



**Universitat Autònoma
de Barcelona**



Departament de medicina

Programa de Doctorat: Medicina

Legionella pneumophila:

Tipatge molecular i descripció de diferències genotípiques i fenotípiques
entre aïllats relacionats amb casos de legionel·losis i aïllats ambientals

Tesi doctoral presentada per

Sara Quero Blanca

Tesis realitzada sota la direcció dels Doctors Miquel Sabrià i Marian García

Sara Quero Blanca

Doctoranda

Dr. Miquel Sabrià Leal

Director

Dra. Marian Garcia Núñez

Directora

Juny 2015

Miquel Sabrià, Catedràtic de la Universitat Autònoma de Barcelona i Cap de la Unitat de Malalties Infeccioses de l'Hospital Germans Trias i Pujol, i Marian Garcia, doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona i investigadora post-doctoral CIBER

CERTIFIQUEN

Que la tesi doctoral titulada "*Legionella pneumophila*: Tipatge molecular i descripció de diferències genotípiques i fenotípiques entre aïllats relacionats amb casos de legionel·losis i aïllats ambientals" ha sigut realitzada per Sara Quero Blanca sota la seva direcció i és apta per a la seva defensa pública davant d'un tribunal per a optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona

Dr. Miquel Sabrià Leal

Dra. Marian Garcia Núñez

Barcelona, Juny 2015

A mi familia

*La vida es una obra de teatro que no permite ensayos;
por eso canta, ríe, baila, llora y vive intensamente cada momento de tu vida,
antes que el telón baje y la obra termine sin aplausos
(Charles Chaplin)*

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	1
Antecedents històrics	1
Taxonomia	2
Característiques microbiològiques	3
Ecologia	4
Patogènia	7
Cicle cel·lular	7
Factors de virulència	10
Estudis proteòmics en la cerca de factors de virulència	13
Malaltia i Diagnòstic	14
Diagnòstic microbiològic per Cultiu de legionel·la.....	15
Detecció mitjançant anticossos	16
Detecció d'antigen en mostres d'orina	17
Detecció de material genètic	18
Tractament	20
Detecció en l'ambient	20
Tècniques de tipatge per Brots	21
Mètodes fenotípics	22
Mètodes genotípics.....	22
Noves metodologies.....	25
OBJECTIUS.....	27
MATERIAL I MÈTODES	31
Objectiu 1. Comparació de mètodes de tipatge en brots	33
Selecció de aïllats	33
Caracterització fenotípica d'aïllats per anticossos del Panell de Dresden	33
Electroforesis en camp polsant (Pulse-Field Gel Electrophoresis, PFGE)	34
Tipificació per Seqüenciació de loci (Sequence-based Typing, SBT).....	36
Interpretació de dades	38
Objectiu 2. Anàlisi de diversitat de poblacions	39
Selecció d'aïllats	39
Estudi comparatiu de diversitat poblacionals.....	39
Objectiu 3. Caracterització proteòmica	39
Selecció d'aïllats	39
Gels 2D-DIGE	40
Identificació de proteïnes.....	43

PCR quantitativa (qPCR)	45
Assajos enzimàtics.....	48
Anàlisis estadístiques per qPCR i assajos enzimàtics	50
Citopatogenicitat en cèl·lules “ <i>macrophages-like</i> U-937”	51
RESULTATS.....	55
Objectiu 1. Comparació de mètodes de tipatge en brots	57
Panell de Dresden	57
PFGE	59
SBT.....	59
Comparació del PFGE front SBT	60
Objectiu 2. Anàlisis de diversitat de poblacions.....	62
Panell de Dresden	63
SBT.....	64
Combinació SBT i Dresden	67
Anàlisis filogenètics de l’SBT	69
Objectiu 3. Caracterització proteòmica.....	70
Anàlisi del proteoma	70
Identificació i classificació de proteïnes.....	72
qPCR	76
Assajos Enzimàtics.....	77
Citopatogenicitat.....	78
DISCUSSIÓ.....	Error! No s'ha definit el marcador.
CONCLUSIONS	95
Objectiu 1. Comparació de mètodes de tipatge en brots	97
Objectiu 2. Anàlisis de diversitat de poblacions.....	97
Objectiu 3. Caracterització proteòmica.....	98
REFERÈNCIES.....	99
ANNEX.....	121
AGRAÏMENTS	125

INTRODUCCIÓ

Antecedents històrics

Legionella és l'agent causant d'una malaltia descoberta fa relativament poc com a conseqüència d'un brot de pneumònia en un hotel de Filadèlfia l'any 1976. Degut a que aquesta malaltia va afectar a ex-membres d'una legió americana que celebraven una convenció anual es va denominar malaltia del Legionari (en anglès Legionaire's Disease, LD). Aquest brot explosiu va causar 182 casos, dels quals 29 van ser mortals [1]. A partir dels estudis epidemiològics es va deduir la seva procedència però no es va trobar una font d'infecció concreta. Es va observar que no hi havia transmissió persona-persona i que la seva dispersió havia de ser per l'aire. No va ser fins més tard, examinant els sèrums de pacients i els espècimens dels teixits en la cerca del presumpte agent, que es va descobrir que es tractava d'un bacil gram-negatiu al que se li podrien atribuir altres brots de malalties respiratòries a on no es va arribar a identificar l'agent causant [2].

Després de la identificació del bacteri causant de la malaltia del Legionari com a *Legionella pneumophila* i constatar la capacitat dels pacients de produir anticossos en front a aquest, es van realitzar estudis retrospectius de casos i brots de pneumònia produïts durant la dècada dels 50 en el mateix hotel de Filadèlfia, en una planta envasadora de carn a Austin (Minnesota, USA) [3] i en un hospital psiquiàtric de Washington (USA) [4], en els quals no s'havia identificat l'agent etiològic [2,5]. A més també es va relacionar amb una malaltia febril no pneumònica produïda l'any 1968 a Pontiac (Michigan, USA) [6], la qual es va denominar pel seu origen Febre de Pontiac.

Ambdues malalties (Malaltia del Legionari i Febre de Pontiac) se les coneix globalment com a legionel·losis.

Degut a la dificultat de creixement d'aquest bacteri en medis de cultiu convencionals i a la seva presentació clínica sense un símptoma característic que la diferenciés de la resta de pneumònies, la malaltia va ser catalogada com a pneumònia atípica i considerada únicament en relació a brots comunitaris i nosocomials. A la dècada dels 90 el seu diagnòstic va augmentar gràcies a la incorporació d'una tècnica senzilla i sensible, la detecció d'antigen en mostres d'orina, i *L. pneumophila* va començar a ser considerat com un dels principals agents de pneumònia adquirida en la

comunitat.

La incorporació d'aquesta nova tècnica diagnòstica, ha ajudat a descriure brots de legionel·losis amb gran afectació de pacients com a Holanda en 1999 amb 133 casos confirmats [7] i a Melbourne (Australia) al 2000 amb 125 casos confirmats [8]. A Espanya també s'han descrit grans brots d'aquesta malaltia, com a Almuñécar l'any 1991 amb 91 casos [9], a Alcalá de Henares l'any 1997 amb 224 casos [10] i a Murcia l'any 2001 amb 449 casos confirmats [11], el brot amb més afectats que s'ha produït al món. A la regió de Barcelona també hi van haver grans brots importants d'aquesta malaltia com els brots de Barcelona de 1988 amb 56 casos i el de 2000 amb 56 casos [12,13], el brot de Mataró de 2002 amb 113 casos confirmats [14], el brot de Vic de 2005 amb 55 afectats [15] entre d'altres.

Amb l'augment de la incidència a Espanya d'aquesta malaltia, el Ministeri de Sanitat i Consum publicà el primer Real Decret de prevenció i control de la legionel·losis com a normativa bàsica de l'Estat (RD 909/2001 de 27 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis), que posteriorment va ser substituït pel RD 865/2003 del 4 de juliol amb el mateix enunciat (BOE, 2003a). A Catalunya es va escriure la normativa DOGC núm. 4185, 29.07.04 en el que s'estableixen els criteris d'actuació i normes específiques per en la prevenció i control de la legionel·losis. Tot i l'aplicació de les mesures de prevenció del RD i DOGC, aquesta malaltia continua sent un gran problema sanitari en el nostre país, veient-se reflectit en l'últim brot de Sabadell i Ripollet (Setembre-Novembre de 2014) amb 48 persones afectades.

Taxonomia

Legionella pneumophila és un bacteri gram-negatiu de l'ordre γ -Proteobacteria que pertany a la família *Legionellaceae* [5].

La família *Legionellaceae* consisteix en un únic gènere, *Legionella*, tot i que alguns investigadors van proposar dividir la família en 3 gèneres (*Legionella*, *Fluoribacter* i *Tatlockia*) [16]. Diferents estudis filogenètics del gen 16S ARNr van confirmar que la família *Legionellaceae* és un únic subgrup monofilètic dins de la subdivisió gamma-2 de

Proteobacteria [17,18]. A més, la relació d'ADN entre dos espècies de *Legionella* és com a mínim del 70 %, i segons el comitè ad hoc per la conciliació d'enfoc de la sistemàtica bacteriana [18,19], aquesta relació es dóna quan dos espècies pertanyen al mateix gènere.

Ara per ara, s'han descrit unes 57 espècies de *Legionella*, que comprenen més de 70 serogrups, aproximadament la meitat d'aquests han estat aïllades o detectades en mostres clíniques, però totes elles estan considerades com a potencials patògens humans [20,21]. *L. pneumophila* destaca com la causant del 90 % de les infeccions, i tot i que consta de 16 serogrups, *L. pneumophila* sg 1 és l'agent causant del 85 % del casos [22,23]. La infecció per altres soques del gènere *Legionella* s'ha descrit en pocs casos, possiblement per la seva raresa en l'ambient o per la falta de test diagnòstics adequats [24].

Característiques microbiològiques

Legionella és un bacteri aeròbic, Gram-negatiu, no formador d'espores. És un bacteri mòbil que posseeix un o més flagels polars [25], i en alguns aïllats primaris s'ha arribat a observar que posseïen fimbries [26]. *L. pneumophila*, l'espècie més estudiada, presenta un cicle cel·lular bifàsic en el que s'alterna entre un estat no-mòbil (fase replicativa) i un estat virulent i flagel·lat (fase transmissiva) [27] (Figura 2). El bacteri mostra un gran pleomorfisme, presentant una forma cocoide-bacil·lar (entre 0.3 a 0.6 µm per 3 µm), i/o filamentosa (entre 8 a 50µm), depenent de la temperatura, els nutrients o metabòlits disponibles, l'ambient de creixement (per exemple, dins d'una ameba) i el tipus de medi [2,28].

Encara que estructuralment és un bacteri gram-negatiu, amb paret bacteriana, membrana externa, polímer de peptidoglicà amb àcid m-diaminopimèlic i membrana externa, l'estudi d'àcid grassos de la paret cel·lular mostra que conté compostos poc habituals en bacteris gram-negatius com àcids grassos de cadena ramificada i ubiquinones (coenzim Q) amb 9-14 unitats d'isoprenoides a la cadena lateral, i baixa quantitat d'hidroxiàcids [29,30]. Aquesta composició dificulta la visualització del bacteri mitjançant la tinció de Gram. Com a alternativa a aquesta i amb millor resultats es pot

utilitzar la tinció de Giménez [31], la impregnació argèntica de Dieterle [32], o tincions de fluorescència utilitzant anticossos específics.

En relació al seu metabolisme, són bacteris quimiorganotròfics. La seva major font de carboni són els aminoàcids, però a falta d'aquests també es capaç d'utilitzar alguns glúcids com a font d'energia. Pel que fa a les proves bioquímiques, la reacció de l'oxidasa és variable, la reacció de la catalasa és dèbilment positiva, i la reducció de nitrats i la prova de la urea són negatives [33]. Moltes espècies produeixen beta-lactamasa i liqüen gelatina [34].

L. pneumophila va ser aïllada per primera vegada en medi d'agar Muller-Hinton suplementat amb hemoglobina i Iso VitalX (MH-IH) [35]. L'hemoglobina era necessària pel suplement de ferro, i el Iso VitalX proveïa l'aminoàcid L-cisteïna. Aquests refinaments van permetre el desenvolupament de l'agar Feeley-Gorman, el qual va permetre un millor aïllament de l'organisme a partir de mostres de teixit [35]. Més tard, el midó va ser substituït pel carbó actiu per a la detoxificació del medi, i la font d'aminoàcids va ser canviada per extracte de llevat [36]. L'agar amb extracte de llevat i carbó actiu és la base de molts dels medis utilitzats per al creixement de legionel·la. El medi utilitzat per al seu cultiu ha sigut millorat moltes vegades, finalment resultant en el medi utilitzat avui dia, un agar tamponat amb extracte de llevat i carbó actiu (*buffered charcoal-yeast extract* (BCYE)) enriquit amb àcid α -cetoglutàric i amb o sense agents selectius [36,37]. El seu creixement en condicions *in vitro* és relativament lent, necessitant com a mínim unes 72 hores per al seu creixement en placa. Encara que la majoria de *Legionella* spp. creix bé en agar BCYE, algunes espècies necessiten complementació amb albúmina de sèrum boví per incrementar el creixement [38].

L. pneumophila és un bacteri termotolerant. Tot i que la seva temperatura òptima de creixement és entre 36 i 37 °C, és capaç de multiplicar-se a temperatures entre 20 i 45 °C, de sobreviure de manera activa per sota de 20 °C i tolerar temperatures de fins a 65-70 °C [39,40].

Ecologia

Legionella spp. és un microorganisme comú d'hàbitats aquàtics naturals com rius,

llacs, rierols, estanys, aigües termals, i aigües superficials, i és part de la microbiota natural de l'ecosistema [41]. L'aigua és el major reservori per legionel·la, s'ha detectat en un 40 % d'ambients aquàtics naturals per cultiu i en un 80 % dels ambients naturals testats per PCR [42]. Com a excepció, algunes espècies com *L. longbeachae*, han sigut aïllades de terres humides, compost i terres de cultiu exposades a fertilitzants en Estats Units, Austràlia, i el Regne Unit [43,44]. Aquesta espècie és la causa principal de legionel·losis en Austràlia, sobretot a jardiners que estan exposats a les terres de cultiu comercials [45].

Els tres factors que influeixen en la propagació de la legionel·losis són primerament la presència del bacteri en l'ambient aquàtic, temperatura òptima pel bacteri i finalment la presència de factors nutricionals que permeten la proliferació d'aquest.

Aquest gènere s'acostuma a trobar a concentracions baixes en l'ambient. La exigència del requeriment nutricional *in vitro* de *L. pneumophila* [34,36] originalment va contradir el fet de l'aïllament del bacteri en un ambient amb poca quantitat de nutrients, altament competitiu i polimicrobià [19]. Ràpidament es va observar que la forma primària de sobreviure i replicar-se en l'ambient natural del bacteri era de forma paràsita en nombrosos gèneres de protozous com *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella* i *Tetrahymena*, i secundàriament com a vida lliure o associat a una biopel·lícula aquàtica. La seva associació amb amebes podria induir els fenotips virulents del bacteri, assistir en la disrupció, i donar protecció en condicions no favorables i a la presència de bactericides, com altes temperatures o grans dosis de clor [46].

S'ha demostrat que aquests bacteris són capaços de multiplicar-se en 14 espècies diferents d'amebes, en 2 espècies de protozous ciliats i una espècie de floridura de fang, mentre que el creixement de legionel·la en absència de protozous només ha estat documentat en el laboratori [42]. Els protozous es presenten naturalment en els ambients implicats en el focus d'infecció de la legionel·losis. Mentre que els protozous són hostatgers naturals de legionel·la, els humans són considerats hostatgers accidentals en el qual infecta i es replica dins dels macròfags alveolars. Molts dels coneixements de la patogènesis de legionel·la provenen de l'anàlisi del procés d'infecció tant de protozous com de cèl·lules humanes. Els estudis que contrasten el paper que els factors de virulència juguen en aquestes dues poblacions d'hostatgers

permet l'especulació de la transició del bacteri des de la relació obligada amb els protozous a la relació oportunista amb humans.

Legionel·la també pot sobreviure immers en biopel·lícules. En els estudis de detecció de *Legionella* en els sistemes de distribució d'aigua, aquest són detectats més fàcilment en hisops fregats per l'interior de la canonada que en el flux d'aigua, suggerint que la majoria de legionel·les estan associades a biopel·lícules [47]. Tot i sobreviure en les biopel·lícules, hi ha estudis que demostren que la proliferació del bacteri està condicionada a la presència de protozous, i que sense els seus hostatgers només era capaç de persistir i no replicar-se [48].

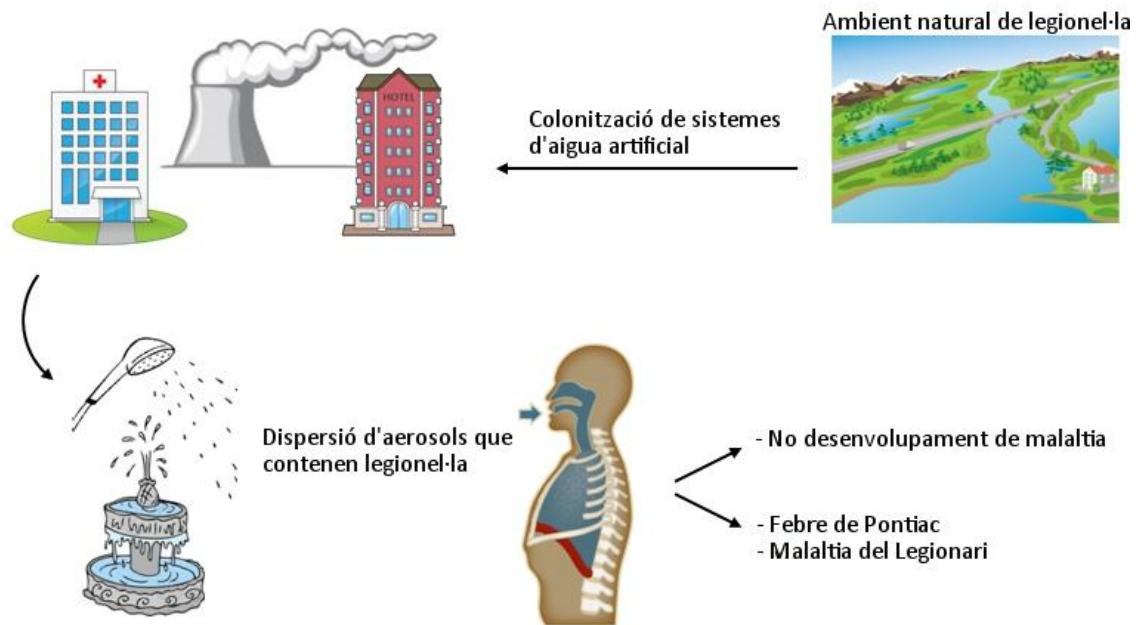


Figura 1. Cicle de transmissió de *Legionella*.

Des de l'ambient natural aquest bacteri pot colonitzar ambients aquàtics artificials com torres de refrigeració i sistemes d'aigua sanitària (Figura 1). La majoria de casos de legionel·losis s'originen a partir d'ambients aquàtics artificials, on les temperatures són més altes que en els ambients naturals. Aquests ambients alterats poden canviar el balanç entre protozous i bacteris, resultant en una ràpida proliferació de *Legionella*, el qual es pot traduir en malaltia humana. El risc de patir malaltia està associat a molts

factors com l'exposició al microorganisme, la virulència, la susceptibilitat de l'hostatger i la creació de gotes que continguin *Legionella* amb possibilitat de ser inhalades.

Els únics emplaçaments naturals associats amb la transmissió directa del bacteri són les fonts termals adaptades als banys, com els banys públics populars al Japó i Taiwan [49,50].

Patogènia

La ecologia i la patogènia de *Legionella* estan molt relacionades. Dos grans àrees d'assoliment del coneixement de la patogènia de *Legionella* són la caracterització del seu cicle de vida i la identificació de determinants de virulència per tècniques moleculars. En l'any 1980 es va descriure el cicle de vida *L. pneumophila* en amebes [51]. Uns anys més tard, s'observà que *L. pneumophila* també es multiplicava intracel·lularment en macròfags humans evitant la fusió del fagosoma amb el lisosoma [52]. Els processos d'infecció dels protozous i cèl·lules fagocítiques de mamífers per *Legionella* són similars, i utilitzen gens i productes gènics semblants [53]. S'ha postulat que la capacitat de replicació en l'interior de cèl·lules de mamífers és el resultat d'una prèvia adaptació a nínxols intracel·lulars com podrien ser els protozous.

L. pneumophila és un bacteri patogènic intracel·lular facultatiu, i la seva patogènesis està directament associada amb la seva capacitat d'envair i multiplicar-se en un gran nombre de cèl·lules eucariotes com fagòcits mononuclears, fonamentalment monòcits, macròfags alveolars humans i també en diverses cèl·lules epitelials i fibroblast humans i d'animals. Tot i això, no totes les espècies de *Legionella* són capaces d'infectar macròfags [54,55].

Cicle cel·lular

Els mecanismes de virulència de *L. pneumophila* són complexos i poc coneguts. No obstant això, s'han pogut caracteritzar algunes de les proteïnes que s'indueixen durant la replicació intracel·lular [56].

La interacció de *Legionella* amb les cèl·lules fagocítiques es pot dividir en 6 passos: 1) adhesió del microorganisme als receptors de superfície de les cèl·lules, 2) endocitosis i penetració del microorganisme en els fagòcits, 3) vacuolització i evasió de la via bactericida, 4) formació de la vacuola replicativa, 5) multiplicació intracel·lular, i 6) mort de la cèl·lula hostatgera i propagació del bacteri. A la Figura 2 es representa el cicle cel·lular de *Legionella*.

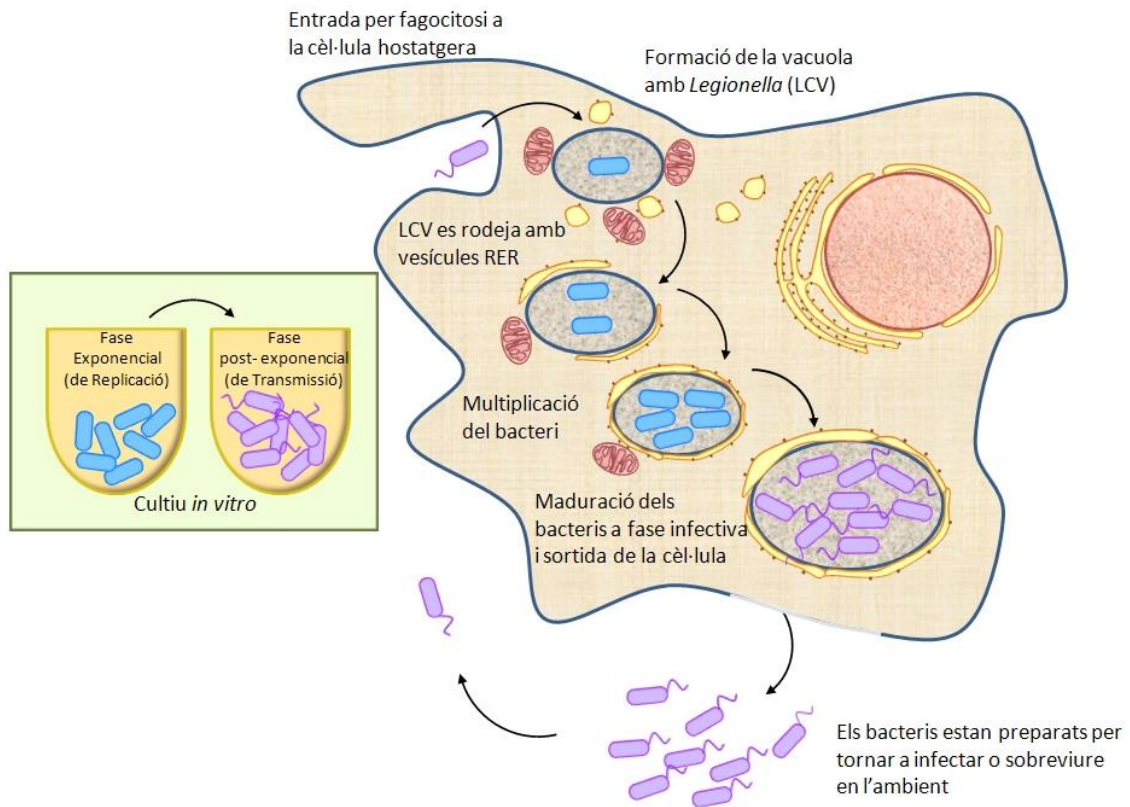


Figura 2. Representació del cicle cel·lular de *Legionella* en medi de cultiu i en cèl·lules fagocítiques.

Els macròfags alveolars fagociten a *Legionella* quan aquesta entra al pulmó de la persona afectada i els bacteris es mantenen intactes dins dels fagosomes. No es coneix amb exactitud el mecanisme d'entrada de *Legionella* en la cèl·lula. En la majoria dels casos, sembla que el bacteri és fagocitat per fagocitosis convencional. La fagocitosis en els monòcits humans és en part intervinguda pel sistema de tres components de receptors de complement CR1 i CR3, encara que el paper d'aquests receptors no s'ha determinat mai [57,58]. També s'ha observat que l'entrada pot ser per un mecanisme de fagocitosis en espiral (*coiling phagocytosis*) en diferents cèl·lules i amebes [59]. Els

fagosomes maduren normalment en les vacuoles a la via endocítica. Pel contrari, durant la fagocitosis, *Legionella* inicia una cascada complexa d'activitats que inclouen: inhibició de l'estrès oxidatiu, reducció de l'acidificació del fagosoma, bloqueig de la maduració del fagosoma i canvis en el tràfic d'òrgans. *L. pneumophila* ocupa una vacuola que és independent de la via endocítica. Aproximadament després de 4 a 6 hores de l'entrada a la cèl·lula hostatgera, el fagosoma que conté el bacteri està associat a vacuoles del reticle endoplasmàtic de la cèl·lula hostatgera. *L. pneumophila* evita els lisosomes i les vies endocítiques tradicionals utilitzant una nova via dins de la cèl·lula hostatgera [60]. No està clar quina proporció d'aquest mitjà d'entrada i evasió està dirigit pel patogen i quina proporció del mecanisme està sota el control de la cèl·lula hostatgera. Aquests processos permeten que les soques virulentes de *Legionella* puguin inhibir la fusió dels fagosomes amb els lisosomes i que transformin els fagolisosomes en un nínxol adequat per a la seva replicació en l'interior dels fagòcits [19,60,61].

El procés d'infecció de legionel·la en protozous i cèl·lules fagocítiques de mamífer és similar, tot i que s'han descrit algunes diferències entre ambdós processos. Microscòpicament, el procés és virtualment idèntic, encara que existeixen notables diferències en el mecanisme d'entrada i sortida de la cèl·lula hostatgera. El mètode d'entrada dels bacteris ha sigut descrit com fagocitosis en espiral i per fagocitosis convencional, tant en macròfags com amebes [62]. Com s'ha dit abans, l'endocitosis en macròfags pot ser dependent o independent a receptors de complement. En amebes *Legionella* s'uneix als filipodis (*hair-like projections*) [63], els quals són estructures d'adherència i els bacteris poden unir-se a aquestes de manera aleatòria. L'entrada per aquesta via no és un procés fagocític. Estudis amb inhibidors de metabolisme amb metilamina i citocalasina D han demostrat que *L. pneumophila* entra a *H. vermiformis* per una forma d'endocitosis mediada per receptor [64], i que la polimerització l'actina (component indispensable per a la fagocitosis), no és necessària per al procés d'infecció de *L. pneumophila* en *H. vermiformis*, però sí per a la infecció de les cèl·lules monocítiques U937 [65].

Una altra diferència entre l'entrada de *L. pneumophila* en cèl·lules fagocítiques humanes i *H. vermiformis* és el paper de les proteïnes de síntesi de les cèl·lules hostatgeres. *L. pneumophila* requereix de la síntesi de proteïnes de la cèl·lula

hostatgera per a la infecció de *H. vermiformis* però no per a infectar cèl·lules humanes U937 [66].

La etapa final del cicle d'infecció és la mort de la cèl·lula hostatgera i l'alliberament dels bacteris. En els macròfags i en les cèl·lules epitelials alveolars *L. pneumophila* indueix l'apoptosi, i a més en els fagòcits humans pot induir la necrosis per l'activitat de la formació de porus [67,68]. Pel contrari, la mort de l'ameba no s'ha associat amb l'apoptosi en els estudis que han utilitzat *Acanthamoeba castellanii* i *Acanthamoeba polyphaga*. En aquests organismes la sortida del bacteri i mort de la cèl·lula hostatgera es deu a la formació del porus [68,69].

El cicle cel·lular del bacteri s'ha relacionat amb les dos fases de creixement d'aquest. La forma replicativa s'ha relacionat amb la fase exponencial del bacteri en cultiu, a on els bacteris no són mòbils i tenen una paret arrugada amb una mica o sense hidroxipiruvat. La forma no-replicativa o infectiva, relacionada amb la fase post-exponencial i estacionària del cultiu, els bacteris són més petits, amb la paret llisa, mòbils i contenen nombroses inclusions de hidroxipiruvat. Aquestes fases del cicle de vida de *L. pneumophila* han estat caracteritzades, connectant un gran nombre de proteïnes expressades a cadascuna de les fases. L'esgotament dels aminoàcids a la cèl·lula hostatgera provoca una acumulació de 3',5'-bispirofosfat (ppGpp) [70], el qual està implicat en l'augment de factors de transcripció RpoS que estimularien l'expressió de gens de la fase estacionària. Les proteïnes descrites de la fase estacionària faciliten la infecció de noves cèl·lules hostatgeres i augmenta la citotoxicitat, la sensibilitat al sodi, la resistència osmòtica, la mobilitat, i són capaços d'evadir la fusió de fagosoma-lisosoma [60]. L'expressió de la proteïna del flagel també està relacionada amb la fase del cicle de vida del bacteri, la qual promou la proliferació intracel·lular encara que no és dependent d'aquesta [71,72].

Factors de virulència

No s'han definit de forma clara els factors biològics i immunològics individuals que fan d'intermediaris en la virulència de *Legionella*. Tot i així, l'anàlisi del procés

d'infecció en protozous i cèl·lules hostatgeres humanes han ajudat a identificar alguns dels factors que poden influir en la virulència del bacteri.

Les estructures de superfície de membrana són importants en la patogènia de *Legionella* [61]. L'adherència seguida de l'entrada del bacteri en la cèl·lula hostatgera és un pas essencial per a la infecció. Algunes proteïnes de superfície com el lipopolisacàrid (LPS), el flagel o el pili de tipus IV estan involucrades en l'adherència i entrada de *Legionella* en macròfags alveolars i protozous. Aquestes proteïnes inclouen, entre d'altres, a la proteïna principal de membrana externa (MOMP, *major outer membrane protein*), les proteïnes de xoc tèrmic (Hsp60, *heat shock protein 60*), la proteïna potenciadora de la infectivitat (Mip, *major infectivity potentiator*) i la toxina implicada en la formació del porus (RtxA, *pore-formation protein*).

El gen *mip* va ser el primer gen descrit associat a la virulència de *L. pneumophila*. Aquest codifica per una proteïna de 24 kDa de superfície (Mip) [73]. La proteïna Mip és una homòloga de la proteïna FK506 i té activitat *cis/trans*-peptidilprolil [74]. El producte gènic Mip és necessari per a la infecció en models animals, cèl·lules fagocítiques de mamífer i protozous, i va ser el primer gen que es va demostrar que estava involucrat en la patogènesis de tots dos hostatgers, mamífers i protozous [75]. El mecanisme d'acció encara és desconegut. Aquest gen també ha sigut detectat en les altres espècies de *Legionella* [76,77]. Es pensa que la proteïna Mip està conservada en tot el gènere [73], i inclús s'utilitza com a eina filogenètica per a la identificació de les espècies de *Legionella* [77] mitjançant seqüenciació d'aquest gen.

La proteïna MOMP és una porina que actua en la unió dels macròfags a través de component C3 del complement, i intervé en l'entrada del bacteri a la cèl·lula via receptors de macròfags de complement CR1 i CR3 [57]. No obstant, la fagocitosi de *L. pneumophila* també es pot dur a terme per un mecanisme independent de complement [78].

La toxina RtxA, que pertany a la família Rtx (*repeats-in-toxin*), participa en l'adherència, entrada del bacteri a la cèl·lula hostatgera, la formació del porus i en la supervivència intracel·lular [79,80].

Un altre aspecte important de la virulència de *Legionella* és la capacitat de secretar toxines i proteases destructores del teixit extracel·lular [81], que realitza mitjançant els sistemes de secreció tipus II i IV. El sistema de secreció tipus II és necessari per a un

creixement intracel·lular no restrictiu de *L. pneumophila* i per a la formació del pili tipus IV [82]. Mutacions en els gens que codifiquen per aquest sistema produeixen una disminució en la capacitat d'infectar macròfags, protozous i altres cèl·lules fagocítiques. Aquest sistema de secreció és similar al sistema de secreció PilBCD de *Pseudomonas aeruginosa* [83]. Els dos gens que han estat més extensivament estudiats en *Legionella* són *pilE* (*pilin protein*) i *pilD* (*prepilin peptidase*) [82,83]. La proteïna pilin, codificada per gen *pilE*, no és necessària per al creixement intracel·lular, però pot estar involucrada en la unió a la cèl·lula hostatgera. El gen *pilD* codifica per a una peptidasa preplin que és essencial per a la producció del pili i per a les proteïnes del sistema de secreció tipus II. Els mutants defectius del gen *pilD* perden la capacitat de multiplicar-se en cèl·lules U937, *H. vermiformis*, i en models animals [84] i tenen una activitat reduïda en la secreció enzimàtica [81]. Les proteïnes secretades que faciliten el creixement intracel·lular de legionel·la encara no estan identificades. Estudis recents han mostrat que el sistema de secreció tipus II està directament lligat amb el creixement en amebes, mentre que en cèl·lules humanes s'ha observat un mecanisme diferent *pilD*-dependent [85].

El sistema de secreció tipus IV es divideix en dos tipus: IV A i IV B. El sistema de secreció tipus IV A de *Legionella* es coneix també com a '*Legionella vir* homologue' (Lvh) i està relacionat amb el creixement intracel·lular del bacteri en macròfags i amebes, i a més, està implicat en la infecció de la cèl·lula hostatgera a 30 °C [86].

El sistema de secreció tipus IV B, conegut com Dot/Icm (*defective for organelle trafficking/intracellular multiplication*), codifica factors involucrats en l'assamblatge i activació de la transferència conjugal de plàsmids [60,77]. A més promou la infecció intracel·lular per diverses vies: primer, incrementa l'entrada de *L. pneumophila* en les cèl·lules hostatgeres [87]; segon, proporciona proteïnes durant la fagocitosis que desvien el fagosoma de la via endocítica per establir el nínxol replicatiu [88,89] i, finalment, el sistema Dot/Icm és important per a la apoptosi i regressió de la cèl·lula hostatgera [90–92]. Per tant, les mutacions en el *locus dot/icm* condueixen a una pèrdua de la virulència [93]. L'únic substrat que ha sigut identificat com a proteïna de sortida pel sistema Dot/Icm és DotA [94].

També s'han descrit altres *loci* que estan involucrats en el creixement intracel·lular de *Legionella*. Entre aquests estan *mak* (*macrophage killing*), *mil* (*macrophage-specific*

infectivity loci), i *pmi* (*protozoan and macrophage infectivity*) [53,95,96]. L'absència d'un d'aquests *loci* resulta en una disminució de la multiplicació intracel·lular de l'organisme o la completa inhibició del creixement intracel·lular. El mecanisme d'acció d'aquests gens és desconegut. Altres factors de virulència potencial inclouen citotoxines, proteïnes Hsp com la Hsp60 que augmenta la invasió en les cèl·lules epitelials [97], fosfolipases, LPS, components associats amb l'adquisició de ferro, i metaloproteases [60].

Estudis proteòmics en la cerca de factors de virulència

La majoria d'estudis per a la cerca de factors de virulència s'han realitzat mitjançant tècniques de mutagènesi i anàlisis transcriptòmics. Els estudis proteòmics de *Legionella* no són gaire extensos.

Els primers estudis de caracterització de proteïnes de *Legionella* es van enfocar en les proteïnes associades al peptidoglicà i en les proteïnes de membrana externa. Aquests estudis, realitzats en gels monodimensionals, van determinar la presència d'una proteïna en gairebé totes les soques de *Legionella* testades, la qual va ser determinada com MOMP) [98,99].

El primer proteoma de *Legionella* descrit mitjançant la tècnica 2D-PAGE va ser l'any 2005 per Lebeau [100]. A partir d'aquest moment, les anàlisis comparatives posteriors mitjançant la tècnica 2D-DIGE (2 Dimensions Difference gel electrophoresis) han descrit les proteïnes exposades a l'exterior i proteïnes de membrana externa, utilitzant fraccionament cel·lular [101], s'han identificat vies de transport de nutrients/elements i vies de reconeixement del bacteri-hostatger. També es va determinar per primera vegada, que en la fase estacionària de creixement de *Legionella* és on s'expressa el major nombre de determinants per a la infecció de l'hostatger [101].

En 2009, Shevchuk *et al* van comparar el proteoma de *Legionella pneumophila* i d'una altra espècie de *Legionella* menys virulenta quan es trobaven dins del fagosoma de *Dictyostelium*, i es van identificar les proteïnes implicades en la replicació i supervivència del bacteri dins del fagosoma tant de l'hoste com de l'hostatger [102].

Amb la premissa de Khemiri, el grup de Hayashi va descriure el proteoma de

legionel·la segons la fase de creixement en cultiu *in vitro* i va relacionar la fase post-exponencial del cultiu amb la fase de transmissió del bacteri [103], corroborant que en aquesta fase del cultiu el bacteri expressa els trets de virulència, és a dir, que era la fase on es prepara per infectar cèl·lules.

Per últim, s'ha descrit una comparació del proteoma de *Legionel·la* crescuda en biopel·lícula i crescuda en suspensió [104]. Segons aquest estudi, quan el bacteri es troba en biopel·lícula deixa d'expressar factors de virulència, i comença a acumular factors contra l'estrès oxidatiu per tal de protegir-se i poder sobreviure.

Malaltia i Diagnòstic

La legionel·losis, clàssicament es presenta com a dos entitats clíniques, la malaltia del Legionari (LD), una malaltia greu multisistèmica que causa una pneumònia, i la febre de Pontiac, una malaltia de tipus gripal autolimitada [1]. L'aspiració d'aigua que conté *Legionella* ha sigut suggerida com la principal ruta de transmissió [105], encara que la freqüència d'aquest fet no és clara.

La malaltia resultant pot manifestar-se com una malaltia febril caracteritzada per pneumònia i una possible bacterièmia [106]. *Legionella* spp., *Mycoplasma pneumoniae* i *Chlamydia pneumoniae* representen la branca atípica (per exemple, no *Streptococcus*) de patògens respiratoris no zoonòtics, responsables d'aproximadament el 28 % dels casos de pneumònia adquirida en la comunitat (AC) [107]. La majoria de casos de LD succeeixen a l'estiu i afecta més habitualment a homes majors de 50 anys que pateixen alguna malaltia pulmonar o immunosupressió [46]. Altres factors que incrementen el risc de patir infecció és el tabac, viatge recent, condicions mèdiques subjacents com diabetis, càncer, SIDA i l'etapa terminal de la malaltia renal [108,109], i potencialment, mutacions en els receptors humans Toll-like 6 (TLR6) [110].

Les presentacions clíniques i radiogràfiques de LD no són diferenciables d'altres formes de pneumònia més comunes [111]. Algunes característiques d'aquesta malaltia són febre, tos no productiva d'esput, mal de cap, miàlgia, rigidesa, dispnea, diarrea i deliris [112]. Encara que no hi ha un patró per a diferenciar la pneumònia per *Legionella* en una radiografia, es comú trobar infiltrats alveolars [113]. La clau per al

diagnòstic d'aquesta és realitzar els test microbiològics adients quan el pacient es troba en la categoria d'alt risc.

El processos de diagnòstic i administració de la legionel·losis requereix distincions metodològiques importants per a la identificació de *Legionella* spp., serogrup, i tipatge per a les investigacions epidemiològiques. Encara que complementaries, aquestes activitats relacionades tenen diferents objectius. Un tractament correctament informat per a la LD no precisa d'una discriminació a nivell de gènere, perquè totes les espècies de *Legionella* testades són sensibles als antibiòtics habitualment prescrits com els macròlids i les fluoroquinilones (azitromicina i levofloxacín), els quals són actius contra aquest i recomanats per les infeccions comunitàries i hospitalàries. Pel contrari que en les AC produïdes per *M. pneumoniae* o *Streptococcus*, no s'ha descrit una resistència adquirida per cap soca de *Legionella*, encara que existeix un estudi recent en el que un aïllat clínic té certa resistència a azitrimicina i ciprofloxacina fora del rang del fenotípic salvatge [46].

El diagnòstic de la legionel·losis es basa, en l'actualitat, en el cultiu de mostres respiratòries, immunofluorescència directa, serologia i detecció d'antigen en orina. Tot i existir gran varietat de tècniques que es poden dur a terme, és difícil establir certes dades epidemiològiques com són la incidència o la proporció de casos de la malaltia. Un dels motius és que cada una de les proves diagnòstiques presenta diferents valors de sensibilitat, de manera que la freqüència de la malaltia varia en funció de la prova utilitzada [114].

Diagnòstic microbiològic per Cultiu de legionel·la

El cultiu i l'aïllament continua sent la tècnica d'elecció ('gold standard') per a la detecció i diagnòstic de *Legionella* [19,46]. És l'únic mètode disponible que permet detectar infeccions causades per qualsevol espècie i serogrup de *Legionella* (aproximadament entre el 15 i el 20 % de les infeccions estan causades per diferents espècies i serogrup a *L. pneumophila* serogrup 1).

Les mostres clíniques potencialment cultivables són les que provenen del tracte respiratori o arbre bronquial [19,46]. Mostres menys convencionals per al cultiu són les

extrapulmonars com teixit tous, fluids de les articulacions, i sang [19,46]. D'entre totes les mostres cultivables, l'espüt és el més utilitzat, encara que un gran nombre de pacients presenten tos no productiva [19]. La sensibilitat de la detecció de *Legionella* per cultiu en mostres clíniques és molt variable, oscil·lant entre el 10 i el 80 %, i l'aïllament depèn del tipus de mostra tant com l'experiència de l'equip del laboratori [115]. *Legionella* pot créixer en varis tipus de medis de cultiu artificials complexes, però el més adequat per al seu creixement és el BCYE amb 0.1 % d'àcid α -cetoglutàric i L-cisteïna [36,37]. Molts dels aïllats mostren creixement després de 3 a 5 dies, però les espècies no-*L. pneumophila* poden necessitar temps d'incubació més llargs, a vegades fins a 2 setmanes [46]. Malgrat, els principals inconvenients d'aquesta tècnica, com són la baixa sensibilitat i el lent creixement del bacteri [19,116], la possibilitat d'obtenció dels aïllats dona grans avantatges permetent una bona caracterització i estudis epidemiològics exhaustius [117].

Els processos semiselectius poden incrementar l'aïllament de *Legionella* en presència de microbiota competitiva (tant en mostres ambientals com en clíniques). Aquests processos semiselectius són tractaments d'àcid i calor, i/o l'addició de glicina, polimixina B, cicloheximida, i vancomicina al medi de cultiu, ja que la majoria de legionel·les són resistents a aquests agents.

Detecció mitjançant anticossos

L'examen microscòpic de les mostres utilitzant tinció directa amb anticossos marcats amb fluorescència (DFA direct fluorescent antibody), va ser el primer mètode utilitzat per a la detecció de legionel·la en teixit pulmonar (de mostres d'autòpsies i biòpsies) i de les secrecions respiratòries. Legionel·la pot ser detectada en les secrecions respiratòries per immunofluorescència en dies posteriors a l'inici de la teràpia antimicrobiana. La sensibilitat del test DFA en secrecions respiratòries per al diagnòstic de la legionel·losis oscil·la entre el 25 i el 75 %, i l'especificitat és major del 95 % [118]. Comercialment existeix un anticòs monoclonal (Genetic System, Seattle, Wash.) que reacciona contra una proteïna de membrana externa que detecta tots els serogrupos de *L. pneumophila*, i que pot ser utilitzat en mostres clíniques [119]. Encara

que el DFA proporciona una metodologia ràpida per a la identificació de *Legionella*, el microscopi de fluorescència precisa d'un tècnic i s'hauria de fer en un laboratori amb personal experimentat en la metodologia.

Els test serològics d'immunofluorescència indirecta (IFA) per a la detecció d'immunoglobulina G (IgG) i immunoglobulina M (IgM) específics de *Legionella* va ser l'eina diagnòstica en les investigacions del brot de Filadèlfia [19], i un dels principals mètodes utilitzats per al diagnòstic de la legionel·losis a principi dels anys 1980 [120]. Des del brot de Filadèlfia, en el que es va utilitzar la immunofluorescència indirecta (IFI) per a la detecció del anticossos en els pacients afectats, s'han desenvolupat una gran varietat de probes per a detectar anticossos específics en mostres de sèrum, com assajos immunoenzimàtics (EIA) i microaglutinació, hemaglutinació indirecta i contraimmunoelctroforesis [19].

Encara que al principi la serologia va ser popular, la seva utilització ha disminuït significativament amb la estandardització del medi de cultiu i desenvolupament de tècniques més ràpides, com la detecció d'antigen en orina i mètodes moleculars [120]. Aquesta disminució de la seva utilització també va venir donada per la dependència de la seroconverció per al diagnòstic de la malaltia, ja que en certes condicions mèdiques com la immunosupressió no es dona l'augment de 4 vegades en el títol d'anticossos, tot i havent infecció [46]. La majoria dels tests serològics utilitzats en la Unió Europea es realitzen amb una única titulació de la fase convalescent, cosa que pot ser problemàtic també, perquè inclús abans de l'exposició del pacient a l'agent etiològic aquest pot presentar títols superiors a 1:256 [19,46]. Una gran llista d'estudis suggereixen que es poden detectar elevats nombres d'Ig entre 1 i 30 % dels individus sans, depenent de l'edat, localització, ambient de treball i ocasionalment el gènere [46].

Detecció d'antigen en mostres d'orina

El test de detecció d'antigen en orina permet un diagnòstic precoç, un inici ràpid del tractament [121] i a una intervenció ràpida dels serveis de vigilància epidemiològica [19]. L'anticòs de captura utilitzat en la majoria del assajos es considera específic de *L.*

pneumophila serogrup 1, per tant, depèn únicament d'aquest mètode per al diagnòstic de LD significaria la no detecció de legionel·losis causades per altres serogrupos i altres espècies detectables per cultiu. . Tot i això, actualment representa el 82 i el 97 % de les eines de diagnòstic utilitzades per a la confirmació de la legionel·losis en Europa i Estats units respectivament [46]. La popularitat i la ubiqüitat de la detecció d'antigen en orina està atribuïda a la seva rapidesa, el baix cost relatiu, un procediment senzill, la fàcil recollida de les mostres i la disponibilitat comercial.

Actualment, la prova de detecció d'antigen en orina de *Legionella* està disponible en varies cases comercials en 2 formats, com un immunoassaig enzimàtic (EIA) en plaques de 96 pous o ELISA, o bé com a test immunocromatogràfic (ICT). Els tests utilitzats habitualment són altament específics per *L. pneumophila* (entre el 95 i el 100 %) i una sensibilitat entre el 70 i 90 %, depenent de si la orina ha sigut concentrada artificialment. El test ICT és ràpid, simple i qualitatiu, mentre que el EIA és quantitatiu i pot oferir millors sensibilitats i especificitats, i és més adequat per a un gran nombre de mostres [122].

Les tècniques de detecció d'antigen en orina tenen una alta especificitat, oscil·lant entre 90 i 99 %. Un fals-positiu pot ser degut a factors reumàtics, processos de congelació-descongelació i per un elevat sediment en orina. El tractament tèrmic de la orina no suposa la desaparició de la positivitat i si la eliminació d'aquests falsos positius en mostres negatives.

Tot i la seva popularitat per al diagnòstic encara existeix la necessitat de desenvolupar un assaig de captura d'antigen que pugui diagnosticar totes les infeccions causades per totes les espècies i serogrupos de *Legionella*.

Detecció de material genètic

En els últims anys, s'han desenvolupat mètodes de diagnòstic basats en la detecció de material genètic de *Legionella* en mostres clíniques, utilitzant mètodes d'hibridació amb sondes específiques o basats en la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR representa un dels pocs tests diagnòstics amb gran potencial per a la detecció d'infeccions causades per totes les espècies conegudes de *Legionella*. S'han

desenvolupat diversos test de PCR per a legionel·la, tant per seqüències d'ADN a l'atzar per *L. pneumophila* [123], per al gen 5S ARNr [124], per al gen 16S ARNr [125,126], o per al gen *mip* [19].

La detecció, diagnòstic, i tipatge de *Legionella* per àcids nucleics va començar a meitat dels 1980. Abans de l'ample dispersió o adopció de la PCR, els científics van experimentar amb sondes específiques de *Legionella* [46]. El primer informe de la PCR com a eina per a la detecció de *Legionella* va ser al 1989, quan investigadors de la Universitat de Standford van combinar la PCR amb Southern blot per a la detecció d'ADN de *Legionella* en aigua [123]. Es va anar progressant amb les estratègies basades en PCR per a estudis epidemiològics i per mostres ambientals. L'evolució de la PCR ha permès la utilització de la PCR a temps real combinada amb la hibridació amb sondes, de tal manera que es confirma la identitat del producte amb una ràpida detecció de legionel·la en mostres clíniques [81,127]. Aquest mètode redueix les contaminacions creuades, el temps necessari per al processament de la mostra, i elimina el pas de Southern blot després de la PCR. Aquest mètode va guanyar popularitat a principi dels 2000, i encara que requereix experiència tècnica, és complexa, i els termocicladors i programes són cars, molts kits comercials per a la detecció ràpida de *Legionella* en l'ambient utilitzen aquesta tecnologia.

Actualment no existeix un consens en el valor d'un gen o marcador "tipus" per a la detecció específica de *Legionella*, a excepció del gen *mip* que és utilitzat per a la detecció de *L. pneumophila* o per a la identificació de les espècies de *Legionella*. La selecció dels gens diana està influenciada pels objectius específics dels experiments del laboratori, i per tant, la estandardització de la metodologia és complicada.

La detecció de *Legionella* mitjançant els àcid nucleics ofereix avantatges significants respecte la serologia i el cultiu en termes de sensibilitat i velocitat. No obstant això, existeixen notables desavantatges i limitacions com la presència d'inhibidors de la reacció i els falsos positius/negatius. Una complicació inherent amb la metodologia d'amplificació d'àcids nucleics és la dificultat en avaluar la viabilitat bacteriana. Aquests mètodes no discriminen entre àcid nucleics lliures, ja sigui en solució o associats a amebes, de bacteris en procés de mort o morts, i/o dels bacteris viables no cultivables (VBNC) [46].

Tractament

El tractament efectiu de la legionel·losis està condicionat per la naturalesa intracel·lular del patogen. Els únics agents antibiòtics que són clínicament acceptables són aquells que arriben a altes concentracions intracel·lulars com els macròlids, quinolones, rifampicina, cotrimoxazol i tetraciclins. No es disposa d'estudis clínics randomitzats sobre el tractament de la malaltia del legionari, degut a la seva baixa incidència i per tant el coneixement de l'eficàcia dels diferents antibiòtics disponibles es basa en models experimentals i en estudis clínics retrospectius. Les dades *in vitro* suggereixen que les fluoroquinolones tenen millor activitat contra les espècies de *Legionella* i provoquen menys efectes secundaris [128].

La recuperació de la infecció aguda pot ser lenta i afectada per fatiga, pèrdua de memòria, desordres d'estrès post-traumàtic, i complicacions comuns en molts tipus de AC.

Detecció en l'ambient

Les tècniques de detecció de *Legionella* en l'ambient són essencials per traçar la font d'un brot. També són útils per a la verificació de l'efectivitat dels mètodes de desinfecció, i per a control de proliferació en els centres de salut amb pacients amb d'alt risc per al desenvolupament de la legionel·losis (per exemple, immunodeprimits). Aquestes tècniques també poden ser apropiades en el context d'un pla de gestió i anàlisi i control de riscos, com per exemple, l'avaluació del potencial d'amplificació/transmissió de les instal·lacions. El fet de testar rutinàriament la presència de *Legionella* en les instal·lacions no implica que sigui substitutiu de les operacions de manteniment, de tractaments efectius de l'aigua, o de la gestió dels riscos d'aquestes. Aquestes proves rutinàries no són predictives del risc de transmissió de malaltia, ja que *Legionella* pot estar present en l'aigua sense causar cap infecció.

Les tècniques de detecció de *Legionella* en l'ambient es basen, com en les mostres clíniques, en el cultiu, mètodes serològics i mètodes moleculars.

El cultiu en mostres ambientals també és la tècnica d'elecció per a la detecció de *Legionella* [19]. Aquesta metodologia permet la quantificació de l'inòcul present en les instal·lacions. Com passa amb les mostres clíniques, per a la millora de l'aïllament del bacteri les mostres són pretractades amb calor i/o àcid per eliminar la microbiota acompanyant i posteriorment es sembra en medi de cultiu BCYE. Les colònies bioquímicament i morfològicament sospitoses de *Legionella* són identificades de la mateixa manera que els aïllats clínics.

En l'ambient també es poden utilitzar mètodes serològics, encara que tenen baixa sensibilitat (el límit de detecció està entre de 10^5 - 10^7 bacteris per litre). Per tant aquesta tècnica s'utilitza habitualment per a la identificació dels aïllats i no per a la detecció directa en l'ambient.

Finalment, els mètodes moleculars basats en la detecció d'àcids nucleics, tot i que tenen sensibilitat i especificitat, com passa amb les mostres clíniques, no són capaços de discriminar entre organismes vius i morts [129–131]. Aquests mètodes poden ser adequats per anàlisis previs i ràpids de l'ambient, seguit de cultiu de les mostres per a la confirmació dels resultats.

Tècniques de tipatge per Brots

Les tècniques de tipatge s'utilitzen per a ajudar a trobar el focus d'infecció en els brots de legionel·losis, juntament amb les dades epidemiològiques. Degut a la gran diversitat entre *L. pneumophila*, els aïllats clínics i ambientals es comparen per tècniques moleculars per identificar adequadament el punt de la infecció. Inicialment, les legionel·les eren identificades a nivell de serogrup en les investigacions dels casos. El fet que la majoria dels aïllats corresponien al serogrup 1, va descartar aquesta metodologia com a eina epidemiològica, deixant-se només com a marcador taxonòmic.

Els mètodes de tipatge es poden dividir en dos grans categories, la primera correspon als mètodes fenotípics basats en la determinació de característiques expressades pel microorganismes, i la segona als mètodes genotípics, els quals es basen en l'anàlisi del material genètic.

Mètodes fenotípics

Entre els mètodes fenotípics troben el tipatge serològic, el tipatge per electroforesis de proteïnes i immunoblotting i l'estudi d'isoenzims.

S'han desenvolupat anticossos monoclonals amb la finalitat de poder subtipar la gran varietat de *L. pneumophila* serogrup 1 [19]. Al 1986 es va proposar un panell d'anticossos monoclonals (MAb) [132], que permetia identificar 12 subgrups de *L. pneumophila* serogrup 1 [19], encara que moltes de les línies cel·lulars s'han perdut, i molts dels reactius ja no estan disponibles.

Posteriorment es va desenvolupar el Panell de Dresden (Dresden *Legionella* LPS MAb) que juntament amb MAb 3, descrit per Joly *et al* [133], permeten el subtipatge de *L. pneumophila* serogrup 1 en només 9 subgrups [134], i per tant resulta insuficient per a la discriminació entre els aïllats causants de la malaltia i altres aïllats ambientals [135].

EL tipatge per electroforesis de proteïnes i immunoblotting utilitzen les variacions de les proteïnes expressades pels bacteris com a marcadors moleculars per a la diferenciació d'aïllats. És una metodologia fàcil de realitzar, però la interpretació dels resultats és complexa. A més, els resultats venen condicionats pel creixement del bacteri i les variants del mètode, i això pot donar patrons diferents en un mateix aïllat.

Per últim, l'anàlisi d'isoenzims es basa en la caracterització de les variants electroforètiques d'un conjunt d'enzims (isoenzims). Aquest mètode és discriminatori per a *L. pneumophila* [136,137], però té una aplicació limitada per ser laboriós i per necessitar de personal especialitzat.

Mètodes genotípics

Els mètodes més utilitzats per al tipatge de *Legionella* es basen en l'anàlisi del material genètic. EL gran avantatge d'aquestes tècniques respecte les fenotípiques és que el material genètic presenta una gran estabilitat en diferents condicions. Aquests mètodes, a l'hora, es poden dividir entre mètodes que no utilitzen la PCR i mètodes que utilitzen la PCR. Entre els mètodes que no utilitzen la PCR per al tipatge tenim

l'anàlisi de plàsmids, RFLP (detecció de polimorfismes en la longitud de fragments de restricció), PFGE (electroforesis en camp polsant) i ribotipatge. Entre aquestes, les més utilitzades són les que necessiten una endonucleasa de restricció per a l'anàlisi (PFGE i RFLP).

La tècnica RFLP utilitza una endonucleasa amb alta freqüència de tall, generant fragments entre 0.5 a 50 kb. Una de les limitacions d'aquesta tècnica és la complexitat dels patrons generats, els qual dificulten la comparació entre aïllats. Aquesta tècnica ha sigut combinada amb el 'Southern blot', utilitzant sondes específiques per hibridar amb el patró generat. El ribotipatge es basa en la utilització de la RFLP amb 'Southern blot' on les sondes utilitzades són específiques de l'operó ribosomal [138–140].

El mètode PFGE es basa en l'anàlisi dels fragments de restricció utilitzant una endonucleasa que reconeix una diana específica amb baixa freqüència de tall, les quals generen bandes de fins a 5 Mb. El PFGE és un bon marcador epidemiològic, altament discriminatori per al subtipatge de *L. pneumophila* [141–144]. No existeix un únic protocol per al tipatge de *Legionella* per aquesta tècnica, sinó que cada laboratori utilitza els seu propi, variant condicions de digestió de la paret del bacteri, l'enzim de restricció utilitzat i les condicions d'electroforesis [145–148]. La utilització d'un protocol comú i la interpretació dels resultats de la tècnica són dos aspectes molt importants a l'hora de comparar els resultats amb altres laboratoris. Tenover *et al* [149] va descriure una categorització dels perfils PFGE segons el nombre de bandes diferents entre els aïllats a aplicar en general per tots el bacteris. Tot i això aquesta tècnica té un gran poder discriminatori i és reproduïble.

Entre el mètodes de genotipat que utilitzen la PCR tenim AP-PCR (arbitràriament encebada), RAPD (anàlisi de polimorfismes amplificats a l'atzar), rep-PCR (PCR d'elements repetitius), AFLP (anàlisi de polimorfismes de longitud de fragments amplificats), seqüenciació de gens específics de *Legionella* [46]. *L. pneumophila* sg 1 Paris s'ha arribat a caracteritzat per 'spoligotyping' (caracterització de les seqüències curtes palindròmiques d'espaiament específiques d'aquesta espècie) [150].

Les tècniques AP-PCR, RAPD i Rep-PCR es basen en l'aparellament aleatori dels encebadors de PCR, ja que no estan dirigits a un *locus* concret, i per tant s'hibridarà a l'atzar amb suficient afinitat per a permetre l'inici de la polimerització. Com a resultat

s'obté un perfil de bandes complex que és el que s'utilitzarà per a comparar els aïllats. La desavantatge d'aquestes tècniques és la seva baixa reproductibilitat [151].

La metodologia AFLP combina la utilització d'enzim de restricció i l'amplificació dels fragments per PCR. En el moment de digerir material genètic amb l'endonucleasa també es realitza una reacció de lligació a uns adaptadors especials per a la posterior amplificació. El producte obtingut dona com a resultat un patró de bandes. És una tècnica reproducible, però laboriosa.

Una de les últimes tècniques desenvolupades utilitzada actualment per al genotipat de *L. pneumophila* i per a les investigacions epidemiològiques és el tipatge basat en seqüència (SBT, *sequence-based typing*), el qual és una variant de la '*multilocus sequence typing*' (MLST) [152–154]. La discriminació dels aïllats per SBT es basa en la seqüència ordenada de 7 gens (*flaA*, *pile*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, i *neuA*), amb la opció d'incloure l'homòleg de *neuA* (*neuAH*) quan els encebadors estàndards d'aquest gen fallen en l'amplificació de la diana en aïllats no serogrup 1. L'avantatge de l'SBT és la comparació directa de seqüències, eliminant les interpretacions subjectives dels mètodes no basats en seqüència com el PFGE, els quals són propensos a ambigüitats en la interpretació de les bandes entre laboratoris [155]. El Grup d'estudi d'infeccions de *Legionella* de la Societat Europea de Microbiologia Clínica (ESGLI), manté una base de dades dels al·lels (actualment la versió 3.0) que permet la consulta d'un gran nombre de seqüències, donant com a resultat tant el perfil al·lèlic com el 'sequence type' (ST) per a cada aïllat (Taula 3). La base de dades és dinàmica, i està contínuament actualitzada amb l'addició de noves seqüències dels al·lels i STs. Tradicionalment, l'SBT s'ha realitzat en extraccions d'ADN provinents de cultius, no obstant això, alguns estudis han demostrat èxit fent una extracció d'ADN i amplificació dels gens directament de mostres clíniques [46]. La desavantatge és la baixa qualitat de les seqüències obtingudes directament de mostres clíniques. Tot i això, l'SBT podria oferir una bona alternativa per a estudis epidemiològics en els casos on no es pugui aïllar el bacteri.

El PFGE i l'SBT són considerats els mètodes més eficients per al subtipatge i la investigació de la prevalença i distribució de *Legionella* entre els aïllats clínics i ambientals [14].

Noves metodologies

La seqüenciació del genoma complet (WGC) és una tècnica innovadora i accessible amb un ample potencial diagnòstic per a laboratoris de salut pública. El desenvolupament de plataformes de seqüenciació de nova generació 'next-generation' i reactius de molts fabricants ha disminuït dràsticament el cost i el temps per WGS des dels últims 10 anys. Un gran grup d'investigadors han demostrat que aquesta tècnica és bona per a identificació i tipatge, exàmens de les relacions filogenètiques entre patògens, estudis retrospectius i longitudinals, identificació de bases moleculars per a la resistència a antibiòtics o virulència, per la descobriment de noves dianes de ADN per al desenvolupament diagnòstic, i menys freqüent, per a la vigilància prospectiva o investigacions de brots [46]. Per poder utilitzar aquesta eina com a mètode de tipatge durant un brot es necessitaria el desenvolupament d'una xarxa bioinformàtica per a l'anàlisi i interpretació de les dades, incloent llibreries microbianes.

L'espectrometria de masses (MS) és una tecnologia encara en evolució i adaptació, però té possibilitats com a eina ràpida i barata per a la identificació i classificació de patògens clínicament rellevants [156]. La identificació de *Legionella* per MS es va provar per primer cop a finals dels 1970 en combinació amb la cromatografia de gasos [157]. El desenvolupament del MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) ha demostrat ser fiable per a la identificació del gènere *Legionella*, encara que la discriminació de serogrupos no és possible [46,158,159]. Les bases de dades de referència d'espectres són imprescindibles per a la comparació del cromatograma MS, i arribar a la identificació a nivell d'espècie i serogrup. Moltes d'elles han estat creades i millorades amb la intenció de tipar *Legionella* [158,159].

L'aplicació d'aquesta tècnica com a eina de tipatge encara no ha estat validada i el seu poder discriminatori no ha estat determinat. Resultats recents del nostre grup i altres [160], han demostrat que aquesta metodologia pot arribar a tenir el mateix poder discriminatori que el PFGE en fer comparacions del patró d'espectrometria de masses de la mateixa manera que es fa amb els patrons del PFGE.

OBJECTIUS

Avui dia, la legionel·losis continua sent una malaltia amb una alta incidència, provocant brots amb nombroses persones afectades, tot i existir normes de prevenció i control de la legionel·losis. Quan es declara un brot d'aquesta malaltia són molt importants els estudis epidemiològics i moleculars i les tècniques utilitzades per a la cerca del focus d'infecció, ja que ser el responsable de l'origen d'aquesta malaltia implica grans multes i fins i tot sentències de presó segons la Regulació Espanyola. Les tècniques moleculars utilitzades per a l'estudi epidemiològic són les proves definitives per indicar el focus d'infecció. Entre aquestes tècniques, l'EWGLI va proposar al 2003 la metodologia SBT com a eina molecular amb gran potencial per al tipatge de *Legionella*, i per a estudis de diversitat de poblacions i filogenètics. La darrera versió d'aquesta metodologia s'aplica actualment en estudis epidemiologic-moleculars encara que no s'han realitzat estudis exhaustius de la seva capacitat discriminatòria en grans brots de la comunitat.

Per altra banda, s'ha observat que els aïllats responsables de casos clínics en altres àrees més grans difereixen dels aïllats que es troben en l'ambient sense causar malaltia a nivell d'al·lels i STs. En el moment de l'origen del brot s'ha detectat que els aïllats responsables dels brots coexisteixen amb aïllats que no estan infectant en aquell moment. Fins ara, no existeixen estudis a nivell proteòmic que descriguin les diferències entre aquestes dues poblacions d'aïllats.

Segons aquests antecedents, amb aquest treball es pretén avaluar la utilitat de la tècnica SBT en els estudis epidemiològics en front a la tècnica '*gold standard*', PFGE, i fer una comparació filogenètica i proteòmica entre els aïllats ambientals responsables de casos i els aïllats ambientals que en aquell moment coexisteixen amb el causant de la malaltia.

Els objectius del treball són:

1. Anàlisi de la concordança i utilitat de les tècniques PFGE i SBT en les investigacions epidemiològiques de legionel·losis.
2. Anàlisi de la diversitat i distribució d'STs dels aïllats clínics i ambientals de *Legionella* en l'àrea de Catalunya.
3. Descripció del proteoma diferencial entre aïllats ambientals responsables de malaltia i aïllats ambientals no relacionats amb infecció.

MATERIAL I MÈTODES

Objectiu 1. Comparació de mètodes de tipatge en brots

Selecció de aïllats

Es van seleccionar 25 investigacions de casos/brots de Legionel·losis declarats a Catalunya. Cada investigació consistia en aïllats de pacient/s (1 aïllat clínic per pacient) i aïllats que provenien de diferents fonts ambientals investigades com a probables focus d'infecció (aïllats ambientals).

Caracterització fenotípica d'aïllats per anticossos del Panell de Dresden

Els aïllats identificats com a *Legionella pneumophila* sg 1 van ser caracteritzats fenotípicament utilitzant els anticossos del Panell de Dresden, el qual divideix el serogrup 1 en 9-10 diferents subgrups segons la reactivitat de l'aïllat en front de 7 anticossos (Serogrup 1, MAb 3/1, MAb 3, MAb 8/4, MAb 10/6, MAb 20/1 i MAb 26/1) (Figura 3). Per a procedir amb aquest mètode, els aïllats van ser descongelats i incubats a 37 °C durant 72 hores en plaques de medi BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract). Després es realitzà una suspensió bacteriana en formalina al 1 % (vol/vol), i es va ajustar a una DO_{625nm} de 0.3. Aquesta suspensió es va utilitzar com antigen per a la realització de l'assaig d'immunofluorescència, dispensant 5 µl de la suspensió a cada pou del portaobjectes i deixant-lo assecar. Un cop preparats els portaobjectes, es van afegir 10 µl de cada anticòs específic del Panell de Dresden en pouets separats i es va incubar durant 30 minuts a 37 °C. Els portaobjectes es van rentar dos cops amb PBS (Phosphate Buffered Saline) durant 5 min, es van assecar i es van afegir 10 µl d'anticòs secundari a una dilució 1:40 (goat anti-mouse IgG (whole molecule)-FITC antibody, Sigma) i es va incubar durant 30 minuts a 37 °C. Els portaobjectes es van tornar a rentar dos cops durant 5 minuts amb PBS, es van assecar i es van preparar amb medi de muntatge (Fluoprep, Biomeriex) i cobreobjectes. Els aïllats es van determinar com a positius o negatius en el microscopi de fluorescència (Axioscope, Zeiss, Alemanya). Segons el seu patró de positivitat/negativitat del diagrama de flux de la figura 3 per aquests anticossos els aïllats es van definir com NS1 (no serogrup 1), Knoxville, Philadelphia, Benidorm, France/Allentown, Bellingham, Camperdown, Heysham, OLDA,

Oxford o Oxford/OLDA.

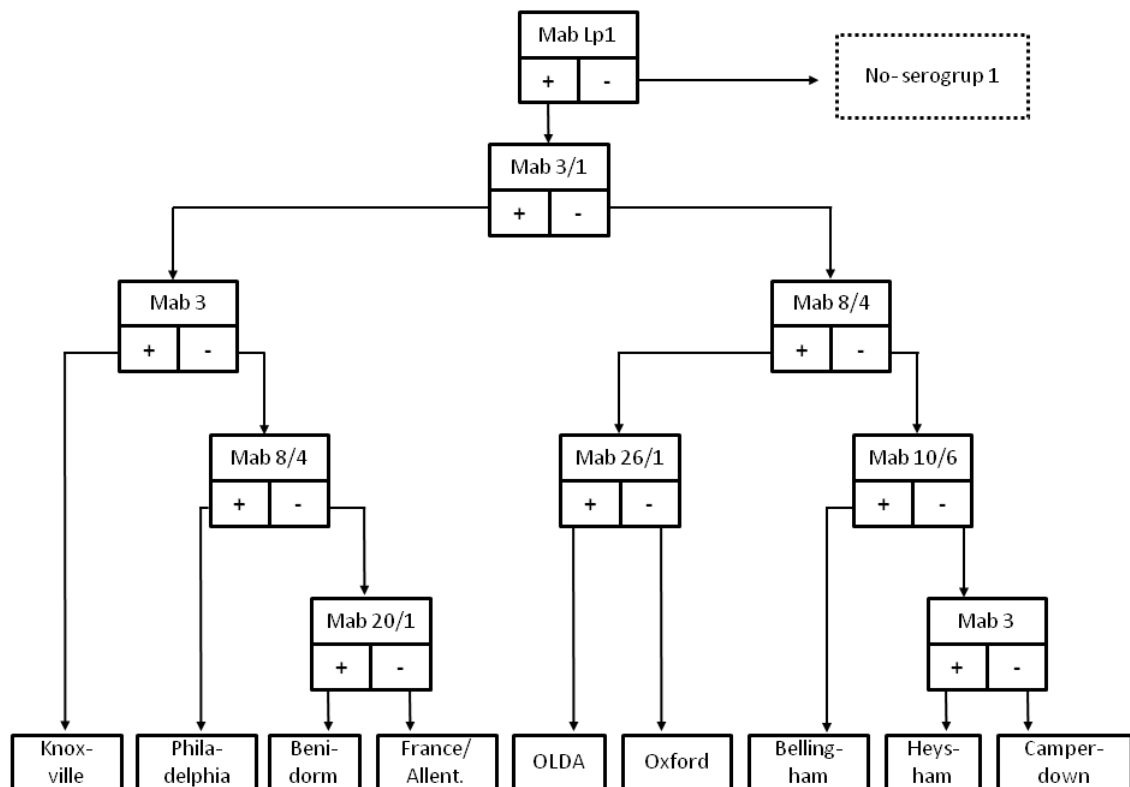


Figura 3. Esquema del Panell de Dresden.

Electroforesis en camp polsant (Pulse-Field Gel Electrophoresis, PFGE)

L'anàlisi de l'ADN cromosòmic dels aïllats es va realitzar mitjançant l'anàlisi dels fragments de restricció del seu genoma generats amb una endonucleasa de baixa freqüència de tall (*SfiI*) i la seva posterior separació per PFGE.

Els aïllats a estudi es van descongelar i cultivar en plaques de medi BCYE en una estufa a 37 °C durant 72 hores. Amb la biomassa obtinguda en el creixement es va procedir a fer l'extracció de l'ADN. L'extracció d'ADN es va realitzar per immersió del bacteri en blocs d'agarosa. El creixement bacterià es va resuspendre en 5 ml de solució salina estèril per tal d'eliminar restes del medi de cultiu i es van fer dos rentats per centrifugació a 4800 rpm 8 min. Finalment, la biomassa bacteriana es va resuspendre en tampó PET IV (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) fins a una DO_{625nm} de 0.3. Es va traspasar 1 ml d'aquesta suspensió en un tub de microcentrífuga, es va centrifugar a

12000 rpm durant 3 minuts. El sediment es va resuspendre en 600 µl de PET IV i es va barrejar amb 400 µl d'agarosa al 2 % (Incert Agarose, Lonza) en tampó EC (6 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 10 mM EDTA, 0.5 % Brij 58, 0.2 % Desoxyxolat, 0.5 % Lauril-sarkosil, pH 7.5) atemperada a 50°C. Seguidament aquesta solució es va repartir en els motlles i es va deixar solidificar durant 30 minuts.

Els blocs solidificats es van traspasar a una placa de 6 pous amb 2 ml de tampó EC, complementat amb 2.3 mg/ml de Lisozim i 0.04 mg/ml de RNasa. Després d'una incubació a 37°C durant tota la nit, es va retirar el tampó i es van fer 4 rentats d'una hora amb 2 ml de tampó TE High (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 7.5) cadascú. Posteriorment es va escollir un dels blocs per mostra i es van traspasar a una placa de 24 pous. En aquesta placa es va afegir 400 µl de tampó ES (0.4 M EDTA, 1 % Lauril-sarkosil) complementat amb 0.95 mg/ml de Proteinasa K, i es va incubar durant tota la nit a 50 °C. La utilització d'aquest tampons i enzims assegura la completa lisi del bacteri evitant la degradació i trencament del material genètic.

Posteriorment es van fer 4 rentats d'una hora amb TE High i 4 retants amb tampó Dummy (0.1 M Tris-HCl, 0.005 M MgCl₂, pH 7.5). Després dels rentats es va afegir 320 µl de tampó de digestió (tampó R2 1x, 10 µg RNasa), es van deixar 30 min a 4 °C i finalment es va afegir 54 Unitats de *Sfi*I i es va incubar durant la nit a 50 °C.

La separació de restricció generats es realitzà en gel d'agarosa a l'1 % (Chromosomal Grade Agarose, BioRad) amb TBE 0.5x (Tris-Boric-EDTA, pH 7.5). Cada bloc es va carregar en un pou del gel d'agarosa, deixant lliures entre 2 i 3 pous intercalats pel marcador de pes molecular (Lambda Ladder PFGE Marker). Els pous es van segellar amb la mateixa agarosa del gel. Per la electroforesis en camp polsant es va utilitzar l'equip CHEF-DR II (Bio-Rad) amb 2 litres de tampó TBE 0.5x. Les condicions d'electroforesis van ser en distribució lineal de polsos entre 5.6 y 50.6 segons durant 24 hores, amb un voltatge de 5 V/cm i a 14 °C.

Finalment els gels es van tenyir amb SYBR Safe (Invitrogen) i es van visualitzar en un transil·luminador connectat a un equip de captura d'imatges. Els patrons PFGE es van analitzar segons les dues categories més discriminatòries de Tenover [149]. Per una banda es van realitzar les anàlisi dels perfils tenint en compte que dos patrons es consideraven 'relacionats' quan diferien en 3 o menys bandes. D'altra banda, els perfils només eren considerats 'idèntics' quan no existia cap diferència entre ells, quan

existia una banda o més de diferència els perfils eren considerats diferents. Cada patró PFGE es va designar amb una lletra majúscula.

Tipificació per Seqüenciació de loci (Sequence-based Typing, SBT)

La caracterització dels aïllats també es va realitzar per seqüenciació, utilitzant el protocol SBT descrit pel grup “European Working Group for Legionella Infections” (EWGLI versió 5.0). Els encebadors d’aquests gens estan dissenyats de tal manera que tots amplifiquen a una T_m de 55 °C, a més de contenir una cua M13, per a facilitar el procés de marcatge amb els ddNTPs (dideoxinucleòtids).

Els aïllats van ser descongelats en plaques de medi BCYE i cultivats a 37 °C durant 72 hores. L’extracció de l’ADN es va realitzar resuspenent una part de biomassa en 300 µl de CHELEX 6 % (Bio-Rad). Aquesta suspensió es va incubar a 56 °C durant 30 min, després es va pujar la temperatura a 100 °C durant 8 min i finalment es va refredar a 4 °C. La suspensió es va centrifugar a 12000 rpm durant 3 min per eliminar la resina amb restes cel·lulars i el sobrenedant es va traspasar a un nou tub de microcentrífuga. La quantificació i valoració de la qualitat de l’ADN es va realitzar en Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.), i la concentració va ser ajustada a 50-100 ng/µl d’ADN amb aigua de grau molecular.

Les amplificacions dels fragments dels 7 gens a analitzar es van realitzar mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Aquesta reacció es va fer en un volum total de 25 µl per a cada gen els quals contenien Tampó 1x de PCR (Novagen), 0.5 U de polimerasa (KOD Hot Sart DNA Polymerase. Novagen; Merck Millipore, Alemanya), 20 µM de cada dNTP, 2.5 mM de $MgCl_2$, 200 µM de cada encebador específic (Taula 1) i 100 ng de ADN genòmic. L’amplificació es va realitzar en un termociclador (GeneAmp* PCR System 2700, Applied Biosystem) utilitzant el següent programa: 1 cicle a 95 °C durant 1 min per a la desnaturalització del ADN, 35 cicles d’amplificació de 30 segons a 95 °C, 30 segons a 55 °C i 30 segons a 72 °C, 1 cicle 5 minuts a 72 °C i finalment es disminueix la temperatura a 4 °C pel seu manteniment.

Taula 1. Encebadors utilitzats en l'SBT

Gen	Nom d'encebador	Seqüència 5'-3' * ¹	Tm (°C)	Mida amplicó (pb)* ²
<i>flaA</i>	flaA-587F	tgtaaaacgacggccagtGCGTATTGCTCAAATACTG	55	450
	flaA-960R	caggaaacagctatgaccCCATTAATCGTTAAGTTGTAGG		
<i>pilE</i>	pilE-35F	tgtaaaacgacggccagtCACAATCGGATGGAACACAAACTA	55	496
	pilE-453R	caggaaacagctatgaccGCTGGCGCACTCGGTATCT		
<i>asd</i>	asd-511F	tgtaaaacgacggccagtCCCTAATTGCTCTACCATTGAGATG	55	612
	asd-1039R	caggaaacagctatgaccCGAATGTTATCTGCGACTATCCAC		
<i>mip</i>	mip-74F	tgtaaaacgacggccagtGCTGCAACCGATGCCAC	55	595
	mip-595R	caggaaacagctatgaccCATATGCAAGACCTGAGGGAAC		
<i>mompS</i>	mompS-450F	tgtaaaacgacggccagtTTGACCATGAGTGGGATTGG	55	729
	mompS-1116R	TGGATAAATTATCCAGCCGGACTTC		
	mompS-1015R	CAGAAGCTGCGAAATCAG (Per seqüenciació)		
<i>proA</i>	proA-1107F	tgtaaaacgacggccagtGATCGCCAATGCAATTAG	55	517
	proA-1553R	caggaaacagctatgaccACCATAACATCAAAGCC		
<i>neuA</i>	neuA-196F	tgtaaaacgacggccagtCCGTTCAATATGGGGCTTCAG	55	495
	neuA-634R	caggaaacagctatgaccCGATGTCGATGGATTACTAATAC		
<i>neuAH</i>	neuAh_F	tgtaaaacgacggccagtATCCAGCAGTTTTTAMAAATTTAGG	55	830
	neuAh_R	caggaaacagctatgaccTGGTGTCATAAAYTAATTCTTTAGCCA		

*¹ La seqüència en minúscula correspon a la cua M13, i la seqüència en majúscula a l'encebador específic del gen; *² Mida de l'amplicó comptant la regió M13.

Els productes amplificats es van analitzar amb un gel d'electroforesis al 2% en TBE 1x i 400x de SYBR Safe (Invitrogen), a 100 V durant 45 minuts. Per a determinar la mida dels amplicons es va utilitzar un marcador de pes molecular de 100 parell de bases (DNA ladder 100 pb, Ecogen). Els gels es van visualitzar en un transil·luminador connectat a un equip de captació d'imatges.

Els productes de PCR es van purificar utilitzant el mètode enzimàtic ExoSAP-IT (USB). Aquesta purificació es va realitzar barrejant 2 µl de ExoSAP-IT amb 5 µl de producte de la PCR. Es va utilitzar un termociclador amb el següent programa: 45 minuts a 37 °C per a l'eliminació de la resta d'encebadors i nucleòtids, i 15 minuts a 80 °C per a la inactivació de ExoSAP-IT.

El producte purificat es va utilitzar pel marcatge amb els ddNTPs en totes dues direccions utilitzant el kit ABI PRISM BigDye Terminator V3.1 (Applied Biosystem). Aquesta reacció es va dur a terme en un volum final de 10 µl. La reacció contenia 1 µl de tampó 10x, 0.7 µl de reactiu BigDye, 1.6 µl de encebador M13 (Forward o Reverse, o bé *mompS*-R) a 1 µM, 2 µl de producte amplificat i 4.7 µl d'aigua de grau molecular. La reacció de marcatge dels amplicons es va dur a terme en un termociclador seguint

el següent programa: 30 cicles de 20 segons a 96 °C, 20 segons a 50 °C, i 4 minuts a 60 °C. Finalment es va refredar a 4 °C. L'electroforesi en capil·lar per a la seqüenciació dels productes es va realitzar en el 3130xl (3100) ABI Prism Genetic Analyzer (Applied Biosystems) a la Unitat de Genòmica de la Fundació Insitut d'Investigació Germans Trias i Pujol. Les seqüències es van analitzar amb el programa Sequence Scanner (Applied Biosystems). L'alineament de les seqüències "forward" i "reverse" de cada gen es va fer en la base de dades "Sequence Quality Tool" disponible en la pàgina web de EWGLI (www.ewgli.org). En aquesta base de dades es va obtenir per cada aïllat el perfil dels 7 al·lels (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) i el corresponen tipus de seqüència (ST) definit amb un número.

Interpretació de dades

Es va calcular la diversitat de PFGE i SBT en cada investigació utilitzant l'índex Hunter Gaston amb l'eina en línia VDICE (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>). Aquest índex és una modificació de l'índex de Simpson per a mostres petites.

La comparació de les tècniques SBT i PFGE es va realitzar a nivell de concordances epidemiològiques i moleculars. La concordança epidemiològica es va expressar com el percentatge de investigacions de LD en les que l'SBT indicava el mateix focus d'infecció que el PFGE utilitzant els aïllats clínics com a referència. La concordança molecular es va definir com l'aparellament entre els perfils PFGE i SBT dels aïllats clínics i ambientals en cada investigació de LD.

La congruència molecular entre aquestes dues tècniques es definida com la probabilitat de que un parell de mostres que tinguin el mateix perfil pel primer mètode també tinguin el mateix perfil per el segon mètode i *vice versa*. La congruència molecular va ser calculada utilitzant l'índex Ajustat de Wallace (AW) [161] en totes dues direccions, $AW_{SBT \rightarrow PFGE}$ i $AW_{PFGE \rightarrow SBT}$. Aquest índex es va calcular per les categories 'idèntiques' i 'relacionades' segons els criteris de Tenover per a la diferenciació dels patrons PFGE [149].

Les anàlisis estadístiques es van du a terme en el programa SPSS (versió 19 SPSS,

Chicago, IL, USA). Els resultats per a les variables categòriques es van expressar com absolutes, freqüències relatives per poblacions no normals, medianes i interquartils. El test exacte de Fisher es va utilitzar per a comparar les distribucions proporcionals entre els grups. Els tests estadístics utilitzats eren bilaterals, i el valor $p \leq 0.05$ va ser considerat estadísticament significat.

Objectiu 2. Anàlisi de diversitat de poblacions

Selecció d'aïllats

Es van seleccionar aïllats clínics de pacients amb LD i aïllats ambientals de les investigacions epidemiològiques no relacionats amb casos de LD en el moment del brot/cas. Tots els aïllats van ser caracteritzats amb els anticossos del Panell de Dresden i per la metodologia SBT com s'ha explicat anteriorment.

Estudi comparatiu de diversitat entre aïllats clínics i ambientals no relacionats

L'estudi comparatiu poblacional es va dur a terme amb les dades obtingudes de les tècniques SBT i Panell de Dresden. Es va calcular l'índex de diversitat Hunter Gaston (IOD) amb l'eina en línia V-DICE (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>). Es van realitzar anàlisis filogenètics amb el programa online eBURST V3 [162] i les anàlisis estadístiques es van fer amb el programa estadístic SPSS (versió 19 SPSS, Chicago, IL, USA). Per a les comparacions poblacionals es va utilitzar el test estadístic U de Mann-Whitney, els p-valors inferiors a 0.05 van ser considerats com valors diferencials estadísticament significatius.

Objectiu 3. Caracterització proteòmica

Selecció d'aïllats

Per a l'estudi proteòmic i de citopatogenicitat es van seleccionar 3 parelles d'aïllats procedents de 3 brots diferents de l'estudi epidemiològic i valoració de tècniques de tipatge. Cada parella estava formada per dos aïllats ambientals de *Legionella*

pneumophila sg 1 que coexistien en el mateix ambient (torre de refrigeració), un dels aïllats tenia les mateixes característiques que l'aïllat clínic del cas i un aïllat ambiental diferent a l'aïllat clínic del cas.

La validació de les proteïnes diferencials es va realitzar mitjançant estudis d'expressió gènica i activitat enzimàtica en un conjunt d'aïllats de *Legionella pneumophila* serogrup 1 més extens provinent de l'estudi de les 25 investigacions de legionel·losis del primer estudi d'aquest treball.

Gels 2D-DIGE

Aquesta metodologia està dividida en 5 parts: 1) el creixement i producció de biomassa del bacteri en fase post-exponencial 2) extracció i marcatge de les proteïnes, 3) separació en dos dimensions de les proteïnes, 5) visualització i anàlisi de les proteïnes als gels i 5) identificació de les proteïnes d'interès.

Obtenció de biomassa

Els aïllats es van descongelar en places de medi BCYE i es van incubar a 37 °C durant 72 hores. El creixement bacterià es va resuspendre en aigua estèril fins a obtenir una DO_{625nm} de 0.3, que equival a 10⁸ ufc/ml. La suspensió va ser utilitzada com a inòcul del medi de cultiu líquid AYE (ACES-Buffered Yeast Extract) a pH 6.9 complementat amb àcid L-cetoglutàric, L-cisteïna i pirofosfat fèrric, el qual partia de 10² ufc/ml en un volum final de 50 ml. Els cultius van ser controlats diàriament fent sembres en plaques de medi BCYE per comprovar que no hi haguessin contaminacions i poder realitzar la corba de creixement.

Es va determinar que la fase post-exponencial de *Legionella pneumophila* s'adquiria a les 72 hores de cultiu, per tant, en aquest punt els cultius es van rentar dos cops amb aigua centrifugant a 6000 xg durant 30 minuts a 4 °C, per a eliminar les restes del medi de cultiu.

Extracció i marcatge de proteïnes

L'extracció de proteïnes es va realitzar amb un total de 10^8 bacteris. Aquests es van lliurar en 300 μ l de tampó de lisis (Tris 30 mM, Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4%, HCl pH 8,5) amb 20 cicles de sonicació (cada cicle constava de 10s de sonicació i 20s en gel per evitar el reescalfament de la mostra) amb Omni-Ruptor 4000 Ultrasonic Homogenizer (OMNI International, Georgia, USA). La suspensió lliurada es va centrifugar a 10000 xg durant 10 minuts a 4 °C, i es va descartar el sediment que contenia les restes cel·lulars i cèl·lules no lliurades. L'extracte cru (les proteïnes totals en el sobrenadant) es va traspasar a un nou tub de microcentrifuga.

Es van purificar 100 μ l de l'extracte cru utilitzant el kit 2D-CleanUp (Amersham, Alemanya) que es basa en la precipitació de les proteïnes pel mètode àcid tricloroacètic (TCA)-acetona modificat. El producte precipitat es va resolubilitzar en 70 μ l de tampó de lisis, i es va ajustar el pH de la mostra a 8.5 amb hidròxid sòdic (NaOH).

Un cop realitzada la precipitació i purificació proteica es va quantificar el producte obtingut mitjançant el kit de Bio-Rad RC DC Protein Assay (Bio-Rad, Espanya). Com a estàndard per a la recta patró es van utilitzar diferents concentracions conegudes (entre 0.2 i 1.2 mg/ml) de la proteïna BSA (Bovine Serum Albumin). L'extracte proteic purificat es va diluir 1:10, 1:20 i 1:50 amb tampó de lisis per a la seva correcta quantificació. La lectura de les quantificacions es van fer a una longitud d'ona de 750 nm amb el lector de plaques Varioskan[®] Flash (ThermoScientific).

El marcatge de les proteïnes es realitzà amb CyDye DIGE Fluor minimal dyes (GE Healthcare, USA). Cada gel estava format per una parella d'aïllats bacterians (aïllat relacionat amb cas clínic i aïllat no relacionat) i un estàndard intern per a poder realitzar la comparació de gels. Cada gel es va fer per duplicat i el marcatge (Cy3 i Cy5) de la parella d'aïllats es va intercanviar per evitar que les variacions de proteïnes obtingudes no fossin pel procés de marcatge. L'estàndard intern es va preparar fent una barreja de 25 μ g de proteïna de cada un dels 6 aïllats, i sempre va ser marcat amb Cy2. El marcatge es realitzà amb 50 μ g de proteïna i 400 pmol de Cy en un volum final de 1 μ l de N,N-dimetilformamida anhidra. La reacció es va dur a terme en gel durant 30 minuts i es va aturar afegint 10 mM de lisina i incubant durant 10 minuts més. Les proteïnes marcades de cada parella es van barrejar equitativament amb l'estàndard

intern i es va arribar a un volum final de 250 µl amb tampó de càrrega (7 M Urea, 2 M Tiourea, 4 % CHAPS, 2 % DTT, 2 % IPG Buffer pH 3-10 (GE Healthcare), 0.002 % Blau de Bromofenol Blue).

Separació bidimensional

Les proteïnes marcades van ser separades en la primera dimensió segons el seu punt isoelèctric (isoelectroenfoc (IEF)) i després en la segona dimensió segons el seu pes molecular (SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)).

La primera dimensió es va realitzar en tires IPG de 24 cm lineals de pH 3-10 (Immobiline DryStrip linear gradient pH 3-10, GE Healthcare) en l'aparell Ettan IPGphor (Amersham Bioscience) segon Görg *et al* [163]. Les tires IPG es van rehidratar durant la nit utilitzant 450 µl de tampó de rehidratació (7 M Urea, 2 M Tiourea, 4 %CHAPS, 1 %tampó IPG pH 3-10, 100 mM Solució DeStreak, i 0.002 % Blau de Bromofenol) a temperatura ambient.

La mostra diluïda en tampó de càrrega es van dispensar per la banda àcida de la tira utilitzant una copa. Les proteïnes es van enfocar a la tira a 65 kVh amb un programa amb diferents etapes que consistia en 300 V 3 hores, 1000 V 6 hores, 8000 V 3 hores, 8000 V 5 hores 40 minuts i un pas de seguretat addicional de 50 V.

Després de l'enfocament de les proteïnes segons el seu punt isoelèctric en la tira IPG, aquestes tires van ser equilibrades durant 15 minuts en solució reductora (6 M urea, 100 mM Tris pH 8.0, 30 % glicerol, 2 % SDS, 0.002 % Blau de Bromofenol i 0.5 % DTT) i 15 min en solució alquilant (6 M Urea, 100 mM Tris pH 8,0, 30 % Glicerol, 2 % SDS, 0.002 % Blau de Bromofenol i 2.25 % Iodoacetamida) amb agitació suau.

La segona dimensió es va fer en el sistema d'electroforesis Ettan DALT 6 (GE Healthcare) amb gels d'acrilamida/bisacrilamida al 12.5 % en plaques de vidre de baixa fluorescència. Es van córrer simultàniament els 6 gels a 20 °C, 2.5 W durant 30 minuts i 17 W fins que el Blau de Bromofenol arribà a la part inferior del gel (aproximadament 7 hores).

Anàlisi dels gels

Els gels van ser escanejats a l'equip Typhoon 9400 Variable Mode Imager and Typhoon TRIO Variable Mode Imager (GE Healthcare, USA). L'adquisició de la imatge es va realitzar a les longituds d'ona excitació/emissió de 488nm/520nm, 532/580nm i 633/670nm per a Cy2, Cy3 i Cy5 respectivament, amb una resolució de 100 µm/píxel. Tant l'anàlisi de la imatge com la quantificació estadística dels nivells relatius de proteïna es realitzaren amb el programa Progenesis SameSpot v3.0 (NonLinear Dynamics, Newcastle, UK).

En les anàlisis estadístiques es van comparar el grup que contenia els aïllats relacionats amb casos clínics i el grup d' aïllats no relacionats amb casos clínics. Només els punts (spots) que estaven presents en els tres aïllats del grup van ser considerats com a proteïnes potencials per a la comparació. Els punts que tenien un canvi d'expressió (fold-change) per sobre de 1.5 entre els grups i un valor p inferior a 0.005 ($p < 0.005$) en el test ANOVA van ser definits com a proteïnes expressades diferentment entre els dos grups amb significança estadística.

El clúster jeràrquic amb els punts estadísticament significatius es van realitzar amb el programa Qlucore Omic v.2.3 (Qlucore AB, Suècia).

Identificació de proteïnes

Per a la identificació de les proteïnes diferencials obtingudes en els gels 2D, es va escollir un dels gels escanejats anteriorment per a fer una tinció de proteïnes globals amb el kit Flamingo Fluorescent Gel Staining (Bio-Rad). Per a dur a terme aquest protocol es va fixar el gel amb una solució d'etanol al 10 % i àcid acètic al 7 % durant la nit a 4 °C. Després de la fixació el gel es va tenyir amb la solució Flamingo Fluorescent Gel Stain 1x. El gel es va escanejar en l'equip 9400 Variable Mode Imager (GE Healthcare, USA) i a partir d'aquesta nova imatge utilitzant el programa Progenesis SameSpot v3.0 es van marcar les proteïnes diferencials.

Aquests punts diferencials van ser retallats amb l'equip Ettan Spot Picker (GE Healthcare) i es van deshidratar progressivament utilitzant dos solucions de 25 mM de

bicarbonat d'amoni amb 5 %, 50 % i finalment 100 % d'acetonitril. Les proteïnes immerses en l'acrilamida seca es va digerir utilitzat entre 10 i 15 µl de solució de digestió (40 mM bicarbonat d'amoni, 10 % acetonitril i 0.04 µg de tripsina de grau de seqüenciació (Promega)). Es va deixar 15 minuts per a que l'acrilamida es rehidrates i passat aquest temps es va retirar el tampó sobrant. L'acrilamida rehidratada amb el tampó de digestió es va incubar a 37 °C durant 3 hores. Passat aquest temps es va procedir a la elució dels pèptids amb 130 µl de Trifluoroacètic (TFA) al 2 % incubant durant 30 minuts en agitació. La solució es va traspasar a un nou tub de microcentrífuga, i es va repetir el mateix pas dos cops més amb 100 µl de TFA al 2 %. El volum final en el nou tub de microcentrífuga era de 330 µl, i en aquest volum es troben els pèptids eluïts de l'acrilamida però molt diluïts. Per a concentrar els pèptids es va assecat tot el volum en el SpeedVac (Eppendorff) a una temperatura de 37 °C. Els pèptids es van resuspendre en 10 µl de TFA al 0.1 %. Per a la seva completa dissolució es van deixar els tubs en gel durant 10 minuts. Per a la eliminació de les sals es van utilitzar puntes amb matriu C18 (ZipTips, Millipore).

L'espectrometria de masses (MS) es va realitzar en un equip "autoflex speed TOF/TOF MALDI mass spectrometer" de Bruker Daltonics. Per a l'adquisició dels espectres, les mostres es van barrejar amb matriu HCCA (àcid alfa-ciano 4-hidroxicinàmic) dissolta en un solvent d'acetonitril al 85 %, trifluoroacetic al 0.1 % i 1 mM de fosfat d'amoni, i seguidament van ser dispensades en una placa AnchorChip Standard MALDI target. Les mostres es van deixar assecat a la placa a temperatura ambient i posteriorment van ser analitzades a l'espectròmetre de masses MALDI. Els paràmetres d'adquisició van ser els següents: la font d'ions 1 estava a 19 kV, la font d'ions 2 a 16.65 kV, la Lent a 7.8 kV, el voltatge del Reflector 1 es va ajustar a 21 kV, i el del Reflector 2 a 9.65, i el detector del reflector es va fixar a 1.95 kV. El deflector de masses es va configurar a 1000 Da i el laser era smartbeamTM-II a 250 Hz. El programa d'adquisició utilitzat va ser FlexControl 3.3 (Bruker Daltonics). Els espectres s'adquireixen en l'equip que prèviament havia estat calibrat utilitzant un calibrador extern (Peptide Calibration Standard I, Bruker Daltonics). Cada espectre va ser anotat utilitzant l'algoritme de captura (snap algorithm) amb un punt de tall de soroll de fons de 3. Es va aplicar la línia de correcció de base per "TopHat". També es va aplicar una calibració estadística i els pics més comuns es van atribuir tant a la queratina i a la

tripsina que van ser eliminats de l'espectre final. Les proteïnes no identificades per MS van ser sotmeses a un anàlisi de fragments PSD (Post-Source Decay Analysis) dels pics seleccionats (anàlisi MS/MS) seguint els següents paràmetres: la font d'ions 1 es va ajustar a 6 kV, la font d'ions 2 a 5.25 kV, el voltatge de la lent a 3 kV, el voltatge "LIFT" 1 a 19 kV, el voltatge "LIFT" 2 a 4.2 kV, el reflector 1 a 27 kV, i el reflector 2 a 11.6 kV. L'adquisició de la "parent mass" a la finestra va ser establerta a 0.65 % de "parental mass". No es va aplicar el paràmetre de deflector de massa.

Els espectres processats van ser buscats a la base de dades NCBI nr [164]. La taxonomia va ser fixada a "Altres proteobacteris" (que inclou 1.619.185 seqüències de qualsevol *Proteobacteria* excepte *Agrobacterium tumefaciens*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis* i *Salmonella* sp.). El motor de cerca va ser Mascot 2.3 (Matrixscience) i els paràmetres de cerca van ser fixats a: l'enzim utilitzat: tripsina; els punts de tall perduts: màxim de 2; modificacions globals: carbamidometilacions en cisteïnes; modificacions variables: oxidacions a les metionines i finalment la tolerància: 50 ppm. Només es van considerar les proteïnes i/o pèptids (cerques MS/MS) amb una puntuació Mascot per sobre del llindar d'identitat establert a 75.

Les proteïnes identificades van ser classificades segons el seu procés biològic en Gene Ontology (Uniprot [165]), i van ser classificades funcionalment com: a) enzims, b) síntesi de paret cel·lular, c) traducció, d) modificacions post-traduccionals, recanvi de proteïnes i funció chaperona, e) proteïnes d'estrès, i f) altres.

PCR quantitativa (qPCR)

L'extracció d'ARN total es va realitzar amb el kit RNA NucleoSpin (Macherey-Nagel), basat en l'extracció per columnes. Per això, es va homogeneïtzar la mostra utilitzant 10^9 bacteris en 100 μ l de tampó TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8) amb 1 mg/ml de lisozim, i es va incubar a 37 °C durant 10 minuts. Posteriorment, per a assegurar la completa lisis bacteriana es va afegir 20 μ l de Proteinasa K a 20 mg/ml i es va incubar durant 1 hora a 56 °C. Un cop acabada la lisis bacteriana es va procedir amb el protocol assenyalat per la casa comercial. Aquest consistia en la preparació de la mostra per a la

unió del ARN al filtre de la columna, l'eliminació de l'ADN amb rDNAsa, i diferents rentats amb tampons proveïts pel fabricant. Finalment l'elució de l'ARN es va realitzar afegint 60 µl d'aigua molecular lliure de ARNases.

L'ARN obtingut va ser quantificat amb ND-1000 Spectrophotometer i es va ajustar la concentració a 100 ng/µl amb aigua de grau molecular.

L'ARN total es va retrotranscriure a l'ADN copia (ADNc) utilitzant el kit SuperScript VILO cDNA (Invitrogen). La reacció es va fer en tubs de 200 µl en un volum final de 20 µl que consistien en 4 µl de reactiu SuperScript VILO i 100 ng d'ARN. La reacció es va dur a terme en un termociclador utilitzant el següent programa: 10 minuts a 25 °C, 60 minuts a 42 °C, 5 minuts a 85 °C per a la desnaturalització de l'enzim, i es va baixar la temperatura a 4 °C.

De les proteïnes identificades com a diferencials en l'estudi proteòmic es va seleccionar un grup per a l'estudi de validació d'expressió gènica (ARN). Les proteïnes escollides per a la determinació de l'expressió gènica són aquelles que presentaven punts amb p-valors més baixos i uns ratios de volums normalitzats més alts entre els grups.

Es va valorar l'expressió gènica dels gens *piperidine-6-carboxylate dehydrogenase*, *cystathionine beta-lyase*, *elongation factor Tu*, *inosine-5'-monophosphate dehydrogenase*, *acyl CoA C-acetyltransferase*, *malate dehydrogenase*, *aconitate hydratase*, *aminopeptidase N*, *catalase/(hydro)peroxidase KatG*, *FOF1 ATP synthase subunit delta*, *global stress protein GspA*, i *oligopeptidase A*.

Com a gen control ('housekeeping') per a la normalització de les dades es va fer servir el nivell d'expressió del gen *16S rRNA* [166,167].

Els encebadors utilitzats per a cada gen es troben a la taula 2. Aquests encebadors van ser dissenyat amb la eina en línia PrimerBlast [168]. Les condicions utilitzades per al disseny dels encebadors va ser: Tm a 60 °C; mida de l'amplicó entre 90-120 pb; GC entre 40-60 %; i especificitat en front de *Legionella pneumophila*.

Aquest assaig per als diferents gens es va fer amb cultius de les soques a fase post-exponencial. Els cultius es van fer de la mateixa manera que per a l'estudi proteòmic, per tal d'evitar variacions entre els diferents estadis de creixement.

Taula 2. Encebadors utilitzats per a la valoració de l'expressió gènica

Gen	Seqüència 3'-5'	T _m (° C)	Mida amplificó (pb)
<i>malate dehydrogenase</i>	F-AACGCCATATGCCTCATGTGCT R-CTAGTATGGCGGCTACAGCAAC	57	110
<i>aconitate hydratase</i>	F-GGCTCTTCTCGGATTGGGC R-TGGAACGATGGATTGCTCAAAGC	58	91
<i>succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit</i>	F-GGCCCTGCTGGACTTTTACA R-TTGAGTCCCTTCGGGCATAC	59	152
<i>FOF1 ATP synthase subunit delta</i>	F-CTCCAGCGCAACAACAGCGT R-TAGCGCTCCGCCAAGCAAGG	59	104
<i>acyl CoA C-acetyl transferase</i>	F-ATGGCGGGGCGATGCGCTTTA R-GCTGTTGCTTACCACCGCC	59	139
<i>cystathionine beta-lyase</i>	F-TTGCAAAATTCATGCGGCGCT R-CAGTGCCTTTGCATACGAACGGATA	57	95
<i>inosine 5' monophosphate dehydrogenase</i>	F-GGTGACGTTTGTAAGCGTTGGC R-CGGTCACTTGACCCCTGAGCTA	57	176
<i>piperidine 6-carboxylate dehydrogenase</i>	F-CGGACACTGGATGAGGCTAT R-ACAATCACTCCACAAGCACTG	58	120
<i>cell division protein MraZ</i>	F-TCGTGATGATAGGCCAGGGA R-TCCGTCATGGACGCTTCTTC	60	100
<i>elongation factor-TU</i>	F-ACGAATCAGCGAGCAGACAT R-GAACACCTACCTGGCGAGAC	59	177
<i>oligopeptidase A</i>	F-CTCGCATATTTTTGGGGTGG R-AGCATCGGCTGCTTTTCTTG	59	178
<i>aminopeptidase N</i>	F-GATGCAAGCGGCATGTGAG R-ATATCCGCTGCCATCCAACG	60	163
<i>shot chain dehydrogenase/reductase family oxidoreductase</i>	F-AATCAATAATGCGGGTTTGGCT R-CATCCCTGGGAGAATTAGCCG	60	130
<i>catalase/(hydro)peroxidase KatG</i>	F-TGGCCGGCTAATGATCCTC R-GCGGCATTACGCCTAAAAC	59	137
<i>global stress protein gspA</i>	F-CCTTTCGACTTGCGATCACA R-GAATGATGCGTGGTTTCGCT	59	111
lpg2867	F-TTTCAGGAAGCCCGGATTGA R-CATGCTGGAATTGCCAAGACT	59	165
16S rRNA	F-GACGATCGGTAGCTGGTCTG R-CTCCTCCCCACTGAAAGTGC	60	175

La reacció de PCR quantitativa (qPCR) es va realitzar en plaques de 384, en un volum final de 10 µl. Aquesta reacció contenia 4 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen), 0.3 µl d'encebador F i R a 10 µM i 3 µl de ADNc diluït 1:100. La reacció es va dur a terme en l'equip LightCycler 480 (Roche) utilitzant el següent programa: 1 cicle de 10 minuts a 95 °C, 35 cicles que consistien en 15 segons a 95 °C, 1 minut a 60 °C, i adquisició de fluorescència durant 1 segon a 75 °C. Al finalitzar l'amplificació es van realitzar les corbes de "Melting" que consistien en una desnaturalització completa

del ADN a 95 °C, baixar la temperatura a 55 °C per a obtenir les dobles cadenes de ADN específiques de l'amplicó, i a partir d'aquí una adquisició continua de la senyal de fluorescència mentre s'augmenta la temperatura 0.07 °C/segon. Cada mostra i gen es va fer per triplicat.

Utilitzant el programa LighCycler 480 es van calcular els punts de tall (Cp) per a cada mostra i gen.

Per a la comparació dels nivells d'expressió dels gens es van utilitzar els Cp dels gens control per a la normalització de les dades a través d'aquesta formula:

$$2^{\Delta C_p}, \text{ on } \Delta C_p = C_{p \text{ gen d'interès}} - C_{p \text{ gen control}}$$

Assajos enzimàtics

Com a tècnica complementaria a la comprovació del nivell d'expressió de proteïnes diferencials obtingudes en l'estudi proteòmic es van realitzar dos assajos enzimàtics relacionats amb el cicle de Krebs. En aquests assajos es va valorar l'activitat enzimàtica de Aconitat hidratasa i Malat deshidrogenasa en els mateixos aïllats utilitzats per a la qPCR. Aquests aïllats van ser cultivats i recollits en la fase post-exponencial tal i com estava realitzat l'estudi proteòmic i el d'expressió gènica.

Aconitat hidratasa

L'activitat aconitat hidratasa es va mesurar utilitzant el kit Aconitase Activity Assay (Novagen, Millipore), que mesura l'activitat de l'enzim a la mostra a través de la reacció catalitzada d'isocritat a cis-aconitate, provocant un augment de l'absorbància a una longitud d'ona de 240 nm amb un coeficient d'extinció molar de 2.2 OD/mM per pou.

Per a la valoració de l'activitat enzimàtica es fa una extracció de proteïnes totals de 10^9 bacteris, els quals es van resuspendre en 250 µl de preservant d'aconitasa i 20 µl de detergent (subministrat en el kit). Aquesta barreja es va deixar en gel durant 20 minuts i després es van fer 4 polsos de sonicació en Omni-Ruptor 4000 Ultrasonic Homgenizer (OMNI International, Gerogia, USA). L'extracte es centrifugà a 20000 xg

durant 10 minuts a 4 °C i l'extracte proteic del sobrenedant es quantificà amb el kit DC Protein Assay (Bio-Rad) per a la posterior normalització de les dades.

L'assaig es va realitzar en plaques de 96 pous. Per cada assaig es preparava el tampó d'Activitat afegint un volum 1:25 d'isocitrat i un volum 1:100 de manganès en el Tampó subministrat en el kit. Per a cada mostra s'utilitzava 50 µl de extracte prèviament quantificat i 200 µl de tampó d'activitat. A cada assaig es va incloure un control blanc de la reacció, per a la correcció dels càlculs, que consistia en mesurar la producció de NADH sense enzim en el Tampó d'activitat.

La mesura de la cinètica de la reacció es realitzà per quantificació de l'absorbància a una longitud d'ona de 240nm en intervals de 60 segons amb un Auto-shake de 3 segons entre les mesures del Varioskan[®] Flash (ThermoScientific). L'activitat de l'enzim es va expressar en µmols/min/mg d'extracte i va ser quantificada a través d'aquests càlculs:

$$\frac{\Delta OD}{\Delta t} * \frac{1000 * 161}{\text{mg de proteïna per pou}}$$

Malat deshidrogenasa

L'activitat Malat deshidrogenasa (MDHasa) es va quantificar amb un assaig que mesura la quantitat de NAD oxidat produït per aquest enzim segons la reacció següent:



Per a la valoració de l'activitat d'aquest enzim es va utilitzar un extracte proteic de 10⁹ bacteris, els quals es van resuspendre en 500 µl de tampó d'extracció (20 mM Hepes, pH 7.1, 1 mM DTT, 100 mM KCl, i inhibidors de proteases Complete Mini (Roche)). La suspensió es va sotmetre a 4 polsos de sonicació en Omni-Ruptor 4000 Ultrasonic Homgenizer. L'extracte proteic es va centrifugar 12000 xg durant 5 minuts a 4 °C. Es va recollir el sobrenedant i es va quantificar amb el kit DC Proteins Assay (Bio-Rad).

La reacció es va dur a terme en plaques de 96 pous que contenien 125 µl de tampó de reacció (100 mM Imidazol, pH 7.1, 200 mM KCl, 2 mM EDTA, i 10 mM MgSO₄), 12.5

µl d'extracte cru a una concentració entre 50 i 100 µg de proteïna, 12.5 µl de NADH a 4 mM, i 87.5 µl d'aigua miliQ. La reacció MDHasa comença en afegir 12.5 µl d'oxalacetat a 100 mM. Prèviament a l'inici de la reacció es va fer una lectura a 340 nm. A partir del moment d'afegir l'oxalacetat l'absorbància va disminuint progressivament en funció de la quantitat de MDHasa present a la mostra. La disminució de l'absorbància es va monitoritzar durant 15 minuts fent lectures cada 60 segons amb un Auto-shake de 3 segons entre cada lectura.

L'activitat de l'enzim es va expressar en mUnitat/mg de proteïna, i es va tenir en consideració que 1 unitat a 340 nm equival a 161 nmols de NADH. El càlcul realitzat va ser el següent:

- Ratio (mOD/min)=

$$\frac{\text{Abs (temps 1)} - \text{Abs(temps 2)}}{\text{temps 1} - \text{temps 2}} * 1000$$

- Ratio corregit (mOD/min)= Ratio_{mostra}-Ratio_{blanc}
- µM/min = (Coeficient d'extinció molar: 2.2 mM⁻¹ per prou)

$$\frac{\text{Ratio corregit}}{\text{Coeficient d'extinció molar}}$$

- nmols/min=

$$\frac{\mu\text{M/min}}{\text{Volum del pou en ml (0.25 ml)}}$$

- µmols/min/mg d'extracte=

$$\frac{\text{nmols/min}}{\mu\text{g de proteïna per pou}}$$

Anàlisis estadístiques per qPCR i assajos enzimàtics

Les anàlisis estadístiques es van realitzar en el programa SPSS (versió 19 SPSS, Chicago, IL, USA). La comparació dels nivells d'expressió i activitats enzimàtiques entre els aïllats ambientals relacionats amb casos i els aïllats ambientals no relacionats es va fer utilitzant el test estadístic U de Mann-Whitney i on valors *p* eren ≤ 0.05 es van

considerar com a diferències significatives entre els dos grups.

Citopatogenicitat en cèl·lules “*macrophages-like* U-937”

L'estudi de la citopatogenicitat dels aïllats seleccionats per a l'estudi proteòmic es va realitzar en la línia cel·lular U-937 (ATCC CRL-1593.2). L'assaig d'infecció es va realitzar per triplicat a cada aïllat de *L. pneumophila* seleccionat.

Les cèl·lules van ser cultivades en medi RPMI 1640 complementat amb L-glutamina (Lonza) 10 % de sèrum fetal boví (SFB) (), 100 U/ml de penicil·lina i 75 µg/ml de estreptomicina. Els cultius es van mantenir a 37 °C amb una atmosfera del 5 % de CO₂ en flascons de T-125, a una concentració de 3·10⁴ cèl·lules/ml inicial i ajustada cada 2-3 dies centrifugant els cultius a 1200 rpm durant 6 minuts.

Les cèl·lules es van comptar amb la tinció d'exclusió i viabilitat blau trià (SIGMA) en càmera de Neubauer.

Per a realitzar la infecció cel·lular amb els aïllats de *L. pneumophila* les cèl·lules van ser diferenciades a macròfags en flascons T-75 en posició horitzontal per a promoure l'adhesió dels macròfags al flascó. Per a la diferenciació, es van utilitzar 25 milions de cèl·lules en un volum total de 25 ml de medi de cultiu RPMI amb 5 % SFB, 50 U/ml de penicil·lina, 37.5 µg/ml de estreptomicina i 10⁻⁸ M de forbol miristat acetat (PMA). Els flascons van ser incubats a 37 °C amb una atmosfera al 5 % de CO₂ durant 3 dies.

Després de les 72 hores d'incubació per a la diferenciació cel·lular, les cèl·lules es van recollir dels flascons per tripsinització. Aquest procés consistia en l'eliminació del medi de cultiu de les cèl·lules, fer un rentat amb 7 ml de PBS estèril, i finalment afegir 7 ml de tripsina 5x (Lonza) i incubar durant 8-10 minuts a 37 °C i 5 % de CO₂. Passat aquest temps es va comprovar que les cèl·lules estaven desenganxades i es va aturar la reacció afegint 7 ml de medi RPMI amb 5 % SFB. Les cèl·lules es van centrifugar a 1200 rpm durant 6 minuts, per eliminar la tripsina, es van resuspendre en 3 ml de medi RPMI, i es van comptar amb blau tripà utilitzant la cambra de Neubauer. La concentració cel·lular es va ajustar a 2.2·10⁶ cèl·lules/ml amb medi RPMI 5 % SFB i antibiòtics. Aquestes cèl·lules van ser repartides en plaques de 96 pous, on a cada pou es van sembrar 220000 cèl·lules (100 µl de suspensió). Les plaques es van incubar

durant 24 hores a 37 °C en una atmosfera del 5 % de CO₂ per assegurar la seva adhesió. Abans de procedir amb la infecció es van realitzar 2 rentats de les cèl·lules amb 90 µl de medi RPMI 5 % SBF sense antibiòtics.

Cada placa de 96 pous va ser utilitzada per a l'assaig d'infecció d'un aïllat. Els aïllats van ser cultivats en places de medi BCYE durant 72 hores a 37 °C. El creixement bacterià es va resuspendre en medi RPMI amb 5 % SBF sense antibiòtics a una DO625nm entre 1.9-2.1, que equival a una concentració bacteriana de l'ordre de 10¹². Amb aquesta suspensió es van fer dilucions amb medi RPMI-5 % SBF per a la infecció cel·lular (Figura 4) .

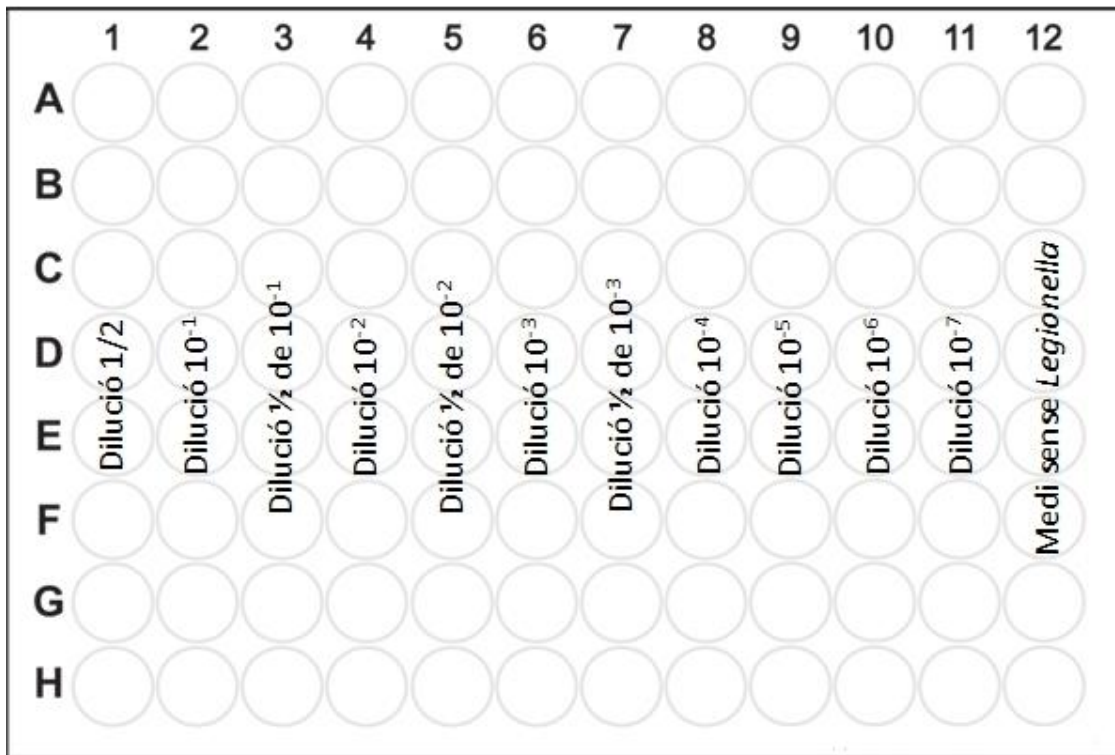


Figura 4. Esquema d'infecció cel·lular.

Es va retirar el medi de cultiu de les cèl·lules i cada columna de la placa es van infectar amb 100 µl d'una dilució determinada (Figura 4), excepte la última que contenia només medi RPMI-5 % SBF sense bacteri. Aquesta columna va servir com a control de viabilitat cel·lular.

Les cèl·lules infectades es van incubar durant 90 minuts a 37 °C en una atmosfera del 5 % de CO₂. Després d'aquesta incubació es van fer dos rentats amb 90 µl de medi RPMI-5 % SBF sense antibiòtics, un rentat amb 100 µl de medi RPMI-5 % SBF amb 50

$\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, i 3 rentats més amb RPMI-5 % SBF, durant 30 minuts cadascun. Finalment, es van afegir 200 μl de medi RPMI-10 % SBF i es va incubar durant 72 hores a 37 °C en una atmosfera del 5 % CO_2 .

La viabilitat cel·lular es va determinar mitjançant un assaig MTT, en el que es determina l'activitat de la deshidrogenasa mitocondrial. Després de la incubació de 3 dies, es va retirar el medi de cultiu i es van afegir 100 μl de medi RPMI sense Roig Fenol, amb 5 % SBF i 0.5 mg/ml de MTT (bromur de 3-(4,5-Dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli) (Sigma). Les plaques es van incubar durant 4 hores a 37 °C en una atmosfera del 5 % de CO_2 . La reacció es va aturar afegint 100 μl isopropanol amb 0.04 N HCl. Es va resuspendre el precipitat format i es va incubar durant 10 minuts a 37 °C-5 % CO_2 . La lectura de les plaques es va fer mesurant l'absorbància en una longitud d'ona de 570 nm a l'equip Varioskan[®] Flash (ThermoScientific). A cada experiment es va calcular la fracció de supervivència (f) com el ratio de les cèl·lules infectades respecte les no infectades. Per a la determinació del valor citopàtic es va utilitzar el logaritme en base 10 de 1-f ($\log(1-f)$).

A partir dels resultats obtinguts en l'assaig MTT es va calcular la citopatogenicitat relativa de cada aïllat, determinat per l'efecte citopàtic en les cèl·lules. Aquest efecte citopàtic es va definir com el mínim nombre de bacteris necessaris per a produir efecte citopàtic en el 50 % de les cèl·lules U937 infectades després de 72 hores d'incubació.

Les dades de l'assaig MTT es van analitzar estadísticament amb el programa SPSS (versió 19 SPSS, Chicago, IL, USA). El test estadístic aplicat va ser U de Mann-Whitney, i els p-valors inferiors a 0.05 van ser considerats com a diferències significatives entre els dos grups.

RESULTATS

Objectiu 1. Comparació de mètodes de tipatge en brots

Amb la finalitat d'avaluar la capacitat discriminatòria de les dues tècniques més utilitzades pels estudis epidemiològic-moleculars dels brots o casos esporàdics de la malaltia del Legionari (LD) es van analitzar un total de 25 investigacions de legionel·losis que van ocórrer en Catalunya entre 1989 i 2012. D'aquestes, 14 eren investigacions LD adquirides a la comunitat (AC) i 11 LD nosocomials (NOS). Es van incloure un total de 302 aïllats de *Legionella*, dels quals 55 corresponien a aïllats clínics i 247 a aïllats ambientals. Cada investigació de LD constava de 1 a 5 aïllats clínics, excepte en una de les investigacions, de la que disposàvem de 9 aïllats clínics, i de 2 a 32 aïllats ambientals (8 (IQR: 4-13)).

Panell de Dresden

Dels 302 aïllats, 269 van ser identificats com a *L. pneumophila* serogrup 1, dels quals 51 corresponien a aïllats clínics i 218 a aïllats ambientals. El 46 % dels aïllats identificats com a *L. pneumophila* serogrup 1 (140/269) eren positius per al MAb 3/1 (Figura 5A), un epítip relacionat amb virulència. Aquests 269 aïllats van ser dividits en 11 subgrups utilitzant els anticossos del Panell de Dresden (Figura 5B).

Tots els aïllats clínics AC, a excepció d'un, eren *L. pneumophila* sg 1 i MAb 3/1 positius, mentre que només 4 dels 16 aïllats clínics NOS eren positius per aquest anticòs (Test exacte de Fisher, $p < 0.001$) (Figura 6A). El subgrup Philadelphia representava la majoria dels aïllats AC (74 %), seguit de Benidorm (13 %), mentre que els grups més representatius dels aïllats NOS eren OLDA (44 %), no serogrup 1 (25 %) i Philadelphia (19 %) (Figura 6B).

Els aïllats ambientals de les investigacions AC eren majoritàriament *L. pneumophila* sg 1 i prop del 50 % eren positius pel MAb 3/1 (Figura 7A). Contràriament, una gran part dels aïllats ambientals recollits en les investigacions NOS eren MAb 3/1-negatius (59 %) i *L. pneumophila* no-serogrup 1 (27 %) (Test exacte de Fisher, $p < 0.001$).

Els subgrups majoritaris entre els aïllats ambientals AC eren Philadelphia i OLDA (26 % i 23 % respectivament), seguit per Oxford (11 %), mentre que en els aïllats NOS els

dos grups més representatius eren OLDA (46 %) i no serogrup 1 (27 %) (Figura 7B).

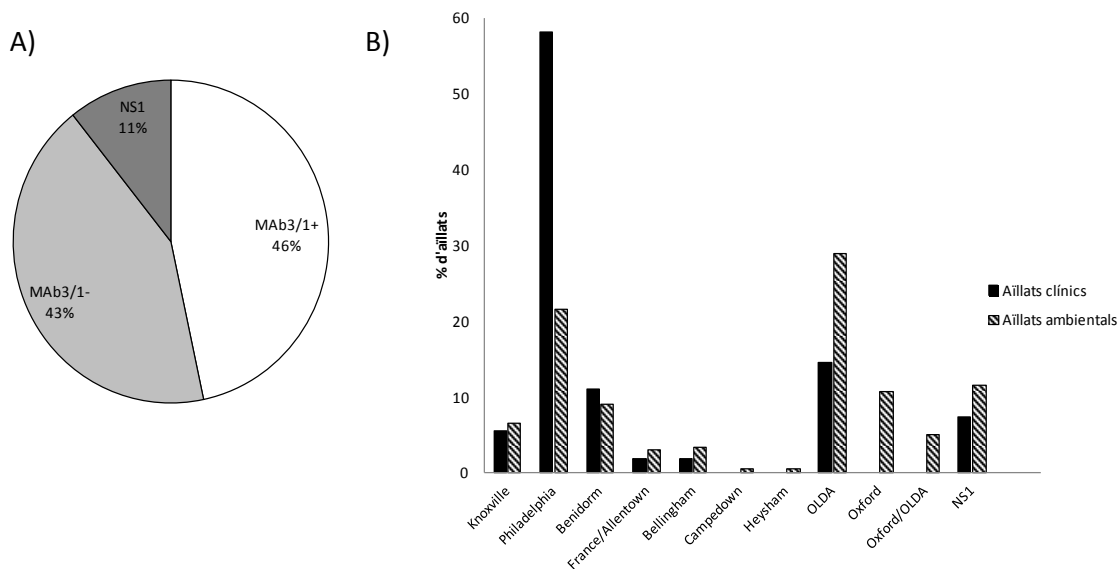


Figura 5. Classificació dels aïllats *L. pneumophila* inclosos en l'estudi. A) Distribució dels aïllats segons si són *L. pneumophila* no-sg1 (NS1) o serogrup 1 MAb3/1 positius (+) o negatius (-). B) Distribució dels aïllats segons el subgrup en la classificació de Dresden i el seu origen (NS1, *L. pneumophila* no sg1).

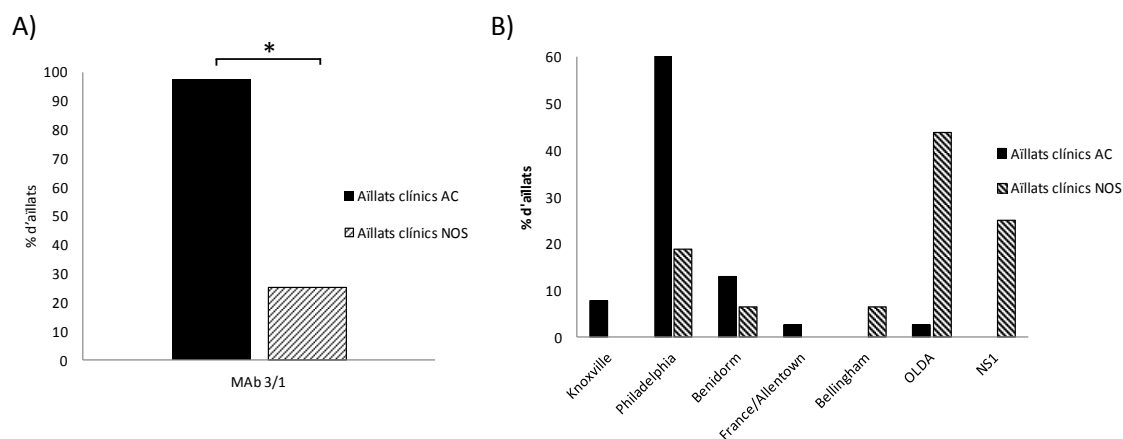


Figura 6. Distribució dels aïllats clínics *L. pneumophila* segons la seva procedència. A) Proporció d'aïllats *L. pneumophila* sg 1 Mab 3/1 positius per aïllats clínics segons la seva procedència. Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives. B) Distribució dels aïllats clínics segons el subgrup en la classificació de Dresden i la seva procedència (NS1, *L. pneumophila* no sg1).

Els aïllats ambientals molecularment associats a un mateix brot presentaven el mateix subgrup de Dresden que l'aïllat clínic. No obstant això, es van trobar aïllats ambientals molecularment no associats que presentaven el mateix subgrup Dresden que els aïllats clínics.

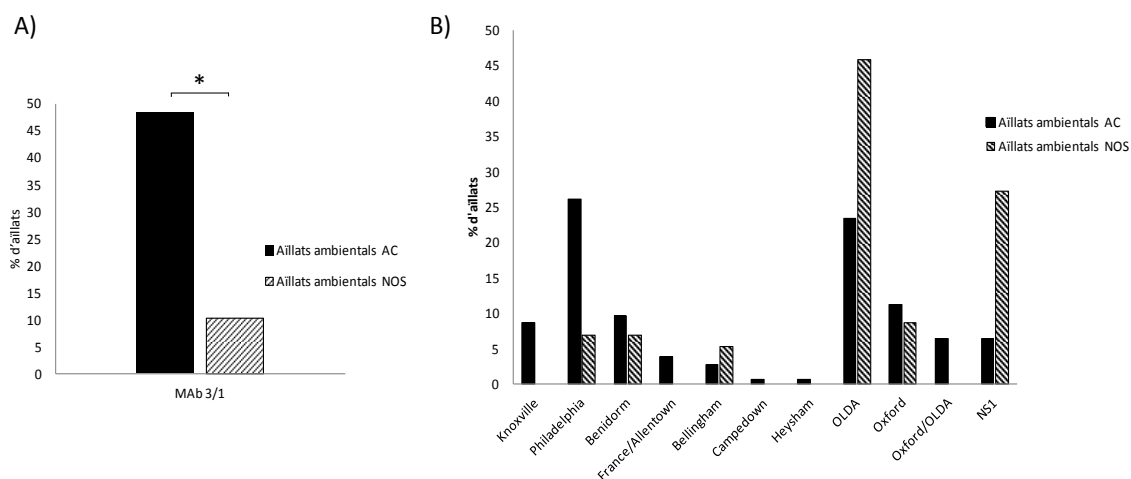


Figura 7. Distribució dels aïllats ambientals *L. pneumophila* segons la seva procedència. A) Proporció d'aïllats *L. pneumophila* sg 1 Mab 3/1 positius per aïllats ambientals segons la seva procedència. Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives. B) Distribució dels aïllats ambientals segons els subgrup en la classificació de Dresden i la seva procedència (NS1, *L. pneumophila* no sg1).

PFGE

Cada investigació estava composta per l'aïllat clínic i per aïllats ambientals que es podien dividir entre aïllats relacionats amb la infecció, mostrant un perfil idèntic o relacionat al perfil de l'aïllat clínic, i aïllats no relacionats amb la infecció (perfils PFGE no relacionats). El nombre de perfils PFGE trobats a cada investigació oscil·lava entre 1 i 10 perfils diferents.

La diversitat dels perfils PFGE va ser calculada en cada investigació utilitzant l'índex de Hunter Gaston, segons dues categories de Tenover (idèntics i relacionats). La diversitat mediana del PFGE per a la categoria idèntics era de 0.556 (IQR: 0-0.702), i per a la categoria relacionats era de 0.533 (IQR: 0-0.627).

SBT

Els 302 aïllats de *Legionella* van ser dividits en 38 STs diferents. Els aïllats clínics es van diferenciar en 19 STs i els aïllats ambientals en 33 STs.

A cada investigació, els casos clínics es va associar a un únic ST. Els STs que van causar més episodis van ser el ST 1 i ST 37, els quals van causar 5 investigacions cadascun, seguit per l'ST 23 que va ser responsable de 3 brots.

Els STs més freqüentment aïllats de l'ambient no-relacionats amb casos clínics en aquell moment van ser l'ST 1 (identificat en 12 investigacions), l'ST 8 (en 6 investigacions), i l'ST 284 (identificat en 5 investigacions).

La diversitat mediana de l'SBT entre totes les investigacions va ser de 0.533 (IQR: 0-0.608).

Comparació del PFGE front SBT

En comparar el PFGE front l'SBT es va observar que ambdós mètodes eren capaços d'identificar l'origen dels casos de LD, utilitzant com a referència l'aïllat clínic de cada cas, per tant la concordança epidemiològica de l'SBT i PFGE va ser del 100 %. No obstant això, aquestes tècniques no presentaven la mateixa especificitat molecular a l'hora de diferenciar tots els aïllats. La metodologia PFGE va mostrar un major poder discriminatori que l'SBT (Taula 3).

Aquesta major capacitat discriminatòria es va remarcar en 4 investigacions, en les que l'ST 1 es va diferenciar en 2 o 3 perfils PFGE diferents, que diferien entre 3 i 4 bandes en 3 de les investigacions i l'ST 1106 que es va dividir en 2 perfils PFGE diferents en una d'elles (Figura 8). Per tant, la concordança molecular observada en les investigacions analitzades utilitzant la categoria 'relacionats' de PFGE era del 80 %, mentre que en utilitzar la categoria 'idèntics' aquesta concordança disminuïa fins al 64 %, mostrant en ambdós casos que el PFGE mostra més variabilitat entre els aïllats que l'SBT.

La congruència entre aquests dos mètodes es va calcular amb l'índex Ajustat de Wallace (AW) utilitzant les dos categories pels perfils PFGE. Els índex AW per la categoria de PFGE idèntics eren de 0.767 i 1 per $AW_{SBT \rightarrow PFGE}$ i $AW_{PFGE \rightarrow SBT}$, respectivament. En utilitzar la categoria relacionats en PFGE, el $AW_{SBT \rightarrow PFGE}$ era de 0.883 i el $AW_{PFGE \rightarrow SBT}$ de 0.986. Aquests resultats van posar de manifest, de nou, el poder discriminatori del mètode PFGE.

La combinació de la caracterització per Dresden amb aquestes dues tècniques augmentava la diversitat en totes dues tècniques per igual.

Taula 3. Resum dels aïllats trobats en les investigacions amb mateix ST i diferent perfil PFGE

Investigació	Origen aïllat*	PFGE	ST
2	C-AC	A	181
	AMB 1	Aa (1 banda de A)	181
3	C-AC	A	8
	AMB 1	Aa (2 bandes de A)	8
4	AMB 1	E	1
	AMB 3	D	1
	AMB 2	C	284
	AMB 2	Ca (1 banda de C)	284
	AMB 4	B	1594
	AMB 4	Bb (1 banda de B)	1594
	AMB 4	Ba (1 banda de B)	1594
	AMB 2	B	1
6	AMB 2	B	1
	AMB 2	Ba (1 banda de B)	1
	AMB 2	Bb (2 bandes de B)	7
	AMB 2	C	1
	AMB 3	C	242
8	AMB 3	Ca (1 banda de C)	242
	AMB 4	C	242
	AMB 2	D	1
14	AMB 2	Da (1 banda de D)	1
	AMB 3	C	1
	AMB 4	G	1
	AMB 4	G	1
	AMB 5	G	1
	AMB 2	D	1
15	C-NOS	A	187
	C-NOS	Aa (2 bandes de A)	187
18	C-NOS	B	1106
	AMB 1	B	1106
	AMB 1	C	1106
22	C-NOS	A	48
	AMB 4	A	48
	AMB 4	Aa (1 banda de A)	48

*C-AC: Aïllat clínic AC; C-NOS: Aïllat clínic NOS; AMB: Aïllat ambiental

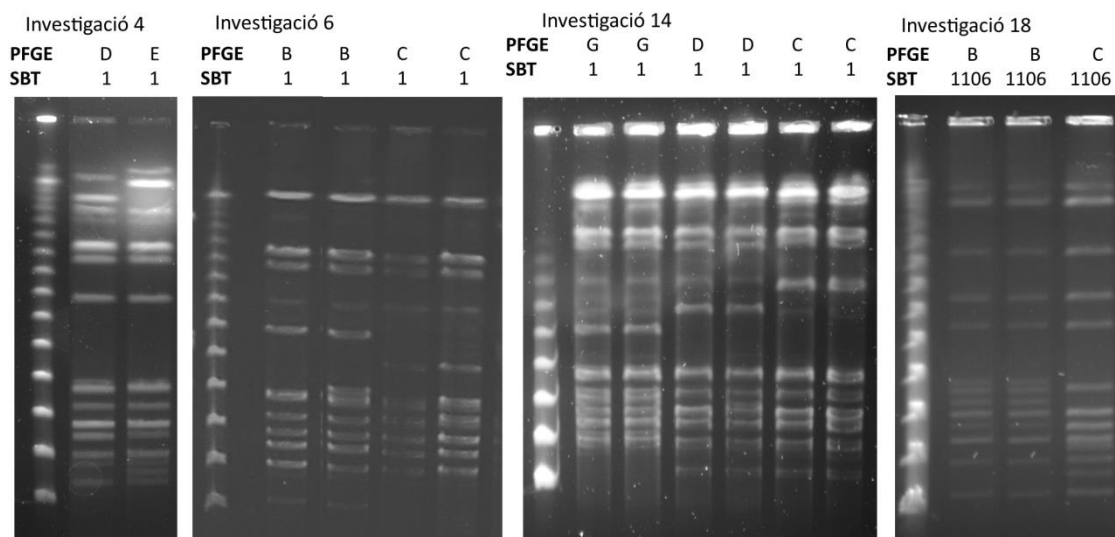


Figura 8. Aïllats de *L. pneumophila* d'una mateixa investigació amb mateix ST i perfils PFGE diferents.

Objectiu 2. Anàlisi de diversitat de poblacions

En observar en l'objectiu anterior de comparacions de tècniques que hi havia un comportament diferent dels aïllats segon el seu origen (clínic o ambiental), es va proposar realitzar un estudi de diversitat poblacional en un grup d'aïllats més ampli per les tècniques SBT i MAb. Per això, es van analitzar un total de 461 aïllats de *L. pneumophila* recollits entre 1989 i 2014 a l'àrea de Catalunya. Aquests aïllats provenien d'estudis epidemiològics de casos de legionel·losis que van ocórrer durant aquest període. Del total d'aïllats, 130 corresponien a aïllats clínics (aïllats de pacients) i 331 a aïllats ambientals. Dels aïllats recollits de pacients, 91 eren de casos de pneumònia adquirida a la comunitat (AC), 35 de pneumònies nosocomials (NOS) i 4 d'origen desconegut.

Els aïllats ambientals havien estat recollits per estudis epidemiològic-moleculars associats a casos de legionel·losis, i un cop caracteritzats es van poder dividir en aïllats relacionats amb casos (un total de 115 aïllats) i aïllats ambientals no relacionats amb casos (216 aïllats).

Per a la realització de l'estudi de diversitat es van utilitzar els aïllats clínics i els aïllats ambientals no relacionats amb casos. Les rèpliques en cada cas/brot es van eliminar, així que les anàlisis finals es van realitzar amb 94 aïllats clínics i 114 aïllats ambientals no relacionats amb casos.

Panell de Dresden

Dels 208 aïllats inclosos en l'estudi, el 86.06 % (n=179) es van identificar com *L. pneumophila* serogrup 1, i d'aquest el 51.14 % (n=90) eren positius per l'anticòs MAb 3/1. Els subgrups més amb més prevalença eren OLDA (22.93 %, n=47), Philadelphia (14.63 %, n= 30) i no-serogrup 1 (14.15 %, n=29) (Figura 9).

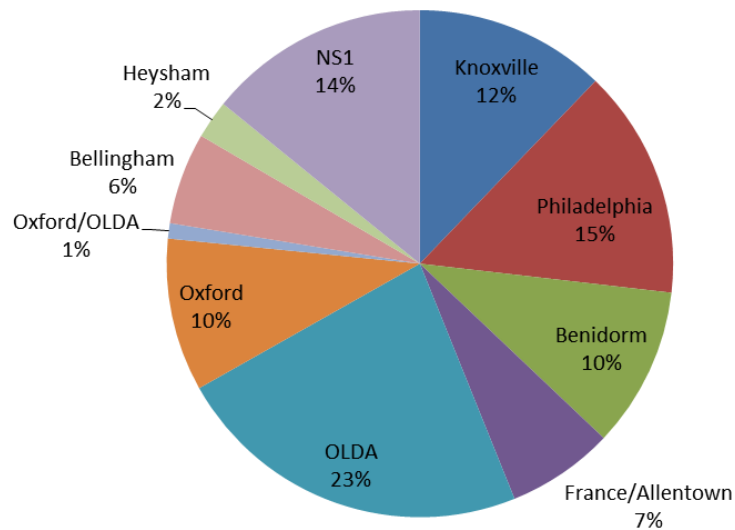


Figura 9. Distribució dels aïllats inclosos en l'estudi segons el subgrup de Dresden. (NS1 correspon a *L. pneumophila* no-sg1).

L'anàlisi de distribució de subgrups Dresden del grup d'aïllats clínics era diferent que del grup d'ambientals. El grup clínic presentava un 74.19 % (n=69) d'aïllats positius per l'anticòs MAb 3/1, mentre que el grup ambientals només presentava un 18.75 % (n=21) d'aïllats positius ($p < 0.001$) (Figura 10A). Els subgrups majoritaris en els aïllats clínics eren Philadelphia (27.96 %, n=26), Knoxville (21.51 %, n=20) i France/Allentown (13.98 %, n=13), mentre que els subgrups majoritaris dels aïllats ambientals eren OLDA (31.25 %, n=35), no-serogrup 1 (18.75 %, n=21) i Oxford (17.86 %, n=20) (Figura 10B).

Els aïllats clínics també presentaven diferències de distribució segons els seu origen d'adquisició (comunitat/nosocomial). En primer lloc, el 79.45 % (n=58) dels aïllats clínics d'origen AC eren MAb3/1 positiu mentre que entre els NOS només representaven aquest epítip el 43.75 % (n=7) ($p < 0.001$) (Figura 11A). En segon lloc, el subgrup France/Alletown (18.46 %, n=12) només es va trobar implicat en casos AC, mentre que els subgrups Oxford/OLDA (4.17%, n=1) i NS1 (33.33 %, n=8) només es van

trobar implicats en casos NOS (Figura 11B).

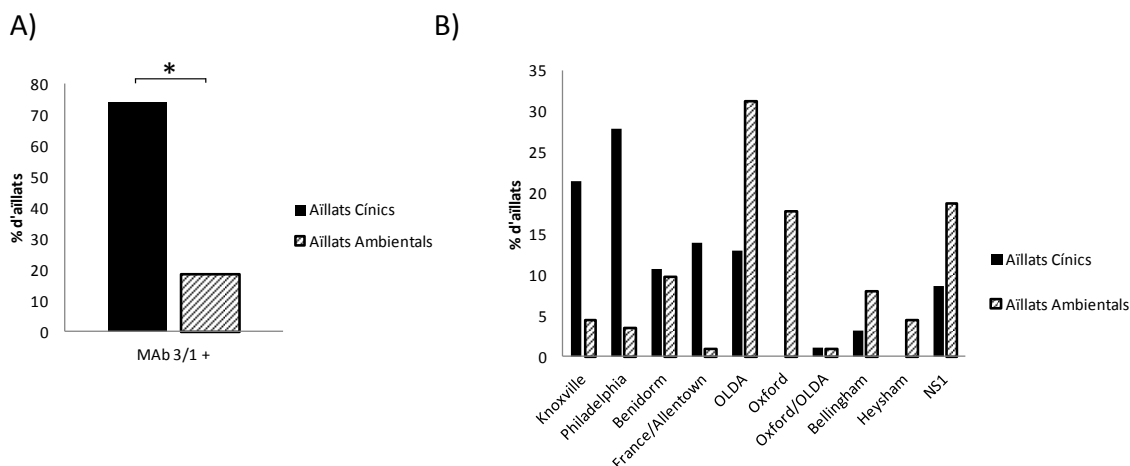


Figura 10. A) Proporció d'aïllats *L. pneumophila* sg 1 Mab 3/1 positius segons origen. Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives. B) Distribució dels aïllats segons el subgrup de Dresden i el seu origen (NS1, *L. pneumophila* no sg1).

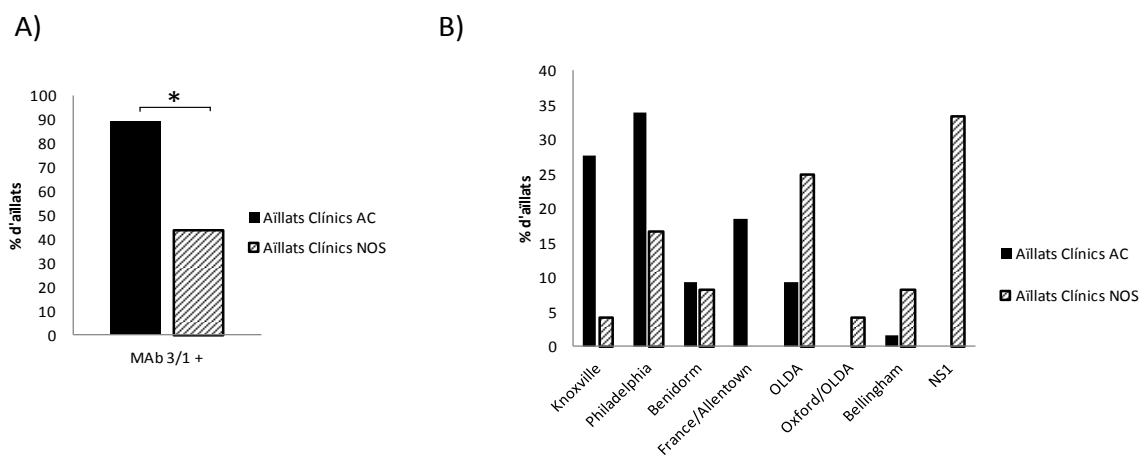


Figura 11. A) Proporció d'aïllats clínics *L. pneumophila* sg 1 Mab 3/1 positius segons origen d'adquisició. Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives. B) Distribució dels aïllats clínics segons el subgrup de Dresden i el seu origen d'adquisició (NS1, *L. pneumophila* no sg1).

SBT

El tipatge per SBT va dividir els aïllats en 79 STs diferents (IOD: 0.944). Els aïllats clínics es dividien en 43 STs diferents (IOD: 0.960) i els ambientals en 45 STs diferents (IOD: 0.896). En general, l'ST més abundant era el ST 1 trobat en un total de 42 aïllats

(20.19 %), seguit de l'ST 284 (7.21 %, n= 15), l'ST 23 (6.25 %, n= 13) i l'ST 37 (5.77 %, n= 12). La majoria d'STs es van identificar en 1 a 3 aïllats.

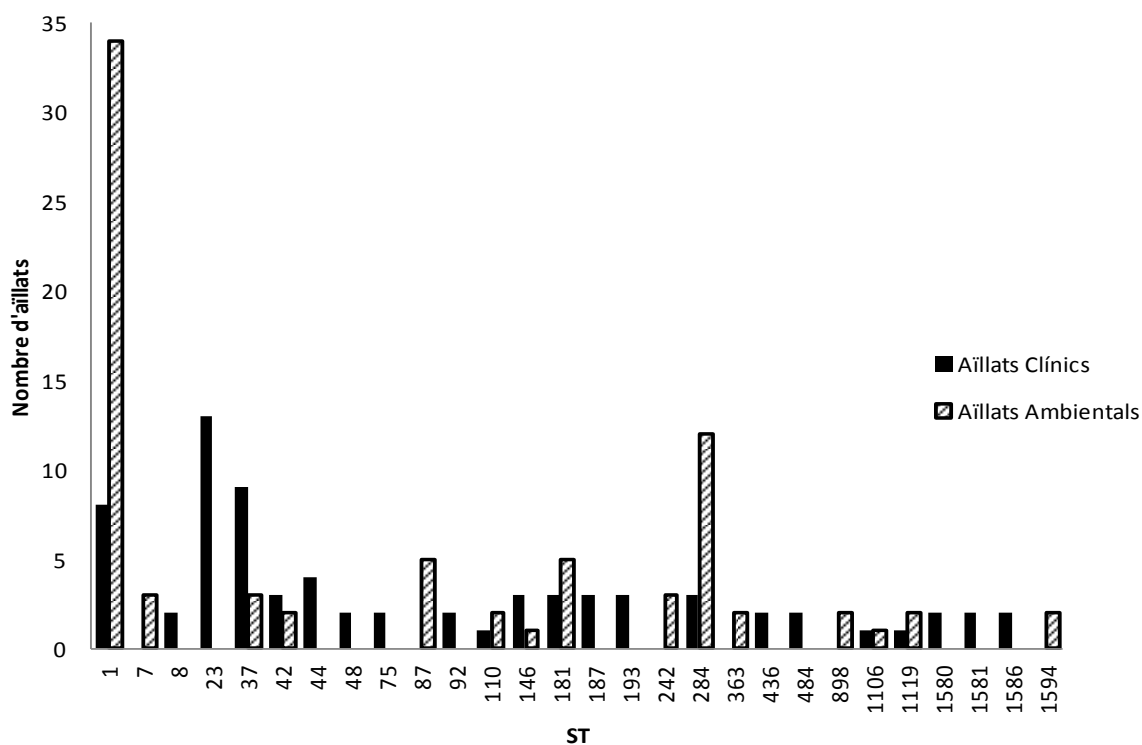


Figura 12. Distribució dels STs amb més aïllats segons l'origen d'aquests.

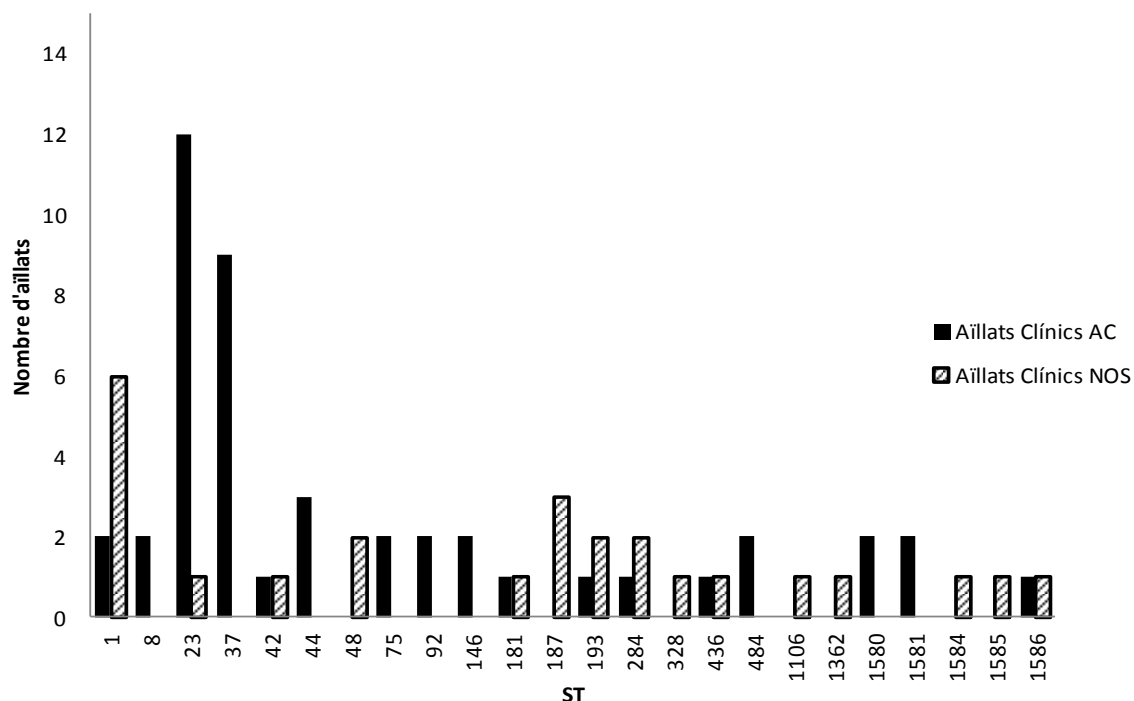


Figura 13. Distribució dels STs amb més aïllats clínics segons l'origen d'adquisició d'aquests.

En el grup d'aïllats clínics, l'ST més abundant era l'ST 23 (13.83 %, n= 13), seguit per ST 37 (9.57 %, n= 9), i ST 1 (8.5 %, n= 8). (Figura 12). Els STs més abundants en els

aïllats ambientals eren ST 1 (29.84 %, n= 34), ST 284 (10.52 %, n= 12), ST 181 (4.38 %, n= 5) i ST 87 (4.38 %, n= 5).

Segons el seu origen d'adquisició, el grup d'aïllats clínics AC i NOS variaven en la distribució d'STs. Els STs més abundants en els aïllats clínics AC eren ST 23 (18.46 %, n= 12) i ST 37 (13.84 %, n= 9), mentre que en els aïllats clínics NOS era l'ST 1 (24 %, n= 6) i ST 187 (12 %, n=3). (Figura 13).

Taula 4. Índex de Diversitat Hunter-Gaston

Variable	Anàlisi General	Aïllats Ambientals	Aïllats Clínics	Aïllats Clínics AC	Aïllats Clínics NOS
'Fenons'	0.972 (0.961 - 0.983)	0.949 (0.925 - 0.973)	0.975 (0.962 - 0.988)	0.963 (0.940 - 0.987)	0.967 (0.942 - 0.992)
ST	0.944 (0.924 - 0.964)	0.896 (0.850 - 0.942)	0.960 (0.942 - 0.978)	0.946 (0.913 - 0.979)	0.930 (0.868 - 0.992)
Dresden	0.871 (0.855 - 0.888)	0.827 (0.791 - 0.864)	0.836 (0.804 - 0.868)	0.777 (0.730 - 0.825)	0.830 (0.749 - 0.911)
<i>neuA</i>	0.845 (0.824 - 0.865)	0.817 (0.777 - 0.857)	0.819 (0.775 - 0.864)	0.758 (0.686 - 0.829)	0.893 (0.844 - 0.943)
<i>mompS</i>	0.843 (0.811 - 0.875)	0.752 (0.683 - 0.822)	0.878 (0.845 - 0.911)	0.869 (0.822 - 0.915)	0.843 (0.754 - 0.933)
<i>mip</i>	0.815 (0.789 - 0.841)	0.789 (0.743 - 0.834)	0.830 (0.792 - 0.868)	0.808 (0.748 - 0.868)	0.833 (0.752 - 0.915)
<i>asd</i>	0.806 (0.766 - 0.846)	0.692 (0.609 - 0.776)	0.860 (0.836 - 0.885)	0.859 (0.830 - 0.887)	0.783 (0.675 - 0.892)
<i>flaA</i>	0.796 (0.771 - 0.822)	0.735 (0.681 - 0.788)	0.812 (0.772 - 0.853)	0.773 (0.704 - 0.841)	0.827 (0.751 - 0.902)
<i>pilE</i>	0.760 (0.724 - 0.796)	0.690 (0.641 - 0.740)	0.809 (0.767 - 0.852)	0.809 (0.764 - 0.854)	0.753 (0.630 - 0.877)
<i>proA</i>	0.750 (0.703 - 0.797)	0.732 (0.666 - 0.799)	0.757 (0.697 - 0.818)	0.750 (0.675 - 0.826)	0.783 (0.675 - 0.892)

En els parèntesis s'indica els intervals de confiança per a cada valor

Amb les dades obtingudes de la tècnica SBT es van calcular les diversitats per a cada fragment gènic i pels grups d'aïllats segons el seu origen i la seva adquisició (ambientals, clínics, i clínics AC i NOS). En el conjunt total d'aïllats, el gen amb més diversitat era el *neuA* (0.871 CI: 0.855-0.888), com en el grup d'aïllats ambientals (0.817 CI: 0.777-0.857), mentre que al grup d'aïllats clínics era el gen *mompS* (0.878 CI: 0.845-0.911). Segons la seva adquisició, el gen amb més diversitat en el grup clínic AC continuava essent el gen *mompS* (0.869 CI: 822-0.915), però en el grup d'aïllats clínics NOS era el gen *neuA* (0.893 CI: 0.844-0.943). Per altra banda, el gen més conservat en tot el grup era *proA* (0.750 CI: 0.703-0.797), en canvi en els aïllats ambientals

corresponia al gen *pilE* (0.690 CI: 0.641-0.740) mentre que en els aïllats clínics continuava essent el gen *proA* (0.757 CI: 0.697-0.818). Els aïllats clínics AC també mantenien més conservat el gen *proA* (0.750 CI: 0.675-0.826), en canvi en els aïllats clínics NOS el gen més conservat era *pilE* (0.753 CI: 0.630-0.877) (Taula 4).

Combinació SBT i Dresden

La combinació de les tècniques SBT i Dresden va resultar en 98 'fenons' diferents (ST-Subgrup Dresden) (IOD: 0.972 CI: 0.961-0.983). El 'fenon' més abundant era el ST1-OLDA (12.5 %, n= 26), seguit dels fenons ST1-Oxford (5.77 %, n= 12), ST37-Philadelphia (5.77 %, n= 12), ST23-Philadelphia (4.33 %, n= 9) i ST284-OLDA (3.85 %, n=8) (Figura 14).

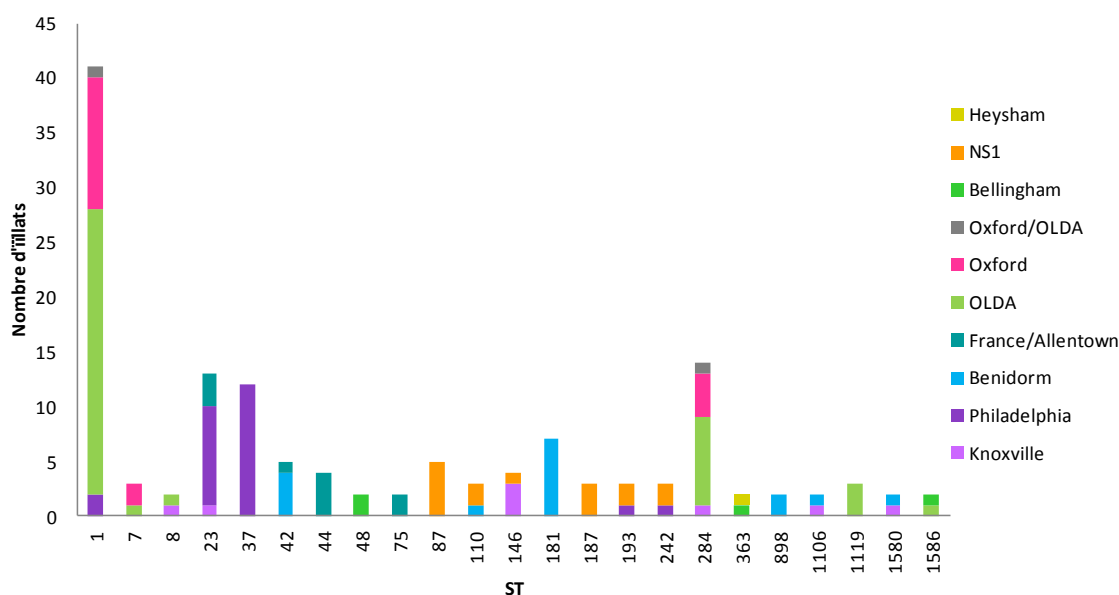


Figura 14. Distribució dels 'Fenons' més representatius en el grup d'aïllats *L. pneumophila* analitzats.

Aquesta combinació de tècniques va permetre dividir els aïllats clínics en 51 'fenons' diferents (IOD: 0.975 CI: 0.962-0.988), essent els més abundants els ST37-Philadelphia (9.57 %, n= 9) i ST23-Philadelphia (9.57 %, n= 9) seguit del ST1-OLDA (5.32 %, n= 5) (Figura 15). La distribució dels 'fenons' entre els aïllats clínics diferia segons la seva adquisició: els aïllats clínics AC es dividien en 40 'fenons' diferents (índex de diversitat: 0.963 CI: 0.940-0.987) on els més abundants eren ST37-Philadelphia (13.85 %, n= 9), ST23-Philadelphia (12.31 %, n= 8) i ST23-France/Allentown (6.16 %, n= 4),

mentre que els aïllats clínics NOS es dividien en 16 ‘fenons’ (índex de diversitat: 0.967 CI: 0.942-0.992) on els més abundants eren ST1-OLDA (12 %, n= 3) i ST187-NS1 (12 %, n= 3).

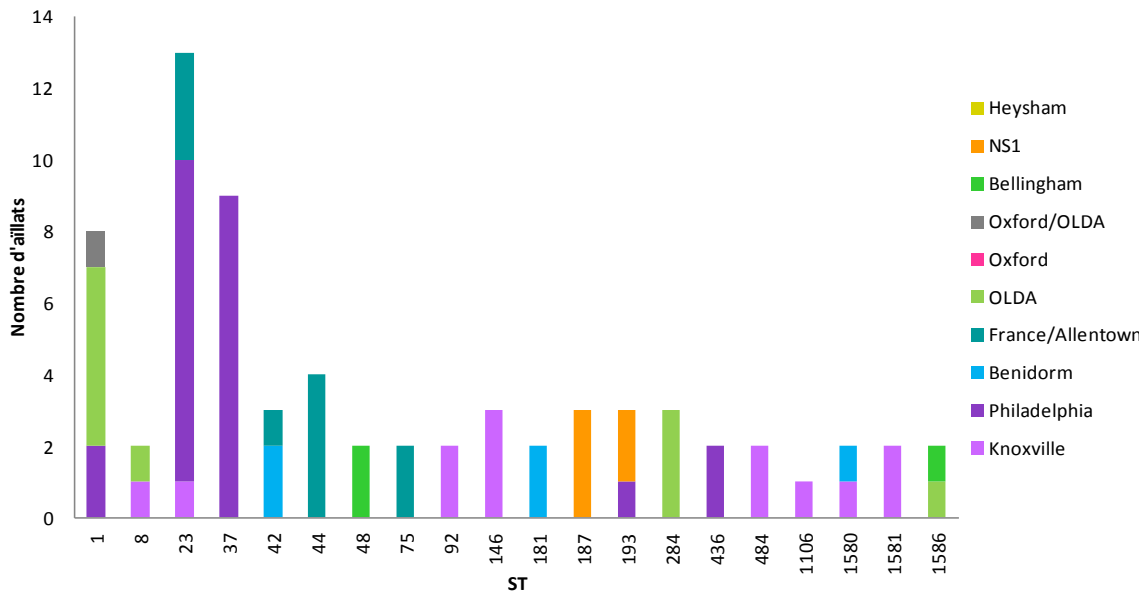


Figura 15. Distribució dels ‘Fenons’ més representatius en el grup d’aïllats clínics *L. pneumophila*.

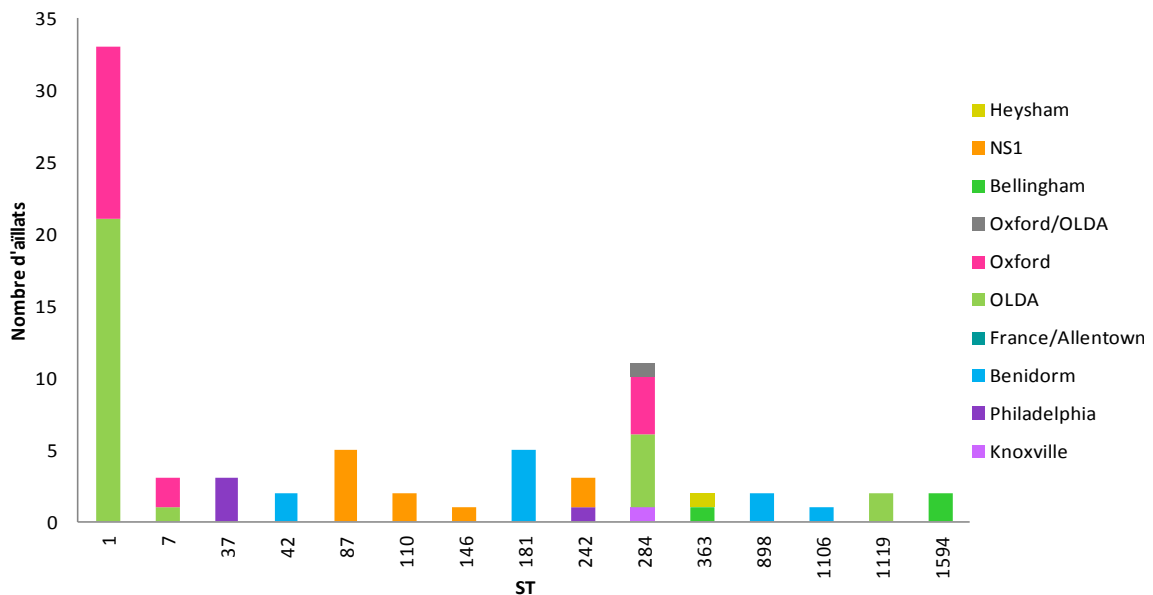


Figura 16. Distribució dels ‘Fenons’ més representatius en el grup d’aïllats ambientals *L. pneumophila*.

Respecte als aïllats ambientals, aquests es van dividir en 52 ‘fenons’ diferents (índex de diversitat: 0.949 CI: 0.925-0.973), on els més abundants eren el ST1-OLDA (18.42 %, n= 21) i ST1-Oxford (10.52 %, n=12) (Figura 16).

Anàlisi filogenètic de l'SBT

L'anàlisi filogenètic dels aïllats amb els al·lels de l'SBT va classificar els 79 STs identificats en 131 complexos clonals i 42 “singletons” (Figura 17). Els complexos clonals amb més STs eren el CC1, CC2 i CC3, tots 3 amb 4 STs diferents.

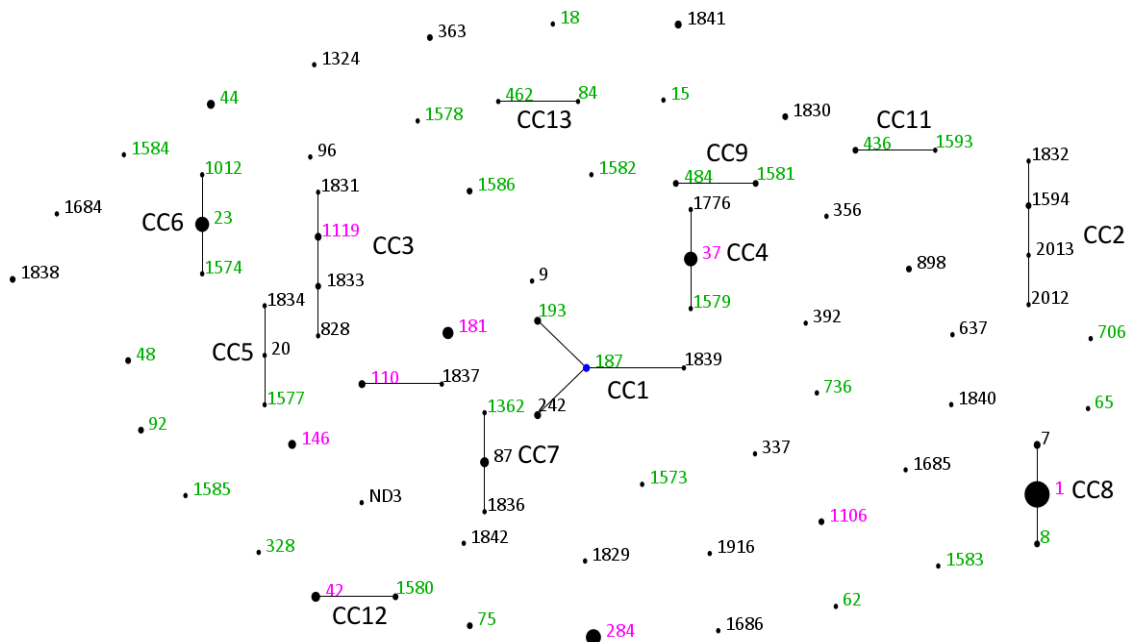


Figura 17. Relació entre els 79 STs de *L. pneumophila* identificats en l'estudi amb eBURST V3. La grandària dels punts són proporcionals al nombre d'aïllats identificats en cada ST, les línies negres marquen els complexos clonals (CC), els STs de color verd representen els subtipus trobats únicament associats a casos clínics, els STs negres representen els subtipus trobats únicament a l'ambient i els STs magenta representen els subtipus trobats tant en casos clínics com en l'ambient.

El CC1 estava format per *L. pneumophila* no-sg 1, dels quals 2 STs estaven relacionats sempre amb casos clínics (ST 193 i ST 187), i 2 STs eren exclusivament ambientals (ST 242, i ST 1839). Per altra banda, el CC2 estava format per 2 STs identificats com a *L. pneumophila* no-sg 1 i per 2 STs que corresponien a *L. pneumophila* sg 1 subgrup Bellingham, que únicament es trobaven al grup ambiental.

Els complexos clonals CC7 i CC11 també estaven formats únicament per *L.*

pneumophila no-sg 1. En el cas del complex 7, un dels STs es va trobar únicament implicat en casos nosocomials i la resta dels STs d'aquests dos complexos es trobaven únicament colonitzant l'ambient.

El complex clonal que contenia més aïllat era el CC8, en el qual es trobava l'ST 1, l'ST amb més proporció d'aïllats, juntament amb l'ST 7 i l'ST 8.

Respecte als STs més prevalents en el grup clínic (ST 23 i ST 37) es trobaven en dos complexos clonals diferents. L'ST 23 es trobava en el CC6 juntament amb dos STs només trobats en aïllats clínics, i l'ST 37 va ser situat al CC4 amb un ST només trobat en el grup clínic (ST 1579) i un ST només associat a l'ambient (ST 1776).

Objectiu 3. Caracterització proteòmica

Anàlisi del proteoma

Es va realitzar una comparació de proteomes complets entre aïllats ambientals relacionats amb casos clínics (AARC) i aïllats ambientals no relacionats amb casos clínics (AANR) que coexistien en el mateix nínxol ecològic. Per fer aquesta comparació es va utilitzar la metodologia 2D-DIGE combinada amb espectrometria de masses (MALDI-TOF i/o LC-ESI-MS/MS).

En la figura 18A es mostra una imatge representativa del gel de poliacrilamida. Es van observar més de 500 punts, dels quals 63 mostraven diferències estadístiques a nivell d'expressió entre els dos grups (Figura 18B). D'aquests, 27 es trobaven sobrerrepresentats en els aïllats relacionats amb casos clínics i 36 en els aïllats ambientals (Figura 19). Els 63 punts van ser escindits del gel per a identificar a quina proteïna corresponien per MS. Es van poder identificar correctament (amb una bona puntuació) 31 dels punts, els quals corresponien a 23 proteïnes diferents (Taula 5). De les 23 proteïnes identificades, 14 corresponien a proteïnes més abundants en els AARC, i 8 en els AANR. Una de les proteïnes identificades estava present en ambdós grups i localitzada en punts diferents.

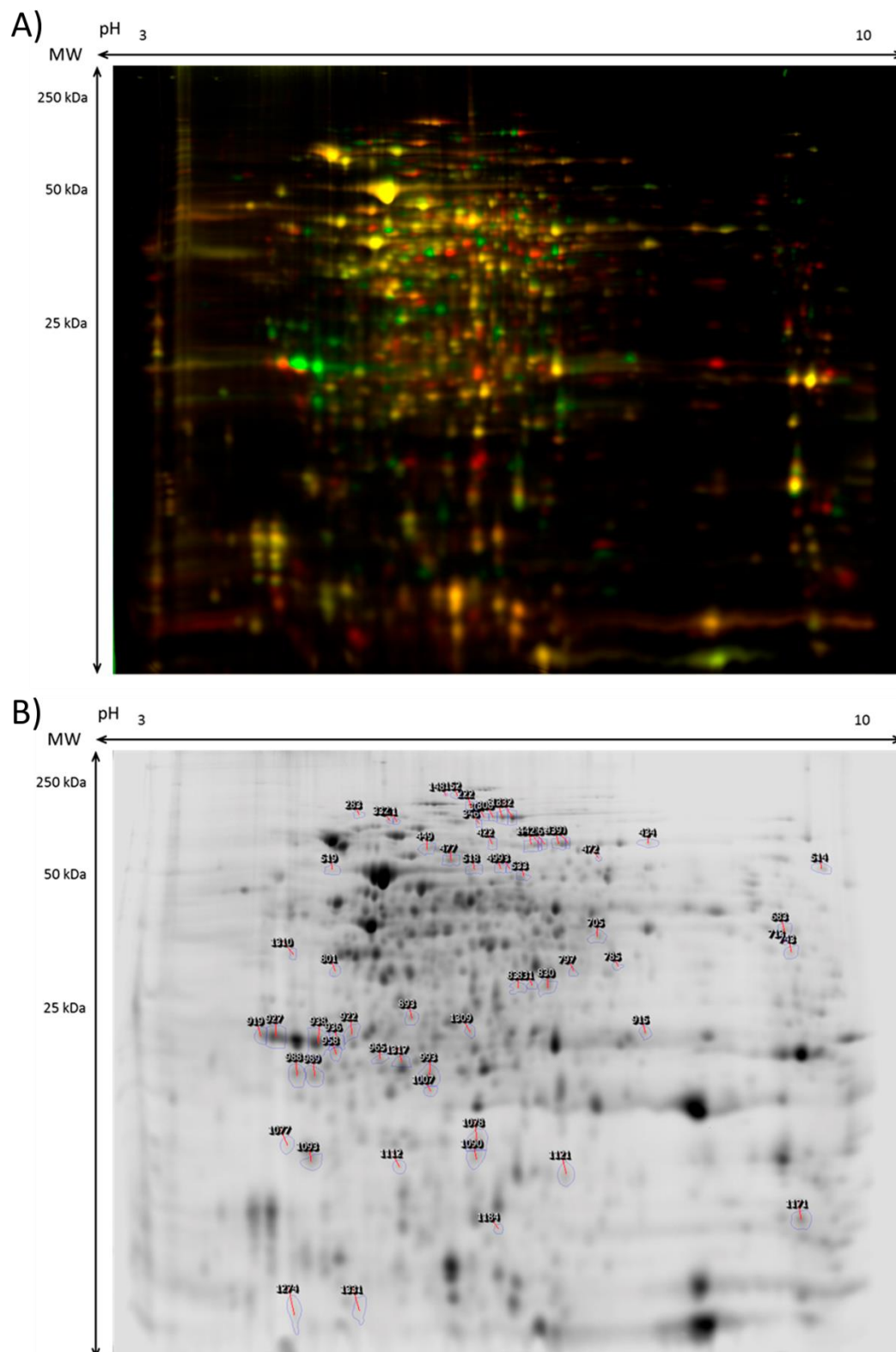


Figura 18. Gel 2D-DIGE. A) Imatge dels fluoròfors, les tonalitats verdes representen els punts més abundants en els aïllats ambientals relacionats amb casos, les tonalitats vermelles els punts més abundants en els aïllats ambientals no relacionats amb casos i les tonalitats grogues representen els punts comuns entre els dos aïllats. B) Imatge en blanc i negre del gel 2D-DIGE on es marquen els punts estadísticament diferents ($p < 0.05$) entre els aïllats ambientals relacionats amb casos i els aïllats ambientals no relacionats.

En alguns casos dels punts identificats representaven més d'una proteïna (com per exemple el punt 533 on es van identificar 3 proteïnes diferents), ja que aquestes proteïnes tenien un punt isoelèctric (pI) i una pes molecular (MW) molt semblant. Per altra banda, algunes proteïnes es van identificar en més d'un punt (com la MOMP o la aconitat hidratasa), degut a modificacions artificials, modificacions post-traduccional (PTM), per la degradació per proteases o per desaminacions artificials.

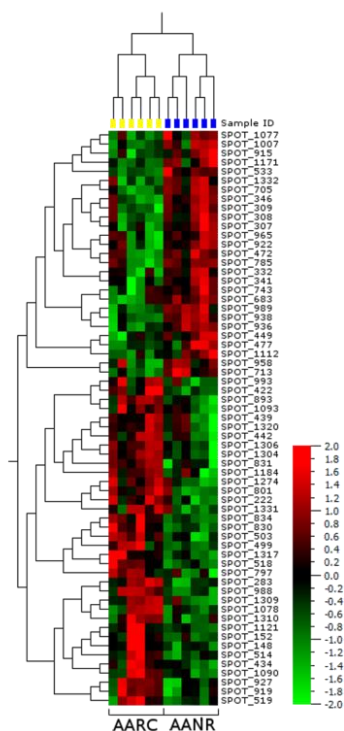


Figura 19. Clúster jeràrquic dels punts estadísticament diferencials entre els aïllats ambientals relacionats amb casos i els aïllats (AARC) ambientals no relacionats (AANR).

Identificació i classificació de proteïnes

Les proteïnes diferencials es van classificar en 5 categories: a) enzims, b) traducció, modificació de proteïnes, recanvi de proteïnes i xaperones, c) proteïnes d'estrès, d) síntesi de paret, i e) altres.

El 40 % de les proteïnes identificades corresponien a enzims (Taula 5), els quals es trobaven sobrerrepresentats en els AARC. Aquests estaven majoritàriament associats amb la producció i conversió d'energia, metabolisme de carbohidrats, aminoàcids, lípids i metabolisme i transport de nucleòtids.

Les proteïnes identificades i classificades com a enzims relacionats amb el cicle de l'àcid tricarbòxilic (TCA) (*malate dehydrogenase* (gi|52843165), *aconitate hydratase* (gi|52841918), *succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit* (gi|52840775)), amb el metabolisme de nucleòtids, carbohidrats, lípids i aminoàcids (*acyl CoA C-acetyl transferase* (gi|52842052), *cystathionine beta-lyase* (gi|52841125), *piperidine 6-carboxylate dehydrigenase* (gi|52841581), *inosine 5' monophosphate dehydrogenase* (gi|52841951)), i amb enzims relacionats amb la producció i conversió d'energia (*FOF1 ATP synthase subunit delta* (gi|54295823)) eren més abundants en els AARC. La aconitat hidratasa es va trobar en 2 punts (309 i 1332) amb pls diferents. Aquestes dues isoformes de l'enzim corresponen a dos números d'accés diferent en la base de dades, i les diferències entre aquestes dues isoformes recau en la composició de residus aminoacídics, on 6 de 891 residus són diferents.

Pel contrari, només la subunitat- α de l'enzim *tryptophan synthase* (gi|52841536) i l'enzim *cytidilate kinase* (gi|148358951) van ser identificades com a enzims sobrerrepresentants en els AANR.

Les proteïnes relacionades amb la traducció, modificació i recanvi de proteïnes, i xaperones es trobaven estadísticament sobrerrepresentats en els AARC. Les proteïnes que es van identificar van ser *elongation factor-TU* (gi|52840560), *aminopeptidase N* (gi|52843005) i *oligopeptidase A* (gi|52840396).

Quatre de les 9 proteïnes sobrerrepresentades en els AANR estaven associades amb proteïnes d'estrès (*catalase/(hydro)peroxidase* KatG (gi|52840449), *global stress protein* GspA (gi|1084054) i la *DnaK supressor protein* (gi|52842548), juntament amb la subunitat proteolítica de la proteasa ATP-dependent Clp (gi|52842086)). Per altra banda, només una de les 15 proteïnes sobrerrepresentades en els AARC estava associada amb proteïnes d'estrès (*shot chain dehydrogenase/reductase family oxidoreductase* (gi|52840541)).

En tots dos grups es van identificar proteïnes de síntesi de paret i proteïnes no caracteritzades. En el grup dels AARC es van identificar la proteïna MraZ de divisió cel·lular (gi|52841148) i la plpI0048 (gi|54292954). En els AANR es van identificar la *UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine* (gi|54295450) i la proteïna hipotètica Ipg2867 (gi|52843062).

Taula 5. Proteïnes diferencials identificades per espectrometria de masses

Nº d'accés NCBI	Nº punt	Nom de la proteïna	Valor estadístic (p)	Ratio promig* ¹	Sobre- representació* ²	Valors teòrics pI/MW	Puntuació (score)	Cobertura de seqüència	Mètode d'identificació	Funció* ³
gi 3978396	936	major outer membrane protein precursor	0.0011	2.791	AARC	4.9/32100	64.1	5.9 %	MS/MS	Altres
gi 3978396	989	major outer membrane protein precursor	0.0003	4.018	AARC	5.01/32246	53	3 %	MS/MS	Altres
gi 50658045	938	major outer membrane protein	0.0001	5.395	AARC	6.08/16150	89	48 %	MS	Altres
gi 52840396	449	oligopeptidase A	0.0173	1.974	AARC	5.5/78200	237.9	8.7 %	MS/MS	PTM, recanvi proteic i xaperona
gi 52840541	915	short chain dehydrogenase/reductase family oxidoreductase	0.0120	2.156	AARC	8.0/31700	176.4	11.3 %	MS/MS	Proteïna d'estrés, Enzim
gi 52840560	936	elongation factor Tu	0.0011	2.791	AARC	5.1/43200	50.9	3 %	MS/MS	Traducció, Altres
gi 52840775	915	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	0.0120	2.156	AARC	6.2/27400	59.6	4.2 %	MS/MS	Enzim
gi 52841125	705	cystathionine beta-lyase	0.0003	3.483	AARC	6.8/41900	264.9	13.3 %	MS/MS	Enzim
gi 52841148	1112	cell division protein MraZ	0.0236	1.692	AARC	5.4/18900	162	17.4 %	MS/MS	Síntesi de paret
gi 52841581	533	piperidine-6-carboxylate dehydrogenase	0.0010	3.095	AARC	6.2/55200	66.7	4 %	MS/MS	Enzim
gi 52841918	309	aconitate hydratase	0.0079	2.054	AARC	6.09/98660	121	20 %	MS	Enzim
gi 52841951	533	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	0.0010	3.095	AARC	6.5/52500	90.5	5.1 %	MS/MS	Enzim
gi 52842052	705	acyl CoA C-acetyltransferase	0.0003	3.483	AARC	6.5/41200	188.5	14.7 %	MS/MS	Enzim
gi 52843005	341	aminopeptidase N	0.0136	2.954	AARC	5.2/99800	53.3	1.2 %	MS/MS	PTM, recanvi proteic i xaperona
gi 52843165	533	malate dehydrogenase	0.0010	3.095	AARC	6.1/61900	82.6	3.8 %	MS/MS	Enzim
gi 54292954	705	hypothetical protein plp0048	0.0003	3.483	AARC	6.3/38100	53.2	2.6 %	MS/MS	Altres

Nº d'accés NCBI	Nº punt	Nom de la proteïna	Valor estadístic (p)	Ratio promig* ¹	Sobre- representació* ²	Valors teòrics pI/MW	Puntuació (score)	Cobertura de seqüència	Mètode d'identificació	Funció* ³
gi 54295823	1007	FOF1 ATP synthase subunit delta	0.0067	3.715	AARC	7.5/19900	475.7	43.9 %	MS/MS	Enzim
gi 54297608	1332	aconitate hydratase	0.0180	1.623	AARC	6.13/98666	103	18 %	MS	Enzim
gi 148358951	1309	cytidylate kinase	0.0111	0.605	AANR	5.97/25608	115	52 %	MS	Enzim
gi 3978396	919	major outer membrane protein precursor	0.0236	0.286	AANR	4.9/32200	85	10 %	MS/MS	Altres
gi 3978396	988	major outer membrane protein precursor	0.0008	0.274	AANR	4.9/32200	67	6 %	MS/MS	Altres
gi 50658027	927	major outer membrane protein	0.0158	0.236	AANR	4.9/32200	108	13 %	MS/MS	Altres
gi 52840449	422	catalase/(hydro)peroxidase KatG	0.0067	0.567	AANR	7.67/82863	50	1 %	MS/MS	Proteïna d'estrés
gi 52840449	442	catalase/(hydro)peroxidase KatG	0.0175	0.668	AANR	7.67/82863	46	1 %	MS/MS	Proteïna d'estrés
gi 52841536	893	tryptophan synthase subunit alpha	0.0037	0.708	AANR	5.35/29900	212.33	18 %	MS/MS	Enzim
gi 52842086	993	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	0.0278	0.710	AANR	5.56/23931	163	48 %	MS	Proteïna d'estrés , PTM, recanvi proteic i xaperona
gi 52842548	1093	DnaK suppressor protein	0.0458	0.787	AANR	4.99/18511	66	7 %	MS/MS	Proteïna d'estrés
gi 52843062	1184	hypothetical protein lpg2867	0.0263	0.577	AANR	5.89/14942	56	6 %	MS/MS	Altres
gi 54295450	831	UDP-N- acetylenolpyruvoylglucosamine	0.0060	0.681	AANR	6.26/33752	86	26 %	MS	Síntesi de paret
gi 54298084	1078	global stress protein GspA	0.0495	0.151	AANR	5.86/18886	92	38 %	MS/MS	Stress protein
gi 54298084	1090	global stress protein GspA	0.0264	0.124	AANR	5.86/18886	84	44 %	MS	Proteïna d'estrés

*¹ Ratio correspon al volum normalitzat del punt de la proteïna en els aïllats relacionats amb casos (AARC) respecte el dels aïllats ambientals; *² AANR: Aïllats ambientals relacionats amb casos; AANR: aïllats ambientals no relacionats; *³ PTM: Modificacions post-traduccionals

Finalment, la proteïna major de membrana externa (*Major Outer Membrane Protein*, Momp) va ser identificada en ambdós grups. Aquesta proteïna es va identificar en 7 punts diferents amb una distribució “particular” en el 2D-DIGE (Figura 20A). Dels 7 punts, un d’ells no mostrava diferències estadístiques (937). Utilitzant aquest punt com a referència, els tres punts localitzats en la banda més bàsica (938, 936, i 989) es trobaven sobrerrepresentats en els AARC, mentre que els altres 3 punts localitzats en la banda més àcida (919, 927, i 988) estaven sobrerrepresentats en els AANR (Figura 20B).

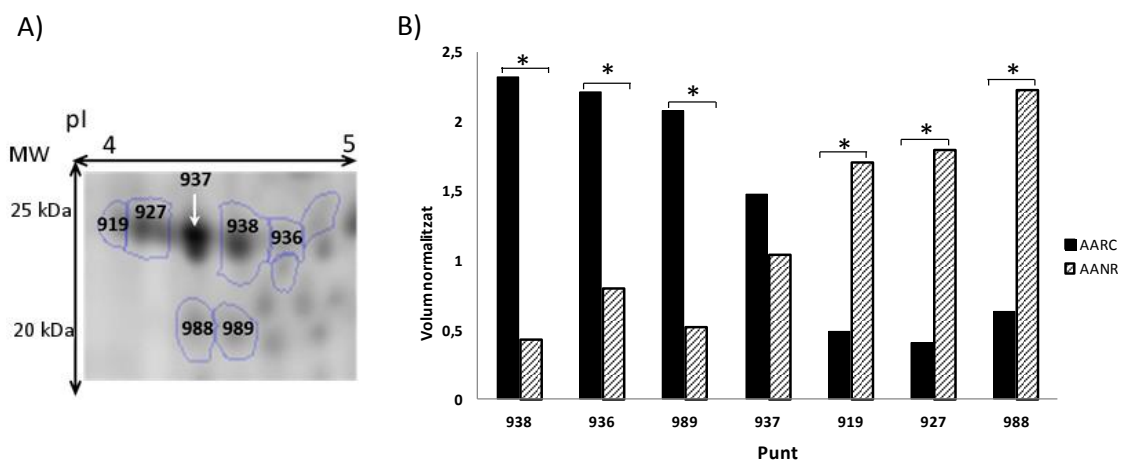


Figura 20. A) Ampliació de l’àrea on s’ha identificat la proteïna MOMP. El punt marcat amb una fletxa blanca era el punt identificat com a MOMP no diferencial entre els grups (punt 937), els punts número 938, 936 i 989 eren més abundants identificats com MOMP en els aïllats ambientals relacionats amb casos, i els punts número 919, 927 i 988 eren els punts més abundants identificats com MOMP en els aïllats ambientals no relacionats. B) Representació dels volums normalitzats dels punts identificats com MOMP en cada grup d’aïllats. Els asteriscs indiquen diferències estadísticament significatives.

qPCR

Per a realitzar la validació de les proteïnes diferencials trobades en el gel 2D-DIGE es va valorar l’expressió dels gens en un grup més ampli d’aïllats. Es va analitzar l’expressió gènica de 16 proteïnes estadísticament significatives en un grup de 55 aïllats, dels quals 30 eren AARC i 25 eren AANR.

Els resultats de les anàlisis de qPCR es mostren a la Taula 6. Cap de les proteïnes analitzades a nivell d’expressió d’ARN va mostrar diferències significatives entre els dos grups comparats.

Taula 6. Resultats de les anàlisis de qPCR

Gen	Mitjana 2 Δ Cp AARC	Mitjana 2 Δ Cp AANR	p-valor	Ratio d'expressió
<i>malate dehydrogenase</i>	12668.228	17723.179	0.488	0.714
<i>aconitate hydratase</i>	4504.189	3576.207	0.319	1.259
<i>succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit</i>	1858.151	1782.824	0.933	1.042
<i>FOF1 ATP synthase subunit delta</i>	4533.419	6996.039	0.866	0.648
<i>acyl CoA C-acetyl transferase</i>	33079.296	21502.020	0.465	1.538
<i>cystathionine beta-lyase</i>	62858.288	103104.384	0.946	0.610
<i>inosine 5'monophosphate dehydrogenase</i>	18487.571	15992.807	0.767	1.156
<i>piperidine 6-carboxylate dehydrogenase</i>	9227.126	14243.533	0.295	0.648
<i>cell division protein MraZ</i>	3071.501	3280.586	0.265	0.936
<i>elongation factor-TU</i>	2073.191	2506.680	0.437	0.827
<i>oligopeptidase A</i>	25747.229	55494.449	0.357	0.463
<i>aminopeptidase N</i>	11173.802	15511.694	0.723	0.720
<i>short chain dehydrogenase/reductase family oxidoreductase</i>	9387.737	7304.763	0.636	1.285
<i>catalase/(hydro)peroxidase KatG</i>	14221.811	21120.831	0.606	0.673
<i>global stress protein GspA</i>	8650.330	7565.063	0.685	1.143
<i>lpg2867</i>	3306.946	3663.373	0.298	0.903

AARC: aïllats ambientals relacionats amb casos; AANR: aïllats ambientals no relacionats amb casos. Ratio d'expressió: $2^{\Delta\text{Cp AARC}}/2^{\Delta\text{Cp AANR}}$

Assajos Enzimàtics

Com a eina complementaria a l'anàlisi d'expressió gènica es va analitzar l'activitat enzimàtica de l'Aconitat hidratasa i la Malat deshidrogenasa per cinètica de reacció. No es van trobar diferències d'activitat enzimàtica en Aconitat hidratasa ni en Malat deshidrogenasa entre els dos grups d'aïllats. Els resultats obtinguts de l'activitat dels enzims en cada grup i el valor estadístic es mostren en la taula 7 i en la figura 21.

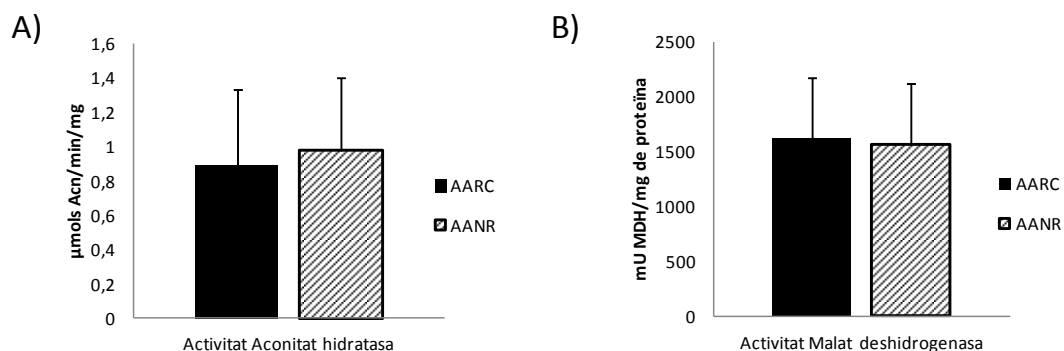


Figura 21. A) Representació de l'activitat Aconitat hidratasa dels AARC i dels AANR. B) Representació de l'activitat Malat deshidrogenasa dels AARC i dels AANR

Taula 7. Resultats de les activitats enzimàtiques

Enzim	Activitat en AARC	Activitat en AANR	p-valor	Ratio d'activitat
Aconitat hidratasa	0.896 µmols/min/mg	0.978 µmols/min/mg	0.293	0.916
Malat deshidrogenasa	1616.562 mU/mg de proteïna	1559.925 mU/mg de proteïna	0.588	1.036

AARC: aïllats ambientals relacionats amb casos; AANR: aïllats ambientals no relacionats amb casos. Ratio d'activitat representa la relació entre l'activitat de AARC /Activitat AANR

Citopatogenicitat

Es va analitzar la capacitat citopatogènica dels aïllats comparats en l'anàlisi proteòmic amb la finalitat de comprovar si el fet d'haver causat infecció en un moment puntual era degut a que la seva capacitat patogènica era més elevada que la dels altres aïllats que coexistien en el mateix punt. Els resultats obtinguts es van expressar en ufc/ml necessàries per produir un efecte citopàtic en el 50% de les cèl·lules hostatgeres. En la figura 22 es representen els resultats obtinguts per cada parella d'aïllats. No es van trobar diferències significatives en la capacitat patogènica dels aïllats analitzats.

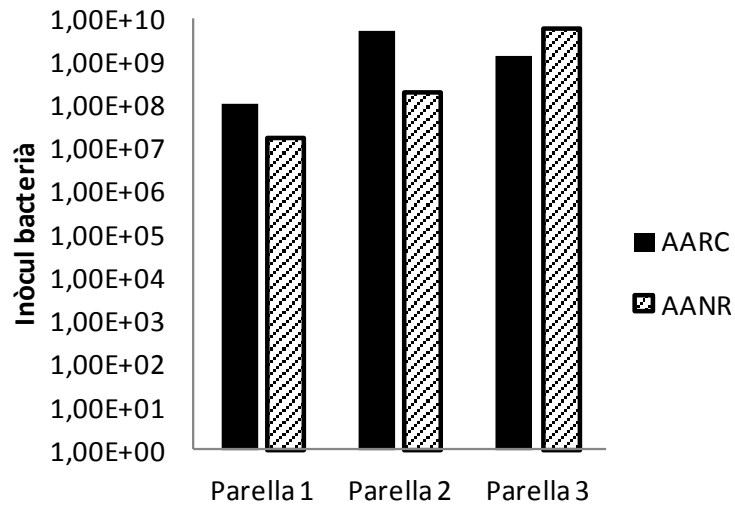


Figura 22. Representació de l'inòcul bacterià necessari per causar efecte citopàtic en el 50 % de les cèl·lules.

DISCUSSIÓ

Legionella pneumophila es un microorganisme ambiental que provoca malalties en humans, sent un patògen important causant de pneumònies. Els sistemes de distribució d'aigües i les torres de refrigeració són les principals fonts d'infecció implicades en casos i brots de LD. Encara que els recomptes elevats de *Legionella* poden relacionar-se amb casos o brots de legionel·losi, aquest fet no implica necessàriament la seva relació causal. Per tant, els estudis epidemiològics i moleculars són necessaris per a establir el vincle entre els aïllats clínics i ambientals. S'han utilitzat un gran nombre de mètodes de tipatge per a la identificació i caracterització de legionel·la, com els anticossos monoclonals, ribotipatge, AFLP, mètodes basats en PCR, SBT i PFGE [169]. Els mètodes discriminatoris de tipatge són necessaris per a la determinació de les rutes de transmissió i la identificació de la font d'infecció i no només a nivell científic, ja que pot tenir implicacions legals. El PFGE ha sigut la tècnica d'elecció (gold standard) fins a la recent introducció l'any 2003 del SBT [153].

En la comparació de les tècniques PFGE i SBT, s'observà que aquestes tenien un 100 % de concordança epidemiològica, permetent identificar i diferenciar l'aïllat responsable dels casos entre tots els aïllats ambientals a cada investigació. No obstant això, la concordança molecular entre aquestes dues tècniques era del 64 %. L'índex Ajustat de Wallace va determinar que la tècnica SBT era predit per la metodologia PFGE, però contràriament, l'SBT no era un bon mètode per a la predicció dels perfils PFGE. Aquestes discrepàncies van ser detectades en alguns aïllats que presentaven els mateix ST a la investigació, però que tenien un patró PFGE diferent. Aquest fenomen també va ser observat en l'ST 505 detectat al Japó el qual presentava dos perfils PFGE que difereien en dos fragments de restricció [170].

Estudis preliminars van demostrar que el PFGE és un marcador epidemiològic discriminatori per al subtipatge de *L. pneumophila* [141–145], i durant els anys s'han descrit diversos protocols per aquesta tècnica [145–148]. La interpretació dels resultats del PFGE és un dels aspectes més importants per a la discriminació dels aïllats. Degut a que no existeix una norma general per a la discriminació dels patrons PFGE, cada laboratori ha d'establir els seus propis criteris per a les investigacions epidemiològiques. A l'hora d'intentar establir les relacions epidemiològiques entre els aïllats clínics i els ambientals durant una investigació de LD és imprescindible la utilització del criteri 'idèntics' per a la classificació dels aïllats, com va passar en grans

investigacions epidemiològiques a Holanda, Murcia i Mataró [7,11,14,171]. En aquestes grans investigacions es van observar patrons PFGE que només diferien d'una o dues bandes coexistent en les àrees epidemiològicament relacionades, subrallant la importància de la utilització del criteri idèntics per a la correcta identificació del focus d'infecció.

El PFGE és un mètode basat en l'anàlisi del genoma complet utilitzant una endonucleasa de restricció que reconeix una diana específica, veient-se les diferències entre aïllats quan succeixen events genètics que alteren els fragments de restricció com les modificacions de les dianes per mutacions puntuals o per insercions/deleccions de llargues seqüències d'ADN. Per l'altra banda, l'SBT es basa en la seqüenciació de 7 loci donant informació de 3.5 kb d'un total de 3.5 Mb del genoma [172–177] i les diferències entre aïllats són degudes al canvi d'una única base de la seqüència analitzada. No obstant això, el PFGE era capaç de mostrar més variabilitat entre els aïllats. Malgrat això, l'SBT té l'avantatge de ser una tècnica estandarditzada, reproduïble i de fàcil intercanvi de resultats entre laboratoris. A més el seu major avantatge és que el tipatge dels aïllats clínics pot realitzar-se directament de secrecions respiratòries evadint el pas d'aïllament del microorganisme per cultiu [178].

Encara que el PFGE és més discriminatori que l'SBT, hi ha alguns problemes pràctics en l'aplicació d'aquest mètode en les investigacions de LD. D'entre els problemes d'aquesta tècnica trobem la manca de un protocol estandarditzat entre laboratoris, diferint entre ells en paràmetres crítics com l'enzim de restricció utilitzat i les condicions d'electroforesi utilitzades per a generar els perfils d'ADN, la qual cosa fa impossible la comparació de resultats [145,147,148,169]. A més, per poder comparar els aïllats ambientals entre ells i discernir entre els responsables del cas és necessari la obtenció de l'aïllat clínic com a patró de referència en cada cas, i la limitació d'avui dia és que la majoria de diagnòstics de legionel·losis es fan per detecció d'antigen en orina o test serològics sense l'aïllament del bacteri [179].

Els resultats obtinguts en aquest estudi suggereixen dificultats en l'aplicació de la tècnica SBT per a la vigilància epidemiològica i per a la investigació de brots complexes. Per tant, s'haurien de buscar altres gens més diversificats en *L. pneumophila* per tal d'avaluar la seva aplicabilitat en l'esquema actual de l'SBT. Tot i la necessitat de nous marcadors per a una millor classificació dels aïllats, en comparar aquesta tècnica amb

la classificació obtinguda per Seqüenciació del Genoma Complet (Whole Genome Sequencing, WGS), els resultats obtinguts van ser molt similars [180]. Una altra opció seria la creació d'una eina per a la diferenciació dels STs amb distribució mundial com l'ST 1. En aquest estudi l'ST 1 va ser responsable de la majoria dels casos d'incongruència entre PFGE i SBT. En aquest sentit, el 'spoligotyping', un mètode utilitzat per a la diferenciació del ST 1 [181], s'hauria d'utilitzar com a mètode epidemiològic complementari quan aquest tipus d'ST són els causants dels casos o brots.

Els resultats d'aquest estudi van mostrar que el tipatge per MAb pot reduir el nombre d'aïllats a tipar per mètodes moleculars estalviant temps i diners en el procés de la cerca del focus d'infecció, ja que en el context d'un brot tots els aïllats amb el mateix PFGE o el mateix ST compartien el mateix subgrup de Dresden, encara que no seria una tècnica útil per si mateixa per a la identificació correcta del focus d'infecció, ja que diferents perfils de PFGE o STs poden presentar el mateix subgrup de Dresden. En aquest objectiu s'ha establert la congruència entre aquests dos mètodes, juntament amb el tipatge per anticossos del Panell de Dresden, per intentar comprendre l'aplicabilitat d'aquestes tècniques en les investigacions de LD. S'ha observat que tot i que totes dues tècniques moleculars són aplicables en la investigació de legionel·losis, la tècnica PFGE mostrava un poder discriminatori més elevat per a la classificació dels aïllats de *Legionella pneumophila*. L'existència d'STs amb diferents perfils PFGE dins d'un mateix context de brot suggereix la necessitat de trobar nous marcadors o tècniques complementàries a l'SBT en l'estudi de brots per tal de millorar els resultats. Per tant, la tècnica SBT per si mateixa no seria una prova suficientment discriminatòria per alguns STs. Per poder determinar la importància de la tècnica SBT en la nostra àrea, és important conèixer la distribució d'STs dels aïllats de *Legionella* i comprovar si existeixen diferències segons si són d'origen clínic o ambiental.

En l'estudi de distribució i diversitat de poblacions la reacció positiva en front a l'anticòs MAb 3/1 (o MAb 2 en el panel de Jolly [132]) dels aïllats de *L. pneumophila* serogrup 1 ha estat relacionada amb la majoria dels aïllats responsables de brots de la comunitat [134]. Per tant és important comprendre la distribució dels aïllats MAb 3/1 positius en l'ambient per intentar entendre com és d'important aquest epítoc en la virulència d'aquests bacteris. La proporció d'aïllats positius pel MAb 3/1 en aquest

estudi és consistent amb estudis previs a on el 79.6 %, el 96.6 % i el 63.6 % dels aïllats clínics eren positius per aquest anticòs, mentre que els aïllats ambientals només presentaven aquest epítot un 12.8 %, 8.3 % i 17.1 % al Regne Unit, Anglaterra-Galles i Canadà, respectivament [182–184].

Segons la seva adquisició, la majoria d'aïllats clínics de la comunitat (89.23 %) expressaven aquest epítot, mentre que només el 29.17 % dels nosocomials eren positius. Aquest fenomen també es va observar en estudis previs [134,184,185], i es va suggerir que la distribució de subgrups nosocomials estava atribuïda a la colonització ambiental dels sistemes d'aigua i no a les diferències en la virulència dels aïllats [134], ja que els casos nosocomials estan més relacionats amb pacients amb factors de risc acumulats per patir aquesta infecció, que no el bacteri en qüestió. Una hipòtesi alternativa a aquest efecte podria ser degut al infradiagnòstic de les legionel·losis causades per aïllats MAb 3/1 negatius, ja que els test actuals de diagnòstic per a pneumònies comunitàries es basen primerament en detecció d'antigen en orina, el qual és menys sensible per aquests aïllats [186,187].

Es van identificar un total de 79 STs, i només 9 STs d'ells eren compartits entre el grup associat i no associat a casos de legionel·losis, mostrant una diferència de distribució d'STs segons el grup al que pertanyien [188,189]. Els índex de diversitat del grup associat a casos clínics era superior que al grup no associat a casos clínics, comportament similar als dels altres estudis de regions entre 10 i 100 vegades més grans, on la diversitat dels aïllats clínics és més alta que la dels aïllats ambientals [184,190,191].

A més de diferències a nivell d'STs, el grup clínic i ambiental mostraven diversitats al·lèliques diferents pels gens analitzats per SBT. Tot i això, en analitzar indendentment els aïllats clínics AC i NOS, els STs clínics NOS mostraven una distribució similar als aïllats ambientals a nivell d'ST, 'fenon' i de patró de diversitat gènica, donant suport a la hipòtesi de que la incidència dels aïllats nosocomials està atribuïda al grau de colonització en els sistemes de distribució d'aigua i a la susceptibilitat dels pacients i no als trets que augmenten la virulència.

El IOD dels aïllats ambientals era de 0.896, comparable a altres regions més grans com Regne Unit, Estats Units i Canadà [183,184,190]. Segons estudis de diversitat d'STs en ambients artificials i naturals, els ambients artificials tenen tendència a una

diversitat bastant més baixa (en torres de refrigeració d'un estudi al Japó la IOD era de 0.448 [192], i en un estudi en Estats Units d'aigua potable i no potable era de 0.615 i 0.787 respectivament [191]), en canvi, tot i que els aïllats ambientals recollits en aquest estudi provenen d'ambients artificials, la diversitat trobada és més alta que en la dels estudis anteriors d'ambients artificials.

L'ST més prevalent entre els aïllats era l'ST 1. Aquest ST està distribuït arreu del món [184,185,192–195], i és l'ST més representatiu (13 %) de les entrades a la base de dades EWGLI (web). La representació d'aquest ST en els aïllats clínics era del 8.5 %, essent la majoria d'aïllats de procedència nosocomial. A Estats Units l'ST 1 es va assumir com a un ST poc virulent, ja que només va ser aïllat de fonts ambientals i mai es va trobar implicat en casos clínics [191]. El fet de que aquest ST estigui en el nostre estudi implicat en casos nosocomials afavoriria la hipòtesi de que l'ST 1 té una baixa virulència. A més seria un ST molt ben adaptat a l'ambient, i només causaria malaltia en hostatgers amb factors de risc acumulats, com és el cas de les infeccions nosocomials.

La majoria dels ST 1 identificats en aquest estudi eren MAb 3/1 negatius, Oxford i OLDA com en la majoria d'estudis [190,192], a excepció de dos aïllats, els quals eren MAb 3/1 positius identificats com a Philadelphia. Aquests dos últims aïllats estaven implicats en dos casos nosocomials de legionel·losis. Els aïllats ambientals identificats com ST 1 no relacionats amb casos eren MAb 3/1 negatius. Aquest fet suportaria la teoria de Amemura-Maekawa *et al*, on suggerien que l'epítop MAb 3/1 pot ser fàcilment guanyat o perdut durant l'adaptació als ambients, on no hi ha pressió per retenir la patogenicitat [192]. És molt probable que la pèrdua d'aquest epítop incrementi el seva capacitat d'adaptació a l'ambient reduint la seva habilitat d'infectar. Per aquesta raó, aquest ST, i la resta d'STs que només es troben colonitzant l'ambient serien majoritàriament negatius per aquest anticòs.

Pel que fa als STs clínics, els més abundants, eren l'ST 23 i ST 37. L'ST 37 està molt relacionat amb els ST 36 i ST 35, els quals han causat nombrosos brots tant a Europa com Estats Units [191]. Harrison *et al* van suggerir que aquests tres STs corresponen a un grup d'STs amb una habilitat incrementada per causar legionel·losis [196]. L'ST 37 va ser trobat tant en aïllats clínics com en l'ambient sense causar malaltia. En les anàlisis filogenètiques, l'ST 37 quedava situat en el complex clonal 4 (CC4), amb l'ST 1579, el

qual només s'ha trobat relacionat amb casos i amb l'ST 1776, el qual s'ha trobat com a colonitzador de l'ambient. La diferència entre aquests era en el gen *asd* respecte al ST clínic i el *neuA* respecte l'ST ambiental, veient-se lligat amb les diferències de diversitats entre gens trobades a cada grup (*neuA* era el gen amb més variabilitat en els aïllats ambientals i *asd* era el segon gen més variable en els aïllats clínics). L'ST 37 va causar un dels brots a Catalunya amb molts afectats [14], i va ser el responsable del brot de legionel·losis amb més afectats fins ara descrit (brot de Murcia) [11]. A més de ser el causant del brot de 1979 a Filadèlfia [190]. Tots els aïllats ST 37 eren positius pel MAb 3/1 i eren subgrup Philadelphia. En canvi l'ST 23, l'ST més prevalent del grup d'aïllats clínics, eren positius pel MAb 3/1, però estava associat a diferents subgrups. L'ST 23 és un dels STs que més casos ha provocat a França, juntament amb l'ST 1 i ST47 [197], i com passa en el nostre estudi, rarament és aïllat de l'ambient. En realitzar l'anàlisi filogenètic, aquest ST formava el CC6 amb l'ST 1012 i l'ST 1574, els quals tampoc es van trobar a l'ambient. És molt probable que aquests STs tinguin una gran capacitat de virulència però que la seva capacitat de persistir en l'ambient durant molt de temps estigui disminuïda.

Els STs més abundants a l'ambient, a més de l'ST1 eren l'ST 284 i ST 181, i ST 87. Els dos primers es trobaven com a "singletons" en l'anàlisi filogenètic, i van ser identificats tant en el grup clínic com en l'ambient sense causar casos. Únicament l'ST 87 va ser aïllat només de l'ambient, formant part del CC8 amb l'ST 1836, el qual també es va aïllar només de l'ambient i l'ST 1362, que només es va trobar associat a casos clínics. En comparar els STs més abundants amb altres estudis, les distribucions dels STs són diferents, a excepció de l'ST 1, posant de manifest que la colonització ambiental és molt més heterogènia entre les regions que els STs vinculats amb la malaltia.

Una de les limitacions d'aquest estudi poblacional, és la metodologia de selecció dels aïllats ambientals. Aquests provenien d'estudis epidemiològics enfocats a la cerca dels focus d'infecció que podrien estar relacionats amb un cas o brot. Per tant, a la majoria de casos només es van seleccionar els aïllats identificats com a *Legionella pneumophila*, eliminant la resta d'espècies de *Legionella*, i moltes vegades aquesta selecció també era a favor del serogrup 1, exclouent la resta de serogrupos i per tant la diversitat ambiental d'aquest estudi estaria relacionada amb la diversitat en l'ambient de *L. pneumophila* serogrup 1. A més, la selecció d'ambients no és representatiu de

tota l'àrea inicialment definida, ja que la majoria de casos i fonts ambientals seleccionades provenen de la costa central de la regió, i no de manera equitativa a la resta de localitzacions. Per tant, els resultats de diversitat ambiental potser no es podrien extrapolar a tots els ambients aquàtics artificials de Catalunya, ja que seria una petita representació de zones concretes, sobretot de l'Àrea Metropolitana de Barcelona.

En aquest objectiu hem pogut establir les diferències en la distribució d'STs i subgrups de Dresden entre els aïllats ambientals i clínics. A més també es va observar que els aïllats clínics només es troben puntualment en l'ambient, ja que només 9 dels 43 STs clínics es van trobar com a colonitzadors ambientals sense causar malaltia en aquell moment. Aquest fenomen podria ser degut a diferents factors com que l'increment de la virulència del bacteri desfavoreix la seva estabilitat en l'ambient, reflectit en la presència/absència de l'epítot MAb 3/1. Per altra banda, la capacitat d'infectar dels aïllats nosocomials estaria més relacionada a factors externs a la seva pròpia virulència, com per exemple la susceptibilitat de l'hostatger i la seva abundància en l'ambient.

Com s'ha descrit anteriorment, la distribució de genotips associats a soques clíniques és diferent de la distribució de soques ambientals. Aquest és el primer estudi de descripció de proteomes diferencials entre aïllats ambientals relacionats amb casos i aïllats ambientals no relacionats utilitzant la tècnica 2D-DIGE combinada amb espectrometria de masses (MALDI-TOF o LC-ESI-MS/MS). L'anàlisi global va mostrar que d'entre 500 punts només 63 presentaven expressió diferencial entre els dos grups. Les proteïnes identificades es van classificar en 5 categories. La categoria d'enzims va ser la més freqüentment identificada, especialment aquells enzims relacionats amb el TCA, catabolisme i anabolisme, i aquest es trobaven sobrerrepresentades en els aïllats ambientals relacionats amb casos. La comparació proteòmica es va realitzar amb cultius en fase post-exponencial, ja que és en aquesta fase on s'expressen més factors de virulència en cultiu *in vitro* [103,198].

Legionel·la utilitza sucres i lípids com a font d'energia en la fase post-exponencial o dins de la cèl·lula hostatgera quan els aminoàcids són escassos [103,199]. A més el cicle del TCA està involucrat en la producció de poli-hidroxibutirat (PHB), un compost d'emmagatzematge d'energia bacterià [199]. Per altra banda, els enzims relacionats

amb el TCA tenen funció de captació de 'metalls', ja que molts d'ells tenen un grup de Fe-S (com l'Aconitat hidratasa i la Succinat deshidrogenasa). Els aïllats relacionats amb casos van presentar alts nivells de proteïnes involucrades en aquestes vies, d'aquesta manera són capaces d'explotar millor els recursos *in vitro*. Aquest fenomen podria ocórrer en els ambients aquàtics artificials, com en les torres de refrigeració, on els nutrients són limitats, i el bacteri necessita maximitzar el seu ús, per tal de poder persistir durant llarg períodes en l'ambient.

El grup d'aïllats relacionats amb els pacients també va presentar alts nivells d'enzims catabòlics i anabòlics. La presència d'aquest grup d'enzims en aquests aïllats podria estar relacionada amb una taxa de creixement més elevada que es podria relacionar amb estudis previs on els aïllats responsables d'un brot es troben més abundants en l'ambient [200]. Tot i trobar més enzims catabòlics i anabòlics en el grup d'aïllats relacionats amb casos, en l'altre grup es va trobar sobrerepresentada la proteïna *trpA*. La reacció fisiològica per a la producció de triptòfan és metabòlicament cara [201], la qual cosa no és consistent amb els baixos nivells de proteïnes relacionades amb la producció d'energia comparat amb els grup d'aïllats relacionats amb casos.

La categoria de proteïnes relacionades amb la traducció, modificació, recanvi de proteïnes i xaperona es va trobar sobrerepresentada en els aïllats relacionats amb casos. *Legionella* no és capaç de sintetitzar alguns aminoàcids [199], per tant el bacteri necessita maximitzar l'ús d'aquests en l'ambient. La presència de proteïnes relacionades amb l'escissió de pèptids permet la reutilització dels aminoàcids quan aquests són escassos en el medi de cultiu o ambient. Per tant, els aïllats relacionats amb casos serien més hàbils en la producció de noves proteïnes i en el canvi d'expressió de proteïnes per adaptar-se a noves condicions. Una proteïna interessant trobada en sobrerepresentació en el grup d'aïllats relacionats amb casos és la EF-Tu. El seu paper principal és la síntesi de proteïnes, tot i que també s'ha vist que pot estar implicada en altres funcions. Per exemple, en *E. coli* la proteïna EF-Tu té activitat xaperona i osmoprotector [201,202]; i en *Mycoplasma pneumonia* actua com a factor d'adhesió [203,204]. La proteïna no té una localització específica en el citoplasma, trobant-se associada a proteïnes de membrana en *Lactobacillus* o exposada en la superfície en *Mycobacterium leprae* i *E. coli* [204,205]. Es necessiten estudis més

focalitzats en *L. pneumophila* per comprendre el paper d'aquesta proteïna i determinar quins avantatges podria representar la sobreexpressió d'aquesta.

En el grup d'aïllats ambientals no relacionats, més del 40 % de les proteïnes identificades estaven associades amb estrès (KatG, GspA, DnaK supressor protein i ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit). Aquestes proteïnes s'indueixen durant molts tipus d'estrès com per exemple en presència de peròxid d'hidrogen, xoc tèrmic o en resposta a la formació de cossos d'inclusió [206]. En aquest estudi, els cultius es van realitzar en les mateixes condicions i es van recollir tots els aïllats en la mateixa fase de creixement, per tant, l'expressió d'aquestes proteïnes no està relacionada amb un xoc tèrmic o una fase de creixement diferent. Durant les condicions d'estrès, els bacteris sobreviuen per una resposta de persistència o de resistència [207], per aquesta raó, per tal de fer front a les mateixes condicions, cada grup d'aïllats activa diferents vies de regulació d'estrès [208].

En tots dos grups d'aïllats es van identificar proteïnes hipotètiques. En el grup d'aïllats relacionats amb casos es va identificar la proteïna plpI0048. Aquesta proteïna està relacionada amb el sistema CRISPR/Cas associat a la proteïna Csy3 de la superfamília RAMP, que compren un sistema de defensa heretable contra bacteriòfags i altres elements estranys d'ADN. L'adquisició d'aquests gens podria explicar la persistència en l'ambient dels aïllats relacionats amb casos, mentre que els aïllats no relacionats amb malaltia apareixen i desapareixen durant el temps [209–211].

En el grup d'aïllats no relacionats amb casos es va identificar la proteïna lpg2867, relacionada amb la degradació de xenobiòtics. Les proteïnes que pertanyen a aquesta via s'expressen en presència d'aquests compostos xenobiòtics, que moltes vegades estan produïts pel propi microorganisme [212]. Aquests compostos poden interceptar el creixement i l'estabilitat del bacteri, provocant una diferenciació prematura [213], i una disminució de la capacitat de persistència en l'ambient.

Finalment, la proteïna MOMP es va trobar com a proteïna diferencial en ambdós grups. La membrana externa dels bacteris gram-negatius té un paper molt important en l'adaptació a l'ambient. Les proteïnes de membrana externa (OMPs) i les lipoproteïnes assumeixen aquest paper amb la capacitat de donar estructura i estabilitat a la membrana, per l'activitat passiva i activa de transport d'ions, senyals de transducció, defensa i catàlisi [214]. La proteïna MOMP és la proteïna de membrana

més abundant sintetitzada per *L. pneumophila* [215]. Aquesta proteïna és una porina que forma canals d'ions [98,215]. La proteïna MOMP està implicada en la patogènesis, intervenint en la fagocitosi per unió al component C3 de complement i als receptors dels monòcits CR1 i CR3. També pot ajudar a la fagocitosi en absència de complement [215,216]. En aquest estudi, la proteïna MOMP ha sigut identificada en els punts del 2D-DIGE amb una distribució 'característica', suggerint la presència de modificacions post-traduccionals (PTM). Desafortunadament, no vam ser capaços de caracteritzar les modificacions d'aquesta proteïna. Curiosament s'ha descrit la glicosilació de la proteïna MOMP en *S. flexneri* i suggerida en *C. trachomatis* i aquestes glicosilacions s'han relacionat amb trets de virulència [217,218]. Es precisen estudis més exhaustius sobre les PTM per a determinar quins canvis provoca en pI i MW i per a determinar les funcions de les proteïnes modificades.

Es necessiten investigacions més extenses per a la determinació dels canvis de pI i MW que provoquen les PTM i per a la seva identificació i caracterització de les modificacions de l'activitat proteica, amb interès particular en les proteïnes de membrana externa, ja que són aquestes les que podran donar més informació sobre la virulència, la identificació de noves dianes terapèutiques o desinfectants per a la prevenció de la estimulació de creixement i disseminació de *Legionella*, a més de la identificació de les soques més rellevants associades a malaltia. Aquests marcadors podrien ser inclosos en els criteris de prevenció de salut pública, fent que siguin més efectives i econòmiques les desinfeccions recurrents innecessàries.

En aquest estudi s'ha intentat correlacionar el perfils proteics diferencials amb els fenotips causants de malaltia, però ha sigut una tasca complicada principalment per la heterogeneïtat genètica intra-grup i inter-grup. Una fracció d'aquesta variabilitat segurament no estava relacionada amb les diferències en la virulència, sinó amb l'aptitud de sobreviure en l'ambient. A més, la selecció del petit nombre d'aïllats en l'estudi limita la extrapolació dels resultats, els quals no poden ser validats en un grup més gran per l'absència d'anticossos disponibles, i la manca de correlació entre les proteïnes trobades i els anàlisis transcriptòmics [219], com s'ha pogut comprovar en els anàlisis de qPCR. A més, el nombre de punts no identificats (ja sigui per una baixa concentració de proteïnes, soroll de fons en l'espectre MS, o pels artefactes artificials produïts en el 2D-DIGE) pot dificultar la comprensió de l'estudi comparatiu. No

obstant, la proteòmica basada en gel és una eina potent per a la obtenció d'informació entre grups i és capaç d'identificar les proteïnes associades al metabolisme i estrès.

L'adaptació bacteriana a l'ambient és clau en la supervivència, i aquest fenomen podria ser degut a petites modificacions que fan més fort a l'organisme en algunes situacions. Aquestes modificacions poden diferir entre grups i tenir el mateix efecte en una situació concreta, però també poden tenir una funció diferent en altres ambients estimulant o inhibint alguns processos. En el nostre cas, s'ha pogut comprovar que la capacitat citopatogènica dels aïllats ambientals no relacionats amb casos i la dels aïllats ambientals relacionats amb casos no presenta diferències significatives. Aquest fet està en acord amb que l'habilitat per infectar humans no contribueix a la selecció evolutiva de legionel·la, degut a que és un patogen humà oportunista, i no es transmet persona a persona. En comptes d'això, la selecció evolutiva podria resultar de les pressions del nínxol ecològic o dels protozous hostatger de legionel·la [190]. Per tant, la capacitat de produir infecció en humans estaria més relacionada amb la seva presència en l'ambient i la supervivència en els aerosols per a la seva transmissió que amb la seva capacitat citopatogènica.

CONCLUSIONS

Dels resultats obtinguts en aquests estudis s'extreuen les següents conclusions:

Objectiu 1. Comparació de mètodes de tipatge en brots

- Les tècniques PFGE i SBT tenen gran capacitat discriminatòria per ser aplicades en la investigació dels brots per a la cerca del focus d'infecció.
- La tècnica PFGE té un poder discriminatori més elevat per a l'estudi de la variabilitat entre els aïllats de *Legionella*.
- La tècnica SBT necessitaria trobar nous marcadors per poder millorar la capacitat discriminatòria i diferenciar aquells STs iguals que mostren perfils PFGE diferents.

Objectiu 2. Anàlisi de diversitat de poblacions

- La diversitat d'STs entre les poblacions d'aïllats clínics i ambientals d'una regió petita és molt similar a les diversitats d'STs de regions molt més grans (de 32 000 km² a 200 000-9 984 000 km²).
- Existeixen diferències de distribucions d'STs i 'fenons' entre els aïllats clínics i ambientals.
- La majoria d'aïllats clínics presenten l'epítot relacionat amb la virulència MAb 3/1, mentre que els aïllats ambientals són majoritàriament negatius, reflectint que la pèrdua d'aquest epítot augmenta el seu rendiment a l'ambient, tot i que disminuiria la virulència dels aïllats.
- Els 'fenons' ST23-Philadelphia i ST37-Philadelphia són els més predominants entre els causants de casos de legionel·losis en aquesta regió, suggerint una major virulència.
- Els aïllats clínics nosocomials presenten un patró de diversitat d'al·lels i reactivitat en front dels anticossos monoclonals de Dresden similar als aïllats ambientals, posant de manifest que el factor de risc bacterià en casos nosocomials estaria relacionat amb el grau de colonització dels sistemes de distribució d'aigua i no a la virulència del bacteri.

Objectiu 3. Caracterització proteòmica

- Els aïllats relacionats amb casos mostraven un increment en la producció d'enzims relacionats amb el metabolisme per a la generació d'energia i nous precursors per incrementar la taxa de creixement.
- Els aïllats ambientals no relacionats amb casos presentaven un patró d'estrès, amb un increment de factors de transcripció pel canvi d'expressió de proteïnes per a la protecció contra l'estrès oxidatiu i parada del creixement bacterià.
- La resistència a bacteriòfags i altres elements genètics mòbils a través del sistema CRISPR/Cas proporciona una resistència més alta en l'ambient.
- Les modificacions post-traduccionals podrien provocar canvis en l'adaptació a l'ambient i en la capacitat de virulència dels aïllats.

REFERÈNCIES

1. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, et al. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med.* 1977;297: 1189–1197. doi:10.1056/NEJM197712012972201
2. McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med.* 1977;297: 1197–1203. doi:10.1056/NEJM197712012972202
3. Osterholm MT, Chin TD, Osborne DO, Dull HB, Dean AG, Fraser DW, et al. A 1957 outbreak of Legionnaires' disease associated with a meat packing plant. *Am J Epidemiol.* 1983;117: 60–67.
4. Terranova W, Cohen ML, Fraser DW. 1974 outbreak of Legionnaires' Disease diagnosed in 1977. Clinical and epidemiological features. *Lancet.* 1978;2: 122–124.
5. Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann Intern Med.* 1979;90: 656–658.
6. Glick TH, Gregg MB, Berman B, Mallison G, Rhodes WW, Kassanoff I. Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol.* 1978;107: 149–160.
7. Den Boer JW, Yzerman EPF, Schellekens J, Lettinga KD, Boshuizen HC, Van Steenberghe JE, et al. A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerg Infect Dis.* 2002;8: 37–43.
8. Greig JE, Carnie JA, Tallis GF, Ryan NJ, Tan AG, Gordon IR, et al. An outbreak of Legionnaires' disease at the Melbourne Aquarium, April 2000: investigation and case-control studies. *Med J Aust.* 2004;180: 566–572.
9. BMS (Boletín Microbiológico Semanal). Brote de neumonía por *Legionella* en Almuñécar. *Bol Microbiol Sem* 48:2-4. 1991.
10. CNE (Centro Nacional de Epidemiología). Informe del brote de neumonía por *Legionella* de Alcalá de Henares. Instituto Carlos III *Bol Epidemiol Sem* 14:133-44. 1997.
11. García-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, García J, González-Diego P, Jiménez-Buñuales T, et al. Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2003;9: 915–921. doi:10.3201/eid0908.030337
12. Caylà JA, Sala MR, Plasencia A, Beneyto V, Sureda V, Llorens M, et al. [A community outbreak of Legionnaires' disease in Barcelona: epidemiologic and environmental study]. *Med Clínica.* 1989;93: 526–530.

13. Jansà JM, Caylà JA, Ferrer D, Gracia J, Pelaz C, Salvador M, et al. An outbreak of Legionnaires' disease in an inner city district: importance of the first 24 hours in the investigation. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis.* 2002;6: 831–838.
14. Garcia-Nuñez M, Quero S, Catini S, Pedro-Botet ML, Mateu L, Sopena N, et al. Comparative molecular and antibody typing during the investigation of an outbreak of Legionnaires' disease. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* 2013;19: 896–901. doi:10.1007/s10156-013-0595-8
15. Ferré MRS, Arias C, Oliva JM, Pedrol A, García M, Pellicer T, et al. A community outbreak of Legionnaires' disease associated with a cooling tower in Vic and Gurb, Catalonia (Spain) in 2005. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2009;28: 153–159. doi:10.1007/s10096-008-0603-6
16. Fox KF, Brown A. Properties of the genus *Tatlockia*. Differentiation of *Tatlockia* (*Legionella*) *maceachernii* and *micdadei* from each other and from other legionellae. *Can J Microbiol.* 1993;39: 486–491.
17. Benson RF, Fields BS. Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect.* 1998;13: 90–99.
18. Fry NK, Bangsberg JM, Bernander S, Etienne J, Forsblom B, Gaia V, et al. Assessment of intercentre reproducibility and epidemiological concordance of *Legionella pneumophila* serogroup 1 genotyping by amplified fragment length polymorphism analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2000;19: 773–780.
19. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15: 506–526.
20. Muder RR, Yu VL. Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2002;35: 990–998. doi:10.1086/342884
21. Pearce MM, Theodoropoulos N, Mandel MJ, Brown E, Reed KD, Cianciotto NP. *Legionella cardiaca* sp. nov., isolated from a case of native valve endocarditis in a human heart. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62: 2946–2954. doi:10.1099/ijs.0.039248-0
22. Ginevra C, Jacotin N, Diancourt L, Guigon G, Arquilliere R, Meugnier H, et al. *Legionella pneumophila* sequence type 1/Paris pulsotype subtyping by spoligotyping. *J Clin Microbiol.* 2012;50: 696–701. doi:10.1128/JCM.06180-11
23. Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, et al. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis.* 2002;186: 127–128. doi:10.1086/341087

24. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15: 506–526.
25. Ott M, Messner P, Heesemann J, Marre R, Hacker J. Temperature-dependent expression of flagella in Legionella. *J Gen Microbiol.* 1991;137: 1955–1961.
26. Rodgers FG, Greaves PW, Macrae AD, Lewis MJ. Electron microscopic evidence of flagella and pili on Legionella pneumophila. *J Clin Pathol.* 1980;33: 1184–1188.
27. Molofsky AB, Swanson MS. Differentiate to thrive: lessons from the Legionella pneumophila life cycle. *Mol Microbiol.* 2004;53: 29–40. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04129.x
28. Katz SM, Hashemi S, Brown KR, Habib WA, Hammel JM. Pleomorphism of Legionella pneumophila. *Ultrastruct Pathol.* 1984;6: 117–129.
29. Moss CW, Dees SB. Further studies of the cellular fatty acid composition of Legionnaires disease bacteria. *J Clin Microbiol.* 1979;9: 648–649.
30. Moss CW, Dees SB. Cellular fatty acid composition of WIGA, a rickettsia-like agent similar to the Legionnaires disease bacterium. *J Clin Microbiol.* 1979;10: 390–391.
31. Chandler FW, Hicklin MD, Blackmon JA. Demonstration of the agent of Legionnaires' disease in tissue. *N Engl J Med.* 1977;297: 1218–1220. doi:10.1056/NEJM197712012972206
32. Van Orden AE, Greer PW. Modification of the Dieterle Spirochete Stain. *J Histotechnol.* 1: 51–53.
33. Pine L, Hoffman PS, Malcolm GB, Benson RF, Keen MG. Determination of catalase, peroxidase, and superoxide dismutase within the genus Legionella. *J Clin Microbiol.* 1984;20: 421–429.
34. Pine L, George JR, Reeves MW, Harrell WK. Development of a chemically defined liquid medium for growth of Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol.* 1979;9: 615–626.
35. Feeley JC, Gorman GW, Weaver RE, Mackel DC, Smith HW. Primary isolation media for Legionnaires disease bacterium. *J Clin Microbiol.* 1978;8: 320–325.
36. Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC, et al. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol.* 1979;10: 437–441.
37. Edelstein PH. Improved semiselective medium for isolation of Legionella pneumophila from contaminated clinical and environmental specimens. *J Clin Microbiol.* 1981;14: 298–303.

38. Morrill WE, Barbaree JM, Fields BS, Sanden GN, Martin WT. Increased recovery of *Legionella micdadei* and *Legionella bozemanii* on buffered charcoal yeast extract agar supplemented with albumin. *J Clin Microbiol.* 1990;28: 616–618.
39. Dennis PJ, Green D, Jones BP. A note on the temperature tolerance of *Legionella*. *J Appl Bacteriol.* 1984;56: 349–350.
40. Wadowsky RM, Wolford R, McNamara AM, Yee RB. Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water. *Appl Environ Microbiol.* 1985;49: 1197–1205.
41. Fliermans null. Ecology of *Legionella*: From Data to Knowledge with a Little Wisdom. *Microb Ecol.* 1996;32: 203–228.
42. Fields BS. The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* 1996;4: 286–290.
43. Pravinkumar SJ, Edwards G, Lindsay D, Redmond S, Stirling J, House R, et al. A cluster of Legionnaires' disease caused by *Legionella longbeachae* linked to potting compost in Scotland, 2008-2009. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2010;15: 19496.
44. Travis TC, Brown EW, Peruski LF, Siludjai D, Jorakate P, Salika P, et al. Survey of legionella species found in thai soil. *Int J Microbiol.* 2012;2012: 218791. doi:10.1155/2012/218791
45. Ruehleman SA, Crawford GR. Panic in the potting shed. The association between *Legionella longbeachae* serogroup 1 and potting soils in Australia. *Med J Aust.* 1996;164: 36–38.
46. Mercante JW, Winchell JM. Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28: 95–133. doi:10.1128/CMR.00029-14
47. Rogers J, Dowsett AB, Keevil CW. A paint incorporating silver to control mixed biofilms containing *Legionella pneumophila*. *J Ind Microbiol.* 1995;15: 377–383.
48. Murga R, Forster TS, Brown E, Pruckler JM, Fields BS, Donlan RM. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiol Read Engl.* 2001;147: 3121–3126.
49. Ito I, Naito J, Kadowaki S, Mishima M, Ishida T, Hongo T, et al. Hot spring bath and *Legionella pneumonia*: an association confirmed by genomic identification. *Intern Med Tokyo Jpn.* 2002;41: 859–863.
50. Kurosawa H, Fujita M, Kobatake S, Kimura H, Ohshima M, Nagai A, et al. A case of *Legionella pneumonia* linked to a hot spring facility in Gunma Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2010;63: 78–79.

51. Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol.* 1980;33: 1179–1183.
52. Horwitz MA. Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med.* 1983;158: 1319–1331.
53. Gao LY, Harb OS, Abu Kwaik Y. Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect Immun.* 1997;65: 4738–4746.
54. Cirillo JD, Cirillo SL, Yan L, Bermudez LE, Falkow S, Tompkins LS. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* 1999;67: 4427–4434.
55. Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun.* 1994;62: 3254–3261.
56. Brüggemann H, Cazalet C, Buchrieser C. Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9: 86–94. doi:10.1016/j.mib.2005.12.009
57. Bellinger-Kawahara C, Horwitz MA. Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J Exp Med.* 1990;172: 1201–1210.
58. Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J Exp Med.* 1987;166: 1377–1389.
59. Abu Kwaik Y. The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62: 2022–2028.
60. Swanson MS, Hammer BK. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54: 567–613. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.567
61. Cianciotto NP. Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol IJMM.* 2001;291: 331–343. doi:10.1078/1438-4221-00139
62. Horwitz MA. Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell.* 1984;36: 27–33.

63. Fields BS, Fields SR, Loy JN, White EH, Steffens WL, Shotts EB. Attachment and entry of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis*. *J Infect Dis.* 1993;167: 1146–1150.
64. King CH, Fields BS, Shotts EB, White EH. Effects of cytochalasin D and methylamine on intracellular growth of *Legionella pneumophila* in amoebae and human monocyte-like cells. *Infect Immun.* 1991;59: 758–763.
65. Venkataraman C, Haack BJ, Bondada S, Abu Kwaik Y. Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. *J Exp Med.* 1997;186: 537–547.
66. Abu Kwaik Y, Fields BS, Engleberg NC. Protein expression by the protozoan *Hartmannella vermiformis* upon contact with its bacterial parasite *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* 1994;62: 1860–1866.
67. Gao LY, Abu Kwaik Y. Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. *Infect Immun.* 1999;67: 862–870.
68. Hägele S, Hacker J, Brand BC. *Legionella pneumophila* kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;169: 51–58.
69. Gao LY, Kwaik YA. The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol.* 2000;2: 79–90.
70. Hammer BK, Swanson MS. Co-ordination of legionella pneumophila virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol Microbiol.* 1999;33: 721–731.
71. Bosshardt SC, Benson RF, Fields BS. Flagella are a positive predictor for virulence in *Legionella*. *Microb Pathog.* 1997;23: 107–112. doi:10.1006/mpat.1997.0134
72. Pruckler JM, Mermel LA, Benson RF, Giorgio C, Cassidy PK, Breiman RF, et al. Comparison of *Legionella pneumophila* isolates by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis: analysis from seven epidemic investigations. *J Clin Microbiol.* 1995;33: 2872–2875.
73. Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Toews GB, Engleberg NC. A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect Immun.* 1989;57: 1255–1262.
74. Fischer G, Bang H, Ludwig B, Mann K, Hacker J. Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl-cis/trans isomerase (PPIase) activity. *Mol Microbiol.* 1992;6: 1375–1383.

75. Cianciotto NP, Fields BS. Legionella pneumophila mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89: 5188–5191.
76. Cianciotto NP, Bangsberg JM, Eisenstein BI, Engleberg NC. Identification of mip-like genes in the genus Legionella. Infect Immun. 1990;58: 2912–2918.
77. Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW. Sequence-based classification scheme for the genus Legionella targeting the mip gene. J Clin Microbiol. 1998;36: 1560–1567.
78. Weissgerber P, Faigle M, Northoff H, Neumeister B. Investigation of mechanisms involved in phagocytosis of Legionella pneumophila by human cells. FEMS Microbiol Lett. 2003;219: 173–179.
79. Cirillo SLG, Yan L, Littman M, Samrakandi MM, Cirillo JD. Role of the Legionella pneumophila rtxA gene in amoebae. Microbiol Read Engl. 2002;148: 1667–1677.
80. D’Auria G, Jiménez N, Peris-Bondia F, Pelaz C, Latorre A, Moya A. Virulence factor rtx in Legionella pneumophila, evidence suggesting it is a modular multifunctional protein. BMC Genomics. 2008;9: 14. doi:10.1186/1471-2164-9-14
81. Aragon V, Kurtz S, Flieger A, Neumeister B, Cianciotto NP. Secreted enzymatic activities of wild-type and pilD-deficient Legionella pneumophila. Infect Immun. 2000;68: 1855–1863.
82. Stone BJ, Abu Kwaik Y. Expression of multiple pili by Legionella pneumophila: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. Infect Immun. 1998;66: 1768–1775.
83. Liles MR, Viswanathan VK, Cianciotto NP. Identification and temperature regulation of Legionella pneumophila genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. Infect Immun. 1998;66: 1776–1782.
84. Liles MR, Edelstein PH, Cianciotto NP. The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen Legionella pneumophila. Mol Microbiol. 1999;31: 959–970.
85. Rossier O, Cianciotto NP. Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by Legionella pneumophila. Infect Immun. 2001;69: 2092–2098. doi:10.1128/IAI.69.4.2092-2098.2001
86. Ridenour DA, Cirillo SLG, Feng S, Samrakandi MM, Cirillo JD. Identification of a gene that affects the efficiency of host cell infection by Legionella pneumophila in a temperature-dependent fashion. Infect Immun. 2003;71: 6256–6263.

87. Hilbi H, Segal G, Shuman HA. Icm/dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol*. 2001;42: 603–617.
88. Duménil G, Isberg RR. The *Legionella pneumophila* IcmR protein exhibits chaperone activity for IcmQ by preventing its participation in high-molecular-weight complexes. *Mol Microbiol*. 2001;40: 1113–1127.
89. Joshi AD, Sturgill-Koszycki S, Swanson MS. Evidence that Dot-dependent and -independent factors isolate the *Legionella pneumophila* phagosome from the endocytic network in mouse macrophages. *Cell Microbiol*. 2001;3: 99–114.
90. Molmeret M, Abu Kwaik Y. How does *Legionella pneumophila* exit the host cell? *Trends Microbiol*. 2002;10: 258–260.
91. Molmeret M, Alli OAT, Zink S, Flieger A, Cianciotto NP, Kwaik YA. icmT is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells. *Infect Immun*. 2002;70: 69–78.
92. Zink SD, Pedersen L, Cianciotto NP, Abu-Kwaik Y. The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. *Infect Immun*. 2002;70: 1657–1663.
93. Marra A, Blander SJ, Horwitz MA, Shuman HA. Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89: 9607–9611.
94. Nagai H, Roy CR. The DotA protein from *Legionella pneumophila* is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter. *EMBO J*. 2001;20: 5962–5970. doi:10.1093/emboj/20.21.5962
95. Gao LY, Stone BJ, Brieland JK, Abu Kwaik Y. Different fates of *Legionella pneumophila* pmi and mil mutants within macrophages and alveolar epithelial cells. *Microb Pathog*. 1998;25: 291–306.
96. Sadosky AB, Wiater LA, Shuman HA. Identification of *Legionella pneumophila* genes required for growth within and killing of human macrophages. *Infect Immun*. 1993;61: 5361–5373.
97. Garduño RA, Garduño E, Hoffman PS. Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect Immun*. 1998;66: 4602–4610.
98. Butler CA, Hoffman PS. Characterization of a major 31-kilodalton peptidoglycan-bound protein of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol*. 1990;172: 2401–7.
99. Helbig JH, Lück PC, Knirel YA, Witzleb W, Zähringer U. Molecular characterization of a virulence-associated epitope on the lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Epidemiol Infect*. 1995;115: 71–78.

100. Lebeau I, Lammertyn E, De Buck E, Maes L, Geukens N, Van Mellaert L, et al. First proteomic analysis of *Legionella pneumophila* based on its developing genome sequence. *Res Microbiol.* 2005;156: 119–129. doi:10.1016/j.resmic.2004.08.010
101. Khemiri A, Galland A, Vaudry D, Chan Tchi Song P, Vaudry H, Jouenne T, et al. Outer-membrane proteomic maps and surface-exposed proteins of *Legionella pneumophila* using cellular fractionation and fluorescent labelling. *Anal Bioanal Chem.* 2008;390: 1861–71. doi:10.1007/s00216-008-1923-1
102. Shevchuk O, Batzilla C, Hagele S, Kusch H, Engelmann S, Hecker M, et al. Proteomic analysis of *Legionella*-containing phagosomes isolated from *Dictyostelium*. *Int J Med Microbiol.* 2009;299: 489–508. doi:10.1016/j.ijmm.2009.03.006
103. Hayashi T, Nakamichi M, Naitou H, Ohashi N, Imai Y, Miyake M. Proteomic analysis of growth phase-dependent expression of *Legionella pneumophila* proteins which involves regulation of bacterial virulence traits. *PLoS One.* 5: e11718. doi:10.1371/journal.pone.0011718
104. Khemiri A, Lecheheb SA, Chi Song PC, Jouenne T, Cosette P. Proteomic regulation during *Legionella pneumophila* biofilm development: decrease of virulence factors and enhancement of response to oxidative stress. *J Water Health.* 2014;12: 242–253. doi:10.2166/wh.2014.103
105. Yu VL. Legionnaires' disease: seek and ye shall find. *Cleve Clin J Med.* 2001;68: 318–322.
106. Horwitz MA, Silverstein SC. Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiples intracellularly in human monocytes. *J Clin Invest.* 1980;66: 441–450. doi:10.1172/JCI109874
107. Arnold FW, Summersgill JT, Lajoie AS, Peyrani P, Marrie TJ, Rossi P, et al. A worldwide perspective of atypical pathogens in community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175: 1086–1093. doi:10.1164/rccm.200603-350OC
108. Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF. Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch Intern Med.* 1994;154: 2417–2422.
109. Straus WL, Plouffe JF, File TM, Lipman HB, Hackman BH, Salstrom SJ, et al. Risk factors for domestic acquisition of legionnaires disease. Ohio legionnaires Disease Group. *Arch Intern Med.* 1996;156: 1685–1692.
110. Misch EA, Verbon A, Prins JM, Skerrett SJ, Hawn TR. A TLR6 polymorphism is associated with increased risk of Legionnaires' disease. *Genes Immun.* 2013;14: 420–426. doi:10.1038/gene.2013.34

111. Tan MJ, Tan JS, Hamor RH, File TM, Breiman RF. The radiologic manifestations of Legionnaire's disease. The Ohio Community-Based Pneumonia Incidence Study Group. *Chest*. 2000;117: 398–403.
112. Tsai TF, Finn DR, Plikaytis BD, McCauley W, Martin SM, Fraser DW. Legionnaires' disease: clinical features of the epidemic in Philadelphia. *Ann Intern Med*. 1979;90: 509–517.
113. Macfarlane JT, Miller AC, Roderick Smith WH, Morris AH, Rose DH. Comparative radiographic features of community acquired Legionnaires' disease, pneumococcal pneumonia, mycoplasma pneumonia, and psittacosis. *Thorax*. 1984;39: 28–33.
114. Harrison's principles of internal medicine. 18th ed. New York: McGraw-Hill; 2012.
115. Murdoch DR. Diagnosis of Legionella infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2003;36: 64–69. doi:10.1086/345529
116. Den Boer JW, Yzerman EPF. Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2004;23: 871–878. doi:10.1007/s10096-004-1248-8
117. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2007;44 Suppl 2: S27–72. doi:10.1086/511159
118. Edelstein PH. The laboratory diagnosis of Legionnaires' disease. *Semin Respir Infect*. 1987;2: 235–241.
119. Gosting LH, Cabrian K, Sturge JC, Goldstein LC. Identification of a species-specific antigen in Legionella pneumophila by a monoclonal antibody. *J Clin Microbiol*. 1984;20: 1031–1035.
120. Benin AL, Benson RF, Besser RE. Trends in legionnaires disease, 1980-1998: declining mortality and new patterns of diagnosis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2002;35: 1039–1046. doi:10.1086/342903
121. Kashuba AD, Ballow CH. Legionella urinary antigen testing: potential impact on diagnosis and antibiotic therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1996;24: 129–139.
122. Dirven K, Ieven M, Peeters MF, van der Zee A, De Schrijver K, Goossens H. Comparison of three Legionella urinary antigen assays during an outbreak of legionellosis in Belgium. *J Med Microbiol*. 2005;54: 1213–1216. doi:10.1099/jmm.0.45909-0

123. Starnbach MN, Falkow S, Tompkins LS. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. *J Clin Microbiol.* 1989;27: 1257–1261.
124. MacDonell MT, Colwell RR. The nucleotide sequence of the 5S rRNA from *Legionella pneumophila*. *Nucleic Acids Res.* 1987;15: 1335.
125. Jonas D, Rosenbaum A, Weyrich S, Bhakdi S. Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of legionellae in bronchoalveolar fluid. *J Clin Microbiol.* 1995;33: 1247–1252.
126. Lisby G, Dessau R. Construction of a DNA amplification assay for detection of *Legionella* species in clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 1994;13: 225–231.
127. Hayden RT, Uhl JR, Qian X, Hopkins MK, Aubry MC, Limper AH, et al. Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. *J Clin Microbiol.* 2001;39: 2618–2626. doi:10.1128/JCM.39.7.2618-2626.2001
128. Edelstein PH. Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires disease: time for a change. *Ann Intern Med.* 1998;129: 328–330.
129. Alary M, Joly JR. Comparison of culture methods and an immunofluorescence assay for the detection of *Legionella pneumophila* in domestic hot water devices. *Curr Microbiol.* 1992;25: 19–23.
130. Flournoy DJ, Belobraydic KA, Silberg SL, Lawrence CH, Guthrie PJ. False positive *Legionella pneumophila* direct immunofluorescent monoclonal antibody test caused by *Bacillus cereus* spores. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1988;9: 123–125.
131. Tronel H, Hartemann P. Overview of diagnostic and detection methods for legionellosis and *Legionella* spp. *Lett Appl Microbiol.* 2009;48: 653–656. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02570.x
132. Joly JR, McKinney RM, Tobin JO, Bibb WF, Watkins ID, Ramsay D. Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 1986;23: 768–771.
133. Joly JR, McKinney RM, Tobin JO, Bibb WF, Watkins ID, Ramsay D. Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 1986;23: 768–771.
134. Helbig JH, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, Gaia V, Lauwers S, et al. Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2002;21: 710–716. doi:10.1007/s10096-002-0820-3

135. Pruckler JM, Mermel LA, Benson RF, Giorgio C, Cassidy PK, Breiman RF, et al. Comparison of *Legionella pneumophila* isolates by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis: analysis from seven epidemic investigations. *J Clin Microbiol.* 1995;33: 2872–2875.
136. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol.* 1986;51: 873–884.
137. Edelstein PH, Nakahama C, Tobin JO, Calarco K, Beer KB, Joly JR, et al. 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 Microbiol.* 1986;23: 1121–1126.
138. Bangsberg JM, Gerner-Smidt P, Colding H, Fiehn NE, Bruun B, Høiby N. Restriction fragment length polymorphism of rRNA genes for molecular typing of members of the family Legionellaceae. *J Clin Microbiol.* 1995;33: 402–406.
139. Schoonmaker D, Heimberger T, Birkhead G. 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.* 1992;30: 1491–1498.
140. Gaia V, Poloni C, Peduzzi R. Epidemiological typing of *Legionella pneumophila* with ribotyping. Report of two clinical cases. *Eur J Epidemiol.* 1994;10: 303–306.
141. Casini B, Valentini P, Baggiani A, Torracca F, Lorenzini C, Frateschi S, et al. Comparison of two molecular methods used for subtyping of *Legionella pneumophila* 1 strains isolated from a hospital water supply. *Water Sci Technol J Int Assoc Water Pollut Res.* 2008;58: 683–688. doi:10.2166/wst.2008.434
142. De Zoysa AS, Harrison TG. Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by pulsed-field gel electrophoresis with *Sfi*I and comparison of this method with restriction fragment-length polymorphism analysis. *J Med Microbiol.* 1999;48: 269–278.
143. Pruckler JM, Mermel LA, Benson RF, Giorgio C, Cassidy PK, Breiman RF, et al. Comparison of *Legionella pneumophila* isolates by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis: analysis from seven epidemic investigations. *J Clin Microbiol.* 1995;33: 2872–2875.
144. Schoonmaker D, Heimberger T, Birkhead G. 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.* 1992;30: 1491–1498.

145. Amemura-Maekawa J, Kura F, Chang B, Watanabe H. Legionella pneumophila serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan form a distinct genetic cluster. *Microbiol Immunol.* 2005;49: 1027–1033.
146. Bernander S, Jacobson K, Helbig JH, Lück PC, Lundholm M. A hospital-associated outbreak of Legionnaires' disease caused by Legionella pneumophila serogroup 1 is characterized by stable genetic fingerprinting but variable monoclonal antibody patterns. *J Clin Microbiol.* 2003;41: 2503–2508.
147. Boccia S, Stenico A, Amore R, Moroder L, Orsini M, Romano-Spica V, et al. Molecular epidemiology of Legionella pneumophila environmental isolates representing nine different serogroups determined by automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiol Infect.* 2005;133: 1097–1105. doi:10.1017/S0950268805004395
148. Garcia-Nuñez M, Sopena N, Ragull S, Pedro-Botet ML, Morera J, Sabria M. Persistence of Legionella in hospital water supplies and nosocomial Legionnaires' disease. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;52: 202–206. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00362.x
149. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33: 2233–2239.
150. Ginevra C, Jacotin N, Diancourt L, Guigon G, Arquilliere R, Meugnier H, et al. Legionella pneumophila sequence type 1/Paris pulsotype subtyping by spoligotyping. *J Clin Microbiol.* 2012;50: 696–701. doi:10.1128/JCM.06180-11
151. Georghiou PR, Doggett AM, Kielhofner MA, Stout JE, Watson DA, Lupski JR, et al. Molecular fingerprinting of Legionella species by repetitive element PCR. *J Clin Microbiol.* 1994;32: 2989–2994.
152. Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, et al. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol.* 2005;43: 2047–2052. doi:10.1128/JCM.43.5.2047-2052.2005
153. Gaia V, Fry NK, Harrison TG, Peduzzi R. Sequence-based typing of Legionella pneumophila serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak investigation. *J Clin Microbiol.* 2003;41: 2932–2939.
154. Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Lück PC. Addition of neuA, the gene encoding N-acylneuraminase cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing Legionella pneumophila serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol.* 2007;45: 1965–1968. doi:10.1128/JCM.00261-07

155. Scaturro M, Losardo M, De Ponte G, Ricci ML. Comparison of three molecular methods used for subtyping of *Legionella pneumophila* strains isolated during an epidemic of Legionellosis in Rome. *J Clin Microbiol.* 2005;43: 5348–5350. doi:10.1128/JCM.43.10.5348-4350.2005
156. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26: 547–603. doi:10.1128/CMR.00072-12
157. Fisher-Hoch S, Hudson MJ, Thompson MH. Identification of a clinical isolate as *Legionella pneumophila* by gas chromatography and mass spectrometry of cellular fatty acids. *Lancet.* 1979;2: 323–325.
158. Gaia V, Casati S, Tonolla M. Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. *Syst Appl Microbiol.* 2011;34: 40–44. doi:10.1016/j.syapm.2010.11.007
159. He Y, Chang TC, Li H, Shi G, Tang Y-W. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and database for identification of *Legionella* species. *Can J Microbiol.* 2011;57: 533–538. doi:10.1139/w11-039
160. Fujinami Y, Kikkawa HS, Kurosaki Y, Sakurada K, Yoshino M, Yasuda J. Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol Res.* 2011;166: 77–86. doi:10.1016/j.micres.2010.02.005
161. Severiano A, Pinto FR, Ramirez M, Carriço JA. Adjusted Wallace coefficient as a measure of congruence between typing methods. *J Clin Microbiol.* 2011;49: 3997–4000. doi:10.1128/JCM.00624-11
162. Spratt BG, Hanage WP, Li B, Aanensen DM, Feil EJ. Displaying the relatedness among isolates of bacterial species -- the eBURST approach. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;241: 129–134. doi:10.1016/j.femsle.2004.11.015
163. Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 2000;21: 1037–1053. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1037::AID-ELPS1037>3.0.CO;2-V
164. Mascot database search: Sequence database setup: NCBI nr [Internet]. [cited 7 Apr 2015]. Available: http://www.matrixscience.com/help/seq_db_setup_nr.html
165. UniProt [Internet]. [cited 17 Sep 2013]. Available: <http://www.uniprot.org/>
166. Hindré T, Brüggemann H, Buchrieser C, Héchard Y. Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm

- formation. *Microbiol Read Engl.* 2008;154: 30–41. doi:10.1099/mic.0.2007/008698-0
167. Trigui H, Dudyk P, Sum J, Shuman HA, Faucher SP. Analysis of the transcriptome of *Legionella pneumophila* hfq mutant reveals a new mobile genetic element. *Microbiol Read Engl.* 2013;159: 1649–1660. doi:10.1099/mic.0.067983-0
168. Primer designing tool [Internet]. [cited 7 Mar 2015]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
169. Zhou H, Ren H, Zhu B, Kan B, Xu J, Shao Z. Optimization of pulsed-field gel electrophoresis for *Legionella pneumophila* subtyping. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76: 1334–1340. doi:10.1128/AEM.01455-09
170. Kanatani J-I, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, et al. Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates identify a prevalent sequence type, ST505, and a distinct clonal group of clinical isolates in Toyama Prefecture, Japan. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* 2013;19: 644–652. doi:10.1007/s10156-012-0537-x
171. Sabria M, Alvarez J, Dominguez A, Pedrol A, Sauca G, Salleras L, et al. A community outbreak of Legionnaires' disease: evidence of a cooling tower as the source. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;12: 642–647. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01447.x
172. Sánchez-Busó L, Coscollá M, Pinto-Carbó M, Catalán V, González-Candelas F. Genetic Characterization of *Legionella pneumophila* Isolated from a Common Watershed in Comunidad Valenciana, Spain. *PloS One.* 2013;8: e61564. doi:10.1371/journal.pone.0061564
173. Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, et al. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet.* 2004;36: 1165–1173. doi:10.1038/ng1447
174. Chien M, Morozova I, Shi S, Sheng H, Chen J, Gomez SM, et al. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science.* 2004;305: 1966–1968. doi:10.1126/science.1099776
175. D'Auria G, Jiménez-Hernández N, Peris-Bondia F, Moya A, Latorre A. *Legionella pneumophila* pangenome reveals strain-specific virulence factors. *BMC Genomics.* 2010;11: 181. doi:10.1186/1471-2164-11-181
176. Schroeder GN, Petty NK, Mousnier A, Harding CR, Vogrin AJ, Wee B, et al. *Legionella pneumophila* strain 130b possesses a unique combination of type IV secretion systems and novel Dot/Icm secretion system effector proteins. *J Bacteriol.* 2010;192: 6001–6016. doi:10.1128/JB.00778-10
177. Steinert M, Heuner K, Buchrieser C, Albert-Weissenberger C, Glöckner G. *Legionella* pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host

- cell response. *Int J Med Microbiol IJMM*. 2007;297: 577–587. doi:10.1016/j.ijmm.2007.03.009
178. Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, Stagg HR, Zhang N, Kumar K, et al. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis*. 2014;14: 1011–1021. doi:10.1016/S1473-3099(14)70713-3
179. Chasqueira MJ, Rodrigues L, Nascimento M, Marques T. Sequence-based and monoclonal antibody typing of *Legionella pneumophila* isolated from patients in Portugal during 1987-2008. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2009;14.
180. Underwood AP, Jones G, Mentasti M, Fry NK, Harrison TG. Comparison of the *Legionella pneumophila* population structure as determined by sequence-based typing and whole genome sequencing. *BMC Microbiol*. 2013;13: 302. doi:10.1186/1471-2180-13-302
181. Ginevra C, Jacotin N, Diancourt L, Guigon G, Arquilliere R, Meugnier H, et al. *Legionella pneumophila* sequence type 1/Paris pulsotype subtyping by spoligotyping. *J Clin Microbiol*. 2012;50: 696–701. doi:10.1128/JCM.06180-11
182. Harrison TG, Doshi N, Fry NK, Joseph CA. Comparison of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* obtained in the UK over 19 years. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;13: 78–85. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01558.x
183. Harrison TG, Afshar B, Doshi N, Fry NK, Lee JV. Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2009;28: 781–791. doi:10.1007/s10096-009-0705-9
184. Reimer AR, Au S, Schindle S, Bernard KA. *Legionella pneumophila* monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types isolated in Canada between 1981 and 2009: Laboratory Component of National Surveillance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2010;29: 191–205. doi:10.1007/s10096-009-0840-3
185. Borchardt J, Helbig JH, Lück PC. Occurrence and distribution of sequence types among *Legionella pneumophila* strains isolated from patients in Germany: common features and differences to other regions of the world. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2008;27: 29–36. doi:10.1007/s10096-007-0392-3
186. Helbig JH, Uldum SA, Lück PC, Harrison TG. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax *Legionella* Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest *Legionella* Urin Antigen EIA. *J Med Microbiol*. 2001;50: 509–516.

187. Helbig JH, Uldum SA, Bernander S, Lück PC, Wewalka G, Abraham B, et al. Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial legionnaires' disease. *J Clin Microbiol.* 2003;41: 838–840.
188. Harrison TG, Afshar B, Doshi N, Fry NK, Lee JV. Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2009;28: 781–791. doi:10.1007/s10096-009-0705-9
189. Reimer AR, Au S, Schindle S, Bernard KA. *Legionella pneumophila* monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types isolated in Canada between 1981 and 2009: Laboratory Component of National Surveillance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2010;29: 191–205. doi:10.1007/s10096-009-0840-3
190. Kozak NA, Benson RF, Brown E, Alexander NT, Taylor TH, Shelton BG, et al. Distribution of lag-1 alleles and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. *J Clin Microbiol.* 2009;47: 2525–2535. doi:10.1128/JCM.02410-08
191. Kozak-Muiznieks NA, Lucas CE, Brown E, Pondo T, Taylor TH, Frace M, et al. Prevalence of sequence types among clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in the United States from 1982 to 2012. *J Clin Microbiol.* 2014;52: 201–211. doi:10.1128/JCM.01973-13
192. Amemura-Maekawa J, Kikukawa K, Helbig JH, Kaneko S, Suzuki-Hashimoto A, Furuhashi K, et al. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78: 4263–4270. doi:10.1128/AEM.06869-11
193. Amemura-Maekawa J, Kura F, Helbig JH, Chang B, Kaneko A, Watanabe Y, et al. Characterization of *Legionella pneumophila* isolates from patients in Japan according to serogroups, monoclonal antibody subgroups and sequence types. *J Med Microbiol.* 2010;59: 653–659. doi:10.1099/jmm.0.017509-0
194. Lee HK, Shim JI, Kim HE, Yu JY, Kang YH. Distribution of *Legionella* species from environmental water sources of public facilities and genetic diversity of *L. pneumophila* serogroup 1 in South Korea. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76: 6547–6554. doi:10.1128/AEM.00422-10
195. Tijet N, Tang P, Romilowych M, Duncan C, Ng V, Fisman DN, et al. New endemic *Legionella pneumophila* serogroup I clones, Ontario, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2010;16: 447–454. doi:10.3201/eid1603.081689
196. Harrison TG, Fry NK, Afshar B, Bellamy W, Doshi N, Underwood AP. Typing of *Legionella pneumophila* and its role in elucidating the epidemiology of

- Legionnaire's disease. *Legionella*: state of the art 30 years after its recognition. Washington, DC: ASM Press; pp. 94–99.
197. Cassier P, Campese C, Le Strat Y, Che D, Ginevra C, Etienne J, et al. Epidemiologic characteristics associated with ST23 clones compared to ST1 and ST47 clones of Legionnaires disease cases in France. *New Microbes New Infect.* 2015;3: 29–33. doi:10.1016/j.nmni.2014.10.006
 198. Byrne B, Swanson MS. Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun.* 1998;66: 3029–34.
 199. Eylert E, Herrmann V, Jules M, Gillmaier N, Lautner M, Buchrieser C, et al. Isotopologue profiling of *Legionella pneumophila*: role of serine and glucose as carbon substrates. *J Biol Chem.* 2010;285: 22232–22243. doi:10.1074/jbc.M110.128678
 200. Garcia-Nuñez M, Quero S, Catini S, Pedro-Botet ML, Mateu L, Sopena N, et al. Comparative molecular and antibody typing during the investigation of an outbreak of Legionnaires' disease. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* 2013; doi:10.1007/s10156-013-0595-8
 201. Phillips RS, Wang AK, Marchal S, Lange R. Effects of pressure and osmolytes on the allosteric equilibria of *Salmonella typhimurium* tryptophan synthase. *Biochemistry (Mosc).* 2012;51: 9354–9363. doi:10.1021/bi301002q
 202. Caldas TD, El Yaagoubi A, Richarme G. Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. *J Biol Chem.* 1998;273: 11478–11482.
 203. Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB. Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 2002;46: 1041–1051.
 204. Granato D, Bergonzelli GE, Pridmore RD, Marvin L, Rouvet M, Cortesey-Theulaz IE. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect Immun.* 2004;72: 2160–9.
 205. Marques MA, Chitale S, Brennan PJ, Pessolani MC. Mapping and identification of the major cell wall-associated components of *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.* 1998;66: 2625–2631.
 206. Abu Kwaik Y, Gao LY, Harb OS, Stone BJ. Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant. *Mol Microbiol.* 1997;24: 629–42.
 207. Hong SH, Wang X, O'Connor HF, Benedik MJ, Wood TK. Bacterial persistence increases as environmental fitness decreases. *Microb Biotechnol.* 2012;5: 509–522. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00327.x

208. Dalebroux ZD, Yagi BF, Sahr T, Buchrieser C, Swanson MS. Distinct roles of ppGpp and DksA in *Legionella pneumophila* differentiation. *Mol Microbiol.* 2010;76: 200–219. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07094.x
209. Garcia-Nunez M, Sopena N, Ragull S, Pedro-Botet ML, Morera J, Sabria M. Persistence of *Legionella* in hospital water supplies and nosocomial Legionnaires' disease. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;52: 202–6. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00362.x
210. Lawrence C, Reyrolle M, Dubrou S, Forey F, Decludt B, Goulvestre C, et al. Single clonal origin of a high proportion of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the environment in the area of Paris, France, over a 10-year period. *J Clin Microbiol.* 1999;37: 2652–2655.
211. Rangel-Frausto MS, Rhomberg P, Hollis RJ, Pfaller MA, Wenzel RP, Helms CM, et al. Persistence of *Legionella pneumophila* in a hospital's water system: a 13-year survey. *Infect Control Hosp Epidemiol Off J Soc Hosp Epidemiol Am.* 1999;20: 793–797. doi:10.1086/501586
212. Benning MM, Wesenberg G, Liu R, Taylor KL, Dunaway-Mariano D, Holden HM. The three-dimensional structure of 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase from *Pseudomonas* sp. Strain CBS-3. *J Biol Chem.* 1998;273: 33572–33579.
213. Fonseca MV, Swanson MS. Nutrient salvaging and metabolism by the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4: 12. doi:10.3389/fcimb.2014.00012
214. Khalid S, Bond PJ, Carpenter T, Sansom MSP. OmpA: gating and dynamics via molecular dynamics simulations. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778: 1871–1880. doi:10.1016/j.bbamem.2007.05.024
215. Hoffman PS, Seyer JH, Butler CA. Molecular characterization of the 28- and 31-kilodalton subunits of the *Legionella pneumophila* major outer membrane protein. *J Bacteriol.* 1992;174: 908–13.
216. Bellinger-Kawahara C, Horwitz MA. Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J Exp Med.* 1990;172: 1201–1210.
217. Pore D, Chowdhury P, Mahata N, Pal A, Yamasaki S, Mahalanabis D, et al. Purification and characterization of an immunogenic outer membrane protein of *Shigella flexneri* 2a. *Vaccine.* 2009;27: 5855–5864. doi:10.1016/j.vaccine.2009.07.054
218. Swanson AF, Kuo CC. Evidence that the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* is glycosylated. *Infect Immun.* 1991;59: 2120–2125.

219. Taniguchi Y, Choi PJ, Li G-W, Chen H, Babu M, Hearn J, et al. Quantifying E. coli Proteome and Transcriptome with Single-Molecule Sensitivity in Single Cells. *Science*. 2010;329: 533–538. doi:10.1126/science.1188308

ANNEX

Publicacions

García-Nuñez M, **Quero S**, Catini S, Pedro-Botet ML, Mateu L, Sopena N, Sabria M. COMPARATIVE MOLECULAR AND ANTIBODY TYPING DURING THE INVESTIGATION OF AN OUTBREAK OF LEGIONNAIRES' DISEASE J Infect Chemother. 2013 Apr 10.

Quero S, Párraga-Niño N, García-Núñez M, Sabrià M. PROTEOMICS IN INFECTIOUS DISEASES. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2015 Jan 9.

M. García-Núñez; **Quero S**, ML. Pedro-Botet; I. Campoy; S. Quero; L. Mateu; M. Sabria. CHARACTERIZATION OF CLINICAL LEGIONELLA PNEUMOPHILA ISOLATES IN CATALONIA (SPAIN) BY MONOCLONAL SUBGROUPS AND SEQUENCE-BASED TYPING (SBT). Eurosurveillance 2015 (submitted)

Quero S, García-Núñez M, Párraga-Niño N, Pedro-Botet M, Mateu L, Sabrià M. DIFFERENTIAL PROTEOME BETWEEN PATIENT-RELATED AND NON-RELATED ENVIRONMENTAL ISOLATES OF *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*. Journal of Water and Health 2015 (submitted)

AGRAÏMENTS

Sense saber com acabaria, a l' octubre del 2010 vaig arribar a un laboratori d' investigació perdut a la muntanya amb la intenció de tenir el primer contacte en el món de la investigació. El meu objectiu principal era arribar aquí per poder comparar i escollir la branca que més m' agradés, però una cosa va portar a l' altra i cinc anys més tard aquí estic, amb una tesis doctoral.

La meva estada aquí no hauria sigut possible sense el suport dels meus pares i la meva germana, els quals van fer el possible que pogués dedicar-me al 100 % amb els meus estudis. Gràcies a ells, durant tots els meus anys de formació he pogut dedicar-me al que m' agradava, sense demanar-me en cap moment res a canvi. Ells van fer possible la meva entrada en el món de la biologia i en el de la investigació.

Per altra banda, i també molt important per a la realització de la meva tesis, va ser la acceptació en el grup d' investigació en el que estic. Els meus directors de tesis, el Dr. Miquel Sabrià i la Dra. Marian Garcia, van fer possible la meva estada aquí, ajudant-me, primer de tot, en la cerca de fons de financiació, i segon i més important, guiant-me durant tots aquests anys en la recerca.

A banda de la feina, en entrar al grup anava una mica perduda, però gràcies a les companyes de laboratori, vaig anar centrant-me i em van anar ajudant a integrar-me. Em recordo que al entrar al grup, les persones amb qui compartia laboratori van anar desapareixent, com la Sonia, la Neus, la Carol, l' Aïda... Va haver un moment que només quedàvem al laboratori la Laura i jo. Gràcies a ella, qualsevol dubte o ajuda que necessitava, ella feia (i continua fent) tot el possible per ajudar-me, moltes gràcies! Tot i que al laboratori només quedàvem nosaltres dues, a l' hora de dinar mai estàvem soles, teníem la companyia d' un gran grup de persones amb les que compartim molts bons moments, l' Eva, l' Alba, el Vicenç, l' Anna, la Marian, la Maribel... En el nostre antic menjador.

Un temps més tard va arribar Noemí, una companya que sense saber on es ficava, també em va ajudar en tot lo possible per continuar amb proteòmica, la branca més inexperta del grup. Em va donar molts ànims, i continua donant-me' ls. La veritat que ella ens va donar molta vida al laboratori, cantant, ballant, rient... Encara que a vegades es podria estalviar alguna cançoneta d' aquestes que es fiquen cap. I 'Las Chochis' !! Que no m' oblidu de vosaltres, que vau aparèixer en el millor moment

per fer de suport. Elles, Vanessa, Marina, i Noemí, van començar sent companyes i van acabar convertint-se en amigues amb les he compartit grans moments. Començant pels descansos o breaks de mig matí o mitja tarda, al solete torrant-nos una miqueta per dissimular les hores de laboratori sense que ens toqués l' aire i acabant per les sortides inesborrables, com a Madrid i 'las comilonas' o el gran ambient de Malgrat, els berenars de divendres, i totes les sortides i dinars i experiències que ens queden per viure juntes. Vosaltres em vàreu donar les forces per continuar amb tot això en els moments de declivi.

I com no, no m' oblidó dels inicis amb l' Eugeni i el Raül, de la Jovita, l' Alba, la Lucia... tots vosaltres que als inicis, sense saber gaire de mi em vaú convidar a les vostres sortides i vàreu fer sentir com una més de vosaltres. Sou increïbles, i sempre estareu en la meua memòria. Això sí, espero continuar repetint sopars, sortides i bons moments amb tots vosaltres.

A banda de les grans persones de la feina, també he d' agrair a persones externes al laboratori pel seu suport, per aguantar els moments de desesperació i tontuna després de laboratori. A tu, Laia, per acompanyar-me quan ho he necessitat. I a Irene i Tania, que encara que en menys mesura, també heu aguantat alguns moments d' histèria.

En definitiva, són moltes les persones que han passat per la meua vida, i que l' han fet més agradable, com en aquesta última temporada els estudiants que han arribat al nostre grup. Tots tres, sense saber-ho han fet aquesta temporada més agradable.

Sé que hi ha moltes més persones a les que he d' agrair, i cada cop que hi penso apareixen més, i això seria un no acabar mai. Encara que no surtin aquí referències vostres, no m' oblidó de vosaltres, cada dia em venen records diferents de tothom que ha passat per la meua vida. Gràcies a tots per ser com sou.