

ECOLOGÍA MEDIOAMBIENTAL DE *LEGIONELLA* SPP.

Estudio de su capacidad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas mediante la producción de bacteriocinas.

TRABAJO FIN DE MÁSTER
Claudia Sánchez Serrano



MÁSTER SALUD PÚBLICA
Universidad de Zaragoza

Índice General

0. Justificación	1
00. Objetivos.....	3
1. Introducción.....	5
2. Metodología.....	35
3. Resultados y discusión.....	62
4. Conclusiones.....	84
5. Anexos.....	85
6. Bibliografía	96

Índice de Gráficos

GRÁFICO 1. Colonización de las legionelas según puntos de muestreo.....	10
GRÁFICO 2. Casos y brotes en Aragón.....	13
GRÁFICO 3. Esquema transferencia de bacteriocinas.....	48
GRÁFICO 4. Curva de crecimiento de <i>L. pneumophila</i>	50
GRÁFICO 5. Estabilidad de la actividad enzimática según el pH.....	75
GRÁFICO 6. Estabilidad de la actividad enzimática tras someter el extracto a diferentes temperaturas	76
GRÁFICO 7. Curva de calibrado concentración BSA.....	77

TABLA 1. Rangos y nombres taxonómicos del género <i>Legionella</i>	6
TABLA 2. Art. 2 R.D. 865/2003.....	9
TABLA 3. Sistemas y fuentes de información complementaria.	11
TABLA 4. Evolución temporal, casos y fallecidos 1999-2009 CNE.....	12
TABLA 5. Fuentes de infección de brotes y casos de legionelosis.....	14
TABLA 6. Características de las formas clínicas provocadas por <i>L. pneumophila</i>	15
TABLA 7. Criterios de valoración cuantitativa sobre dosis infecciosa.....	17
TABLA 8. Sensibilidad y especificidad de pruebas diagnósticas.....	18
TABLA 9. Cepas de <i>Legionella</i> estudiadas.....	26
TABLA 10. Características de las cepas estudiadas.....	27
TABLA 11. Procedimiento unidades arbitrarias.....	54
TABLA 12. Ratio P/S e inmunidad a sus legionelinas (<i>L. pneumophila</i>).....	68
TABLA 13. Ratio P/S e inmunidad a sus legionelinas (<i>Legionella spp</i>).....	69
TABLA 14. Actividad de <i>Legionella</i> frente a <i>N. lactamica</i> y <i>N. sicca</i>	70
TABLA 15. Actividad de las legionelinas frente a bacterias gram+.....	71
TABLA 16. Resultados de las U.A. de los extractos enzimáticos crudos.....	73
TABLA 17. Sensibilidad a diversas enzimas de las legionelinas.....	74
TABLA 18. Características del extracto enzimático crudo.....	77
TABLA 19. Pruebas realizadas de transferencias de bacteriocinas.	79
TABLA 20. Conexiones en la transferencia de bacteriocinas. Receptora primera <i>Legionella</i> y discos de <i>L. pneumophila</i>	79
TABLA 21. Conexiones en la transferencia de bacteriocinas. Receptora primera <i>Legionella</i> y discos de <i>L. spp.</i>	80
TABLA 22. Conexiones en la transferencia de bacteriocinas. Receptora primera <i>N. sicca.</i>	80

IMAGEN 1. Crecimiento <i>Legionella</i> en caldo de cultivo selectivo	51
IMAGEN 2. Diluciones del extracto en placa de microtiter.....	54
IMAGEN 3. U.A. extracto crudo de <i>L. cherrii</i> , indicadora <i>N. sicca</i>	55
IMAGEN 4. Estabilidad del extracto a diferentes temperaturas.....	56
IMÁGENES 5 Y 6. Estabilidad a diferentes pHs.....	57
IMÁGENES 7 Y 8. <i>E. faecalis</i> frente extractos de bacteriocinas.....	72
IMAGEN 9. U.A. del extracto enzimático de <i>L. cherrii</i> frente a <i>N. sicca</i>	74
IMAGEN 10. Estabilidad de la actividad del extracto crudo a diferentes pHs...	75
IMAGEN 11. Estabilidad de la actividad a diferentes temperaturas.....	76
IMAGEN 12. β -hemólisis del disco de bacteriocinas de <i>L. sainthelensis</i>	81

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

ACS: Agua Caliente Sanitaria

CNE: Centro Nacional de Epidemiología

BMS: Bristol-Myers Squibb

CDC: Centre for Disease Control

EWGLI: **European Working Group for *Legionella* Infections**

EPOC: **Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica**

PCR: **Reacción en Cadena de la Polimerasa**

BGN: **Bacterias Gram Negativas**

BGP: **Bacterias Gram Positivas**

BL: **Bacteriocin Like**

BLIS: **Bacteriocin Like Inhibitory Substance**

DQ: **Detección del Quorum**

U.A.: **Unidades Arbitrarias de actividad**

Ratio P/S: **Ratio producción/sensibilidad**

Lp1: ***Legionella pneumophila* SG. 1**

SG: **Serogrupo**

KDa: **Kilo Dalton**

P.M.: **peso molecular**

U.Z.: **Universidad de Zaragoza**

IUCA: **Instituto Universitario de Ciencias Ambientales**

"If you're not failing every now and again, it's a sign you're not doing anything very innovative"

Woody Allen

Trabajo Fin de Máster

Claudia Sánchez

0. Justificación

Máster Salud Pública

Universidad de Zaragoza



La importancia histórica y actual del agua en Aragón continúa siendo una seña de identidad y una necesidad cultural y social de primer orden. Los tiempos actuales nos sugieren que frente a las necesidades de cantidad son precisos unos criterios de calidad del agua que permitan ofrecer este factor de desarrollo integral con las debidas garantías en una sociedad moderna.

Esta necesidad de un agua de calidad viene determinada para la utilización de abastecimientos urbanos, los usos industriales, las finalidades lúdicas o, finalmente pero no menos importantes, las puramente ambientales.

El conocimiento de los factores ambientales permitirá planificar cualquier tipo de actuación sobre el medio ambiente y ofreciendo su uso a finalidades hoy insospechadas pero que requieran un patrón de calidad microbiológico.

Los estudios epidemiológicos con valor ecológico son las investigaciones básicas útiles para un conjunto muy importante de ciencias que actúan sobre el medio ambiente. Calidad y cantidad de agua son también caras de una misma moneda científica; pero dos caras que deben llevar un desarrollo armónico y coordinado. Nunca se avanzará si no somos capaces de hibridar estas dos áreas de conocimiento, porque solo así es posible responder a nuestras necesidades sobre el agua.

El avance de los conocimientos científico-técnicos y las experiencias acumuladas recomiendan contemplar las innovaciones necesarias para un mayor control de la legionelosis.

La prevención y control de la legionelosis mediante la adopción de medidas higiénico-sanitarias implica tomar medidas preventivas que se basarán en la aplicación de dos principios fundamentales: primero, la eliminación o reducción de zonas contaminadas mediante un buen diseño y el mantenimiento de las instalaciones y segundo evitando las condiciones que favorecen la supervivencia y multiplicación de las legionelas, mediante el control de la temperatura del agua y la desinfección continua de la misma.

Estas dos medidas preventivas no deben entenderse de manera aislada porque sería abordar un problema complejo desde una perspectiva muy limitada, lo que impediría una actuación coordinada y por lo tanto eficaz sobre el problema. Se considera desde el punto de vista científico la necesidad de coordinar los estudios técnicos de las distintas áreas de conocimiento de una forma eficaz.

Ante una situación de casos de legionelosis, las autoridades sanitarias competentes coordinarán las actuaciones de todos los profesionales que intervengan en la investigación de casos y brotes de legionelosis, donde todos los trabajos previos de conocimiento científico del problema sin duda ayudarán a decidir las líneas más eficaces de actuación.

Este proyecto también quiere contribuir a mejorar los conocimientos actuales y facilitar la labor de los distintos Departamentos, Organismos y de los Comités del Gobierno de Aragón. La actuación sobre las legionelas no puede reducirse

a un mero problema teórico o a un planteamiento cerrado. Es necesario actualizar los conocimientos sobre la biología y la ecología de la legionela y formar los distintos profesionales en los mecanismos de prevención y control adecuados. Sin duda los estudios epidemiológicos nos permitirán una formación que se ajuste al tiempo presente.

Por su importancia, quiero destacar que este proyecto puede responder a las inquietudes e iniciativas que en materia de salud y medio ambiente se incluyen en la propuesta del Gobierno de Aragón: "PROPUESTA DE ESTRATEGIA ARAGONESA DE CAMBIO CLIMÁTICO Y ENERGÍAS LIMPIAS. Horizonte 2008-2012-2025".

Nuestro objetivo es sin duda científico pero su aplicación y utilidad trasvasa los conocimientos de las ciencias básicas para ser herramienta de gestión para la planificación de las ciencias sociales.

Trabajo Fin de Máster

Claudia Sánchez

00. Objetivos



CONTENIDO:

1. Objetivos generales
2. Objetivos específicos

Máster Salud Pública

Universidad de Zaragoza

1. OBJETIVO GENERAL

Demostrar la actividad biológica de las bacteriocinas de las legionelas frente a sí mismas y frente a otras bacterias relacionadas tanto gram-negativas como gram-positivas.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Perfeccionar los métodos de investigación de producción de bacteriocinas de legionelas.
- ✓ Determinar las cepas productoras de bacteriocinas, así como la inmunidad a las mismas.
- ✓ Determinar la actividad de bacteriocinas mediante el estudio in vitro, determinando los halos de inhibición que expresan su actividad.
- ✓ Demostrar la actividad interespecífica e intraespecífica de las bacteriocinas de legionela frente a sí mismas.
- ✓ Determinar la productividad y sensibilidad de las cepas productoras de bacteriocinas estudiadas, frente al resto de legionelas estudiadas y a otras bacterias que comparten nichos ambientales y/o humanos. .
- ✓ Desarrollar un método para determinar con un ratio, las legionelas mejor dotadas para una posible competición.
- ✓ Demostrar la actividad inhibitoria de cepas de *Legionella* spp. frente a otras bacterias (*E. faecalis*, *E. faecium*, *N. lactamica*, *N. gonorrhoeae*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. warneri*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*.)
- ✓ Cuantificar las unidades arbitrarias en la producción de bacteriocinas mediante diluciones seriadas de los extractos obtenidos en medio líquido.
- ✓ Definir las características de los extractos crudos de *Legionella* como su resistencia a la temperatura, actividad con los cambios de pH, a diversas proteasas y lisozima.
- ✓ Calcular la concentración de proteínas del extracto crudo de bacteriocinas.
- ✓ Caracterizar la bacteriocina una vez purificada por electroforesis.

1. Introducción

CONTENIDO:

1. Características de la bacteria
2. Taxonomía
3. Hábitat y Ecología microbiana
4. Biofilm
5. Fuente de infección
6. Epidemiología
7. Clínica
8. Transmisión
9. Métodos de detección
10. Marcadores moleculares
 - 10.1. Antibiotipo
 - 10.2. Fagotipia
 - 10.3. Plasmidotipia
 - 10.4. Bacteriocinotipia
11. Bacteriocinas
 - 11.1. Tolerancia al calor, a la acidez y a las enzimas
 - 11.2. Espectro antimicrobiano
 - 11.3. Mecanismo de acción
 - 11.4. Bacteriocinas de *Legionella*
 - 11.4.1. Detección del D.Q.
 - 11.4.2. Bacteriocinas de alto y bajo P.M.
12. Cepas de estudio
 - 11.1. *Legionella*
 - 11.2. Otras bacterias
 - 11.2.1. *Neisseria lactamica* (ATCC 23970)
 - 11.2.2. *Neisseria sicca* (ATCC 9913)
 - 11.2.3. *E. faecalis* (ATCC 19433)
12. Otros estudios relacionados

La legionelosis es una enfermedad relativamente nueva cuyo conocimiento se produjo en el año 1976, tras un brote de neumonía en un hotel de Filadelfia que afectó a miembros de la legión americana que celebraban su convención anual, y a la que debe su nombre. Se produjeron un total de 182 casos con 34 fallecidos. La enfermedad se denominó legionelosis y fue descrita por investigadores del Center for Disease Control (CDC) de Atlanta; el agente se denominó *Legionella pneumophila*.

Relacionada con el agua, y por tanto ampliamente distribuida en la naturaleza, es un parásito intracelular de los protozoos que utilizan un mecanismo similar para multiplicarse en el interior de los macrófagos del ser humano.

No obstante investigaciones posteriores identificaron brotes previos, ya desde el año 1957. Las primeras cepas aisladas fueron en 1943 y 1947 por Tatlock y Jackson et al respectivamente. En 1954, Drozanski identificó una bacteria que infectaba amebas de vida libre.

1. CARACTERÍSTICAS DE LA BACTERIA

Las legionelas son bacilos que oscilan entre 0,3 y 0,9 μm de ancho, y de 1,5 a 5 μm de longitud, aerobios, gram-negativos, no capsulados, móviles con uno o más flagelos polares o laterales, aunque también hay cepas inmóviles. Se tiñen preferiblemente por la tinción de Giménez. Es catalasa, oxidasa y gelatinasa positiva.

2. TAXONOMÍA

La familia *Legionellaceae* comprende únicamente el género *Legionella*, de la que existen 48 especies descritas (*L. pneumophila*, *L. micdadei*, *L. anisa*, etc.) con más de 70 serogrupos, siendo los que más frecuentemente producen enfermedad los serogrupos 1, 4 y 6 de *L. pneumophila* y *L. micdadei*.

TABLA 1. Rangos y nombres taxonómicos de Legionella.

DOMINIO	<i>Eubacteria</i>
REINO	<i>Proteobacteria</i>
SECCIÓN	<i>γ-Proteobacteria</i>
ORDEN	<i>Legionellales</i>
FAMILIA	<i>Legionellaceae</i>
GÉNERO	<i>Legionella</i>
ESPECIE	<i>L. pneumophila</i>

Fuente: Elaboración propia

Coxiella burnetii es la especie filogenéticamente más próxima a las legionelas, ya que poseen en común el carácter de patógeno intracelular. La homología de DNA entre cepas de una misma especie del género *Legionella* es igual o superior al 70%, mientras que entre cepas de diferentes especies es inferior al 70%..

Existen legionelas no cultivables en medios usados rutinariamente, que precisan cocultivos con protozoos para su identificación, las denominadas LLAPs (Legionella-LikeAmoebaPathogens), que pueden producir enfermedad en el hombre.

Más adelante (TABLA 9) se muestra la relación de legionelas con las que se ha trabajado para este y otros trabajos en el laboratorio de microbiología de la Universidad de Zaragoza.

3. HÁBITAT Y ECOLOGÍA MICROBIANA

Legionella es una bacteria ambiental ya que su nicho natural son las aguas superficiales como lagos, ríos, estanques, formando parte de su microbiota. Además de sus nichos naturales, esta bacteria puede colonizar otros artificiales, como son los sistemas de abastecimiento, accediendo así a los sistemas de agua sanitaria, torres de refrigeración, condensadores evaporativos, fuentes ornamentales, etc. También hay algunas especies, que se han encontrado aisladas en terrenos húmedos y abonos, como *L. longbeachae*.

Una de las características de las legionelas, es que son capaces de sobrevivir en un amplio intervalo de condiciones físico-químicas:

- Temperaturas de 0 a 63°C, multiplicándose entre 20 y 40°C, y destruyéndose a 70°C; siendo su temperatura óptima de crecimiento de 35-37°C
- pH de 5 a 8,5
- oxígeno disuelto de 0,2 a 15 mg/ml, etc.

La tolerancia al cloro de las legionelas les permite sobrevivir a concentraciones que el mismo cloro elimina a *Escherichia coli*, demostrándose así, que si en el agua de la red hay *E. coli*, no se aíslan legionelas, y si la colimetría es negativa, crecen las legionelas. Sólo al alcanzar 2mg/L de cloro, se destruyen el 100% de las legionelas.

Legionella es un microorganismo aeróbico estricto, necesita oxígeno para su supervivencia (concentración mayor a 2,2 mg/l) y en general es poco activo.

Su supervivencia en el aire es corta debido a la poca resistencia que presentan a la desecación y a los efectos de la radiación ultravioleta.

Una característica biológica de esta bacteria es su capacidad de crecer intracelularmente en protozoos y en macrófagos humanos. La presencia de amebas en determinados ambientes e instalaciones es un mecanismo de supervivencia de *Legionella* en condiciones ambientales desfavorables que hacen más difícil su eliminación. Esta particularidad les confiere una gran resistencia en su hábitat natural, se multiplican en el interior de diversos protozoos de vida libre (5 géneros de amebas) y en el medio libre se encuentran formando parte de complejas biocapas microbianas. La posibilidad de multiplicación intracelular la protege contra la acción de los antibióticos y desinfectantes, de forma que sólo responde a antibióticos capaces de penetrar en las células. Por ello son de gran interés las asociaciones de las legionelas con amebas, ciliados, algas, algunas especies bacterianas e incluso plantas acuáticas como *Myriophyllum spicatum*. Otra asociación es con un organismo eucariote del suelo, *Dictyostelium discoideum*, con fase ameba, puede formar agregados, fase mucoide y cuerpos fructificantes. Asimismo, se nutre de bacterias.

En general, en su medio natural, la bacteria se encuentra en bajas concentraciones, pero en número suficiente para contaminar circuitos de agua artificiales, en los que el estancamiento de agua, material de corrosión y amebas, le permite formar una biocapa que junto con una temperatura óptima, se multiplica en concentraciones importantes, y una vez dispersadas en el aire, ayudadas por los mecanismos productores de aerosoles, infectan el aparato respiratorio humano.

4. BIOFILM

A medida que interaccionan, los microorganismos pueden formar agrupaciones físicas complejas, como los biofilms. Se desarrollan sobre todas las superficies inmersas en los ambientes acuáticos, tanto biológicos, como abióticos (cemento, metal, plástico, piedras). Los biofilms se forman con especial rapidez en sistemas acuáticos en movimiento, donde se ven provistos los microorganismos de una fuente constante de nutrientes. Estos biofilms,

representan un gran impacto en la supervivencia microbiana y en la aparición de enfermedades.

Por tanto, es importante contemplar cuatro niveles en referencia a los factores de riesgo de esta bacteria: las legionelas planctónicas, legionelas asociadas a las amebas, legionelas aisladas en el biofilm y legionelas asociadas a las amebas en el biofilm.

Las legionelas por tanto, se pueden presentar en forma planctónica, o parasitando intracelularmente a protistas de vida libre, como diferentes especies de amebas. No se ha documentado el crecimiento de *Legionella* en la naturaleza en ausencia de protozoos, y se cree que éstos como se ha comentado anteriormente, constituyen los huéspedes de la bacteria en el medio ambiente. En la naturaleza, los microorganismos residen frecuentemente en biofilms que consisten en microcolonias bien organizadas envueltas en matrices poliméricas. Dentro de estos biofilms, las microcolonias están separadas mediante canales de agua por donde se eliminan los desechos y se provee de nutrientes. Esta organización, facilita la comunicación entre los miembros de la microcolonia y permite una alimentación cruzada entre diferentes especies. Además, la conjugación de DNA entre bacterias que ocurre en un porcentaje muy elevado dentro del biofilm, es también un instrumento para la evolución y la adaptación a cambios en el medio ambiente.

Dentro del biofilm, las amebas de vida libre constituyen el principal regulador de la población bacteriana y son organismos de interés en la adaptación de las bacterias al interior de células eucariotas. Esta fase de interrelación procariota-eucariota, debe haber permitido la adaptación de *Legionella* a la supervivencia intracelular en el interior de protozoos y se ofrece así, un posible mecanismo mediante el cual estas bacterias pueden resistir situaciones adversas y propagarse rápidamente en condiciones favorables. Los estudios llevados a cabo sobre los ciclos de infección en protozoos tienden a utilizar como modelo a una ameba de vida libre, *Hartmannella vermiformis*, a pesar de que otros modelos de protozoos son también eficientes huéspedes.

Las bacterias que crecen en el interior del biofilm, son más resistentes a los biocidas al estar protegidas por el mismo. Muchas veces, el uso de biocidas, puede incluso potenciar las cepas patógenas al actuar selectivamente sobre las no patógenas. El uso de cloración en continuo es una de las estrategias más efectivas para la eliminación de biofilms, aunque su erradicación total es muy difícil. También el mantenimiento de la temperatura en los sistemas de ACS a más de 50°C, o la limitación de su formación en las paredes de los distintos sistemas hídricos con la utilización de materiales específicos o evitando zonas de estancamiento, son buenas técnicas para evitar su formación. Asimismo, es muy importante la investigación de sustancias que bloqueen los mecanismos específicos de invasión legionela-ameba.

Los aminoácidos son su principal fuente de energía, habiéndose comprobado que la presencia de otros microorganismos como las algas verde azuladas, favorecen su desarrollo. Es difícil su aislamiento in vitro ya que requieren hierro y cisteína. El medio selectivo más empleado para su aislamiento es el CYE (charcoal yeast extract), suplementado con ácido alfa-cetoglutarato. Son de

crecimiento lento; pueden tardar entre 3 y 5 días en crecer colonias visibles. Estas colonias son pequeñas y con tonalidad azul y textura esmerilada.

Aparte de esas asociaciones, se han detectado también antagonismos con especies de familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*, a cuyas bacteriocinas de alto y bajo peso molecular, las legionelas son muy sensibles. Esta competencia se producirá a nivel extracelular, donde tienen ventajas las bacterias de crecimiento rápido.

5. FUENTES DE INFECCIÓN

Como se menciona anteriormente, las instalaciones que colonizan las legionelas, amplifican y favorecen el crecimiento, por la acumulación de nutrientes y sedimentos, así como también facilitan su diseminación; el artículo 2 del Real Decreto 865/2003, divide estas instalaciones según la probabilidad de proliferación y dispersión de la bacteria:

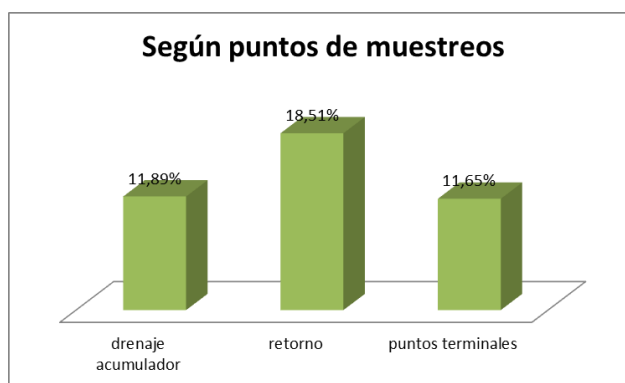
TABLA 2. Artículo 2 R.D. 865/2003 División de las instalaciones según proliferación y dispersión de la *Legionella*.

1. Instalaciones con mayor probabilidad de proliferación y dispersión
<ul style="list-style-type: none"> a) Torres de refrigeración y condensadores evaporativos. b) Sistemas de ACS con acumulador y circuito de retorno c) Sistemas de agua climatizada con agitación constante y recirculación a través de chorros de alta velocidad o la inyección del aire. d) Centrales humidificadoras industriales
2. Instalaciones con probabilidad menor de proliferación y dispersión
<ul style="list-style-type: none"> a) Sistemas de instalación interior de agua fría o depósitos, cisternas o depósitos móviles y agua caliente sanitaria sin circuito de retorno b) Equipos de enfriamiento evaporativo que pulvericen agua. c) Humectadores d) Fuentes ornamentales e) Sistemas de riego por aspersión del medio urbano f) Sistemas de agua contra incendios g) Elementos de refrigeración por aerosolización al aire libre h) Otros aparatos que acumulen agua y puedan producir aerosoles
3. Instalaciones de riesgo en terapia respiratoria
<ul style="list-style-type: none"> a) Equipos de terapia respiratoria b) Respiradores c) Nebulizadores d) Otros

Fuente: Modificado (Datos R.D. 865/2003)

Según un estudio realizado por el Dr. J. Dellundé y la Dra. R. Arango del departamento de microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, casi el 50% de las instalaciones estudiadas, estaban colonizadas por *Legionella*, de las cuales el 87% eran *L. pneumophila*, el 25% pertenecientes al SG.1 y el resto a los serogrupos entre el 2-14.

GRAFICO 1. Colonización por *Legionella* según el punto de muestreo



Fuente: Prevención y control de *Legionella* en instalaciones ACS. Universidad de Barcelona

Cualquier zona puede actuar como área de amplificación, aunque especialmente se encuentran por debajo de los 60°C, de aquí que sea tan importante mantener la temperatura por encima de los 60° en todo el recorrido; aún así, no se garantiza la no colonización de legionelas.

6. EPIDEMIOLOGÍA

La legionelosis es una enfermedad ampliamente diseminada. Se han descrito casos en América del Norte, Australia, África y Europa, notificándose más en países industrializados. Se detectan casos esporádicos todo el año, pero con más frecuencia aparecen, al igual que los brotes, en verano y otoño. La proporción de neumonías de origen comunitario causadas por *L. pneumophila* se estima en torno a un 0,5-5% del total de las mismas.

A pesar de que la legionelosis es un problema bien conocido, los datos son muy escasos en los países en desarrollo, ya que no existen redes adecuadas de vigilancia y notificación de casos. Habida cuenta que los entornos de riesgo y las poblaciones vulnerables se encuentran en todo el mundo, es seguro que el problema de la legionelosis no es realmente conocido en estas regiones.

En España la vigilancia epidemiológica de la legionelosis se basa en la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica y en otros sistemas y fuentes de información complementarios. Su objetivo es conocer la evolución de la incidencia y de 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. A continuación se describen dichos sistemas:

TABLA 3. Sistemas y fuentes de información complementarios

	Quién notifica	Periodo tiempo	Otros datos
Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO)	Médicos en ejercicio	Semanal	Encuesta enviada al CNE
Notificación de situaciones epidémicas y brotes	Responsables del estudio de la CCAA.	Trimestral	Informe final al CNE
Sistema de Información Microbiológica (SIM)	Laboratorios de microbiología clínica.	A establecer por la CCAA.	
Notificación de casos de legionelosis en viajeros en Europa	EWGLI: grupo europeo con información recíproca sobre casos de turistas con legionelosis.		
Información procedente del centro Nacional de Microbiología	En casos de brotes: técnicas de tipificación molecular para comparar con cepas ambientales y establecer fuente de infección.	Laboratorio de referencia para todo el país.	

Fuente: Modificado de datos de la CNE

En EEUU, según datos de los CDC, entre 8.000 y 18.000 personas son hospitalizadas con legionelosis. Recientemente, los CDC americanos han incluido los viajes como un factor de riesgo para la legionelosis, habiendo detectado que más del 20% de los casos notificados de esta enfermedad se relacionaban con algún tipo de viaje.

En Europa, según datos de 2008, se notificaron 5.960 casos de legionelosis en 34 países europeos. El mayor número de casos se registró en Francia (1244), España (1219) e Italia (1107), aunque, las tasas por millón de habitantes fueron mayores en Suiza (28,6), Eslovenia (23,7), Dinamarca (23,3) y los Países Bajos (20,5). En 2009, se declararon en Europa 808 casos de enfermedad concretamente asociados a viajes.

Tanto a nivel nacional, como en Aragón, se considera Enfermedad de Declaración Obligatoria, individualizada y urgente desde el año 1996.

La aparición de brotes genera alarma social y gran demanda informativa por la alta letalidad en personas de edad avanzada o con patologías previas, y la

posibilidad de prevención mediante el control de las instalaciones que utilizan de agua. Normalmente se presenta en forma de casos esporádicos, pero en ocasiones se han detectado casos agrupados y brotes.

TABLA 4. Evolución temporal, casos y fallecidos (1999-2009) del CNE.

Tabla 1a
Brotos de legionelosis comunitarios y nosocomiales. Evolución temporal, casos y fallecidos según el ámbito. Años 1999-2009

BROTOS COMUNITARIOS						BROTOS NOSOCOMIALES					
AÑO	BROTOS	CASOS	MEDIA CASOS	FALLECIDOS	LETALIDAD	AÑO	BROTOS	CASOS	MEDIA CASOS	FALLECIDOS	LETALIDAD
1999	8	78	9,8	6	7,7	1999	2	8	4,0	4	50,0
2000	12	243	20,3	12	4,9	2000	5	28	5,6	8	28,6
2001	19	716	37,7	7	1,0	2001	6	41	6,8	13	31,7
2002	35	331	9,5	8	2,4	2002	6	29	4,8	5	17,2
2003	39	212	5,4	5	2,4	2003	2	10	5,0	2	20,0
2004	36	187	5,2	11	5,9	2004	2	8	4,0	1	12,5
2005	57	367	6,4	12	3,3	2005	1	9	9,0	1	11,1
2006	34	257	7,6	4	1,6	2006	3	6	2,0	0	0,0
2007	27	110	4,1	5	4,5	2007	2	7	3,5	1	14,3
2008	46	189	4,1	5	2,6	2008	3	7	2,3	1	14,3
2009	27	124	4,4	6	4,7	2009	—	—	—	—	—
Total	340	2.814	8,3	81	2,9	Total	32	153	4,8	36	23,5

Fuente: CNE

Los datos de la tabla anterior, proceden del informe del boletín epidemiológico de 2010 del Centro Nacional de Epidemiología. Al igual que los datos anteriores, muestran al principio un incremento de los brotes y casos, desde 1999 hasta el 2005, esto se debe probablemente a una mejora en la detección y en la notificación de la enfermedad, más que por un aumento de la incidencia real de la legionelosis y a partir de 2006 se estabiliza el crecimiento.

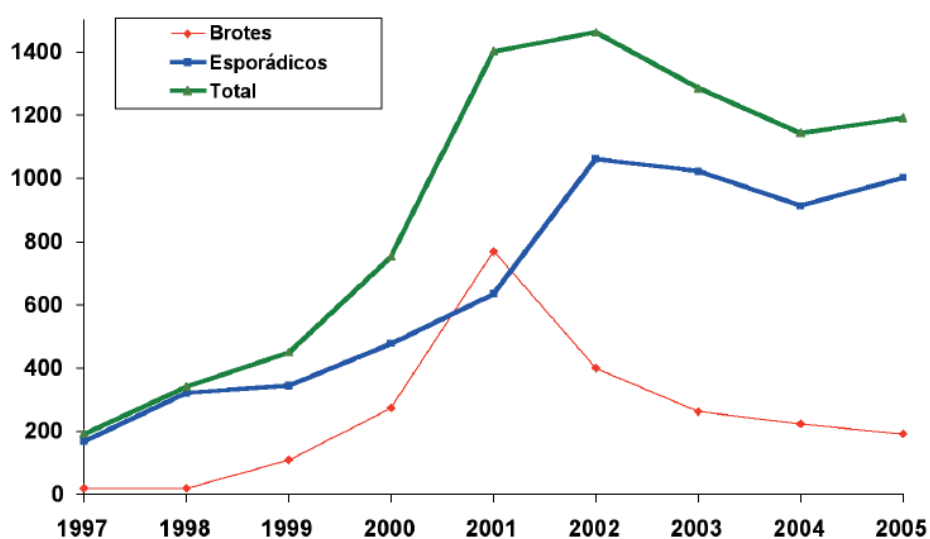
En el primer año del que se dispone de datos, 1997, se declararon 201 casos de legionelosis lo que supone una tasa de 0,51 casos por 100.000 habitantes, desde entonces ha presentado una incidencia creciente hasta el año 2001, año en el que se produjo el brote de legionelosis de Murcia, con un gran número de afectados (650 casos confirmados, aunque su letalidad fue inferior (1%) a la de la mayoría de los brotes declarados a escala mundial). Esta tasa de crecimiento anual (52,5%) se explica en parte por la amplia difusión del uso del antígeno en orina como técnica diagnóstica y un mejor diagnóstico, control y prevención de la enfermedad.

En el año 2002 la notificación de la enfermedad se estabiliza con 1.461 casos, lo que supone una tasa de incidencia global de 3,60 casos por 100.000 habitantes, en este año el 50% de los brotes afectaron a menos de 3 personas. A partir de aquí los casos inician un descenso paulatino, más evidenciable en el número de casos notificados asociados a brotes. De 1.262 casos y una tasa de 3,19 por 100.000 habitantes en el año 2003, se ha pasado a 1.192 casos y una tasa de 2,89 en el año 2005,

En cuanto a la distribución por el tipo de casos se puede observar una disminución de los casos asociados a brotes, más evidente a partir del año 2001 (que incluye el brote acaecido ese año en la ciudad de Murcia) y un continuo incremento de los casos esporádicos.

En el caso de Aragón, la incidencia de la legionelosis ha crecido progresivamente. La mejor notificación de casos y el empleo del antígeno específico desde el 2002, pueden influir en este aumento. Pese al ligero incremento en el último año, podemos decir que estas cifras siguen siendo las más bajas observadas en la última década.

GRÁFICO 2. Casos y brotes en Aragón de 1997-2005



Fuente: CNE

La información relativa al estudio de brotes aporta datos sobre factores de riesgo y mecanismos de transmisión. Desde 1989 a 1997 se declararon 45 brotes de legionelosis (679 casos en total), alguno de ellos con un elevado número de casos, como el ocurrido en un hotel de Granada en 1991, que afectó a 91 personas (BMS 1991), o el ocurrido en Alcalá de Henares, Madrid, en 1996, que afectó a 224 personas (BES 1997, Grupo de trabajo BE de la CAM 1997). Según el ámbito donde se produjeron hubo 37 brotes comunitarios (82%) y 8 hospitalarios (18%) (CNE, datos no publicados).

La fuente de infección más frecuentemente relacionada con la aparición de brotes es el agua caliente sanitaria; sin embargo, según datos consultados de la CNE, se asocia un mayor número de casos a las torres de refrigeración. Es de reseñar que en más del 32% de los casos no es posible detectar la fuente de infección.

TABLA 5. Fuentes de infección de brotes y casos de legionelosis.

FUENTES DE INFECCIÓN DE BROTES Y CASOS DE LEGIONELOSIS			
		Número de brotes (%)	Número de casos
Agua sanitaria edificios		87 (29,5%)	423
Torre refrigeración		63 (21,3)	1565
Baño burbujas/termal		5 (1,8)	59
Otros		7 (2,4)	32
Resultados negativos		39 (13,2)	168
Desconocido		95 (32,1)	533
TOTAL		296 (100)	2780

Fuente: CNE

Del total de 1.365 casos en viajeros, declarados por distintos países de Europa a EWGLI en el período 1987-1997, 376 (28%) están relacionados con instalaciones españolas (CNE datos no publicados). En nuestro país, esta información tiene claras repercusiones sociales, económicas y sanitarias (Joseph y cols 1996, Infuso y cols 1997, Galmés y Martínez-Navarro 1997, BES 1998b).

Por último, el Laboratorio de Referencia de *Legionella* ha caracterizado desde 1980, aproximadamente, 2.000 aislamientos de *Legionella* (300 de origen humano y 2.700 de origen ambiental), provenientes de casi todas las Comunidades Autónomas. De sus resultados se desprende que *L. pneumophila* serogrupo 1 es el patógeno principal así como el serogrupo más frecuente en el ambiente (Pelaz 1998).

7. CLÍNICA

Los síndromes clínicos producidos por los miembros de la familia *Legionellaceae* reciben el nombre de legionelosis. La enfermedad de los legionarios es la neumonía causada por *L. pneumoniae*, que ha sido detectada en muchos hospitales desde que se presentó la primera epidemia en 1976.

El cuadro clínico es muy variable, desde formas asintomáticas, hasta una neumonía grave con fallo multiorgánico, pero clásicamente, se distinguen dos formas clínicas: la infección pulmonar o neumonía por *Legionella* y la fiebre Pontiac o síndrome global agudo autolimitado.

- La fiebre Pontiac se presenta con un cuadro febril con dolores articulares y musculares (artromialgias) y afectación del estado general, fiebre, tos, dolor torácico, diarrea y confusión. En general es una enfermedad

autolimitada con una clínica leve que evoluciona a la curación. La fiebre de Pontiac es por tanto, una enfermedad febril aguda, no neumónica y autolimitada. Su periodo de incubación es de 24-48 horas, la tasa de ataque es del 95% y su letalidad es del 0%.

- Neumonía por Legionella (Enfermedad del legionario). Se presenta con una incidencia entre 1 – 5%. La presentación clínica puede variar desde una neumonía atípica a una forma clásica. Es frecuente la afectación de otros órganos como riñón, hígado, tracto gastrointestinal, sistema nervioso. Los síntomas más frecuentes son: fiebre elevada, tos, dolor muscular, escalofríos, cefalea, dolor torácico, espectoración, diarrea, confusión mental o alteración del estado de conciencia. Su período de incubación es de 2 a 10 días, la tasa de ataque es del 1-5% y la letalidad es del 15-20%, aunque ésta disminuye con un tratamiento precoz con antibióticos.

TABLA 6. Características de las formas clínicas provocadas por *L. pneumophila*

	Enfermedad del Legionario	Fiebre de Pontiac
Incidencia	1-5 %	95 %
Periodo Incubación	2-10 días	1-2 días
Síntomas	Fiebre, tos, dolor muscular, escalofríos, dolor de cabeza, dolor torácico, esputos, diarrea, confusión, coma	Fiebre, dolor muscular, tos, escalofríos, dolor de cabeza, dolor torácico, confusión
Efectos en pulmón	Neumonía	Pleuritis, Ausencia de neumonía
Afección otros órganos	Riñón, hígado, tracto gastrointestinal, sistema nervioso	Ninguno
Proporción fatales	casos 15-20%	Ausencia

Fuente: CNE

En los primeros casos, el agente causal fue *L. pneumophila*, sin embargo cuadros similares se relacionaron con *L. feelei*, *L. anisa* y *L. micdadei*.

L. pneumophila es responsable de aproximadamente el 85% de los casos diagnosticados de infección por *Legionella* spp., en el 15% restante, se aíslan con frecuencia decreciente variable de unos países a otros, *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, y *L. longbeachae*. La mayoría de los enfermos con infecciones por estas especies, estaban inmunocomprometidos por tratamiento

con corticosteroides, un trasplante o padecían cáncer. Asimismo, en los pacientes con neumonía por *L. micdadei*, el estado de inmunosupresión es más frecuente que entre los infectados con *L. pneumophila*. La infección por virus de la inmunodeficiencia humana condiciona un mayor riesgo para *L. pneumophila* y en menor grado para *L. bozemanii*, *L. feeleii* y *L. micdadei*.

8. TRANSMISIÓN

La transmisión de las legionelas al hombre requiere la existencia de un reservorio, un mecanismo de diseminación eficiente y un huésped susceptible a la infección. La cantidad de *Legionella* necesaria para que se produzca infección, va en relación inversa a la virulencia de la cepa y la susceptibilidad del huésped.

8.1. Mecanismo de transmisión

El mecanismo de transmisión más aceptado es mediante la inhalación de gotículas de agua contaminada y aerosolizada mediante diversos mecanismos (torres de refrigeración, duchas).

Una vez en el tracto respiratorio, los macrófagos alveolares fagocitan la *Legionella*. No obstante, las legionelas son un patógeno intracelular, capaz de multiplicarse en el interior de los macrófagos hasta la ruptura celular.

Otro mecanismo que se ha sugerido recientemente, pero que no se considerará de momento 100% fiable, es el que algunos autores consideran el más importante: mediante aspiración de agua contaminada o de secreciones de la orofaringe previamente colonizada por este microorganismo. De este modo la *Legionella* llega a los pulmones mediante aspiración de legionelas externas que se encuentran en la cavidad oral y escapan del reflejo usual de deglución entrando en el tracto respiratorio.

8.2. Mecanismos de patogenicidad

La legionelosis aparece fundamentalmente en personas mayores, con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), en personas que toman glucocorticoides y en enfermos transplantados. Otros factores que pueden influir en la susceptibilidad del huésped son: sexo masculino, tabaquismo, alcoholismo, diabetes, cáncer o estar sometido a tratamientos de diálisis.

No obstante, los individuos sanos también pueden padecer la enfermedad si han sufrido una exposición a concentraciones suficientemente elevadas del agente infeccioso.

Para causar la enfermedad, la bacteria debe ser virulenta, estar presente en cantidades suficientes, ser dispersada desde sus reservorios y alcanzar el fondo del pulmón.

No existen datos sobre dosis infectante, pero sí tentativas de establecer unos criterios de valoración cuantitativos basados en los datos procedentes de las investigaciones de los casos de legionelosis. Estos criterios orientativos se recogen en la siguiente tabla:

TABLA 7. Criterios de valoración cuantitativa sobre dosis infecciosa

LEGIONELLA (ufc/ml)	TORRES DE REFRIGERACIÓN	DE INSTALACIÓN ACS	HUMIDIFICADORES
<1	Bajo	Bajo	Bajo
1/9	Bajo	Bajo	Moderado
10/99	Bajo	Moderado	Alto
100/999	Moderado	Alto	Alto
>1000	Alto	Alto	Alto

Fuente: INSHT

Como se ha explicado en el apartado anterior las legionelas son capaces de multiplicarse en un protozoo y de sobrevivir a la fagocitosis por el macrófago alveolar. Los factores de virulencia que facultan a las legionelas para la multiplicación intracelular, tanto en los protozoos como en los macrófagos, han sido muy estudiados en las diferentes etapas del proceso: endocitosis, vacuolización, multiplicación y, finalmente, liberación de las legionelas. Se conoce que los factores de virulencia no son idénticos entre especies de *Legionella* aisladas de procesos patológicos humanos, ni en una misma especie no es idéntica la activación de los factores de virulencia en el interior de una ameba o de un macrófago humano.

Al final de la fase intracelular se producen un conjunto de cambios en la bacteria que le permiten adaptarse a los diferentes estadios del proceso que finaliza después de la multiplicación, adquiriendo una serie de características que le permitirán liberarse al exterior y reinfectar a otros macrófagos (resistencia a los ácidos, la expresión de flagelos y la citotoxicidad, entre otras).

9. MÉTODOS DE DETECCIÓN

A continuación se detallan las diferentes pruebas utilizadas para el diagnóstico de la infección por *Legionella* spp.:

TABLA 8. Sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS				
PRUEBA		SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)	TIEMPO
Aislamiento cultivo	por	70	100	3-10 días
IFI		78-91	99	2 meses
Antígeno SG1	L. pne.	70	100	2-3 horas
PCR		95	25-75	

Fuente: INSHT

Aislamiento de la bacteria por cultivo. A partir de muestras respiratorias tales como esputos, muestras obtenidas mediante broncoscopio o tejido pulmonar, utilizando los medios de cultivo adecuados (BCYE- α -cetogluturato) es la técnica de elección. El crecimiento se produce entre 3 y 10 días.

Serología mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Demostrando la presencia de anticuerpos específicos en el suero, tomados en la fase aguda o convaleciente de la enfermedad. La seroconversión se produce en 2 meses.

*Detección de antígeno específico de *L. pneumophila* SG. 1 en orina. Es una técnica rápida que se está aplicando de forma creciente. Debido a la adopción de la determinación por enzimoimmunoanálisis (EIA) y de inmunocromatografía de membrana (IC) se puede detectar los antígenos en 2-3 horas y en 15 minutos, respectivamente. El antígeno de *Legionella* es detectable desde el inicio de los síntomas hasta muchos meses después.

Técnica de la PCR. Mediante la utilización de sondas específicas de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa, posee una especificidad del 95% y una sensibilidad entre el 25 y el 75%, sobre todo en muestras respiratorias.

10. MARCADORES MOLECULARES

Existen varias definiciones de marcador genético. Rieger et al. (1982) lo definen como cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente utilizado en el análisis genético. Gale (1994) lo define como cualquier medio para identificar cualquier locus específico en un cromosoma. En definitiva, podemos usar como marcador el efecto de un gen fácilmente observable en los individuos, metabolitos característicos de bajo peso molecular, proteínas que pueden extraerse y observarse con facilidad (isoenzimas, proteínas), generalmente tras un fraccionamiento mediante electroforesis, o segmentos de

DNA que pueden obtenerse e identificarse por toda una serie de técnicas moleculares (Pérez de la Vega, 1993).

Hay autores que entienden que sólo los ácidos nucleicos deben de ser incluidos en esa categoría, sin embargo otros aplican también productos primarios, las proteínas y distinguen entre marcadores proteicos y DNA.

Un método de tipificación es aquel que puede ser usado para diferenciar cepas bacterianas pertenecientes a una misma especie. La esencia del uso de estos métodos es la de ser capaz de comparar aislamientos y agrupar cepas con idénticos resultados en un mismo grupo. Cuando dos aislamientos estudiados rinden resultados diferentes según uno o más métodos de tipificación, en general puede concluirse que derivan de diferentes líneas clonales. Sin embargo, para poder ubicar distintos aislamientos en una misma línea clonal, se requieren resultados coincidentes en más de un método de tipificación.

Los métodos de tipificación deben cumplir tres requisitos esenciales:

1. Poder de tipificación (ser capaces de catalogar cualquier aislamiento en un tipo determinado.)
2. Poder discriminatorio (ser capaces de discriminar entre aislamientos no relacionados).
3. Reproducibilidad (ser capaces de brindar resultados reproducibles entre diferentes ensayos y estables para una cepa dada obtenida de diferentes orígenes).

Además, debe de tenerse en cuenta la sencillez de realización así como de interpretación de los resultados.

Entre ellos destacan: antibiotipo, bacteriocinotipo, serotipo y fagotipo.

10.1. Antibiotipo

Estos marcadores, nos permiten determinar si dos o más aislamientos corresponden a una misma cepa.

10.2. Fagotipia

Tipificación de una cepa bacteriana mediante su sensibilidad a la lisis por bacteriófagos; dentro de una misma especie bacteriana (ej.: *Staphylococcus aureus*) hay distintas cepas que son lisadas por diferentes bacteriófagos (12, 80/81 entre otros) lo cual permite su identificación; la presencia de placas de lisis visibles en un cultivo confluyente sobre agar, permite la tipificación de cada cepa

10.3. Plasmidotipia

Técnica de utilidad para marcar epidemiológicamente los plásmidos de resistencia. no aplicada en *Legionella* spp. Empleada al principio para discriminar cepas causantes de brotes, su aplicación ha caído en desuso.

10.4. Bacteriocinotipia

El método de la piocinotipia se basa en la producción de bacteriocinas por *Pseudomonas aeruginosa*; posee una gran sensibilidad, constituyendo un valioso marcador epidemiológico. A pesar de que algunos autores no han hallado correlación entre sensibilidad, producción de piocinas y serotipo, en un trabajo publicado en 1978 por R. Gómez-Lus, se demostró que había una evidente correlación entre producción y sensibilidad, y en segundo lugar, algunos serotipos demostraron poseer una homogeneidad en su piocinogénesis y sensibilidad a las piocinas; habiendo, una relación inversa entre la producción de piocinas y sensibilidad a las mismas, siendo el patrón más frecuente el que corresponde a cepas buenas productoras de bacteriocinas y poco sensibles (resistentes).

Desde un punto de vista ecológico, estas cepas parecen las mejor dotadas para competir por los substratos, siendo capaces de antagonizar a otras cepas a nivel de huéspedes, de tejidos, y en general, de cualquier nicho.

Muchas veces se considera a las bacteriocinas, “antibióticos”, pero esta consideración, no es correcta; si bien los antibióticos son producto del metabolismo secundario de la célula y su síntesis se dispara cuando se detienen las rutas biosintéticas principales, las bacteriocinas son proteínas no estructuradas de síntesis ribosómica cuya producción casi siempre va paralela al crecimiento celular. No se debe a ningún error metabólico, por dos motivos principalmente: si fueran sustancias sin sentido, no se mantendrían a través de tantas generaciones, y como ya he comentado, su producción va unida al crecimiento celular.

El fenómeno de antagonismo, podría encuadrarse más bien en el campo de las interacciones microbianas, en la lucha por la existencia en los microentornos. En un microhábitat donde las interacciones intraespecíficas son predominantes, la presencia en una población microbiana de individuos bacteriocinogénicos podría contribuir a la disminución del porcentaje de individuos de la misma especie de fenotipo no productor debido primero a las bacteriocinas y segundo por transmisión por conjugación de los plásmidos portadores de ese carácter.

El término bacteriocina, (Jacob et al, 1953), incluía a las proteínas del tipo de las colicinas (inhibidores bacterianos producidos por *Escherichia coli*) caracterizadas principalmente por su biosíntesis letal, actividad antibacteriana intraespecífica y adsorción a receptores específicos.

Como se han encontrado discrepancias notables en ciertas bacterias, algunos autores prefieren hablar de “sustancias de tipo bacteriocina”, porque no cumplen alguno de los criterios anteriores, o bien como Konisky, que propone el uso del término bacteriocina para designar “proteínas o complejos de proteína con actividad antibacteriana, no activas frente a la estirpe productora”.

Surge así el término de las microcinas, para designar sustancias de tipo antibiótico producido por enterobacterias, de naturaleza proteica, bajo peso molecular y espectro de acción reducido a enterobacterias, cuya productividad e inmunidad van codificadas por plásmidos. Estas últimas, son capaces de actuar bajo condiciones que la mayoría no lo permiten (de Lorenzo Aguilar , 1984), por lo que son de momento, los únicos inhibidores bacterianos a los que se las ha asignado un claro papel ecológico.

Hay algunas versiones que restan importancia a la competitividad de las bacteriocinas, anunciando que estas se producen en muy baja concentración y que por tanto serían fácilmente ignoradas o atacables por otras bacterias con las que cohabitasen. Eso sí, la característica que le hace afectar únicamente a individuos de su misma especie o similares, le proporcionaría una ventaja y es la selección natural, del mejor dotado.

11. BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas se definen como sustancias proteicas antimicrobianas producidas por un gran número de especies bacterianas (Taggs y col. 1976). Estas sustancias constituyen un grupo heterogéneo de proteínas que varían mucho en su espectro antimicrobiano, propiedades bioquímicas, mecanismo de acción y características genéticas (Piard y Desmazeaud, 1992; Tagg y col. 1976). La actividad antimicrobiana y su estructura proteica, probablemente sean las únicas características comunes a todas ellas (Stiles y Hastings, 1991). El término "bacteriocinogenicidad" se emplea para describir la capacidad de las

bacterias para sintetizar y eliminar al exterior proteínas antagonistas del desarrollo de otros microorganismos (Daeschel y col. 1990).

Estas sustancias se detectaron por primera vez en *E. coli* (Hardy, 1975) y más tarde en algunas bacterias Gram-positivas (Tagg. y co., 1976).

La biosíntesis de las bacteriocinas ocurre o en la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, y en la mayoría de los casos, guarda relación con la biomasa producida (Piard y Desmazeaud, 1992), si bien la producción máxima en los medios de cultivo puede ocurrir en diferentes fases del ciclo de crecimiento (Tagg y Col., 1996)

Algunos investigadores han señalado que ciertos componentes específicos del medio de cultivo interfieren sensiblemente en la producción de alguna bacteriocina individual. Así, varios trabajos indican la necesidad de algunos nutrientes, como extracto de levadura, aminoácidos, manganeso y manitol, para aumentar, disminuir o suprimir la producción de diversas bacteriocinas (Rogers, 1972; Clarke y col., 1975; Hale y Hinsdill, 1973 y Tagg y col., 1975).

Las variaciones de las condiciones de cultivo, como por ejemplo la temperatura y el tiempo, ejercen un profundo efecto en la producción de bacteriocinas activas. Generalmente, se producen más bacteriocinas cuando la cepa productora se cultiva a su temperatura óptima de crecimiento (Tagg y Col, 1976). El desarrollo de la cepa productora a temperaturas elevadas puede suprimir la producción de bacteriocinas (Dajoni, 1974, Tagg y col. 1975) y algunas veces eliminar irreversiblemente esa propiedad (Dajoni, 1974; Jetten y Vogels, 1973), Shlegel y Slade, (1973) demostraron que la producción de estreptocina era máxima en la fase logarítmica descendiendo algo cuando el cultivo entraba en la fase estacionaria. Por otro lado en otros estudios se ha demostrado que la producción de bacteriocinas se iniciaba al final de la fase logarítmica y que disminuía lentamente tras un período de incubación prolongado. Otras investigaciones también han descrito pérdidas sustanciales en la actividad de las bacteriocinas de cultivos incubados durante mucho tiempo. Este efecto puede deberse a la existencia de inactivadores específicos de las bacteriocinas, digestión enzimática o a la reabsorción de la bacteriocina por la cepa receptora (Tagg y Col., 1976).

11.1. Tolerancia al calor, a la acidez y a las enzimas

De acuerdo con su definición, las bacteriocinas se inactivan, al menos por una enzima proteolítica, entre las que conviene citar las de origen pancreático (tripsina y alfa-quimiotripsina) y gástrico (pepsina). Algunas bacteriocinas son sensibles a otras enzimas como las lipasas, amilasas y fosfolipasas, lo que indica la heterogeneidad de las bacteriocinas y la influencia de los compuestos no proteicos en su estructura y actividad (Jiménez y col., 1990; Lewus y col., 1992; Upreti y Hindill, 1973).

Generalmente las bacteriocinas son termorresistentes, y en el caso de las bacteriocinas de *Legionella*, les permitiría mantener su actividad antimicrobiana a temperaturas elevadas de las torres de refrigeración.

Las bacteriocinas son también, generalmente estables a pH ácido o neutro, aunque existen excepciones.

La estabilidad de las bacteriocinas disminuye a medida que aumenta su purificación.

11.2. Espectro antimicrobiano de las bacteriocinas

El espectro antimicrobiano de las bacteriocinas parece estar asociado a presencia de receptores apropiados en los microorganismos receptores (Taggs y col. 1976). Sin embargo, la mayoría de las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-negativas actúan fundamentalmente sobre especies microbianas relacionadas taxonómicamente con ellas, mientras que las bacteriocinas de las Gram-positivas son antagonistas de una mayor diversidad de especies Gram-positivas (Tagg y Col. 1976). Según su espectro antimicrobiano, pueden clasificarse en: a) bacteriocinas activas frente a bacterias taxonómicamente relacionadas y b) bacteriocinas con un amplio rango de actividad frente a bacterias también Gram-positivas.

11.3. Mecanismo de acción de las bacteriocinas

Tagg y col. (1976) señalan que la acción de las bacteriocinas sobre las células sensibles ocurre en dos etapas. En la primera fase, la bacteriocina se adsorbe en receptores específicos y no específicos de la célula hospedadora. En ese estadio, las bacteriocinas son sensibles a las proteasas. En una segunda fase, ésta ya es irreversible, la bacteriocina origina alteraciones celulares en las células sensibles de acuerdo con cada tipo de bacteriocina.

11.4. Bacteriocinas en *Legionella*

Estudios ecológicos sobre *Legionella spp.* son esenciales para entender mejor sus fuentes en el medio natural, el mecanismo de su entrada en los sistemas de agua creados por el hombre y los factores que permiten su supervivencia y crecimiento en los hábitats acuáticos

La interacción bacteriana-protozoario contribuye a la amplificación de la población de *Legionella* en los sistemas de agua, actuando como un reservorio de la infección y contribuyendo a la virulencia del patógeno para infectar células humanas. *Legionella* es capaz de sobrevivir como organismo libre por largos períodos dentro de los biofilms que se han generado en los sistemas de agua artificial.

Como ya he comentado anteriormente, el conocimiento sobre biofilm asociado a la legionela puede dar lugar a medidas de control eficaces para prevenir la legionelosis, pero las nuevas perspectivas en el control de la contaminación por *Legionella* pueden surgir a partir de las investigaciones sobre las bacterias acuáticas capaces de inhibir el crecimiento de la legionela en sistemas de aguas naturales y artificiales, incluso de la capacidad que tienen ellas, las legionelas, de inhibirse a sí mismas.

Basados en el criterio ecológico y al haber comprobado la elevada sensibilidad in vitro de las legionelas a bacilos gram negativos (BGN), pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, y *Aeromonas*, así como géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus* y *Salmonella*) y en menor grado a bacterias gram positivas (BGP) (géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*)^{1,6}, se ha ampliado este estudio con el análisis de la posible actividad de las legionelas sobre diversas cepas de BGN, con los que puede coexistir en el medio hídrico, e incluso en los enfermos con las BGP.

Aunque la actividad bacteriocinogénica de las legionelas no había sido detectada con anterioridad, recientemente se ha demostrado que 20 especies del género *Legionella* y 8 serogrupos de *L. pneumophila* son productores de bacteriocinas (BL o BLIS, de bacteriocin-like o bacteriocin-like inhibitory substance, respectivamente).

Para la caracterización de las bacteriocinas, se proponen 6 puntos (Jacob, F. Lwoff, S., Wollman, E. Ann. Inst. Pasteur. 1953):

- Espectro de actividad reducido
- Naturaleza proteica
- Mecanismo de acción bactericida
- Unión a receptores específicos
- Codificación por plásmidos que además confieren inmunidad frente a la bacteriocina
- Dudas en los gram-positivos.

En otro estudio previo, se confirmó en 36 especies y serogrupos de *Legionella spp*, mostrando una gran variabilidad en el balance entre producción de bacteriocinas y sensibilidad a las mismas. Este llamativo comportamiento de todas las legionelas estudiadas significa una capacidad discriminatoria con valor epidemiológico y ecológico, que proyectan su utilidad para interpretar que las bacteriocinas de las legionelas tienen sobre todo un valor ecológico, y actúan con toda probabilidad como señales, constituyendo por tanto su lenguaje conocido en otras bacterias, es el denominado quórum sensing. La especificidad que poseen las legionelinas se expresa con un carácter discriminatorio.

Estos conocimientos pueden servir para encontrar medidas de control más efectivas de la persistencia de las legionelas en el medio ambiente.

11.4.1. Detección del Quorum sensing (D.Q.)

Las bacteriocinas han sido reconocidas recientemente como señales moleculares con un papel clave para el comportamiento microbiano colectivo.

Antes se pensaba que las bacterias eran incapaces de comunicarse o de organizarse en grupo, pero es cierto que la comunicación célula-célula es una actividad fundamental y realizada por la mayoría de las bacterias; se ha demostrado que son capaces de coordinar sus actividades.

La caracterización de las moléculas señal de la D.Q. demostró que regulan la expresión de una gran variedad de fenotipos (Fucqua et al.).

Las bacterias se comunican por medio de señales moleculares difusibles. La variación de estas señales es amplia, existiendo sistemas de percepción y mecanismos de transducción que convierten la información en cambios de la regulación de los genes.

La D.Q. permite, por tanto, a las poblaciones bacterianas regular colectivamente la expresión génica y sincronizar el comportamiento del grupo.

La detección del quórum permite el acceso de las bacterias a los nutrientes y la organización de la respuesta defensiva frente a sus competidores, así como optimizar su capacidad para diferenciarse en morfotipos mejor adaptados para sobrevivir en un ambiente hostil. La población bacteriana ocupa un nicho ecológico cerrado, sintetizando constitutivamente un bajo nivel de señales, y que su concentración crece en sincronía con el aumento de la población.

11.4.2. Bacteriocinas de alto y bajo peso molecular

El tamaño de las proteínas es medido usualmente en masa molecular, aunque algunas veces se menciona su longitud y diámetro. El peso molecular es la masa de 1 mol de proteína, usualmente se expresa en daltones. La masa se puede determinar con métodos como: la electroforesis, la filtración en gel y la espectrometría de masas.

Los métodos de separación de proteínas que se está empleando es la electroforesis en gel de poliacrilamida. Por el resultado de algunas pruebas podemos deducir que éstas tienen muy alto peso molecular, por encima de 14 kDa. Además, podemos comprobar a grosso modo que las bacteriocinas de bajo peso molecular difunden más en el medio que las de alto peso molecular que dan lugar a halos de inhibición más pequeños.

12. CEPAS DE ESTUDIO

La familia *Legionellaceae* incluye un género, *Legionella*, que a su vez comprende 48 especies y más de 70 serogrupos. *L. pneumophila* posee 15 serogrupos, siendo el serogrupo 1 el más frecuentemente aislado en pacientes (más del 80 % de los casos confirmados).

12.1. Cepas de *Legionella* estudiadas

En nuestro estudio, hemos dispuesto de la siguiente variedad de cepas de *Legionella*:

TABLA 9. Cepas de *Legionella* estudiadas

Género <i>Legionella</i>	
Especies	
<i>L. pneumophila</i>	<i>L. anisa</i>
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 1	<i>L. bozemanii</i>
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 2	<i>L. bozemanii</i> serogrupo 2
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 3	<i>L. chemi</i>
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 4	<i>L. dumoffii</i>
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 5	<i>L. enydra</i>
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 6	<i>L. feelei</i>
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 7	<i>L. feelei</i> serogrupo 2
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 8	<i>L. gormanii</i>
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 9	<i>L. hackellae</i>
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 10	<i>L. hackellae</i> serogrupo 2
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 11	<i>L. israeliensis</i>
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 12	<i>L. jamesstownensis</i>
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 13	<i>L. jordanis</i>
<i>L. pneumophila</i> serogrupo 14	<i>L. longbeachae</i>
	<i>L. longbeachae</i> serogrupo 1
	<i>L. longbeachae</i> serogrupo 2
	<i>L. macacae</i>
	<i>L. micdadei</i>
	<i>L. oakridgensis</i>
	<i>L. parisiensis</i>
	<i>L. santhelensis</i>
	<i>L. steigerwardii</i>
	<i>L. wadsworthii</i>

Fuente: Elaboración propia

Se ha trabajado con 20 especies diferentes. La especie *Legionella pneumophila* origina más del 90% de las infecciones. Esta especie comprende 15 serogrupos. El más patógeno es el serogrupo 1 (52% de las infecciones por *Legionella*), seguido del serogrupo 6 (12%). En total la *L. pneumophila* causan más del 85 % de las infecciones por *Legionella*. Las siguientes en importancia están por debajo del 5 % de las infecciones: *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii* y *L. longbeachae*.

Del serogrupo 1, que es el más frecuentemente aislado en pacientes, disponemos de varias cepas; principalmente hemos estudiado 4 de ellas que son las que figuran en la tabla. Además, de las 19 especies restantes, se han estudiado dos diferentes serogrupos de 4 de ellas.

Legionella anisa es una de las especies más frecuentes distinta de *L. pneumophila* en el medio ambiente y pueden ser adquiridas en hospitales.

TABLA 10. Características de las cepas estudiadas

Especie	Origen	Grupo DNA
<i>L. pneumophila</i>	Ambiental / Clínico	
<i>L. anisa</i>	Ambiental / Clínico	2
<i>L. bozemanii SG. 1</i>	Ambiental / Clínico	2
<i>L. bozemanii SG. 2</i>		2
<i>L. cherrii</i>	Ambiental	2
<i>L. dumoffii</i>	Ambiental / Clínico	2
<i>L. erythra</i>	Ambiental	1
<i>L. feeleii SG. 1</i>	Ambiental / Clínico	3
<i>L. feeleii SG. 2</i>		3
<i>L. gormanii</i>	Ambiental / Clínico	2
<i>L. hackeliae SG. 1</i>	Clínico	10
<i>L. hackeliae SG. 2</i>		10
<i>L. israeliensis</i>	Ambiental /Clínico	11
<i>L. jamestownensis</i>	Ambiental	4
<i>L. jordanis</i>	Ambiental / Clínico	7
<i>L. longbeachae SG. 1</i>	Ambiental/ Clínico	2
<i>L. longbeachae SG. 2</i>		2
<i>L. maceachearnii</i>	Ambiental/ Clínico	
<i>L. micdadei</i>	Ambiental / Clínico	6
<i>L. oakridgensis</i>	Ambiental / Clínico	
<i>L. parisiensis</i>	Ambiental	
<i>L. sainthelensis</i>	Ambiental / Clínico	
<i>L. steigerwartii</i>	Ambiental	
<i>L. wadsworthii</i>	Clínico	

Fuente: Elaboración propia

Se piensa que *L. anisa* puede enmascarar la contaminación del agua por *L. pneumophila*, lo que sugiere que existe un riesgo de infección por *L. pneumophila* en pacientes inmunocomprometidos.

L. bozemanii es menos conocida para los médicos; ya que en ocasiones se trabaja con pruebas específicas para *L. pneumophila* y no detectan por ejemplo la infección de *L. bozemanii*, pero ésta puede ser también causante de infección pulmonar como se ha visto en casos de pacientes inmunocomprometidos. El primer caso aislado de *L. bozemanii* en Europa fue uno de neumonía adquirido por un hombre de 75 años de edad, durante sus vacaciones en Mallorca. A pesar de la ventilación artificial y la eritromicina intravenosa el paciente falleció. El organismo causante fue aislado de una muestra del pulmón obtenido post mortem. El examen de una sola muestra de suero por medio de una prueba de inmunofluorescencia indirecta identificó a *L. bozemanii*. *L. bozemanii* serogrupo 2, fue aislada de un paciente, caracterizada como *Legionella bozemanii* por los datos de DNA y el análisis de ubiquinona, pero variaba fenotípicamente de *bozemanii* serogrupo 1 por sus características colonias y reacciones serológicas cruzadas.

Otra especie causante de enfermedad es la *L. micdadei*; es la única especie de *Legionella* ácido-alcohol resistente, pero pierde este carácter al ser cultivada en el laboratorio. Es el agente responsable de la "Neumonía de Pittsburg".

L. longbeachae es una especie de la familia *Legionellaceae.*, aislada por primera vez de un paciente en Long Beach, California. Se encuentra predominantemente en el suelo y abono vegetal.

12.2. Otras bacterias estudiadas

Además de la *Legionellae*, hemos trabajado con otras bacterias como cepas receptoras frente a la acción de las bacteriocinas. Se consideran las principales bacterias indicadoras del estudio: *N. lactamica* ATCC23970, *N. sicca* ATCC9913 y *E. faecalis* ATCC19433.

12.2.1. *Neisseria lactamica*

N. lactamica fue descrito por Hollis et al. en 1969 y como *N. meningococcoides* por Berger en 1970.

Las cepas de *N. lactamica* no se habían descrito en los estudios anteriores a 1969. Debido a la producción de ácido a partir de lactosa no se utilizó como una prueba diferencial para la identificación de *Neisseria* spp. Antes de la descripción de esta especie, cepas de *N. lactamica* habrían sido identificados como *N. meningitidis*. (ver IMAGEN 1)

Diplococos gram negativos, colistina-resistente, crecen en medio selectivo gonocócica, y se caracterizan por su capacidad de producir ácido a partir de glucosa, maltosa, y lactosa, y por su capacidad de producir beta-galactosidasa. Entre las especies de *Neisseria*, *N. lactamica* es probablemente el más fácil de identificar las especies. Por lo tanto, con una rara excepción (un conocido, informe no publicado de una cepa lactosa negativa), esta especie no deben ser identificada erróneamente.

N. lactamica se aísla con frecuencia de los niños, pero con poca frecuencia en los adultos.

12.2.2. *Neisseria sicca*

Neisseria sicca, descrita como especie por von Lingelsheim en 1908 y considerada un agente comensal de la orofaringe humana, es un diplococo gramnegativo aeróbico, inmóvil y oxidasa positiva. Al igual que todas las especies de este género, requieren de CO₂ y cierto grado de humedad para crecer a 35 °C. Se cultiva en agar chocolate, agar sangre de cordero y no se desarrolla en Thayer Martin, dado que este medio inhibe el desarrollo de neiserias comensales excepto *N. lactamica*. La colonia es blanca, opaca, de 1 a 3 mm, adherente; con los días de incubación adquiere una textura rugosa y produce pigmento amarillo verdoso. Entre sus características bioquímicas relevantes se encuentra la producción de ácidos desde sacarosa y fructosa, propiedad que comparte con *N. subflava* y *N. mucosa* y que permite diferenciarlas de neiserias patógenas; por último, la reducción de NO₃ es positiva para esta especie. (ver IMAGEN 2)

La sensibilidad in vitro de neiserias comensales se ha mantenido estable a penicilina, ampicilina, cefalosporinas, quinolonas, tetraciclina y macrólidos. Son considerados resistentes a aminoglucósidos y vancomicina.

Las infecciones graves por esta especie son inusuales, pero la publicación de casos ha aumentado, especialmente en huéspedes inmunocomprometidos. Podemos encontrar en la literatura médica casos de endocarditis, peritonitis en peritoneo-diálisis, meningitis, artritis séptica, bursitis, osteomielitis, neumonía, abscesos epidurales y bacteriemia. Los casos comunicados plantean que el fallo de tratamiento con vancomicina y aminoglucósidos en diálisis peritoneal debe inducir la sospecha una infección con agentes no típicos.

12.2.3. *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433)

Enterococcus forma parte de la microbiota intestinal del hombre y los animales, es un contaminante fecal de las aguas residuales y puede aislarse en múltiples

nichos ecológicos debido a su resistencia a los factores ambientales (Baldausarii et al, 2005).

Se han descubierto 36 especies diferentes, sólo 26 se asocian con infecciones en humanos (Chan y Zorus 2009).

Enterococcus faecalis y *E. faecium* son las especies más comunes y responsables de una amplia variedad de infecciones entre las que se citan infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas quirúrgicas, infecciones del torrente sanguíneo, infecciones del sistema nervioso central, endocarditis, infecciones intraabdominales, hepatobiliares, pélvicas y sepsis neonatal (Baldausarii et al, 2006; Sood et al, 2008; Chen y Zercos, 2009).

Enterococcus faecalis es un gram positivo, con forma ovoide. Crece en amplio rango de temperaturas y soporta hasta 60°C durante 30 minutos.

13. ESTUDIOS PREVIOS RELACIONADOS

En 1980, Rowbotham describió que el crecimiento de *L. pneumophila* en medio sólido, se inhibía por algunas especies como *Bacillus* spp y *P. aeruginosa*, presentes en muestras orofaríngeas. En el mismo año, Flesher et al. demostraron que varias bacterias aisladas de cultivos orofaríngeos humanos, inhibían específicamente el crecimiento de *L. pneumophila*. Las bacterias inhibidoras tenían actividad frente a todas las cepas de *L. pneumophila* ensayadas, incluyendo 5 cepas de *L. pneumophila* SG.1 y una de cada SG. 2, 3 y 4. Esta sustancia inhibidora no inhibió sin embargo, el crecimiento de 18 patógenos clínicos ni de 12 patógenos de laboratorio. Algunas propiedades de esta sustancia inhibitoria, son que es dializable, resistente al calor y que no precipita con sulfato amónico. Otras sustancias producidas en el tracto superior, no inhibieron *L. pneumophila*, que además, no podía ser aislada cuando se cocultivaba con *Streptococcus* y *Saprophytus*. Estas propiedades pueden explicar en parte la dificultad de aislamiento y puede ayudar en la identificación de *L. pneumophila*.

En cuanto a las conclusiones que podemos extraer de estos resultados de las interacciones de las bacterias productoras de bacteriocinas y las legionelas, dada la baja densidad de microorganismos en el agua, parece poco probable que los bacilos gram-negativos lleguen a destruir a las legionelas. Así como también es difícil demostrar que en condiciones naturales las bacterias produzcan bacteriocinas. El género *Aeromonas* es particularmente importante porque se encuentran muy distribuidas tanto en aguas corrientes como estancadas, incluso en abastecimientos de agua, aun estando cloradas. De todas formas, estas interacciones deberían darse a nivel extracelular, ya que las legionelas son capaces de infectar amebas multiplicándose intracelularmente, y al romper los protozoos huéspedes es cuando se liberan

una gran cantidad de legionelas móviles. Esta complejidad de su asociación con una variedad de algas, amebas, y plantas acuáticas sugieren que “las legionelas saben exactamente lo que están haciendo, nosotros simplemente todavía no lo entendemos.”

Durante un estudio del 2005 que buscaba encontrar nuevos tratamientos que disminuyeran el desarrollo de *Legionella*, encontraron una cepa de *Staphylococcus warneri* que inhibe el crecimiento de *Legionella*. Esta actividad se debe a una molécula secretada por *S. warneri*. Esta molécula muestra una estabilidad térmica alta y su actividad se perdió después de los tratamientos de proteasa, lo que sugiere que podría ser una bacteriocina. Su purificación les llevó a concluir que esta molécula anti-*Legionella* es un péptido altamente hidrofóbico. Tiene un espectro original y muy específico de actividad, dirigido sólo hacia el género *Legionella*. Esta fue la primera descripción de un péptido antibacteriano activo contra la *Legionella*. Fue probado frente a *L. pneumophila*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. longbeachae* y *L. micdadei*. Este espectro de actividad es importante ya que las bacteriocinas generalmente van dirigidas hacia especies relacionadas con la bacteria productora. Resulta que no sólo no es activa frente a cepas cercanas a ella, sino que se ha probado que lo es frente a *Legionella*, que es una bacteria gram-negativa. Después de estos resultados, esta bacteriocina deberá caracterizarse y secuenciarse antes de iniciar estudios genéticos. También merece la pena estudiar el modo de acción de la bacteriocinas, ya que pueden ser utilizadas como un tratamiento alternativo contra la *Legionella*.

En el año 2008 se publicó un estudio relacionado con el nuestro, sobre el efecto de la interferencia bacteriana sobre el desarrollo del biofilm de *L. pneumophila*. En la ecología de la *Legionella pneumophila*, y las legionelas en general, la relación con la microbiota humana y con otras bacterias, especialmente en los biofilms, juega un papel crucial. Alrededor de 80 bacterias estudiadas, el 66,2% de las mismas resultaron activas frente a *L. pneumophila*. Las especies *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, como ya hemos comentado en estudios anteriores, son las mejores productoras de bacteriocinas y presentan el mayor efecto negativo en la formación de biofilm. *Acinetobacter*, es de las pocas que no produce ningún efecto antagonista y es la única que mejora la formación del biofilm. Las bacteriocinas por tanto, pueden contribuir a la determinación del destino de las legionelas en los nichos ecológicos. Un estudio realizado por Guerrieri et al., demuestra que las *interacciones* observadas son características importantes de la ecología de la *L. pneumophila* y cuyo conocimiento puede servir para encontrar medidas de control más efectivas de la persistencia del microbio en el medio ambiente.

Según este estudio, ninguna de las cepas de *Legionella* producen BLS. De las 80 bacterias acuáticas estudiadas, sólo 37 eran activas frente a *L. pneumophila*, 16 inhibían las legionelas, y otras cepas acuáticas y 11 cepas

eran activas sólo frente a otras bacterias acuáticas. Las productoras de bacteriocinas estaban distribuidas uniformemente por las especies y al menos una cepa de cada especie inhibía el crecimiento de la legionela. Las cepas de *L. pneumophila* eran más sensibles que las otras bacterias acuáticas y no se observó diferencia entre los serogrupos en términos de sensibilidad frente a bacteriocinas.

Un estudio realizado por William E. Maher et. al, reveló los subtipos de un grupo de cepas ambientales y clínicas de *L. pneumophila* SG. 1, subtipificados por análisis de plásmidos. Mediante la combinación de estas técnicas de plásmidos con los anticuerpos monoclonales, las 16 cepas resultaron ser diferentes. Los perfiles de plásmidos y las reacciones a anticuerpos monoclonales de cepas seleccionadas eran estables a pesar de los pasos en serie (más de 100). La disociación observada de los perfiles de plásmidos y la reactividad de anticuerpos monoclonales sugiere que para la tipificación se podría recurrir el uso de ambas técnicas.

Otro estudio de Samrakandi MM, estudia las diferencias genéticas y fenotípicas entre diferentes cepas de *L. pneumophila*. Perfiles de proteínas de membrana y la electroforesis en gel de campo pulsado de *L. pneumophila* SG.1 han dado lugar a patrones muy diferentes.

Estudios posteriores se han dedicado a estudiar diferencias entre los diferentes tipos de legionelas. Hay un estudio de M. Swanson que estudia los diferentes rasgos de virulencia entre *L. pneumophila* y *L. micdadei*. Mientras la mayoría de las enfermedades del legionario se han atribuido a *L. pneumophila*, *L. micdadei* puede causar una infección similar en personas inmunodeprimidas. De acuerdo a los 7 rasgos principales relacionados con la virulencia, concluyen que *L. micdadei* elude los lisosomas y se replica en macrófagos tan eficientemente como *L. pneumophila* a pesar de carecer tanto de citotoxicidad dependiente del contacto y de su sensibilidad al sodio regulado. Hay muchas diferencias fenotípicas para las dos especies; utilizan diferentes estrategias para colonizar los macrófagos alveolares.

La aplicación de marcadores epidemiológicos para tipificar *Legionella pneumophila* o spp. incluye anticuerpos monoclonales, ribotipia, amplificación con iniciadores arbitrarios, electroforesis en campo pulsado y el método de amplificación de los fragmentos obtenidos tras la digestión de ADN cromosómico. Sin embargo, se puede observar aislamientos clínicos y ambientales indiferenciables por estos métodos moleculares por lo que se aplica otra técnica, que es una modificación de la clásica bacteriocinotipia, ya que determina la sensibilidad de las legionelas a una serie de bacteriocinas producidas por otras especies de legionelas, destacando la capacidad discriminatoria entre especies y serogrupos. De esta forma podemos diferenciarlas interespecíficamente e intraespecíficamente, llegando a

discriminar en determinados casos entre aislamientos con el mismo patrón molecular, similar a como ya se hizo con los enfrentamientos cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Aeromonas*.

Según Tagg et al., describieron en 1976 las bacteriocinas como sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica y activas, generalmente, frente a microorganismos relacionados taxonómicamente con la especie productora. Se describieron por primera vez en 1925 en *Escherichia coli* por Gratia y, posteriormente, en bacterias Gram positivas (Jacob et al., 1953; Tagg et al., 1976). Las colicinas (Pugsley, 1984 a, b), bacteriocinas producidas por *E. coli*, han sido estudiadas en profundidad. Estas bacteriocinas se caracterizan no sólo por su naturaleza proteica y su acción bactericida restringida, en la mayor parte de los casos, a cepas de la misma especie sino que, además, necesitan receptores celulares específicos para ejercer su acción, habitualmente tienen codificación plasmídica y su biosíntesis está asociada a la muerte de la célula productora. Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas constituyen un grupo estructural y funcionalmente más amplio y muy heterogéneo. Existe una gran diversidad en cuanto a su tamaño y al número de subunidades que componen la molécula activa, su espectro de inhibición puede ser en ocasiones bastante amplio, no siempre requieren de receptores específicos para su acción bactericida y sus determinantes genéticos pueden localizarse tanto en el cromosoma como en plásmidos (Tagg et al., 1976; Monteville y Kaiser, 1993; Jack et al., 1995).

Todo ello ha llevado a redefinir el concepto de bacteriocina como agentes antimicrobianos de naturaleza peptídica cuya síntesis no es letal para la célula productora (Konisky, 1982), si bien éste último rasgo es cuestionable. Dentro de las bacterias Gram positivas, las bacterias lácticas son un grupo especialmente rico en cepas productoras de bacteriocinas. Desde el descubrimiento de la nisina (Rogers, 1928) hasta nuestros días, se ha descrito la producción de bacteriocinas en organismos de todos los géneros de las bacterias lácticas. De Vuyst y Vandame (1994) citan hasta 89 bacteriocinas diferentes en función de sus características bioquímicas, estructura primaria, determinantes genéticos, rango de microorganismos inhibidos, modo de acción, etc.

Además, estamos colaborando junto con M.L. Gómez-Lus, en un trabajo de la Universidad Complutense de Madrid, de investigación sobre la “Dinámica estructural de colonias/biofilm de *Legionella pneumophila* y *Legionella bozemanii*” en el que se pretende estudiar la evolución de la estructura interna de colonias de especies representativas del género *Legionella* como modelo de biofilm estático.

Se utilizaron colonias aisladas de *Legionella pneumophila* y *Legionella bozemanii* crecidas en medios específicos durante tres y quince días, y

procesadas por medios histológicos de inclusión en parafina y resina epoxi para su análisis mediante microscopía óptica, electrónica y análisis de imagen. Se llegó a la conclusión de que la estructura interna de las colonias de tres días era diferente para las dos especies estudiadas. *Legionella pneumophila* estaba definida por dos estratos y *Legionella bozemanii* por tres. Conforme avanzaban los días de incubación, las especies evolucionaban hacia un mismo y único patrón formado por tres estratos.

Hay un artículo publicado en 2002, que está ciertamente relacionado con este estudio, en el que Garduño et al., buscaban la evidencia morfológica y fisiológica del ciclo de desarrollo de *Legionella pneumophila*. La adaptación fisiológica de *L. pneumophila*, a muy diversos entornos parece estar acompañada por cambios morfológicos (Garduño et al., P 82-85, en Marre et al., Ed., *Legionella*, 2001) y, posiblemente, implica la diferenciación en el desarrollo. En el seguimiento de la vía estructural de *L. pneumophila* a través tanto in vitro como en los ciclos de crecimiento in vivo, se ha descubierto que esta bacteria muestra un número sin precedentes de formas morfológicas, como se revela en secciones ultrafinas y réplicas de congelación-fractura para microscopía electrónica de transmisión. Los resultados confirmaron que *L. pneumophila* es una bacteria altamente pleomórfica, así como sugirieron la diferenciación esporogénica de *L. pneumophila*, sin llegar a demostrarlo, no obstante. Estos resultados proporcionan una fuerte evidencia para la existencia de un ciclo de desarrollo de *L. pneumophila* que se acompaña de alteraciones fisiológicas profundas y los patrones específicos de fase de la expresión génica.

2. Metodología



1. Cepas estudiadas
 - 1.1. Conservación de las cepas estudiadas
 - 1.2. Siembras de *Legionella* y otras bacterias
 - 1.3. Identificación de las colonias de *Legionella*
 - 1.4. Identificación de otras bacterias
 - 1.5. Tinción Gram
2. Medios de cultivo
 - 2.1. Medios de cultivo en agar y medio líquido
 - 2.2. Condiciones de cultivo
3. Protocolo de preparación de discos de bacteriocinas
 - 3.1. Siembra
 - 3.2. Preparación de discos
 - 3.3. Selección de discos
4. Pruebas de actividad de *Legionella* frente a sí misma
5. Peso molecular de las bacteriocinas
 - 5.1. Técnica
6. Transferencia de bacteriocinas
7. Extracto de bacteriocinas
 - 7.1. Cultivo en caldo de *Legionella*
 - 7.2. Preparación del extracto crudo
 - 7.3. Comprobación de actividad del extracto
 - 7.4. Determinación de las unidades arbitrarias
 - 7.5. Caracterización de la sustancia inhibitoria
8. Concentración de proteínas
9. Evaluación de resultados

1. CEPAS ESTUDIADAS

1.1. Conservación de las cepas de *Legionella*

Aparatos y material

- Congelador -20°C y -70°C
- Cámara de seguridad biológica TELSTAR BIO II A-G
- Viales con leche descremada
- Asas de plástico estériles
- Guantes y máscarilla

Método

Para la conservación de las cepas de *Legionella* se utiliza leche descremada, aunque ésta puede ser inhibitoria para algunas especies. A partir de un preparado comercial y siguiendo las instrucciones de uso, se diluye al 10% en agua destilada. Se reparte en viales con tapón con 0,5 ml de leche/vial, esterilizar en autoclave a 121°C, enfriar y almacenar hasta su uso a -20°C.

Se inocula la siembra de *Legionella* en el vial con leche descremada, y se conserva a -70°C hasta su uso.

1.2. Siembras de *Legionella* y otras bacterias indicadoras

Aparatos y material

- Cámara de seguridad biológica TELSTAR BIO II A-G
- Estufa HAERUS 36°C
- Nevera 2-8°C
- Congelador -20°C Y -70°C
- Placa calefactora 35-40°C
- Nefelómetro
- Vórtex
- Puntas de micropipeta estériles
- Pipetas Pasteur estériles
- Asas bacteriológicas
- Contenedores para desechar material infeccioso
- Asas de plástico de Drigalsky

Métodos

Cada 10 días se realiza una siembra a partir de las cepas almacenadas en leche descremada a -70°C que se vayan a utilizar en los próximos días.

Para realizar la siembra a partir de las cepas de colección conservadas en la leche descremada, deberemos seguir el siguiente protocolo:

1. Exponemos la cámara de seguridad durante 20 minutos a luz ultravioleta; una vez aseguramos las condiciones de asepsia, se comienza a trabajar.
2. Se prepara previamente el material necesario: cepas en gradilla, asas de plástico estériles, placas debidamente identificadas, guantes y mascarilla.
3. Se abre el tapón del vial donde está la muestra, se introduce el asa de siembra y tomamos 3 veces muestra del cultivo. Al estar congelada, necesitará una cantidad mínima para asegurarnos de que la muestra crezca debidamente.
4. Realizamos una siembra por agotamiento, para asegurarnos de obtener colonias aisladas.
5. Realizamos una siembra en paralelo en agar sangre, para asegurarnos a las 24 horas, de que la muestra sembrada en agar BCYE- α no está contaminada; si a las 48-72 horas ha crecido en medio BCYE- α , pero no lo ha hecho en agar COLUMBIA y además hemos obtenido colonias aisladas, y observada su forma, consideramos que la siembra y el cultivo son correctos.

Para realizar la siembra para la posterior colocación de discos de bacteriocinas, el método es diferente:

1. A partir de un tubo con 10 ml de agua bidestilada estéril, con asa de plástico estéril, se prepara una suspensión bacteriana, partiendo de un cultivo puro en BCYE α (realizado con el procedimiento anterior a partir de las cepas de colección conservadas a -70°C en leche descremada), hasta lograr una turbidez equivalente al estándar N° 0,5 de McFarland, que se corresponde aproximadamente con un concentración de 3×10^8 bacterias por ml.
2. Agitar en vórtex hasta homogeneizar la suspensión.
3. Colocar con pipeta, 100 μ l de la suspensión en la placa de medio.
4. Extender con ayuda de asa de Drigalsky de plástico estéril.

1.3. Identificación de las colonias de *Legionella*

En general, una colonia de *Legionella* en subcultivo crece en BCYE α a las 48 h de incubación a 36°C, aunque algunas especies pueden requerir una incubación más prolongada y la presencia de 5% de CO₂. A las 48-72 horas el crecimiento aparecerá confluyente en algunas zonas y con pequeñas colonias aisladas en otras.

La confirmación de que un cultivo es positivo para *Legionella* se debe hacer basándose en el aspecto característico de las colonias, la ausencia de crecimiento en BCYE α sin cisteína o agar COLUMBIA. A veces, se realiza una extensión en porta, se tiñe con técnica de Giménez, (con una tinción de gram utilizando fucsina en lugar de la safranina) o con anticuerpos fluorescentes.

1.4. Identificación de otras bacterias

El resto de bacterias utilizadas crecen a las 24 horas. Para confirmar que el cultivo de dichas bacterias es positivo, observamos las características morfológicas y color de dichas colonias. En caso de duda, se realizará la tinción GRAM.

1.5. Tinción GRAM

Material

- Portaobjetos
- Solución cristal violeta al 1%
- Solución diluida de yodo (Lugol)
- Alcohol-acetona (1:1)
- Solución de fucsina al 0,5%
- Microscopio
- Aceite de inmersión
- Guantes

Método

1. Preparar frotis bacteriano a partir de una colonia. Para ello:
 - a. Colocar una pequeña gota de agua en portaobjetos limpio.
 - b. Con el asa de siembra estéril, transferir una pequeña cantidad del cultivo bacteriano en medio sólido a la gota.
 - c. Remover hasta formar una suspensión homogénea y extenderla para facilitar su secado.
 - d. Fijar las bacterias al vidrio portaobjetos con calor, dejando enfriar y no permitiendo que se sobrecaliente.
2. Teñir con cristal violeta durante 1 minuto.
3. Lavar con abundante agua el exceso de colorante.
4. Cubrir con lugol durante 1 minuto.
5. Lavar con agua el exceso de lugol.
6. Decolorar con alcohol-acetona hasta que la preparación deje de perder color, durante unos 30 segundos.
7. Lavar con abundante agua para eliminar el resto de disolvente.
8. Teñir con safranina durante 1 minuto.
9. Lavar con agua para eliminar el colorante de contraste.
10. Secar la preparación.
11. Examinar al microscopio.
 - a. Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión.
 - b. Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre el punto de luz
 - c. Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación (mirando directamente hasta que hagan contacto).

- d. Una vez ahí, ir alejando el porta lentamente hasta visualizar la preparación.
- e. Finalizada la observación, girar el revólver, retirar el porta y bajar el soporte.
- f. Limpiar adecuadamente el soporte y la lente empleada.

2. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo son un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. La diversidad metabólica de los microorganismos es considerable y por ello también la variedad de medios lo es. A continuación describo los medios utilizados en este proyecto.

2.1. Medios de cultivo en agar y medio líquido

El agar es un agente solidificante utilizado en medios de cultivo bacteriológicos y en otras aplicaciones (cultivo de tejido, difusión inmunológica, estudios nutricionales, etc.). El agar es un poligalactósido que se obtiene a partir de algas rojas marinas. La mayoría de microorganismos son incapaces de degradarlo. Las concentraciones más habitualmente utilizadas en los medios de cultivo bacteriológicos son de 13-20 g/l para medios sólidos y 5-7 g/l para medios semi-sólidos. En las distintas aplicaciones, se precisan distintos grados de pureza.

En este estudio se han utilizado principalmente tres tipos de medios de cultivo de agar:

COLUMBIA AGAR WITH 5% SHEEP BLOOD

Descripción: Medio con alto contenido nutricional en el cultivo de microorganismos exigentes. s. También es útil para la observación de reacciones de hemólisis.

Difco Laboratories, Michigan, USA

Componentes:

- Digerido pancreático de caseína.....10,0 g
- Peptona N ° 3...5,0 g
- Extracto de levadura..... 5,0 g
- Infusión músculo corazón 500 g3,0 g
- Almidón 1,0 g
- Cloruro de Sodio.....5,0 g
- Agar.....15,0 g



Bacterias cultivables: Para el aislamiento y cultivo de numerosos microorganismos.

- *Corynebacterium jeikeium*

Observaciones: Este medio se ha utilizado principalmente para los controles de los cultivos de *Legionella* y de los discos de bacteriocinas.

Condiciones de cultivo: Cultivo en aerobiosis durante 24 horas en estufa a 36°C.

AGAR MUELLER-HINTON

Descripción: Es un medio general que permite el desarrollo de gran variedad de microorganismos. Se prepara en el laboratorio, para el aislamiento y crecimiento de bacterias y ensayos de sensibilidad a los antibióticos y bacteriocinas.

CULTIMED (Panreac Química S.L.U.)

Componentes (g/l):

Almidón1,5 g
 Infusión de Carne 2,0 g
 Peptona de Caseína Hidr 17,5 g
 Agar.....17,0 g
 pH: 7,4±0,2

Aspecto: polvo fino

Color: Beige

pH: 7,4±0,2



Procedimiento seguido según recomendaciones del fabricante:

- Suspender 38 g en 1 l de agua destilada
- Calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto.
- Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera de presión, 121°C durante 15 minutos.
- Distribución en placas y dejar enfriar en cámara bajo luz U.V.

Bacterias cultivables: Para el aislamiento y cultivo de numerosos microorganismos.

- *E. faecalis*
- *E. faecium*
- *N. lactamica*
- *N. sicca*

Observaciones: Se ha utilizado principalmente para la determinación de la “concentración mínima inhibitoria” (CMI) por la técnica de diluciones seriadas.

Condiciones de cultivo: Cultivo en aerobiosis durante 24 horas en estufa de 25 o 36°C.

AGAR LEGIONELLA GVPC

Descripción: medio selectivo para el aislamiento y cultivo de *Legionella*. Es un medio de color negro uniforme y sensibilidad muy alta.

MAIM S.L.

Componentes: (g/l)

Extracto de Levadura.....	10.00
Carbón Activado.....	2.00
Agar Bacteriológico.....	13.00
ACES	10.00
KOH	
Alfa-Cetogluturato	1.00
L-Cisteína	0.40
Pirofosfato Férrico	0.25
Polimixina B	79200 UI
Glicina	3.00
Cicloheximida	0.08
Vancomicina	0.01



Bacterias cultivables: Para el aislamiento y cultivo de *Legionella*.

Condiciones de cultivo: Cultivo en ambiente de 5% de aerobiosis de CO₂ aerobiosis durante 48-96 horas a 36°C. Para conseguir estas condiciones, introducimos las placas en una jarra especial. Colocamos las placas a incubar en una gradilla. Sobre las placas colocamos 2 velas encendidas y un recipiente con agua estéril (para proporcionar humedad al ambiente). Colocamos dicha gradilla en una jarra. Una vez cerrada, la vela consumirá todo el oxígeno, y se apagará consiguiendo de esta manera una atmósfera con un 5% de CO₂.

CALDO DE CULTIVO DE LEGIONELLA

Descripción: Medio líquido para el aislamiento y cultivo de *Legionella*.

Componentes (g/l):

Extracto de levadura.....10 g / Cultimed Panreac
 α -cetoglutarato1 g / Sigma
 Buffer ACES.....10 g / Sigma
 KOH 1N
 L-cisteína.....0,4 g / Sigma Aldrich
 Pirofosfato férrico0,25 g / Sigma Aldrich
 Agua destilada1 l (aprox.)

Procedimiento:

- Disolver 10 gramos de levadura y 1 gramo de α -cetoglutarato en 850 ml. de agua y llevar a ebullición.
- Disolver 10 gramos del buffer ACES en 100 ml de agua caliente y ajustar el pH a 6,9 con KOH 1N. Añadimos a la preparación anterior.
- Autoclavar 15 minutos a 121°C.
- Dejar enfriar (o calentar si se ha enfriado antes) a 50°C.
- Disolver 0,4 gramos de L-cisteína y 0,25 gramos de pirofosfato férrico en 10 ml de agua, cada uno.
- Filtrar con filtro de 0,22 μ m primero la L-cisteína y después en otro tubo el pirofosfato férrico; se añaden al caldo en cámara de seguridad..
- Volver a ajustar el pH con KOH estéril.



Observaciones: A partir del caldo de cultivo se centrifuga y filtra para obtener el extracto crudo.

Condiciones de cultivo: Cultivo durante 48-96 horas en estufa de 36°C. Para conseguir unas condiciones estrictas, introducimos los matraces en jarras,. En la misma jarra, introducimos varias velas encendidas. Una vez cerrada, la vela consumirá todo el oxígeno, y se apagará consiguiendo de esta manera una atmósfera con un 5% de CO₂.

2.2. Condiciones de cultivo

- Todos los cultivos fueron incubados a 36°C en incubadora aeróbica HERAEUS modelo B6.
- En ocasiones se utilizaron los 25° bien para la desecación de discos de bacteriocinas o para favorecer la pigmentación de los cultivos de *Neisseria lactamica*.
- En el caso de cultivo de *Legionella*, como se ha comentado previamente, se incubaron en atmósfera de 5% de CO₂.



3. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE DISCOS DE BACTERIOCINAS

Aparatos y Material

- Placas BCYE- α
- Asa desechable de Drigalsky
- Cloroformo
- Tubos estériles
- Estufa 25°
- Estufa 36°
- Nefelómetro DINKO Mc. F colorimeter
- Lámpara U.V.

Método

Uno de los métodos utilizados para comprobar la actividad de las bacteriocinas de *Legionella pneumophila*, frente a sí mismas, y de otras especies de *Legionella* así como de otras bacterias, es el método de difusión en agar a partir de discos de bacteriocinas producidas en medio BCYE- α y concentradas por desecación a 25°C.

Para considerar válidos los discos de bacteriocinas de BCYE- α , es necesario seguir un procedimiento estricto en el que se asegure ha habido un correcto crecimiento de legionela con su correspondiente producción de bacteriocinas, así como evitar toda contaminación posterior a la siembra, que pueda falsear nuestros resultados. Para ello, debe de seguirse el siguiente método:

3.1. Siembra

- Se parte de una siembra de *Legionella*, obtenida a partir de cepas de colección conservadas a -70°C en leche descremada. Como máximo se utilizarán durante 10 días y conservadas a 4°C.
- Una vez descongelada cada cepa, se procede a su siembra en BCYE-ALFA, incubándose a 36°, con 5% de CO₂, durante 3-4 días. A partir de colonias aisladas se efectúa la resiembra en placas del mismo medio con un inóculo de 0,5 McFarland ajustado con nefelómetro "DINKO Mc.F colorimeter". En cada placa se siembran 100 μ l, distribuyéndose uniformemente en su superficie con asa de Drigalsky, llevándose a la estufa de cultivo e incubándose de nuevo de 2-4 días.
- Esta siembra deberá pasar por los pertinentes controles de pureza, como la resiembra en agar sangre, para comprobar que no ha crecido ninguna otra bacteria.
- Se sembrará cada cepa de *Legionella* por placa.

- Una vez se considera que es óptimo el crecimiento de la cepa sembrada, ya puede procederse a la elaboración de los discos.

3.2. Preparación de discos

- Se retira la siembra con portas esmerilados siguiendo la técnica de Gillies y Govan modificada y en condiciones de esterilidad.
- Una vez se ha retirado el crecimiento bacteriano, se procede al tratamiento con cloroformo según el método de Bauerfeind (REF); sometemos la placa a la acción de los vapores de cloroformo, colocándola boca abajo y sobre papel de filtro impregnado en el cloroformo durante 20 minutos.
- Una vez el cloroformo ha actuado (se puede observar en la degradación del plástico), volvemos a cerrar la placa que llevamos a la estufa para que se evaporen los restos de tricolorometano.
- Este es el momento de realizar los tacos, bien con sacabocados o con tubos de vidrio dependiendo del tamaño del disco que queremos hacer de 8 y 10 mm de diámetro. Antes de realizar los tacos, flameamos o usamos material estéril. Los tacos deben de realizarse antes de que el medio empiece a desecarse ya que con el medio desecado resulta más difícil y costosa la preparación de los discos.
- Una vez hemos obtenido los tacos, se deja la placa en estufa a 25° hasta lograr su desecación.
- Con este sistema se pretende concentrar las bacteriocinas en estructura laminar; el disco. El medio pasa de tener un volumen, a transformarse en una lámina, lo que refleja la concentración que se ha conseguido.
- Una vez obtenidos los discos, los sometemos al tratamiento con H₂O₂ y a 20 minutos de radiación ultravioleta para asegurar la esterilidad. Éste método de esterilización es el que tras diversas pruebas se ha comprobado como el más eficaz, ya que además de suprimir el H₂O₂, es el único desinfectante probado que carece de efecto residual.

3.3. Selección de discos

- Se probarán los discos frente a bacterias indicadoras de las que ya se conoce su resistencia o sensibilidad.
- Se considerará que el disco está en condiciones cuando: sea estéril, y además el resultado de la inhibición obtenida, corresponda con los resultados previamente logrados. Cuando se cumplan estas condiciones se dará por válido y se procederá a su conservación en viales de tapón roscado debidamente identificados con el nombre de la especie de *Legionella* de la que se trata, así como el lote al que pertenece y la fecha de elaboración.

- Los discos que muestren irregularidades bien en la forma, tamaño, color o textura, serán eliminados.
- No se mezclarán discos de una misma especie procedentes de diferentes placas; los discos se conservarán por lotes como ya se ha comentado.

4. PRUEBAS DE ACTIVIDAD DE *LEGIONELLA* FRENTE A SÍ MISMA

Aparatos y material

- Jarras Anaerocult MERCK de 12 cm de diámetro
- Asas de siembra estériles desechables
- Asas de Drigalsky desechables
- Pipetas VoluMate Liquisystems de Mettler Toledo.
- Tubos estériles
- Nefelómetro DINKO Mc. Farland colorimeter
- Estufa 36°C
- Guantes y mascarilla

Método

- En placas de BCYE- α sembramos las cepas de colección de *Legionella* que queremos probar como receptoras.
- Cuando éstas cepas hayan crecido, se procede a inocularlas en tubos con 10 ml de agua bidestilada esterilizados. El inóculo debe de realizarse para obtener una turbidez estándar 0,5 Mc. Farland, medida con el nefelómetro X.
- Se preparan todos los inóculos que requerimos para las pruebas con cada una de las bacterias receptoras, recientemente sembradas y crecidas. Estos inóculos los sembramos por sectores en placas de BCYE- α para comprobar que efectivamente crecen de manera semiconfluente.
- A las 24-48 horas el inóculo ha debido de crecer ya que se ha tomado en su fase exponencial de rápido crecimiento.
- Una vez comprobamos que crece adecuadamente, procedemos a realizar las pruebas.
Previamente se habrán preparado los discos que queremos usar según el protocolo descrito en el apartado 3 de la metodología.
- Identificamos debidamente la placa: base receptora, discos de bacteriocinas y fecha de preparación de la prueba.
- Con pipeta sembramos en una placa de BCYE- α , 100 μ l del inóculo preparado y probado previamente.
- Éstos 100 μ l se extienden con asa de plástico de Drigalsky por toda la placa de cultivo.

- Una vez sembrado el inóculo, colocamos los ocho discos adecuadamente preparados y esterilizados sobre el medio y la base receptora. Las placas se mantienen a 4°C durante 18 horas para la predifusión de las bacteriocinas.
- Colocamos las placas en jarra con un pequeño recipiente de agua estéril para dar humedad al medio, así como 2 velas para el porcentaje de CO₂ adecuado para el crecimiento de la *Legionella*.
- Esperamos de 24-72 horas para comprobar el crecimiento y los halos de inhibición.
- El resultado es que las bacteriocinas han difundido en el medio alrededor del disco, y algunas de ellas inhiben el crecimiento de la base receptora.

5. PESO MOLECULAR DE LAS BACTERIOCINAS

Como técnica complementaria y para corroborar que efectivamente los discos que dan un halo de inhibición pequeño se tratan de bacteriocinas de alto peso molecular, y que las de halo de inhibición grande son bacteriocinas de bajo peso molecular, realizamos el siguiente experimento:

5.1. Técnica

Sembramos tal y como lo hacemos habitualmente la base de legionella que vamos a enfrentar a los discos. Sobre la superficie de una placa de medio BCYE- α , colocamos la membrana de diálisis esterilizada y con pinzas estériles se extiende con asa Drigalsky para que haga contacto con el medio. A continuación, sobre la membrana colocaremos 2 discos de bacteriocinas que han dado halo pequeño (bacteriocinas de alto peso molecular), incapaces de atravesar la membrana de diálisis. Además, se colocan otros dos discos que daban halos grandes (bajo peso molecular), cuyas bacteriocinas deben ser permeables, difundiéndose en el medio de cultivo durante la predifusión en nevera a 4°C durante 48-20 horas. Ya está la placa en condiciones para retirar la membrana con pinzas y proceder a la siembra de una cepa indicadora (*L. oakridgensis*). Tras la incubación a 36°C durante 2-3 días se podrá comprobar los halos de las 2 bacteriocinas de bajo peso molecular, contrastando con la ausencia de inhibición de las 2 cepas que proceden de bacteriocinas de alto peso molecular.

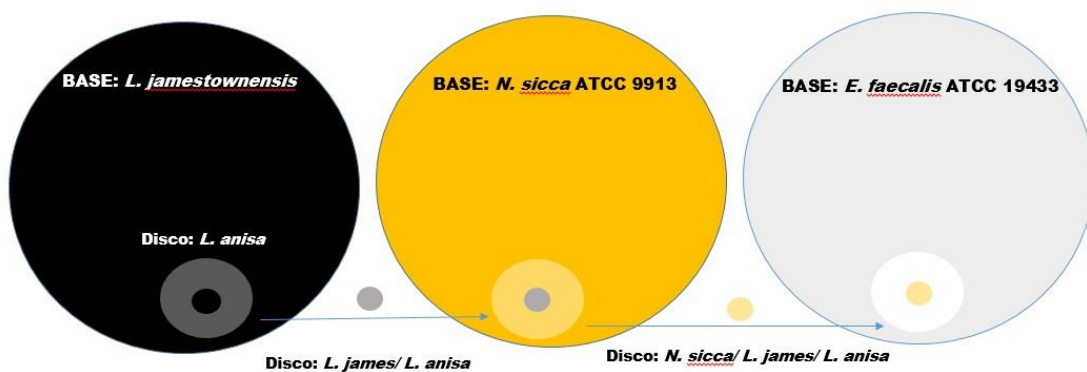
6. TRANSFERENCIA DE BACTERIOCINAS

Es una nueva perspectiva estudiar la transferencia de las bacteriocinas desde las legionelas a diversas bacterias receptoras. Para ello, hemos ensayado discos conteniendo bacteriocinas de legionelas activas seleccionadas

directamente de los halos de inhibición en placas de BCYE- α recién leídas, que debían de secarse para concentrar al máximo su contenido de bacteriocinas, tratándose por último con H₂O₂ y rayos UV para su esterilización. A partir de ese momento, se preparan placas de BCYE- α , sembradas con la segunda serie de bacterias receptoras aplicándose los nuevos discos para completar el experimento. Cuando estos ensayos funcionan, se realiza un tercero y hasta un cuarto intento de transferencia.

El objetivo de esta técnica es, por tanto, conocer durante cuántos “pases” se conservan la actividad de las bacteriocinas obtenidas en el halo de inhibición de un disco de legionella, haciendo transferencia de los halos inhibitorios donde se han difundido las bacteriocinas, a otro medio y enfrentándose a una bacteria distinta.

GRÁFICO 3: Esquema transferencia de bacteriocinas. Ejemplo: *N. sicca* /*L. jamestownensis* / *L. anisa* (bacteriocinas de *L. anisa* tras 2 pases)



Fuente: Elaboración propia

Aparatos y material

- Asas de Drigalsky desechables
- Pinzas metálicas
- Discos de papel Whatman 81
- Estufa 36°

Método

1. Se siembran 100 μ l. de la cepa de interés con asa de Drigalsky; en este caso puede ser una bacteria de las utilizadas como indicadoras, *N. sicca* ATCC9913, sobre placa de Mueller Hinton. El crecimiento debe de ser semiconfluente y homogéneo por toda la placa.
2. Con ayuda de las pinzas metálicas (previamente esterilizadas con alcohol y flameado), se depositan los discos de papel WHATMAN sobre la placa ya sembrada, y sobre estos discos, añadimos 20 μ l del extracto de bacteriocinas de legionela.

3. Se deja en pre-difusión 24 horas a 4°C.
4. Se incuban las placas a 36°C durante 24 horas.
5. Se observan los halos de inhibición de cada uno de los extractos ensayados sobre la cepa indicadora. El diámetro del halo de inhibición es un indicativo de la sensibilidad de la bacteria receptora,
6. Con la parte superior de tubos de ensayo estériles de 10mm, realizamos tacos de la zona de inhibición, donde han difundido las bacteriocinas del extracto de legionela. Éstos tacos, o discos, los utilizaremos para el primer pase.
7. Antes de utilizar éstos tacos, se deben desecar para la concentración de bacteriocinas en la zona de contacto con el medio, y así facilitar su difusión. Es entonces cuando los nombraremos como “discos”.
8. Se siembra otra placa, bien puede ser de otra receptora indicadora como el *E. faecalis* 19433 o bien *Legionella* spp. Se realiza exactamente lo mismo: sembramos 100 ul de la bacteria inoculada, extendemos con asa Drigalsky y sobre esta base, esta vez, se colocan los discos obtenidos de los halos de inhibición de la prueba anterior.
9. Se observan los halos de inhibición de los tacos de bacteriocinas; comprobamos que aún hay bacteriocinas en ellos. En el caso de que tengan actividad, se realiza un segundo y último pase, con tacos de estos últimos halos de inhibición.
10. Vuelven a probarse estos tacos, pudiendo regresar a la bacteria indicadora inicial, y así comprobar la diferencia entre el primero y el segundo pase, y así observar el agotamiento de las bacteriocinas o bien probar frente a otra bacteria indicadora.
11. En ocasiones, si se ve que continúa teniendo actividad, se realiza un tercer y cuarto pase.

7. EXTRACTO DE BACTERIOCINAS

Aparatos y material

- Placas BCYE- α
- Asas de siembra estériles desechables
- Estufa 36°
- Centrífuga
- Papel Whatman P81
- Tubos estériles con 10 ul de agua bidestilada
- Placas de microtiter
- Baño GFL 1092
- Tiras de pH
- NaOH 0,5N
- HCl 0,2N
- Enzimas

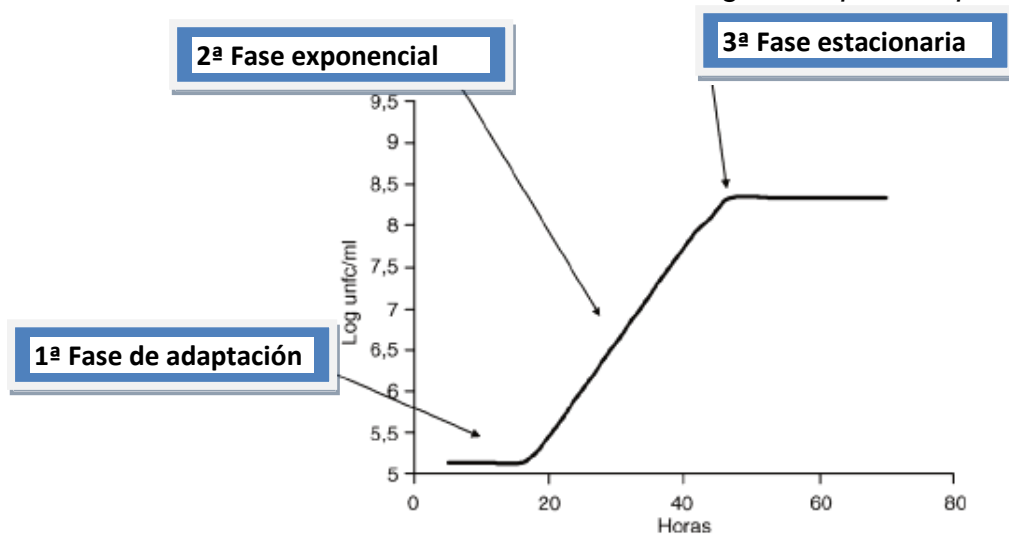
Método

Antes de cultivar en medio líquido se debe asegurar que las legionelas que sembramos está en buenas condiciones:

- Se ha trabajado con cepas de *Legionella* ATCC de colección o cepas de origen conocido clínico o ambiental que constituyen la bacterioteca U.Z.
- Previamente a la siembra en medio líquido, se preparan las siembras en medio agar BCYE- α para la obtención de colonias individualizadas. A partir de estas colonias individuales, sembramos de 3 a 4 placas de BCYE de las legionelas que queremos probar.
- De las siembras obtenidas, se realiza la prueba en agar sangre como control.
- Una vez comprobado, que el cultivo es puro, se transfieren al medio líquido para que empiecen a crecer aquí. La transferencia se hace arrastrando el crecimiento de la placa y depositándolo en el medio, sin romper demasiado su estructura, para que la adaptación al medio sea más rápida; si no alteramos la organización de la arquitectura del desarrollo de las legionelas, cada uno de los acúmulos se comporta como un núcleo de crecimiento.

Las bacterias deben de estar al principio de su fase estacionaria o en la fase exponencial.

GRÁFICO 4. 3 Fases curva de crecimiento de *Legionella pneumophila*.



Fuente: Modificado de Revista El Sevier (vol. 29, nº5 Mayo 2011)

Se incubaba a 36° y se comprueban a partir del segundo día los frascos sembrados.

IMAGEN 1. Crecimiento *Legionella* en caldo de cultivo selectivo

Fuente: Elaboración propia

7.2. Preparación del extracto de bacteriocinas

Cuando se emplean cultivos en las pruebas de antagonismo microbiano,, no es fácil identificar la causa de dicho antagonismo (Tagg y col. 1996). En la identificación de las bacterias productoras de bacteriocinas difusibles, es importante excluir de los ensayos, no solamente a los microorganismos productores de tales sustancias, si no también otros metabolitos con actividad inhibidora.

Las sustancias que en la prueba de antagonismo bacteriano poseen actividad inhibitoria similar a las bacteriocinas, pueden neutralizarse o eliminarse utilizando sobrenadantes libres de células, neutralizados o dializados. Los sobrenadantes se obtienen por centrifugación de los cultivos y filtración por filtros de 0,22 o 0,45 μm de diámetro de poro. La neutralización de la actividad antagonista de los ácidos orgánicos puede realizarse al pH de los sobrenadantes a un valor próximo a la neutralidad (pH 6,9-7,0) (Geis y col., 1983; Barefoot y Klaenhammer, 1984; Rodriguez y col., 1989; Nielsen y col., 1990; Mortvedt y Nes, 1990), o dializando los sobrenadantes por membranas que permiten la difusión de sustancias de un tamaño molecular menor de 6.000 daltons. La diálisis puede ir precedida de una precipitación de los sobrenadantes con sulfato amónico (Bhunja y col., 1987; Gonzalez y Kunka, 1987; Ray y col., 1989b). El precipitado, constituido fundamentalmente por proteínas, se reconstituye y dializa. No obstante, diversos autores prescinden de esta precipitación (Anderson, 1986; Anderson y col., 1988; Harris y col., 1989; Schillinger y Lflicke, 1989; Daeschel y col., 1990; Ahn y Stiles, 1990b).

Aparatos y material

- Centrífuga
- Estufa de 36°C
- Asas de siembra estériles
- Filtros Macherey-Nagel. Chromafil CA-20/25-s. Cell. acetate, 0.20 µm
- Jeringas 20 cc/mL TERUMO

Método

Una vez las legionelas han crecido en este medio, se realizan los controles para comprobar que el extracto es válido. Para ello se sigue el siguiente proceso:

1. Centrifugar el extracto a 1300 r.p.m. a 4°C durante 20 minutos.
2. Control de pellets: sembrar en agar sangre COLUMBIA y en BCYE-A
3. Control microbiológico del extracto centrifugado: sembrar en agar sangre COLUMBIA y en BCYE-α.

Una vez centrifugado, filtrado, y comprobada su esterilidad, ya está preparado el extracto de bacteriocinas para los correspondientes ensayos.

La valoración de la actividad inhibitoria del extracto se realiza por el método de difusión en agar. La técnica consiste en depositar alícuotas, vehiculadas en discos de papel Whatman P81, del extracto a analizar sobre microorganismos sensibles, habiendo seleccionado bacterias de crecimiento rápido (18h), pertenecientes a las especies *E. faecalis* (ATCC 19433), *Neisseria sicca* (ATCC 9913) y *Neisseria lactamica* (ATCC23970) tras haber comprobado su sensibilidad a las legionelas. Esto se detecta una vez finalizada la incubación de la placa de agar en la que aparecen los halos de inhibición (zonas sin crecimiento bacteriano). Para cuantificar la actividad antimicrobiana se realizan y evalúan diluciones seriadas de las muestras de extractos para determinar la dilución máxima a la que se permite ver un halo de inhibición nítido.

Para comprobar, si una vez centrifugado y filtrado, este extracto tiene actividad inhibitoria frente a otras bacterias, se enfrentó el extracto crudo, al *E. faecalis* ATCC19433 y *Neisseria sicca* ATCC9913.

7.3. Comprobación de la actividad del extracto crudo

Aparatos y material

- Estufa 36°C
- Micropipeta
- Puntas de micropipeta
- Papel de filtro Whatman P81

- Placa de Microtitter
- Pinzas
- Asas estériles

Método

- Se prepara un inóculo con la bacteria indicadora (*E. faecalis* o *Neisseria sicca*) 0,5 Mc. Farland.
- Se rotula la placa de Muller-Hinton con la bacteria receptora y los extractos de legionelas a la que vamos a evaluar.
- Se siembran 100 µl de este inóculo sobre placa de agar Muller-Hinton. Se añaden los 100 µl y se extiende con asa de siembra Drigalsky de plástico.
- Se deja absorber bien el inóculo.
- Sobre disco de papel de filtro Whatman, se añaden 20 µl del extracto del que queremos comprobar su actividad. Los 20 µl deben de impregnar el disco.
- Dejamos en “pre-difusión” a 4°C, durante 18-24 horas y después las placas se incuban a 36°C durante la noche (18 horas).

7.3. Comprobación de la actividad del extracto crudo

Una vez se ha comprobado que el extracto sin diluir tiene actividad, determinamos las unidades arbitrarias, que se corresponde con la máxima dilución que tiene actividad inhibitoria.

Material

- Estufa 36°C
- Papel de filtro Whatman P81
- Placas de microtitter
- Pinzas
- Asas de siembra estériles

Método

- En la primera columna, añadir 20 µl de cada extracto a ensayar.
- En la segunda columna, añadir 20 µl de extracto y 20 µl de agua estéril.
- En las siguientes columnas añadir únicamente los 20 µl de agua estéril.
- La primera columna se deja únicamente con los 20 µl de extracto y así se coloca en primer lugar un disco con el extracto y a continuación las diluciones seriadas.

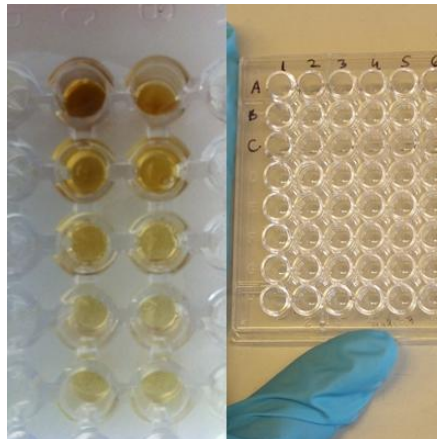
TABLA 11. Procedimiento unidades arbitrarias.

	1	2	3	4	5
Extracto 1	20 μ l de extracto	20 μ l de agua 20 extracto	20 μ l de agua	20 μ l de agua	20 μ l de agua
Extracto 2	20 μ l de extracto	20 μ l de agua 20 extracto	20 μ l de agua	20 μ l de agua	20 μ l de agua

Fuente: Elaboración propia

- Una vez están realizadas las diluciones, se procede a impregnar los 20 μ l del extracto sobre cada disco colocado en la placa sembrada con la bacteria indicadora.
- Se deja en pre-difusión durante la noche a 4°C y posteriormente se incuba a 36°C, hasta el día siguiente.

IMAGEN 2. Diluciones del extracto en placa de microtiter



Fuente: Elaboración propia

Por último se procede a la lectura de la placa y se comprueba cuál es la máxima dilución a la que tienen actividad inhibitora los extractos ensayados.

IMAGEN 3. U.A. extracto crudo de *L. cherrii*, indicadora *N. sicca*.



Fuente: Elaboración propia

7.5. Características de la sustancia inhibitoria para comprobar que son bacteriocinas

Las bacteriocinas presentan una serie de propiedades bioquímicas comunes como son, la sensibilidad a la acción de ciertas enzimas proteolíticas y su tolerancia a temperaturas elevadas y condiciones de pH bajo.

Debido a su naturaleza proteica, todas las bacteriocinas son inactivadas por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático (tripsina y α - quimotripsina) y algunas de origen gástrico, como la pepsina y proteinasa K.

La termotolerancia de las bacteriocinas de las BAL es generalmente elevada, aunque puede reducirse significativamente después de su purificación (Davey y Richardson, 1981; Barefoot y Klaenhammer, 1983). Esta característica de termorresistencia parece estar estrechamente relacionada con su estructura molecular; normalmente compuesta por péptidos pequeños que no presentan estructura terciaria. Algunas bacteriocinas termolábiles, poseen mayor peso molecular que reflejan probablemente una estructura molecular más compleja.

Dadas éstas características, para comprobar que la inhibición del extracto preparado, se debe a la acción de las bacteriocinas, se someten pequeñas cantidades de extracto, a un amplio rango de temperaturas y pHs, y determinamos de nuevo su actividad con el método de difusión en agar.

7.5.1 Estabilidad al calor

Material

- Baño GFL
- Tubos eppendorf
- Micropipeta
- Puntas de micropipeta

Método

Las muestras activas se reparten en tubos eppendorf que se cierran herméticamente y se calientan en baño de agua a diferentes temperaturas, dejando luego enfriar a temperatura ambiente. A continuación se determina la actividad residual frente a la bacteria indicadora comparando con un blanco no calentado.

Se prepara, para cada muestra, 15 tubos con 50 μ l de extracto en cada uno.

- Tres tubos se someterán a 80°C.
- Tres tubos a 90°C.
- Tres tubos a 100°C.

Para cada una de estas temperaturas, se sacarán los tubos en diferentes momentos: uno a los 5 minutos, otro a los 10 y el último a los 20.

- De cada uno de estos tubos se toman 20 μ l y se colocan sobre disco de papel como se ha indicado antes con el método de difusión en agar sobre bacteria indicadora, en este caso, *E. faecalis*, *N. lactamica* o *N. sicca*.

IMAGEN 4. Estabilidad extracto a diferentes temperaturas



Fuente: Elaboración propia

7.5.2 Estabilidad al pH

Las muestras activas se les ajusta el pH a los valores deseados (desde pH3 hasta pH 11) mediante adición de tampones preparados.

- NaOH 0,5N
- HCl 0,2N

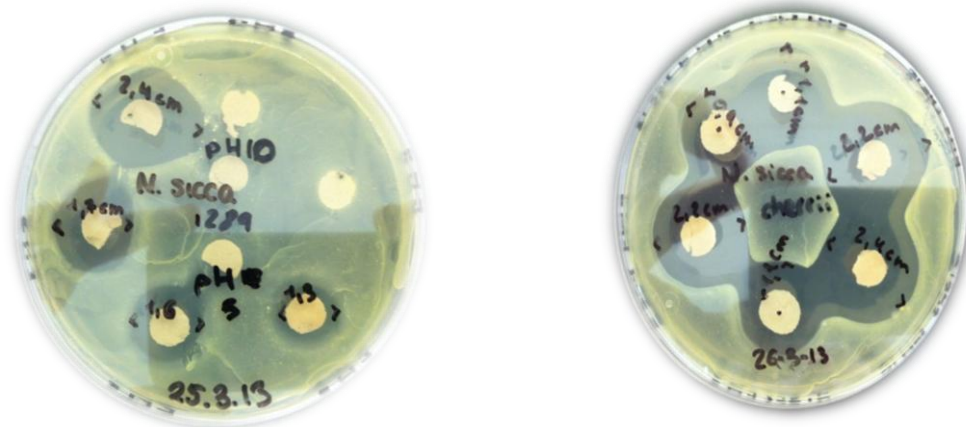
En placa de microtiter:

1. Se colocan 50 microlitros en cada pocillo (del 2-11)
2. Se mide el pH del extracto, normalmente tiene un pH de 6.9-7.0, ese pocillo será al que no se le añada nada.
3. A partir de aquí añadimos NaOH 0,5N o HCl 0,2M en cada uno de los pocillos para subir y bajar el pH hasta alcanzar el pH que le corresponda de acuerdo a su sitio (desde pH 3 a pH 11).

Una vez se tiene en los pocillos el extracto ajustado a los pHs que se buscan, se siembra la placa con inóculo de bacteria indicadora, en este caso por ejemplo de *N. lactamica*, sobre la que pondremos discos con los extractos, correspondientes a los diferentes pocillos.

Se colocan sobre cada disco unos 20 µl del extracto, identificando el pH al que se encuentra el extracto, o bien empapando el disco de papel en el pocillo y colocando posteriormente sobre la placa ya sembrada.

IMÁGENES 5 y 6. Estabilidad a diferentes pH



Fuente: Elaboración propia

7.5.3 Sensibilidad a las enzimas / Tratamiento enzimático

Los sobrenadantes con actividad inhibitoria, neutralizados y esterilizados por filtración, se someten a la acción de diferentes enzimas:

- Proteasas inespecíficas: pronasa E y proteinasa K (Boehringer Mannheim)
- Proteasas específicas: tripsina y α -quimotripsina (Merck)

Las enzimas que se han empleado para estos ensayos son:

1. Proteasa XXI: Obtenida de caldo de cultivo de *S. griseus* y purificada, de la casa "Sigma".
2. Proteasa XIV: también denominada Pronasa. Es una mezcla comercialmente disponible de proteinasas aisladas del fluido extracelular de *Streptomyces griseus*.
3. Proteinasa K: también proteasa K o endopeptidasa K. Es una serina proteasa de amplio espectro. La enzima fue descubierta en 1974 en los extractos del hongo *Engyodontium* (anteriormente *Tritirachium album*). Es capaz de digerir la queratina natural (pelo), de ahí el nombre "proteínasa K".
4. Lisozyma: también conocida como muramidasa o glycanhydrolase N-acetylmuramide, son glucósido hidrolasas. Éstas son enzimas que dañan las paredes celulares de las bacterias.

Puesto que lo que se pretende con esta prueba es aproximar la naturaleza proteica del inhibidor, en un principio conviene emplear endoproteasas que sean bastante inespecíficas, tales como la tripsina o la proteasa XIV de *Streptomyces griseus* (Sigma), esterilizadas por filtración.

Estos ensayos se pueden realizar en medio sólido, o bien en medio líquido y a ser posible en preparaciones purificadas o semipurificadas.

En medio líquido a una muestra con actividad, se le adiciona la enzima correspondiente a una concentración de 2,5 mg/ml, incubándose a 37°C durante 2-3 h, transcurridas las cuales se determina actividad residual de la muestra tratada, comparando con una muestra activa. Se debe emplear un control de la enzima a la misma concentración.

Una vez hechas las pruebas de actividad descritas anteriormente y anotados los halos de inhibición en las tablas de sensibilidad, realizaremos un análisis de dichos resultados.

8. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Para caracterizar la enzima inhibidora, debemos conocer en primer lugar la concentración de proteínas que tiene el extracto, según la concentración que encontremos, concentrarlo para posteriormente correrlo en electroforesis.

De entrada sabemos que es una enzima secretada y su peso molecular aproximado.

Para conocer la concentración de dicho extracto, realizamos el siguiente procedimiento:

1. Pesamos 6 mg de albúmina bovina y le añadimos 6 ml de agua, para obtener un "stock" de concentración 1mg/ml.
2. Diluimos en primer lugar al 1:10 (1ml de solución, 9 de agua) y a continuación al 1:4. De esta forma ya obtenemos la concentración deseada, que es 25 µg/ml.
3. Se preparan 7 tubos para cada una de las concentraciones:
 - a. Blanco, 0 µg/ml (800 µl de agua)
 - b. 25 µg/ml (800 µl de stock)
 - c. 20 µg/ml (640 µl de stock y 160 µl de agua)
 - d. 15 µg/ml (480 µl de stock y 320 µl de agua)
 - e. 10 µg/ml (320 µl de stock y 480 µl de agua)
 - f. 5 µg/ml (160 µl de stock y 640 µl de agua)
 - g. 1 µg/ml (32 µl de stock y 768 µl de agua)
4. El espectrofotómetro que se va a manejar en la práctica es del tipo convencional de haz simple. Se enciende el espectrofotómetro y se ajusta la longitud de onda del espectrofotómetro a 540 nm.
5. Se colocan en una gradilla con 7 tubos de ensayo que deben de estar limpios y secos. Se numeran del 1 al 7 con un rotulador permanente al agua.
6. Colocamos en cada uno de los tubos del espectrofotómetro, 0,80 ml de cada una de las preparaciones anteriores, más 0,2 ml del DYE REAGENT CONCENTRATE.
7. Se tapa con papel parafilm y se invierte dos o tres veces para mezclar.
8. Se toma la gradilla con los tubos de ensayo y se introduce en el baño de agua termostático a 37 °C, dejándose que se desarrolle el color durante 15 min.
9. Se enfrían los tubos de ensayo, introduciendo la gradilla en el agua a temperatura ambiente
10. Se procede a medir en el espectrofotómetro siguiendo las normas expresadas anteriormente. Se ajusta el cero de absorbancia con la solución blanco exenta de proteína (tubo 1). Se miden las absorbancias de los tubos 2 a 6.

11. Se anotan las medidas de absorbancia en el cuaderno de laboratorio. Una vez realizadas las medidas, se limpian cada uno de los tubos de ensayo.
12. Se calcula la concentración de proteína que se ha colocado en cada uno de los tubos de ensayo y se anotan los resultados medidos por el espectrofotómetro con los que realizaremos la recta.
13. Realizamos también las mediciones del extracto que deseamos conocer su concentración, así como de su blanco, que en este caso será el un extracto crudo que no tenga actividad.
14. En papel milimetrado, se representan los valores experimentales de absorbancia obtenidos frente a la concentración de proteína estándar calculada de cada uno de los tubos, para cada método ensayado. Se ajustan los puntos obtenidos por el método de mínimos cuadrados a una recta, incluyendo el punto 0,0. Se representan la rectas ajustada en el papel milimetrado.
15. Si la absorbancia de la muestra está dentro del rango de medida del método seleccionado, mediante la ecuación de la recta de calibrado se puede calcular la concentración de proteína de la disolución problema

9. MÉTODO DE EVALUACIÓN DE RESULTADOS

Para la evaluación de resultados, se diferenciarán los enfrentamientos entre las propias legionelas y los producidos entre legionelas y otras bacterias.

- Entre cepas pertenecientes a especies del género *Legionella*:
 - o Diferenciación interespecíficas (especies)
 - o Diferenciación intraespecíficas (serogrupos)
- Entre legionelas y otras bacterias con las que comparten nicho ecológico.

De cada una de las especies de *Legionella*, hay aproximadamente 30 pruebas realizadas. De estas 30 pruebas, debemos conocer el número que han dado resultado positivo y las que han dado negativo; a partir de aquí, puede conocerse su ratio de producción/sensibilidad. Para ello, se distingue entre el comportamiento de la *Legionella* como receptora (sensibilidad) y como productora (actividad inhibitoria).

- Porcentajes:
 - Se hallan los porcentajes de producción y sensibilidad de cada una de las legionelas, como productoras y como receptoras.
 - Calcular el ratio de producción/sensibilidad.
 - Ratio $P/S > 1$ → Cepas de especies y/o serogrupos más productoras
 - Ratio $P/S < 1$ → Cepas de especies y/o serogrupos más sensibles.
 - Ratio $\gg 1$ → Cepas de especies y/o serogrupos productoras y resistentes.
 - Ratio $\ll 1$ → Cepas de especies y/o serogrupos poco productoras y muy sensibles.
 - Ratio $= 1$ → Cepas de especies y/o serogrupos equilibradas.

Algunas consideraciones a tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados, son las siguientes:

1. Es posible que una sólo bacteriocina por bacteria pueda provocar la lisis.
2. Podría haber relación entre la resistencia y los receptores de la cepa base. Si no tiene receptores, no puede ser inhibida. Un único receptor podría ser suficiente para ser inhibida.
3. En la masa microbiana (crecimiento) debe de haber al menos 1 bacteriocina por cada una de las células bacterianas para que surjan los halos de inhibición carentes de colonias.
4. Se puede afirmar que en la zona inhibida no hay legionelas vivas si no muertas, además de poder corroborar que en el disco que preparamos hay suficientes bacteriocinas para antagonizar nuevas siembras de legionelas en medio BCYE-alfa.

3. Resultados



CONTENIDO:

1. RATIOS DE TABLAS PRODUCCIÓN/ SENSIBILIDAD
 - 1.1. *Legionella pneumophila*
 - 1.2. *Legionella spp.*
2. CLASIFICACIÓN EN PATRONES DE PRODUCCIÓN/ SENSIBILIDAD
 - 2.1. Producción alta y muy baja sensibilidad
 - 2.2. Producción baja y alta sensibilidad
 - 2.3. Producción alta y alta sensibilidad
 - 2.4. Producción media y alta sensibilidad
 - 2.5. Producción y sensibilidad similares
3. DIFERENCIAS INTERESPECÍFICAS E INTRAESPECÍFICAS
4. ACTIVIDAD DE LAS LEGIONELAS FRENTE A OTRAS BACTERIAS
 - 4.1. Frente a bacterias gram +
 - 4.2. Frente a bacterias gram –
5. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DSE BACTERIOCINAS
 - 5.1. Unidades arbitrarias (U.A.)
 - 5.2. Naturaleza proteica
 - 5.3. Estabilidad al pH
 - 5.4. Tratamiento térmico
 - 5.5. Conclusiones de la caracterización
6. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DEL SOBRENADANTE
7. RESULTADOS DE LA TRANSFERENCIA DE BACTERIOCINAS
8. OTRAS INTERACCIONES DISTINTAS A LA INHIBICIÓN DE LA BACTERIA

1. RATIOS DE LAS TABLAS PRODUCCIÓN/SENSIBILIDAD

Se ha comparado la producción de bacteriocinas y sensibilidad a las mismas, de cepas pertenecientes a la especie *Legionella pneumophila* (SG. 1 (5 estirpes), SG.2-SG.14 (1 por cada serogrupo) y 19 especies distintas del género *Legionella*, entre ellas *L. bozemanii* (SG. 1 y SG. 2), *L. feeleii* (SGs. 1 y 2), *L. haeckeliae* (SGs. 1 y 2) y *L. longbeachae* (SGs. 1 y 2).

Después de calcular a través del método descrito en la metodología, los porcentajes de producción y sensibilidad de cada una de las legionelas como productoras y receptoras, hemos obtenido los siguientes ratios, que nos servirán como análisis previo de los resultados:

1.1. *Legionella pneumophila*

- *L. pneumophila* SG.1 1289: 1,37 → Muy productora y algo sensible.
- *L. pneumophila* SG.1 2189: 1,14 → Menos productora y menos sensible que la 1289 pero igualmente equilibrada.
- *L. pneumophila* SG.1 Knoxville: 0,59 → Dentro del SG.1, la menos productora y la más sensible; la menos competitiva.
- *L. pneumophila* SG.1 Philadelphia: 1,35 → De características similares a la 1289 y 2189.
- *L. pneumophila* SG.1. 4573: 1,24 → Hay pocos datos; más productora que sensible.
- *L. pneumophila* SG. 2: 0,79 → Bastante sensible y algo productora.
- *L. pneumophila* SG. 3: 0,88 → Cepa equilibrada en cuanto a su producción y sensibilidad.
- *L. pneumophila* SG. 4: 0,25 → Serogrupo poco productor y muy sensible. Poco competitivo.
- *L. pneumophila* SG. 5: 0,26 → De similares características al serogrupo 4.
- *L. pneumophila* SG. 6: 1,51 → Serogrupo competitivo; alta productividad y relativamente baja sensibilidad.
- *L. pneumophila* SG. 7: 2,34 → Serogrupo de muy elevada productividad y baja sensibilidad.
- *L. pneumophila* SG. 8: 4,21 → El 100% de las pruebas realizadas con discos de SG.8 han dado inhibición. En cuanto a su faceta como receptora, es bastante resistente.

- *L. pneumophila* SG. 9: 1,58 → Cepa de condiciones de resistencia y sensibilidad equilibrada: productora media, y resistente.
- *L. pneumophila* SG. 10: 0,24 → Serogrupo poco competitivo: poco productor y bastante sensible.
- *L. pneumophila* SG. 11: 1,27 → Serogrupo muy productor y bastante resistente. Competitivo.
- *L. pneumophila* SG. 12: 1,49 → Serogrupo productor y relativamente resistente.
- *L. pneumophila* SG. 13: -2,20 → Serogrupo especialmente resistente, y poco productor.
- *L. pneumophila* SG. 14: 1,33 → Especie equilibrada; productora y relativamente resistente.

1.2. Legionella spp.

- *L. anisa*: 0,17 → Especie poco productora y muy sensible.
- *L. bozemanii* SG.1: 0,44 → Especie poco productora y muy sensible.
- *L. bozemanii* SG. 2: 0,89 → Especie más sensible, pero equilibrada en cuanto a producción y sensibilidad.
- *L. cherrii*: 0,77 → Especie equilibrada en cuanto a producción y sensibilidad.
- *L. dumoffii*: 0,715 → Especie más sensible que productora.
- *L. erythra*: 0,69 → Especie más sensible que productora.
- *L. feeleii* SG.1: 0,811 → Especie más sensible, aunque equilibrada en cuanto a su producción y sensibilidad.
- *L. feeleii* SG.2: 1,011 → Especie equilibrada en cuanto a su producción de bacteriocinas y sensibilidad a ellas. Es bastante productora aunque también sensible.
- *L. gormanii*: 0,96 → Especie equilibrada en cuanto a su producción y sensibilidad a las bacteriocinas de legionella.
- *L. hackeliae* SG.1: 4,16 → Es una especie muy resistente como receptora y a la vez bastante productora. El ratio es muy superior a 1.
- *L. hackeliae* SG.2: 1,06 → Especie equilibrada en cuanto a su producción y sensibilidad.

- *L. israeliensis*: 1,15 → Especie equilibrada en cuanto a su producción de bacteriocinas y sensibilidad a las mismas.
- *L. jamestownensis*: 1,28 → Especie un tanto más productora que sensible.
- *L. jordanis*: 2,22 → Especie que destaca por ser muy resistente.
- *L. longbeachae* SG.1: 0,44 → Especie más sensible que productora.
- *L. longbeachae* SG.2: 1,15 → Especie equilibrada un tanto más productora que sensible.
- *L. maceachearnii*: 0,16 → Especie poco productora y muy sensible.
- *L. micdadei*: 0,72 → Especie productora y muy sensible.
- *L. oakridgensis*: 0,86 → Especie equilibrada en producción y sensibilidad.
- *L. parisienses*: 1,34 → Especie poco sensible o receptora, y más productora.
- *L. sainthelensis*: 0,28 → Especie muy poco productora y bastante sensible al resto de bacteriocinas.
- *L. steigerwartii*: 0,16 → Especie muy poco productora y muy sensible.
- *L. wadsworthii*: 0,74 → Especie productora, pero sobretodo sensible.

2. CLASIFICACIÓN EN PATRONES DE PRODUCCIÓN/SENSIBILIDAD

Hemos definido nuevos patrones de producción/sensibilidad, a partir de los cuales vamos a clasificar a las especies y serogrupos de legionelas estudiadas.

Señalamos 5 patrones con las siguientes características.

2.1. Producción alta y muy baja sensibilidad

Este patrón es mostrado por *L. jordanis*, *L. hackeliae* SG. 1, *L. pneumophila* SG. 7 y *L. pneumophila* SG. 8.

2.2. Producción baja y alta sensibilidad

Este patrón es mostrado por *L. pneumophila* SGs. 1 y 5, *L. anisa*, *L. bozemanii* SG.1, *L. longbeachae* SG.1., *L. maceachearnii*, *L. parisienses*, *L. steigerwartii*, *L. pneumophila* SG. 10 y *L. pneumophila* SG.13.

2.3. Producción alta y alta sensibilidad

L. jamestownensis, *L. micdadei*, *L. oakridgensis*, *L. pneumophila* SG.1. UZ1289 y *L. pneumophila Philadelphia*.

2.4. Producción media y alta sensibilidad

Este patrón es mostrado por *L. bozemanii* SG.2, *L. cherrii*, *L. dumoffii*, *L. erythra*, *L. gormanii*, *L. hackeliae* SG.2, *L. israeliensis*, *L. steigerwartii* y *L. pneumophila Knoxville*.

2.5. Producción y sensibilidad similares

L. feeleii, SG.1., *L. feeleii* SG. 2., *L. longbeachae* SG. 2, y *L. sainthelensis*, *L. wadsworthii*, *L. pneumophila* SG.1. 2189, *L. pneumophila* SG. 6, *L. pneumophila* SG. 9, *L. pneumophila* SG.11, *L. pneumophila* SG. 12. y *L. pneumophila* SG. 13.

Como es lógico, los patrones de las dos primeras categorías corresponden a las condiciones más favorables para competir en su hábitat natural y los creados por el hombre, como las torres de refrigeración y determinados edificios, lo que implica una capacidad para colonizar y así crear sus propios nichos ecológicos.

3. DIFERENCIAS INTERESPECÍFICAS E INTRAESPECÍFICAS

La producción y la sensibilidad a las bacteriocinas de las legionelas estudiadas, presentan diferencias interespecíficas e intraespecíficas y discrimina algunos serogrupos como hemos demostrado en *L. pneumophila*, *L. bozemanii*, *L. feeleii*, *L. hackeliae* y *L. longbeachae*.

Respecto a las diferencias interespecíficas poseen patrones distintos en la producción de bacteriocinas y en la sensibilidad, con una diversidad que sugiere su valor discriminatorio.

Y en cuanto a las diferencias intraespecíficas se pueden extraer las siguientes observaciones:

1. En el mismo serogrupo 1 de *Legionella pneumophila*, en las cepas Knoxville, Philadelphia, UZ4573, UZ4890, UZ 71289 y UZ72189 existen marcadas diferencias. *L. pneumophila* Knoxville es menos productora y más sensible que *L. pneumophila* Philadelphia. La cepa *L. pneumophila* SG.1 UZ1289 es de similar competitividad a la 2189, pero ésta última es menos productora, aunque también menos sensible que la primera. Realizando una visión global de todas las cepas estudiadas del serogrupo 1, observamos que todas ellas tienen en

común un factor producción/sensibilidad superior a 1, lo que indica que son competitivas; buenas productoras de bacteriocinas frente a otras legionelas y poco sensibles a las mismas.

2. Asimismo entre los serogrupos 2-14 de *L. pneumophila* pueden observarse distintos patrones. Por ejemplo, los SG. 4, 5, 10 y el SG.13 son muy poco productores, a diferencia de los serogrupos 6,7,8,11 y 12, que son productores frente a la mayoría de serogrupos de su especie (Tabla 1) o de otras especies de *Legionella* (Tabla 4). En cuanto a sensibilidad podemos diferenciar al SG.13 que es muy resistente, del SG. 4 que es a su vez muy sensible pese a la frecuencia en la producción de enfermedad ya que aparece en España en tercer lugar. Primero *L. pneumophila* SG. 1, después el SG. 4 y por último el SG. 6.

3. Análogamente se encuentran diferencias en los serogrupos 1 y 2 de las siguientes especies: *L. bozemanii*, *L. feeleii*, *L. hackeliae* y *L. longbeachae*. En las tablas 2, 3 y 4 podemos ver que sus comportamientos son bastante similares en todos los enfrentamientos, aunque también encontramos algunas discrepancias. *L. bozemanii* SG.1 y *L. hackeliae* SG.1 son bastante más resistente que *L. bozemanii* SG.2 y *L. hackeliae* SG.2.

Existe por tanto, una evidente relación entre la producción de bacteriocinas y la sensibilidad a las mismas, que varía no sólo entre las especies si no también entre los serogrupos.

Algunos rasgos llamativos son los siguientes:

1. *L. erythra* no es activa frente a *L. feeleii* SG. 1 ni a *L. feeleii* SG. 2, sólo es activa frente al SG.2 de *L. hackeliae* y carece de actividad frente a *L. jordanis*.
2. *L. feeleii* SG. 1 no inhibe a *L. feeleii* SG. 2 y si a *L. feeleii* SG. 2.
3. *L. pneumophila* SG.1 UZ2189, inhibe a *L. bozemanii* SG. 2 pero sin embargo no lo hace a *L. bozemanii* SG. 1.
4. *L. jordanis* inhibe a *L. hackeliae* SG. 2, pero no al SG. 1.
5. *L. longbeachae* SG. 1 y *L. longbeachae* SG.2 son activas frente a los 2 serogrupos de *L. hackeliae*, en tanto que solamente *L. longbeachae* SG. 1 inhibe a *L. jamestownensis*.
6. *L. sainthelensis* es inhibida por *L. bozemanii* SG. 1 pero no por *L. bozemanii* SG. 2.
7. Se observa sinergismo entre *L. parisienses*, *L. sainthelensis* y *L. longbeachae* SG. 2 frente a *L. hackeliae* SG. 2.

8. Al comparar los SG. 1 y 2 de *L. hackeliae* también pueden apreciarse marcadas diferencias.

8.1. El SG.1 se caracteriza por la elevada resistencia a las 31 cepas de legionelas probadas, siendo solamente sensible a SGs. 1 y 2 de *L. bozemanii*, *L. jamestownensis* y *L. oakridgensis*. Su capacidad bacteriocinogénica es positiva en 15 cepas.

8.2. Contrastando con estos rasgos, el SG 2 solamente presenta resistencia a 5 cepas resistentes, es decir, una notable sensibilidad y su producción baja de bacteriocinas lo muestra en 13 ensayos.

Dos de las especies que hemos estudiado en profundidad son *L. pneumophila* SG. 1 (5 estirpes) y SG. 1 y 2 de *L. bozemanii*. De estas especies podemos concluir:

9. Son significativas las diferencias entre los serogrupos 1 y 2 de *L. bozemanii*.

9.1. En primer lugar, la cepa del SG. 1 no tiene inmunidad frente a la bacteriocinas que produce, en contraste del SG.2 que es inmune ante la bacteriocinas que ella misma genera.

9.2. El SG. 1 inhibe al SG. 2, dando un diámetro de 12 mm, y a su vez el SG. 2 es activo frente al SG.1, con un halo de 20 mm.

9.3. La cepa SG.2 determina una doble inhibición sobre el SG.1, la primera correspondiente a antagonistas de bajo peso molecular (diámetro de 20 mm) y la segunda de halo menor, mostrando efecto sinérgico con la cepa del SG.1.

10. Como ya se ha comentado hay marcadas diferencias entre las diferentes estirpes estudiadas pertenecientes a *L. pneumophila* SG. 1.

10.1. Las tres cepas de *Lp.1* Knoxville, Philadelphia y UZ4573 poseen el mismo patrón de bacteriocinas con actividad frente a los SG.1-SG.6 y SG. 12.

10.2. La relación entre las 3 cepas del SG.1 se caracteriza porque la estirpe Knoxville inhibe a Philadelphia, en tanto que la cepa UZ74573 es activa frente a las otras dos.

10.3. *L. jordanis* es resistente a *L. Knoxville*, Philadelphia y UZ4573 y sin embargo sensible a UZ72189 y UZ71289.

10.4. Todas las estirpes estudiadas pertenecientes a *L. pneumophila* SG.1 son activas frente a *L. bozemanii* SG.1 menos UZ72189.

10.5. *L. pneumophila* Knoxville, *L. pneumophila* Philadelphia y *L. pneumophila* SG1 UZ4573 son activas frente a *L. cherri*, a diferencia de UZ2189 y UZ1289 que no lo son.

10.6. Todas las estirpes son sensibles a *L. bozemanii* SG.1 y *L. erythra*, salvo UZ4573 que es resistente.

Una posible evaluación ecológica sugiere que el SG.1., está mejor dotado ya que produce bastantes cinas y especialmente es muy resistente para una probable competición.

A continuación se muestra un cuadro resumen del ratio de producción/sensibilidad de cada de las especies estudiadas, así como la inmunidad a sus propias legionelinas.

TABLA 12. Ratio P/S e inmunidad a sus legionelinas (*L. pneumophila*)

Especie y serogrupo	Ratio P/S	Inmunidad a sus legionelina(s)
<i>L. pneumophila</i> SG. 1 UZ71289	1,37	NO
<i>L. pneumophila</i> SG. 1 UZ72189	1,14	NO
<i>L. pneumophila</i> SG. 1 Knoxville	0,59	SÍ
<i>L. pneumophila</i> SG. 1 Philadelphia	1,35	NO
<i>L. pneumophila</i> SG. 2	0,79	NO
<i>L. pneumophila</i> SG. 3	0,88	NO
<i>L. pneumophila</i> SG. 4	0,25	NO
<i>L. pneumophila</i> SG. 5	0,26	NO
<i>L. pneumophila</i> SG. 6	1,51	NO
<i>L. pneumophila</i> SG. 7	2,34	NO
<i>L. pneumophila</i> SG. 8	4,21	NO
<i>L. pneumophila</i> SG. 9	1,58	NO
<i>L. pneumophila</i> SG. 10	0,24	NO
<i>L. pneumophila</i> SG. 11	1,27	NO
<i>L. pneumophila</i> SG. 12	1,49	NO
<i>L. pneumophila</i> SG. 13	-2,20	SÍ
<i>L. pneumophila</i> SG. 14	1,33	NO

Fuente: Elaboración propia

Tabla 13. Ratio P/S e inmunidad a sus legionelinas (*Legionella spp.*)

Espece y serogrupo	Ratio P/S	Inmunidad a sus legionelina(s)
<i>L. anisa</i>	0,17	NO
<i>L. bozemanii</i> SG. 1	0,44	NO
<i>L. bozemanii</i> SG. 2	0,89	NO
<i>L. cherrii</i>	0,77	NO
<i>L. dumoffii</i>	0,715	NO
<i>L. erythra</i>	0,69	NO
<i>L. feeleii</i> SG. 1	0,811	SÍ
<i>L. feeleii</i> SG. 2	1,011	SÍ
<i>L. gormanii</i>	0,96	NO
<i>L. hackeliae</i> SG. 1	4,16	SÍ
<i>L. hackeliae</i> SG. 2	1,06	SÍ
<i>L. israeliensis</i>	1,15	NO
<i>L. jamestownensis</i>	1,28	NO
<i>L. jordanis</i>	2,22	SÍ
<i>L. longbeachae</i> SG. 1	0,44	SÍ
<i>L. longbeachae</i> SG. 2	1,15	SÍ
<i>L. maceachearnii</i>	0,16	NO
<i>L. micdadei</i>	0,72	NO
<i>L. oakridgensis</i>	0,86	NO
<i>L. parisienses</i>	1,34	SÍ
<i>L. sainthelensis</i>	0,28	NO
<i>L. steigerwartii</i>	0,16	SÍ
<i>L. wadsworthii</i>	0,74	NO

Fuente: Elaboración propia

4. ACTIVIDAD DE LAS LEGIONELAS FRENTE A OTRAS BACTERIAS

Se han realizado pruebas de bacteriocinas de *Legionella* frente a cepas de bacterias de hábitat orofaringe gram negativos (*N. lactamica* y *N. sicca*) así como también frente a gram-positivos de origen hídrico (*E. faecalis* 19433).

4.1. Actividad de *Legionella* vs bacterias gram negativas

Se han realizado muchas pruebas con *N. lactamica* y *N. sicca* como receptoras, y aunque se han obtenido buenos resultados, la actividad inhibitoria de la *Legionella* sobre estas cepas es limitada, tal como se muestra en la siguiente tabla.

TABLA 14. Actividad de *Legionella* spp. sobre *Neisseria lactamica* (ATCC2397) y *Neisseria sicca* (ATCC9913).

Base: <i>Neisseria lactamica</i> (ATCC 2398)	Base: <i>Neisseria sicca</i> (ATCC9913)
<i>L. pne.</i> SG. 1 INHIBE Y BLOQUEA PIGMENTO	<i>L. anisa</i> INHIBE
<i>L. pne.</i> SG. 6 NO TIENE ACTIVIDAD	<i>L. gormanii</i> INHIBE
<i>L. bozemanii</i> SG. 1 BLOQUEA PIGMENTO	<i>L. jamestownensis</i> INHIBE
<i>L. bozemanii</i> SG. 2 BLOQUEA PIGMENTO	<i>L. micdadei</i> NO TIENE ACTIVIDAD
<i>L. cherrii</i> NO TIENE ACTIVIDAD	<i>L. parisienses</i> NO TIENE ACTIVIDAD
<i>L. dumoffii</i> NO TIENE ACTIVIDAD	<i>L. wadsworthii</i> NO TIENE ACTIVIDAD
<i>L. feeleii</i> SG. 2 NO TIENE ACTIVIDAD	
<i>L. oakridgensis</i> INHIBE Y BLOQUEA PIGMENTO	<i>L. oakridgensis</i> INHIBE Y BLOQUEA PIGMENTO

Fuente: Elaboración propia

4.2. Actividad de *Legionella* vs bacterias gram positivas

TABLA 15. Actividad Legionella frente a bacterias gram positiva

<i>S. pneumonia 13</i>				<i>S. pyogenes</i>			
Lp1 Knox	0	<i>L. bo-2</i>	0	Lp1 Knox	0	<i>L. bo-2</i>	0
Lp1 Phila	0	<i>L. cherrii</i>	0	Lp1 Phila	0	<i>L. cherrii</i>	0
UZ2189	0	<i>L. dumoffii</i>	0	UZ2189	9	<i>L. dumoffii</i>	0
UZ1289	0	<i>L. erythra</i>	0	UZ1289	0	<i>L. erythra</i>	0
SG. 6	0	<i>L. feeleii 1</i>	0	SG. 6	0	<i>L. feeleii 1</i>	0
SG. 13	0	<i>L. feeleii 2</i>	0	SG. 13	0	<i>L. feeleii 2</i>	0
<i>L. bo-1</i>	0	<i>L. gormanii</i>	0	<i>L. bo-1</i>	0	<i>L. gormanii</i>	0
<i>L. anisa</i>	0	<i>L. hackeliae 1</i>	0	<i>L. anisa</i>	0	<i>L. hackeliae1</i>	0
<i>S. pneumonia 14</i>				<i>S. epidermidis</i>			
Lp1 Knox	0	<i>L. bo-2</i>	0	Lp1 Knox	0	<i>L. bo-2</i>	0
Lp1 Phila	0	<i>L. cherrii</i>	0	Lp1 Phila	0	<i>L. cherrii</i>	0
UZ2189	0	<i>L. dumoffii</i>	0	UZ2189	0	<i>L. dumoffii</i>	0
UZ1289	0	<i>L. erythra</i>	0	UZ1289	0	<i>L. erythra</i>	0
SG. 6	0	<i>L. feeleii 1</i>	0	SG. 6	0	<i>L. feeleii 1</i>	0
SG. 13	0	<i>L. feeleii 2</i>	0	SG. 13	0	<i>L. feeleii 2</i>	0
<i>L. bo-1</i>	0	<i>L. gormanii</i>	0	<i>L. bo-1</i>	0	<i>L. gormanii</i>	0
<i>L. anisa</i>	0	<i>L. hackeliae1</i>	0	<i>L. anisa</i>	0	<i>L. hackeliae1</i>	0

Fuente: Elaboración propia

Tal como puede observarse en la tabla, se probaron discos frente a *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *S. epidermidis*; para ninguno de estas bases produjeron inhibición los discos probados

Sin embargo, esta actividad fue distinta para la base de *E. faecalis* ATCC 19433. Este enterococo se enfrentó a varios extractos crudos filtrados de *L. bozemanii* SG.2 (extractos B4, B4(-10°)), a varias cepas de *L. pneumophila*. (1289, 4173, 225 y 223) y a *L. jamestownensis*.

Los extractos B4 son de *L. bozemanii* SG. 2, el segundo conservado a menos 10°C. Las cepas de *L. pneumophila* son cepas propias de colección bien de origen clínico (1289, 4573) o de origen ambiental, en este caso de la residencia militar "Los Castillejos" (223 y 225).

Los únicos que mostraron actividad fueron los extractos B4 (-70°) y B4 (-10°), con un halo de 26 mm cada uno.

A partir de aquí se continuaron haciendo pruebas con el extracto de *L. bozemanii* SG.2 y otros tantos. A continuación se muestran las imágenes de algunas pruebas realizadas con estos extractos.

IMÁGENES 7 y 8. *E. faecalis* ATTC19433 frente extractos de bacteriocinas de *Legionella*.



Fuente: Elaboración propia

5. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE BACTERIOCINAS

Se ha caracterizado el extracto enzimático de las siguientes cepas:

Extractos de bacteriocinas de Legionellas caracterizados	
<i>L. pneumophila</i> SG. 1 UZ1289	<i>L. pneumophila</i> SG. 1 225
<i>L. bozemanii</i> SG. 1	<i>L. bozemanii</i> SG. 2
<i>L. cherrii</i>	<i>L. erythra</i>
<i>L. feeleii</i> SG. 1	<i>L. feeleii</i> SG. 2
<i>L. parisiensis</i>	<i>L. steigerwartii</i>
<i>L. longbeachae</i> SG. 2	<i>L. micdade</i>

A continuación se detalla la caracterización del extracto enzimático crudo, centrifugado y filtrado de las cepas de *L. pneumophila* SG.1 (Knoxville) y *L. bozemanii* SG.2 (ATCC35545) tras cultivo en medio líquido durante 4 días a 36°C, con un 10% de CO₂.

Para dicha caracterización se han seguido los planteamientos de Jacob, F; una contribución clave para la caracterización de las bacteriocinas producidas por *E. coli*, denominadas colicinas:

1. Espectro de actividad reducido
2. Naturaleza proteica
3. Mecanismo de acción bactericida
4. Unión a receptores específicos
5. Codificación por plásmidos que además confieren inmunidad frente a la bacteriocinas.
6. Dudas en los gram-positivos

Dado los resultados obtenidos en la caracterización de dichos extractos enzimáticos, se ha comprobado su naturaleza proteica (inactivación por 7 proteasas; no por lisozima), estabilidad al pH (valores 3-11) y su termoresistencia a 80°, 90° y 100° durante 20 minutos.

5.1. Unidades arbitrarias (U.A.)

A continuación se muestra la valoración de la actividad de 16 cepas de *Legionella* spp. crecidas en BYE (alfa-ceto-ACES-L.cist.piro Fe) expresada en unidades arbitrarias, enfrentadas a las cepas indicadoras utilizadas en el estudio *E. faecalis* ATCC19433 y *N. sicca* ATCC9913.

Tabla 16. Resultados de las U.A. de los extractos enzimáticos crudos.

Unidades arbitrarias de los extractos enzimáticos crudos de 16 cepas de <i>Legionella</i> spp.			
<i>Lp1</i> (Knoxville)	> 128	<i>L. hackeliae</i> SG2	128
<i>Lp1</i> (Philadelphia)	128	<i>L. jamestownensis</i>	> 128
<i>Lp1</i> (UZ71289)	> 128	<i>L. jordanis</i>	> 128
<i>Lp1</i> (UZ72189)	> 128	<i>L. longbeachae</i> SG1	128
<i>L. bozemanii</i> SG1	128	<i>L. longbeachae</i> SG2	> 128
<i>L. bozemanii</i> SG2	> 128	<i>L. maceachearnii</i>	128
<i>L. cherrii</i>	128	<i>L. micdadei</i>	128
<i>L. hackeliae</i> SG1	128	<i>L. oakridgensis</i>	> 128

Fuente: Elaboración propia

IMAGEN 9. U.A. del extracto enzimático de *L. cherri* frente a *N. sicca*.



Fuente: Elaboración propia

5.2. Caracterización del extracto: naturaleza proteica

Para conocer la naturaleza proteica se ha sometido el extracto crudo enzimático a la acción de 7 proteasas y la lisozima.

Dado que las bacteriocinas son compuestos inhibidores de naturaleza peptídica, la inactivación por proteasas es uno de los primeros criterios para definir una sustancia antimicrobiana como bacteriocina.

Tabla 17. Sensibilidad de los extractos de *L. pn.* SG. 1 (Knoxville) y *L. bozemanii* SG. 2 a las enzimas.

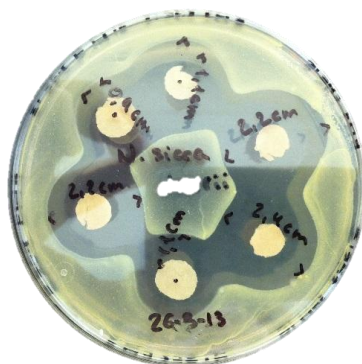
Características del extracto enzimático crudo							
Proteasa K XXI	Proteasa XIV	Proteinasa K	Papaína	Pronasa K	Tripsina	α -quimo tripsina	Lisozima
+	+	+	+	+	+	+	-

Fuente: Elaboración propia

5.3. Caracterización del extracto: estabilidad al pH

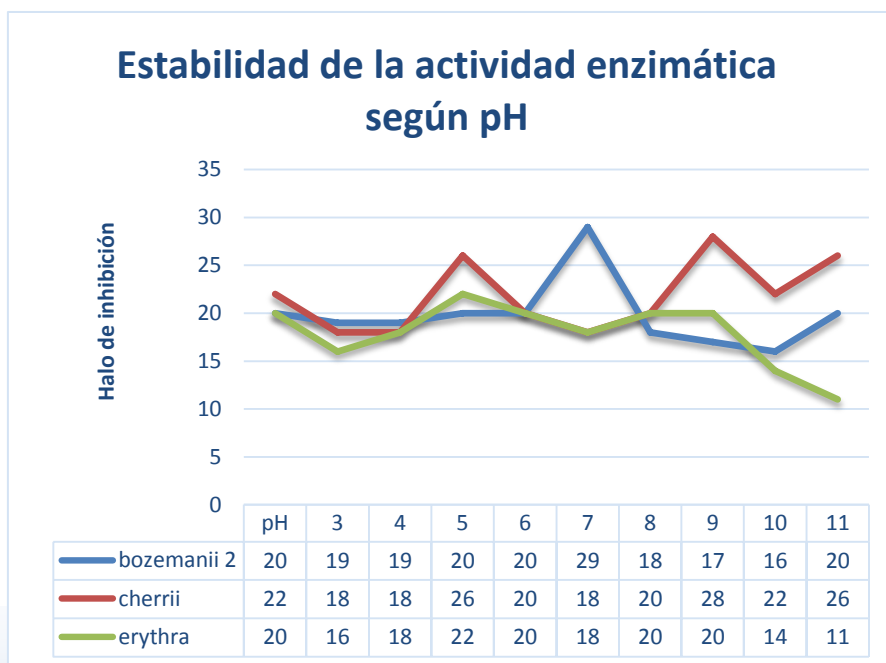
A continuación se muestra la estabilidad de la actividad de los extractos de *L. bozemanii* SG. 2, *L. cherrii* y *L. erythra* al someterse a un rango de pHs entre 3 y 11.

IMAGEN 10. Estabilidad de la actividad del extracto crudo a diferentes pHs frente a la base receptora *N. sicca*.



Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO 4. Estabilidad de la actividad enzimática a diferentes pHs.



Fuente: Elaboración propia

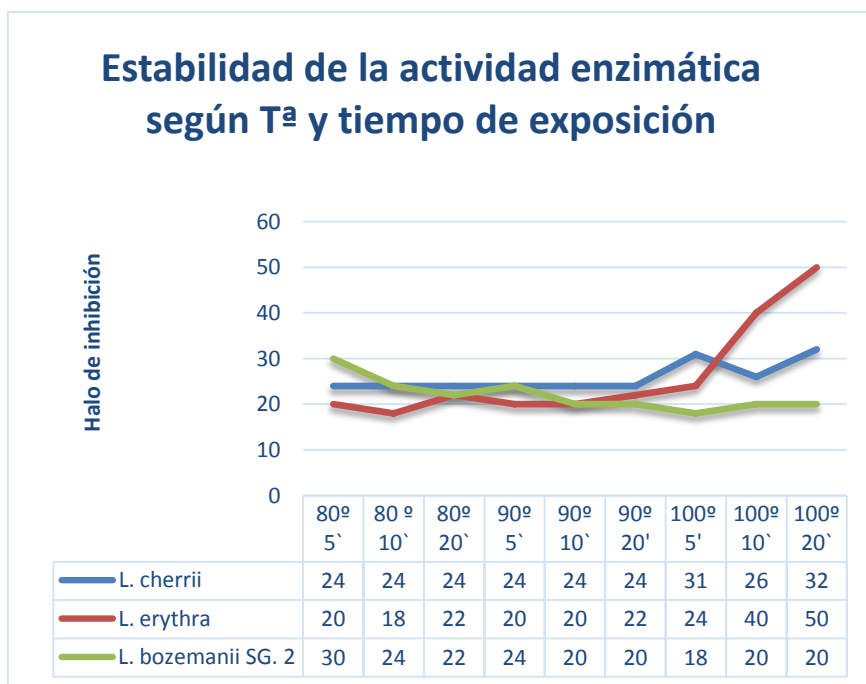
Estos mismos extractos se sometieron a diferentes temperaturas tal como se describe en la metodología y éstos fueron los resultados:

IMAGEN 11: Estabilidad de la actividad tras someterse a diferentes temperaturas.



Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO 5. Estabilidad de la actividad de los extractos sometidos a diferentes temperaturas.



Fuente: Elaboración propia

5.5. Conclusiones de la caracterización

Podemos deducir estas posibles respuestas a los planteamientos de Jacob, F., Lwoff, S., Wollman, E.:

1. Espectro de actividad no es reducido sino amplio, más parecido al de las arqueobacterias.
2. Naturaleza proteica: Sí
3. Mecanismo de acción bactericida: Sí
4. Unión a receptores específicos
5. Codificación por plásmidos que además confieren inmunidad frente a la bacteriocinas.:
6. Dudas en los gram-positivos: muy limitada en las legionelas.

Tabla 18. Características del extracto enzimático crudo.

Características del extracto enzimático crudo de las cepas: <i>L.pneumophila</i> SG1 [Knoxville] y <i>L. bozemanii</i> SG2 [ATCC35545]									
Control Tª amb., 25 mm	80° C 5 min	80° C 10 min	80° C 20 min	90° C 5 min	90° C 10 min	90° C 20 min	100° C 5 min	100° C 10 min	100° C 20 min
	25 mm	24 mm	22 mm	24 mm	20 mm	20 mm	19 mm	20 mm	20 mm
Sensibilidad a enzimas	Proteasa XXI +	Proteasa XIV +	Proteinasa K +	Papaína +	Pronanasa E +	Tripsina +	α-quimio tripsina +	Lisozima -	
Estabilidad pH 20 mm	pH3 20 mm	pH4 19 mm	pH5 19 mm	pH6 20 mm	pH7 20 mm	pH8 20 mm	pH9 18 mm	pH10 17 mm	pH11 16 mm
Tras 24 horas a 4°C	18 mm	18 mm	18 mm	18 mm	18 mm	18 mm	16 mm	16 mm	16 mm

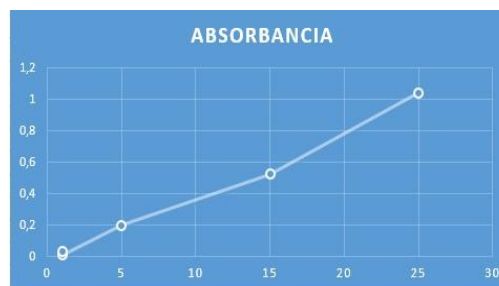
Fuente: Elaboración propia

6. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL EXTRACTO ENZIMÁTICO CRUDO (Sobrenadante)

Tal como se indica en la metodología y a través de una curva de calibrado con BSA, se han obtenido los siguientes resultados:

Gráfico 7. Curva de calibrado concentración BSA

Concentraciones	Absorbancia
25	1,042
15	0,522
5	0,197
1	0,03



Fuente: Elaboración propia

La medición realizada con el espectrofotómetro, dio los siguientes resultados:

Extracto blanco	0,42
Extracto B4 (4°C)	0,272

Esto, puede deberse a que el medio tiene proteínas, que una vez cultivado las pierde por procesos de crecimiento y metabólicos de la bacteria. Por tanto, éste blanco no sería el más adecuado para este experimento. De momento, tomamos el dato del espectrofotómetro relativo al sobrenadante de *L. bozemanii* SG. 2 (B4 a 4°C) para estimar la concentración de un extracto activo.

Por tanto, y a través de la curva de calibrado, calculamos la concentración de proteínas de dicho extracto y estimamos que está alrededor de 7 µg/ml.

Una vez conocida la concentración del extracto, deducimos que lo mejor sería concentrar éste extracto por precipitación; se precipitarán las proteínas por el agregado de un solvente orgánico (acetona). Una vez concentrado se procederá a la electroforesis.

Paralelamente a la muestra concentrada, se correrá el caldo de cultivo de extracto de levadura, concentrado, para desestimar las proteínas que sean del propio medio.

Las transferencias de la actividad de bacteriocinas producidas por legionelas

7. RESULTADOS DE LA TRANSFERENCIA DE BACTERIOCINAS

frente a otras especies, incluidos serogrupos, que se hace a partir de los halos de inhibición, se han probado frente a cepas de bacterias de hábitat orofarínge gram negativos (*N. lactamica* y *N. sicca*) así como también frente a gram-positivos de origen hídrico (*E. faecalis* ATCC19433).

1. Utilizando como receptora primera, la cepa *L. pneumophila* SG.1 UZ2189 se comprueba la actividad de *L. dumoffi*, *L. feeleeii* SG. 1, *L. israelensis*, *L. jordanis*, *L. longbeachae* SG.1 y *L. wadsworthii*. De estas 7 cepas al aplicar los discos frente a la indicadora *N. sicca*, la segunda receptora, serán activas 5 especies excepto *L. hackeliae* SG. 2 y *L. longbeachae* SG. 1.

2. Al comparar el comportamiento de *E. faecalis* ATCC19433 como receptora tercera, frente a *L. feeleeii* SG. 1, *L. hackeliae* SG. 2, *L. longbeachae* SG. 1 y *L. wadsworthii*, estas cuatro especies presentaban actividad inhibidora.

TABLA 19. Pruebas realizadas de la transferencia de bacteriocinas

TRANSFERENCIA DE BACTERIOCINAS				
Disco de bacteriocinas	1ª Base Receptora	2ª Base Receptora	3ª Base Receptora	4ª Base Receptora
Legionella pneumophila sobre diferentes bacterias receptoras				
Lp1 (Knoxville)	<i>N. sicca</i> (ATCC9913)	<i>L. anisa</i>		
Lp1 (Philadelphia)	<i>L. oakridgensis</i>	<i>N. sicca</i> (ATCC9913)	<i>L. anisa</i>	
Lp1 (UZ1289)	<i>N. sicca</i> (ATCC9913)	<i>L. anisa</i> , <i>L. oakridgensis</i>		
Lp1 (522)	<i>E. cloacae</i> (ATCC23355)	<i>L. oakridgensis</i>		
<i>L. pne.</i> SG3	<i>L. maceachearnii</i>	<i>N. sicca</i> (ATCC9913)	<i>E. faecalis</i> (ATCC19433)	<i>L. anisa</i> , <i>L. oakridgensis</i>
<i>L. pne.</i> SG9	<i>E. cloacae</i> (ATCC23355)	<i>L. oakridgensis</i>		
<i>L. pne.</i> SG10	<i>L. maceachearnii</i>	<i>L. jamestownensis</i>	<i>N. sicca</i> (ATCC9913)	<i>E. faecalis</i> (ATCC19433)
<i>L. pne.</i> SG13	<i>E. cloacae</i> (ATCC23355)	<i>N. sicca</i> (ATCC9913)	<i>L. anisa</i>	
Legionella spp. sobre diferentes bacterias receptoras				
<i>L. anisa</i>	<i>N. sicca</i> (ATCC9913)	<i>L. oakridgensis</i>		
<i>L. bozemanii</i> SG2	<i>N. sicca</i> (ATCC9913)	<i>E. faecalis</i> (ATCC19433)	<i>L. anisa</i> , <i>L. oakridgensis</i>	
<i>L. dumoffii</i>	Lp1 (UZ2189)	<i>N. sicca</i> (ATCC9913)	<i>L. anisa</i>	
<i>L. feeleeii</i> SG1	<i>L. jamestownensis</i>	<i>N. sicca</i> (ATCC9913)	<i>E. faecalis</i> (ATCC19433)	<i>L. anisa</i> , <i>L. oakridgensis</i>
<i>L. feeleeii</i> SG1	Lp1 (UZ2189)	<i>E. faecalis</i> (ATCC19433)	<i>L. oakridgensis</i>	
<i>L. israeliensis</i>	<i>L. dumoffii</i>	<i>N. sicca</i> (ATCC9913)	<i>L. oakridgensis</i>	
<i>L. jamestownensis</i>	<i>L. dumoffii</i>	<i>N. sicca</i> (ATCC9913)	<i>L. oakridgensis</i>	
<i>L. longbeachae</i> SG1	Lp1 (UZ2189)	<i>E. faecalis</i> (ATCC19433)	<i>L. oakridgensis</i>	
<i>L. micdadei</i>	<i>L. jamestownensis</i>	<i>N. sicca</i> (ATCC9913)	<i>E. faecalis</i> (ATCC19433)	<i>L. anisa</i> , <i>L. oakridgensis</i>
<i>L. sainthelensis</i>	<i>N. sicca</i> (ATCC9913)	<i>L. anisa</i>		
<i>L. steigerwartii</i>	<i>L. jamestownensis</i>	<i>N. sicca</i> (ATCC9913)	<i>E. faecalis</i> (ATCC19433)	<i>L. anisa</i> , <i>L. oakridgensis</i>

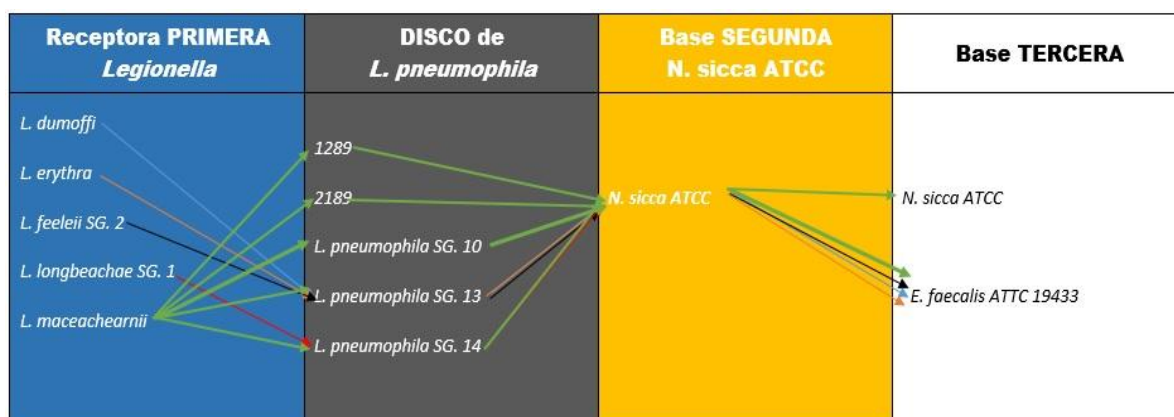
Fuente: Elaboración propia

3. Al haber demostrado que las bacteriocinas de diversas especies del género *Legionella* activas frente *L. pneumophila* SG. 1 (UZ 2189) poseían actividad versus *E. faecalis* (ATCC 19433) y *N. sicca* (ATCC 9413), significa que las bacteriocinas (legionelinas) tienen un espectro amplio que incluyen bacterias gram+ y gram-.

4. Finalmente, constituye una prueba que los discos procedentes de *L. pneumophila* SG.1, son capaces de inhibir sucesivamente a *E. faecalis* y *N. sicca*. Al enfrentarse a *L. oakridgensis*; poseen todavía actividad inhibitoria.

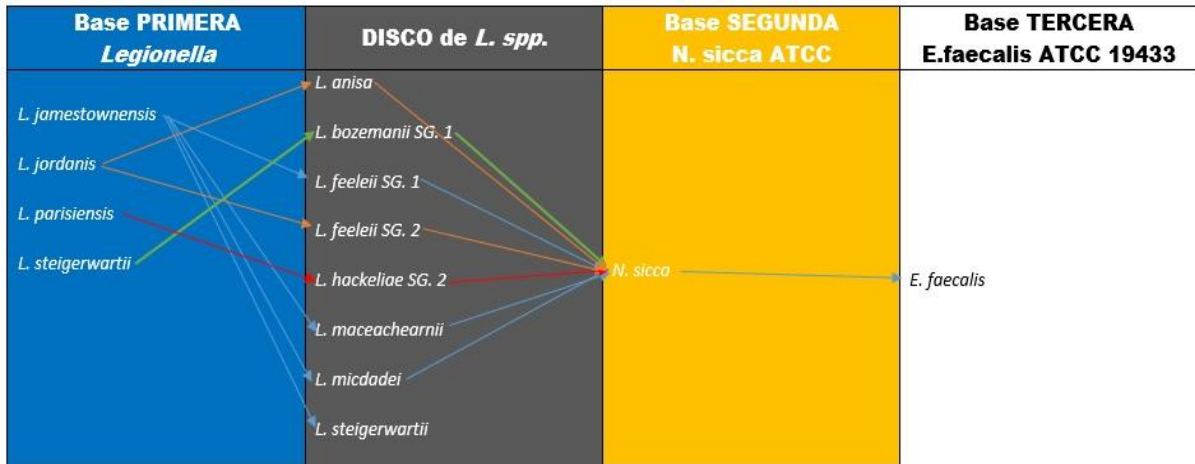
A continuación puede observarse un cuadro de conexiones, realizado a partir de la transferencia de bacteriocinas.

TABLA 20. Conexiones en la transferencia de bacteriocinas. Receptora primera *Legionella* y discos de *L. pneumophila*.



Fuente: Elaboración propia

TABLA 21. Conexiones en la transferencia de bacteriocinas. Receptora primera *Legionella* y discos de *Legionella spp.*

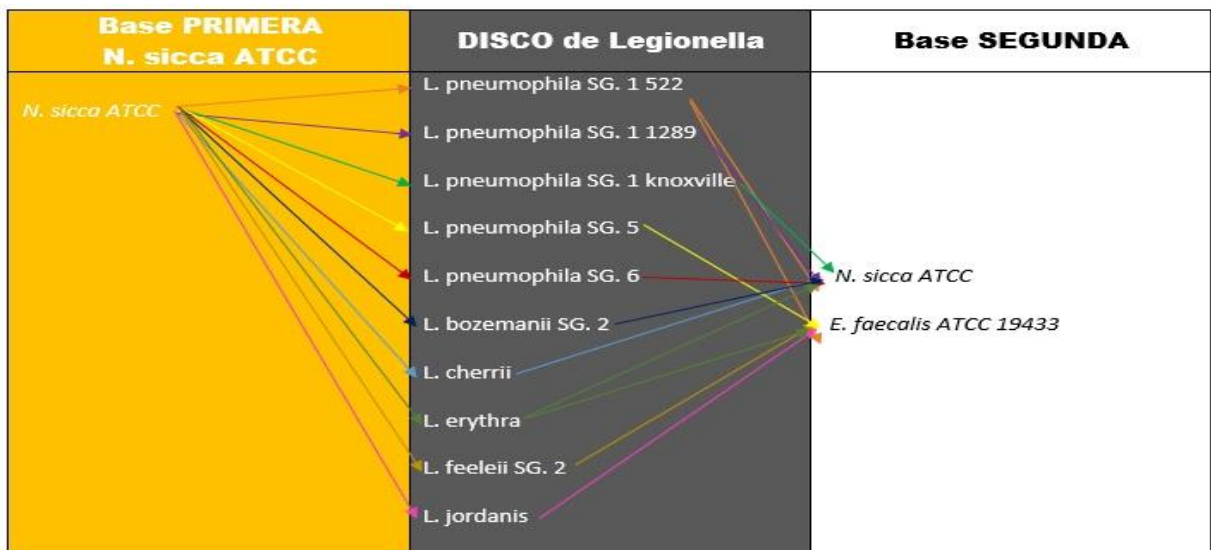


Fuente: Elaboración propia

Los resultados de las tablas anteriores, muestran algunas de las conexiones positivas obtenidas tras las numerosas pruebas realizadas; pero no siempre las bacterias muestran interconexiones.

Por ejemplo, las bacteriocinas producidas por *L. anisa*, cuando se enfrenta a una receptora *L. jordanis*, siguen teniendo actividad cuando se enfrenta en el segundo pase a la receptora *N. sicca*; sin embargo, cuando su primera receptora es *L. longbeachae* SG. 2 y *L. oakridgensis*, y se transfieren las bacteriocinas a *N. sicca*, no inhiben. Lo mismo ocurre con *L. feeleii* SG. 2; las bacteriocinas que produce frente a *L. jordanis*, siguen inhibiendo en el segundo pase frente a *N. sicca*, pero no lo hacen las producidas frente a *L. oakridgensis*.

TABLA 22. Conexiones en la transferencia de bacteriocinas. Receptora primera *N. sicca*.



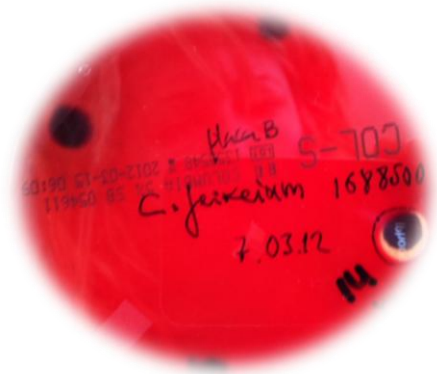
Fuente: Elaboración propia

9. CONTINUIDAD DE ESTE PROYECTO

Se considera que un antibiótico es efectivo cuando elimina o inhibe el crecimiento de un organismo infeccioso. En nuestra investigación, hemos trabajado en estudiar precisamente qué bacterias son inhibidas por las bacteriocinas de las legionelas, pero en este trayecto, hemos descubierto, que además de la eliminación o muerte de las bacterias receptoras, estos discos de bacteriocinas, podían inhibir otro tipo de síntesis de proteínas como son los procesos de pigmentación o la hemólisis.

Al igual que se producen estos fenómenos, se pueden estar produciendo otras interacciones en la síntesis de proteínas, que a la vista somos incapaces de ver, y que desconocemos si pueden tener efectos y repercusión en la virulencia de la bacteria donadora y en la receptora.

IMAGEN 12. β -hemólisis del disco de bacteriocinas de *L. sainthelensis*.



Fuente: Elaboración propia

Podía ser objeto de estudio por tanto, no sólo la búsqueda de antibióticos que eliminen o inhiban el crecimiento de la bacteria, si no antibióticos que interfieran de alguna forma en la síntesis de proteínas modificando con ello la virulencia de dicho organismo infeccioso.

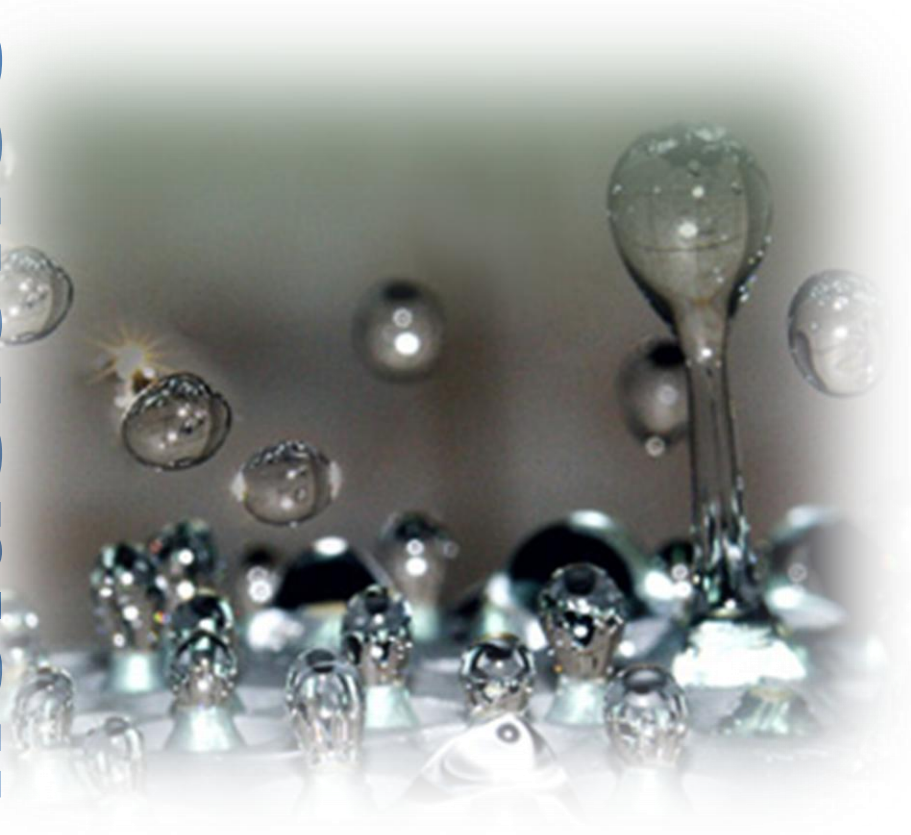
Es conocido, que muchas de las legionelas que crecen en las torres de refrigeración, no son tipificables; es decir, no son identificables por los métodos utilizados habitualmente. Esto es debido que al estar sometidas a según qué condiciones, cambian su estructura, sus anticuerpos, etc.

A través del estudio de sus bacteriocinas, pretendemos comparar las legionelas originales y las legionelas desarrolladas en las torres de refrigeración. Nos planteamos la siguiente cuestión: ¿Aumenta, disminuye o se mantiene la misma producción de bacteriocinas cuando las legionelas se desarrollan en las torres de refrigeración? ¿Varía su producción bacteriocinogénica? ¿Influye esto en su virulencia?.

Trabajo Fin de Máster

Claudia Sánchez

4. Conclusiones



Máster Salud Pública

Universidad de Zaragoza

Para complementar la historia natural de la legionelosis, hemos examinado las legionelas de las fuentes hídricas con una investigación aplicando marcadores convencionales, moleculares y las bacteriocinas tanto de las legionelas como de las bacterias que comparten hábitat con ellas, y llegando a analizar sus interacciones con la microbiota de los humanos, a nivel orofaríngeo y en otros nichos ecológicos acuáticos, incluidos los que representan los protozoos ambientales, entre los que se identificaron especies pertinentes a los géneros *Acanthamoeba* y *Hartmanella*, tanto en torres de refrigeración como en la red de agua caliente.

1. Las legionelas tienen muy limitada su inmunidad a las bacteriocinas que producen, en tanto que su espectro de actividad es más amplio. Una evaluación ecológica sugiere que el SG. 1 de *L. pneumophila* está mejor dotada ya que es un buen productor de bacteriocinas, y es muy resistente para una posible competición, sin excluir su recepción de señales.

2. El espectro antimicrobiano de las cepas seleccionadas, sugiere que las sustancias inhibidoras son distintas o que poseen mecanismos de acción diferentes, ya que la sensibilidad de los microorganismos indicadores empleados varía dependiendo de la cepa de *Legionella* estudiada. .

3. Existe una evidente relación entre la producción de bacteriocinas y la sensibilidad a las mismas, que no varía sólo entre las especies sino también entre los serogrupos de una misma especie y a su vez entre cepas pertenecientes a una misma especie pueden discriminarse por técnicas de bacteriocinotipia.

4. Un elevado porcentaje de bacilos gram-negativos pertenecientes a la microbiota acuática, producen bacteriocinas con actividad anti-legionela, capaces de impedir la formación de biofilms en su hábitat. La cloración y la elevación de las temperaturas en las torres de refrigeración, han hecho desaparecer esas bacterias que anteriormente antagonizaban a las legionelas. Esta barrera microbiológica, de enterobacterias, aeromonas, pseudomonas, etc, ha sido eliminada con los métodos de desinfección (cloración), lo que permite que las legionelas se multipliquen y lleguen incluso a desarrollar biofilms.

5. Todavía resulta problemático demostrar la producción de bacteriocinas en condiciones naturales, contrastando que en periodos de sequía las colonizaciones de *Legionella* spp. Cuando un lago o una laguna entra en época de sequía y la periferia se deseca, provoca que el huésped natural de la legionela, en lugar de un protozoo o ameba vegetativa, pase a ser un quiste que favorece el crecimiento. Además estas legionelas pueden quedar también en hierbas acuáticas como el *Miryophillum spicatum*, donde también pueden quedar las legionelinas que condicionen las legionelas que puedan desarrollarse, o no, después.

6. Dada la baja densidad de microorganismos en el agua, resulta poco probable la lisis de las legionelas planctónicas (libres), pero el contacto con otras bacterias en los biofilms, pueden implicar fenómenos de competición.

7. El extracto de 16 cepas de *Legionella* spp. tratado con proteasas pierde totalmente su actividad inhibitoria demostrando que la sustancia es proteinácea:

7.1. Tiene un espectro antimicrobiano amplio que incluye BGP y BGN.

7.2. Tiene unas propiedades físico-químicas adecuadas para resistir tratamientos por calor y cambios de pH.

7.3. Poseen un tamaño molecular de alrededor de 14 kDa, que es superior al P.M. de otras bacteriocinas estudiadas en otros trabajos que tenían alrededor de 1,5-2 KDa.

8. Además de antagonizar el crecimiento de legionelas y otras bacterias, influyen también en las reacciones metabólicas de otras bacterias anulando por ejemplo la pigmentación o produciendo hemólisis, y la posible repercusión en la virulencia de algunas bacterias.

9. De las especies y serogrupos estudiados, sólo 11 cepas poseen inmunidad a las legionelinas estudiadas, en tanto que todas las cepas producían bacteriocinas aunque en un grado variable.

10. Se ha demostrado la posibilidad de estudiar estas bacteriocinas de legionelas con otras bacterias indicadoras pertenecientes a las especies *N. lactamica*, *N. sicca* y *E. faecalis*, distintas a las legionelas, facilitando así, el trabajo en el laboratorio, excluyendo el uso de medio BCYE- α .

Trabajo Fin de Máster

Claudia Sánchez

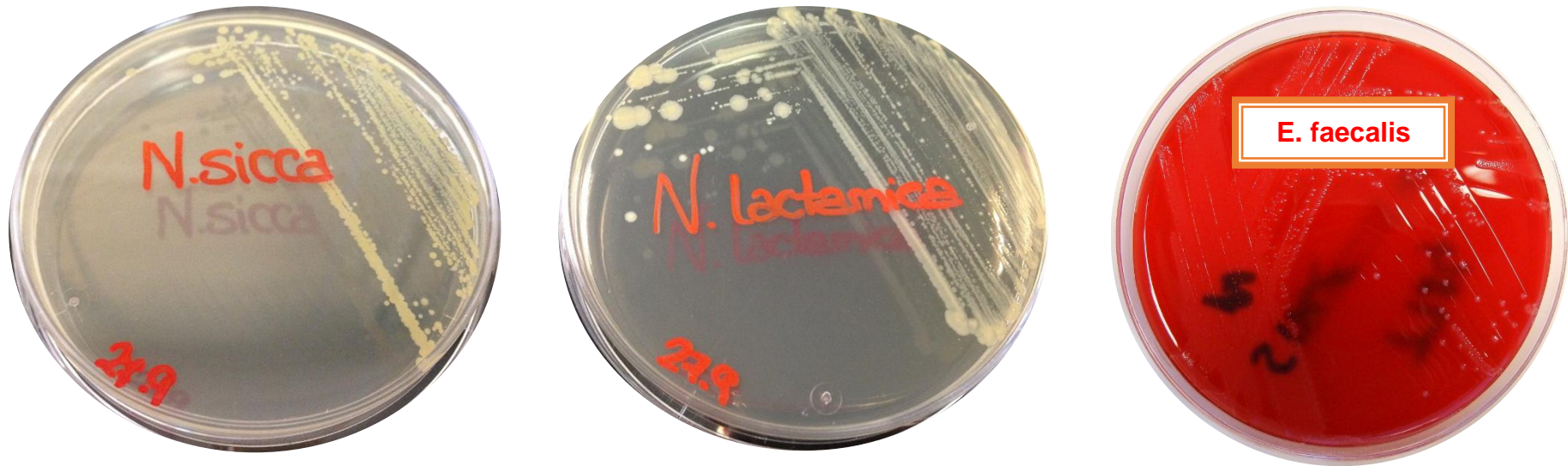
5. Anexos



Máster Salud Pública

Universidad de Zaragoza

ANEXO 1. Siembras por agotamiento de las principales cepas receptoras de laboratorio (*N. sicca*, *N. lactamica*, *E. faecalis*).



ANEXO 2. Actividad de *L.pneumophila* sg.1 (2 cepas), sg.8, sg.11, y sg.14, *L. maceachearnii* y *L. wadsworthii* frente a *L. jamestownensis*, como receptora



DISCOS.

1. *L. pneumophila* SG. 8
2. *L. pneumophila* SG. 14
3. *L. longbeachae* SG. 2
4. *L. pneumophila* SG. 1 (UZ4890)
5. *L. pneumophila* SG. 1 (UZ1289)
6. *L. pneumophila* SG. 11
7. *L. maceachearnii*
8. *L. wadsworthii*

ANEXO 3. Actividad de diferentes serotipos de *L. pneumophila* [#1,#5,#6,#7,#8,#9,#10#14], *L. anisa* , frente a *L. pneumophila* SG.1(Philadelphia).



DISCOS.

1. *L. pneumophila* SG. 1 (UZ1289)
2. *L. pneumophila* SG. 7
3. *L. pneumophila* SG. 8
4. *L. pneumophila* SG. 9
5. *L. anisa*
6. *L. pneumophila* SG. 14
7. *L. pneumophila* SG. 6
8. *L. pneumophila* SG. 10

ANEXO 4. Actividad de 2 cepas de Lpn1[UZ2189, UZ4890], Lpn SG.#7, #8, #9, #13, #14 y *L. jordanis** frente a *L. hackeliae* SG. 2.



DISCOS.

1. *L. pneumophila* SG. 13
2. *L. pneumophila* SG.1 (UZ2189)
3. *L. pneumophila* SG. 9
4. *L. pneumophila* SG. 8
5. *L. pneumophila* SG. 7
6. *L. pneumophila* SG. 14
7. *L. jordanis*
8. *L. pneumophila* SG. 1 (UZ4890)

ANEXO 5. Actividad antagonista entre *L. bozemanii* sg. 1, *L. bozemanii* sg 2 y *L. jordanis*.



1. *L. bozemanii* SG1:

doble inhibición por sí misma y por *L. bozemanii* SG.2.
 ¡¡¡Sinergia entre bacteriocinas de alto PM [halo pequeño] y bajo PM [halo grande]!!!

2. *L. bozemanii* SG. 2:

autoinmune, activa frente a *L. bozemanii* SG. 1 y *L. jordanis*, por bacteriocinas de bajo PM.

3. *L. jordanis*:

autoinmune, y sensible a *L. bozemanii* SG. 2, producen halo grande [bajo PM].

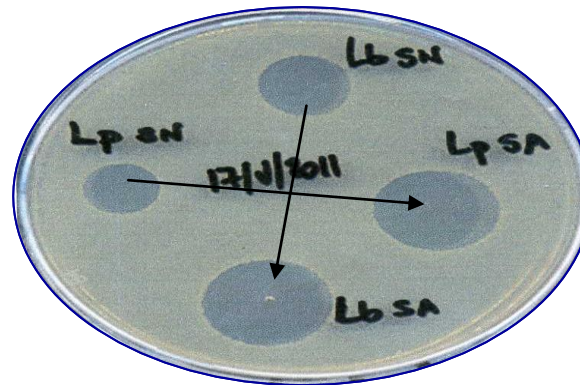
ANEXO 6. Idéntica actividad de 9 cepas de *Legionella* spp sobre 2 de *Stahylococcus aureus* [UZ68015 y ATCC25923] la primera de origen clínico y la segunda de origen ambiental



ANEXO 7. Actividad inhibidora de los Extractos Crudos [3 días en medio líquido, centrif. 10^4 y Fitar] *L. pneumophila* SG. 1 (#1-3) y *L. bozemanii* SG.2(# 4-7) vs *E. faecalis* 19433.



ANEXO 8. Tras la concentración de los extractos de *L.pneumophila* SG. 1(sn) y *L.bozemanii* SG. 2 (sn) incrementan los halos de inhibición.



ANEXO 9. Actividad de 8 cepas de *Legionella* spp frente a *Neisseria gonorrhoeae*



DISCOS.

1. *L. pneumophila* SG. 1 (Philadelphia)
2. *L. pneumophila* SG.1 (Knoxville)
3. *L. anisa*
4. *L. bozemanii* SG. 1
5. *L. micdadei*
6. *L. bozemanii* SG. 2
7. *L. pneumophila* SG. 5
8. *L. pneumophila* SG. 12

ANEXO 9. Póster publicado en Noviembre 2013 para las Jornadas del IUCA sobre las interacciones bacterianas de *Legionella* frente a otras especies.

ANEXO 9. Póster publicado en Noviembre 2013 para las Jornadas del IUCA sobre la caracterización del extracto enzimático crudo.

ANEXO 10. Abstract presentado en Noviembre 2013 para las Jornadas del IUCA sobre las interacciones bacterianas de *Legionell*.

ANEXO 11. Abstract presentado en Noviembre 2013 para las Jornadas del IUCA sobre la caracterización del extracto enzimático crudo.

ANEXO 12. Trabajo publicado en la Revista Española de Quimioterapia: Arquitectura evolutiva de las poblaciones de *Legionella* spp.

Trabajo Fin de Máster

Claudia Sánchez

6. Bibliografía



Máster Salud Pública

Universidad de Zaragoza

1. **Alvin Fox, Pauline Y. Iau, Arnold Brown, Stephen L. Morgan et al.** Capillary Gas Chromatographic Analysis of Carbohydrates of *Legionella pneumophila* and Other Members of the Family *Legionellaceae*. Departamento de Microbiology and Immunology, School of Medicine, Columbia, South Carolina 29201. 25 August, 1983. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar. 1984, p. 326-332.
2. **Baldassarri et al.** Enterococcus spp. produces slime and survives in peritoneal macrophages. *Med. Microbiol. Immunol* (2001). 190: 113-120. October, 2001.
3. **Bauernfeind A., Burrows J.R.** Suggested procedure allowing use of plastic petri dishes in bacteriocin typing. *Applied and environmental microbiology*, May 1978, p. 970.
4. **Claudia Valsangiacomo, Franca Baggi, Valeria Gaia, Tiziano Balmelli, Raffaele Peduzzi and Jean-Claude Piffaretti.** Instituto Cantonale Bacteriosierologico, CH-6904 Lugano, Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, July 1995, p. 1716-1719. April 1995.
5. **Contreras B.G., Vuyst L., Devreese B., Bysanyova K., Raymaeckers J., Bosman F., Sablon E., Vandamme E.J.** Isolation, purification, and amino acid sequence of lactobacin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG-13139. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63(1): 13.
6. **Corcuera, MT., Gómez-Lus, ML., Gómez-Aguado, F., Maestre, JR., Ramos, MC., Alonso, MJ., Prieto, J.** Morphological plasticity of *Streptococcus oralis* isolates for biofilm production, invasiveness, and architectural patterns. Available online at www.sciencedirect.com journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/aob>
7. **Corcuera, MT., Gómez-Aguado, F., Gómez-Lus, ML., Ramos, C., de la Parte M.A., Alonso, MJ., Prieto, J.** Qualitative and quantitative agar invasion test based on bacterial colony/biofilm. *Journal of Microbiological Methods* 94 (2013) 267–273
8. **Del Campo R., Tenorio C., Jiménez-Díaz R., Gómez-Lus R., Torres C., Baquero F., Pelaz C.** Bacteriocin production in Vancomycin-Resistant and Vancomycin-Susceptible *Enterococcus* Isolates of different origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Mar. 2001, p. 905-912.
9. **Díaz, R., Gamazo, C., López-Goñi, I.** Manual práctico de microbiología. Masson, S.A. Barcelona, 1995. 195.
10. **Filermans C.B.** Philosophical Ecology: *Legionella* in historical perspective 1984 Proceeding 2nd International Symposium on *Legionella*. ASM, Washington, D.C. 265-267.

10. **Flescher, A.R., Kasper, D.L., Modern, P.A., Mason, E.** *Legionella pneumophila*: Growth inhibition by Human Pharyngeal Flora. *J Infect Dis* 142, 313-317.
11. **Gálvez del Postigo A., Maqueda M, Martínez del Buen.** Las bacteriocinas ¿supervivencia del individuo frente a la especie? 1991. Monografías de la Universidad de Granada.
12. **Garduño R., Hoffman P., Garduño E., Hiltz M., Allan D.** Morphological and physiological evidence for a developmental cycle in *Legionella pneumophila*.
13. **Gómez-Aguado, F., Gómez-Lus ML., Alou, L., Alonso, MJ., Sevillano, D., Val, D., Palmeiro, A., Iglesias, N., Prieto, J.** Colonial architecture and growth dynamics of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. *Rev Esp Quimioter* 2009;22(4):224-227
14. **Gómez-Aguado,, F., Corcuera, MT., García-Rey, C., Gómez-Lus, ML., Ramos, C., Alonso, MJ., Prieto, J.** Invasion of solid culture media: a widespread phenotypic feature of clinical bacterial isolates. *Rev Esp Quimioter* 2013;26(1):34-38
15. **Gómez-Aguado, F., Alou,, L., Corcuera,, M.T., Sevillano, D., Alonso, M.J., Gómez-Lus, ML., Prieto, J.** Evolving Architectural Patterns in Microbial Colonies Development. *Microscopy Research and Technique*. 74:925-930 (2011)
16. **Gómez-Lus M.L., Corcuera M.T., Gómez-Lus R., Sánchez-Serrano C., Gómez-Aguado F., Alonso M.J., Prieto J.** Dinámica estructural de colonias/biofilm de *Legionella pneumophila* y *Legionella bozemanii*. *Rev. Esp. Quimioter*. 2013 26(3). 241-219.
17. **Gómez-Lus, R., Gómez-Lus, M.L., Abarca, M.S., Durán, E., et al.** *Legionella pneumophila* inhibition by bacteriocins produced by environmental and clinical isolates of pseudomonas species. Department of Microbiology. University Hospital N.I.H. Zaragoza, Spain. 227. pag. 104.
18. **Gómez-Lus, ML., Gómez-Aguado, F., García-Rey, C., Corcuera, MT., Ramos, C., Prieto, J.** Comparative spatio-temporal evolving histology of *Staphylococcus aureus* and *staphylococcus epidermidis* colony/biofilm. *Cell Biology, ACB*, 1(1), November 2012 (38-46).
19. **Gómez-Lus R., Pelaz. C, Rubio C.** et al. In vitro antagonistic activity among clinical and environmental *Legionella spp* Straits showing inter- and intraespecific differences. Abstract Book P87, pp.121. 7nd International Congress LEGIONELLA 2009, PARIS 13-17, oct. 2009.

20. **Gómez-Lus, R., Rubio, C., Lomba, E., Tovar, O., Goñi, P., Castillo, J., Clavel, A.** Actividad de las bacteriocinas de *Pseudomonadaceae*, *Aeromonadaceae* y *Enterobacteriaceae* frente a cepas clínicas y ambientales del género *Legionella*. Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza.
21. **Gómez-Lus R., Gómez-Lus M.L., Abarca M.S., Durán E., García C., Rezusta A., Rubio M.C.**, 1987. *Legionella pneumophila* inhibition by *pyocins* produced by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Program Abstr. 3rd Eur. Congr. Clin. Microbiol. The Hage, The Netherlands, Astr.. 227.
22. **Gómez-Lus, R., Lomba E., Gómez-Lus P., Abarca M.S., Gómez-Lus S., martínez A., Durán E., García C., Rubio M.C.** In vitro antagonistic activity of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Aeromonas spp* against *Legionella spp*. En J.M. Barbaree, R.F. Reimann y A.P. Dufour (Ed.) *Legionella: Current status and emerging perspectives*. Proceeding of the 4th International Symposium on *Legionella*. ASM, Washington, D.C. 265-267.
23. **Gómez-Lus R.** La salud de las aguas. El agua: la contaminación de la “fuente de vida” y mecanismos de control. Programa de “Genética, Medio ambiente y Sociedad”. Fundación Genes y Gentes.
25. **Gómez-Lus, R., Gómez-Lus M.L., Rubio M.C.** 1987. *Legionella pneumophila* inhibition by *piocins* produced by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Program Abstr. 3rd Eur. Congr. Clin. Microbio. The Hage, The Netherlands, Abstr.. 227.
26. **Gómez-Lus R., Lomba, E., Gómez-Lus. P et al** *Legionella: Current status and emerging perspectives*. Proceeding 4th International Symposium on *Legionella*. ASM, Washington, D.C. 265-267. 1992
27. **Gómez-Lus, R., Pelaz, C., Rubio, C., et al.** In vitro antagonistic activity among clinical and environmental *Legionella spp* Straits showing inter- and intraespecific differences. Abstract book P87, pp. 121. 7nd International Congress *LEGIONELLA* 2009, PARIS. 13-17. Oct. 2009.
28. **Gómez-Lus, R., Pelaz, C., Rubio, C., et al.** Cepas bacteriocinogénicas de *Legionella spp* (10 *L. pneumophila* y 18 especies distintas) valorando la relación producción/sensibilidad y su significado ecológico. I Jornadas del Instituto Universitario de investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA). Zaragoza. 10-12 de noviembre de 2009.
29. **Gómez-Lus, R.** Hallazgo de legionelas productoras de bacteriocinas, su capacidad inhibidora frente a ellas mismas y a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas: significado ecológico. I Jornadas del IUCA. JOBM 181.64-65

30. **Guerrieri E., Bondi M., Sabia C., de Niederhausern S., Borella P., Messi P.** Effect of Bacterial Interference on Biofilm Development by *Legionella pneumophila*. *Curr. Microbiol* (2008) 57:532-536. September 2008.
31. **Guerreri E., Moreno Bondi, Paola Borella, Patrizia Messi.** Influence of aquatic microorganisms on *Legionella pneumophila* survival. *New Microbiologica*, 30. 247-251; 2007.
32. **Hécharde Y., Ferraz S., Bruneteau E., Steinert M., Berjeaud J-M.** Isolation and characterization of a *Staphylococcus warneri* strain producing an anti-*Legionella* peptide. *FEMS Microbiology Letters* 252 (2005) 19-23.
33. **Heng NCK et al.** The diversity of bacteriocins in gram-positive bacteria. *Ecology and evolution*. P. 49. Riley MA Chavan MA (Eds) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007.
34. **JACOB F, LWOFF A, SIMINOVITCH A, WOLLMAN E.** Définition de quelques termes relatifs a la lysogénie. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1953 Jan;**84**(1):222
35. **Jantzen E., Sonesson A., Tangen T, Eng J.** Hydroxy-Fatty acid profiles of *Legionella* species: Diagnostic Usefulness Assessed by principal component analysis. *Journal of clinical microbiology*, June 1993, p. 1413-1419.
36. **Joshi A., Swanson M.** Comparative Analysis of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* virulence traits. *Infect. Immun.* 1999 August; 67:4134-4142.
37. **Kuiper, M., Wullings B., Akkermans, A., Beumer R., Kooij D.** Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in Aquatic Biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Applied and environmental microbiology*, Nov. 2004, p. 6826-6833.
388. **Lambert M.A., Moss W.** Cellular fatty acid compositions and isoprenoid quinone contents of 23 *Legionella* species.
39. **Lammertyn E., Valde Voorde, Meyen, E., Anée, J.** 2008. Evidence for the presence of *Legionella* bacteriophages in environmental water samples. *Microbial Ecology*. 191-197. Springer New York.
40. **Lattimer G., Ormsbee R.** **Legionnaires' Disease.** *Infectious diseases and antimicrobial Agents.* Marcel Dekker. New York.
41. **L.S. Clesceri, A.E. Greenberg, A.D. Eaton, M.A.H. Franson.** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA, AWWA, WEF. Eds. American Public Health Association. Washington, Dc 2005-2605. 20th Ed. 1998.

42. **Mahe W.E., Plouffe J., Para M.** Plasmid profiles of Clinical and Environmental Isolates of *Legionella pneumophila* Serogroup 1. Journal of clinical microbiology, Dec. 1983, p. 1422-1423.
43. **Mahe W.E., Plouffe J., Para M.** Subtyping of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates by monoclonal antibody and plasmid techniques. Journal of Clinical Microbiology, Dec. 1987, p. 2281-2284.
44. **Means, E.G., Olson B.H.** 1981. Coliform inhibition by bacteriocin-like substances in drinking water distribution systems. Appl. Environ. Microbiol. 42, 506-512.
45. **Muriana P.M., Klaenhammer T.R.** Purification and partial characterization of lactacin F., a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. Appl. Environ. Microbiol. 1991, 57 (1): 114.
46. **Mustapha M. Samrakandi, Suat L. G. Cirillo, [...], and Jeffrey D. Cirillo.** Genetic and phenotypic between *Legionella pneumophila* Strains.
47. **Orsini, M., Amore, R., Pietrangeli, BM., Anastasi, D., Ricciardi, W., Boccia, S.** Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for *Legionella pneumophila* typing. Italian journal of public health. Volumen 5, número 2, 2008. 143-148.
48. **Portnoy D., Moseley S.L., Falkow S.** Characterization of plasmids and plasmid-associate determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. Infection and immunity, Feb. 1981, p. 775-782.
49. **Robredo B., Olarte I., Torres, C.** Bacteriocin production by clinical *Staphylococcus* isolates. Rev. Esp. Quimioterap. Septiembre 2002; Vol 15 (Nº3); 272-274.
50. **Rowbotham, T.J.** 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J Clin Pathol 33, 1179-1183.
51. **Snelling W., Moore J., McKenna J., Lecky D., Dooley J.** Bacterial- protozoa interactions; an update on the role these phenomena play towards human illness. Disponible en www.sciencedirect.com. October 2005.
52. **Swanson M., Fernández-Moreia E.** A microbiol strategy to multiply in macrophages: the pregnant pause. Department of microbiology and immunology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor; MI 48109-0620, USA. Traffic 2002; 170-177.

53. **Thacker L., McKinney R., Moss W., Sommers M., L. Spivack, O'Brien T.** Thermophilic Sporeforming bacilli that mimic fastidious growth characteristics and colonial morphology of *Legionellae*. Journal of Clinical Microbiology, Apr. 1981, p. 794-797.
54. **Tovar-Aguirre, O.L.** Aislamiento e identificación de amebas de vida libre en el sistema de agua del hospital clínico universitario "Lozano Blesa" y su interrelación con *Legionella pneumophila*. Tesis Doctoral. Dpto. Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública. Zaragoza. Nov., 2006.
55. **Wingender, J., Flemming H-C.** Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. International Journal of Hygiene and environmental health 214 (2011) 417-423.
56. Legionelosis. Situación en la Comunidad Autónoma de Aragón. Sección de vigilancia Epidemiológica. Dirección General de Salud Pública. 12 de marzo de 2013.
57. **Corrección de errores de la Orden de 1 de marzo de 2004**, del Departamento de Salud y Consumo, por la que se establecen medidas referidas al censo de instalaciones, aparatos y equipos en relación con la legionelosis.
58. **DECRETO 136/2005**, de 5 de julio, del Gobierno de Aragón, por el que se establecen medidas especiales para la prevención y control de la legionelosis.