

This is an Accepted Manuscript of the article published by Elsevier: García-Núñez M, Sabria M. Epidemiología molecular de Legionella. Med Clin (Barc). 2002;119(Suppl 2):S64–7.

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE *Legionella*

MARIAN GARCIA-NUÑEZ. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Germans Trias i Pujol.

Correspondencia: Marian Garcia-Núñez. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. Crta. Canyet s/n. 08916. Badalona (Barcelona). E-mail: cis@ns.hugtip.scs.es

INTRODUCCIÓN

El género *Legionella* comprende aproximadamente 42 especies (1), al menos 20 de ellas se han relacionado con patologías infecciosas en humanos, siendo *Legionella pneumophila* el responsable principal de la mayoría de los casos de legionelosis, gran parte de los cuales pertenecen al serogrupo 1 y al mismo tiempo es el que con más frecuencia se aísla a partir de reservorios ambientales.

Los clones de *Legionella* aislados de muestras clínicas o ambientales en el transcurso de un brote, tienen que ser analizados para identificar la posible fuente de contagio y poder establecer una asociación epidemiológica. La ubicuidad de *Legionella* spp. en ecosistemas acuáticos, tanto naturales como artificiales, dificulta establecer el nexo epidemiológico entre los clones aislados de muestras clínicas y los procedentes de muestras ambientales. Debido a esto, y asumiendo que todas las cepas de esta especie tienen que ser consideradas *a priori* como potencialmente patógenas, el discernir cuales pertenecen a una misma población clonal nos obliga a aplicar sistemas de tipificación epidemiológicos.

Las primeras investigaciones dirigidas al confrontamiento de cepas clínicas y ambientales de *Legionella* se basaron en la determinación del serogrupo (2). Cuando se hizo evidente que la mayoría de los aislados pertenecían al serogrupo 1, la importancia del serogrupo dejó de ser un marcador epidemiológico pasando a ser un carácter taxonómico (de igual manera pasó con la determinación de ácidos grasos mediante cromatografía o el patrón de carbohidratos).

Este capítulo describe brevemente las técnicas más habituales disponibles para el tipado molecular de *Legionella* y se discute su efectividad.

DEFINICIONES

Un término importante a tener en cuenta es el de “*aislado bacteriano*”, que define una población de células obtenidas en cultivo primario y es identificado a nivel de especie.

Cuando se obtiene más información de la naturaleza del aislado específico, el aislado se transforma en “*cepa*”. Una cepa es un aislado o un grupo de aislados que muestran caracteres que son diferentes de otros aislados pertenecientes a la misma especie.

Un “tipo o subtipo” se define como un grupo de marcadores manifestados por una cepa frente a la aplicación de un sistema de tipado particular.

Finalmente el concepto de “clon”, desarrollado por Tenover (3), hace referencia a aquel grupo de aislados o cepas descendientes de una antecesor común.

MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN

Se han utilizado diferentes métodos para distinguir los clones de *Legionella* spp. en estudios epidemiológicos. Estos sistemas de tipificación se clasifican en: *técnicas fenotípicas*, basadas en la detección de características expresadas por el microorganismo y, *técnicas genotípicas*, a partir del análisis de DNA cromosómico y/o elementos genéticos extracromosómicos.

TÉCNICAS FENOTÍPICAS

Los métodos de tipificación que analizan las diferencias fenotípicas (Tabla 1) definen las características bioquímicas, inmunológicas o proteicas de los aislados microbianos. Estas técnicas tienen el inconveniente de que la expresión génica

bacteriana puede quedar alterada en respuesta a diferentes estímulos ambientales. Además, la existencia de mutaciones aleatorias puede suponer una disfunción génica de algún fenotipo particular induciendo a posibles errores en la tipificación fenotípica.

Sistema de tipificación	T	R	D	I	FR	Referencia
Serotipado	Parcial	Buena	Poca	Buena	Excelente	4-7,27
Electroforesis de proteínas	Todas	Buena	Regular	Regular	Regular	5,8
Inmunoblotting	Todas	Buena	Buena	Regular	Regular	5
MLEE	Todas	Excelente	Buena	Excelente	Buena	9,10

T, proporción de cepas tipificables; R, Reproducibilidad; D, poder de discriminación; I, Fácil interpretación, FR, Fácil de realizar

Tabla 1. Características de los sistemas de tipificación fenotípicos.

TIPIFICACIÓN CON ANTICUERPOS MONOCLONALES. SEROTIPADO

Se han desarrollado diferentes paneles de anticuerpos monoclonales (4) que aprecian diferencias antigénicas menores expresadas en la superficie celular bacteriana. Se trata pues, de una técnica relativamente simple y rápida que, en modalidad de microinmunofluorescencia, puede aplicarse directamente sobre los microorganismos aislados. No obstante, la técnica no siempre resulta suficientemente discriminatoria, y un segundo método de tipificación es necesario para identificar los clones epidémicos de *Legionella*.

Algunos autores sugieren que los epítomos relacionados con el subtipo Pontiac podría ser un marcador de virulencia (5-7) al observar que los aislados clínicos mayoritariamente eran Pontiac (Mab 2-positivo) mientras que los aislados ambientales eran Bellingham y OLDA.

TIPIFICACIÓN POR ELECTROFOREIS DE PROTEINAS E INMUNOBLOTTING

Las variaciones de las proteínas bacterianas expresadas por los clones de *Legionella* pueden utilizarse como marcadores moleculares cuando se analizan separándolas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Los patrones proteicos resultantes pueden ser detectados directamente por tinción o

bien indirectamente por la preparación de inmunoblots. Alternativamente si las proteínas se radiomarcaban internamente, el patrón puede ser detectado por autoradiografía.

Se trata de un método relativamente simple y de fácil realización. No obstante, los patrones detectados son complejos, las comparaciones entre muchos clones pueden ser difíciles, y la relevancia de pequeñas diferencias es incierta. Las imágenes asistidas por programas informáticos y análisis numéricos pueden facilitar estos estudios. Los efectos de factores técnicos como la extracción y las condiciones de crecimiento bacteriano no han sido definidos completamente.

Habitualmente no se utilizan como un método de tipificación aunque esta técnica ha sido efectiva en el estudio del perfil de proteínas de membrana externa (MPO) (8) siendo útil en estudios epidemiológicos (5).

ANALISIS MULTIENZIMATICO POR ELECTROFORESIS. ELECTROFORESIS ENZIMÁTICA MULTILOCULAR. MLEE. ESTUDIO DE ISOENZIMAS

Se basa en el análisis de las variantes electroforéticas de un conjunto de enzimas (isoenzimas). Las diferencias en la secuencia polipeptídica que producen cambios en la carga pueden demostrarse por las diferentes movilidades en una matriz de almidón.

El análisis de estas variantes se ha utilizado para la caracterización de poblaciones clonales de *L.pneumophila* (9,10). Es un método altamente discriminatorio entre clones pero es muy laborioso y especializado y por lo tanto, tiene una aplicación relativamente limitada a estudios epidemiológicos.

TÉCNICAS GENOTÍPICAS

Los métodos de tipificación genotípicos se basan en los ácidos nucleicos como origen de polimorfismos bacterianos. Incluyen el análisis de plásmidos, análisis de DNA cromosómico con endonucleasas de restricción (ER), fingerprinting con sondas de DNA y tipificación con Reacción en Cadena de la Polimerasa (Tabla 2). El desarrollo de estas técnicas ha reducido el uso de los métodos fenotípicos. La gran

ventaja de los análisis genotípicos es la estabilidad relativa del genotipo bacteriano frente al fenotipo. Estos métodos están dotados de un elevado grado de sensibilidad y especificidad, y pueden contribuir notablemente con gran exactitud a establecer relaciones epidemiológicas.

Sistema de tipificación	T	R	D	I	FR	Referencia
Tipificación por plásmidos	Parcial	Buena	Pobre	Buena	Buena	5,11-14
REA	Todas	Buena	Buena	Pobre	Buena	15,16
Ribotyping, Southern Blotting	Todas	Excelente	Regular	Regular	Regular	18-20
PFGE	Todas	Excelente	Excelente	Excelente	Buena	21,13,29
Rep- PCR	Todas	Pobre	Buena	Buena	Buena	23
RAPD - AP-PCR	Todas	Normal	Normal	Buena	Buena	13,22,24, 25, 29
IRS-PCR	Todas	Excelente	Buena	Buena	Buena	27
AFLP	Todas	Excelente	Buena	Excelente	Buena	13,26,29

T, proporción de clones tipificables; R, reproducibilidad; D, poder de discriminación; I, Fácil Interpretación; FR, Fácil de realizar.

Tabla 2. Características de los sistemas de tipificación genotípicos.

ANÁLISIS DE PLÁSMIDOS

La determinación del contenido plasmídico total para comprobar la naturaleza clonal de diferentes microorganismos fue uno de los primeros métodos en que se basó la epidemiología molecular. Los plásmidos son moléculas de DNA autónomas transmisibles y extracromosómicas que son fácilmente extraíbles de las células pudiéndose separar por tamaño mediante electroforesis. Debido a que pueden existir diferentes plásmidos del mismo peso molecular es necesario recurrir al uso de ER para verificar la identidad de los clones.

La demostración de que algunas cepas de *Legionella* eran portadoras de plásmidos (11,12) estimuló la posibilidad del uso del perfil plasmídico como marcador epidemiológico. En clones aislados de *L. pneumophila* sg 1 geográficamente diferentes se ha revelado la presencia de diferentes patrones plasmídicos (5). A pesar de ello, hay que tener en cuenta que una proporción variable de clones de origen clínico (60-80%) no contiene plásmidos, siendo estos elementos más frecuentes en las cepas de origen ambiental.

La capacidad discriminatoria del simple análisis no es adecuada para las investigaciones epidemiológicas prolongadas porque los microorganismos pueden perder o ganar plásmidos y transposones al ser expuestos a presiones selectivas en

el transcurso del tiempo. El análisis de plásmidos sería un método analítico apropiado para estudiar brotes epidémicos que de alguna manera estuvieran restringidos en el tiempo y en el espacio.

ANALISIS DEL DNA CROMOSÓMICO CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Al contrario de lo que sucede con el DNA plasmídico, que por su naturaleza puede sufrir modificaciones por ganancia, pérdida o reordenamiento de secuencias, el DNA cromosómico es más estable y su análisis constituye un elemento valioso para la caracterización de diferentes subtipos de *Legionella* (15,16).

El uso de ER ha supuesto una mejora en la identificación de clones específicos para conseguir el análisis del DNA genómico. Las ER cortan el DNA en secuencias específicas de reconocimiento llamadas secuencias diana. Las diferencias (polimorfismos) en el tamaño de los fragmentos de DNA generados por el tratamiento con ER son llamados *Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción o RFLP*.

En un análisis de restricción convencional (REA), el DNA cromosómico se aísla y digiere con la endonucleasa escogida que tiene un gran número de dianas de restricción, generando centenares de fragmentos con longitudes de ~0,5 a 50 Kb. Estos fragmentos se separan por tamaño en gel de electroforesis.

Se ha demostrado una elevada correlación entre los resultados obtenidos por este procedimiento y los derivados del estudio de isoenzimas. El poder discriminatorio de la técnica REA aumenta en función del número de ER utilizadas y de análisis cuantitativos por densitometría (16). Una de las limitaciones de la técnica es que los perfiles generados representan centenares de fragmentos difíciles de separar por la técnica clásica del gel de electroforesis. Consecuentemente, la comparación de diferentes clones es difícil.

RFLP Y SOUTHERN BLOT CON SONDAS DE ACIDOS NUCLEICS, INCLUYENDO IS FINGERPRINTING y RIBOTIPIFICACIÓN

El análisis de *RFLP* también puede asociarse con el análisis de sondas (18). Esto se consigue por la transferencia del DNA digerido en un gel de agarosa a una membrana de nitrocelulosa (denominada *Southern Blot*) donde los fragmentos de DNA se hibridan con sondas específicas marcadas.

El ribotipado (*Ribotyping*) se basa en el análisis de Southern blot en el que las cepas se caracterizan por su RFLP asociado al operón ribosomal. La ribotipificación se ha utilizado mucho para la caracterización y subtipificación epidemiológica de *Legionella* (18-20).

ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSANTE. PFGE.

La *electroforesis en campo pulsante* (PFGE) es un tipo especial de análisis de RFLP que permite separar fragmentos de DNA extremadamente grandes, de más de 5 Mb de longitud. En el PFGE, suspensiones de células bacterianas se sumergen en bloques de agarosa, se lisan *in situ*, y se digieren con ER de baja frecuencia. Los fragmentos resultantes se separan por electroforesis en un campo eléctrico donde las polaridades se invierten periódicamente. Este método produce pocos pero grandes fragmentos de DNA que se separan nítidamente en bandas resultantes de electroforesis. El análisis de PFGE se aplica a muchos estudios epidemiológicos en brotes de *Legionella* (21)(Foto 1).

Esta técnica es candidata como mejor técnica en epidemiología molecular ya que tiene un elevado poder discriminatorio y reproducibilidad. A pesar de esto, es un proceso largo y necesita un equipo especial la cual cosa hace que sólo algunos laboratorios la puedan realizar.

TIPIFICACIÓN BASADA EN TÉCNICAS EN PCR

El método de *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (PCR) en combinación con las técnicas detalladas anteriormente demuestran tener un gran potencial para la tipificación de los aislados bacterianos con propósitos epidemiológicos. Mediante PCR y un procedo rápido de extracción de DNA, a partir del crecimiento de una única colonia se puede subtipar en pocas horas. En cambio las otras técnicas

necesitan más masa bacteriana. Se han desarrollado numerosos protocolos de tipificación (22):

- *Rep-PCR*, RAPD y AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*) (22-25) se basa en el apareamiento aleatorio de cebadores de PCR (típicamente de 10 pb) no dirigidos contra un locus genético determinado que se hibridarán con suficiente afinidad y permitirán el inicio de la polimerización. Da como resultado mezclas complejas de producto de PCR que pueden ser traducidos en perfiles de DNA con la ayuda de geles de electroforesis.

No obstante, la reproducibilidad de la tipificación de estas técnicas es muy baja (23), debido a las condiciones de baja astringencia para facilitar el inicio de la reacción de polimerización, de manera que es difícil comparar diferentes análisis. Además, los perfiles genómicos son complejos y se tendrían de analizar mediante sistemas de análisis informáticos. Los resultados obtenidos no pueden ser guardados para futuras investigaciones epidemiológicas.

- *AFLP. Amplified fragment Length Polymorphism*. (26) Este método consiste en una simple reacción de restricción-ligación seguida de una amplificación de PCR. En un paso de reacción el DNA genómico se digiere con una enzima de restricción enzimático y los fragmentos generados se ligan a unos adaptadores construidos especialmente. Los fragmentos generados por este método son dianas a ser amplificadas mediante PCR con cebadores complementarios a los adaptadores. Los productos de PCR de gran tamaño se pueden separar y visualizar fácilmente mediante un gel de agarosa o poliacrilamida tiñendo con bromuro de etidio o plata. Es una técnica muy reproducible y permite establecer una librería de los diferentes subtipos genómicos tipados. Presenta ventajas en comparación con otros métodos de tipificación por PCR ya que es más versátil y reproducible que la AP-PCR ya que esta se realiza en condiciones óptimas para la unión de los cebadores.

Este sistema al acoplarse a un sistema de detección automática de fluorescencia por láser (13) mejora la definición del tamaño de los fragmentos y mejora la detección de los fragmentos pequeños que se tiñen débilmente con bromuro de etidio en geles de agarosa.

- *IRS-PCR. Infrequent-Restriction-Site PCR* (27), se basa en los mismos principios que el anterior. Consiste en una doble digestión del DNA genómico con una ER de baja frecuencia y una endonucleasa de alta frecuencia, seguido por una amplificación de DNA con cebadores y adaptadores diana a las extremidades de los

fragmentos generados. Los productos de PCR se pueden separar en un gel de agarosa convencional fácilmente ya que son pequeños (100-110 bp). Tiene una buena reproducibilidad.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

La variación en la metodología ha ido cambiando a lo largo del tiempo a medida que nuevas técnicas en epidemiología molecular han ido apareciendo. Actualmente, las nuevas estrategias se dirigen a la amplificación y secuenciación de genes en base a su polimorfismo de restricción o longitud variable de los productos de PCR.

La tecnología de secuenciación de DNA, ha revolucionado la microbiología en general ya que permite secuenciar el genoma entero. Esto facilita la identificación de nuevas secuencias diana para tipar. La técnica "*Multilocus Sequence typing*" (MLST) es un ejemplo. Esta técnica es una variación de MLEE donde diferentes genes se comparan simultáneamente a nivel de secuencia, permitiendo caracterizar las cepas en base a su diversidad alélica. Los primeros ejemplos de esquemas de esta técnica se están empezando a conocer (28), muestra una excelente correlación con los datos obtenidos mediante el análisis con AFLP.

CONCLUSIONES

La importancia de este capítulo es reflejar los múltiples métodos moleculares utilizados en la epidemiología de *Legionella* spp. (tablas 1 y 2). Todos estos métodos se han comparado en muchas revisiones (13,29). La mayoría han probado su utilidad pero muchos son inadecuados para el uso general del laboratorio. Todas las pruebas mencionadas van encaminadas a una precisa identificación de clones epidémicos de *Legionella* spp. y a su vinculación con un reservorio específico. En general todas resultan de utilidad, aunque presentan diferentes grados discriminación y reproducibilidad (tabla 1 y 2), la cual cosa hace que a veces sea preciso recorrer a más de un método para conseguir una mayor exactitud en la identificación y apareamiento de clonas.

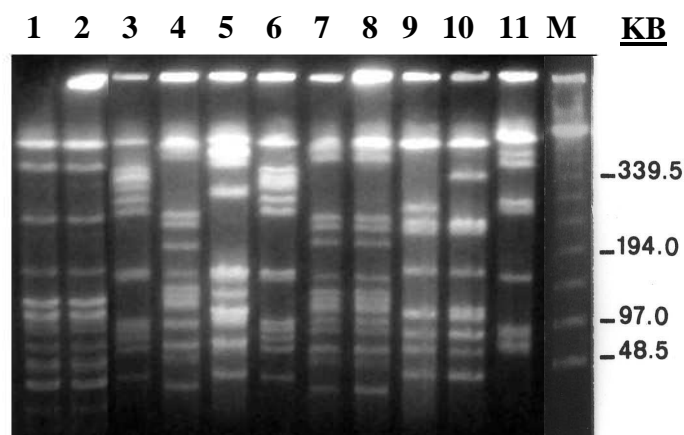
En general no se ha definido un proceso ideal en el campo de la legionelosis aunque en los últimos años las técnicas más introducidas han sido PFGE y AFLP, debido a su elevado poder de discriminación y su buena reproducibilidad. A pesar de ello, el PFGE es un proceso largo y sólo se puede realizar en centros que dispongan del equipo necesario. La *AFLP* es un método relativamente rápido, fácil de realizar y asequible en muchos laboratorios. Es una técnica que combina la discriminación, ofrecida por los métodos basados en enzimas de restricción, con la velocidad, ofrecida por los métodos basados en PCR. Se necesita muy poca cantidad de DNA genómico, 1-2 µg de DNA purificado. Permite ajustar el nivel de discriminación escogido por la enzima de restricción y cebadores para asegurar una buena reproducibilidad. También presenta ventajas técnicas respecto al MLEE y las técnicas de hibridación DNA-DNA, en particular, evita las tinciones delicadas de las enzimas en geles de almidón o las manipulaciones largas que suponen las extracciones de DNA, marcaje e hibridación.

La mayoría de métodos descritos anteriormente generan polimorfismos de DNA con un perfil de bandas muy complejo. La interpretación y agrupamiento de estos patrones es generalmente complejo, especialmente cuando se quieren comparar un gran número de patrones (tipos). Por ello, el acoplamiento de equipos informáticos para ayudar a la interpretación de los resultados es indispensable, aunque no son muy sencillos.

Por lo tanto, la elección de uno o varios métodos de tipificación está en función de la especie a tipificar, la infraestructura y de la experiencia del laboratorio que se enfrenta a estos problemas para *Legionella spp.*

Las propuestas basadas en las secuencias de DNA están actualmente recibiendo mucha atención y sin duda esta tecnología se irá implementando más frecuentemente en el campo de la tipificación epidemiológica microbiana. Probablemente provocará un cambio importante en el uso de las técnicas de tipado de *Legionella*

Foto 1. PFGE de DNA genómico digerido con *Sfi*I de diferentes aislados de *L.pneumophila* sg 1. Carriles: 1, aislado clínico hospital A; 2, aislado circuito agua potable hospital A; 3 Torre de Refrigeración hospital A; 4, aislado clínico hospital B, 5, Torre de Refrigeración nº1 Hospital B, 6, Torre de Refrigeración nº2 Hospital B, 7-8, circuito agua potable hospital B. 9-11 aislados ambientales no relacionados, M, Lambda DNA concatámeros.



BIBLIOGRAFIA

1. Benson RF, Fields FB. 1998. Classification of the genus Legionella. Sem Resp Infect.13(2):90-9.
2. Tobin JO'H.J Beare, MS Dunnill et al. 1980 Legionnaires'disease in a transplant unit: isolation of the causative agent from shower baths. Lancet 2:118-121.
3. Tenover FC, Arbeit RA, Goering RV et al.1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 33: 2233-2239.
4. Joly, J.R. R.M.MacKinney, J.O. Tobin, EW.F. Bibb. I.D. Watkins, and D. Ramsay. 1986. Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol.23:768-771.
5. Stout JE, Joly J, Para M, J Plouffe, C Ciesielski, MJ blazer and VL Yu. 1988. Comparison of molecular methods for subtyping patients and epidemiologically linked environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J Infect Dis 157;486-95.

6. Dournon E, Bibb WF, Rajagopalan P, Desplaces N, McKinney RM. 1988. Monoclonal antibody reactivity as a virulence marker for *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J Infect Dis 157:496-501.
7. Erhet E, Von Specht BU, Ruckdeschel G. 1986. Discrimination between clinical and environmental strains of *Legionella pneumophila* by a monoclonal antibody. Isr J Med Sci 22:715-723.
8. Lema M, Brown A. 1983. Electrophoretic characterization of soluble protein extracts of *Legionella pneumophila* and other members of the family of Legionellaceae. J Clin Microbiol 17:1132-40.
9. Selander RK, Cargant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, TS Wittman. 1986. Methods of multilocus enzymes electrophoresis for bacterial populations genetics and systematics. Appl Environ Microbiol 51:873-884.
10. Edelstein PH, C Nakahama, JO Tobin, K Calarco, KB Beer, JR Joly, RK Selander. 1986. Paleoepidemiologic investigation of Legionnaires disease at Wadsworth veterans administration hospital by using three typing methods for comparison of legionellae from clinical and environmental sources. J Clin Microbio 23,1121-1216
11. Knudson GB, O Mikesell, 1980. A plasmid in *Legionella pneumophila*. Infect Immun 29:1092-1095.
12. Mikesell P, Ezzell JW, Knudson GB. 1981. Isolation of plasmids in *Legionella pneumophila* and *Legionella* like organisms. Infect Immun 31:1270-1272
13. Jonas D, HG W Meyer, P Matthes, D Hartung, B Jahn, FD Daschner, B Jansen. 2000. Comparative evaluation of three different genotyping methods for investigation of nosocomial outbreaks of Legionnaires' disease in hospitals. J Clin Microbiol 38: 2284-2291.
14. Nolte FS, CA Conlin, AJ Roisin, SR Redmon 1984. Plasmids as epidemiological markers in nosocomial Legionnaires' disease. JID 149;251-256.
15. Pedro-Botet ML, M Sabria, L Espinosa, MJ Condom, y Carrasco M Foz. 1992. Utilidad de los marcadores epidemiológicos moleculares en el estudio de un brote epidémico de enfermedad del legionario de origen nosocomial. Med Clin (Barc) 99; 761-765.
16. VanKetel, R.J. J.Schegget, and H.C. Zanen. 1984. Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1. J. Clin. Microbiol. 20:362-364.

17. Saunders, N.A., T.G. Harrison, A. Hathjithotuwa, N. Kachwalla, and A.G. Taylor. 1990. A method for typing strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by analysis of restriction fragment length polymorphisms. *J. Med. Microbiol.* 31:45-55.
18. Bangsberg JM, P Gerner-Smidt, H Colding, NF Fiehn, B Bruun and N Hoiby. 1995. Restriction fragment polymorphism of rRNA genes for molecular typing of members of the family *Legionellaceae*. *J Clin Microbiol* 33:402-406.
19. Shoemaker D, T Heimberg G Birkhead. 1992. Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using pulsed-field gel electrophoresis for distinguishing *Legionella pneumophila* isolates obtained during a nosocomial outbreak. *J Clin Microbiol* 30; 1491-1498.
20. Gaia V, C Poloni and R Peduzzi. 1994. Epidemiological typing of *Legionella pneumophila* with ribotyping report of two clinical cases. *Eur J Epidemiol* 10;303-306.
21. M.Sabria, M.Garcia-Núñez, ML. Pedro-Botet, N.Sopena, , Presence of *Legionella pneumophila* . *Inf. Cont. Hosp. Epidem* (en prensa)
22. Welsh J and M McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18; 7213-7218.
23. Georghiou PR, AM Dogget, MA Kielhofner, JE Stout, DA Watson, JR Lupski, and RJ Amill. 1994. Molecular fingerprinting and differentiate isolates of *Legionella* species by repetitive element PCR. *J Clin Microbiol* 32; 2989-2994.
24. Tyler KD, G. Wang, S.D. Tyler and WM Johnson. 1997. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification –based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens *J Clin Microbiol* 35:339-346.
25. Bansal NS, F McDonell. 1997. Identification and DNA fingerprinting of *Legionella* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 35; 2310-2314.
26. Valsangiacomo C, F Baggi, V Gaia, T Balmelli, R Peduzzi, JC Piffaretti. 1995. Use of Amplified Fragment Length Polymorphism in Molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *J Clin Microbiol* 33; 1716-1719.
27. Riffard S, Lo Presti F, Vandenesch F, Forey F, Reyrolle M, Etienne J. 1998. Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and Pulsed-Field Gel

- Electrophoresis for epidemiological Typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J Clin Microbiol 36(1) 161-167
28. Gaia V and Peduzi R. 2002. Multilocus sequence typing for characterization of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates. Legionella. p.251-254. Ed by R Marre et al. ASM Press, Washington DC.
29. Fry NK, S Alexiou-Daniel, JM Bangsberg, S Bernander, CM pastoris, J Etienne, B Forsblom, V Gaia, JH Helbig, D Lindsay, PC Lück, C Pelaz, S Uldum, TG Harrison. 1999. A multicenter evaluation of genotypic methods for the epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 : results of a pan-European study. Clinical Microbiology and Infection. 5:462-477.