	Albacete	CM1t	T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jul 2006	200	ND	ND
			T1	-	-	-	-	-
			T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	feb 2006	50	ND	ND
Cataluña	Barcelona c.c.	CT1t	T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
			T5	-	-	-	-	-
Cataluña	Barcelona c.c.	CT2t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	¶ (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
Cataluña	Barcelona c.c.	CT3t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
Cataluña	Barcelona c.c.	CT4t	T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	nov 2007	50	ND	ND
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
			T4	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	oct 2006	200	ND	ND
			T5	-	-	-	-	-
Cataluña	Barcelona p.i.	CT5t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
Cataluña	Sabadell	CT6t	T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	sep 2006	50	ND	ND
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
			T5	-	-	-	-	-
			T6	-	-	-	-	-
			T7	-	-	-	-	-

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	[] (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
Cataluña	Gerona	CT7t	T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ago ¹ , oct ¹ 2007, jun ¹ 2008	55-700	TH ¹	<i>lvh-/rtxA⁻¹</i>
				<i>Legionella no-pneumophila</i>	oct 2006	350	ND	ND
			T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ago ¹ 2007, jun ¹ 2008	50-330	TH ¹	<i>lvh-/rtxA⁻¹</i>
				<i>Legionella no-pneumophila</i>	oct 2006	600	ND	ND
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ago ¹ , oct ¹ 2007	100-300	TH	<i>lvh-/rtxA⁻¹</i>
				<i>Legionella no-pneumophila</i>	oct 2006	950	ND	ND
Extremadura	Badajoz	E1t	T4	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ago ¹ , oct ¹ 2007	500->10000	TD ¹	<i>lvh+/rtxA⁺⁺¹</i>
				NI	dic 2007	ND	ND	ND
			T5	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	oct 2007	50	ND	ND
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	ago2006	1600	ND	ND
Extremadura	Badajoz	E2t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	mar 2007	>10000	ND	ND
			T4	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	mar 2007	>10000	ND	ND
			T5	-	-	-	-	-
			T6	-	-	-	-	-
Galicia	Vigo	G1t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	CFU (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia			
Galicia	La Coruña	G2t	T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	ago 2008	50	ND	ND			
			T2	-	-	-	-	-			
			T3	-	-	-	-	-			
			T4	-	-	-	-	-			
			T5	-	-	-	-	-			
Galicia	Santiago de Compostela	G3t	T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	ago 2008	400	ND	ND			
			T2	<i>Legionella no-pneumophila</i>	ago 2008	400	ND	ND			
			T3	<i>Legionella no-pneumophila</i>	ago 2008	400	ND	ND			
Galicia	Santiago de Compostela	G3t	T4	-	-	-	-	-			
			T5	-	-	-	-	-			
			T6	-	-	-	-	-			
			T7	-	-	-	-	-			
			T8	-	-	-	-	-			
			Baleares	Mallorca	IB1t	T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	nov 2007	330	TD	<i>lvh+/rtxA+</i>
						T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	ago 2006. dic ¹ 2007. jun ² , sep ² 2008.	50-500	TN ¹ /TN ²	<i>lvh+/rtxA+¹</i> <i>lvh+/rtxA+²</i>
						T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	jun ² , sep ² 2008	200	TN ²	<i>lvh+/rtxA+²</i>
T4	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	ago 2006. jun ² , sep ² 2008				400-1300	TN ²	<i>lvh+/rtxA+²</i>			
T5	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	ago 2006. nov ¹ , dic ¹ 2007. jun ² , sep ² 2008				50-3000	TN ¹ /TN ²	<i>lvh+/rtxA+¹</i> <i>lvh+/rtxA+²</i>			
T6	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	jul, ago 2006. sep ² 2008				150-800	TN ²	<i>lvh+/rtxA+²</i>			
Baleares	Mallorca	IB2t	T1	-	-	-	-				

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	□ (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
Baleares	Mallorca	IB3t	T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	jun ³ , jul ³ , oct ³ 2008	100-500	TD ³	<i>lvh+/rtxA+³</i>
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	dic ¹ 2007. ene ¹ , oct ² 2008	250	TN ¹ /TÑ ²	<i>lvh+/rtxA+¹</i> <i>lvh+/rtxA+²</i>
				<i>Legionella no-pneumophila</i>	jun, jul 2008	>10000	ND	ND
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	May ³ 2007. jun ³ , ago ³ , oct ³ 2008	50-1500	TD ³	<i>lvh+/rtxA+³</i>
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	dic ¹ 2007. ene ¹ , oct ² 2008	550	TN ¹ /TÑ ²	<i>lvh+/rtxA+¹</i> <i>lvh+/rtxA+²</i>
C. Madrid	Madrid c.c.	M1t	T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jun, ago 2008	1200->10000	ND	ND
				T3	-	-	-	-
				T4	-	-	-	-
				T2	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M2t	T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jun, ago 2008	1200->10000	ND	ND
				T3	-	-	-	-
				T2	-	-	-	-
				T4	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M3t	T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	feb ¹ , mar ¹ , jul ¹ , ago ¹ , oct ¹ 2008	55->10000	TK ¹	<i>lvh+/rtxA-</i>
				<i>Legionella no-pneumophila</i>	oct 2008	500	ND	ND
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	feb ¹ , mar ¹ , jul ¹ , ago ¹ 2008	50->10000	TK ¹	<i>lvh+/rtxA-</i>
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ene ¹ , feb ¹ , ago ¹ 2008	250-3600	TK ¹	<i>lvh+/rtxA-</i>
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ene ¹ , feb ¹ , jul ¹ , ago ¹ 2008	200-3700	TK ¹	<i>lvh+/rtxA-</i>
C. Madrid	Madrid c.c.	M3t	T5	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	feb ¹ 2008	1200	TK ¹	<i>lvh+/rtxA-</i>
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	feb ¹ 2008	1200	TK ¹	<i>lvh+/rtxA-</i>

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	CFU (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
C. Madrid	Madrid c.c.	M4t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T1	-	-	-	-	-
			T2	<i>Legionella no-pneumophila</i>	sep 2008	>10000	TW	<i>lh+/rtxA-</i>
C. Madrid	Madrid c.c.	M5t	T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
			T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	oct 2008	>10000	ND	ND
			T1	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M6t	T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
			T5	-	-	-	-	-
			T1	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M7t	T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
			T5	-	-	-	-	-
			T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M8t	T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
			T5	-	-	-	-	-
			T6	-	-	-	-	-

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	CFU (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
			T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jul 2007	1200	TY	<i>lvh-1/rtxA-</i>
			T2	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jul 2007	2300	TY	<i>lvh-1/rtxA-</i>
			T3	<i>Legionella no-pneumophila</i>	oct 2008	4100	ND	ND
			T4	<i>Legionella no-pneumophila</i>	sep ¹ , oct ¹ 2008	500-1200	TZ ¹	<i>lvh-1/rtxA-¹</i>
			T5	-	-	-	-	-
			T6	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M9t	T7	-	-	-	-	-
			T8	-	-	-	-	-
			T9	-	-	-	-	-
			T10	-	-	-	-	-
			T11	-	-	-	-	-
			T12	-	-	-	-	-
			T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M10t	T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
			T5	-	-	-	-	-
			T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M11t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T1	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M12t	T2	-	-	-	-	-

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	CFU (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
C. Madrid	Madrid c.c.	M13t	T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	sep 2008	1000	ND	ND
			T2	-	-	-	-	-
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	sep 2008	8000	ND	ND
			T4	-	-	-	-	-
			T5	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	nov 2006. ene, feb, jun ¹ 2007. oct ¹ 2008	100-6000	TJ ¹	<i>lvh+/rtxA+</i> ¹
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	feb, mar, abr, may ² , jun ² , jul 2007. oct 2008	200-4400	TO ²	<i>lvh+/rtxA+</i> ²
			T6	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jul, ago, sep 2008	1500-4700		
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	nov 2006. ene, jun ¹ 2007. oct ¹ 2008	350-5000	TJ ¹	<i>lvh+/rtxA+</i> ¹
			T7	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	may, jun 2006. feb, mar, abr, may ² , jun ² , jul ² , ago 2007.	50-6600	TO ²	<i>lvh+/rtxA+</i> ²
				<i>Legionella no-pneumophila</i>	jul, ago, sep ³ 2008	1500-4000	TX ³	<i>lvh+/rtxA</i> ⁻³
			T7	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	mar, abr, ago, oct ¹ 2008		TJ ¹	<i>lvh+/rtxA+</i> ¹
				<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14	nov 2006. nov ² , dic ⁴ 2007. ene ² , feb ² , oct ² 2008.	250->10000	TO ² /TP ⁴	<i>lvh+/rtxA+</i> ⁴ <i>lvh+/rtxA+</i> ²
	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jul, ago 2008	4100-4600	ND	ND			

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	CFU (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
C. Madrid	Madrid c.c.	M14t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
			T5	-	-	-	-	-
			T6	-	-	-	-	-
			T7	-	-	-	-	-
			T8	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid c.c.	M15t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid p.i	M16t	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1		sep ¹ , oct 2008	>10000	TL ¹	<i>lvh+/rtxA+¹</i>
			<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2-14		sep ¹ , oct ¹ , nov ¹ , dic 2007. dic 2008	100-950	TQ ¹	<i>lvh-/rtxA-¹</i>
C. Madrid	Madrid p.i	M17t	<i>Legionella no-pneumophila</i>		ago 2008	>10000	ND	ND
			T1	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid p.i	M18t	T2	-	-	-	-	-
			T1	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid p.i	M19t	T2	-	-	-	-	-
			T1	-	-	-	-	-

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	CFU (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
C. Madrid	Madrid p.i	M20t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
C. Madrid	Madrid p.i	M21t	T1	-	-	-	-	-
			T1	-	-	-	-	-
C. Madrid	Alcalá de Henares	M23t	T1	-	-	-	-	-
			T2	<i>Legionella no-pneumophila</i>	ago 2007	50	ND	ND
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	may 2006	50	ND	ND
			T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ago ¹ , oct ¹ 2007	50-4000	TD ¹	<i>lvh+/rtxA+</i> ¹
C. Madrid	Leganés	M24t	T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	oct ¹ 2007, jun 2008	50	TD ¹	<i>lvh+/rtxA+</i> ¹
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ago 2007	1700	TD	<i>lvh+/rtxA+</i> ¹
			T4	-	-	-	-	-
C. Madrid	Valdemoro	M25t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	jun 2007	50	TI	<i>lvh-/rtxA-</i>
			T4	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	dic 2006, jun ¹ 2007	50-1100	TI ¹	<i>lvh-/rtxA-</i> ¹
			T5	-	-	-	-	-

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	CFU (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
C. Madrid	San José	M26t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
			T5	-	-	-	-	-
C. Madrid	Tres cantos	M27t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
C. Madrid	Móstoles	M28t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
C. Madrid	Alcorcón	M29t	T1	-	-	-	-	-
			T2	<i>Legionella no-pneumophila</i>	dic 2006	50	ND	ND
R. Murcia	Murcia	MU1t	T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	oct ¹ , dic ¹ 2007. ene ¹ , may ¹ , oct ¹ , nov ¹ 2008.	50-7200	TD ¹	<i>lvh+/rtxA+</i> ¹
			T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	oct ¹ , dic ¹ 2007. ene ¹ , may ¹ , oct ¹ , nov ¹ 2008	50-9000	TD ¹	<i>lvh+/rtxA+</i> ¹
Navarra	Pamplona	N1t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	jun 2006	2100	ND	ND
			T4	-	-	-	-	-
			T5	-	-	-	-	-

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	[] (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
País Vasco	Bilbao	PV1t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
			T5	-	-	-	-	-
País Vasco	Bilbao	PV2t	T3	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
País Vasco	Bilbao	PV3t	T1	-	-	-	-	-
			T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
País Vasco	Vitoria	PV4t	T4	-	-	-	-	-
			T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	sep 2008	1500	ND	ND
			T2	-	-	-	-	-
			T3	<i>Legionella no-pneumophila</i>	sep 2008	5000	ND	ND
C. Valenciana	Valencia	V1t	T4	<i>Legionella no-pneumophila</i>	sep 2008	1500	ND	ND
			T5	-	-	-	-	-
			T5	-	-	-	-	-

C. autónoma	Ciudad	Edificio	T.R.	Especie	Fecha aislamiento	[] (ufc/l)	Patrón molecular	Genes virulencia
			T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	nov 2008	1000	ND	ND
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-
			T4	-	-	-	-	-
C. Valenciana	Valencia	V2t	T5	<i>Legionella no-pneumophila</i>	ago, sep, oct 2006	150-2200	ND	ND
			T6	<i>Legionella no-pneumophila</i>	ago, sep 2006	900-1100	ND	ND
			T7	<i>Legionella no-pneumophila</i>	jul 2006	3000	ND	ND
			T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	ago 2006	650	ND	ND
			T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	jun, jul, ago, sep 2006	150-800	ND	ND
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	jun, jul, ago 2006	100-2500	ND	ND
			T4	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	may 2008	500	ND	ND
C. Valenciana	Valencia	V3t	T1	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	sep 2006	350	ND	ND
			T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	sep 2006	50	ND	ND
			T3	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	sep 2006	50	ND	ND
			T4	-	-	-	-	-
C. Valenciana	Alicante	V5t	T1	<i>Legionella no-pneumophila</i>	nov 2007	5200	TV	<i>lvh-rtxA-</i>
			T2	<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	jul, sep 2006	50-600	ND	ND
			T3	<i>Legionella no-pneumophila</i>	ago 2007, feb 2008	500-3000	ND	ND
C. Valenciana	Alicante	V6t	T1	-	-	-	-	-
			T2	-	-	-	-	-
			T3	-	-	-	-	-

R.T., torre de refrigeración. [] (ufc/l), rango de concentraciones de *Legionella* spp. en agua de consumo humano expresado en unidades formadoras de colonias por litro. c.c., centro ciudad. p.i., polígono industrial. NI, no identificado. ND, no detectado. *lvh+rtxA+*, presencia de los genes de virulencia *lvh* y *rtxA*. *lvh-rtxA-*, ausencia del gen de virulencia *lvh* y ausencia del gen de virulencia *rtxA*. *lvh-rtxA+*, ausencia del gen de virulencia *lvh* y presencia del gen de virulencia *rtxA*.

8. Bibliografía

-
- Abu Kwaik Y.** 1996. The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2022-28.
- ACHD (Allegheny County Health Department).** 1997. Approaches to prevention and control of *Legionella* infection. 2a ed. Pittsburg, PA: Allegheny County Health Department. 1-15.
- Addiss DG, Davis JP, LaVenture M, Wand PJ, Hutchinson MA, McKinney RM.** 1989. Community-acquired Legionnaires' disease associated with a cooling tower: evidence for longer-distance transport of *Legionella pneumophila*. *Am. J. Epidemiol.* **130**:557-68.
- AEMET (Agencia Estatal de Meteorología).** 2010a. <http://www.aemet.es/es/servicios/públicos>.
- AEMET (Agencia Estatal de Meteorología).** 2010b. http://www.aemet.es/documentos/es/el-clima/datos_climat/resumenes_climat/anuales/res_anual_clim_2006.
- Alli OA, Gao LY, Pedersen LL, Zink S, Radulic M, Doric M, Abu Kwaik Y.** 2000. Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **68**:6431-40.
- Alli OA, Zink S, von Lackum NK, Abu-Kwaik Y.** 2003. Comparative assessment of virulence traits in *Legionella spp.* *Microbiology.* **149**:631-41.
- Allison DG.** 2003. The biofilm matrix. *Biofouling.* **19**:139-50.
- Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Watanabe H.** 2005. *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan form a distinct genetic cluster. *Microbiol. Immunol.* **49**:1027-33.
- Aragon V, Kurtz S, Fliieger A, Neumeister B, Cianciotto NP.** 2000. Secreted enzymatic activities of wild-type and pliD-deficient *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* **68**:1855-63.
- Arushothy R, Ahmad N.** 2008. Occurrence of virulent genes among environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains from various parts of peninsular Malaysia. *Trop. Biomed.* **25**:259-61.
- ASHRAE Standard (Atlanta: Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers).** 2000. Minimizing the risk of Legionellosis associated with building water systems. Inc. Guideline 12.
- Aurell H, Etienne J, Forey F, Reyrolle M, Girardo P, Farge P, Decludt B, Campese C, Vandenesch F, Jarraud S.** 2003. *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain Paris: endemic distribution throughout France. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3320-2.
- Ausina V, Catalán V, Cercenado E, Pelaz C.** 2005. Diagnóstico microbiológico y control de la legionelosis. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 2º edición. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).
- Ballard AL, Fry NK, Chan L, Surman SB, Lee JV, Harrison TG, Towner KJ.** 2000. Detection
-

- of *Legionella pneumophila* using a real-time PCR hybridization assay. J. Clin. Microbiol. **38**:4215-8.
- Bandrés F, Lluch G.** 2007. *Legionella*: enfoque multidisciplinar de un mismo problema. En: Biomedicina y derecho sanitario. p. 499-526.
- Barbaree JM, Gorman GW, Martin WT, Fields BS, Morrill WE.** 1986. Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. **51**:422-4.
- Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM.** 1991. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. Appl. Environ. Microbiol. **57**:597-600.
- Bej AK, Mahbubani MH, Miller R, DiCesare JL, Haff L, Atlas RM.** 1990. Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. Mol. Cell. Probes. **4**:353-65.
- Bellinger-Kawahara C, Horwitz MA.** 1990. Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. J. Exp. Med. **172**:1201-10.
- Benin AL, Benson RF, Besser RE.** 2002. Trends in legionnaires disease, 1980-1998: declining mortality and new patterns of diagnosis. Clin. Infect. Dis. **35**:1039-46.
- Bentham RH.** 2000. Routine sampling and the control of *Legionella* spp. in cooling tower water systems. Curr. Microbiol. **41**:271-5.
- Bentham RH, Broadbent CR.** 1993. A model for autumn outbreaks of Legionnaires' disease associated with cooling towers, linked to system operation and size. Epidemiol. Infect. **111**:287-95.
- Best M, Yu VL, Stout J, Goetz A, Muder RR, Taylor F.** 1983. *Legionellaceae* in the hospital water-supply. Epidemiological link with disease and evaluation of a method for control of nosocomial legionnaires' disease and Pittsburgh pneumonia. Lancet. **2**:307-10.
- Bezanson G, Burbridge S, Haldane D, Yoell C, Marrie T.** 1992. Diverse populations of *Legionella pneumophila* present in the water of geographically clustered institutions served by the same water reservoir. J. Clin. Microbiol. **30**:570-6.
- Bezanson G, Fernandez R, Haldane D, Burbridge S, Marrie T.** 1994. Virulence of patient and water isolates of *Legionella pneumophila* in guinea pigs and mouse L929 cells varies with bacterial genotype. Can. J. Microbiol. **40**:426-31.
- Bhopal RS, Fallon RJ.** 1991. Seasonal variation of Legionnaires' disease in Scotland. J. Infect. **22**:153-60.
- Blázquez RM, Espinosa FJ, Alemany L, Ramos RM, Sánchez-Nieto JM, Segovia M, Serano JA, Huerta FH.** 2005a. Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires disease:

levofloxacin versus macrolides. Clin. Infect. Dis. **40**:800-6.

- Blázquez RM, Espinosa FJ, Martínez-Toldos CM, Alemany L, García-Orenes MC, Segovia M.** 2005b. Sensitivity of urinary antigen test in relation to clinical severity in a large outbreak of *Legionella pneumoniae* in Spain. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **24**:488-91.
- BMS (Boletín Microbiológico Semanal).** 1991. Brote de neumonía por *Legionella* en Almuñecar. Bol. Microbiol. Sem. **48**:2-4.
- BOE (Boletín Oficial del Estado).** 1995. Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la red nacional de vigilancia epidemiológica. BOE nº 21 de 24 de enero de 1996, Madrid.
- BOE (Boletín Oficial del Estado).** 2003a. Real Decreto 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. BOE nº 171 de 18 de julio de 2003, Madrid.
- BOE (Boletín Oficial del Estado).** 2003b. Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios, de la calidad del agua de consumo humano. BOE nº 45 de 21 de febrero de 2003, Madrid.
- Bollin GE, Plouffe JF, Para MF, Prior RB.** 1985. Difference in virulence of environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. **21**:674-7.
- Bonetta S, Bonetta S, Ferretti E, Balocco F, Carraro E.** 2010. Evaluation of *Legionella pneumophila* contamination in Italian hotel water systems by quantitative real-time PCR and culture methods. J. Appl. Microbiol. **108**:1576-83.
- Borchardt J, Helbig JH, Lück PC.** 2008. Occurrence and distribution of sequence types among *Legionella pneumophila* strains isolated from patients in Germany: common features and differences to other regions of the world. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **27**:29-36.
- Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V, Stampi S, Stancanelli G, Triassi M, Neglia R, Marchesi I, Fantuzzi G, Tatò D, Napoli C, Quaranta G, Laurenti P, Leoni E, De Luca G, Ossi C, Moro M, Ribera D'Alcalà G.** 2004. *Legionella* infection risk from domestic hot water. Emerg. Infect. Dis. **10**:457-64.
- Borella P, Montagna MT, Stampi S, Stancanelli G, Romano-Spica V, Triassi M, Marchesi I, Bargellini A, Tatò D, Napoli C, Zanetti F, Leoni E, Moro M, Scaltriti S, Ribera D'Alcalà G, Santarpia R, Boccia S.** 2005. *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. Appl. Environ. Microbiol. **71**:5805-13.
- Boyd JF, Buchanan WM, MacLeod TI, Dunn RI, Weir WP.** 1978. Pathology of five Scottish deaths from pneumonic illnesses acquired in Spain due to Legionnaires' disease agent. J. Clin. Pathol. **31**:809-16.
- Brabender W, Hinthorn DR, Asher R, Lindsey NJ, Liu C.** 1983. *Legionella pneumophila* wound infection. JAMA. **250**:3091-2.

- Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE.** 1979. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. *Ann. Intern. Med.* **90**:656-8.
- Brooks T, Osicki R, Springthorpe V, Sattar S, Filion L, Abrial D, Riffard S.** 2004. Detection and identification of *Legionella* species from groundwaters. *J. Toxicol. Environ. Health A.* **67**:1845-59.
- Brown A, Garrity GM, Vickers RM.** 1981. *Fluoribacter dumoffii* comb. nov. and *Fluoribacter gormanii* comb. nov. *Int. J. System Bacteriol.* **31**:111-15.
- Bruggemann H, Cazalet C, Buchrieser C.** 2006a. Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:86-94.
- Bruggemann H, Hagman A, Jules M, Sismeiro O, Dillies MA, Gouyette C, Kunst F, Steinert M, Heuner K, Coppee JY, Buchrieser C.** 2006b. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell. Microbiol.* **8**:1228-40.
- Byrne B, Swanson MS.** 1998. Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect. Immun.* **66**:3029-34.
- Campanac C, Pineau L, Payard A, Baziard-Mouysset G, Roques C.** 2002. Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1469-74.
- Carratala J, Gudiol F, Pallares R, Dorca J, Verdaguer R, Ariza J, Manresa F.** 1994. Risk factors for nosocomial *Legionella pneumophila* pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **149**:625-9.
- Casini B, Valentini P, Baggiani A, Torracca F, Lorenzini C, Frateschi S, Matteoli B, Privitera G.** 2008. Comparison of two molecular methods used for subtyping of *Legionella pneumophila* 1 strains isolated from a hospital water supply. *Water Sci. Technol.* **58**:683-8.
- Castellani M, Ciceroni L, Lo Monaco R, Goldoni P, Mentore B, Flego G, Cattani L, Ciarrocchi S, Pinto A, Visca P.** 1997. Molecular epidemiology of an outbreak of Legionnaires' disease associated with a cooling tower in Genova-Sestri Ponente, Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**:883-92.
- Castilla J, Barricarte A, Aldaz J, García Cenoz M, Ferrer T, Pelaz C, Pineda S, Baladrón B, Martín I, Goñi B, Aratajo P, Chamorro J, Lameiro F, Torroba L, Dorransoro I, Martínez-Artola V, Esparza MJ, Gastaminza MA, Fraile P, Aldaz P.** 2008. A large Legionnaires' disease outbreak in Pamplona, Spain: early detection, rapid control and no case fatality. *Epidemiol. Infect.* **136**:823-32.
- Caylá JA, Maldonado R, González J, Pellicer T, Ferrer D, Pelaz C, Gracia J, Baladrón B, Plasencia A; Legionellosis study group.** 2001. A small outbreak of Legionnaires' disease in a cargo ship under repair. *Eur. Respir. J.* **17**:1322-7.

-
- Caylá JA, Sala MR, Plasencia A, Beneyto V, Sureda V, Llorens M.** 1989. Brote comunitario de enfermedad de los legionarios en Barcelona: investigación epidemiológica y medioambiental. *Med. Clin. (Barc)*. **93**:526-30.
- Chen TT, Schapiro JM, Loutit J.** 1996. Prosthetic valve endocarditis due to *Legionella pneumophila*. *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)*. **37**:631-3.
- Cianciotto NP.** 2001. Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:331-43.
- Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Toews GB, Engleberg NC.** 1989. A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect. Immun.* **57**:1255-62.
- Cianciotto NP, Fields BS.** 1992. *Legionella pneumophila mip* gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:5188-91.
- Cirillo JD, Cirillo SL, Yan L, Bermudez LE, Falkow S, Tompkins LS.** 1999. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **67**:4427-34.
- Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS.** 1994. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect. Immun.* **62**:3254-61.
- Cirillo SL, Lum J, Cirillo JD.** 2000. Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*. *Microbiology.* **146**:1345-59.
- Cirillo SL, Yan L, Littman M, Samrakandi MM, Cirillo JD.** 2002. Role of the *Legionella pneumophila rtxA* gene in amoebae. *Microbiol.* **148**:1667-77.
- CNE (Centro Nacional de Epidemiología).** Instituto de Salud Carlos III. 1997. Informe del brote de neumonía por *Legionella* de Alcalá de Henares. *Bol. Epidemiol. Sem.* **14**: 133-44.
- CNE (Centro Nacional de Epidemiología).** 2010a. Instituto de Salud Carlos III. Boletín epidemiológico en red. <http://www.isciii.es/jsps/centros/epidemiologia/boletinesSemanal.jsp>
- CNE (Centro Nacional de Epidemiología).** 2010b. Instituto de Salud Carlos III. Boletín epidemiológico en red. <http://www.isciii.es/jsps/centros/epidemiologia/seriesTemporalesAnuales.jsp>
- Colbourne JS, Trew RM.** 1986. Presence of *Legionella* in London's water supplies. *Isr. J. Med. Sci.* **22**:633-9.
- Coscollá M, Fenollar J, Escribano I, González-Candelas F.** 2010. Legionellosis outbreak associated with asphalt paving machine, Spain, 2009. *Emerg. Infect. Dis.* **16**:1381-7.
- Darelid J, Bernander S, Jacobson K, Lofgren S.** 2004. The presence of a specific genotype of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in a hospital and municipal water distribution system over a 12-year period. *Scand. J. Infect. Dis.* **36**:417-23.
-

- D'Auria G, Jiménez N, Peris-Bondia F, Pelaz C, Latorre A, Moya A.** 2008. Virulence factor rtx in *Legionella pneumophila*, evidence suggesting it is a modular multifunctional protein. *BMC Genomics*. **9**:14.
- de Olalla PG, Gracia J, Rius C, Caylá JA, Pañella H, Villabí JR, Guix J, Pellicer T, Ferrer D, Cusi M, Pelaz C, Sabria M.** 2008. Community outbreak of pneumonia due to *Legionella pneumophila*: importance of monitoring hospital cooling towers. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **26**:15-22.
- Den Boer JW, Yzerman EP, Schellekens J, Lettinga KD, Boshuizen HC, Van Steenberghe JE, Bosman A, Van den Hof S, Van Vliet HA, Peeters MF, Van Ketel RJ, Speelman P, Kool JL, Conyn-Van Spaendonck MA.** 2002. A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* **81**:37-43.
- Dennis PJ, Green D, Jones BP.** 1984. A note on the temperature tolerance of *Legionella*. *J. Appl. Bacteriol.* **56**:349-50.
- Diederer BM, de Jong CM, Aarts I, Peeters MF, van der Zee A.** 2007. Molecular evidence for the ubiquitous presence of *Legionella* species in Dutch tap water installations. *J. Water Health.* **5**:375-83.
- DOGC (Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya).** 2004. Decreto 352/2004, de 27 de julio, por el que se establecen las condiciones higiénico-sanitarias para la prevención y control de la legionelosis. DOGC nº 4185 de 29 de julio de 2004, Barcelona.
- Doleans A, Aurell H, Reyrolle M, Lina G, Freney J, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S.** 2004. Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *J. Clin. Microbiol.* **42**:458-60.
- Donlan RM, Costerton JW.** 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:167-93.
- Drenning SD, Stout JE, Joly JR, Yu VL.** 2001. Unexpected similarity of pulsed-field gel electrophoresis patterns of unrelated clinical isolates of *Legionella pneumophila*, serogroup 1. *J. Infect. Dis.* **183**:628-32.
- Dumenil G, Isberg RR.** 2001. The *Legionella pneumophila* lcmR protein exhibits chaperone activity for lcmQ by preventing its participation in high-molecular-weight complexes. *Mol. Microbiol.* **40**:1113-27.
- DVGW (Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches).** 2004. DVGW Arbeitsblatt W 551: Trinkwassererwärmungs- und Leitungsanlagen; Technische Maßnahmen zur Verminde rung des Legionellenwachstums; Planung, Errichtung, Betrieb und Sanierung von Trinkwasser- Installationen. DVGW e.V., Germany, 15.
- Eighmy TT, Bishop PL.** 1985. Effect of reactor turbulence on the binding proteinmediated aspartate transport system in thin wastewater biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:120-24.
- el-Ebiary M, Sarmiento X, Torres A, Nogué S, Mesalles E, Bodí M, Almirall J.** 1997. Prog-

- nostic factors of severe *Legionella pneumonia* requiring admission to ICU. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **156**:1467-72.
- Engelhart S, Pleischl S, Lück C, Marklein G, Fischnaller E, Martin S, Simon A, Exner M.** 2008. Hospital-acquired legionellosis originating from a cooling tower during a period of thermal inversion. Int. J. Hyg. Environ. Health. **211**:235-40.
- Engleberg NC, Carter C, Demarsh P, Drutz DJ, Eisenstein BI.** 1986. A *Legionella*-specific DNA probe detects organisms in lung tissue homogenates from intranasally inoculated mice. Isr. J. Med. Sci. **22**:703-5.
- Fernández JA, López P, Orozco D, Merino J.** 2002. Clinical study of an outbreak of Legionnaire's disease in Alcoy, Southeastern Spain. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **21**:729-35.
- Fields BS.** 1996. The molecular ecology of legionellae. Trends Microbiol. **4**:286-90.
- Fields BS, Benson RF, Besser RE.** 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin. Microbiol. Rev. **15**:506-26.
- Fields BS, Shotts EB Jr, Feeley JC, Gorman GW, Martin WT.** 1984. Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. Appl. Environ. Microbiol. **47**:467-71.
- Fitzgeorge RB, Baskerville A, Broster M, Hambleton P, Dennis PJ.** 1983. Aerosol infection of animals with strains of *Legionella pneumophila* of different virulence: comparison with intraperitoneal and intranasal routes of infection. J. Hyg. **90**:81-9.
- Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope DH.** 1981. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. **41**:9-16.
- Fraser D.** 1977. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. N. Engl. J. Med. **297**:1189-97.
- Frías J, Gomis M, Prieto J, Mensa J, Bouza E, García-Rodríguez JA, Torres A, Dorca J, Zalacaín R, García de Lomas J.** 1998. Initial empirical antibiotic treatment of community-acquired pneumonia. Rev. Esp. Quimioter. **11**:255-61.
- Friedman H, Yamamoto Y, Newton C, Klein T.** 1998. Immunologic response and pathophysiology of *Legionella* infection. Semin. Respir. Infect. **13**:100-8.
- Fry NK, Warwick S, Saunders NA, Embley TM.** 1991. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae. J. Gen. Microbiol. **137**:1215-22.
- Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R, Harrison TG.** 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. **43**:2047-52.
- Gaia V, Fry NK, Harrison TG, Peduzzi R.** 2003. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak

- investigation. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2932-9.
- Gao LY, Harb OS, Abu Kwaik Y.** 1997. Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect. Immun.* **65**:4738-46.
- García C, Ugalde E, Campo AB, Miñambres E, Kovács N.** 2004. Fatal case of community-acquired pneumonia caused by *Legionella longbeachae* in a patient with systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**:116-8.
- García MT, Baladrón B, Gil V, Tarancon ML, Vilasau A, Ibañez A, Elola C, Pelaz C.** 2008. Persistence of chlorine-sensitive *Legionella pneumophila* in hyperchlorinated installations. *J. Appl. Microbiol.* **105**:837-47.
- García MT, Jones S, Pelaz C, Millar RD, Abu Kwaik Y.** 2007. Acanthamoeba polyphaga resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ. Microbiol.* **9**:1267-77.
- García MT, Pelaz C.** 2008. Effectiveness of disinfectants used in cooling towers against *Legionella pneumophila*. *Chemotherapy.* **54**:107-16.
- García-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, García J, González-Diego P, Jiménez-Buñuales T, Rodríguez M, López R, Pacheco F, Ruiz J, Segovia M, Baladrón B, Pelaz C.** 2003. Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:915-21.
- García-Nuñez M, Pedro-Botet ML, Ragull S, Sopena N, Morera J, Rey-Joly C, Sabria M.** 2009. Cytopathogenicity and molecular subtyping of *Legionella pneumophila* environmental isolates from 17 hospitals. *Epidemiol. Infect.* **137**:188-93.
- García-Nuñez M, Sopena N, Ragull S, Pedro-Botet ML, Morera J, Sabria M.** 2008. Persistence of *Legionella* in hospital water supplies and nosocomial Legionnaires' disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52**:202-6.
- Garduño RA, Garduño E, Hoffman PS.** 1998. Surface-associate hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect. Immun.* **66**:4602-10.
- Garin J, Diez R, Kieffer S, Dermine JF, Duclos S, Gagnon E, Sadoul R, Rondeau C, Desjardins M.** 2001. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J. Cell. Biol.* **152**:165-80.
- Garrity GM, Brown A, Vickers RM.** 1980. *Tatlockia* and *Fluoribacter*: two new genera of organisms resembling *Legionella pneumophila*. *Int. J. System Bacteriol.* **30**:609-14.
- Ginevra C, Lopez M, Forey F, Reyrolle M, Meugnier H, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S, Molmeret M.** 2009. Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' disease. *J. Clin. Microbiol.* **47**:981-7.
- Glick TH.** 1978. Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am. J. Epidemiol.* **107**:149-60.

-
- Goutziana G, Mouchtouri VA, Karanika M, Kavagias A, Stathakis NE, Gourgoulisanis K, Kremastinou J, Hadjichristodoulou C.** 2008. *Legionella* species colonization of water distribution systems, pools and air conditioning systems in cruise ships and ferries. *BMC Public Health.* **8**:390.
- Greig JE, Carnie JA, Tallis GF, Ryan NJ, Tan AG, Gordon IR, Zwolak B, Leydon JA, Guest CS, Hart WG.** 2004. An outbreak of Legionnaires' disease at the Melbourne Aquarium, April 2000: investigation and case-control studies. *Med. J. Aust.* **180**:566-72.
- Grimont PA, Grimont F, Desplaces N, Tchen P.** 1985. DNA probe specific for *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* **21**:431-7.
- Guerrero C, Toldos CM, Yagüe G, Ramírez C, Rodríguez T, Segovia M.** 2004. Comparison of diagnostic sensitivities of three assays (Bartels enzyme immunoassay [EIA], Biotest EIA, and Binax NOW immunochromatographic test) for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. *J. Clin. Microbiol.* **42**:467-8.
- Gupta SK, Imperiale TF, Sarosi GA.** 2001. Evaluation of the Winthrop-University Hospital criteria to identify *Legionella pneumonia*. *Chest.* **120**:1064-71.
- Hammer BK, Bassler BL.** 2003. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio Holerae*. *Mol. Microbiol.* **50**:101-4.
- Harrison TG, Afshar B, Doshi N, Fry NK, Lee JV.** 2009. Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**:781-91.
- Harrison TG, Doshi N, Fry NK, Joseph CA.** 2007. Comparison of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* obtained in the UK over 19 years. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**:78-85.
- Hayden RT, Uhl JR, Qian X, Hopkins MK, Aubry MC, Limper AH, Lloyd RV, Cockerill FR.** 2001. Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2618-26.
- Helbig JH, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, Gaia V, Lauwers S, Lindsay D, Lück PC, Marques T, Mentula S, Peeters MF, Pelaz C, Struelens M, Uldum SA, Wewalka G, Harrison TG.** 2002. Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**:710-6.
- Hilbi H, Segal G, Shuman HA.** 2001. Icm/dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Molec. Microbiol.* **42**:603-17.
- Hofmann A, Beaulieu Y, Bernard F, Rico P.** 2009. Fulminant legionellosis in two patients treated with infliximab for Crohn's disease: case series and literature review. *Can. J. Gastroenterol.* **23**:829-33.
-

- Horwitz MA.** 1983. Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J. Exp. Med.* **158**:1319-31.
- HSE.** 2004. Legionnaires' Disease - A Guide for Employers. HSE, London. <http://www.hse.gov.uk/pubns/iac127.pdf>
- Huang B, Heron BA, Gray BR, Eglezos S, Bates JR, Savill J.** 2004. A predominant and virulent *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain detected in isolates from patients and water in Queensland, Australia, by an amplified fragment length polymorphism protocol and virulence gene-based PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4164-8.
- Huang B, Yuan Z, Heron BA, Gray BR, Eglezos S, Bates JR, Savill J.** 2006. Distribution of 19 major virulence genes in *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and water in Queensland, Australia. *J. Med. Microbiol.* **55**:993-7.
- Huhn GD, Adam B, Ruden R, Hilliard L, Kirkpatrick P, Todd J, Crafts W, Passaro D, Dworin MS.** 2005. Outbreak of travel-related pontiac fever among hotel guests illustrating the need for better diagnostic tests. *J. Travel. Med.* **12**:173-9.
- Infuso A, Hubert B, Dumas D, Reyrolle M, De Mateo S, Pelaz C, Hemery C, Perez I.** 1997. Outbreak of legionnaire s disease in two groups of tourists staying at camp sites in France. *Euro. Surveill.* **2**:48-50.
- Jansá JM, Caylá JA, Ferrer D, Gracia J, Pelaz C, Salvador M, Benavides A, Pellicer T, Rodriguez P, Garcés JM, Segura A, Guix J, Plasencia A; Barcelona Legionellosis Study Group.** 2002. An outbreak of Legionnaires' disease in an inner city district: importance of the first 24 hours in the investigation. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **6**:831-8.
- Jones TF, Benson RF, Brown EW, Rowland JR, Crosier SC, Schaffner W.** 2003. Epidemiologic investigation of a restaurant-associated outbreak of Pontiac fever. *Clin. Infect. Dis.* **37**:1292-7.
- Joseph C, Morgan D, Birtles R, Pelaz C, Martín-Bourgón C, Black M, Garcia-Sanchez I, Griffin M, Bornstein N, Bartlett C.** 1996. An international investigation of an outbreak of Legionnaires disease among UK and French tourists. *Eur. J. Epidemiol.* **12**:215-9.
- Joshi AD, Sturgill-Koszycki S, Swanson MS.** 2001. Evidence that Dot-dependent and independent factors isolate the *Legionella pneumophila* phagosome from the endocytic network in mouse macrophages. *Cell. Microbiol.* **3**:99-114.
- Kim BR, Anderson JE, Mueller SA, Gaines WA, Dendall AM.** 2002. Literature review-efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res.* **36**:4433-44.
- Kirby BD, Snyder KM, Meyer RD, Finegold SM.** 1980. Legionnaires' disease: report of sixty-five nosocomially acquired cases of review of the literature. *Medicine.* **59**:188-205.
- Kohler JR, Maiwald M, Luck PC, Helbig JH, Hingst V, Sonntag HG.** 1999. Detecting legionellosis by unselected culture of respiratory tract secretions and developing links to hospital water strains. *J. Hosp. Infect.* **41**:301-11.

- Kool JL, Bergmire-Sweat D, Butler JC, Brown EW, Peabody DJ, Massi DS, Carpenter JC, Pruckler JM, Benson RF, Fields BS.** 1999. Hospital characteristics associated with colonization of water systems by *Legionella* and risk of nosocomial legionnaires' disease: a cohort study of 15 hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **20**:798-805.
- Kool JL, Fiore AE, Kioski CM, Bown EW, Genson RF, Pruckler JM, Glasby C, Butler JC, Cage GD, Carpenter JC, Mandel RM, England B, Breiman RF.** 1998. More than 10 years of unrecognized nosocomial transmission of Legionnaires disease among transplant patients. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **19**:898-904.
- Lasheras A, Boulestreau H, Rogues AM, Ohayon-Courtes C, Labadie JC, Gachie JP.** 2006. Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and proliferation of *Legionella* species in hospital water systems. *Am. J. Infect. Control.* **34**:520-5.
- Lawrence C, Reyrolle M, Dubrou S, Forey F, Decludt B, Goulvestre C, Matsiota-Bernard P, Etienne J, Nauciel C.** 1999. Single clonal origin of a high proportion of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the environment in the area of Paris, France, over a 10-year period. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2652-5.
- Li JS, O'Brien ED, Guest C.** 2002. A review of national legionellosis surveillance in Australia, 1991 to 2000. *Commun. Dis. Intell.* **26**:461-8.
- Lopez P, Chinchilla A, Andreu M, Pelaz C, Sastre J.** 2001. The role of the clinical microbiology laboratory during the outbreak of *Legionella* spp. in the municipality of Alcoy: the effectiveness of the different diagnosis methods. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **19**:435-8.
- Lowry PW.** 1991. A cluster of *Legionella* sternal-wound infections due to postoperative topical exposure to contaminated tap water. *N. Engl. J. Med.* **324**:109-13.
- Luck PC, Dinger E, Helbig JH, Thurm V, Keuchel H, Presch C, Ott M.** 1994. Analysis of *Legionella pneumophila* strains associated with nosocomial pneumonia in a neonatal intensive care unit. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**:565-71.
- Lück PC, Helbig JH, Hagedorn H, Ehret W.** 1995. DNA fingerprinting by pulsedfield gel electrophoresis to investigate a nosocomial pneumonia caused by *Legionella bozemanii* serogroup 1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2759-61.
- Lück PC, Helbig JH, Schuppler M.** 2002. Epidemiology and laboratory diagnosis of *Legionella* infections. *J. Lab. Med.* **26**:174-82.
- Lück PC, Schneider T, Wagner J, Walther I, Reif U, Weber S, Weist K.** 2008. Community-acquired Legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 10 linked to the private home. *J. Med. Microbiol.* **57**:240-3.
- Luck PC, Wenchel HM, Helbig JH.** 1998. Nosocomial pneumonia caused by three genetically different strains of *Legionella pneumophila* and detection of these strains in the hospital water supply. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1160-3.
- Marra A, Blander SJ, Horwitz MA, Shuman HA.** 1992. Identification of a *Legionella pneu-*

mophila locus required for intracellular multiplication in human macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**:9607-11.

Marrie TJ, Haldane D, Bezanson G, Peppard R. 1992. Each water outlet is a unique ecological niche for *Legionella pneumophila*. Epidemiol. Infect. **108**:261-70.

Marrie TJ, Haldane D, MacDonald S, Clarke K, Fanning C, Le Fort-Jost S, Bezanson G, Joly J. 1991. Control of endemic nosocomial legionnaires' disease by using sterile potable water for high risk patients. Epidemiol. Infect. **107**:591-605.

Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF. 1994. Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. Arch. Intern. Med. **154**:2417-22.

Marston BJ, Plouffe JF, File TM Jr, Hackman BA, Salstrom SJ, Lipman HB, Kolczak MS, Breiman RF. 1997. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance Study in Ohio. The Community-Based Pneumonia Incidence Study Group. Arch. Intern. Med. **157**:1709-18.

Martinelli F, Carasi S, Scarcella C, Speziani F. 2001. Detection of *Legionella pneumophila* at thermal spas. New Microbiol. **24**:259-64.

Martínez D, Alvarez Rodríguez V, Ortiz de Zárate MM, Rivas M, Giménez MJ, Aguilar L, Ruiz Polaina MJ, Barberán J, Prieto J; CAPEM Study Group. 2009. Management in the emergency room of patients requiring hospital treatment of community-acquired pneumonia. Rev. Esp. Quimioter. **22**:4-9.

McDade JE, Brenner DJ, Bozeman FM. 1979. Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. Ann. Intern. Med. **90**:659-61.

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. N. Engl. J. Med. **297**:1197-203.

Miller, RD, Kenepp, KA. 1993. *Legionella* Current State and Emerging Perspectives, Editors: Barbaree, J.M., Breiman, R.F. and Dufour, A.P.: American Society for Microbiology, p.40-3.

Mineshita M, Nakamori Y, Seida Y, Hiwatashi S. 2005. *Legionella pneumonia* due to exposure to 24-hour bath water contaminated by *Legionella pneumophila* serogroup-5. Intern. Med. **44**:662-5.

Ministère de la Santé et des Solidarités. 2005. L'eau dans les Établissements de Santé guide technique, France (http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/eau_etabs/accueil.htm).

Miyake M, Watanabe T, Koike H, Molmeret M, Imai Y, Abu Kubaik Y. 2005. Characterization of *Legionella pneumophila* pmiA, a gene essential for infectivity of protozoa and macrophages. Infect. Immun. **73**:6272-82.

Modi A, Gardner J, Lighton L, Coetzee N. 2008. Pontiac fever outbreak associated with a spa-pool, United Kingdom, April 2008. Euro. Surveill. Vol. 13.

-
- Molmeret M, Abu Kwaik Y.** 2002. How does *Legionella pneumophila* exit the host cell? Trends Microbiol. **10**:258-60.
- Molmeret M, Alli OA, Zink S.** 2002. IcmT is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells. Infect. Immun. **70**:69-78.
- Morton LHG.** 1998. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. Int. Biodeterior Biodegradation. **41**:247-59.
- Moss CW, Dees SB.** 1979. Further studies of the cellular fatty acid composition of Legionnaires' disease bacteria. J. Clin. Microbiol. **9**:648-9.
- Mouchtouri VA, Goutziana G, Kremastinou J, Hadjichristodoulou C.** 2010. *Legionella* species colonization in cooling towers: risk factors and assessment of control measures. Am. J. Infect. Control. **38**:50-5.
- MSC (Ministerio de Sanidad y consumo).** Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral. 2008. Guía técnica para la Prevención y Control de la Legionelosis en instalaciones.
- MSWG.** 2000. Report of the Maryland Scientific Working Group to Study *Legionella* in Water Systems in Health Care Institutions. State of Maryland, Department of Health and Mental Hygiene.
- Mülazimoglu L, Yu VL.** 2001. Can Legionnaires' disease be diagnosed by clinical criteria? A critical review. Chest. **120**:1049-53.
- Muñoz MJ, Martínez MC, Yagüe G, Segovia M.** 2009. Evaluation of three Immunochromatographic Assays for Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 Antigen in Urine Samples. Rev. Esp. Quimioter. **22**:207-9.
- Murder RR, Yu VL.** 2002. Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. Clin. Infect. Dis. **35**:990-8.
- Murdoch DR.** 2003. Diagnosis of *Legionella* infection. Clin. Infect. Dis. **36**:64-9.
- Murdoch DR, Chambers ST.** 2000. Detection of *Legionella* DNA in peripheral leukocytes, serum, and urine from a patient with pneumonia caused by *Legionella dumoffii*. Clin. Infect. Dis. **30**:382-3.
- Naik FC, Ricketts KD, Harrison TG, Joseph CA.** 2009. Legionaire's disease in residents of England and Wales: 2007. Euro. Surveill. **3**:14.
- Neil K, Berkelman R.** 2008. Increasing incidence of legionellosis in the United States, 1990-2005: changing epidemiologic trends. Clin. Infect. Dis. **47**:591-9.
- Newton HJ, Ang D, van Driel IR, Hartland EL.** 2010. Molecular Pathogenesis of Infections Caused by *Legionella pneumophila*. Clin. Microbiol. Rev. **23**:274-98.
- Orrison LH, Cherry WB, Tyndall RL, Fliermans CB, Gough SB, Lambert MA, McDougal LK, Bibb WF, Brenner DJ.** 1983. *Legionella oakridgensis*: unusual new species isolated
-

- from cooling tower water. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:536-45.
- Ortiz-Roque CM, Hazen TC.** 1987. Abundance and distribution of *Legionellaceae* in Puerto Rican waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2231-6.
- Osterholm MT, Chin TD, Osborne DO, Dull HB, Dean AG, Fraser DW, Hayes PS, Hall WNA.** 1983. A 1957 outbreak of Legionnaires' disease associated with a meat packing plant. *J. Epidemiol.* **117**:60-7.
- Ott M, Messner P, Heesemann J, Marre R, Hacker J.** 1991. Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*. *J. Gen. Microbiol.* **137**:1955-61.
- Pascual JM, Redón J, Borrás R, Vila B, Bertolín V, Lopez Camps V, Belda A, Michavila J, Garcia de Lomas J.** 1987. *Legionella pneumophila* pneumonia. Clinical characteristics of 52 cases. *Med. Clin. (Barc).* **89**:489-93.
- Pedro-Botet L, Dominguez J, Sabria M.** 2008. Infecciones causadas por *Legionella*. En: Farreras, Rozman, eds. *Principios de Medicina Interna*. 16° ed. Elsevier España, SL. p.2308-12.
- Pelaz C, García L, Martín-bourgon C.** 1992. *Legionellae* isolated from clinical and environmental samples in Spain (1983-90): monoclonal typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates. *Epidemiol. Infect.* **108**:397-402.
- Perola O, Kauppinen J, Kusnetsov J, Kärkkäinen UM, Lück PC, Katila ML.** 2005. Persistent *Legionella pneumophila* colonization of a hospital water supply: efficacy of control methods and a molecular epidemiological analysis. *APMIS.* **113**:45-53.
- Pine L, Hoffman PS, Malcolm GB, Benson RF, Keen MG.** 1984. Determination of catalase, peroxidase, and superoxide dismutase within the genus *Legionella*. *J. Clin. Microbiol.* **20**:421-9.
- Pinna G.** 1994. A 21-month review of *Legionella* and Standard Plate Count analyses of cooling tower water. *AIRAH Journal.* **48**:31-5.
- Ragull S, Garcia-Nuñez M, Pedro-Botet ML, Sopena N, Esteve M, Montenegro R, Sabria M.** 2007. *Legionella pneumophila* in cooling towers: fluctuations in counts, determination of genetic variability by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and persistence of PFGE patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:5382-4.
- Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW.** 1998. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1560-7.
- Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC.** 2007. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1965-8.
- Reimer AR, Au S, Schindle S, Bernard KA.** 2010. *Legionella pneumophila* monoclonal an-

- tibody subgroups and DNA sequence types isolated in Canada between 1981 and 2009: Laboratory Component of National Surveillance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **29**:191-205.
- Rello J, Bodi M, Mariscal D, Navarro M, Diaz E, Gallego M, Valles J.** 2003. Microbiological testing and outcome of patients with severe community-acquired pneumonia. *Chest.* **123**:174-80.
- Ricketts KD, Joseph CA; European Working Group for *Legionella* Infections.** 2007. Legionnaires' disease in Europe: 2005-2006. *Euro. Surveill.* **12**:E7-E8.
- Ricketts KD, Yadav R, Joseph CA; European Working Group for *Legionella* Infections.** 2008. Travel-associated Legionnaires disease in Europe: 2006. *Euro. Surveill.* **17**;13(29).
- Ridenour DA, Cirillo SL, Feng S, Samrakandi MM, Cirillo JD.** 2003. Identification of a gene that affects the efficiency of host cell infection by *Legionella pneumophila* in a temperature-dependent fashion. *Infect. Immun.* **71**:6256-63.
- Riffard S, Douglass S, Brooks T, Springthorpe S, Fillion LG, Sattar SA.** 2001. Occurrence of *Legionella* in groundwater: an ecological study. *Water Sci. Technol.* **43**:99-102.
- Rivera JM, Aguilar L, Granizo JJ, Vos-Arenilla A, Giménez MJ, Aguiar JM, Prieto J.** 2007. Isolation of *Legionella* species/serogroups from water cooling systems compared with potable water systems in Spanish healthcare facilities. *J. Hosp. Infect.* **67**:360-6.
- Rodgers FG, Greaves PW, Macrae AD, Lewis MJ.** 1980. Electron microscopic evidence of flagella and pili on *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Pathol.* **33**:1184-8.
- Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW.** 1994. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1585-92.
- Roig J, Aguilar X, Ruiz J, Domingo C, Mesalles E, Manterola J, Morera J.** 1991. Comparative study of *Legionella pneumophila* and other nosocomial-acquired pneumonias. *Chest.* **99**:344-50.
- Rota MC, Caporali MG, Massari M, European Working Group for *Legionella* Infections.** 2004. European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires' Disease: the Italian experience. *Euro. Surveill.* **9**:10-1.
- Rowbotham TJ.** 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* **33**:1179-83.
- Rowbotham TJ.** 1986. Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr. J. Med. Sci.* **22**:678-89.
- Sabria M.** 2002. Legionellosis: pasado, presente y futuro. *Med. Clín. (Barc).* **119**:4-8.
- Sabria M, García-Nuñez M, Pedro-Botet ML, Sopena N, Gimeno JM, Reynaga E, Morera**

- J, Rey-Joly C.** 2001. Presence and chromosomal subtyping of *Legionella* species in potable water systems in 20 hospitals of Catalonia, Spain. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **22**:673-6.
- Sabria M, Pedro-Botet ML, Gomez J, Roig J, Vilaseca B, Sopena N, Banos V.** 2005. Fluoroquinolones vs macrolides in the treatment of Legionnaires disease. *Chest.* **128**:1401-5.
- Sabria M, Yu VL.** 2008. *Legionella* Infection. In: Fauci A BE, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J., eds. HARRISON'S Principles of Internal Medicine 17th ed. McGraw-Hill Companies, Boston, p. 929-33.
- Sakamoto R, Ohno A, Nakahara T, Satomura K, Iwanaga S, Kouyama Y, Kura F, Kato N, Matsubayashi K, Okumiya K, Yamaguchi K.** 2009. *Legionella pneumophila* in rain-water on roads. *Emerg. Infect. Dis.* **15**:1295-7.
- Salleras L.** 2002. La Legionelosis: un problema de salud pública emergente. *Med. Clín. (Bar).* **119**:1-3.
- Samrakandi MM, Cirillo SL, Ridenour DA, Bermudez LE, Cirillo JD.** 2002. Genetic and phenotypic differences between *Legionella pneumophila* strains. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1352-62.
- Sanchez I, Garcia-Nuñez M, Ragull S, Sopena N, Pedro-Botet ML, Rey-Joly C, Sabria M, Esteve M.** 2008. Genotypic variability and persistence of *Legionella pneumophila* PFGE patterns in 34 cooling towers from two different areas. *Environ. Microbiol.* **10**:395-9.
- Saravolatz LD, Russell G, Cvitkovich D.** 1981. Direct immunofluorescence in the diagnosis of Legionnaires' disease. *Chest.* **79**:566-70.
- Scaturro M, Losardo M, De Ponte G, Ricci ML.** 2005. Comparison of three molecular methods used for subtyping of *Legionella pneumophila* strains isolated during an epidemic of Legionellosis in Rome. *J. Clin. Microbiol.* **43**:5348-50.
- Segal G, Russo JJ, Shuman HA.** 1999. Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **34**:799-809.
- Segovia M.** 2005. The journey of *Legionella pneumophila* from amoebae to macrophage. Reflections on the largest outbreak of legionnaire's disease. *An. R. Acad. Nac. Med. (Madr).* **122**:489-98.
- Shelburne SA, Kielhofner MA, Tiwari PS.** 2004. Cerebellar involvement in legionellosis. *South Med. J.* **97**:61-4.
- Skaliy P, McEachern H.** 1979. Survival of the Legionnaires' disease bacterium in water. *Ann. Intern. Med.* **90**:662.
- Socan M, Kese D, Marinic-Fiser N.** 2000. Polymerase chain reaction for detection of *Legionellae* DNA in urine samples from patients with community-acquired pneumonia. *Folia Microbiol.* **45**:469-72.

-
- Sopena N, Sabria M, Pedro-Botet ML, Reynaga E, Garcia-Nuñez M, Dominguez J, Matas L.** 2002. Factors related to persistence of *Legionella* urinary antigen excretion in patients with Legionnaires' disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**:845-8.
- Speers DJ, Tribe AE.** 1994. *Legionella longbeachae* pneumonia associated with potting mix. *Med. J. Aust.* **161**:509.
- Stojek NM, Szymanska J, Dutkiewicz J.** 2008. Gram-negative bacteria in water distribution systems of hospitals. *Ann. Agric. Environ. Med.* **15**:135-42.
- Storey MV, Ashbolt J, Stenström TA.** 2004. Biofilms, thermophilic amoebae and *Legionella pneumophila*-a quantitative risk assessment for distributed water. *Water Sci. Technol.* **50**:77-82.
- Stout JE, Yu VL.** 1997. Legionellosis. *N. Engl. J. Med.* **337**:682-7.
- Stout JE, Yu VL, Muraca P, Joly L, Troup N, Tompkins LS.** 1992. Potable water as a cause of sporadic cases of community-acquired legionnaires' disease. *N. Engl. J. Med.* **326**:151-5.
- Stout J, Yu VL, Vickers RM, Zuravleff J, Best M, Brown A, Yee RB, Wadowsky R.** 1982. Ubiquitousness of *Legionella pneumophila* in the water supply of a hospital with endemic Legionnaires' disease. *N. Engl. J. Med.* **306**:466-8.
- Swanson MS, Hammer BK.** 2000. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:567-613.
- Szénási Z, Endo T, Yagita K, Veréb I, Nagy E.** 2001. Epidemiology and laboratory diagnostics of legionellae. *Orv. Hetil.* **142**:1035-43.
- Tanzi ML, Capobianco E, Affanni P, Pizzi S, Vitali P, Veronesi L.** 2006. *Legionella* spp. in hospital dental facilities. *J. Hosp. Infect.* **63**:232-4.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickeisen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233-9.
- Tesh MJ, Miller RD.** 1981. Amino acid requirements for *Legionella pneumophila* growth. *J. Clin. Microbiol.* **13**:865-9.
- Tobin JO, Beare J, Dunnill MS, Fisher-Hoch S, French M, Mitchell RG, Morris PJ, Muers MF.** 1980. Legionnaires' disease in a transplant unit: isolation of the causative agent from shower baths. *Lancet.* **2**:118-21.
- Trulear MG, Characklis WG.** 1982. Dynamics of biofilm processes. *J. Water Pollution Control Federation.* **54**:1288-301.
- Türetgen I, Sungur EI, Cotuk A.** 2005. Enumeration of *Legionella pneumophila* in cooling tower water systems. *Environ. Monit. Assess.* **100**:53-8.
- Uriel B, Pinazo M, Vilar B, Redón J, Quesada E, Pérez MV, García de Lomas J.** 1988. Noso-
-

comial pneumonia caused by *Legionella pneumophila* at Sagunto hospital. Epidemiology and preventive measures. Rev. San. Hig. Publica. **62**:1459-68.

- Van Steerbergen JE, Slijkermea FAN, Sperrlman P.** 1999. Las primeras 48 horas en la investigación e interpretación de un brote de legionelosis en los Países Bajos. Euro. Surveill. Vol. **4**.
- Vaqué J.** 2002. Epidemiología de la legionelosis. Med. Clin. (Barc). **119**:14-24.
- Venezia RA, Agresta MD, Hanley AM, Urquhart K, Schoonmaker D.** 1994. Nosocomial legionellosis associated with aspiration of nasogastric feedings diluted in tap water. Infect. Control Hosp. Epidemiol. **15**:529-33.
- Veríssimo A, Marrao G, Gomes da Silva F, da Costa MS.** 1991. Distribution of *Legionella* spp. in hydrothermal areas in continental Portugal and the island of Sao Miguel, Azores. App.I Environ. Microbiol. **57**:2921-7.
- Visca P, Goldoni P, Lück PH, Helbig JH, Cattani L, Giltri G.** 1999. Multiple types of *Legionella pneumophila* serogroup 6 in a hospital heated system associated with sporadic infections. J. Clin. Microbiol. **37**:2189-96.
- Vogel JP, Isberg RR.** 1999. Cell biology of *Legionella pneumophila*. Curr. Opin. Microbiol. **2**:30-4.
- Voss L, Button KS, Tuovinen OH.** 1985. *Legionella* in a metropolitan water distribution system. Environ. Tech. Lett. **6**:429-38.
- VROM (The Netherlands Ministry of Housing).** 2002. Modelbeheersplan Legionellapreentie in Liedingwater Distribution No. 16827.
- Wadowsky RM, Wilson TM, Kapp NJ, West AJ, Kuchta JM, States SJ, Dowling JN, Yee RB.** 1991. Multiplication of *Legionella* spp. in tap water containing *Hartmannella vermiformis*. Appl. Environ. Microbiol. **57**:1950-5.
- Weissgerber P, Faigle M, Northoff H, Neumeister B.** 2003. Investigation of mechanisms involved in phagocytosis of *Legionella pneumophila* by human cells. FEMS Microbiol. Lett. **219**:173-9.
- Wéry N, Bru-Adan V, Minervini C, Delgènes JP, Garrelly L, Godon JJ.** 2008. Dynamics of *Legionella* spp. and bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in a cooling tower facility. Appl. Environ. Microbiol. **74**:3030-7.
- WHO (World Health Organization).** 1999. Recommended Surveillance Standards, 2nd ed. (WHO/CDS/ CSR/ISR/99.2).
- WHO (World Health Organization).** 2004. Guidelines for Drinking Water Quality. 3rd ed. Vol. 1. Recommendations, Geneva, WHO.
- WHO (World Health Organization).** 2007. *Legionella* and prevention of legionelosis. Switzerland.

-
- Wilkinson HW, Cruce DD, Broome CV.** 1981. Validation of *Legionella pneumophila* indirect immunofluorescence assay with epidemic sera. J. Clin. Microbiol. **13**:139-46.
- Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U.** 2000. Heterogeneity in biofilms. FEMS Microbiol. Rev. **24**:661-71.
- Yaradou DF, Hallier-Soulier S, Moreau S, Poty F, Hillion Y, Reyrolle M, André J, Festoc G, Delabre K, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S.** 2007. Integrated real-time PCR for detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. Appl. Environ. Microbiol. **73**:1452-6.
- Yee RB, Wadowsky RM.** 1982. Multiplication of *Legionella pneumophila* in unsterilized tap water. Appl. Environ. Microbiol. **43**:1330-4.
- Yong SF, Goh FN, Ngeow YF.** 2010. *Legionella* species and serogroups in Malaysian water cooling towers: identification by latex agglutination and PCR-DNA sequencing of isolates. J. Water Health. **8**:92-100.
- Yu VL, Feeg-Yee C.** 2001. Infección por *Legionella*. En: principios de Medicina Interna. p.1117-22.
- Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, Summersgill J, File T, Heath CM, Paterson DL, Cheresky A.** 2002. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. J. Infect. Dis. **186**:127-8.
- Yu VL, Stout JE.** 2000. Hospital characteristics associated with colonization of water systems by *Legionella* and risk of nosocomial legionnaires' disease: a cohort study of 15 hospitals. Infect. Control Hosp. Epidemiol. **21**:434-5.
- Zink SD, Pedersen L, Cianciotto NP, Abu-Kwait Y.** 2002. The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. Infect. Immun. **70**:1657-63.
- Zuravleff JJ, Yu VL, Shonnard JW, Davis BK, Rihs JD.** 1983. Diagnosis of Legionnaires' disease. An update of laboratory methods with new emphasis on isolation by culture. JAMA. **250**:1981-5.

