



**COLONIZACIÓN CITOPATOGENICIDAD Y
PERSISTENCIA DE *Legionella* spp. EN AGUA
SANITARIA HOSPITALARIA**



Tesis Doctoral

Marian García-Núñez
2009



**Departamento de Medicina
Programa de Doctorado: Medicina Interna**

**COLONIZACIÓN, CITOPATOGENICIDAD Y PERSISTENCIA DE
Legionella EN AGUA SANITARIA HOSPITALARIA**

Tesis doctoral de M^a Angeles García Nuñez

**Directores : Dr. Miquel Sabria Leal
Dra. María Luisa Pedro-Botet Montoya**



El Dr. Miquel Sabrià Leal, Catedrático de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Germans Trias i Pujol y la Dra. María Luisa Pedro-Botet Montoya, Profesora asociada de la Universidad Autónoma de Barcelona y Facultativo Especialista del Hospital Germans Trias i Pujol

HACEN CONSTAR

Que el trabajo experimental y la redacción de la memoria de tesis titulada "Colonización, Citopatogenicidad y Persistencia de *Legionella* en Agua Sanitaria Hospitalaria" ha sido realizado por M^a Angeles García Núñez y consideran que es apta para el trámite de lectura y defensa pública delante de un tribunal, para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y para que quede constancia, firman este documento en Badalona, 19 de Enero de 2009.

Dr. Miquel Sabrià Leal

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Miquel Sabrià Leal', written over a faint circular stamp.

Dra. María Luisa Pedro-Botet Montoya

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'María Luisa Pedro-Botet', written over a faint circular stamp.

a mis padres y hermanos

a Xevi

a los cazadores de microbios

“¡Ven a ver esto!,
¡Hay animáculos en el agua!”

Antony van Leeuwenhoek

INDICE

- Abreviaturas.....	1
- Generalidades.....	3
- COLONIZACIÓN, CITOPATOGENICIDAD Y PERSISTENCIA DE <i>Legionella</i> EN AGUA SANITARIA HOSPITALARIA.....	31
▪ Objetivos.....	35
▪ Metodología.....	37
▪ Resultados.....	39
▪ Discusión.....	51
▪ Conclusiones.....	61
- Referencias.....	63
- ANEXO I: Compendio de artículos.....	83
- ANEXO II: Otros artículos, capítulos de libro y comunicaciones a congresos del doctorando referidos a la temática de la tesis doctoral.....	101
- Agradecimientos.....	111

ABREVIATURAS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
BCYE α	Buffered Charcoal Yeast Extract-alfa ketoglutaric acid
CIE	Contrainmunolectroforesis
CPED ₅₀	Se define como la concentración mínima de bacterias necesarias para producir un efecto citopático del 50% en las monocapas de células infectadas después de 72 h de incubación.
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIA	enzimoinmunoanálisis
ER	enzima de restricción
Hsp60	heat shock proteína
ICT	inmuncromatografía
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
LLAP	<i>Legionella</i> -like amoebal pathogen
m.o.i.	multiplicity of infection
mg/L	miligramos por litro
min	minutos
mip	macrophage infectivity potentiator protein
MOMP	Major outer membrane protein
°C	Grado centígrado
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFGE	Electroforesis en campo pulsante
rRNA	ácido ribonucleico ribosomal
sg.	serogrupo
UFC	Unidades formadoras de colonias

GENERALIDADES

1.1 HISTORIA DE LA ENFERMEDAD DEL LEGIONARIO

En 1976 se produjo un brote de neumonía severa de etiología desconocida entre los asistentes a una convención de legionarios excombatientes americanos en el hotel Bellevue-Stratford de Filadelfia (*American Legion Convention*) [1]. La enfermedad afectó a 221 individuos, de los cuales 34 (15%) murieron.

En los primeros estudios, la búsqueda del agente infeccioso en 14 medios de cultivo bacteriológico-micológico y en 13 sistemas huésped-virológico, así como pruebas serológicas frente a 77 agentes infecciosos conocidos y tinciones diversas en muestras de tejido de pacientes fallecidos fracasaron. Meses más tarde, se consiguió aislar un microorganismo en muestras de tejido pulmonar de 4 pacientes fallecidos mediante su inoculación intraperitoneal en cobayas utilizando protocolos de aislamiento de *Rickettsias*. Al examinar el bazo e hígado de las cobayas infectadas, se consiguió observar, mediante la tinción de Giménez, por primera vez al microorganismo responsable [2]. Mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) se demostró, asimismo, que el 90% de los pacientes del brote de Filadelfia habían desarrollado anticuerpos frente a este microorganismo [2]. Posteriormente, se desarrolló un medio de crecimiento óptimo, el medio "buffered Charcoal Yeast Extract" (BCYE), cuya base sigue siendo utilizada en la actualidad [3]. McKinney and Cherry, usando cultivos bacterianos de muestras de pacientes fallecidos en el brote desarrollaron el primer antisuero marcado con fluoresceína para la visualización directa de la bacteria (IFD: inmunofluorescencia directa) [4].

La identificación y caracterización fenotípica del agente de la Enfermedad del Legionario permitió confirmar casos previos de neumonía de origen desconocido, que incluían casos esporádicos y brotes ocurridos durante la década de los años 50. En 1947 se había aislado un microorganismo denominado "agente *Rickettsia* like", hoy en día denominada cepa "Olda", de un paciente afecto de un proceso infeccioso pulmonar [5], en 1957 en trabajadores de una planta de empaquetamiento de carne en Austin (Minnesota, USA) [6] y en 1973 en 5 turistas escoceses en España [7]. El primer brote conocido de enfermedad del legionario había acaecido en el hospital psiquiátrico St. Elisabeth's de Washington DC en el año 1965 [8]. La "Fiebre de Pontiac" se describió también en relación a las cepas aisladas en un brote de fiebre de corta duración y sin foco aparente que había afectado en 1968, a personal sanitario y visitantes del

Oakland County Health Departament de Pontiac (Michigan) [9]. Actualmente, la identificación del microorganismo causante de la enfermedad del legionario y de la fiebre pontiac, así como los aspectos epidemiológicos y el espectro clínico de estas enfermedades están bien establecidos.

La primera clasificación de este germen junto a su denominación *Legionella pneumophila* (en honor de los pacientes afectados "Legionario" y del vocablo griego pneumo, pulmón, y philos, amante- "amante del pneumo") [10], y su inclusión en una nueva familia bacteriana fueron propuestas en el Primer Simposium Internacional sobre Enfermedad del Legionario en Atlanta, USA en noviembre de 1978.

1.2 EL AGENTE ETIOLOGICO. MICROBIOLOGÍA DE LA BACTERIA

Taxonomía

Cuando se clasificó a *L. pneumophila* como *genus novum, species nova* [10], esta era la única especie del género *Legionella*. Desde entonces, se han descrito diferentes bacterias con características fenotípicas similares, llevando a la descripción de un gran número de especies con una variedad de serogrupos (sg.) en el género *Legionella* dentro de la familia *Legionellaceae*.

En la actualidad, la familia *Legionellaceae* comprende un único género, *Legionella*. Se han realizado diversas propuestas de división de esta familia en tres géneros - *Legionella*, *Fluoribacter*, y *Tatlockia* [11-13]. No obstante, los dos últimos no han sido utilizados o aceptados ampliamente y el género *Legionella* es utilizado generalmente para describir todas sus especies.

Especies y serogrupos

En la actualidad el género *Legionella* incluye más de 50 especies y más de 70 serogrupos distintos (Tabla 1). El estudio del medio ambiente ha permitido el descubrimiento de nuevas especies y es muy probable que el número de especies y serogrupos continúe aumentando; aunque no todas causan patología. Entre ellas destaca *L. pneumophila*, la primera especie descrita, que comprende 16 serogrupos. Basándose en estudios genéticos se ha admitido la existencia de tres subespecies para *L. pneumophila* (*ssp. pneumophila*, *spp. fraseri*, *spp pascullei*) [14], aunque esto no tenga relevancia en el diagnóstico de laboratorio. En Europa, aproximadamente el 77% de las infecciones por *Legionella* están causadas por *L. pneumophila* sg. 1, el 15,5% están causadas por otros serogrupos de *L. pneumophila* y del 7,5% por especies de

Legionella no-pneumophila [15].

Legionella-like amoebal pathogens

Algunas *Legionellae* no pueden crecer en medios de cultivo convencionales para *Legionella* y se han denominado "Legionella-like amoebal pathogens" (LLAPs). Estos microorganismos se han aislado y mantenido mediante cocultivo de la bacteria con sus huéspedes protozoarios [16]. Se ha descrito alguna cepa de LLAP como patógeno en humanos tras su aislamiento en muestras de esputo de pacientes con neumonía mediante su enriquecimiento en amebas [17, 18]. Otras cepas de LLAPs podrían ser patógenas en humanos, pero probar esto es complejo debido a la dificultad de su detección mediante las técnicas de cultivo habituales. Las cepas de LLAP se denominan como cepas de *Legionella*.

Características morfológicas y fisiológicas

Los miembros de la familia *Legionellaceae* son microorganismos aerobios estrictos, no esporulados, de forma cocoide o bacilar que miden de 0,3 a 0,9 μm de ancho y de 1,5 a 20 μm de longitud dependiendo del tiempo del cultivo – en cultivos frescos los cocobacilos de *Legionella* pueden ser de 2-6 μm de longitud, mientras que en cultivos prolongados pueden observarse formas filamentosas de hasta 20 μm de longitud. Son móviles (excepto *L. oakridgensis*) con uno o más flagelos en disposición polar o lateral [19] y se ha podido demostrar la presencia de fimbrias [20] y de una estructura polisacárida ácida extracelular [21]. No obstante, en tejidos y especímenes clínicos se han observado diferentes formas cocobacilares inmóviles y una gran variedad morfológica en el interior de amebas.

Es una bacteria gram negativa que contiene una gran proporción de fosfolípidos (fosfatidilcolina) en su composición lipídica [22], hecho que dificulta su tinción por el método de Gram, pudiéndose utilizar para su identificación diversas técnicas de fluorescencia y alternativamente la tinción de Giménez [23] o la impregnación argéntica de Dieterle [24]. La ultraestructura es similar a otras bacterias gram negativas, con una membrana externa, un polímero de peptidoglicano que contiene ácido m-diaminopimélico, y una membrana citoplasmática. Sin embargo, la pared bacteriana contiene grandes cantidades de ácidos grasos de cadena ramificada y ubiquinonas (coenzima Q) con 9-14 unidades de isoprenoides en la cadena lateral [25].

Desde un punto de vista bioquímico, las especies del género *Legionella* son quimiorganotróficos, poco sacarolíticos y, en general, con características de metabolis-

Tabla 1. Especies de *Legionella* y serogrupos.

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

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

^a+, ha sido relacionada con infecciones humanas; -, no se conoce aislados a partir de infecciones humanas;

+^b presuntamente relaciona con infecciones en humanos.

mo poco corrientes (metabólicamente son poco activas). Son oxidasa variable, catalasa positivo débil, licuan la gelatina, y las reacciones de reducción de nitrato y ureasa son negativas. La mayoría producen β -lactamasas y un pigmento marrón que se incrementa con la adición de tirosina al medio de cultivo. Algunas especies son capaces de producir pigmentos fluorescentes. No fermentan los hidratos de carbono ni los azúcares habituales. En contraste con otras bacterias acuáticas, utilizan los aminoácidos y otros compuestos orgánicos como el almidón, como principal fuente de carbono y energía [26]. Por esta razón los medios de cultivo tradicionales resultan inapropiados para su aislamiento.

En condiciones de laboratorio, la mayoría de especies de *Legionella* necesitan para su crecimiento en aislamiento primario sales férricas y L-cisteína, y no pueden ser aisladas en agar sangre u otros medios de cultivo convencionales. El medio de cultivo "Buffered Charcoal Yeast Extract alfa-Ketoglutaric acid" (BCYE α) es el medio primario para el cultivo y aislamiento de la bacteria, donde son necesarios de 3-10 días para visualizar las colonias. La L-cisteína representa un ingrediente esencial para el cultivo (excepto en *L. oakridgensis* y *L. spiritensis*) [27], mientras que los iones hierro conjuntamente con los cetoácidos facilitan su desarrollo.

1.3 VIRULENCIA DE *Legionella*

La ecología y patogénesis de *Legionella* están muy relacionadas. Rowbotham J. [28] demostró que *L. pneumophila* podía infectar amebas, y describió el ciclo de vida intracelular de *Legionella* en ellas. Más tarde, Horwitz MA. [29] demostró que *L. pneumophila* se multiplica intracelularmente en macrófagos humanos evitando la fusión del fagosoma-lisosoma. Existen similitudes durante los procesos de infección de *Legionella* en protozoos y células fagocíticas de mamíferos, procesos que utilizan genes y productos génicos similares [30] y se ha postulado que la capacidad de multiplicarse en el interior de células de mamíferos, resulta de una previa adaptación a nichos intracelulares como puede ser el interior de protozoos.

A pesar que desde un punto de vista genético aun se está lejos de un conocimiento profundo de la patogénesis de *L. pneumophila*, continuamente se están realizando descubrimientos en este campo [31]. *Legionella pneumophila* es una bacteria patógena intracelular facultativa y su patogénesis está directamente relacionada con su capacidad de invadir y multiplicarse en un gran número de células

eucariotas, incluidos fagocitos mononucleares, fundamentalmente monocitos, macrófagos alveolares humanos y también diversas células epiteliales y fibroblastos humanos de animales.

No todas las especies de *Legionella* estudiadas son capaces de infectar macrófagos. No obstante, *L. pneumophila*, la especie que posee los factores de virulencia más relevantes, puede infectar y replicarse en una gran variedad de protozoos y de esta forma aumentar su virulencia [32, 33].

Ciclo celular

Los mecanismos de virulencia de *L. pneumophila* son complejos y hoy en día todavía no son bien conocidos pero sí se sabe que hay muchas proteínas inducidas durante la replicación intracelular [34]. Los estudios que contrasten la función que juegan los diferentes factores de virulencia en diferentes poblaciones huésped podrán ayudar a demostrar como la bacteria desarrolla una capacidad para infectar a humanos, sin la necesidad de un huésped protozoario.

La interacción de legionellas virulentas con células fagocíticas puede dividirse en diferentes etapas: a) adhesión del microorganismo a los receptores de la superficie de las células, b) endocitosis, penetración del microorganismo en los fagocitos, c) vacuolización, escape del ataque bactericida, d) formación de la vacuola replicativa, e) multiplicación intracelular y, f) liberación de las bacterias y muerte de la célula huésped.

Una vez *Legionella* entra en el pulmón de la persona afectada (por aerosol o aspiración), tanto las cepas virulentas como las no virulentas son fagocitadas por los macrófagos alveolares y se mantienen intactas dentro de los fagosomas. Durante la fagocitosis, *Legionella* inicia una cascada compleja de actividades, que incluyen: inhibición del estrés oxidativo, reducción de la acidificación del fagosoma, bloqueo de la maduración del fagosoma y cambios en el tráfico de orgánulos. Solamente las cepas virulentas pueden inhibir la fusión de los fagosomas con los lisosomas y transformar el fagolisosoma en un nicho para su replicación dentro de los fagocitos [27, 35-37]. Esto conduce a la muerte del macrófago y a la liberación de un gran número de bacterias desde la célula a través de la formación transitoria de un poro [38]. Las bacterias liberadas pueden infectar otros macrófagos, de manera que se amplifica la concentración de bacterias en el pulmón.

Factores de virulencia

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

Las estructuras de superficie de membrana juegan un papel importante en la patogenicidad de *Legionella* [35, 39]. La adherencia seguida de la entrada de la bacteria en la célula huésped es un paso crucial en el ciclo de infección. Ciertas proteínas de superficie de membrana junto con el lipopolisacárido (LPS), el flagelo y el pili tipo IV, están involucradas en la adherencia y entrada de *Legionella* en macrófagos alveolares y protozoos. Estas proteínas incluyen, entre otras: la mayor outer membrane protein (MOMP), la heat shock protein (Hsp60) y la mayor infectivity potentiator proteína (Mip).

La MOMP es una porina que se une al componente C3 de complemento, y media la entrada de *L. pneumophila* vía receptores de macrófagos de complemento CR1 y CR3 [40]. Sin embargo, la fagocitosis de *L. pneumophila* también puede producirse por un mecanismo independiente de complemento [41].

La proteína Hsp60 aumenta la invasión en células epiteliales [42].

La proteína Mip, codificada por el gen *mip* [43], es un producto claramente asociado a la virulencia de *Legionella*. Es necesaria para una infección eficiente tanto en células fagocíticas humanas como protozoos [44] ya que interviene en los estadios de infección temprana. Se cree que la proteína Mip está conservada en todo el género [45-47] e incluso se utiliza la secuencia del gen *mip* para identificar especies de *Legionella* [47].

Otros aspecto importante en la virulencia de *Legionella* es la capacidad de secretar citotoxinas y proteasas destructoras de tejido al medio extracelular [48-50]. La secreción de proteínas se realiza mediante los sistemas de secreción tipo II y tipo IV. Mutaciones en los genes codificantes para el sistema de secreción tipo II producen una disminución de infectividad en macrófagos, protozoos y animales [51]. Mutaciones en el locus *dot/icm*, codificante para el sistema de secreción tipo IV, conllevan la pérdida de virulencia [51].

1.4 ECOLOGÍA DE *Legionella*

Las especies de *Legionella* se encuentran en hábitats acuáticos naturales [52] y su nicho ecológico lo constituyen las aguas superficiales de lagos, ríos, arroyos, estanques, fuentes termales, e incluso se ha descrito en agua estancada localizada en la zona eruptiva de un volcán [53] y recientemente en lagos de la Antártida [54]. Así mismo, también se ha aislado en suelos húmedos y lodos [55], aunque no en tierras secas. En estos ambientes, *Legionella* sobrevive, en concentraciones bajas, a las variaciones de temperatura, pH y oxígeno disuelto, de forma simbiótica o parasita con otros agentes (algas, amebas o protozoos ciliados), que le ayudan a soportar las variaciones ambientales.

Desde estos reservorios naturales la bacteria coloniza diferentes instalaciones acuáticas artificiales como son los sistemas de abastecimiento y distribución de agua de las ciudades, a través de las cuales se incorpora al agua sanitaria doméstica y a otros sistemas que requieran agua para su funcionamiento y puedan generar aerosoles. Más que como contaminantes esporádicos de las aguas naturales, domésticas o industriales, hay que considerar a las especies del género *Legionella* como microorganismos que colonizan de forma natural los ecosistemas acuáticos y viven libremente en ellos. Estos sistemas acuáticos artificiales tienen una gran importancia desde el punto de vista epidemiológico. Este concepto de *ubicuidad acuática* de *Legionella* es importante a la hora de entender la epidemiología de esta infección.

Al principio, parecía contradictorio que *Legionellae* tuviera requerimientos complejos para los medios de cultivo artificiales de laboratorio y por otro lado sobreviviera y se multiplicara en el agua. Las instalaciones artificiales favorecen el estancamiento y la acumulación de productos que sirven de nutrientes para los protozoos y bacterias con los que vive en asociación, y que con una temperatura adecuada puede multiplicarse hasta alcanzar niveles infectantes para el hombre [28]. La presencia de biofilm juega un papel importante en el anidamiento y constituye un foco de reinfección de las instalaciones.

Factores que afectan el crecimiento de *Legionella*

Para que los microorganismos puedan llegar a tener capacidad infectiva, es necesario que alcancen en el agua una cierta concentración de los mismos. Los principales factores favorecedores de su multiplicación en el medio, son los siguientes:

Influencia de la temperatura

Legionella es una bacteria termotolerante, capaz de multiplicarse entre los 20 y 45°C, con un crecimiento óptimo alrededor de 37°C [56], puede sobrevivir entre los 40 y 60°C, inactivándose por encima de los 70°C [57].

Efecto de otros microorganismos

El agua, por si sola, no permite la proliferación de *Legionella*. *Legionella pneumophila* puede sobrevivir durante largo tiempo, pero no multiplicarse, en agua destilada y agua sanitaria estéril [58, 59]. La suciedad del agua garantiza la presencia de otros microorganismos y nutrientes apropiados para su crecimiento. Hay una relación nutricional entre *Legionella* y otros microorganismos que ayudan a su amplificación, ya que los nutrientes pueden ser suplementados, directa o indirectamente, por otras especies de bacterias u otros microorganismos (algas, cianobacterias, protozoos) en forma de constituyentes orgánicos disueltos por un exceso de producción de nutrientes orgánicos o bien por descomposición de los microorganismos (aminoácidos como cisteína) [60-62].

En 1963, Drozanski [63] describió el aislamiento de unos parásitos de amebas procedentes de muestras de suelo que eran incapaces de crecer en medios de cultivo de laboratorio. Es posible que estos parásitos bacterianos fueran *Legionella* spp. Sin embargo, no fue hasta 1980 que se describió la relación entre amebas y *L. pneumophila* [28], y por lo tanto, se confirmó que *Legionellae* son parásitos facultativos intracelulares. *Legionellae* puede multiplicarse en 14 especies de protozoos, incluyendo las amebas, como *Acanthamoeba*, *Naegleria* and *Hartmannella* spp; los ciliados *Tetrahymena pyriformis*, *Tetrahymena vorax* [28, 58, 64, 65]; y una especie de hongo del limo [27].

Los protozoos ayudan a *Legionella* a protegerse de los efectos de los biocidas y de la desinfección térmica. *Legionellae* puede sobrevivir en amebas enquistadas durante largos periodos de tiempo [64, 66, 67]. Las amebas enquistadas se mantienen viables después de tratamientos con 100 mg/L de cloro durante 10 minutos así como después del tratamiento a 80°C [68], y se ha postulado que este puede ser el mecanismo por el que *L. pneumophila* es capaz de sobrevivir a condiciones ambientales adversas y sobrevivir en los aerosoles transmitidos por el aire, junto con su capacidad de entrar en estado de viable pero no cultivable (VBNC).

Asociación con Biofilms

La colonización y actividad microbiana asociada a las superficies, o la formación de biofilms, aparece ampliamente descrita en los ambientes acuáticos naturales y artificiales, y en un amplio rango de tipos de superficies. En el biofilm, los microorganismos (bacterias, protozoos, hongos, algas) están embebidos en una matriz extracelular que proporciona estructura, estabilidad, nutrientes y protección de los posibles efectos tóxicos en el sustrato sobre los que el biofilm crece (por ej. en tuberías de cobre en los sistemas de distribución de agua). El biofilm es un mecanismo de resistencia de los microorganismos que lo forman, incluyendo *L. pneumophila*, a condiciones adversas, tales como la limitación de nutrientes y las condiciones extremas. Los gradientes de nutrientes, pH y oxígeno en la matriz suplen las distintas necesidades de los diferentes microorganismos de la población heterogénea que forma el biofilm [69, 70].

Se han realizado estudios enfocados a la caracterización de la interacción bacteriana en biofilms para evaluar los efectos de parámetros como la temperatura y los materiales de las superficies en el crecimiento de *L. pneumophila*, y se ha investigado el efecto de biocidas en las fase planctónica y sésil de *Legionellae* [62, 71-74]

La presión del movimiento del agua en los circuitos de agua puede provocar el desprendimiento de algunas de biofilm. Esta actividad puede desplazar los microorganismos del biofilm [28], permitiendo la colonización de otras partes del sistema si las condiciones son apropiadas. Esto explicaría porqué después de tratamientos de desinfección de choque o en épocas de aumento de flujo de los dispositivos (épocas más calurosas) se observan aumentos en los inóculos de *Legionella*.

Los biofilms, que pueden incluir *Legionellae* y protozoos, se pueden formar en la superficie de los circuitos de agua de edificios o torres de refrigeración poco controlados. El biofilm facilita nutrientes y el intercambio de gases y protege a los microorganismos de los biocidas y de los incrementos periódicos de la temperatura e intentos de la eliminación física, especialmente en áreas donde las superficies tienen incrustaciones o están corroídas. Hay más probabilidad de que se forme biofilm en aquellas áreas con depósitos de sedimentos, temperaturas cálidas, y estancamiento o bajo flujo y también en los puntos muertos de los sistemas de distribución y los acumuladores.

La mayoría de sistemas acuáticos de ingeniería – especialmente aquellos que son más complejos (hospitales y hoteles) – tiene áreas con biofilms, incluso cuando el sistema tiene un buen mantenimiento. Cuando las medidas de control, tales como el régimen de desinfección, se relajan, los microorganismos se multiplican rápidamente a niveles detectables y capaces de infectar al hombre.

1.5 FUENTES DE INFECCIÓN POR *LEGIONELLA*

La infección por *Legionella* puede ser adquirida fundamentalmente en dos grandes ámbitos, el comunitario y el hospitalario. En ambos casos la enfermedad puede estar asociada a varios tipos de instalaciones y de edificios (Tabla 2), y puede presentarse en forma de brotes/casos agrupados, casos relacionados y casos aislados o esporádicos.

La transmisión de *L. pneumophila* está asociada con el uso de agua. La vehiculización se produce mediante la formación de aerosoles a partir de la inhalación de aerosoles y la microaspiración de agua colonizada. Rara vez puede ocurrir por otros mecanismos, como la inoculación directa en heridas quirúrgicas a través de agua contaminada [75]. Las infecciones por *L. longbeachae* se han relacionado con abono de jardinería [76, 77].

Se cuestiona cuál es el inóculo necesario para el desarrollo de una infección y cuál es la composición exacta de un aerosol. Se conoce que los aerosoles infectivos pueden estar compuestos por *Legionella* en estado libre, fragmentos de biofilm contaminados con *Legionella*, vacuolas o vesículas de amebas infectadas con *Legionella* o amebas infectadas con *Legionella*. Aunque *L. pneumophila* cuando crece dentro de amebas en estado libre es de 10 a 1000 veces más invasiva que cuando crece en agar [32], no es probable que la ameba entera sea el vehículo de transporte debido a que es demasiado grande para llegar al alveolo del pulmón (el lugar de infección). De estos posibles mecanismos de transporte, las vesículas conteniendo *Legionella* parece ser la teoría más acertada. Rowbotham [66] hipotetiza que la inhalación de vesículas conteniendo *Legionella* es peligrosa cuando las partículas son de tamaño respirable (1 a 5 micras de diámetro) y contienen bacterias móviles. Estas partículas están protegidas por una membrana, pueden llegar al alveolo del pulmón y pueden contener una dosis infectiva de *Legionella*.

No hay evidencia de transmisión de persona-persona de la enfermedad del

legionario o de la Fiebre Pontiac.

Tabla 2. Clasificación de las instalaciones de riesgo de *Legionella* según RD865/2003 [78].

Instalaciones con mayor probabilidad de proliferación y dispersión de <i>Legionella</i>
<ul style="list-style-type: none">- Torres de refrigeración y condensadores evaporativos- Sistemas de agua caliente sanitaria con acumulador y circuito de retorno- Sistemas de agua climatizada con agitación constante y recirculación a través de chorros de alta velocidad o la inyección de aire (instalaciones termales)- Centrales humidificadoras industriales
Instalaciones con menor probabilidad de proliferación y dispersión de <i>Legionella</i>:
<ul style="list-style-type: none">- Sistemas de instalación interior de agua fría de consumo humano (tuberías, depósitos, aljibes), cisternas o depósitos móviles y agua caliente sanitaria sin circuito de retorno.- Sistemas de agua fría- Humectadores- Fuentes ornamentales- Sistemas de riego por aspersión en el medio urbano- Sistemas de agua contra incendios- Sistema de riego urbano- Otros aparatos que acumulen agua y puedan producir aerosoles
Instalaciones de riesgo en terapia respiratoria
<ul style="list-style-type: none">- Equipos de terapia respiratoria- Respiradores- Nebulizadores- Otros equipos médicos en contacto con las vías respiratorias

1.6 EPIDEMIOLOGÍA

Incidencia

La legionelosis es una enfermedad de distribución mundial con una mayor incidencia en los países desarrollados. Puede presentarse en forma de casos esporádicos o de brotes epidémicos.

Aunque la legionelosis es una enfermedad de declaración en la mayoría de países desarrollados, su incidencia es difícil de determinar debido a la variabilidad en la aplicación de tests diagnósticos, la preocupación de los clínicos para considerar esta enfermedad y la eficacia de los sistemas nacionales de vigilancia epidemiológica (la obligación o no de declaración de la enfermedad). El infradiagnóstico y la infradeclaración estiman que solamente el 2-10% de los casos se declaran.

La incidencia de la legionelosis en nuestro país ha tenido una tendencia ascendente en los últimos diez años (Fig. 1), con tasas actuales de 5,3/100.00 y

3,4/100.000 en Cataluña y en España, respectivamente. El rápido incremento de la incidencia entre los años 1996 y 2002, se explica en parte por la incorporación y amplia difusión del uso del antígeno en orina como técnica diagnóstica. La estabilidad a partir del año 2001-2002, obedece probablemente a las medidas de control y prevención de la enfermedad que entran en vigor de forma legislativa, Real Decreto 909/2001, de 7 de julio [79]. La incorporación de esta técnica más sensible y específica en los laboratorios de microbiología, ha permitido saber que esta enfermedad es una infección más frecuente de lo que se creía.

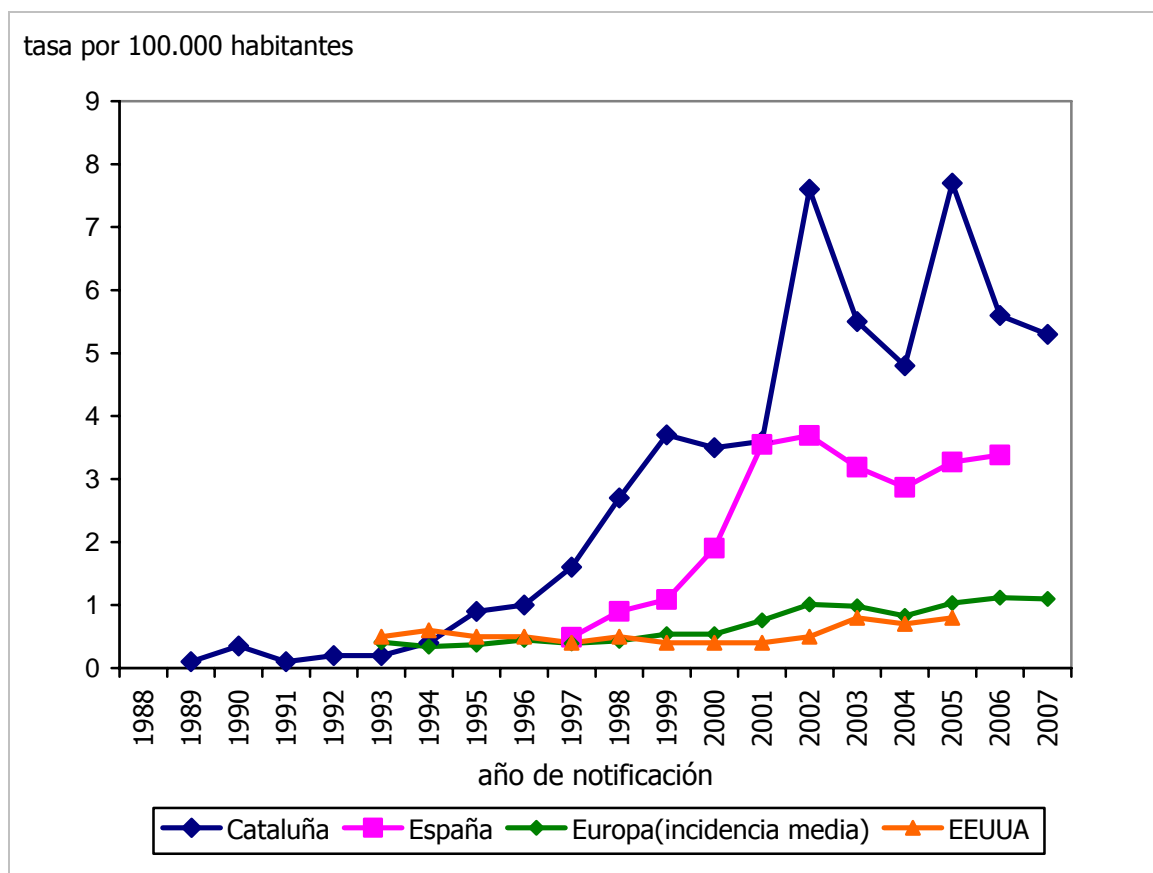


Fig. 1. Tasas de incidencia de la legionelosis por 100.000 habitantes. Fuente: BEC, BES, EWGLI.

1.7 ASPECTOS CLÍNICOS

Presentación clínica

El espectro de las manifestaciones clínicas de la legionelosis, va desde cuadros asintomáticos, detectables solamente por estudios de seroprevalencia, a procesos pseudogripales como la "fiebre de Pontiac" o neumónicos como el descrito

por primera vez en Filadelfia. Se desconoce el por qué de esta variabilidad clínica, pero es probable que esta variabilidad tenga relación con el tamaño del inóculo del microorganismo, la forma de transmisión y con algunos factores del huésped.

- *Forma asintomática*

La seroprevalencia de anticuerpos frente a *Legionella* en estudios de población oscila entre el 0.1 al 26%. Estos individuos no recogen antecedentes de enfermedad sintomática por *Legionella* [80, 81].

- *Fiebre de Pontiac*

Es la forma no neumónica de la infección por *Legionella*. El periodo de incubación suele oscilar entre 5 horas y 5 días. Los síntomas incluyen fiebre, malestar escalofríos y cefalea. La radiología de tórax es normal. La enfermedad es benigna y no requiere tratamiento. Este síndrome se ha descrito en contados brotes epidémicos y la patogenia del mismo es confusa. Las especies de *Legionella* implicadas en la mayoría de casos han sido *L. pneumophila* serogrupos 1, 4 y 6 [82-84], *L. feeley* sg. 1 [85], *L. micdadei* [86-88] y *L. anisa* [89, 90].

- *Neumonía por Legionella o Enfermedad del Legionario*

Las primeras descripciones clínicas de la enfermedad del legionario consistían en un paciente con neumonía, fiebre elevada y síntomas gastrointestinales. El uso progresivo de técnicas de diagnóstico específico para este microorganismo han permitido, sin embargo, conocer que su forma de presentación puede ser muy variada e inespecífica, que aparece tras un periodo de incubación que puede oscilar entre 2 y 15 días.

Los síntomas respiratorios no son inicialmente marcados y si existe tos, ésta suele ser seca y leve. Con el paso de los días la tos se puede hacer productiva y el esputo rosado aunque la hemoptisis es excepcional. El dolor torácico es infrecuente. Los síntomas extrarrespiratorios y más especialmente gastrointestinales y neurológicos son muy sugestivos de la enfermedad pero, sin embargo, la sensibilidad de estos datos no es elevada [91, 92].

La exploración física descubre semiología de condensación pulmonar y signos variables consistentes con el diagnóstico de insuficiencia respiratoria.

Existen datos de laboratorio sugestivos de la enfermedad del legionario como son el incremento de las transaminasas, la hiponatremia y el incremento de la

creatinquinasa [93]. Se describen casos de rabdomiólisis en formas graves de la infección. Esta última se ha descrito en pacientes infectados por el VIH [94]. Se puede observar proteinuria y hematuria que denotan la existencia de afección glomerular secundaria.

La presentación radiológica es indistinguible de la de la neumonía neumocócica en forma de afectación alveolar unilobar. Se describe bilateralización de los infiltrados en pacientes inmunodeprimidos en relación a la evolución desfavorable de estos pacientes. Puede observarse derrame pleural de escasa cuantía hasta en un 20% de los casos. La cavitación aparece en un 4% de los pacientes y suele incidir en pacientes inmunodeprimidos [95].

- *Forma extrapulmonar*

La afectación extrapulmonar es rara, aunque se han descrito casos de infecciones por *Legionella* en localizaciones distintas a la pulmonar y sin afección neumónica simultánea, que incluyen sinusitis, celulitis, pielonefritis, pancreatitis y endocarditis. En estos casos es probable que la vía de entrada siga siendo respiratoria, la vía de diseminación sea hematógena y que la expresividad clínica pulmonar sea mínima o inexistente. La precocidad en el diagnóstico y la eficacia del tratamiento actual justifican esta menor incidencia con respecto a descripciones previas. Contrastan estos casos con los de infección de heridas quirúrgicas por *Legionella*, relacionados con el uso de agua contaminada, en la ducha o lavado de la herida, en los que la inoculación de *Legionella* es directa.

Diagnóstico

Desde un punto de vista clínico, es difícil distinguir la neumonía causada por *Legionella* spp. de otras neumonías [91]. Un elevado índice de sospecha, basado, principalmente, en el contexto epidemiológico y algunos datos clínicos llevan a la sospecha diagnóstica. Suele incidir en pacientes adultos y con mayor frecuencia en varones, con forma de presentación epidémica o esporádica, adquisición comunitaria o nosocomial y existencia - aunque no es la regla - de alguno de los factores predisponentes señalados en la Tabla 3. La anamnesis puede descubrir el antecedente de un viaje y/o estancia en un hotel o en un hospital. Entre las manifestaciones clínicas destacan la fiebre, síntomas respiratorios (tos no productiva, dolor torácico), neurológicos (cefalea, confusión, letargo) y digestivos (diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal). En la analítica la hiponatremia ($\text{Na} > 130\text{nmol/L}$), hipofosfatremia,

un aumento en los niveles de enzimas hepáticas puede sugerir el diagnóstico de legionelosis. La presentación radiológica tampoco es específica ya que la afección alveolar unilateral es la forma de presentación más frecuente.

El diagnóstico de infección por *Legionella* requiere realizar técnicas específicas de laboratorio (Tabla 4), que incluyen la identificación del germen partir de muestras respiratorias mediante aislamiento por cultivo, la detección de antígeno de *L. pneumophila* sg. 1 en orina y la detección de anticuerpos específicos frente a *Legionella* (véase apartado de detección de *Legionella*).

Tabla 3. Factores de riesgo para la adquisición de una infección por *Legionella*

Factores de riesgo ambientales
<ul style="list-style-type: none"> - Exposición a duchas y/o aerosoles generados por agua caliente sanitaria - Exposición al aerosol generado por las torres de refrigeración - Exposición al aerosol generado en excavaciones - Estancia en hotel - Estancia en hospitales - Antecedente de un viaje Estancia en hospitales
Factores de riesgo clínicos mayores
<ul style="list-style-type: none"> - Trasplante - Diálisis - Inmunodepresión farmacológica. - Glucocorticoides. - Neoplasias - Tabaquismo
Factores de riesgo clínicos menores
<ul style="list-style-type: none"> - EPOC* - Enolismo - Diabetes - Sexo masculino - Edad > 50 años

Modificada de Pedro-Botet L, et.al. [96]. *EPOC.- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

Tratamiento

El tratamiento efectivo de la enfermedad del legionario está condicionado por la naturaleza intracelular de este patógeno. Diferentes tipos de antimicrobianos son activos frente a la bacteria *in vitro*, pero no necesariamente *in vivo* debido a la necesidad de inhibir o eliminar a la bacteria intracelular. Por lo tanto, solamente deben utilizarse antimicrobianos que consigan tener una elevada concentración dentro de los macrófagos alveolares. No disponemos de estudios clínicos randomizados sobre el tratamiento de la enfermedad del legionario, por lo que el conocimiento de la eficacia

de los diferentes antibióticos disponibles se basa en modelos experimentales y estudios clínicos retrospectivos observacionales. Los antimicrobianos que son activos para el tratamiento de la enfermedad del legionario incluyen los macrólidos, rifampicina, cotrimoxazol, ketólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas.

Según los estudios intracelulares y en animales de experimentación [97], la azitromicina y las fluoroquinolonas son los antibióticos más eficaces frente a *Legionella*. Los estudios clínicos observacionales demuestran que los pacientes con enfermedad del legionario tratados con fluoroquinolonas (levofloxacino) mejoran clínicamente más rápidamente que los pacientes tratados con macrólidos (eritromicina y claritromicina). [98]. Por lo que se refiere a la azitromicina, su actividad *in vitro* es excelente comparable a las fluoroquinolonas, pero sin embargo la experiencia clínica con este fármaco es escasa.

El tratamiento antibiótico de la neumonía por *Legionella* debe iniciarse lo más precozmente posible, ya que el retraso en su administración se asocia a un peor pronóstico. Aunque la vía oral puede ser adecuada en casos leves, debe iniciarse por vía parenteral hasta obtener una respuesta clínica, que habitualmente se produce de 3 a 5 días. La duración del tratamiento depende del antibiótico, el grado de inmunodepresión, la presencia continua de infección y el curso clínico del paciente. La recuperación de la infección aguda puede ser lenta y afectada por fatiga, pérdida de memoria, desórdenes de stress post-traumático, complicaciones comunes en muchos tipos de neumonía adquirida en la comunidad.

Pronóstico

El diagnóstico y el inicio precoz de un tratamiento antibiótico han permitido en la actualidad reducir la mortalidad de la enfermedad del legionario a menos de un 5%. Sin embargo, en este escenario, los pacientes inmunodeprimidos tienen una mortalidad que alcanza en algunas series entre un 20 y un 40%. Es en estos pacientes en los que el uso de combinaciones terapéuticas que han mostrado su eficacia en estudios experimentales, en modelos animales y de las que se cuentan con experiencias favorables puntuales, tendrán probablemente un papel decisivo.

1.8 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE *Legionella*

Métodos de detección en muestras de origen clínico

La Tabla 4 compara la sensibilidad, especificidad y otras características de los

diferentes métodos de detección.

Cultivo

La mejor elección para el diagnóstico de la infección por *Legionella* es el aislamiento de la bacteria ya que proporciona un diagnóstico de confirmación de la infección y, además, permite la realización de estudios epidemiológicos y su caracterización molecular. Permite detectar infecciones causadas por cualquiera de las especies y serogrupos de *Legionella*. Para ello es necesario el uso de medios selectivos como el BCYE α . Estos medios están basados en el empleo de carbón, extracto de levadura, L-cisteína y pirofosfato férrico. La adición al medio de cultivo de suplementos antibacterianos y/o antifúngicos aumenta su selectividad. Asimismo, el pretratamiento de las muestras respiratorias u ambientales con ácido (pH 2,2 durante 5 min) o calor (50°C 30 min) es vital para aumentar su sensibilidad evitando interferencias en su crecimiento; *Legionella* es resistente al ácido y a temperaturas de 50°C, mientras que la mayoría de bacterias no lo son. En estos medios de cultivo selectivos las colonias aparecen a los 3-4 días de incubación, son pequeñas, grisáceas-azuladas y brillantes, aunque los cultivos deben mantenerse 10-12 días antes de considerarlos negativos. La identificación precisa se hará sometiendo estas colonias a pruebas específicas de género y especie. Estas incluyen la IFI, IFD, aglutinación con partículas de látex conjugadas a anticuerpos, ensayos con anticuerpos género-específicos mediante *dot-blot* en colonias, amplificación específica de ADN mediante técnicas de PCR y secuenciación de fragmentos de genes (16S ribosomal, 5S ribosomal y el gen *mip*) comparándolos con secuencias conocidas incluidas en bases de datos de secuencias existentes.

Las muestras respiratorias, sobretodo si son de obtención dificultosa, como tejido pulmonar, líquido pleural, lavado broncoalveolar (BAL), deberían considerarse para cultivo de forma rutinaria [99]. Las muestras de esputo deben considerarse para cultivo aunque no sean purulentas.

Los principales inconvenientes de esta técnica es su baja sensibilidad, requiere mucho tiempo (4-5 días). El resultado depende de la severidad de la enfermedad, con recuperaciones del 15-25% en neumonías leves y hasta del 90% en neumonías severas.

Tinción

Como hemos comentado anteriormente, *Legionella* es una bacteria gram

negativa que se tiñe débilmente durante el proceso de la tinción de gram. En muestras de esputo, normalmente se observan numerosos leucocitos pero no microorganismos. *Legionella* puede visualizarse difícilmente a partir de muestras clínicas mediante coloraciones *inespecíficas* como la de Gimenez o la de Dieterle y/o, altamente *específicas*, como la IFD y la IFI. La IFD se ha utilizado en muestras de esputo, aspirados traqueales, biopsias de pulmón [99]. Las muestras de esputo se mantienen positivas durante 2-4 días después del inicio de la terapia antibiótica, y a menudo durante largos periodos de tiempo en casos de enfermedad pulmonar infiltrada [100]. Este método es altamente específico (95%), pero tiene una variable baja sensibilidad, requiere solamente 2-3 horas de trabajo y personal altamente cualificado, pero tienen muchas limitaciones por lo que el resultado debe interpretarse con cautela. Un resultado positivo debe interpretarse con un diagnóstico presuntivo, por lo que actualmente no se recomienda su utilización como único método diagnóstico.

Detección de anticuerpos (Serología)

El primer test serológico para la identificación de anticuerpos frente a *L. pneumophila* fue la IFI desarrollada por el Center for Disease control (CDC) en Atlanta (USA) en 1977 [2]. Desde entonces se han desarrollado otros métodos de detección serológica como el test de microaglutinación (MAT), el test de hemaglutinación indirecto (IHA), ELISA y Western immunoblot (contraelectroforesis), aunque el test IFI continua siendo el más utilizado en los laboratorios y por ello el más evaluado principalmente para *L. pneumophila* sg. 1.

La seroconversión medida por IFI, definida como un incremento del título de anticuerpos frente a *Legionella* igual o superior a 4 veces, entre un suero de la fase aguda y un suero de fase convaleciente es diagnóstico de legionelosis. Cuando se cuenta con un suero único, un título >256 durante la fase aguda, es poco habitual en la población normal, y en un contexto epidemiológico adecuado es, asimismo, altamente sugestivo. La seroconversión se produce en alrededor el 70-80% de los casos confirmados por cultivo y se suele producir hacia las 6-12 semanas de iniciada la enfermedad. Debido a este espacio de tiempo, esta técnica no es habitual como método diagnóstico pero si se utiliza en estudios epidemiológicos de brotes o para establecer la infección retrospectivamente. La especificidad de la serología para *Legionella* especies (no *L. pneumophila*) es incierta ya existen reacciones cruzadas entre diferentes especies de *Legionella* y algunos bacilos gram negativos.

Tabla 4. Sensibilidad y especificidad de diferentes pruebas utilizadas en el diagnóstico de la infección por *Legionella*

Test	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Comentarios	Referencias
Cultivo				
Espujo ^a	5-70	100	Gold estándar	[27, 75, 100-102]
BAL o Aspirado bronquial	30-90	100	Requiere de 4-10 días	
Biopsia de pulmón	90-99	100	Elevada especificidad	
Sangre	10-30	100	Requiere personal experimentado	
Serología				
Seroconversión	40-90	95-99	Requiere 3-9 semanas	[27, 75, 100, 101]
Muestra única	-- 70-99	50-70 >95	Sólo para <i>L. pneumophila</i> sg. 1, datos limitados para otros serogrupos u especies Rápido (15 min- 3h)	[27, 75, 100, 101]
IFD				
Espujo y BAL	25-70	95-99	Rápido (2-4 h)	[27, 75, 101]
Biopsia pulmonar	80-90	99	Sensibilidad limitada Requiere experiencia No reactivos validados para especies no- <i>pneumophila</i>	
PCR				
Muestra respiratoria	85-92	94-99	Rápido	[27, 100, 103, 104]
Orina, Suero	33-70	98	Validez del diagnóstico de resultados positivos sin otros resultados no está claro Detecta todas las especies de <i>Legionella</i> Metodología no estandarizada	

Modifica de WHO [105].

^a uso de múltiples medios de cultivo selectivos; ^b sólo serogrupo 1. BAL.- lavado broncoalveolar.

Detección de antígenos de Legionella en muestras de orina (Antigenuria)

La detección de antígeno de *L. pneumophila* sg. 1 en orina ha marcado un antes y un después en la historia de la enfermedad, como se observa en la figura 1 de incidencia. En los últimos años se han aplicado al diagnóstico de la neumonía por *L. pneumophila* diversos ensayos para la detección de antígenos solubles de la bacteria en la orina, que incluyen radioinmunoanálisis (RIA), enzimoimmunoanálisis (EIA) e inmunocromatografía (ICT) con buenas características de sensibilidad y especificidad (Tabla 4), hasta el punto de que hoy día se acepta la detección de antígeno en la orina como prueba confirmatoria de la infección por *L. pneumophila*.

Los ensayos de detección de antígeno en orina son rápidos, relativamente baratos, fáciles de realizar y altamente específicos. El antígeno de *Legionella* es detectable desde el inicio de los síntomas y en algunos casos hasta muchos meses después, sin influir la administración previa de antibióticos.

Su detección mediante técnicas de EIA o ICT constituyen las pruebas más eficaces actualmente en la práctica clínica aunque entre sus desventajas destaca su baja sensibilidad para detectar los serogrupos o especies diferentes a *L. pneumophila* sg. 1. Diferentes estudios han evaluado la sensibilidad para la detección de *L. pneumophila* sg. no-1 dando resultados que variaban de 14 al 69% [106, 107].

Detección de Legionella mediante métodos moleculares

En los últimos años, se ha utilizado el análisis mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de DNA bacteriano en muestras clínicas ya que teóricamente mejora la sensibilidad y especificidad. Esta técnica consiste en la amplificación "in vitro" de DNA o RNA de un segmento específico del material genético del microorganismo. Habitualmente, se está utilizando los genes diana *mip*, *16S rRNA*, *5S rRNA* y la región espaciadora *23S-5S* del ribosoma [108-110]. La PCR puede realizarse en todo tipo de muestras clínicas: muestras respiratorias, células mononucleares de sangre periférica, orina y suero. La posible aplicación de la técnica PCR en muestra no-respiratorias es atractiva, ya que solucionaría el hecho de la dificultad de producir esputos por los pacientes.

Una característica importante del test PCR es que al igual que el cultivo puede potencialmente detectar todos los serogrupos y especies de *Legionella*. Si al mismo tiempo se añade la posible utilización de una PCR múltiple que además de detectar *L. pneumophila* permita la detección simultánea de otros microorganismos causantes de

neumonía, como *C. pneumoniae* y *M. pneumoniae*, el valor de la metodología se podría ver muy incrementado en el diagnóstico etiológico de las neumonías atípicas adquiridas en la comunidad. Sin embargo, todavía no se disponen de datos suficientes para poder estimar la sensibilidad y especificidad real de la PCR o de validación de esta técnica frente a otros métodos y por ello todavía no se utiliza de forma rutinaria en el diagnóstico de infecciones causadas por *Legionella*.

Métodos de detección en muestras de origen ambiental

Los métodos disponibles de detección de *Legionella* en muestras de agua incluyen el cultivo e identificación de la bacteria, métodos inmunológicos y métodos moleculares. Para todos ellos debe optimizarse todos los pasos del procedimiento incluyendo la toma de muestras que será diseñada en función de la finalidad del análisis.

Cultivo, aislamiento, identificación y recuento de Legionella spp.

El cultivo es el método de referencia para la detección de *Legionella* en muestras ambientales. En 1998, se desarrolló una norma estándar internacional, ISO 11731:1998 [111], que incorporaba las estrategias utilizadas en diversas instituciones para una recuperación y detección eficiente. Este método contempla tanto la detección directa de la muestra (muestras con inóculos muy elevados) y la concentración de la misma (inóculos bajos). Al igual que con las muestras clínicas, las muestras ambientales deben sembrarse con pretratamientos con tampón ácido o bien con calor para una mejor recuperación y deben utilizarse medios de cultivo basados en la base BCYE α . Una vez aislada una colonia que morfológica y bioquímicamente es sospechosa de ser *Legionella*, los métodos de identificación de las colonias aisladas son los mismos que los utilizados en la identificación de cultivos de origen humano. Los protocolos descritos en esta norma permiten realizar un recuento de la concentración *Legionella* presente en la muestra.

Métodos inmunológicos

Al igual que con las muestras clínicas, también se ha utilizado la IFD en muestras ambientales, para identificar especies y serogrupos de *Legionella* por tinción directa [112]. Su sensibilidad varía al igual que las muestras clínicas principalmente debido a que tiene un límite de detección muy elevado (10^5 - 10^7 bacterias/litro), por este motivo estos métodos se utilizan más para la identificación de cepas aisladas en cultivo y no para su detección directa en muestras ambientales.

Se han desarrollado kits de detección basados en métodos inmunológicos de detección de antígeno de *L. pneumophila* sg. 1 mediante ensayos IFD y enzimoimmunoensayos (EIA), aunque al tratarse de métodos no cuantitativos con poca sensibilidad no han prosperado en el mercado.

Detección de Legionella mediante métodos moleculares

En los últimos años se han desarrollado métodos moleculares de PCR para detectar *Legionella* en muestras ambientales. Se han descrito distintas sensibilidades y especificidades, al igual que con las muestras de origen clínico, que varían según el origen de la muestra, el procedimiento utilizado, el gen diana escogido, la medida del fragmento de ADN amplificado y el tipo de PCR que se utilice. Es un método atractivo ya que el empleo de un sistema de PCR a "tiempo real" permite la cuantificación del número de bacterias presentes en la muestra, así como el tiempo requerido en el procesamiento frente a las plataformas convencionales. Entre los principales inconvenientes destaca la gran cantidad de inhibidores de la PCR que pueden encontrarse en las muestras ambientales y la imposibilidad de diferenciar entre células vivas y muertas. En la actualidad se están realizando estudios para solventar estos inconvenientes. Actualmente no existe un método universal aceptado que permita obtener resultados reproducibles en todo tipo de muestras, por lo que resulta necesario seguir desarrollando nuevos métodos de eliminación de inhibidores de la reacción y de diferenciación entre células vivas y muertas.

Estas técnicas presentan dificultades en el momento de interpretar los resultados PCR positivos y por ello solamente deberían realizarse en aquellos laboratorios con experiencia con las técnicas clásicas y que aplicaran la combinación con otros tests que podrían ayudar su la validación e interpretación.

Siguiendo las directrices de estas dos últimas técnicas, en la actualidad se están realizando estudios de desarrollo de dispositivos de medición de *Legionella in situ* a modo de biosensor colocado directamente en la instalación a investigar, mediante la detección de ácidos nucleicos y/o antígenos de *Legionella*.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que desde el punto de vista de salud pública, el cultivo y la investigación serológica son importantes herramientas de diagnóstico. El aislamiento y cuantificación por cultivo de cepas bacterianas procedentes de instalaciones asociadas a la infección permite la realización de estudios posteriores, como ensayos de sensibilidad frente a productos antimicrobianos,

identificar los puntos más contaminados y orientar los tratamientos de los puntos colonizados. Mediante la epidemiología molecular podremos identificar la(s) fuente(s) de la misma y aplicar los tratamientos de desinfección necesarios para prevenir la aparición de nuevos casos. Por ello, otro aspecto a tener en cuenta es la incubación conjunta de amebas y legionellas que maximiza la sensibilidad de los cultivos para estas últimas [113].

1.9 TIPIFICACION MOLECULAR DE *Legionella*

Los aislados de *Legionella* procedentes de muestras clínicas y ambientales, tienen que ser analizados para poder identificar la posible fuente de contagio y poder establecer una asociación epidemiológica, hecho que se ve dificultado por la anteriormente mencionada ubicuidad de *Legionella* spp. en ecosistemas acuáticos, tanto naturales como artificiales. Debido a esto, y asumiendo que todas las cepas de esta especie tienen que ser consideradas *a priori* como potencialmente patógenas, el discernir cuales pertenecen a una misma población clonal nos obliga a aplicar sistemas de tipificación epidemiológicos.

Las primeras investigaciones dirigidas a la confrontación de cepas clínicas y ambientales de *Legionella* se basaron en la determinación del serogrupo [114]. Cuando se hizo evidente que la mayoría de los aislados pertenecían al serogrupo 1, la importancia del serogrupo dejó de ser un marcador epidemiológico pasando a ser un carácter taxonómico (de igual manera pasó con la determinación de ácidos grasos mediante cromatografía o el patrón de carbohidratos).

Métodos de tipificación

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

Técnicas Fenotípicas

Los métodos de tipificación que analizan las diferencias fenotípicas (Tabla 5) definen las características bioquímicas, inmunológicas o proteicas de los aislados microbianos. Estas técnicas tienen el inconveniente que la expresión génica bacteriana puede alterarse en respuesta a diferentes estímulos ambientales. Además, la existencia

de mutaciones aleatorias puede suponer una disfunción génica de algún fenotipo particular induciendo a posibles errores en la tipificación fenotípica.

Entre estas técnicas la que se utiliza más frecuentemente y siempre complementaria con las técnicas genotípicas es la tipificación mediante anticuerpos monoclonales. Su principal inconveniente es la falta de antiseros para la tipificación de cepas diferentes de *L. pneumophila* sg. 1. Entre las cepas *L. pneumophila* sg. 1 de origen clínico predominan los subgrupos monoclonales que tienen el epítipo asociado a virulencia reconocido por MAb 3/1 + [115] (cepas de origen comunitario, 72,7%; asociadas a viajero 85,8 y de origen nosocomial un 46,5). Sin embargo, en el ambiente, no predominan las cepas MAb 3/1-positivas [116] y en algunas áreas incluso son raras [117], lo que tal vez podría suponer que la distribución de los serotipos observados en infecciones nosocomiales reflejan más la colonización de los sistemas de distribución y no las diferencias de virulencia entre cepas.

Técnicas genotípicas

Los métodos de tipificación genotípicos se basan en los ácidos nucleicos como origen de polimorfismos bacterianos. Incluyen el análisis de plásmidos, análisis de DNA cromosómico con endonucleasas de restricción (ER), fingerprinting con sondas de DNA y tipificación con Reacción en Cadena de la Polimerasa (Tabla 6). El desarrollo de estas técnicas ha reducido el uso de los métodos fenotípicos. La gran ventaja de los análisis genotípicos es la estabilidad relativa del genotipo bacteriano frente al fenotipo. Estos métodos están dotados de un elevado grado de sensibilidad y especificidad, y pueden contribuir notablemente con gran exactitud a establecer relaciones epidemiológicas.

Entre todas estas técnicas, la *electroforesis en campo pulsante* (PFGE), es hasta el momento la técnica candidata como mejor herramienta en epidemiología molecular, debido a su elevado poder discriminatorio y su reproducibilidad. La PFGE es un tipo especial de análisis de RFLP que permite separar fragmentos de DNA extremadamente grandes, de más de 5 Mb de longitud. En la PFGE, suspensiones de células bacterianas se sumergen en bloques de agarosa, se lisan *in situ*, y se digieren con ER de baja frecuencia. Los fragmentos resultantes se separan por electroforesis en un campo eléctrico donde las polaridades se invierten periódicamente. Este método produce pocos pero grandes fragmentos de DNA que se separan nítidamente en bandas resultantes de electroforesis. El análisis de PFGE se aplica a muchos estudios epidemiológicos en brotes de *Legionella*. A pesar de esto, es un proceso largo y necesita un equipo especial la cual cosa hace que sólo algunos laboratorios las puedan

Tabla 5. Características de los sistemas de tipificación fenotípicos.

Sistema de tipificación	T	R	D	I	FR	Referencia
Serotipado	Parcial	Buena	Poca	Buena	Excelente	[118-122]
Electroforesis de proteínas	Todas	Buena	Regular	Regular	Regular	[119, 123]
Inmunoblotting	Todas	Buena	Buena	Regular	Regular	[119]
MLEE	Todas	Excelente	Buena	Excelente	Buena	[124, 125]

Fuente: García-Nuñez M [126]. T, proporción de cepas tipificables; R, Reproducibilidad; D, poder de discriminación; I, Fácil interpretación, FR, Fácil de realizar.

Tabla 6. Características de los sistemas de tipificación genotípicos

Sistema de tipificación	T	R	D	I	FR	Referencia
Tipificación por plásmidos	Parcial	Buena	Pobre	Buena	Buena	[119, 127-130]
REA	Todas	Buena	Buena	Pobre	Buena	[131, 132]
Ribotyping, Southern Blotting	Todas	Excelente	Regular	Regular	Regular	[133-135]
PFGE	Todas	Excelente	Excelente	Excelente	Buena	[129, 134, 136-140]
RAPD - AP-PCR, IRS-PCR	Todas	Normal	Normal	Buena	Buena	[122, 129, 136, 137, 141-143]
AFLP	Todas	Excelente	Buena	Excelente	Buena	[129, 136, 144]
SBT	Todas	Excelente	¿????*	Excelente	Regular	[145-151]

Modificada de García-Nuñez M [126]. T, proporción de aislados tipificables; R, reproducibilidad; D, poder de discriminación; I, Fácil Interpretación; FR, Fácil de realizar. *¿????? Faltan estudios para poder evaluarlo.

realizar.

Perspectivas de futuro en tipado molecular

A medida que han ido apareciendo nuevas técnicas de laboratorio, se han producido variaciones en la metodología aplicada en epidemiología molecular, sin embargo, siempre se ha mantenido el PFGE como la herramienta más discriminatoria.

Actualmente, la necesidad de disponer de métodos de caracterización molecular que ofrezcan resultados rápidos y reproducibles, con la posibilidad de ser compartidos por diferentes laboratorios, ha llevado al desarrollo de métodos nuevos métodos de amplificación y secuenciación de genes en base a los polimorfismos génicos observados.

La técnica SBT (*sequence-based typing*) es un ejemplo. Esta técnica es una variante de MLST (*Multilocus Sequence typing*) en la que se emplean tanto genes "housekeeping" como genes de virulencia y ha sido empleada para la tipificación molecular de *L. pneumophila* sg. 1 en base a su diversidad alélica [145]. Sin embargo hay que tener en cuenta que MLST es un técnica diseñada para el seguimiento de clones y/o líneas clonales, fundamentalmente en poblaciones bacterianas. Por tanto, es un marcador molecular indicado en lo que se conoce como epidemiología global a largo plazo y todavía no está clara su utilidad en epidemiología molecular local o a corto plazo (caracterización de brotes).

Otros ejemplos de nuevas tecnologías son los microchips, microarrays o micromatrices de ADN con una serie de sondas de ADN unidas a un soporte sólido en una disposición regular y prefijada. La principal ventaja es que podemos detectar en un único proceso miles de genes. En la actualidad el uso los microarrays de ADN en el campo concreto de la epidemiología molecular es limitado y no se conoce aplicación en la legionelosis. No obstante esta técnica se encuentra todavía en fase embrionaria y todavía no se conoce si se podrá aplicar en epidemiología molecular de un brote epidémico ocasionado en un área geográfica localizada. En este momento, la tecnología de secuenciación (SBT) es bastante más asequible que las micromatrices, especialmente si el laboratorio tiene que diseñar y desarrollar su propia matriz. Si en el futuro las matrices fueran asequibles comercialmente, esta variante tecnológica podría sustituir rápidamente a la utilización de secuencias de ADN.

COLONIZACIÓN, CITOPATOGENICIDAD Y PERSISTENCIA DE *Legionella* en AGUA SANITARIA HOSPITALARIA

Desde la primera identificación de *L. pneumophila* como agente etiológico de la enfermedad del legionario, la bacteria se ha asociado tanto a neumonías nosocomiales como a neumonías de la comunidad [91, 152, 153]. Los focos que con mayor frecuencia se han relacionado con los brotes epidémicos son las redes de distribución de agua sanitaria de los grandes edificios y las torres de refrigeración, en las que se dan las condiciones óptimas para el desarrollo del microorganismo. Se ha postulado el papel de la inhalación y la microaspiración en la transmisión de la enfermedad. En cualquier caso, el vehículo de transmisión de la legionelosis es siempre acuoso.

A pesar de que en los años siguientes a su descubrimiento las principales instalaciones asociadas a casos de enfermedad del legionario eran las torres de refrigeración, los sistemas de distribución de agua sanitaria hospitalaria se han relacionado con la mayoría de brotes hospitalarios [140, 149, 154-157]. La legionelosis nosocomial está infradiagnosticada en algunos hospitales. Ello es debido fundamentalmente a que los laboratorios hospitalarios no disponen o no aplican sistemáticamente pruebas diagnósticas para *Legionella* en casos de neumonía nosocomial y no realizan controles periódicos del agua sanitaria.

El primer paso para la identificación de la infección nosocomial por *Legionella* es demostrar la contaminación del sistema de distribución hospitalaria para poder establecer un nexo epidemiológico. Se han descrito diferentes métodos para la detección y aislamiento de *Legionella* a partir de los sistemas de distribución de agua sanitaria [158-160]. El aislamiento de la bacteria en los pacientes y en puntos ambientales epidemiológicamente relacionados¹ permite la aplicación de métodos de tipificación para establecer la identidad o diversidad entre los aislados y así poder delinear las fuentes de brotes de legionelosis. La tipificación mediante PFGE ha demostrado ser una herramienta muy útil y discriminadora para tipificar aislados de *L. pneumophila* [122, 134, 137-140, 161-164], y de *Legionella* spp. [165, 166].

La prevalencia ambiental de *Legionella* spp. en centros hospitalarios son datos por lo general poco conocidos y variables de unas áreas a otras. En el Artículo I se presentan datos bacteriológicos y de tipificación molecular de los sistemas de distribución de agua y torres de

¹ Lugares donde supuestamente los pacientes han sido expuestos a aerosoles conteniendo la bacteria

refrigeración de 20 hospitales en el área de Cataluña.

Demostrada la colonización por *L. pneumophila* de estos hospitales, se informó de los resultados a los responsables de Control de Infección Nosocomial de los mismos. A los 5 años, el 64.7% (11/17) de los hospitales colonizados diagnosticaron casos de legionelosis nosocomial [167]. La mayoría (70%) de ellos tenían más del 30% de los puntos de consumo colonizados por *Legionella*.

Hay evidencias clínicas, basadas fundamentalmente en la evolución de los pacientes, que podrían sugerir grados de virulencia distintos entre las cepas de *Legionella*. En estudios experimentales, se ha observado que el cultivo de *Legionella* en amebas afecta el posterior mecanismo de entrada en monocitos, aumenta la replicación intracelular en monocitos e incrementa la virulencia en ratones aumentando su replicación intracelular en los pulmones de los ratones infectados [32, 33]. Además, algunos autores han demostrado que los aislados de *Legionella* responsables de enfermedad pulmonar expresan más caracteres de virulencia que las no relacionadas con la enfermedad en humanos [168]. Los estudios que evalúan características asociadas a la virulencia demuestran que existen diferencias entre especies [168, 169] y entre los aislados de *L. pneumophila* [170-173]. Es difícil, sin embargo, llegar a saber si estas observaciones son consecuencia de la diferente virulencia bacteriana, del inóculo bacteriano o de variables relacionadas con el huésped, entre ellas: la supervivencia de pacientes con enfermedad del legionario a pesar de no recibir tratamiento antibiótico adecuado [174], la variabilidad de la mortalidad observada en diferentes brotes de la comunidad [175, 176] o el hecho que la mayoría de casos de enfermedad del legionario estén causados por *L. pneumophila* serogrupo 1 [177].

A partir de estos datos, nos preguntamos porque en 6 de los 17 hospitales colonizados por *L. pneumophila* (Artículo I) no se diagnosticaron casos de legionelosis nosocomial y planteamos la hipótesis de que la virulencia de los aislados de *L. pneumophila* podía haber influido en la aparición de casos clínicos.

En el Artículo II se presentan datos de citopatogenicidad de distintos aislados de *Legionella* y se determina su relación con el serogrupo 1, el número de patrones PFGE coexistentes en el mismo sistema de agua sanitaria y con la declaración de casos de legionelosis nosocomial.

Demostrada la gran diversidad de los patrones PFGE de *Legionella* en los sistemas de

distribución de agua sanitaria y la particularidad de que cada hospital presentara su/s propios patrones de PFGE (Artículo I), nos planteamos estudiar la estabilidad de estos patrones en el tiempo. La persistencia de dichos patrones, conociendo *a priori* el patrón PFGE de *Legionella* en cada hospital podría ser clínica y epidemiológicamente significativo dado que permitiría etiquetar fácilmente los casos como nosocomiales y adscribirse a un hospital determinado.

La persistencia de algunos patrones de PFGE de *Legionella* se ha descrito en algunos estudios puntuales [155, 163, 178-180]. Sin embargo la relación entre estos patrones de PFGE persistentes y los casos de legionelosis nosocomial no se ha estudiado ampliamente [140, 151, 164]

En el Artículo III se pretende conocer la persistencia/estabilidad genotípica de los patrones PFGE de *L. pneumophila* en los sistemas de distribución de agua sanitaria de 7 hospitales y describir la relación entre los diferentes patrones PFGE de *L. pneumophila* de origen ambiental y los de origen clínico en 5 de los hospitales que diagnosticaron casos de legionelosis nosocomial.

OBJETIVOS

Artículo I. Colonización y variabilidad genotípica en hospitales

Los objetivos de este estudio son:

1. Determinar la prevalencia y grado de colonización por *Legionella* spp. en los circuitos de distribución de agua caliente sanitaria y de refrigeración de 20 hospitales, pertenecientes a un área de Cataluña.
2. Establecer las características fenotípicas (especie, serogrupo) de las cepas aisladas en las muestras ambientales hospitalarias.
3. Estudiar la variabilidad genotípica de los aislados de *Legionella* de las aguas de los diferentes hospitales.

Artículo II. Citopatogenicidad

Los objetivos de este estudio son:

4. Estudiar la citopatogenicidad de los aislados de *L. pneumophila* de 17 hospitales y determinar su relación con el serogrupo 1 y el número de patrones de PFGE coexistentes en el mismo sistema de distribución de agua sanitaria.
5. Evaluar la relación entre la citopatogenicidad y los casos de legionelosis nosocomial declarados en cada hospital.

Artículo III. Variabilidad y persistencia genotípica en hospitales

Los objetivos de este estudio son:

6. Describir la variabilidad y persistencia genotípica de los patrones PFGE de *L. pneumophila* en los sistemas de distribución de agua sanitaria de 7 hospitales.
7. Describir la relación entre los diferentes patrones PFGE de *L. pneumophila* de origen ambiental y clínico en los hospitales que declaran casos de legionelosis nosocomial.

METODOLOGÍA

La metodología de recogida y procesamiento del agua, caracterización microbiológica y molecular así como el ensayo de citopatogenicidad se recogen en los artículos que configuran esta tesis doctoral (Véase anexo I)

RESULTADOS

4.1 COLONIZACIÓN Y VARIABILIDAD GENOTÍPICA EN HOSPITALES

Extensión y niveles de colonización

Se analizaron los sistemas de riesgo ambiental, es decir, los sistemas de agua sanitaria fría (n=17) y caliente a nivel central (19 retornos y 24 acumuladores) y a nivel de consumo (63 grifos y 63 duchas), las torres de refrigeración (n=5) y el circuito de calefacción/refrigeración (n=5) (Tabla 7). El número de muestras procesadas varió en cada hospital, con un mínimo de 5 por hospital.

Mediante cultivo en medio selectivo MWY-BCYE α y BCYE α , se aisló *Legionella* spp. en 73 (37,2%) de los 196 puntos analizados, correspondientes a 26 Lavabos, 24 duchas, 11 Retornos, 9 Acumuladores y 3 torres de refrigeración (Tabla 7).

Los inóculos de colonización en los sistemas de distribución del agua variaba de 200 a 55.500 UFC/L en puntos centrales y de 200 a 74.250 UFC/L en puntos de consumo. En cambio, en las torres de refrigeración los inóculos fueron más bajos, oscilando des de 600 a 2.800 UFC/L (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis cuantitativo de *Legionella* spp. en las muestras ambientales.

Punto analizado	%Positivos		<i>Legionella</i> spp. UFC/L	
	n	(%)	Rango	(media geométrica)
- Sistema de agua caliente sanitaria				
Puntos de consumo (n=126)				
Duchas (n=63)	24	(38,0)	200-74.250	(2.906)
Lavabos (n=63)	26	(41,0)	250-74.250	(3.106)
Puntos centrales (n=43)				
Retorno (n=19)	11	(58,0)	300-55.500	(6.920)
Acumulador (n=24)	9	(38,0)	200-35.000	(6.573)
- Agua fría (n=17)		0	<100	
- Circuito calefacción/refrigeración (n=5)		0	<100	
- torres de refrigeración (n=5)	3	(60,0)	600-2.800	(1.003)
<i>Total</i>	73	(37,2)		

Respecto a la colonización cualitativa, en el 85 % de los hospitales estudiados (17/20) se aisló *Legionella* spp. en al menos una de las muestras analizadas procedentes de

la red de agua caliente sanitaria. La positividad de los puntos centrales oscilaba del 17 al 100% y en los puntos de consumo del 11 al 100%. En 11 de los 17 hospitales positivos (74%) había más del 30% de los puntos de consumo positivos para *Legionella* spp. (Tabla 8)

Tipificación fenotípica

Legionella pneumophila fue la especie detectada en todos los puntos positivos. De estos, 29 (39,7%) correspondían a *L. pneumophila* sg. 1 y, 44 (60,3%) a *L. pneumophila* sg. 2-14. De los 17 hospitales positivos, se encontró *L. pneumophila* sg. 1 en 8 mientras que, *L. pneumophila* sg. 2-14 se encontró en 11. Ambos grupos coexistían en dos hospitales (Tabla 8).

Tipificación molecular

Se distinguieron 25 patrones PFGE diferentes distribuidos entre los 73 aislados de *L. pneumophila* procedentes de los 17 hospitales positivos estudiados (Tabla 8).

Los aislados se consideraban idénticos si tenían exactamente el mismo perfil cromosómico de PFGE generado por la enzima de restricción *SfiI*. El número de bandas o fragmentos de DNA de restricción enzimática oscilaba de 8 a 12 bandas entre 50 a 2000 KB.

Las cepas de *L. pneumophila* sg. 1 procedentes de muestras ambientales de 8 hospitales presentan 12 patrones PFGE diferentes. Las cepas de *L. pneumophila* sg. 2-14 que se observan en 10 hospitales presentan 13 patrones PFGE diferentes (Tabla 8).

Cada hospital tenía su/s patrón/es PFGE que en ningún caso compartía con otros hospitales. Los patrones PFGE de DNA de los aislados ambientales de cada hospital resultaron idénticos entre ellos en la mayoría de casos y diferentes al patrón PFGE de aislados o cepas no relacionadas epidemiológicamente procedentes de otros hospitales. En 10 hospitales se observa 1 único patrón PFGE, 6 hospitales presentan 2 patrones PFGE y un hospital presenta 3 patrones PFGE diferentes (Fig. 2).

Las torres de refrigeración presentan un patrón PFGE diferente al del sistema de distribución de agua del propio hospital.

Tabla 8. Cuantificación (UFC/L), serogrupo, perfil de restricción cromosómica (PFGE) de *L. pneumophila* en los puntos positivos.

Hospital	Puntos muestreados	Puntos Positivos	UFC/L	Serogrupo <i>L. pneumophila</i>	PFGE
1	15	1 Lavabo	250	2-14	A
		1 Acumulador	200	2-14	A
2	17	1 Lavabo	250	2-14	B
		4 Ducha	250 - 1.750	2-14	B
3	15				
4	19				
5	18				
6	5	1 Lavabo, 2 duchas	500 – 1.250	1	C
		2 Retorno	2.900 - 7.500	1	C
7	7	2 Lavabo	250	2-14	D
		Acumulador	750	2-14	D
		Retorno	34.250	2-14	D
8	10	Ducha	1.750	1	E
		Acumulador	950	1	E
9	10	2 Lavabo, 3 duchas	500 – 2.000	2-14	F
		2 Acumulador	21.250 – 26.850	2-14	F
		Retorno	44.500	2-14	F
10	8	2 Lavabo, 2 duchas	3.875 - 64.250	1	G
		1 Acumulador	8.100	1	H
11	9	1 Lavabo	3.125	1	I
		1 Retorno	1.900	2-14	J
12	7	2 Lavabo, 2 duchas	250 – 18.125	1	K, L
		1 Acumulador	9.800	1	L
		1 Retorno	20.300	1	K
		1 TR	600	1	M
13	9	1 Lavabo	250	2-14	N
14	6	3 Lavabo, 3 duchas	9.875 - 55.875	2-14	O
15	6	1 Lavabo, 1 ducha	1.625 – 3.750	2-14	P
		1 Retorno	2.000	2-14	P
16	7	2 Lavabo, 2 duchas	250 - 74.250	2-14	Q
		1 Acumulador	30.400	2-14	Q
		1 Retorno	33.000	2-14	Q
		1 TR	400	2-14	R
17	7	2 Lavabo, 1Ducha	750 – 20.000	1	S
		1 Acumulador	26.400	1	S
		1 Retorno	300	1	S
18	6	2 Lavabo, 2 Ducha	250-12.375	2-14	T
			14.750	2-14	U
19	7	2 lavabo	500 –12.500	1	V, W
		1 Retorno	1.300	1	V
20	8	1 Lavabo, 1 ducha	19.000-24.250	2-14	X
		1 TR	2.750	1	Y

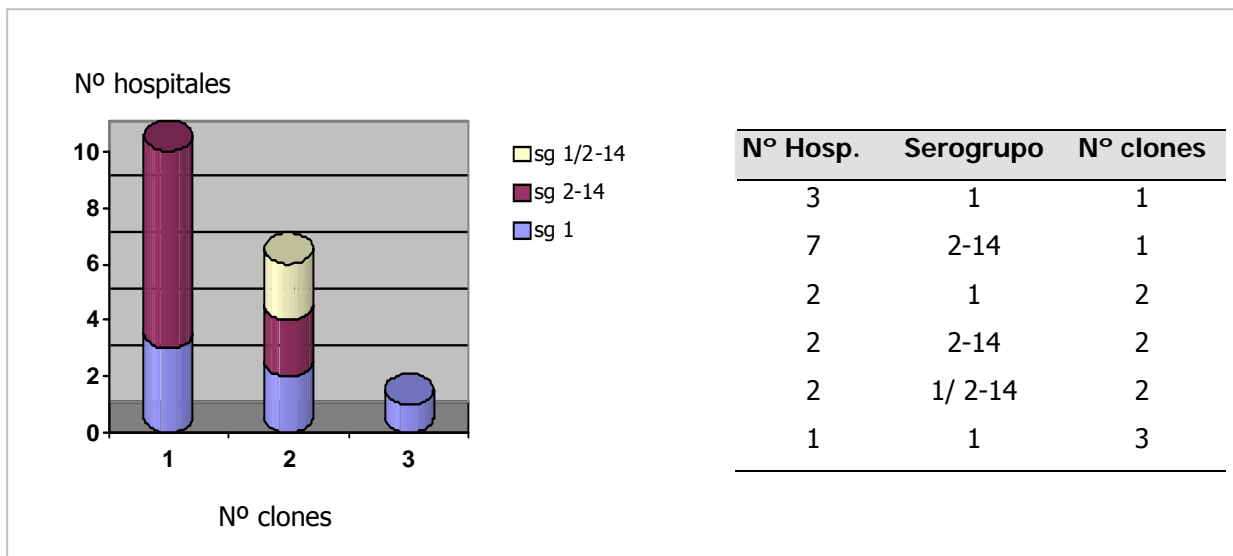


Fig. 2. Distribución de hospitales según el número de patrones PFGE aislados y su relación con el serogrupo.

4.2 CITOPATOGENICIDAD

Citopatogenicidad y crecimiento intracelular

La citopatogenicidad relativa de los 22 aislados ambientales de *L. pneumophila* se determinó ensayando el efecto citopático al 50%. El CPED₅₀ se define como el número mínimo de bacterias necesario para producir un efecto citopático en el 50% de la monocapa de la línea celular U937 infectada después de 72 horas de incubación.

Todos los aislados ambientales de *L. pneumophila* tenían capacidad para infectar y crecer en células macrofágicas produciendo un efecto citopático significativo. El valor CPED₅₀ variaba desde logCPED₅₀ 2,67 ufc/ml hasta log CPED₅₀ 6,73 ufc/ml. Según la citopatogenicidad, se diferenciaron 5 grupos, perteneciendo al grupo 1 las cepas más citopatogénicas y al grupo 5 las de menor citopatogenicidad (Fig. 3). Observamos que el grupo 1 estaba representado por el 4,5% (1/22) de los aislados, el grupo 2 por el 4,5% (1/22), el grupo 3 por el 18,2% (4/22), el grupo 4 por el 54,5% (12/22) y el grupo 5 por el 18,2% (4/22). Para comprobar que el daño celular era debido a la replicación intracelular de la bacteria, observamos el crecimiento intracelular de los aislados de *L. pneumophila*. Todos los aislados eran capaces de crecer intracelularmente en los cultivos de células U937 diferenciadas. Los grupos más citopatogénicos (1 y 2) tenían una tasa de infección (t=0 horas) más elevada (p=0,031). Los aislados aumentaban sus inóculos en $2,05 \pm 0,74$ log ufc/monocapa (rango: 1,04-3,07) a las 24 horas, incrementándose a $3,29 \pm 0,74$ log ufc/monocapa (rango: 1,75-4,93) a las 48 horas (Fig. 4). Por otro lado, confirmamos la virulencia de *L. pneumophila* mediante un test de sensibilidad a la sal, asociado a un fenotipo infectivo, mientras que la tolerancia o resistencia a crecer en presencia de 100 mM NaCl sería un marcador de atenuación en el laboratorio (datos no mostrados) [181].

Los aislados que pertenecían a la especie *L. pneumophila* sg. 1 tenían una citopatogenicidad media significativamente más elevada ($4,92 \pm 1,28$ vs. $5,75 \pm 0,68$ log ufc/ml, p=0.003) y tendían a pertenecer a los grupos de citopatogenicidad ≤ 3 más frecuentemente que el serogrupo no-1 (50% (5/10) vs. 8.3% (1/12), p=0.06) (Tabla 9).

Los aislados ambientales de *L. pneumophila* pertenecían a los grupos citopatogénicos ≤ 3 en 3 de 5 (60%) hospitales con más de 1 patrón PFGE de *L. pneumophila* y en 2 de los 12 (17%) hospitales con un solo patrón PFGE (p>0,05).

Según el grupo citopatogénico y los casos de legionelosis nosocomial declarados, los aislados de *L. pneumophila* pertenecían a los grupos con citopatogenicidad ≤ 3 en 4 hospitales de 11 (36.3%) que declaraban casos de legionelosis nosocomial y en 1 de los 6

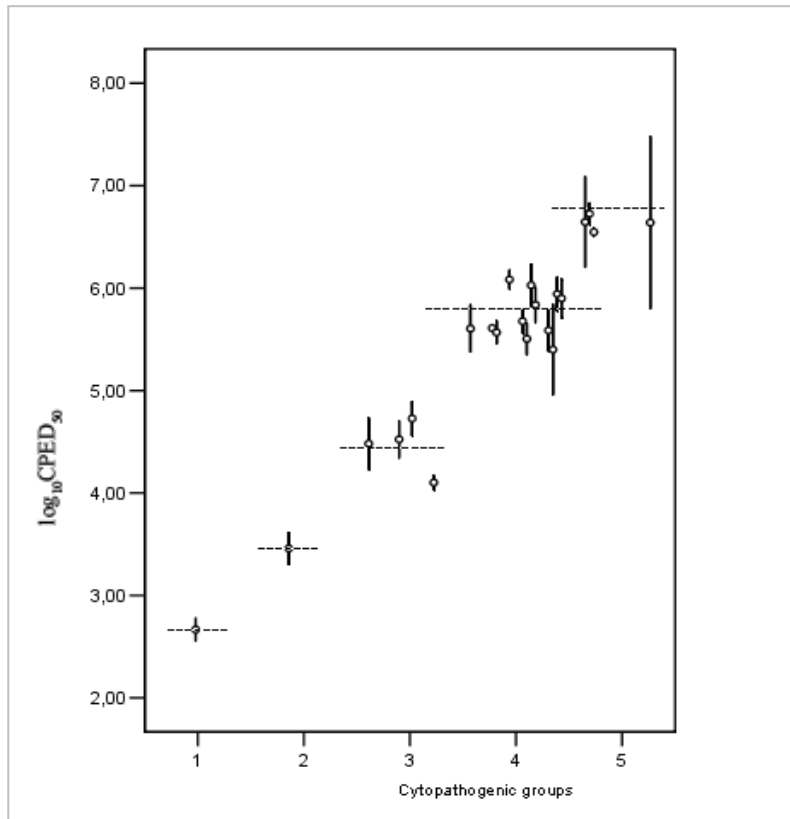


Fig. 3. Grupos de citopatogenicidad de los distintos aislados ambientales. Los datos de cada aislado están dibujados con la media presentado por un punto, y las barras de error su desviación estándar. La media de cada grupo de citopatogenicidad está representada por una línea horizontal. Los grupos se establecieron mediante el K means cluster analysis (SPSS).

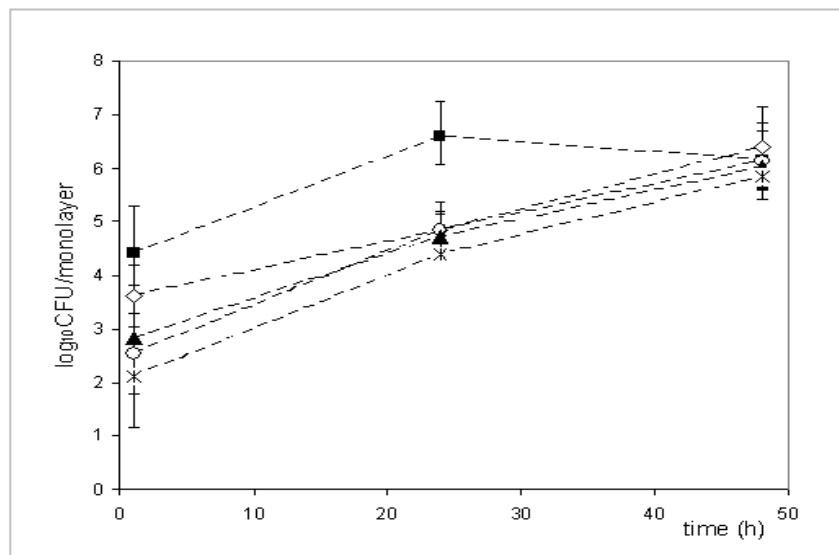


Fig. 4. Crecimiento intracelular de los diferentes grupos citopatogénicos de *L. pneumophila* en cocultivo con células macrófagos-U937. Grupo citopatogénico 1 (◇), grupo citopatogénico 2 (■), grupo citopatogénico 3 (○), grupo citopatogénico 4 (▲) y grupo citopatogénico 5 (×). Los valores son la media de los grupos citopatogénicos y las barras de error representan las desviaciones estándar.

hospitales (16.6%) que no declaraban casos de legionelosis nosocomial ($p > 0.05$).

Tabla 9. Patrones PFGE, serogrupos de *L. pneumophila*, citopatogenicidad y casos de legionelosis nosocomial declarados en cada hospital durante el periodo de estudio.

Aislado / patrón PFGE	Serogrupo	log CPED ₅₀ (media ± DS)	Grupo de citopatogenicidad	Hospital
Lp01	no-sg.1	5,60 ± 0,17	4	H 1
Lp02	no-sg.1	4,48 ± 0,27	3	H 2*
Lp03	1	6,64 ± 0,54	5	H 6*
Lp04	no-sg.1	6,73 ± 0,11	5	H 7*
Lp05	1	6,56 ± 0,2	5	H 8
Lp06	no-sg.1	6,3 ± 0,1	4	H 9
Lp07	1	5,57 ± 0,13	4	H 10*
Lp08	1	3,45 ± 0,15	2	H 10*
Lp09	1	4,52 ± 0,18	3	H 11*
Lp10	no-sg.1	6,08 ± 0,19	4	H 11*
Lp11	1	2,67 ± 0,32	1	H 12*
Lp12	1	4,73 ± 0,16	3	H 12*
Lp14	no-sg.1	5,67 ± 0,11	4	H 13*
Lp15	no-sg.1	5,50 ± 0,10	4	H 14*
Lp16	no-sg.1	6,03 ± 0,14	4	H 15
Lp17	no-sg.1	5,84 ± 0,14	4	H 16*
Lp19	1	4,10 ± 0,07	3	H 17
Lp20	no-sg.1	6,63 ± 0,59	5	H 18
Lp21	no-sg.1	5,59 ± 0,2	4	H 18
Lp22	1	5,40 ± 0,30	4	H 19*
Lp23	1	5,94 ± 0,13	4	H 19*
Lp24	no-sg.1	5,90 ± 0,16	4	H 20*

CPED₅₀.- CPED₅₀ se define como la concentración mínima de bacterias necesarias para producir un efecto citopático del 50% en las monocapas infectadas de células U937 después de 72 h de incubación.

* Hospital que declara casos de legionelosis nosocomial (1996-2001). Datos recogidos en un estudio previo de Sabria M [167].

4.3 VARIABILIDAD Y PERSISTENCIA GENOTÍPICA EN HOSPITALES

Se realizó tipificación molecular mediante PFGE de los aislados de *Legionella* spp. procedentes de 7 hospitales, que comprendían 222 aislados ambientales (rango 7-92 aislados/hospital) y 28 aislados clínicos (1-13 aislados/hospital). Los periodos de aislamiento de los aislados variaron entre 6 y 17 años en cada hospital. Los aislados clínicos pertenecían a 5 de los 7 hospitales.

Variabilidad Genotípica ambiental

Todos los aislados ambientales analizados pertenecían a la especie *L. pneumophila* excepto en un hospital (Hospital V) donde también se tipificó *Legionella* no-pneumophila. El análisis mediante PFGE demostró un elevado grado de variabilidad genotípica entre los aislados ambientales de *Legionella* (Tabla 10 y Tabla 12). El número de patrones PFGE idénticos variaba según el hospital, oscilando desde uno a nueve. Cada hospital tenían sus propios patrones PFGE ambientales y no estaban compartidos con los otros centros.

Persistencia ambiental

La persistencia de los diferentes patrones PFGE recuperados de los sistemas de distribución de agua sanitaria hospitalaria de los siete hospitales se observa en las Tabla 10 y Tabla 12. Los intervalos de muestreos positivos en cada hospital variaban desde 6 (hospital VII) a 16 años (hospital I), excepto en el hospital VI donde no se disponía un segundo muestreo positivo.

Variabilidad Genotípica clínica

Todos los aislados clínicos analizados pertenecían a la especie *L. pneumophila* (Tabla 11 y Tabla 12). Los casos clínicos de *Legionella* en cada hospital se asociaron a un único patrón PFGE, excepto en el hospital IV donde se recuperaron 2 patrones PFGE diferentes en dos pacientes (paciente 1, Patrón PFGE N y paciente 2, patrón PFGE P; ambos patrones PFGE correspondían a serogrupos distintos de *L. pneumophila*).

Correlación ambiental y clínica

En los 5 hospitales, los aislados asociados con legionelosis nosocomial tenían el patrón PFGE correspondiente al patrón PFGE ambiental de *Legionella* que persistía más tiempo en los sistemas de distribución de agua (Tabla 12). Los otros patrones PFGE encontrados en los circuitos de agua sanitaria no se relacionaron con ningún episodio infeccioso. En los hospitales I y VI los aislados asociados con infección en 1989 y 2003, respectivamente (no se disponían de muestras ambientales positivas de estas fechas en estos hospitales) se

relacionaron posteriormente con los aislados ambientales, sugiriendo una persistencia ambiental de los patrones PFGE de 18 años (hospital I) y de 8 años (hospital VI), respectivamente.

Tabla 10. Distribución de los patrones PFGE de los aislados ambientales.

Hospital	Periodo de Estudio	Especie de <i>Legionella</i>	Patrón PFGE	Persistencia ambiental*	Año de Aislamiento												
					1990	1991	1996	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006		
I	1990-2006	<i>L.pneumophila</i> sg. 1	A	16	3	3	3	19	4	2	1	18	10				
		<i>L.pneumophila</i> non-sg.1	B	12	3					2							
		<i>L.pneumophila</i> sg. 1	C	1		5	1										
		<i>L.pneumophila</i> sg. 1	D	4		2	1										
		<i>L.pneumophila</i> sg. 1	E	-			1										
		<i>L.pneumophila</i> non-sg. 1	F	10		1											
		<i>L.pneumophila</i> sg. 1	G	-													
		<i>L.pneumophila</i> non-sg. 1	H	-													
		<i>L.pneumophila</i> non-sg. 1	I	-													
		<i>L.pneumophila</i> non-sg. 1	J	14													
II	1991-2005	<i>L.pneumophila</i> sg. 1	K	-		2						27	1				
		<i>L.pneumophila</i> sg. 1	L	-													
III	1996-2003	<i>L.pneumophila</i> non-sg. 1	M	-								8					
		<i>L.pneumophila</i> sg. 1	N	13	4				2	13	3						
IV	1996-2003	<i>L.pneumophila</i> sg. 1	O	-	2												
		<i>L.pneumophila</i> non-sg. 1	P	2					3	3	1						
V	1996-2006	<i>L.pneumophila</i> sg. 1	Q	-						2							
		<i>L.pneumophila</i> non-sg.1	R	10		3				1							
VI	1996	<i>L.pneumophila</i> non-sg.1	S	6													
		<i>L.pneumophila</i> non-sg.1	T	1													
VII	1996-2002	<i>L.non-pneumophila</i>	U	-													
		<i>L.pneumophila</i> non-sg.1	V	-	2								10	5			
		<i>L.pneumophila</i> non-sg.1	W	-	2												
		<i>L.pneumophila</i> non-sg.1	X	-						3							

*.- en años; ^aN.- número de aislados que presentan el patron PFGE

Tabla 11. Distribución de los patrones PFGE de aislados clínicos

HOSPITAL	Periodo de estudio	Especie de <i>Legionella</i>	Patrón PFGE	Año de aislamiento n ^a									
				1989	1990	1991	1999	2001	2002	2003	2004	2005	
I	1989-2002	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	A	3	5	2	2	1					
II	2005	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	J										5
III	2003	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	M								1		
IV	2001-2003	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	N				1	1					
		<i>L. pneumophila</i> no-sg. 1	P					3					
VI	1996-2004	<i>L. pneumophila</i> no-sg.1	U							3		1	

^an^o.- número de aislados que presentan los patrones PFGE. Cada aislado procedía de un caso clínico.

Tabla 12. Persistencia de patrones PFGE ambientales y correlación con los aislados clínicos

Hospital	Periodo de estudio	Aislados ambientales		Aislados clínicos		Correlación entre patrones PFGE ambientales y clínicos (patrón PFGE)
		Nº de patrones PFGE	Persistencia de patrones PFGE (n ^a)	Nº de patrones PFGE		
I	1989-2006	9	SI (5)	1		SI
II	1991-2005	2	SI (1)	1		SI
III	1996-2003	2	NO	1		SI
IV	1996-2003	3	SI (2)	2		SI
V	1996-2006	4	SI (3)	-		n.a. ^c
VI	1996-2004	1	n.a. ^b	1		SI
VII	1996-2002	3	NO	-		n.a. ^c

^an - número de patrones PFGE persistentes

^bn.a. No aplicable. Segunda muestra no disponible.

^cn.a. No aplicable. Muestra no disponible.

DISCUSIÓN

Legionella está presente en ambientes acuáticos y frecuentemente se encuentra en sistemas de distribución de agua potable o torres de refrigeración [162, 182-184]. La colonización de los sistemas de distribución de agua sanitaria por *L. pneumophila*, se ha relacionado con la aparición de casos de legionelosis nosocomial [116, 140, 185, 186]. Por otro lado, los brotes de legionelosis nosocomial se han asociado al aislamiento del microorganismo en las muestras de agua del hospital [187, 188]. Rara vez se detectan o aparecen casos de legionelosis nosocomial si los cultivos ambientales de *Legionella* son negativos. Nuestro estudio (Artículo I) demostró que el 85% (17/20) de los hospitales estaban colonizados por *Legionella*. En otros estudios que incluían investigaciones ambientales en USA [189, 190], Canadá [191], Reino Unido [188], Nueva Escocia [192] y San Antonio [193], se observó que entre el 12 y el 70 % de los hospitales estaban colonizados por *Legionella*. Esta colonización se detectó en muestras de agua caliente sanitaria y en las torres de refrigeración. En cambio, las muestras correspondientes a la salida del agua sanitaria fría y las procedentes de la red general de suministro de la compañía resultaron negativas. No obstante, otros autores [157, 194] consiguieron aislar cepas de *L. pneumophila* del suministro de agua de dos hospitales proporcionando evidencias que las redes externas son la posible fuente de contaminación del sistema de agua potable de los hospitales, lugar donde se amplificaría.

Los niveles de colonización de *Legionella* oscilaron entre 200 y 74.250 UFC/L, rango similar al encontrado por otros autores [140, 165, 195]. El hecho de que se observen niveles de colonización más elevados en puntos de consumo responde seguramente a la complicada configuración de la red de tuberías. El grado de deterioro de estas junto a la presencia de temperaturas templadas óptimas (sólo en un hospital se conseguían 50°C en puntos de consumo) favorecería la supervivencia y el crecimiento de *Legionella*; por otro lado, el estancamiento del agua secundaria la presencia de depósitos calcáreos y el anidamiento en ellos de algas y amebas favoreciendo la formación de biofilms que se adherirían a las paredes de las tuberías. Algunos autores han demostrado que la formación de biofilm en la superficie interna de las válvulas o tuberías y en la misma abertura está relacionada con los niveles de *Legionella* spp. detectados [196].

El grado de colonización por *Legionella* del agua sanitaria en un hospital se

correlaciona con la incidencia de legionelosis. La necesidad de incluir la cuantificación de la concentración de *Legionella* en muestras de agua en los estudios epidemiológicos de vigilancia ambiental se basa en la importancia de establecer el umbral crítico de contaminación que represente riesgo de que pacientes susceptibles adquieran legionelosis nosocomial. En este sentido, se han propuesto guías de acciones de control basadas en resultados o datos *cuantitativos* de *Legionella* procedentes de cultivos ambientales [197, 198]. En España existe una guía técnica de prevención y control de la legionelosis en instalaciones [199] en el que se establece que a partir de niveles 10^3 UFC/L deben tomarse medidas de desinfección concretas, aun cuando no existe evidencia científica de que la cuantificación en un punto se correlacione con la aparición o no de casos, ya que en un hospital pueden existir más de 1000 puntos de consumo.

Otro dato a destacar es el elevado porcentaje de hospitales con unos niveles de colonización importantes: más del 30% de los puntos de consumo muestreados estaban colonizados por *Legionella* en 13 de los 17 hospitales positivos. Esta cifra tan alta, que representa el 65% (13/20) de los hospitales estudiados, tiene cierta importancia en epidemiología ambiental si se considera el hecho descrito por algunos autores [154, 200, 201] que correlacionan la aparición de casos de legionelosis nosocomial en un hospital cuando se detecta *L. pneumophila* en más del 30% de los puntos de consumo de toma de muestra de agua seleccionados, pero no con el número de microorganismos detectados en cada punto de consumo. En Cataluña, el Decret 352/2004 [202], al igual que otras guías [203, 204], recomiendan la desinfección sistémica a partir de este porcentaje positivo en puntos de consumo. No hay evidencia científica de que sea un punto de corte correcto. No obstante, la presencia de más de un 30 % de puntos de consumo positivos tiene que servir para reforzar las estrategias anteriormente comentadas.

Solamente se identificó *L. pneumophila* sg. 1 en un 40% de las muestras positivas, mientras que el resto de serogrupos representaban un 60% del total, valores similares a los descritos por otros autores [195]. Algunos autores han descrito aislamientos de *Legionella no-pneumophila* en el agua [205, 206]. Esto podría ser debido bien a la variación en la composición de los diferentes hábitats acuáticos o bien al uso de diferentes técnicas y medios de cultivo selectivos de aislamiento de *Legionella*. En un estudio comparativo, Ta y col. [159] detectaron solamente especies de *Legionella no-pneumophila* en muestras de agua con medios de cultivos BCYE no

selectivos. Esto refuerza la idea de la necesidad real de los controles ambientales periódicos. Muchos hospitales utilizan actualmente la prueba del antígeno urinario para el diagnóstico de la legionelosis nosocomial. Dicho test sólo detecta *L. pneumophila* sg. 1. La presencia ambiental de especies o serogrupos distintos a *L. pneumophila* sg. 1 obliga a reforzar la necesidad diagnóstica, con más énfasis en los cultivos de muestras respiratorias que en la determinación del antígeno urinario.

El análisis del genotípico mediante PFGE ha demostrado ser útil en la investigación de infecciones nosocomiales causadas por *L. pneumophila* [139, 140]. El estudio molecular de los aislados ambientales de *Legionella* demostró una gran diversidad de patrones PFGE (Artículo I y III). Chang y col. [155] demostraron la diversidad genética por PFGE entre los aislados de *L. pneumophila* sg. 5 de diferentes áreas geográficas. Debido a que esta bacteria está ampliamente distribuida en muestras ambientales y que existe una gran diversidad en *Legionella* especies, es muy común aislar más de una cepa de *Legionella* en muestras ambientales testadas durante investigaciones de legionelosis. No es por lo tanto extraño observar que diversas especies o serogrupos de *Legionella* representativos de diferentes patrones PFGE puedan cohabitar en la red de distribución de agua potable en el mismo edificio [139] [207]. Aproximadamente el 60% de los hospitales tenía un único patrón PFGE en su sistema de distribución de agua predominante como único patrón PFGE sugiriendo una mayor agresividad/virulencia, al menos ambientalmente, desplazando así y eliminando otras posibles cepas que inicialmente habían coexistido con la cepa presente. Para elucidar el significado de estos resultados, se informó y alertó a todos los hospitales implicados en el estudio I para investigar *Legionella* en todos los casos de neumonía nosocomial y se realizaron estudios de virulencia *in vitro* de estas cepas (Artículo II).

No se conocen los factores responsables de que los hospitales colonizados por *Legionella* tengan o no de casos de legionelosis nosocomial. A menudo, se atribuye a las diferencias en cuanto a diseño de los circuitos de agua sanitaria hospitalaria y las medidas de mantenimiento de estos, a la concentración bacteriana en los puntos de consumo (grifos y duchas) y a la susceptibilidad del huésped. También se ha pensado que la virulencia o capacidad infectiva (capacidad de invadir y multiplicarse en los macrófagos alveolares y en células epiteliales hospedadoras) del microorganismo juega un papel importante y es en esta característica en la que nos centramos en nuestro estudio (Artículo II).

Debido a que el efecto citopático en las células hospedadoras es una

característica importante en la severidad de la enfermedad, se consideró oportuno realizar un ensayo de citopatogenicidad. Todos los aislados ambientales de *L. pneumophila* eran capaces de infectar y crecer en células U937 diferenciadas a macrófagos, produciendo un efecto citopático significativo. Se identificaron 5 grupos de citopatogenicidad de *L. pneumophila*. El 73% de los aislados pertenecían a los grupos menos citopatogénicos (grupos 4 y 5). El grado de citopatogenicidad parecía correlacionarse con el serogrupo 1, el número de patrones PFGE coexistentes en el mismo sistema de distribución de agua y la declaración de casos de legionelosis nosocomial en cada hospital.

Las diferentes especies de *Legionella* poseen distintos grados de virulencia según su citopatogenicidad o ensayos de virulencia y pueden ser agrupados en diferentes clusters [168, 173, 208-211]. O'Connell et al. [211] evalúan la citopatogenicidad de diferentes especies de *Legionella* en células U937 diferenciadas a macrófagos y encontró tasas distintas de virulencia. Neumeister et. al. [210] agrupa *Legionella* en 7 clusters según su replicación intracelular en células MonoMac y *A. castellanii*. Fields et. al. [208] agrupa *Legionella* en 4 clusters basados en la capacidad de infectar cobayas y la multiplicación en *Tetrahymena pyriformis*. Izu et al. [209] agrupa especies de *Legionella* en 4 clusters basados en su capacidad de crecimiento en macrófagos de ratón y cobayas. Por el contrario, hay pocos estudios que evalúen la virulencia de diferentes aislados ambientales de *L. pneumophila* [172, 177, 210, 212].

En este estudio, *L. pneumophila* sg. 1 era más eficiente infectando células U937 diferenciadas a macrófagos que otros serogrupos. La mayoría de casos de legionelosis están causados por *L. pneumophila* serogrupo 1 y, consecuentemente, se ha formulado la hipótesis que el serogrupo 1 es más virulento que otros serogrupos de la especie *L. pneumophila*, aunque esto no se había demostrado experimentalmente [168, 212, 213].

La citopatogenicidad de los aislados de *L. pneumophila* tendía a ser más elevada en aquellos hospitales con más de 1 patrón PFGE en su sistema de distribución de agua. Este fenómeno no se ha descrito previamente en estudios de campo, aunque nuestra experiencia en estudios de laboratorio están en concordancia con las observaciones que la coexistencia de diferentes patrones PFGE de *L. pneumophila* en torres de refrigeración y la consecuentes condiciones adversas del ambiente induce un crecimiento o multiplicación mayor del patrón más virulento que desplaza a los otros y puede producir un brote de legionelosis [214]. De hecho, la ausencia/limitación de

nutrientes en los sistemas de distribución de agua colonizados por *Legionella* spp. activan la expresión o aumentan las características de virulencia de *Legionella* en estudios *in vitro* [181]. Por lo tanto, la competición por los escasos nutrientes en el ambiente acuático podría inducir o aumentar los caracteres de virulencia.

Asimismo, la coexistencia de más de un patrón PFGE en los sistemas de distribución de agua sanitaria podría ser una indicación de su complejidad, que facilitaría la formación de biofilm y el crecimiento intracelular de *Legionella* en protozoos. El crecimiento intracelular de *L. pneumophila* en amebas provoca unos cambios fenotípicos en la bacteria entre ellos un aumento de la capacidad de invasión cuando se compara con las células creciendo en medios convencionales [32]. Las similitudes en los modelos de infección intracelular entre protozoos y macrófagos alveolares [30] sugiere que la infección de *L. pneumophila* en células de mamífero (humanos) es la consecuencia de su evolución como parásito en amebas [37]. De manera que, considerando que los protozoos son determinantes importantes en la ecología de *L. pneumophila* en los ambientes acuáticos, los estudios sobre diferencias en las poblaciones de amebas de los sistemas de distribución de agua sanitaria hospitalaria y su capacidad de crecer en estas poblaciones de amebas y macrófagos alveolares serían de interés para entender la ecología y citopatogenicidad de *Legionella*.

En nuestro estudio (Artículo II), los hospitales colonizados por los aislados más citopatogénicos de *L. pneumophila* tendían a declarar más frecuentemente casos de legionelosis nosocomial. Sin embargo, la vigilancia no era activa en todos los hospitales incluidos y en aquellos que se declaran casos no se disponía de la cepa clínica para llegar a finalizar la correlación ambiental de los aislados. No obstante, algunos autores han sugerido la importancia de la virulencia de la cepa y la aparición de casos de legionelosis nosocomial ya que en los hospitales colonizados con más de un genotipo de *Legionella* spp., la cepa clínica se corresponde genotípicamente con la cepa más virulenta [170, 171].

La presencia de *Legionella* spp. en los sistemas de distribución de agua sanitaria y los factores del huésped de los pacientes hospitalizados como son la inmunodepresión, son los factores pronósticos más importantes para la aparición o no de casos de legionelosis nosocomial [215]. No obstante, teniendo en cuenta que la erradicación completa de *Legionella* en los sistemas de distribución de agua sanitaria es imposible con los métodos actuales de desinfección, el conocimiento de la

citopatogenicidad de los aislados ambientales de *Legionella spp.* podría ser muy útil para evaluar el riesgo de legionelosis nosocomial en un hospital concreto.

Otro aspecto interesante de nuestro estudio, es la constatación que cada hospital tenía su propio patrón PFGE que no estaba relacionado en ningún caso con otros hospitales estudiados (Artículo I y III). El resultado de la gran variabilidad de patrones PFGE de *Legionella* encontrados tiene una elevada relevancia si se tiene en cuenta la pequeña área geográfica donde se realizaron los estudios. Esta observación contrasta con estudios previos: Darelid et al. [180] identificaron el mismo patrón AFLP en 3 de 6 hospitales suecos localizados en un área de 100 Km; y Lawrence et al. [161] describe una amplia distribución de un patrón PFGE en el área de París, en que el 25 % (15/64) aislados ambientales de 43 puntos demostraban el mismo patrón PFGE. Sin embargo, los criterios utilizados por estos autores son menos discriminatorios que los utilizados en el presente trabajo.

A pesar de que existen guías bien establecidas en algunos países para la descontaminación de las torres de refrigeración, no existen criterios uniformes en cuanto a los sistemas de distribución de agua sanitaria. En España es obligatorio por Real decreto [78] realizar un muestreo ambiental anual de *Legionella* anualmente en hospitales. Cuando se detectan casos de legionelosis nosocomial deben realizarse muestreos adicionales. La legionelosis nosocomial a menudo está infradiagnosticada debido a la dificultad de detectarla e identificar el agente etiológico ya que no siempre se realizan sistemáticamente tests de *Legionella* en los enfermos con neumonía nosocomial.

El hecho de conocer a priori el patrón PFGE de *Legionella* en cada hospital puede ser clínica y epidemiológicamente significativo. Si se demostrara su estabilidad ambiental en el tiempo, se podrían etiquetar fácilmente a los casos clínicos de nosocomiales o adscribirse a un hospital determinado. La búsqueda de diferentes focos en la red de distribución del agua caliente sanitaria potable o en torres de refrigeración tendría que ser obligada si algún aislado clínico nosocomial mostrara un patrón PFGE diferente del previamente observado en los aislados ambientales.

En nuestro estudio (artículo III), algunos patrones PFGE persisten incluso durante más de 17 años. Es notable, que la mayoría de los aislados ambientales asociados con los episodios de infección por *Legionella* se correspondían con los patrones PFGE que persistían durante más tiempo en el sistema de distribución de agua sanitaria hospitalaria.

No se conocen los factores responsables de la mayor o menor diversidad genética en algunas áreas. Tampoco se conocen relacionados con la presencia de uno o varios patrones PFGE, o aquellos que influyen en la aparición y/o desaparición de ciertos patrones PFGE, así como aquellos asociados a la persistencia en el ambiente de algunos patrones PFGE. Algunos autores han atribuido estos cambios (aparición/desaparición) en los patrones PFGE de *L. pneumophila* a las medidas de desinfección utilizadas [151, 180, 216, 217], mientras que otros [218] [119] no encontraron cambios en las poblaciones de *L. pneumophila*.

La calidad del agua o los continuos procesos de desinfección a que están sometidos los sistemas de distribución de agua sanitaria en hospitales podrían influir en la variabilidad genómica observada. En los hospitales estudiados se han utilizado varios métodos de desinfección (hipercalentamientos, hipercloraciones y/o ionización cobre-plata) durante los periodos de estudio, relacionándose con un incremento en la variación de patrones PFGE observados. A pesar de todos estos métodos utilizados, los patrones PFGE moleculares relacionados con los casos de legionelosis nosocomial se han mantenido durante los periodos de estudio.

Se asume que *Legionella* llega a los sistemas de distribución de agua sanitaria hospitalaria desde el aporte de agua fría de la red municipal a unas concentraciones indetectables mediante los métodos habituales de laboratorio. Una vez colonizado el sistema en presencia de condiciones favorables, la bacteria puede vivir de forma libre en la fase planctónica o bien como parásito intracelular de protozoos y amebas formando parte de la compleja estructura microbiana del biofilm. La presencia de biofilms a través de todo el sistema de distribución de agua facilita el crecimiento de *Legionella* e interfiere con condiciones ambientales adversas, permitiendo que diferentes PFGE patrones de *Legionella* cohabiten a lo largo del tiempo en los sistemas de distribución de agua incluso a niveles indetectables.

Un cambio en el ambiente, tal y como puede suceder con la aplicación de medidas de desinfección, provoca una desestabilización del nicho ecológico pudiéndose producir una reducción de los inóculos de los patrones PFGE predominantes en el agua, permitiendo una mayor multiplicación o crecimiento de aquellos patrones PFGE menos predominantes inicialmente. Es probable que las medidas desinfección utilizadas sean más efectivas en la fase planctónica que en la fase biofilm; de ahí que no se lleguen a erradicar nunca los microorganismos presentes en los sistemas de distribución de agua sanitaria.

Otros factores como son, la adquisición de mecanismos de resistencia adoptados por *Legionella* frente a las medidas de desinfección como la hipercloración o la ionización cobre-plata se ha descrito en pocos estudios [219, 220]. Por el contrario, las asociaciones *Legionella*-protozoos y *Legionella*-biofilm han demostrado ser más resistentes a las medidas de desinfección bien por la capacidad de *Legionella* de crecer intracelularmente en protozoos o bien por su capacidad de entrar en estado de viable-no cultivable (VBNC) [221, 222]. De este modo, cuando las condiciones adversas se reducen, *Legionella* coloniza de nuevo los sistemas de distribución de agua.

Tampoco se conocen los factores responsables que ciertos patrones PFGE produzcan infección en humanos y otros no (se relacionen con casos/ episodios de infección). En este estudio los aislados clínicos procedentes del mismo paciente tenían el mismo patrón PFGE (datos no mostrados), cuya elevada prevalencia y persistencia temporal en los sistemas de distribución de agua sanitaria hospitalaria demuestra una mejor adaptación al nicho ecológico que otros patrones PFGE de *Legionella*. Si es una mayor virulencia o bien el simple hecho de encontrarse en inóculos más elevados y persistir más tiempo en el ambiente lo que conduce/promueve su asociación con los casos clínicos tampoco se conoce.

Si se sabe que los aislados ambientales de *Legionella* pueden expresar diferentes grados de virulencia, aunque su relación con la aparición de casos clínicos es controvertida [163, 171, 212]. En este estudio (artículo II) se observa que los hospitales colonizados por cepas de *L. pneumophila* que expresan una elevada citopatogenicidad tienen tendencia a situarse en aquellos hospitales que reportan casos de legionelosis nosocomial (capítulo de citopatogenicidad).

Debido a que el tipado molecular se realiza en un número aleatorio de aislados ambientales, no se puede descartar la posibilidad que otros patrones PFGE coexistan en el mismo ambiente que con los seleccionados. En los hospitales estudiados, se analizaron una media de 9,3 aislados ambientales por año. Por lo tanto, es obvio que si se dispusiera de más tipados moleculares en algunos muestreos es probable que algunos hospitales presentaran más patrones PFGE o bien que se reforzara la observación de persistencia genómica. La legislación española (RD865/2003) desde el año 2003 [78] y en Cataluña desde el año 2002 [223] se exige a los hospitales realizar estudios ambientales de *Legionella*. En los años anteriores a esta exigencia, cada hospital realizaba los estudios ambientales según sus propios criterios y grado de

conocimiento sobre el tema. Por otro lado, otra limitación puede ser las variaciones en los sistemas de vigilancia clínica y métodos de detección utilizados entre los diferentes hospitales, de manera que no se puede garantizar que todas las neumonías se testaran para *Legionella* durante el periodo de estudio. Asimismo, la baja rendibilidad de los cultivos de esputo y el hecho de que no se trate de un estudio de vigilancia activa de legionelosis nosocomial dificulta la obtención de más aislados clínicos para ser evaluados.

CONCLUSIONES

Artículo I. Colonización y variabilidad genotípica en hospitales

- *Legionella* está presente en los sistemas de distribución de agua sanitaria de la mayoría de hospitales estudiados.
- *L. pneumophila* serogrupo 1 era predominante entre las muestras positivas.
- Cada hospital tenía su propio patrón PFGE que no estaba genéticamente relacionado en ningún caso con los de los otros hospitales estudiados.
- La verificación de diferentes perfiles cromosómicos de los aislados en esta pequeña área geográfica demuestra la gran diversidad de *Legionella* en el ambiente acuático.

Artículo II. Citopatogenicidad

- Aislados de *Legionella* con diferentes patrones PFGE expresan diferentes grados de citopatogenicidad.
- Los aislados de *L. pneumophila* serogrupo 1 son más citopatogénicos que los aislados no-sg.1.
- La citopatogenicidad de los aislados de *L. pneumophila* tendía a ser más elevada en los hospitales con más de un patrón de PFGE en el sistema de distribución de agua sanitaria.
- Los hospitales con aislados de *L. pneumophila* pertenecientes a los grupos más citopatogénicos tendían a declarar más casos de enfermedad del legionario (no estadísticamente significativo).

Artículo III. Variabilidad y persistencia genotípica en hospitales

- Existe una elevada variabilidad genómica de los patrones de PFGE de *Legionella* en los sistemas de distribución de agua sanitaria de los hospitales.
- Se observa una persistencia a lo largo del tiempo de aquellos patrones de *Legionella* causantes de la mayoría de casos de legionelosis nosocomial.

REFERENCIAS

1. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GF, Martin SM, McDade JE, Shepard CC, Brachman PS. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 1977; 297: 1189-97.
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: 1197-203.
3. Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC, Baine WB. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 1979; 10: 437-41.
4. McDade JE. Legionnaires' disease 25 years later: lesson learned. In: Marre R, Abu Kwaik Y, Bartlett C, et al., eds. *Legionella*. American Society for Microbiology, Washington DC, 2002; p. 1-10.
5. McDade JE, Brenner DJ, Bozeman FM. Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. *Ann Intern Med* 1979; 90: 659-61.
6. Osterholm MT, Chin TD, Osborne DO, Dull HB, Dean AG, Fraser DW, Hayes PS, Hall WN. A 1957 outbreak of Legionnaires' disease associated with a meat packing plant. *Am J Epidemiol* 1983; 117: 60-7.
7. Boyd JF, Buchanan WM, MacLeod TI, Dunn RI, Weir WP. Pathology of five Scottish deaths from pneumonic illnesses acquired in Spain due to Legionnaires' disease agent. *J Clin Pathol* 1978; 31: 809-16.
8. Thacker SB, Bennett JV, Tsai TF, Fraser DW, McDade JE, Shepard CC, Williams KH, Jr., Stuart WH, Dull HB, Eickhoff TC. An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by the Legionnaires' disease bacterium. *J Infect Dis* 1978; 138: 512-9.
9. Glick TH, Gregg MB, Berman B, Mallison G, Rhodes WW, Jr., Kassinoff I. Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol* 1978; 107: 149-60.
10. 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: 656-8.
11. 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: 486-91.
12. Brown A, Garrity GM, Vickers RM. *Fluoribacter dumoffii* comb. nov. and *Fluoribacter gormanii* comb. nov. . Int J Syst Bacteriol 1981; 31: 111-5.
 13. Garrity GM, Brown A, Vickers RM. *Tatlockia* and *Fluoribacter*: two new genera of organisms resembling *Legionella pneumophila*. Int J Syst Evol Microbiol 1980; 609-14.
 14. Brenner DJ, Steigerwalt AG, Epple P, Bibb WF, McKinney RM, Starnes RW, Colville JM, Selander RK, Edelstein PH, Moss CW. *Legionella pneumophila* serogroup Lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and descriptions of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* subsp. nov., *L. pneumophila* subsp. *fraseri* subsp. nov., and *L. pneumophila* subsp. *pascullei* subsp. nov. J Clin Microbiol 1988; 26: 1695-703.
 15. Ricketts KD, Joseph CA. Legionnaires' disease in Europe: 2005-2006. Eurosurveillance 2007; 12: 371-6.
 16. Rowbotham TJ. Legionella-like amoebal pathogens. In: Barbaree JM, Breiman RF, Dufour AP, eds. *Legionella: Current Status and Emerging Perspectives*. American Society for Microbiology, Washington DC, 1993; p. 137-40.
 17. Fry NK, Rowbotham TJ, Saunders NA, Embley TM. Direct amplification and sequencing of the 16S ribosomal DNA of an intracellular *Legionella* species recovered by amoebal enrichment from the sputum of a patient with pneumonia. FEMS Microbiol Lett 1991; 67: 165-8.
 18. Marrie TJ, Raoult D, La Scola B, Birtles RJ, de Carolis E. Legionella-like and other amoebal pathogens as agents of community-acquired pneumonia. Emerg Infect Dis 2001; 7: 1026-9.
 19. Benson RF, Fields BS. Classification of the genus *Legionella*. Semin Respir Infect 1998; 13: 90-9.
 20. Rodgers FG, Greaves PW, Macrae AD, Lewis MJ. Electron microscopic evidence of flagella and pili on *Legionella pneumophila*. J Clin Pathol 1980; 33: 1184-8.
 21. Gress FM, Myerowitz RL, Pasculle AW, Rinaldo CR, Jr., Dowling JN. The ultrastructural morphologic features of Pittsburgh pneumonia agent. Am J Pathol 1980; 101: 63-77.
 22. Hindahl MS, Iglewski BH. Isolation and characterization of the *Legionella pneumophila* outer membrane. J Bacteriol 1984; 159: 107-13.
 23. Greer PW, Chandler FW, Hicklin MD. Rapid demonstration of *Legionella pneumophila* in unembedded tissue. An adaptation of the Gimenez stain. Am J

- Clin Pathol 1980; 73: 788-90.
24. Van Orden A, Greer P. Modification of the Dieterle spirochete stain. *Histotechnology* 1977; 1: 51-3.
 25. Moss CW, Dees SB. Further studies of the cellular fatty acid composition of Legionnaires' disease bacteria. *J Clin Microbiol* 1979; 9: 648-9.
 26. 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: 615-26.
 27. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 506-26.
 28. Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* 1980; 33: 1179-83.
 29. Horwitz MA. Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med* 1983; 158: 1319-31.
 30. 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: 4738-46.
 31. Bruggemann H, Hagman A, Jules M, Sismeiro O, Dillies MA, Gouyette C, Kunst F, Steinert M, Heuner K, Coppee JY, Buchrieser C. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* 2006; 8: 1228-40.
 32. Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* 1994; 62: 3254-61.
 33. 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: 4427-34.
 34. Bruggemann 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.
 35. Cianciotto NP. Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol* 2001; 291: 331-43.
 36. Horwitz MA. Toward an understanding of host and bacterial molecules mediating pathogenesis. In: Barbaree JM, Breiman RF, A.F. D, eds. *Legionella:*

- current status and emerging perspectives. American Society for Microbiology, Washington DC, 1993; p. 55-62.
37. Swanson MS, Hammer BK. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. Annu Rev Microbiol 2000; 54: 567-613.
 38. Molmeret M, Abu Kwaik Y. How does *Legionella pneumophila* exit the host cell? Trends Microbiol 2002; 10: 258-60.
 39. Heuner K. Function and expression of *Legionella pneumophila* surface factors. In: Marre R, eds. *Legionella*. American Society for Microbiology, Washington DC, 2002; p. 43-8.
 40. 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: 1201-10.
 41. 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: 173-9.
 42. Garduno RA, Garduno E, Hoffman PS. Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. Infect Immun 1998; 66: 4602-10.
 43. Fields BS. The molecular ecology of *legionellae*. Trends Microbiol 1996; 4: 286-90.
 44. 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: 5188-91.
 45. 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: 1255-62.
 46. Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Engleberg NC. A mutation in the mip gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. J Infect Dis 1990; 162: 121-6.
 47. 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: 1560-7.
 48. Baskerville A, Conlan JW, Ashworth LA, Dowsett AB. Pulmonary damage caused by a protease from *Legionella pneumophila*. Br J Exp Pathol 1986; 67: 527-36.

49. 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: 1855-63.
50. Dowling JN, Saha AK, Glew RH. Virulence factors of the family *Legionellaceae*. *Microbiol Rev* 1992; 56: 32-60.
51. Edelstein PH, Cianciotto N. *Legionella* In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 6th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2006; p. 2711-24.
52. Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope DH. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 1981; 41: 9-16.
53. Campbell J, Bibb WF, Lambert MA, Eng S, Steigerwalt AG, Allard J, Moss CW, Brenner DJ. *Legionella sainthelensi*: a new species of *Legionella* isolated from water near Mt. St. Helens. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47: 369-73.
54. Carvalho FR, Nastasi FR, Gamba RC, Foronda AS, Pellizari VH. Occurrence and Diversity of *Legionellaceae* in Polar Lakes of the Antarctic Peninsula. *Curr Microbiol* 2008.
55. Steele TW, Moore CV, Sangster N. Distribution of *Legionella longbeachae* serogroup 1 and other *legionellae* in potting soils in Australia. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 2984-8.
56. Katz SM, Hammel JM. The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Ann Clin Lab Sci* 1987; 17: 150-6.
57. Groothuis DG, Veenendaal HR, Dijkstra HL. Influence of temperature on the number of *Legionella pneumophila* in hot water systems. *J Appl Bacteriol* 1985; 59: 529-36.
58. Fields BS, Shotts EB, Jr., Feeley JC, Gorman GW, Martin WT. Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47: 467-71.
59. Skaliy P, McEachern HV. Survival of the Legionnaires' disease bacterium in water. *Ann Intern Med* 1979; 90: 662-3.
60. Yee RB, Wadowsky RM. Multiplication of *Legionella pneumophila* in unsterilized tap water. *Appl Environ Microbiol* 1982; 43: 1330-4.
61. Tesh MJ, Miller RD. Amino acid requirements for *Legionella pneumophila* growth. *J Clin Microbiol* 1981; 13: 865-9.
62. Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella*

- pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. Appl Environ Microbiol 1994; 60: 1585-92.
63. Drozanski W. Studies of intracellular parasites of free-living amoeba. Acta Microbiol Pol 1963; 12: 3-8.
 64. Tyndall RL, Domingue EL. Cocultivation of *Legionella pneumophila* and free-living amoebae. Appl Environ Microbiol 1982; 44: 954-9.
 65. Wadowsky RM, Wilson TM, Kapp NJ, West AJ, Kuchta JM, States SJ, Dowling JN, Yee RB. Multiplication of *Legionella* spp. in tap water containing *Hartmannella vermiformis*. Appl Environ Microbiol 1991; 57: 1950-5.
 66. Rowbotham TJ. Current views on the relationships between amoebae, *legionellae* and man. Isr J Med Sci 1986; 22: 678-89.
 67. Barker J, Brown MR, Collier PJ, Farrell I, Gilbert P. Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. Appl Environ Microbiol 1992; 58: 2420-5.
 68. Storey MV, Winiiecka-Krusnell J, Ashbolt NJ, Stenstrom TA. The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. Scand J Infect Dis 2004; 36: 656-62.
 69. Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. FEMS Microbiol Rev 2000; 24: 661-71.
 70. Allison DG. The biofilm matrix. Biofouling 2003; 19: 139-50.
 71. Green PN, Pirrie RS. A laboratory apparatus for the generation and biocide efficacy testing of *Legionella* biofilms. J Appl Bacteriol 1993; 74: 388-93.
 72. Walker JT, Sonesson A, Keevil CW, White DC. Detection of *Legionella pneumophila* in biofilms containing a complex microbial consortium by gas chromatography-mass spectrometry analysis of genus-specific hydroxy fatty acids. FEMS Microbiol Lett 1993; 113: 139-44.
 73. Atlas RM. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. Environ Microbiol 1999; 1: 283-93.
 74. 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. Microbiology 2001; 147: 3121-6.
 75. Stout JE, Yu VL. Legionellosis. N Engl J Med 1997; 337: 682-7.
 76. Cameron S, Roder D, Walker C, Feldheim J. Epidemiological characteristics of *Legionella* infection in South Australia: implications for disease control. Aust N Z J Med 1991; 21: 65-70.

77. Speers DJ, Tribe AE. *Legionella longbeachae* pneumonia associated with potting mix. Med J Aust 1994; 161: 509.
78. Real Decreto 865/2003 de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. Boletín Oficial del Estado 18 de julio 2003; 171: 28055-69.
79. Real Decreto 909/2001, de 27 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. Boletín oficial del Estado 18 de julio 2001; 180: 27750-59.
80. Rudbeck M, Molbak K, Uldum S. High prevalence of antibodies to *Legionella* spp. in Danish blood donors. A study in areas with high and average incidence of Legionnaires' disease. Epidemiol Infect 2008; 136: 257-62.
81. Borella P, Bargellini A, Marchesi I, Rovesti S, Stancanelli G, Scaltriti S, Moro M, Montagna MT, Tato D, Napoli C, Triassi M, Montegrosso S, Pennino F, Zotti CM, Ditommaso S, Giacomuzzi M. Prevalence of anti-legionella antibodies among Italian hospital workers. J Hosp Infect 2008; 69: 148-55.
82. Modi A, Gardner J, Lighton L, Coetzee N. Pontiac fever outbreak associated with a spa-pool, United Kingdom, April 2008. Euro Surveill 2008; 13.
83. Luttichau HR, Vinther C, Uldum SA, Moller J, Faber M, Jensen JS. An outbreak of Pontiac fever among children following use of a whirlpool. Clin Infect Dis 1998; 26: 1374-8.
84. Kaufmann AF, McDade JE, Patton CM, Bennett JV, Skaliy P, Feeley JC, Anderson DC, Potter ME, Newhouse VF, Gregg MB, Brachman PS. Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. Am J Epidemiol 1981; 114: 337-47.
85. Cordes LG, Fraser DW. Legionellosis: Legionnaires' disease; Pontiac fever. Med Clin North Am 1980; 64: 395-416.
86. Gotz HM, Tegnell A, De Jong B, Broholm KA, Kuusi M, Kallings I, Ekdahl K. A whirlpool associated outbreak of Pontiac fever at a hotel in Northern Sweden. Epidemiol Infect 2001; 126: 241-7.
87. Huhn GD, Adam B, Ruden R, Hilliard L, Kirkpatrick P, Todd J, Crafts W, Passaro D, Dworkin MS. Outbreak of travel-related pontiac fever among hotel guests illustrating the need for better diagnostic tests. J Travel Med 2005; 12: 173-9.
88. Fields BS, Haupt T, Davis JP, Arduino MJ, Miller PH, Butler JC. Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from a whirlpool spa: possible role of bacterial endotoxin. J Infect Dis 2001; 184: 1289-92.

89. Jones TF, Benson RF, Brown EW, Rowland JR, Crosier SC, Schaffner W. Epidemiologic investigation of a restaurant-associated outbreak of Pontiac fever. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 1292-7.
90. Fenstersheib MD, Miller M, Diggins C, Liska S, Detwiler L, Werner SB, Lindquist D, Thacker WL, Benson RF. Outbreak of Pontiac fever due to *Legionella anisa*. *Lancet* 1990; 336: 35-7.
91. Sopena N, Sabria-Leal M, Pedro-Botet ML, Padilla E, Dominguez J, Morera J, Tudela P. Comparative study of the clinical presentation of *Legionella* pneumonia and other community-acquired pneumonias. *Chest* 1998; 113: 1195-200.
92. Mulazimoglu L, Yu VL. Can Legionnaires disease be diagnosed by clinical criteria? A critical review. *Chest* 2001; 120: 1049-53.
93. Kirby BD, Snyder KM, Meyer RD, Finegold SM. Legionnaires' disease: report of sixty-five nosocomially acquired cases of review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1980; 59: 188-205.
94. Pedro-Botet ML, Sabria M, Sopena N, Garcia-Nunez M, Dominguez MJ, Reynaga E, Rey-Joly C. Legionnaires disease and HIV infection. *Chest* 2003; 124: 543-7.
95. Tan MJ, Tan JS, Hamor RH, File TM, Jr., Breiman RF. The radiologic manifestations of Legionnaire's disease. The Ohio Community-Based Pneumonia Incidence Study Group. *Chest* 2000; 117: 398-403.
96. Pedro-Botet L, Dominguez J, Sabria M. Infecciones causadas por *Legionella*. In: Farreras, Rozman, eds. *Principios de Medicina Interna* (16 edición). Elsevier España, SL, 2008; p. 2308-12.
97. Pedro-Botet L, Yu VL. *Legionella*: macrolides or quinolones? *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 Suppl 3: 25-30.
98. Sabria M, Pedro-Botet ML, Gomez J, Roig J, Vilaseca B, Sopena N, Banos V. Fluoroquinolones vs macrolides in the treatment of Legionnaires disease. *Chest* 2005; 128: 1401-5.
99. Stout JE, Rihs JD, Yu VL. Legionella. In: Murray BE, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington DC, 2003; p. 809-23.
100. Lück PC, Helbig JH, Schuppler M. Epidemiology and laboratory diagnosis of *Legionella* infections. *Journal of Laboratory medicine* 2002; 174-82.
101. Sabria M, Yu VL. *Legionella* Infection. In: Fauci A BE, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J., eds. *HARRISON'S Principles of Internal*

- Medicine (17th edition). McGraw-Hill Companies, Boston, 2008; p. 929-33.
102. Maiwald M, Helbig JH, Lück PC. Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections. *Journal of Microbiological methods* 1998; 59-79.
 103. Roig J, Rello J. Legionnaires' disease: a rational approach to therapy. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1119-29.
 104. Diederer BM, Kluytmans JA, Vandenbroucke-Grauls CM, Peeters MF. Utility of real-time PCR for diagnosis of Legionnaires' disease in routine clinical practice. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 671-7.
 105. WHO. *Legionella* and the prevention of legionellosis. Switzerland; 2007: p. 178-9
 106. Benson RF, Tang PW, Fields BS. Evaluation of the Binax and Biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires' disease due to multiple serogroups and species of *Legionella*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2763-5.
 107. Helbig JH, Uldum SA, Luck 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: 509-16.
 108. Diederer BM. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J Infect* 2008; 56: 1-12.
 109. Hayden RT, Uhl JR, Qian X, Hopkins MK, Aubry MC, Limper AH, Lloyd RV, Cockerill FR. 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: 2618-26.
 110. Rantakokko-Jalava K, Jalava J. Development of conventional and real-time PCR assays for detection of *Legionella* DNA in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2904-10.
 111. ISO 11731:1998. ISO Standard: Water quality - detection and enumeration of *Legionella*. . International Organization for Standardization, Geneva
 112. Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T. Comparison of detection methods for *Legionella* species in environmental water by colony isolation, fluorescent antibody staining, and polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 617-22.

113. Sanden GN, Morrill WE, Fields BS, Breiman RF, Barbaree JM. Incubation of water samples containing amoebae improves detection of *legionellae* by the culture method. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 2001-4.
114. Tobin JO, Beare J, Dunnill MS, Fisher-Hoch S, French M, Mitchell RG, Morris PJ, Muers MF. Legionnaires' disease in a transplant unit: isolation of the causative agent from shower baths. *Lancet* 1980; 2: 118-21.
115. Helbig JH, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, Gaia V, Lauwers S, Lindsay D, Luck PC, Marques T, Mentula S, Peeters MF, Pelaz C, Struelens M, Uldum SA, Wewalka G, Harrison TG. Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 710-6.
116. Yu VL. Resolving the controversy on environmental cultures for Legionella: a modest proposal. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; 19: 893-7.
117. Pringler N, Brydov P, Uldum S. Occurrence of *Legionella* in Danish hot water systems. In: Marre R, Abu Kwaik Y, Bartlett C, et al., eds. *Legionella*. American Society foR Microbiology, Washington DC, 2002; p. 298-300.
118. 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: 768-71.
119. Stout JE, Joly J, Para M, Plouffe J, Ciesielski C, Blaser MJ, Yu VL. Comparison of molecular methods for subtyping patients and epidemiologically linked environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Infect Dis* 1988; 157: 486-95.
120. Dournon E, Bibb WF, Rajagopalan P, Desplaces N, McKinney RM. Monoclonal antibody reactivity as a virulence marker for *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Infect Dis* 1988; 157: 496-501.
121. Ehret W, von Specht BU, Ruckdeschel G. Discrimination between clinical and environmental strains of *Legionella pneumophila* by a monoclonal antibody. *Isr J Med Sci* 1986; 22: 715-23.
122. Riffard S, Lo Presti F, Vandenesch F, Forey F, Reyrolle M, Etienne J. Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 161-7.
123. Lema M, Brown A. Electrophoretic characterization of soluble protein extracts of *Legionella pneumophila* and other members of the family *Legionellaceae*. *J Clin*

- Microbiol 1983; 17: 1132-40.
124. 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: 873-84.
 125. Edelstein PH, Nakahama C, Tobin JO, Calarco K, Beer KB, Joly JR, Selander RK. 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: 1121-6.
 126. Garcia-Nuñez M, Sabria M. Epidemiología molecular de *Legionella*. *Med Clin (Barc)* 2001; 119 (supl 2): 64-7.
 127. Knudson GB, Mikesell P. A plasmid in *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 1980; 29: 1092-5.
 128. Mikesell P, Ezzell JW, Knudson GB. Isolation of plasmids in *Legionella pneumophila* and Legionella-like organisms. *Infect Immun* 1981; 31: 1270-2.
 129. Jonas D, Meyer HG, Matthes P, Hartung D, Jahn B, Daschner FD, Jansen B. Comparative evaluation of three different genotyping methods for investigation of nosocomial outbreaks of Legionnaires' disease in hospitals. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2284-91.
 130. Nolte FS, Conlin CA, Roisin AJ, Redmond SR. Plasmids as epidemiological markers in nosocomial Legionnaires' disease. *J Infect Dis* 1984; 149: 251-6.
 131. Pedro-Botet ML, Sabria M, Espinosa L, Condom M, Carrasco M. Utilidad de los marcadores epidemiológicos moleculares en el estudio de un brote epidémico de enfermedad del legionario de origen nosocomial. *Med Clin (Barc)* 1992; 99: 761-5.
 132. van Ketel RJ, ter Schegget J, Zanen HC. Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 362-4.
 133. Bangsberg JM, Gerner-Smidt P, Colding H, Fiehn NE, Bruun B, Hoiby N. Restriction fragment length polymorphism of rRNA genes for molecular typing of members of the family *Legionellaceae*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 402-6.
 134. 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: 1491-8.
 135. Gaia V, Poloni C, Peduzzi R. Epidemiological typing of *Legionella pneumophila*

- with ribotyping. Report of two clinical cases. *Eur J Epidemiol* 1994; 10: 303-6.
136. Fry NK, Alexiou-Daniel S, Bangsberg JM, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, Forsblom B, Gaia V, Helbig JH, Lindsay D, Christian Luck P, Pelaz C, Uldum SA, Harrison TG. A multicenter evaluation of genotypic methods for the epidemiologic typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: results of a pan-European study. *Clin Microbiol Infect* 1999; 5: 462-77.
 137. Pruckler JM, Mermel LA, Benson RF, Giorgio C, Cassiday PK, Breiman RF, Whitney CG, Fields BS. Comparison of *Legionella pneumophila* isolates by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis: analysis from seven epidemic investigations. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2872-5.
 138. Green M, Wald ER, Dashefsky B, Barbadora K, Wadowsky RM. Field inversion gel electrophoretic analysis of *Legionella pneumophila* strains associated with nosocomial legionellosis in children. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 175-6.
 139. Luck PC, Wenchel HM, Helbig JH. Nosocomial pneumonia caused by three genetically different strains of *Legionella pneumophila* and detection of these strains in the hospital water supply. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1160-3.
 140. Visca P, Goldoni P, Luck PC, Helbig JH, Cattani L, Giltri G, Bramati S, Castellani Pastoris M. Multiple types of *Legionella pneumophila* serogroup 6 in a hospital heated-water system associated with sporadic infections. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2189-96.
 141. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 7213-8.
 142. Tyler KD, Wang G, Tyler SD, Johnson WM. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 339-46.
 143. Bansal NS, McDonell F. Identification and DNA fingerprinting of *Legionella* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2310-4.
 144. Valsangiacomo C, Baggi F, Gaia V, Balmelli T, Peduzzi R, Piffaretti JC. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1716-9.
 145. Gaia V, Fry NK, Afshar B, Luck PC, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R, Harrison TG. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 2005;

- 43: 2047-52.
146. Casini B, Valentini P, Baggiani A, Torracca F, Lorenzini C, Frateschi S, Matteoli B, Privitera G. Comparison of two molecular methods used for subtyping of *Legionella pneumophila* 1 strains isolated from a hospital water supply. *Water Sci Technol* 2008; 58: 683-8.
 147. Luck PC, Schneider T, Wagner J, Walther I, Reif U, Weber S, Weist K. Community-acquired Legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 10 linked to the private home. *J Med Microbiol* 2008; 57: 240-3.
 148. O'Loughlin RE, Kightlinger L, Werpy MC, Brown E, Stevens V, Hepper C, Keane T, Benson RF, Fields BS, Moore MR. Restaurant outbreak of Legionnaires' disease associated with a decorative fountain: an environmental and case-control study. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 93.
 149. Fendukly F, Bernander S, Hanson HS. Nosocomial Legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 6: implication of the sequence-based typing method (SBT). *Scand J Infect Dis* 2007; 39: 213-6.
 150. 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: 5348-50.
 151. Perola O, Kauppinen J, Kusnetsov J, Karkkainen UM, Luck PC, Katila ML. Persistent *Legionella pneumophila* colonization of a hospital water supply: efficacy of control methods and a molecular epidemiological analysis. *APMIS* 2005; 113: 45-53.
 152. Pedro-Botet ML, Sabria-Leal M, Haro M, Rubio C, Gimenez G, Sopena N, Tor J. Nosocomial and community-acquired *Legionella* pneumonia: clinical comparative analysis. *Eur Respir J* 1995; 8: 1929-33.
 153. Pedro-Botet ML, Sabria-Leal M, Sopena N, Manterola JM, Morera J, Blavia R, Padilla E, Matas L, Gimeno JM. Role of immunosuppression in the evolution of Legionnaires' disease. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 14-9.
 154. Best M, Yu VL, Stout J, Goetz A, Muder RR, Taylor F. *Legionellaceae* in the hospital water-supply. Epidemiological link with disease and evaluation of a method for control of nosocomial legionnaires' disease and Pittsburgh pneumonia. *Lancet* 1983; 2: 307-10.
 155. Chang FY, Jacobs SL, Colodny SM, Stout JE, Yu VL. Nosocomial Legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 5: laboratory and epidemiologic implications. *J Infect Dis* 1996; 174: 1116-9.

156. Johnson JT, Yu VL, Best MG, Vickers RM, Goetz A, Wagner R, Wicker H, Woo A. Nosocomial legionellosis in surgical patients with head-and-neck cancer: implications for epidemiological reservoir and mode of transmission. *Lancet* 1985; 2: 298-300.
157. Stout J, Yu VL, Vickers RM, Zuravleff J, Best M, Brown A, Yee RB, Wadowsky R. Ubiquitousness of *Legionella pneumophila* in the water supply of a hospital with endemic Legionnaires' disease. *N Engl J Med* 1982; 306: 466-8.
158. Reinthaler FF, Sattler J, Schaffler-Dullnig K, Weinmayr B, Marth E. Comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella pneumophila* from tap water in hospitals. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1213-6.
159. Ta AC, Stout JE, Yu VL, Wagener MM. Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2118-23.
160. Boulanger CA, Edelstein PH. Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 1805-9.
161. Lawrence C, Reyrolle M, Dubrou S, Forey F, Decludt B, Goulvestre C, Matsiota-Bernard P, Etienne J, Nauciel C. 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: 2652-5.
162. Fiore AE, Nuorti JP, Levine OS, Marx A, Weltman AC, Yeager S, Benson RF, Pruckler J, Edelstein PH, Greer P, Zaki SR, Fields BS, Butler JC. Epidemic Legionnaires' disease two decades later: old sources, new diagnostic methods. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 426-33.
163. Marrie TJ, Tyler S, Bezanson G, Dendy C, Johnson W. Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 251-4.
164. Oberdorfer K, Mussigbrodt G, Wendt C. Genetic diversity of *Legionella pneumophila* in hospital water systems. *Int J Hyg Environ Health* 2007.
165. Luck PC, Helbig JH, Hagedorn HJ, Ehret W. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis to investigate a nosocomial pneumonia caused by *Legionella bozemanii* serogroup 1. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 2759-61.
166. Montanaro-Punzengruber JC, Hicks L, Meyer W, Gilbert GL. Australian isolates

- of *Legionella longbeachae* are not a clonal population. J Clin Microbiol 1999; 37: 3249-54.
167. Sabria M, Modol JM, Garcia-Nunez M, Reynaga E, Pedro-Botet ML, Sopena N, Rey-Joly C. Environmental cultures and hospital-acquired Legionnaires' disease: a 5-year prospective study in 20 hospitals in Catalonia, Spain. Infect Control Hosp Epidemiol 2004; 25: 1072-6.
 168. Alli OA, Zink S, von Lackum NK, Abu-Kwaik Y. Comparative assessment of virulence traits in *Legionella* spp. Microbiology 2003; 149: 631-41.
 169. Joshi AD, Swanson MS. Comparative analysis of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* virulence traits. Infect Immun 1999; 67: 4134-42.
 170. Bezanson G, Fernandez R, Haldane D, Burbridge S, Marrie T. Virulence of patient and water isolates of *Legionella pneumophila* in guinea pigs and mouse L929 cells varies with bacterial genotype. Can J Microbiol 1994; 40: 426-31.
 171. Bollin GE, Plouffe JF, Para MF, Prior RB. Difference in virulence of environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol 1985; 21: 674-7.
 172. Molmeret M, Jarraud S, Mori JP, Pernin P, Forey F, Reyrolle M, Vandenesch F, Etienne J, Farge P. Different growth rates in amoeba of genotypically related environmental and clinical *Legionella pneumophila* strains isolated from a thermal spa. Epidemiol Infect 2001; 126: 231-9.
 173. Samrakandi MM, Cirillo SL, Ridenour DA, Bermudez LE, Cirillo JD. Genetic and phenotypic differences between *Legionella pneumophila* strains. J Clin Microbiol 2002; 40: 1352-62.
 174. Macfarlane JT, Finch RG, Ward MJ, Rose DH. Erythromycin compared with a combination of ampicillin and amoxicillin as initial therapy for adults with pneumonia including Legionnaires' disease. J Infect 1983; 7: 111-7.
 175. Lettinga KD, Verbon A, Weverling GJ, Schellekens JF, Den Boer JW, Yzerman EP, Prins J, Boersma WG, van Ketel RJ, Prins JM, Speelman P. Legionnaires' disease at a Dutch flower show: prognostic factors and impact of therapy. Emerg Infect Dis 2002; 8: 1448-54.
 176. Garcia-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, Garcia J, Gonzalez-Diego P, Jimenez-Bunuales T, Rodriguez M, Lopez R, Pacheco F, Ruiz J, Segovia M, Balandron B, Pelaz C. Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. Emerg Infect Dis 2003; 9: 915-21.
 177. Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF. Surveillance for Legionnaires' disease.

- Risk factors for morbidity and mortality. Arch Intern Med 1994; 154: 2417-22.
178. Grattard F, Berthelot P, Reyrolle M, Ros A, Etienne J, Pozzetto B. Molecular typing of nosocomial strains of *Legionella pneumophila* by arbitrarily primed PCR. J Clin Microbiol 1996; 34: 1595-8.
 179. Rangel-Frausto MS, Rhomberg P, Hollis RJ, Pfaller MA, Wenzel RP, Helms CM, Herwaldt LA. Persistence of *Legionella pneumophila* in a hospital's water system: a 13-year survey. Infect Control Hosp Epidemiol 1999; 20: 793-7.
 180. Darelid J, Bernander S, Jacobson K, Lofgren S. The presence of a specific genotype of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in a hospital and municipal water distribution system over a 12-year period. Scand J Infect Dis 2004; 36: 417-23.
 181. Byrne B, Swanson MS. Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. Infect Immun 1998; 66: 3029-34.
 182. Bollin GE, Plouffe JF, Para MF, Hackman B. Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water faucets. Appl Environ Microbiol 1985; 50: 1128-31.
 183. Castellani Pastoris M, Ciceroni L, Lo Monaco R, Goldoni P, Mentore B, Flego G, Cattani L, Ciarrocchi S, Pinto A, Visca P. Molecular epidemiology of an outbreak of Legionnaires' disease associated with a cooling tower in Genova-Sestri Ponente, Italy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997; 16: 883-92.
 184. Marrie TJ, Haldane D, Bezanson G, Peppard R. Each water outlet is a unique ecological niche for *Legionella pneumophila*. Epidemiol Infect 1992; 108: 261-70.
 185. Helms CM, Massanari RM, Zeitler R, Streed S, Gilchrist MJ, Hall N, Hausler WJ, Jr., Sywassink J, Johnson W, Wintermeyer L, Hierholzer WJ, Jr. Legionnaires' disease associated with a hospital water system: a cluster of 24 nosocomial cases. Ann Intern Med 1983; 99: 172-8.
 186. Ruf B, Schurmann D, Horbach I, Seidel K, Pohle HD. Nosocomial legionella pneumonia: demonstration of potable water as the source of infection. Epidemiol Infect 1988; 101: 647-54.
 187. Helms CM, Massanari RM, Wenzel RP, Pfaller MA, Moyer NP, Hall N. Legionnaires' disease associated with a hospital water system. A five-year progress report on continuous hyperchlorination. Jama 1988; 259: 2423-7.
 188. Liu WK, Healing DE, Yeomans JT, Elliott TS. Monitoring of hospital water supplies for *Legionella*. J Hosp Infect 1993; 24: 1-9.

189. Vickers RM, Yu VL, Hanna SS, Muraca P, Diven W, Carmen N, Taylor FB. Determinants of *Legionella pneumophila* contamination of water distribution systems: 15-hospital prospective study. *Infect Control* 1987; 8: 357-63.
190. Goetz AM, Stout JE, Jacobs SL, Fisher MA, Ponzer RE, Drenning S, Yu VL. Nosocomial legionnaires' disease discovered in community hospitals following cultures of the water system: seek and ye shall find. *Am J Infect Control* 1998; 26: 8-11.
191. Alary M, Joly JR. Factors contributing to the contamination of hospital water distribution systems by *legionellae*. *J Infect Dis* 1992; 165: 565-9.
192. Marrie T, Green P, Burbridge S, Bezanson G, Neale S, Hoffman PS, Haldane D. *Legionellaceae* in the potable water of Nova Scotia hospitals and Halifax residences. *Epidemiol Infect* 1994; 112: 143-50.
193. Kool JL, Bergmire-Sweat D, Butler JC, Brown EW, Peabody DJ, Massi DS, Carpenter JC, Pruckler JM, Benson RF, Fields BS. Hospital characteristics associated with colonization of water systems by *Legionella* and risk of nosocomial legionnaires' disease: a cohort study of 15 hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20: 798-805.
194. Tanzi ML, Capobianco E, Affanni P, Pizzi S, Vitali P, Veronesi L. *Legionella* spp. in hospital dental facilities. *J Hosp Infect* 2006; 63: 232-4.
195. Zietz B, Wiese J, Brengelmann F, Dunkelberg H. Presence of *Legionellaceae* in warm water supplies and typing of strains by polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 2001; 126: 147-52.
196. Colbourne JS, Dennis PJ. Distribution and persistence of *Legionella* in water systems. *Microbiol Sci* 1985; 2: 40-3.
197. Shelton B, Morris G, Gorman G. Reducing risks associated with *Legionella* bacteria in building water systems. In: Barbaree JM, Breiman RF, A.F. D, eds. *Legionella: current status and emerging perspectives*. American Society for Microbiology, Washington DC, 1993; p. 279-81.
198. Australia S. AS 3896: Waters-Examination for Legionellae including *Legionella pneumophila*. Standards Australia. 1998.
199. Guía técnica para la Prevención y Control de la Legionelosis en instalaciones. Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral. Ministerio de Sanidad y consumo; 2008.
200. Kohler JR, Maiwald M, Luck PC, Helbig JH, Hingst V, Sonntag HG. Detecting legionellosis by unselected culture of respiratory tract secretions and developing

- links to hospital water strains. *J Hosp Infect* 1999; 41: 301-11.
201. Kool JL, Fiore AE, Kioski CM, Brown EW, Benson RF, Pruckler JM, Glasby C, Butler JC, Cage GD, Carpenter JC, Mandel RM, England B, Breiman RF. More than 10 years of unrecognized nosocomial transmission of legionnaires' disease among transplant patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; 19: 898-904.
 202. Decret 352/2004 de 27 de juliol, pel qual s'estableixen les condicions higienicosanitàries per a la prevenció i el control de la legionel·losi. DOGC 2004; 4185: 14726.
 203. Report of the Maryland Scientific Working Group to Study *Legionella* in Water Systems in Health Care Institutions. State of Maryland, Department of Health and Mental Hygiene. 2000.
 204. Allegheny County Health Department. Approaches to prevention and control of Legionella infection. 2a ed. Pittsburg, PA: Allegheny County Health Department. 1997; 1-15.
 205. Fliermans CB. Ecology of *Legionella*: From Data to Knowledge with a Little Wisdom. *Microb Ecol* 1996; 32: 203-28.
 206. Verissimo A, Marrao G, da Silva FG, da Costa MS. Distribution of *Legionella* spp. in hydrothermal areas in continental Portugal and the island of Sao Miguel, Azores. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 2921-7.
 207. Bezanson G, Burbridge S, Haldane D, Yoell C, Marrie T. Diverse populations of *Legionella pneumophila* present in the water of geographically clustered institutions served by the same water reservoir. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 570-6.
 208. Fields BS, Barbaree JM, Shotts EB, Jr., Feeley JC, Morrill WE, Sanden GN, Dykstra MJ. Comparison of guinea pig and protozoan models for determining virulence of *Legionella* species. *Infect Immun* 1986; 53: 553-9.
 209. Izu K, Yoshida S, Miyamoto H, Chang B, Ogawa M, Yamamoto H, Goto Y, Taniguchi H. Grouping of 20 reference strains of *Legionella* species by the growth ability within mouse and guinea pig macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 26: 61-8.
 210. Neumeister B, Schoniger S, Faigle M, Eichner M, Dietz K. Multiplication of different *Legionella* species in Mono Mac 6 cells and in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 1219-24.
 211. O'Connell WA, Dhand L, Cianciotto NP. Infection of macrophage-like cells by *Legionella* species that have not been associated with disease. *Infect Immun*

- 1996; 64: 4381-4.
212. Luck PC, Dinger E, Helbig JH, Thurm V, Keuchel H, Presch C, Ott M. Analysis of *Legionella pneumophila* strains associated with nosocomial pneumonia in a neonatal intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 565-71.
213. Neumeister B. Intracellular multiplication of *Legionella* species and the influence of amoebae on their intracellular growth in human monocytes: mono mac 6 cells and *Acanthamoeba castellanii* as suitable in vitro models. *Methods Mol Biol* 2004; 268: 141-51.
214. Ragull S, Garcia-Nunez M, Soler A, Sanchez I, Pedro-Botet ML, Sopena N, Dominguez A, Sabria M. Diversity of *Legionella* subtypes in cooling towers. Why only one environmental strain causes the clinical cases. Program and Abstracts of the 6th International Conference on *Legionella* Chicago: American Society for Microbiology; 2005. p. 64.
215. Sabria M, Yu VL. Hospital-acquired legionellosis: solutions for a preventable infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 368-73.
216. Struelens MJ, Maes N, Rost F, Deplano A, Jacobs F, Liesnard C, Bornstein N, Grimont F, Lauwers S, McIntyre MP, et al. Genotypic and phenotypic methods for the investigation of a nosocomial *Legionella pneumophila* outbreak and efficacy of control measures. *J Infect Dis* 1992; 166: 22-30.
217. Triassi M, Di Popolo A, Ribera D'Alcala G, Albanese Z, Cuccurullo S, Montegrosso S, Crispino M, Borella P, Zarrilli R. Clinical and environmental distribution of *Legionella pneumophila* in a university hospital in Italy: efficacy of ultraviolet disinfection. *J Hosp Infect* 2006; 62: 494-501.
218. Ribeiro CD, Burge SH, Palmer SR, Tobin JO, Watkins ID. *Legionella pneumophila* in a hospital water system following a nosocomial outbreak: prevalence, monoclonal antibody subgrouping and effect of control measures. *Epidemiol Infect* 1987; 98: 253-62.
219. Kuchta JM, States SJ, McGlaughlin JE, Overmeyer JH, Wadowsky RM, McNamara AM, Wolford RS, Yee RB. Enhanced chlorine resistance of tap water-adapted *Legionella pneumophila* as compared with agar medium-passaged strains. *Appl Environ Microbiol* 1985; 50: 21-6.
220. Mietzner SM, hangard A, Stout J, Rohr U, Pedro-Botet ML, Samore MH, Yu VL. Reduced susceptibility of *Legionella pneumophila* to the antimicrobial effects of cooper and silver ions. 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Washington DC: American Society for Microbiology; 2005.

221. Hwang MG, Katayama H, Ohgaki S. Effect of intracellular resuscitation of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba polyphaga* cells on the antimicrobial properties of silver and copper. *Environ Sci Technol* 2006; 40: 7434-9.
222. Kilvington S, Price J. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol* 1990; 68: 519-25.
223. DECRET 152/2002, de 28 de maig, pel qual s'estableixen les condicions higienicosanitàries per a la prevenció i el control de la legionel·losi. *Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya* 2002; 3652: 10316-22.

ANEXO I : COMPENDIO DE PUBLICACIONES

- Sabria M, **Garcia-Núñez M**, Pedro Botet ML, Sopena N, Gimeno JM, Reynaga E, Morera J, Rey-Joly C. Presence and chromosomal subtyping of Legionella species in potable water systems in 20 hospitals of Catalonia, Spain. Infect Control Hosp Epidemiol 2001; 22: 673-6.
- **Garcia-Nuñez M**, Pedro-Botet ML, Ragull S, Sopena N, Morera J, Rey-Joly C, Sabria M. Cytopathogenicity and molecular subtyping of Legionella pneumophila environmental isolates from 17 hospitals. Epidemiology and Infection. 2009; 137: 188-93.
- **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 Immunology & Medical Microbiology. 2008; 52: 202-6.

PRESENCE AND CHROMOSOMAL SUBTYPING OF *LEGIONELLA* SPECIES IN POTABLE WATER SYSTEMS IN 20 HOSPITALS OF CATALONIA, SPAIN

Miquel Sabrià, MD, PhD; Marian García-Núñez, BSc; Maria L. Pedro-Botet, MD, PhD; Nieves Sopena, MD; Josep M. Gimeno, MD; Esteban Reynaga, MD; Josep Morera, MD, PhD; Celestino Rey-Joly, MD, PhD

ABSTRACT

OBJECTIVE: To investigate the presence and clonal distribution of *Legionella* species in the water supply of 20 hospitals in Catalonia, Spain.

SETTING: 20 hospitals in Catalonia, an area of 32,000 km², located in northeast Spain.

METHODS: Environmental cultures of 186 points of potable water supply and 10 cooling towers were performed for the presence of *Legionella* species. Following filtration and acid treatment, the samples were seeded in selective MWY (modified Wadowsky Yee)-buffered charcoal yeast extract- α agar. All isolates obtained were characterized microbiologically and genotyped by SfiI pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

RESULTS: 73 of 196 water samples, representing 17 of the 20 hospitals included in the study, were positive for *Legionella*

pneumophila (serogroups 1, 2-14, or both). The degree of contamination ranged from 200 to 74,250 colony-forming units/L. Twenty-five chromosomal DNA subtypes were detected by PFGE. A single DNA subtype was identified in 10 hospitals, 2 DNA subtypes were observed in 6 hospitals, and 1 hospital exhibited 3 different DNA subtypes. Each hospital had its own *Legionella* DNA subtype, which was not shared with any other hospitals.

CONCLUSIONS: *Legionella* was present in the water of most of the hospitals studied; each such hospital had a unique, dominant chromosomal DNA subtype. The verification of several genomic DNA restriction profiles in such a small geographic area demonstrates the great genetic diversity of *Legionella* in the aquatic environment (*Infect Control Hosp Epidemiol* 2001;22:673-676).

Legionella pneumophila was first identified as the causative agent of legionnaires' disease in 1977.¹ Since then, this bacterium has been associated with both community and nosocomial pneumonia (NP).²⁻⁴ Natural water and potable water systems have been identified as reservoirs of *Legionella*. Moreover, the presence of *Legionella* in hospital water systems has been linked to the identification of nosocomial cases of legionellosis.⁵⁻⁸ Nosocomial legionellosis is underestimated in some hospitals because potable water systems are not systematically tested for the presence or absence of *Legionella* and because NP is not always etiologically identified.

Demonstration of water-system contamination is the first step in identifying nosocomial *Legionella* infection in a hospital. Different methods for the isolation of *Legionella* from hospital water systems have been reported.⁹⁻¹¹ Furthermore, typing of *L pneumophila* is of crucial importance for epidemiological purposes to delineate the source of outbreaks of legionellosis. Molecular typing methods, such as monoclonal antibody typing, electrophoretic alloenzyme typing, plasmid analysis, restriction endonuclease

analysis of chromosomal DNA, and typing based on the polymerase chain reaction technique, have been used to fingerprint *Legionella* strains. The chromosomal DNA subtype obtained by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) has proven to be a particularly powerful tool for typing *L pneumophila* strains^{6-8,12-19} and other *Legionella* species.^{20,21}

We herein present bacteriological data and molecular typing of potable water and cooling systems from 20 hospitals in the area of Catalonia, Spain.

METHODS

Twenty hospitals in Catalonia, an autonomous region of 32,000 km², located in the northeast of Spain, were studied. Five hospitals were located in the city of Barcelona. The size of the hospitals ranged from 200 to 2,000 beds. Of the 20 hospitals, 19 treated acute patients; 1 was a mental hospital.

Sampling Procedure

From 1994 to 1996, 196 water samples were taken from the 20 hospitals. Of these, 169 samples were from

From the Section of Infectious Diseases (Drs. Sabrià, Pedro-Botet, Sopena, Gimeno, and Reynaga; Ms. García-Núñez), Service of Pneumology (Dr. Morera), and Service of Internal Medicine (Dr. Rey-Joly), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain.

Support was provided by grant 95/0555 from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias. The authors thank the authorities and staff of the 20 hospitals included in this study for their cooperation. This work was presented in part at the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, September 26-29, 1999, San Francisco, California.

Address reprint requests to Dr. Miquel Sabrià, Unitat de Malalties Infeccioses, Hospital Germans Trias i Pujol, Ctra de Canyet s/n. 08916 Badalona, Barcelona, Spain.

00-OA-252. Sabrià M, García-Núñez M, Pedro-Botet ML, Sopena N, Gimeno JM, Reynaga E, Morera J, Rey-Joly C. Presence and chromosomal subtyping of *Legionella* species in potable water systems in 20 hospitals of Catalonia, Spain. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001;22:673-676.

TABLE 1
LEGIONELLA ISOLATION RATES, BY SOURCE

Source	No. of Sampling Sites	
	Tested	Positive (%)
Returns	19	11 (58)
Hot-water tanks	24	9 (38)
Showers	63	24 (38)
Taps	63	26 (41)
Cold water	17	0 (0)
Cooling towers	5	3 (60)
Cooling water circuit	5	0 (0)
Total	196	73 (37)

potable hot-water systems (63 showers, 63 taps, 19 returns, and 24 hot-water tanks), 17 were from cold water, and 10 were from the cooling system (5 from the cooling water circuit and 5 from the cooling towers; Table 1). A sample of 5 L was obtained from each of the 43 central points (return and hot-water tanks) and from the 10 points of the cooling water system. A sterile Dacron swab was inserted into the opening of the faucet of each of the 126 peripheral points and rotated four times while moving the swab upward into the opening; then, the swab was introduced into a sterile vessel containing 2 L of hot water.

Concentration of water samples was done by filtration on filters type HA (pore size, 0.2 µm; Millipore, Milan, Italy). The filter and 50 mL of the filtrate were placed in a sterile container and shaken for 15 minutes at 200 rpm; then, 0.1 mL was inoculated on a selective MWY (modified Wadowsky Yee)-buffered charcoal yeast extract (BCYE)-α plate (selective MWY *Legionella* [Oxoid, Wesel, Germany] containing glycine, polymyxin B, anisomycin, vancomycin, bromothymol blue, and bromocresol purple) per duplicate and 1 mL was taken for acid decontamination, which was performed by mixing 1 mL of the concentrated sample with 1 mL of acid buffer (0.2 M HCl-KCl [pH 2.2]) and shaking vigorously. After 3 minutes, 1 mL of neutralizing solution (0.01 M KOH) was added. Finally, 0.1 mL was inoculated per duplicate on selective MWY-BCYE-α plates.

Bacteriological Growth Media

Selective BCYE-α plates were prepared from BCYE agar base (Becton-Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD), 0.04% L-cysteine (E. Merk, Darmstadt, Germany), and *Legionella* MWY selective supplement (Oxoid), which contains antibiotics polymyxin B, anisomycin, and vancomycin. Medium was prepared according to the instructions provided by the suppliers. Inoculated plates were incubated for 14 days in candle jars at 37°C.

Identification of *L. pneumophila*

From each positive sampling point, a maximum of four colonies were inoculated on BCYE-α plates. Isolates of *Legionella* were identified by demonstrating growth on BCYE-α but not on sheep-blood agar plates (BioMérieux,

Paris, France) and by Gram's stain. *L. pneumophila* was determined by the Monofluo *Legionella pneumophila* DFA test kit (Genetic Systems Corp, Redmond, WA). Then, *L. pneumophila* strains were classified into two groups (serotype 1 or serotypes 2-14) according to the reaction with the immunoagglutination serotyping by the MicroScreen *Legionella* Latex Kit (Microkit Iberica, Madrid, Spain).

Preparation of PFGE Plugs

PFGE plugs were prepared according to a modified version of the methods of Smith and Cantor²² using cells that had been grown for 72 hours at 37°C on BCYE-α agar plates. The bacterial cells were harvested and washed twice and then were resuspended in Pett IV buffer (Tris 10 mM [pH 7.5], 1 M NaCl). A portion of this bacterial suspension was mixed with 2% Incert-agarose (FMC Bioproducts, Rockland, MD) in EC buffer (6 mM Tris [pH 7.5], 1 M NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% Brij, 0.2% Deoxycholate, 0.5% Sarkosil), and the mixture was poured into acrylic casting wells (Bio-Rad Laboratories, Ivry sur Aseine, France). After the agarose jelled, the blocks were immersed in 2.6 mL of ECLz lysis solution (2 mL EC buffer, 3 mg lysozyme/mL [Sigma-Aldrich, St Louis, MO], 50 mg RNase A/mL) and incubated at 37°C overnight. Afterward, the blocks were placed in 3 mL of ESP buffer (0.4 M EDTA, 1% Sarkosil, 1 mg Proteinase K/mL [Sigma-Aldrich]) and incubated at 50°C overnight.

PFGE Plug Digestion and Electrophoresis

DNAs were cleaved with *Sfi*I (New England Biolabs, Beverly, MA) following the manufacturer's instructions. The fragments were electrophoretically separated by PFGE with a contour-clamped homogeneous-field apparatus (CHEF DRII system; Bio-Rad) in 1% Chromosomal Grade Agarose (Bio-Rad) and a 0.5×Tris-Borate-EDTA (pH 8.3) running buffer (Sigma-Aldrich). The initial pulse time of 5 seconds was increased linearly to a final switch time of 35 seconds over 24 hours at 5 V/cm at 14°C. Bacteriophage lambda concatemers (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA) were included as a molecular DNA size marker. Genomic fragments were stained with ethidium bromide, destained in water, and photographed under UV transillumination.

RESULTS

Positive Samples

Legionella was isolated from 73 (37.2%) of 196 sites analyzed (Table 1), corresponding to 17 of 20 hospitals. Colony counts ranged from 200 colony-forming units (CFUs)/L to 74,250 CFUs/L. Eleven of 17 hospitals (74%) had more than 30% of peripheral points colonized by *Legionella* species.

Microbiological Typing

L. pneumophila was the species detected in all of the positive isolates. *L. pneumophila* serogroup 1 was present in 8 hospitals, and *L. pneumophila* serogroups 2 through 14 were present in 11 hospitals. Both serogroups coexisted in 2 hospitals (Table 2).

Molecular Typing

Twenty-five restriction chromosomal DNA subtypes were detected by PFGE analysis of *Sfi*I-digested genomic DNA. Isolates were considered identical if they had exactly the same electrophoretic pattern. All isolates yielded an average of 8 to 12 bands between 50 and 2,000 kb. A single chromosomal DNA subtype was observed in 10 hospitals. Six hospitals exhibited two different PFGE types (corresponding to *L pneumophila* serogroup 1 and serogroups 2-14); both DNA subtypes were isolated from the hot-water system in 4 hospitals and from the hot-water system and cooling tower, respectively, in 2 hospitals. Three different DNA subtypes were observed in 1 hospital. Each hospital had its own unique chromosomal DNA subtypes of *Legionella*, which were not shared with other hospitals (Table 2).

DISCUSSION

Legionella is present in aquatic habitats and frequently is found in potable-water supplies or cooling towers.^{12,23-25} Water systems in hospitals are often contaminated by *Legionella*. Colonization of hospital water systems with *L pneumophila* has been linked to acquisition of nosocomial legionnaires' disease over time.^{8,26,27} On the other hand, outbreaks of nosocomial legionellosis have been associated with isolation of this microorganism in water samples.²⁸ In contrast, if environmental cultures are negative for *Legionella*, the occurrence of nosocomial cases is rare. Our study shows that 17 (85%) of 20 tested hospitals were contaminated with *Legionella*. Other studies from the United States, Canada, and the United Kingdom, including environmental surveys, found 12% to 70% of hospitals to be colonized with *Legionella*.²⁹⁻³² High densities of *Legionella* were found in the hot-water samples, in the heating tanks, and in the cooling towers (which are commonly known to be reservoirs of *Legionella* in a hospital setting). However, *Legionella* was not isolated from the cold water. The concentration of *Legionella* ranged from 200 to 74,250 CFUs/L, a range similar to that observed by Visca⁸ and Lück.²⁰

Molecular study of the environmental isolates of *Legionella* demonstrated a great genetic diversity of PFGE chromosomal DNA subtypes. Chang et al⁵ demonstrated genetic diversity by PFGE among isolates of *L pneumophila* serogroup 5 from different geographic areas. Since these bacteria are widespread in water environments and there is such a great diversity in *Legionella* species, it is very common to isolate more than one *Legionella* strain in environmental sources tested during surveillance of legionellosis. It is reasonable to assume that different strains of *Legionella* representative of different clones could co-inhabit the distribution network of potable water in the same building.^{7,33} Thus, the results of our study are enlightening. Firstly, nearly 60% of the hospitals exhibited a single chromosomal DNA subtype in their hot-water plumbing system. Despite the absence of clinical cases in all but two hospitals, the predominance of a single clone suggests greater aggressiveness, at least in the environment, thus displacing and eliminating other possible strains that initially may have coexisted with the present strain. We are

TABLE 2

LEGIONELLA PNEUMOPHILA SEROGROUP AND PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS TYPE BY SAMPLING SITE

Hospital	Total Sites	Positive Sites	PFGE Pattern	Serogroup*
1	15	2 (HWT, tap)	A:2	2-14:1; ND:1
2	17	5 (4 shower, 1 tap)	B:1; ND:4	2-14:1; ND:4
3	15			
4	19			
5	18			
6	5	5 (2 return, 2 shower, 1 tap)	C:5	1:5
7	7	4 (1 HWT, 1 return, 2 tap)	D:4	2-14:4; ND:1
8	10	2 (HWT, shower)	E:2	1:2
9	10	8 (2 HWT, 1 return, 3 shower, 2 tap)	F:7; ND:1	2-14:7; ND:1
10	8	5 (1 HWT, 2 shower, 2 tap)	G:4; H:1	1:5
11	9	2 (Return, tap)	I:1; J:1	1:1; 2-14:1
12	7	7 (1 HWT, 1 return, 2 shower, 2 tap, 1 CT)	K:2; L:4, M:1	1:7
13	9	1 (Tap)	N:1	2-14:1
14	6	6 (3 shower, 3 tap)	O:6	2-14:6
15	6	3 (Return, tap, shower)	P:3	2-14:3
16	7	7 (1 HWT, 1 return, 2 shower, 2 tap, 1 CT)	Q:6; R:1	2-14:6; ND:1
17	7	5 (1 HWT, 1 return, 1 shower, 2 tap)	S:5	1:5
18	6	5 (1 return, 2 shower, 2 tap)	T:4; U:1	2-14:5
19	7	3 (1 return, 2 tap)	V:2; W:1	1:3
20	8	3 (shower, tap, CT)	X:2; Y:1	2-14:2; 1:1
Total	196	73	25	

Abbreviations: CT, cooling tower; HWT, hot-water tank; ND, not determined; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis.

* Categorized as serogroup 1 or serogroups 2-14.

currently performing in vitro studies on the virulence of these strains and are alerting the hospitals implicated in this study to investigate for *Legionella* in all cases of NP to elucidate the significance of these findings.

The second interesting aspect is the verification that each hospital has its own *Legionella* clone that is not shared with any of the other hospitals studied. The finding of this large variety of chromosomal DNA subtypes of *Legionella* is even more striking taking into account the small geographic area studied. This contrasts with a previous study from Paris⁶ in which 16 (25%) of 64 environmental isolates from 43 sites showed the same chromosomal DNA subtype. It may be clinically and epidemiologically interesting to know a priori the chromosomal DNA subtype of the *Legionella* in each hospital. The search for different foci within the distribution network of potable-hot-water or cooling-tower systems should be mandatory if a clinical nosocomial isolate shows a chromosomal DNA subtype different from previously observed environmental isolates. We cannot, as yet, verify whether the chromosomal DNA subtypes are stable over time except in our hospital, in which a single strain clearly linked to nosocomial cases of

Legionella infection has been observed for more than 10 years. Marrie et al¹⁶ showed that the strains of *L pneumophila* recovered from the potable water of two hospitals in Halifax, Nova Scotia, Canada, were remarkably stable in terms of genomic DNA over a period of several years.

While guidelines for cooling tower decontamination are well established in some countries, there are no uniform criteria for hospital hot-water plumbing systems.²⁸ Authorities advise detection of the first case of *Legionella* infection before initiation of an environmental search. Nosocomial legionellosis often is underdiagnosed due to the difficulty in detecting every NP and identifying it etiologically in a large hospital area. Moreover, many hospitals do not perform *Legionella* tests systematically. In our study, few hospitals systematically investigated *Legionella* in NP, and only two routinely used the urinary antigen test for the diagnosis of *Legionella* infection.

Environmental studies of *Legionella* should be mandatory in all hospitals, given the high prevalence of environmental *Legionella*, the important degree of hot-water contamination in some cases, and the susceptibility to infection of the population within. Moreover, this microorganism should be considered in any case of NP if *Legionella* has been previously demonstrated in the hospital water systems. Adequate strategies for detecting NP and diagnostic procedures for *Legionella* should be implemented.^{12,34} Previous knowledge of the chromosomal DNA subtype(s) in the water would be of great aid for the correct identification of nosocomial cases, permitting more extensive epidemiological studies. These statements are important because legionellosis is a serious illness and a potentially eradicable disease if appropriate environmental treatment is undertaken.

REFERENCES

- McDade JE, Shepherd CC, Fraser DW, Tsai TR, Resudus MA, Dowdle WR. Laboratory investigation team: legionnaires' disease. Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* 1977;297:1197-1203.
- Pedro-Botet ML, Sabria-Leal M, Haro M, Rubio C, Giménez G, Sopena N, et al. Nosocomial and community-acquired *Legionella* pneumonia: clinical comparative analysis. *Eur Respir J* 1995;8:1929-1933.
- Pedro-Botet ML, Sabria M, Sopena N, Manterola JM, Morera J, Blavia R, et al. Role of immunosuppression in the evolution of legionnaires' disease. *Clin Infect Dis* 1998;26:14-19.
- Sopena N, Sabria M, Pedro-Botet ML, Padilla E, Domínguez J, Morera J, et al. Comparative study of the clinical presentation of *Legionella pneumonia* and other community-acquired pneumonias. *Chest* 1998;113:1195-1200.
- Chang FY, Jacobs SL, Colodny SM, Stout JE, Yu VL. Nosocomial legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 5: laboratory and epidemiologic implications. *J Infect Dis* 1996;174:1116-1119.
- 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.
- Lück PC, Wenchel H-M, Helbig JH. Nosocomial pneumonia caused by three genetically different strains of *Legionella pneumophila* and detection of these strains in the hospital water supply. *J Clin Microbiol* 1998;36:1160-1163.
- Visca P, Goldoni P, Lüick PH, Helbig JH, Cattani L, Giltri G, et al. Multiple types of *Legionella pneumophila* serogroup 6 in a hospital heated system associated with sporadic infections. *J Clin Microbiol* 1999;37:2189-2196.
- Boulangier CA, Edelstein PH. Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water filtration and centrifugation. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1805-1809.
- Reinthal FF, Sattler J, Schaffler-Dulling K, Weinmayr B, Marth E. Comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella pneumophila* from tap water in hospitals. *J Clin Microbiol* 1993;31:1213-1216.
- Ta, AC, Stout JE, Yu VL, Wagener MM. Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital water systems and recommendations for standardization of such methods. *J Clin Microbiol* 1995;33:2118-2123.
- Fiore AE, Nuorti JP, Levine OS, Marx A, Weltman AC, Yeager S, et al. Epidemic legionnaires' disease two decades later: old sources, new diagnostic methods. *Clin Infect Dis* 1998;26:426-433.
- Green M, Wald ER, Dashhefskyy B, Barbadora K, Wadowsky RM. Field inversion gel electrophoretic analysis of *Legionella pneumophila* strains associated with nosocomial legionellosis in children. *J Clin Microbiol* 1996;34:175-176.
- Lawrence C, Ronco E, Dubrou S, Leclercq R, Nauciel C, Matsiota-Bernard P. Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the nosocomial environment by arbitrarily primed PCR and pulsed field gel electrophoresis. *J Med Microbiol* 1999;44:327-333.
- Lück PC, Köhler J, Maiwald M, Helbig JH. DNA polymorphisms in strains of *Legionella pneumophila* serogroups 3 and 4 detected by macrorestriction analysis and their use for epidemiological investigation of nosocomial legionellosis. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:2000-2003.
- Marrie TJ, Yler S, Bezanson G, Dendy C, Johnson W. Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1999;37:251-254.
- Pruckler JM, Mermel LA, Benson RF, Giorgio C, Cassiday 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.
- Riffard S, Lo Presti F, Vandenesch F, Forey F, Reyrolle M, Eitenne J. Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol* 1998;36:161-167.
- 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.
- Lück PC, Helbig JH, Hagedorn H, Ehret W. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis to investigate a nosocomial pneumonia caused by *Legionella bozemanii* serogroup 1. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:2759-2761.
- Montanaro-Punzengruber JC, Hicks L, Meyer W, Gilbert GL. Australian isolates of *Legionella longbeache* are not a clonal population. *J Clin Microbiol* 1999;37:3249-3254.
- Smith CL, Cantor CR. Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules. *Methods Enzymol* 1987;155:449-467.
- Bollin GE, Plouffe JF, Para MF, Hackman B. Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by shower heads and hot-water. *Appl Environ Microbiol* 1985;50:1128-1131.
- Castellani Pastoris M, Ciceroni L, Lo Monaco R, Goldoni P, Mentore B, Fiego G, et al. Molecular epidemiology of an outbreak of legionnaires' disease associated with a cooling tower in Genova-Sestri Ponente, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:883-892.
- Marrie TJ, Haldane D, Bezanson G, Peppard R. Each water outlet is a unique ecological niche for *Legionella pneumophila*. *Epidemiol Infect* 1992;108:261-270.
- Ruf B, Schurmann D, Horbach Y, Seidel K, Pohle HD. Nosocomial *Legionella pneumonia*: demonstration of potable water as the source of infection. *Epidemiol Infect* 1998;103:647-654.
- Yu VL. Resolving the controversy on environmental cultures for *Legionella*: a modest proposal. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998;19:893-897.
- Liu WK, Healing DE, Yeomans JT, Elliot TS. Monitoring of hospital water supplies for *Legionella pneumophila*. *J Hosp Infect* 1993;24:1-9.
- Alary M, Joly JR. Factors contributing to the contamination of hospital water distribution systems. *J Infect Dis* 1992;165:565-569.
- Vickers RM, Yu VL, Hanna SS, Muraca P, Diven W, Carmen N, et al. Determinants of *Legionella pneumophila* contamination of water distribution systems: 15-hospital prospective study. *Infect Control* 1987;8:357-363.
- Second Report of the Committee of Inquiry Into the Outbreak of Legionnaire's Disease in Stafford in April 1985. London, England: Her Majesty's Stationery Office (HMSO); 1987.
- Marrie TJ, Johnson W, Tyler S, Bezanson G, Haldane D, Burbridge S, et al. Potable water and nosocomial legionnaires' disease: check water from all rooms in which patient has stayed. *Epidemiol Infect* 1995;114:267-276.
- Bezanson G, Burbridge S, Haldane D, Yoell C, Marrie T. Diverse populations of *Legionella pneumophila* present in the water of geographically clustered institutions served by the same water reservoir. *J Clin Microbiol* 1992;30:570-576.
- Dominguez JA, Matas L, Manterola JM, Blavia R, Sopena N, Belda FJ, et al. Comparison of radioimmunoassay and enzyme immunoassay kits for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. *J Clin Microbiol* 1997;35:1627-1629.

Cytopathogenicity and molecular subtyping of *Legionella pneumophila* environmental isolates from 17 hospitals

M. GARCIA-NUÑEZ^{1,2*}, M. L. PEDRO-BOTET^{1,2}, S. RAGULL¹, N. SOPENA¹,
J. MORERA³, C. REY-JOLY¹ AND M. SABRIA^{1,2}

¹ Infectious Diseases Section, Fundació Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, Badalona, Autonomous University of Barcelona

² CIBER de Enfermedades Respiratorias, Spain

³ Pneumology Department, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Autonomous University of Barcelona

(Accepted 28 March 2008)

SUMMARY

The cytopathogenicity of 22 *Legionella pneumophila* isolates from 17 hospitals was determined by assessing the dose of bacteria necessary to produce 50% cytopathic effect (CPED₅₀) in U937 human-derived macrophages. All isolates were able to infect and grow in macrophage-like cells (range log₁₀ CPED₅₀: 2·67–6·73 c.f.u./ml). Five groups were established and related to the serogroup, the number of PFGE patterns coexisting in the same hospital water distribution system, and the possible reporting of hospital-acquired Legionnaires' disease cases. *L. pneumophila* serogroup 1 isolates had the highest cytopathogenicity ($P=0\cdot003$). Moreover, a trend to more cytopathogenic groups (groups 1–3) in hospitals with more than one PFGE pattern of *L. pneumophila* in the water distribution system (60% vs. 17%) and in hospitals reporting cases of hospital-acquired Legionnaires' disease (36·3% vs. 16·6%) was observed. We conclude that the cytopathogenicity of environmental *L. pneumophila* should be taken into account in evaluating the risk of a contaminated water reservoir in a hospital and hospital acquisition of Legionnaires' disease.

INTRODUCTION

Hospital-acquired Legionnaires' disease (LD) has been reported in many hospitals since the first outbreak in 1976 [1]. Although cooling towers were linked to many of the cases of LD in the years after its discovery, potable water has been the environmental source for almost all reported hospital outbreaks [2–4]. *Legionella* spp. are common commensals of large building water-supply systems. In a previous study we

demonstrated that *L. pneumophila* was present in 17 out of 20 hospital water systems [5] and prospective surveillance showed that cases of hospital-acquired LD appeared in 11 of these hospitals [6]. The remainder did not report any cases of LD, although appropriate techniques were available for the diagnosis of *Legionella* spp. and most (70%) reported >30% positive peripheral sampling points.

There are some clinical data indicating that the virulence of *Legionella* spp. may vary, although it unclear whether this is a consequence of differences in bacterial virulence or in host immunity. Examples are: the survival of patients with LD despite not receiving adequate antibiotic treatment [7], the variability in the mortality observed in different

* Author for correspondence: M. Garcia-Nuñez, M.Sc., Infectious Diseases Unit, Fundació Institut Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, C/Can Ruti. Camí escoles s/n 08916 Badalona, Barcelona, Spain.
(Email: mgarcia.igtp.germanstrias@gencat.net)

community outbreaks [8, 9], or the fact that most cases are caused by *L. pneumophila* serogroup (sg) 1 [10]. In experimental studies, isolates from amoebas exhibit a variety of phenotypes that appear to increase the incidence and complications of LD in humans [11–13]. Furthermore, some authors have demonstrated that *Legionella* strains causing pulmonary disease express more virulence traits than those that do not cause human disease [14]. Virulence traits show differences between species [14, 15] and strains of *L. pneumophila* [16–19].

As the demographic characteristics of the patients in the 17 hospitals reported earlier [5, 6] were similar, we questioned why hospitals with *L. pneumophila* in their water distribution systems did not experience cases of hospital-acquired LD and hypothesized that the virulence of the *L. pneumophila* strains may have influenced the appearance of clinical cases. We therefore assessed the cytopathogenicity of *L. pneumophila* environmental strains isolated from each hospital and determined their relationship with sg1 and the number of different strain genotypes coexisting in the same water distribution system to gain insight into the contribution of cytopathogenicity and potential to cause disease in each hospital.

MATERIAL AND METHODS

Bacteria and culture

A total of 22 environmental *L. pneumophila* strains from 17 hospital water-supply systems previously characterized [5] by serogroup, and chromosomal DNA subtype by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) were included in the present study (Table 1). The bacteria had a ≤ 2 passage history and were stored in brain heart infusion broth (Oxoid, Wesel, Germany) supplemented with 10% glycerol at -80°C . All strains were susceptible to 100 mM NaCl [20], a marker of laboratory attenuation (data not shown).

For cytopathogenicity and intracellular growth assays, strains were cultured on BCYE- α agar for 72 h and resuspended in antibiotic-free tissue culture medium containing 5% fetal calf serum (FCS).

Cytopathogenicity assay

The human monocyte cell line U937 was cultured in RPMI 1640, 2 mM L-glutamine and 10% FCS. Prior to infection, the cells were differentiated for 72 h with

Table 1. DNA patterns, *Legionella pneumophila* serogroup, cytopathogenicity and number of cases of hospital-acquired Legionnaires' disease reported in each hospital during the surveillance period

Strain/ DNA pattern	Serogroup	log CPED ₅₀ (mean \pm s.d.)	Cytopatho- genic group	Hospital
Lp01	Non-sg1	5.60 \pm 0.20	4	H 1
Lp02	Non-sg1	4.48 \pm 0.28	3	H 2*
Lp03	1	6.64 \pm 0.54	5	H 6*
Lp04	Non-sg1	6.73 \pm 0.11	5	H 7*
Lp05	1	6.55 \pm 0.24	5	H 8
Lp06	Non-sg1	6.3 \pm 0.19	4	H 9
Lp07	1	5.57 \pm 0.13	4	H 10*
Lp08	1	3.45 \pm 0.15	2	H 10 *
Lp09	1	4.52 \pm 0.18	3	H 11*
Lp10	Non-sg1	6.08 \pm 0.19	4	H 11*
Lp11	1	2.67 \pm 0.32	1	H 12*
Lp12	1	4.73 \pm 0.16	3	H 12*
Lp14	Non-sg1	5.67 \pm 0.11	4	H 13*
Lp15	Non-sg1	5.50 \pm 0.10	4	H 14*
Lp16	Non-sg1	6.03 \pm 0.14	4	H 15
Lp17	Non-sg1	5.84 \pm 0.14	4	H 16*
Lp19	1	4.10 \pm 0.07	3	H 17
Lp20	Non-sg1	6.63 \pm 0.59	5	H 18
Lp21	Non-sg1	5.59 \pm 0.2	4	H 18
Lp22	1	5.40 \pm 0.30	4	H 19*
Lp23	1	5.94 \pm 0.13	4	H 19*
Lp24	Non-sg1	5.90 \pm 0.16	4	H 20*

CPED₅₀. The CPED₅₀ was defined as the minimum number of bacteria necessary to produce a cytopathic effect in 50% of the U937 cell infected monolayers after 72 h incubation; Non-sg1, *L. pneumophila* non-serogroup 1.

* Hospital that reported hospital-acquired Legionnaires' disease (1996–2001).

10^{-8} M phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) as described previously [21]. The relative cytopathogenicity of *L. pneumophila* strains was determined by the 50% cytopathic effect (CPE₅₀). CPED₅₀ was defined as the minimum number of bacteria necessary to produce a cytopathic effect in 50% of the U937 cell infected monolayers after 72 h incubation. Briefly, eight replicate monolayers containing 2×10^5 macrophage-like cells in 96-well microtitre plates were infected with serial dilutions of each strain (range of inocula, 10^1 – 10^9 bacteria per monolayer) for 90 min. The monolayers were washed and treated with 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of gentamicin and then incubated with RPMI containing 10% FCS at 37°C for 72 h. The monolayers were stained with tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma)

and the viability of the cells was determined measuring the optical density (OD) and expressed as percentage of cell death compared with uninfected cells using the formula

$$1 - \frac{\text{mean OD of infected cells}}{\text{mean OD uninfected cells}} \times 100.$$

The number of bacteria that reduced the OD by 50% compared with the OD of uninfected cells was defined as the CPED₅₀ value. Each experiment was performed in triplicate.

Intracellular growth

U937 macrophage-like cells plated at a density of 1×10^6 cells per well in 24 tissue culture dishes were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 0.2. Thereafter, extracellular bacteria were removed by washing the monolayers with RPMI followed by incubation with gentamicin in RPMI for 30 min. Intracellular growth was measured in duplicate at 0, 24 and 48 h and expressed as c.f.u./monolayer. Variations between experiments were corrected with the MOI value (dividing the result c.f.u./well by MOI). The relative increase in c.f.u. was calculated by subtracting the c.f.u. at each time-point from the first time-point.

Statistical analysis

Groups of cytopathogenicity were determined with the *K* means cluster analysis using SPSS software program version 12.0 (SPSS Inc., Chicago IL, USA). The Mann-Whitney *U* and Kruskal-Wallis tests were used for statistical analysis of quantitative variables and Fisher's exact test was used for qualitative variables. *P* values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

All strains were able to infect and grow in macrophage-like cells and produce a significant cytopathic effect. Values ranged from log CPED₅₀ 2.67 c.f.u./ml to log CPED₅₀ 6.73 c.f.u./ml and five groups were determined, ranging from 1 (most) to 5 (least) cytopathogenic strains (Fig. 1). Cytopathogenic groups (1 and 2) had a higher intracellular infection efficiency ($T=0$ h, $P=0.031$). At 24 h all isolates showed increased intracellular growth to 2.05 ± 0.74 log units (range 1.04–3.07) and at 48 h to 3.29 ± 0.74 log units (range 1.75–4.93) (Fig. 2).

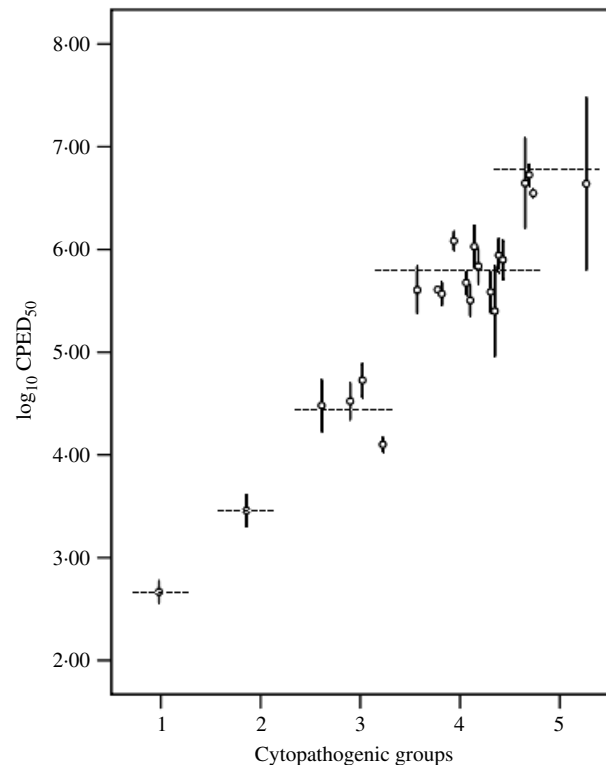


Fig. 1. Cytopathogenic groups of the different environmental isolates. Data of each isolate are represented by a point and error bars represents standard deviations. Mean data of each cytopathogenic group is represented by a horizontal bar. Groups were established with the *K* means cluster analysis (SPSS). The CPED₅₀ groups were statistically different ($P < 0.001$, Kruskal-Wallis test).

L. pneumophila sg1 strains had a significantly higher mean cytopathogenicity (log CPED₅₀ 4.92 ± 1.28 vs. 5.75 ± 0.68 , $P=0.003$) and were distributed in the top three groups more frequently than other strains [50% (5/10) vs. 8.3% (1/12), $P=0.06$] (Table 1). Strains from hospital water systems harbouring more than one DNA type (PFGE) more often fell into the top three cytopathogenic groups than strains from systems that yielded a single genotype (3/5 vs. 2/12 hospitals respectively, $P > 0.05$). Similarly, cytopathogenicity was greatest among strains from hospitals reporting hospital-acquired LD cases than those without clinical cases (4/11 vs. 1/6 hospitals respectively, $P > 0.05$).

DISCUSSION

It is not clear why some hospitals with environmental colonization by *L. pneumophila* have nosocomial LD and others do not. This is often attributed to

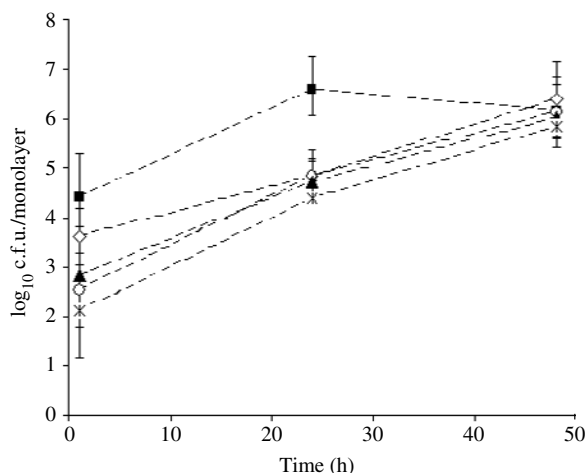


Fig. 2. Intracellular growth of cytopathogenic groups of *L. pneumophila* isolates in co-cultures with U937 macrophage-like cell monolayers. ◇, Cytopathogenic group 1; ■, group 2; ○, group 3; ▲, group 4; ×, group 5. The values are the mean of groups and error bars represents standard deviations.

differences in engineering design and maintenance, bacterial concentration at peripheral points (taps and shower faucets) and host susceptibility. The virulence of the bacteria is also thought to play a major role.

We found that all environmental isolates of *L. pneumophila* tested were able to infect and grow in U937 macrophage-like cells resulting in a significant cytopathic effect. Almost three-quarters of the strains fell into weakly cytopathogenic groups and were invariably non-sg1; half of the 10 strains of sg1 were grouped as strongly cytopathogenic. Moreover, strains from mixed *Legionella* populations in water systems were more often cytopathogenic than those recovered in single strain culture and importantly, this association held for environmental strains from hospitals with cases of LD compared with those free of cases.

It is well established that *Legionella* spp. differ in virulence determined by cytopathogenicity and other assays and can be grouped accordingly [14, 19, 22–25]. However, there are few studies evaluating virulence traits of environmental isolates of *L. pneumophila* [10, 18, 24, 26]. Most cases of disease are caused by sg1 strains and, consequently, it has been suggested that this serogroup is more virulent than other serogroups of *L. pneumophila*, but this has not been demonstrated experimentally [14, 26, 27].

The higher cytopathogenicity of *L. pneumophila* from mixed strain populations in water systems has not been previously described but our data are

consistent with the finding of the coexistence of different *L. pneumophila* genotypes in cooling towers where the limitation of nutrients in the non-potable water induces an overgrowth of the most virulent strain and displacement of other strains leading to an outbreak of disease [28]. Indeed, it has been demonstrated by *in vitro* studies that depleted nutrients enhance the expression of virulence traits [20]. The coexistence of more than one strain population in the hospital water distribution system may provide the microbial complexity to facilitate biofilm formation and intracellular growth in protozoa. *L. pneumophila* growing within amoeba changes phenotypically and exhibits increased invasion ability [29] compared with cells grown in conventional media. The similarities in the model of intracellular infection between protozoa and alveolar macrophages [30] suggest that the virulence of *L. pneumophila* for alveolar macrophages is a consequence of its evolution as a parasite of amoeba [31]. Thus, considering that protozoa are important determinants in the ecology of *L. pneumophila* in aquatic environments, studies to determine the different populations of amoeba in water supplies of hospitals and the ability of different strains to grow in them and alveolar macrophages would be informative of the ecology and pathogenicity of the species.

Hospitals harbouring cytopathogenic strains of *L. pneumophila* strains in water supplies tended to report hospital-acquired LD cases more frequently. Unfortunately, owing to a lack of active surveillance clinical isolates were not available for comparison with the environmental isolates. However, several authors have noted the importance of strain virulence in the appearance of hospital-acquired LD since in hospitals colonized by more than one strain genotype, the clinical strain was often identical to the most virulent environmental strain [16, 17].

Some authors have pointed out that the presence of *Legionella* spp. in a hospital water distribution system, the use of specific techniques for the diagnosis of *Legionella* pneumonia and in-patient host factors such as immunosuppression, are the most important prognostic factors for the appearance of hospital-acquired cases [1]. Nevertheless, since the complete eradication of *Legionella* spp. from a potable water distribution system is impossible without highly cost-effective disinfection methods, knowledge of the cytopathogenicity of an environmental *Legionella* spp. isolate may be useful in evaluating the risk of the emergence of hospital-acquired LD from a contaminated water source.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Grant FIS 98/1114, CB06/06/1089 and by Associació per la Investigació Biomèdica en Malalties Infeccioses, Spain. EI CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES) is an initiative of ISCIII.

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. **Sabria M, Yu VL.** Hospital-acquired legionellosis: solutions for a presentable infection. *Lancet Infectious Diseases* 2002; **2**: 368–373.
2. **Best M, et al.** *Legionellaceae* in the hospital water supply-epidemiological link with disease and evaluation of a method of control of nosocomial Legionnaires' disease and Pittsburgh pneumonia. *Lancet* 1983; **2**: 307–310.
3. **Johnson JT, et al.** Nosocomial legionellosis uncovered in surgical patients with head and neck cancer: implications for epidemiologic reservoir and mode of transmission. *Lancet* 1985; **2**: 298–300.
4. **Stout J, et al.** Ubiquitousness of *Legionella pneumophila* in the water supply of a hospital with endemic Legionnaires' disease. *New England Journal of Medicine* 1982; **36**: 466–468.
5. **Sabria M, et al.** Presence and chromosomal subtyping of *Legionella* species in potable water systems in 20 hospitals of Catalonia, Spain. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2001; **22**: 673–676.
6. **Sabria M, et al.** Environmental cultures and hospital-acquired Legionnaires' disease. A five-year prospective study in twenty hospitals in Catalonia, Spain. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2004; **25**: 1072–1076.
7. **Macfarlane JT, et al.** Erythromycin compared with a combination of ampicillin and amoxycillin as initial therapy for adults with pneumonia including Legionnaires' disease. *Journal of Infection* 1983; **7**: 111–117.
8. **Lettinga KD, et al.** Legionnaires' disease at a Dutch flower show: prognostic factors and impact of therapy. *Emerging Infectious Diseases* 2002; **8**: 1448–1454.
9. **Garcia-Fulgueiras A, et al.** Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 2003; **9**: 915–921.
10. **Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF.** Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Archives of Internal Medicine* 1994; **154**: 2417–2422.
11. **Barker J, et al.** Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Applied Environmental Microbiology* 1992; **58**: 2420–2425.
12. **Cirillo JD, et al.** Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* 1999; **67**: 4427–4434.
13. **Rowbotham TJ.** Current views on the relationships between amoebae, *Legionellae* and man. *Israel Journal of Medical Sciences* 1986; **22**: 678–689.
14. **Alli OA, et al.** Comparative assessment of virulence traits in *Legionella* spp. *Microbiology* 2003; **149**: 631–641.
15. **Joshi A, Swanson MS.** Comparative analysis of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* virulence traits. *Infection and Immunity* 1999; **67**: 4134–4142.
16. **Bezanson G, et al.** Virulence of patient and water isolates of *Legionella pneumophila* in guinea pigs and mouse L929 cells varies with bacterial genotype. *Canadian Journal of Microbiology* 1994; **40**: 426–431.
17. **Bollin GE, et al.** Difference in virulence of environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* 1985; **21**: 674–677.
18. **Molmeret M, et al.** Different growth rates in amoeba of genotypically related environmental and clinical *Legionella pneumophila* strains isolated from a thermal spa. *Epidemiology and Infection* 2001; **126**: 231–239.
19. **Samrakandi MM, et al.** Genetic and phenotypic differences between *Legionella pneumophila* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; **40**: 1352–1362.
20. **Byrne B, Swanson MS.** Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infection and Immunity* 1998; **66**: 3029–3034.
21. **Pearlman E, et al.** Growth of *Legionella pneumophila* in a human macrophage-like (U937) cell line. *Microbial Pathogenesis* 1988; **5**: 87–95.
22. **Fields BS, et al.** Comparison of guinea pig and protozoan models for determining virulence of *Legionella* species. *Infection and Immunity* 1986; **53**: 553–559.
23. **Izu K, et al.** Grouping of 20 reference strains of *Legionella* species by the growth ability within mouse and guinea pig macrophages. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1999; **26**: 61–68.
24. **Neumeister B, et al.** Multiplication of different *Legionella* species in Mon Mac 6 cells and *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; **63**: 1219–1224.
25. **O'Connell WA, Dhand L, Cianciotto NP.** Infection of Macrophage-Like cells by *Legionella* species that have not been associated with disease. *Infection and Immunity* 1996; **64**: 4381–4384.
26. **Luck PC, et al.** Analysis of *Legionella pneumophila* strains associated with nosocomial pneumonia in a neonatal intensive care unit. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 1994; **13**: 565–571.
27. **Neumeister B.** Intracellular multiplication of *Legionella* species and the influence of amoebae on their intracellular growth in human monocytes: mono mac 6 cells and *Acanthamoeba castellanii* as suitable in vitro models. *Methods in Molecular Biology* 2004; **268**: 141–151.

6 M. Garcia-Nuñez and others

28. **Ragull S, et al.** Diversity of *Legionella* subtypes in cooling towers. Why only one environmental strain causes de clinical cases. In: *Program and Abstracts of the 6th International Conference on Legionella*. Chicago: American Society for Microbiology; 2005, pp. 64
29. **Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS.** Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infection and Immunity* 1994; **62**: 3254–3261.
30. **Gao LY, Harb O, Abu Kwaik Y.** Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant hosts, mammalian and protozoan cells. *Infection and Immunity* 1997; **65**: 4738–4746.
31. **Swanson MS, Hammer BK.** *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annual Review of Microbiology* 2000; **54**: 567–613.

RESEARCH ARTICLE

Persistence of *Legionella* in hospital water supplies and nosocomial Legionnaires' disease

Marian Garcia-Nuñez¹, Nieves Sopena¹, Sonia Ragull¹, Maria Luisa Pedro-Botet¹, Josep Morera² & Miguel Sabria¹

¹Infectious Diseases Unit, Fundació Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, Autonomous University of Barcelona, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain; and ²Department of Pneumology, Fundació Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, Autonomous University of Barcelona, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain

Correspondence: Miguel Sabria, Infectious Diseases Unit, Fundació Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, C/canyet s/n. 08916 Badalona, Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 497 88 26; fax: +34 93 497 88 43; e-mail: msabria.germanstrias@gencat.net

Received 6 September 2007; revised 26 October 2007; accepted 5 November 2007. First published online 19 December 2007.

DOI:10.1111/j.1574-695X.2007.00362.x

Editor: Kai Man Kam

Keywords

Legionella; hospital-acquired Legionnaires' disease; PFGE typing; persistence.

Introduction

Legionella has frequently been recovered from potable water systems in hospitals. The colonization of hospital water has been linked to cases of hospital-acquired Legionnaires' disease (Sabria *et al.*, 2002). Studies of molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) have been demonstrated to be useful in the investigation of nosocomial *Legionella* infections (Luck *et al.*, 1998; Fry *et al.*, 2000). Likewise, molecular studies of environmental *Legionella* isolates suggest that these bacteria have great molecular subtyping diversity (Chang *et al.*, 1996; Fry *et al.*, 2000; Sabria *et al.*, 2001). Because of this genomic diversity and their wide distribution in aquatic environments, it is very common to isolate more than one clone of *Legionella* species in the water distribution systems of hospitals (Luck *et al.*, 1998; Sabria *et al.*, 2001). In a previous study, it was observed that 85% of the hospitals tested in Catalonia (north-east Spain) were colonized by *Legionella*, and every hospital presented its own PFGE patterns not shared by the other centers (Sabria *et al.*, 2001).

Abstract

The molecular epidemiology of clinical and environmental *Legionella* species isolates was studied in seven hospitals from 1989 to 2006. The number of environmental pulsed field gel electrophoresis (PFGE) patterns ranged from one to nine according to the hospital. Genomic PFGE pattern persistence was observed in 71% of the hospitals, even after 17 years in some hospitals, and the relationship between environmental and clinical isolates was established. The isolates associated with hospital-acquired Legionnaires' disease corresponded to the persistent environmental PFGE patterns of *Legionella pneumophila* in potable water supplies.

Despite the persistence of PFGE patterns of *Legionella* in the water distribution systems of selected hospitals (Chang *et al.*, 1996; Grattard *et al.*, 1996; Marrie *et al.*, 1999; Rangel-Frausto *et al.*, 1999; Fry *et al.*, 2000; Darelid *et al.*, 2004), the relationship between these persistent subtypes and nosocomial Legionellosis has not been widely investigated (Visca *et al.*, 1999; Oberdofer *et al.*, 2007). In this study the genetic variability and stability of PFGE patterns of *Legionella pneumophila* isolates in the water distribution systems from seven hospitals are described. In addition, the relationship between the PFGE patterns exhibited by the environmental and clinical *L. pneumophila* isolates in five hospitals that reported cases of hospital-acquired Legionnaires' disease is presented.

Materials and methods

During an 18-year period (1989–2006) the authors' *Legionella* Laboratory has analyzed many clinical and environmental isolates of *Legionella* for molecular typing. The *Legionella* PFGE data belonging to the isolates in this culture

collection from seven hospitals were reviewed, which comprised 222 environmental (range: 7–92 isolates/hospital) and 28 nosocomial clinical isolates (range: 1–13 isolates/hospital). The isolation period ranged from 6 to 17 years for each hospital. The clinical isolates were derived from five of the seven hospitals, with each isolate corresponding to a single patient.

Genotyping

For chromosomal DNA subtyping (PFGE), genomic DNA was prepared as described previously with some modifications (Sabria *et al.*, 2001). Fragments of DNA were separated in a 1% agarose gel prepared and run in $0.5 \times$ Tris-borate-EDTA buffer (pH 8.3) in a contour-clamped homogeneous field apparatus (CHEF DR II system; Bio-Rad, Ivry sur Seine, France) with a constant voltage of 5 V cm^{-1} and increasing pulse times (5.6–50.6 s) at 14°C for 24 h. The lambda ladder PFG marker (New England Biolabs) was included as a molecular weight marker.

Band pattern analysis was carried out by the unweighted pair group method using arithmetic averages (UPMGA) with the Finger Printing II software (Bio-Rad, Irvin, France). Isolates with a PFGE pattern that differed by ≥ 1

band were considered to belong to different PFGE genotypes and were designated with capital letters.

Results

Environmental genomic variability

All environmental isolates analyzed were *L. pneumophila*, except in one hospital (hospital V) where *Legionella* non-pneumophila was also typed. PFGE showed a high degree of genomic variability among the environmental isolates of *Legionella*. The number of environmental PFGE patterns varied according to the hospital, ranging from one to nine indistinguishable PFGE patterns (Tables 1 and 3). Each hospital produced its own environmental PFGE patterns, and they were not shared with the other centers.

Environmental persistence

The persistence of the different PFGE patterns recovered from the water distribution systems of the seven hospitals is shown in Tables 1 and 3. The environmental positive sampling intervals in each hospital ranged from 6 (hospital VII) to 16 years (hospital I), except in hospital VI where a second sample was not available.

Table 1. Distribution of environmental isolates PFGE patterns

Hospital	Study period	<i>Legionella</i> species	PFGE pattern	Environmental persistence (Years)	Year of isolation (n)*									
					1990	1991	1996	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
I	1990–2006	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	A	16	3	3	3	19	4	2	1	18	10	
		<i>L. pneumophila</i> nonsg.1	B	12	3					2				
		<i>L. pneumophila</i> sg. 1	C	1			5	1						
		<i>L. pneumophila</i> sg. 1	D	4			2	1						
		<i>L. pneumophila</i> sg. 1	E	–				1						
		<i>L. pneumophila</i> nonsg. 1	F	10			1		1			2		
		<i>L. pneumophila</i> sg. 1	G	–						1				
		<i>L. pneumophila</i> non-sg. 1	H	–									6	
II	1991–2005	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	J	14		2						27		
		<i>L. pneumophila</i> sg. 1	K	–								1		
III	1996–2003	<i>L. pneumophila</i> nonsg. 1	L	–	2									
		<i>L. pneumophila</i> sg. 1	M	–							8			
IV	1996–2003	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	N	13	4					2	13	3		
		<i>L. pneumophila</i> sg. 1	O	–	2									
		<i>L. pneumophila</i> nonsg. 1	P	2						3	3	1		
V	1996–2006	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	Q	–						2				
		<i>L. pneumophila</i> nonsg.1	R	10			3		1			4		
		<i>L. pneumophila</i> nonsg.1	S	6					9			9		
		<i>L. nonpneumophila</i>	T	1								10	5	
VI	1996	<i>L. pneumophila</i> nonsg.1	U	–			9							
VII	1996–2002	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	V	–	2									
		<i>L. pneumophila</i> nonsg.1	W	–	2									
		<i>L. pneumophila</i> nonsg.1	X	–							3			

*n, number of isolates that present the PFGE patterns.

Table 2. Distribution of clinical isolates PFGE patterns

Hospital	Study period	<i>Legionella</i> species	PFGE pattern	Year of isolation <i>n</i> *										
				1989	1990	1991	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
I	1989–2002	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	A	3	5	2	2				1			
II	2005	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	J											5
III	2003	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	M									1		
IV	2001–2003	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	N						1			1		
		<i>L. pneumophila</i> nonsg. 1	P								3			
VI	1996–2004	<i>L. pneumophila</i> nonsg. 1	U									3	1	

**n*, number of isolates that presented the PFGE patterns. Each isolate was from a clinical case.

Table 3. Persistence of environmental PFGE patterns and correlation with clinical isolates

Hospital	Study period	Environmental isolates		Clinical isolates No. of PFGE patterns	Correlation of clinical and environmental PFGE patterns (PFGE pattern)
		No. of PFGE patterns	Persistence of PFGE patterns (<i>n</i> *)		
I	1989–2006	9	Yes (5)	1	Yes
II	1991–2005	2	Yes (1)	1	Yes
III	1996–2003	2	No	1	Yes
IV	1996–2003	3	Yes (2)	2	Yes
V	1996–2006	4	Yes (3)	–	NA [‡]
VI	1996–2004	1	NA [†]	1	Yes
VII	1996–2002	3	No	–	NA [‡]

**n*, number of persistent PFGE patterns.

[†]NA, Not applicable. No second sample available.

[‡]NA, Not applicable. No sample available.

Clinical genomic variability

All the clinical isolates analyzed belonged to *Legionella pneumophila* species (Tables 2 and 3). *Legionella* infection in each hospital was associated with a unique PFGE pattern, except in hospital IV where two different PFGE patterns were recovered from two patients (patient 1, PFGE pattern N and patient 2, PFGE pattern P; both PFGE patterns corresponding to distinct serogroups of *L. pneumophila*).

Environmental and clinical correlation

In five hospitals, the isolates associated with hospital-acquired Legionnaires' disease exhibited the PFGE pattern corresponding to the environmental *Legionella* PFGE pattern persisting longest in the water distribution system (Table 3). The other *Legionella* PFGE patterns found in the water supply systems did not cause any documented infectious episode. In hospitals I and VI the isolates associated with infection in 1989 and 2003, respectively (no environmental samples were available at this time in these hospitals), were later related to the environmental isolates, suggesting persistence of the environmental subtypes for 18 years (hospital I) and 8 years (hospital VI), respectively.

Discussion

Legionella pneumophila colonizes water pipes in a large number of facilities. In this study the large genomic variability among environmental isolates of *L. pneumophila* from the water distribution systems of hospitals was demonstrated. The fact that each hospital exhibited its own PFGE patterns not shared with other PFGE patterns from other hospitals confirmed a previous observation (Sabria *et al.*, 2001). Moreover, despite the variability of genetic subtypes observed during different sampling periods, some PFGE patterns persisted longer than 17 years. It is noteworthy that most of the isolates associated with the infectious episodes corresponded to the PFGE pattern persisting longest in the hospital water environment.

The large PFGE genomic variability demonstrated in this study has not been observed by other authors. Using amplified fragment length polymorphism (AFLP), other researchers (Darelid *et al.*, 2004) identified the same AFLP pattern in three out of six Swedish hospitals located within an area of 100 km. Lawrence *et al.* (1999) reported the wide distribution of a particular PFGE pattern within the Paris area, despite the similarity criteria used by these authors being less discriminatory than that used in the present study.

The factors causing greater or lesser genetic diversity in some areas are unknown. Moreover, the factors related to the presence of one or several clones, or those that influence the appearance or disappearance of specific subtypes, remain to be explained, as does the persistence of some clones in the environment. Some authors have attributed the changes in *L. pneumophila* isolates typed (appearance/disappearance) to the disinfection measures used (Struelens *et al.*, 1992; Darelid *et al.*, 2004; Perola *et al.*, 2005; Triassi *et al.*, 2006).

The quality of the water or continuous disinfection procedures of the potable water supplies in hospitals may influence the observed genomic variability. Different disinfection methods such as superheat-and-flush, hyperchlorination and copper–silver ionization were used in the hospitals studied during the study period, with a concomitant increase in the variation of PFGE patterns observed. In spite of all these different methods, the molecular PFGE patterns related to the clinical cases were maintained throughout the study period.

It is assumed that *Legionella* arrives in potable water distribution systems from the mains of the cold water network at concentrations undetectable by routine laboratory methods. Once the system has been colonized in the presence of favourable conditions the bacteria may live free in the planktonic phase or as an intracellular parasite of protozoa within the complex microbial structure of the biofilm. The presence of a biofilm throughout the water distribution system facilitates the growth of *Legionella* and interferes with the environmental stressful conditions. Therefore, it is possible for different PFGE patterns of *Legionella* to cohabit over time in the water distribution systems, albeit at almost undetectable levels.

A change in the environment, such as may occur on application of disinfection measures, causes the ecological niche to destabilize and the inocula of the predominant subtypes in the water to diminish, allowing other subtypes, previously in the minority, to overgrow. The fact that the disinfection measures used were more effective in the planktonic phase than in the biofilm and could not eradicate the microorganisms present in the water distribution systems could be the reason for the persistence of colonization.

The acquisition of mechanisms of resistance in *Legionella* to disinfection measures such as hyperchlorination or copper/silver ionization has been reported in a few studies (Kuchta *et al.*, 1985; Mietzner *et al.*, 2005). On the contrary, the associations protozoa–*Legionella* and *Legionella*–biofilm have been demonstrated to be more resistant to disinfection measures either by the ability of *Legionella* to grow within a protozoa or enter in a viable but not-culturable (VBNC) status (Kilvington *et al.*, 1990; Hwang *et al.*, 2006). Thus, when starvation conditions are reduced, the *Legionella* again colonizes the water system.

It remains unknown as to which factors cause some environmental subtypes to produce infection where as other subtypes do not. In this study, clinical isolates from the same patients showed the same PFGE pattern (data not shown), whose high prevalence in each water distribution system and persistence over time showed a better adaptation to the ecological niche than other *Legionella* subtypes. Whether it is the greater virulence of these subtypes or the simple fact of being in higher numbers and persisting longer that leads to their association with clinical cases remains under debate.

It is known that environmental *Legionella* isolates can express different degrees of virulence, even though their relationship with the appearance of episodes of infection is controversial (Bollin *et al.*, 1985; Luck *et al.*, 1994; Marrie *et al.*, 1999). The authors have observed that hospitals colonized by *L. pneumophila* strains with greater cytopathogenicity have a trend to present a larger number of cases of hospital-acquired Legionnaires' disease (García-Nuñez *et al.*, 2000).

Because molecular typing is performed on a random number of environmental isolates, the possibility of other subtypes coexisting within the environment of those selected cannot be ruled out. In the hospitals studied, an average of 9.3 environmental isolates were analyzed per year. Therefore, if more isolates had been available in some samplings, it is likely that a higher frequency of hospitals containing more PFGE patterns or demonstrating genomic persistence would have been observed. In a long-term retrospective study such as the present one, it has been taken into account that since 2001 Spanish regulations require environmental surveillance in hospitals. Before this law, surveillance was performed according to the criteria of each hospital and the degree of awareness about the subject. Another limitation may be the variations in the surveillance systems and methods of *Legionella* detection from hospital to hospital, thereby not guaranteeing that all nosocomial pneumonias were tested for *Legionella* during the study period. Likewise, the low productivity of sputum cultures and the fact that this was not a study of active legionellosis surveillance made it difficult to obtain more clinical isolates to evaluate.

In conclusion, this study demonstrated a high genomic variability of *Legionella* subtypes in the water distribution system of seven hospitals, and the persistence over time of those *Legionella* subtypes associated with most of the *Legionella* infection episodes. These observations may justify a periodic genotype analysis of environmental isolates to determine the prevalence of more colonizing or predominant *Legionella* subtypes as well as the impact of disinfection measures on them.

Acknowledgements

This work was financially supported by Asociación per la Investigació Biomèdica en Malalties Infeccioses.

References

- Bollin GE, Plouffe JF, Para MF & Prior RB (1985) Difference in virulence of environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* **5**: 674–677.
- Chang FY, Jacobs SL, Colodny SM, Stout JE & Yu VL (1996) Nosocomial Legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 5: laboratory and epidemiologic implications. *J Infect Dis* **5**: 1116–1119.
- Darelid J, Bernander S, Jacobson K & Lofgren S (2004) The presence of a specific genotype of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in a hospital and municipal water distribution system over a 12-year period. *Scand J Infect Dis* **36**: 417–423.
- Fry NK, Bangsberg JM, Bernander S et al. (2000) 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* **10**: 773–780.
- Garcia-Nuñez M, Pedro-Botet ML, Sopena N, Modol JM, Reynaga E, Morera J, Rey-Joly C & Sabria M (2000) Virulence, molecular subtyping and nosocomial legionellosis from environmental *Legionella pneumophila* isolates of 20 hospitals. *Program and abstracts of the 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Toronto)*, p. 411. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Grattard F, Berthelot P, Reyrolle M, Ros A, Etienne J & Pozzetto B (1996) Molecular typing of nosocomial strains of *Legionella pneumophila* by arbitrarily primed PCR. *J Clin Microbiol* **6**: 1595–1598.
- Hwang MG, Katayama H & Ohgaki S (2006) Effect of intracellular resuscitation of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba polyphage* cells on the antimicrobial properties of silver and copper. *Environ Sci Technol* **40**: 7434–7439.
- Kilvington S & Price J (1990) Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol* **68**: 519–525.
- Kuchta JM, States SJ, McGlaughlin JE, Overmeyer JH, Wadowsky RM, McNamara AM, Wolford RS & Yee RB (1985) Enhanced chlorine resistance of tap water-adapted *Legionella pneumophila* as compared with agar medium-passaged strains. *Appl Environ Microbiol* **50**: 21–26.
- Lawrence C, Reyrolle M, Dubrou S, Forey F, Decludt B, Goulvestre C, Matsiota-Bernard P, Etienne J & Nauciel C (1999) Single clonal origin of a high proportion of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the environment in the area of Paris, France, over a 10-year period. *J Clin Microbiol* **8**: 2652–2625.
- Luck PC, Dinger E, Helbig JE, Thurm V, Keuchel H, Presch C & Ott M (1994) Analysis of *Legionella pneumophila* strains associated with nosocomial pneumonia in a neonatal intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **7**: 565–571.
- Luck PC, Wenchel HM & Helbig JH (1998) Nosocomial pneumonia caused by three genetically different strains of *Legionella pneumophila* and detection of these strains in the hospital water supply. *J Clin Microbiol* **4**: 1160–1163.
- Marrie TJ, Tyler S, Bezanson G, Dendy C & Johnson W (1999) Analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* **1**: 251–254.
- Mietzner SM, Hangard A, Stout JE, Rohr U, Pedro-Botet ML, Samore MH & Yu VL (2005) Reduced susceptibility of *Legionella pneumophila* to the antimicrobial effects of cooper and silver ions. *45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Oberdofer K, Müssigbrodt G & Wendt C (2007) Genetic diversity of *Legionella pneumophila* in a hospital water systems. *Int H Hyg Environ Health* **23**, DOI: 10.1016/j.ijheh.2007.04.003
- Perola O, Kauppinen J, Kusnetsov J, Karkkainen UM, Luck PC & Katila ML (2005) Persistent *Legionella pneumophila* colonization of a hospital water supply: efficacy of control methods and a molecular epidemiological analysis. *APMIS* **1**: 45–53.
- Rangel-Frausto MS, Rhomberg P, Hollis RJ, Pfaller MA, Wenzel RP, Helms CM & Herwaldt LA (1999) Persistence of *Legionella pneumophila* in a hospital's water system: a 13-year survey. *Infect Control Hosp Epidemiol* **12**: 793–797.
- Sabria M & Yu VL (2002) Hospital-acquired legionellosis: solutions for a preventable infection. *Lancet Infect Dis* **2**: 368–373.
- Sabria M, Garcia-Nunez M, Pedro-Botet ML, Sopena N, Gimeno JM, Reynaga E, Morera J & Rey-Joly C (2001) Presence and chromosomal subtyping of *Legionella* species in potable water systems in 20 hospitals of Catalonia, Spain. *Infect Control Hosp Epidemiol* **11**: 673–676.
- Struelens MJ, Maes N, Rost F, Deplano A, Jacobs F, Liesnard C, Bornstein N, Grimont F, Lauwers S, McIntyre MP & Serruys E (1992) Genotypic and phenotypic methods for the investigation of a nosocomial *Legionella pneumophila* outbreak and efficacy of control measures. *J Infect Dis* **1**: 22–30.
- Triassi M, Di Popolo A, Ribera D'Alcala G, Albanese Z, Cuccurullo S, Montegrosso S, Crispino M, Borella P & Zarrilli R (2006) Clinical and environmental distribution of *Legionella pneumophila* in a university hospital in Italy: efficacy of ultraviolet disinfection. *J Hosp Infect* **4**: 494–501.
- Visca P, Goldoni P, Lück PC, Helbig JH, Cattani L, Giltri G, Bramati S & Castellani Pastoris M (1999) Multiple types of *Legionella pneumophila* serogroup 6 in a hospital heated-water system associated with sporadic infections. *J Clin Microbiol* **37**: 2189–2196.

OTROS ARTÍCULOS, CAPÍTULOS DE LIBRO y COMUNICACIONES A CONGRESOS DEL DOCTORANDO REFERIDOS A LA TEMÁTICA DE LA TESIS DOCTORAL

Publicaciones

1. **Garcia-Nuñez M**, Sabria M. Epidemiología Molecular de *Legionella*. Medicina Clínica 2002;118 (S5): 64-8.
2. Pedro-Botet ML, Sabria M, Sopena N, **Garcia-Nuñez M**, Morera J, Reynaga E. Environmental legionellosis and oropharyngeal colonization by *Legionella* in immunosuppressed patients. Infect Control Hosp Epidemiol 2002; 23: 279-81.
3. Sopena N, Sabria M, Pedro-Botet ML, Reynaga E, **Garcia-Nuñez M**, Dominguez J, Matas L. Factors related to persistence of *Legionella* urinary antigen excretion in patients with Legionnaires' disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21: 845-8.
4. Pedro-Botet ML, Sabria M, Sopena N, **Garcia-Nuñez M**, Dominguez MJ, Reynaga E, Rey-Joly C. Legionnaires' disease and HIV infection. Chest 2003; 124: 543-7.
5. Sopena N, Pedro-Botet ML, Sabria M, Garcia-Pares D, Reynaga E, **Garcia-Nuñez M**. Comparative study of community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila* or *Chlamydia pneumoniae*. Scand J Infect Dis 2004; 36: 330-4.
6. Sabria M, Modol JM, **Garcia-Nuñez M**, Pedro-Botet ML, Sopena N, Reynaga E, Sabria M, Pedro-Botet ML, Modol JM, Sopena N, Reynaga E, Rey-Joly C. Environmental legionellosis and hospital acquired *Legionella* infection. A four-year prospective study in 20 catalonian hospitals, Spain. Infect Control Hosp Epidemiol 2004; 25: 1072-6.
7. Sabria M, Pedro-Botet ML, Gomez J, Roig J, Vilaseca Z, Sopena N, Baños V, Reynaga E, **Garcia-Nuñez M**, Lorenzo M, Ortega N, Ruiz J, Tudela P. Fluoroquinolones versus macrolides in the treatment of Legionnaires' disease. Chest 2005; 128: 1401-5.
8. Sabria M, Alvarez J, Dominguez A, Pedrol A, Sauca G, Salleras L, Lopez A, **Garcia-Nuñez M**, Parron I, Barrufet MP. A community outbreak of Legionnaires' disease: evidence of a cooling tower as the source. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 642-7.

9. Ragull S, Luisa Pedro-Botet M, **Garcia-Nunez M**, Esteve M, Sopena N, Rey Joly C, Sabria M. Superheat-and-flush effect on the control of hospital-acquired *Legionella* infection. *Med Clin (Barc)* 2006; 127: 211-3.
10. Sopena N, Force L, Pedro-Botet ML, Barrufet P, Sauca G, **Garcia-Nunez M**, Tolchinsky G, Capdevila JA, Sabria M. Sporadic and epidemic community legionellosis: two faces of the same illness. *Eur Respir J* 2007; 29: 138-42.
11. Pedro-Botet ML, Sopena N, Garcia-Cruz A, Mateu L, **Garcia-Nunez M**, Rey-Joly C, Sabria M. *Streptococcus pneumoniae* and *Legionella pneumophila* pneumonia in HIV-infected patients. *Scand J Infect Dis* 2007; 39: 122-8.
12. Ragull S, **Garcia-Nunez M**, Pedro-Botet ML, Sopena N, Esteve M, Montenegro R, Sabria M. Fluctuations in *Legionella* counts, genetic variability and persistence of PFGE patterns in cooling towers *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 5382-4.
13. Sanchez I, **Garcia-Nuñez M**, Ragull S, Sopena N, Pedro-Botet ML, Esteve M, Rey-Joly C, Sabria M. Genotypic variability and persistence of *Legionella pneumophila* PFGE patterns in 34 cooling towers from two different areas. *Environmental Microbiology* 2008; 10: 395-9.
14. Sala Ferre MR, Arias C, Oliva JM, Pedrol A, **Garcia M**, Pellicer T, Roura P, Dominguez A. 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* 2009; 28:153-9.

Capítulos de libro

1. Alvarez J, Ausina V, Camping M, Ciurana B, Dominguez A, Dominguez J, **Garcia-Nuñez M**, Grau R, Gudiol F, Lopez A, Pedro-Botet ML, Prats G, Sabria M, Sopena N, Vaque J. Guia per la prevenció i control de la legionel.losis. En: *Quaderns de Salut Pública*, 16. Generalitat de Catalunya. Departament de Sanitat i Seguretat Social, 2001.
2. Casas I, Pedro-Botet ML, Sopena N, Esteve M, Mateu L, Roure S, **Garcia-Nuñez M**, Rey-Joly C, Sabria M. Trends observed in Legionnaires' disease in a hospital in Catalonia, Spain, 1983 – 2005. In: *Legionella: State of the art 30 years after its recognition*. ASM Press Washington, DC. 2006: 28-9.

3. Pedro-Botet ML, Sopena N, Tural C, Garcia-Cruz A, Mateu L, Ragull S, **Garcia-Nuñez M**, Roure S, Rey-Joly C, Sabria M. Severe Legionnaires' disease successfully treated with levofloxacin and azithromycin. In: *Legionella: State of the art 30 years after its recognition*. ASM Press Washington, DC. 2006: 40-2.
4. Pedro-Botet ML, Mateu L, Sopena N, Roure S, Casas I, **Garcia-Nuñez M**, Rey-Joly C, Sabria M. Hospital and community-acquired *Legionella* pneumonia: Two faces of the same disease? In: *Legionella: State of the art 30 years after its recognition*. ASM Press Washington, DC. 2006: 22-4.
5. **Garcia-Nuñez M**, Ferrer J, Ragull S, Junyent E, Sagrista A, Soler A, Sanchez I, Pedro-Botet ML, Sopena N, Sabria M. Persistence and Genotypic stability of *Legionella* in a potable water system in a hotel over a 20-month period. In: *Legionella: State of the art 30 years after its recognition*. ASM Press Washington, DC. 2006: 124-7.
6. Ragull S, Montenegro R, **Garcia-Nuñez M**, Sanchez I, Soler A, Sopena N, Pedro-Botet ML, Esteve M, Sabriá M. Fluctuation in *Legionella pneumophila* counts in cooling towers over a one-year period. In: *Legionella: State of the art 30 years after its recognition*. ASM Press Washington, DC. 2006: 436-8.
7. Sanchez I, Ragull S, **Garcia-Nuñez M**, Sopena N, Pedro-Botet ML, Montenegro R, Sabriá M. Genotypic variability and persistence of *Legionella pneumophila* DNA subtypes in 23 cooling towers from two different areas. In: *Legionella: State of the Art 30 Years after Its Recognition*. ASM Press Washington, DC. 2006: 439-41.

Comunicaciones a congresos internacionales :

1. Pedro-Botet ML, **Garcia-Nuñez M**, Prats R, Sopena N, Nieto J, Sabria M. Molecular study of *Legionella* strains isolated in hospitals in Catalonia, Spain. 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Francisco (USA), 1999, Abstract nº 1690, p. 633.
2. Pedro-Botet ML, **Garcia M**, Prats R, Sopena N, Sabria M. A short superheat-and-flush method for rapid control of environmental legionellosis. 14th Meeting of the European Group of *Legionella* Infections (EWGLI). Dresden (Germany), 1999. Abstract nº 53.

3. Modol J.M., Pedro-Botet M.L., **Garcia M**, Prats R, Sopena N, Nieto J, Sabria M. Molecular study of *Legionella* strains isolated in hospitals in Catalonia, Spain. 14th Meeting of the European Group of *Legionella* Infections (EWGLI). Dresden (Germany), 1999. Abstract nº 23.
4. **Garcia-Nuñez M**, Pedro-Botet ML, Sopena N, Modol JM, Reynaga E, Morera J, Rey-Joly C, Sabriá M. Virulence, molecular subtyping and nosocomial legionellosis. Insights from environmental *Legionella pneumophila* isolates of 20 hospitals. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Toronto (Canada), 2000. Abstract nº 946, p. 411
5. Sopena N, Pedro-Botet ML, **Garcia-Nuñez M**, Dominguez J, Matas L, Sabria M. Role of corticotherapy in the persistence of urinary antigen of *Legionella pneumophila* and in the evolution of *Legionella* pneumonia. 11th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Istanbul (Turkey), 2001. Abstract nº 23. In: Clin Microbiol Infect 2001; 7 (suppl 1): 22-23.
6. **Garcia-Nuñez M**, Pedro-Botet ML, Sopena N, Reynaga E, Rey-Joly C, Sabria M. Virulence of epidemiologically related clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1. 11th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Istanbul (Turkey). Abstract nº 138. In: Clin Microbiol Infect 2001; 7 (suppl 1): 201.
7. Sabria M, Pedro-Botet ML, Modol JM, Sopena N, Reynaga E, **Garcia-Nuñez M**, Rey-Joly C. Environmental legionellosis and hospital acquired *Legionella* infection. A four-year prospective study in 20 catalonian hospitals. Spain. 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Chicago (IL, USA), 2001. Abstract nº 1438.
8. Pedro-Botet ML, Dominguez MJ, Sopena N, Sirera G, Reynaga E, **Garcia-Nuñez M**, Dominguez J, Rey-Joly C, Sabria M. Legionnaires' disease in patients with HIV infection. 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Chicago (IL, USA), 2001. Abstract nº 875.
9. Pedro-Botet ML, Vilaseca Z, Sopena N, Viñado B, Reynaga E, **Garcia-Nuñez M**, Sabria M. Erythromycin versus fluoroquinolones in the treatment of Legionnaires' disease. 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Chicago (IL, USA), 2001. Abstract nº 878.

10. Reynaga E, **Garcia-Nuñez M**, Pedro-Botet ML, Sopena N, Sabria M. Copper-Silver ionization system, water disinfection and nosocomial legionellosis. 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Chicago (IL, USA), 2001. Abstract nº 1439.
11. Pedro-Botet ML, Sopena N, Garcia-Pares D, Domínguez MJ, Vilaseca Z, Reynaga E, **Garcia-Nuñez M**, Sabria M. Influence of HIV infection in the evolution of Legionnaires' disease. 12th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Milan (Italy), 2002. Abstract nº 283. In: Clin Microbiol Infect 2002; 8 (suppl 1): 44.
12. Sopena N, Garcia D, Pedro-Botet ML, **Garcia-Nuñez M**. Comparative study of bacterial community-acquired pneumonia (CAP) caused by *S. pneumoniae* (CAP-SP), *L. pneumophila* (CAP-LP) and *C. pneumoniae* (CAP-CP). 12th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Milan (Italy), 2002. Abstract nº 891. In: Clin Microbiol Infect 2002; 8 (suppl 1): 192.
13. **Garcia-Nuñez M**, Pedro-Botet ML, Sopena N, Reynaga E, Rey-Joly C, Morera J, Sabria M. A single environmental clone of *Legionella pneumophila* serogroup 1 causing hospital-acquired Legionnaires' disease over a 13-year period. 42th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Diego (California, USA), 2002. Abstract nº 1366, p. 331
14. Sarroca O, Pedro-Botet ML, Sopena N, Anaya P, Reynaga E, **Garcia-Nuñez M**, Catot N, Sabria M. Descriptive analysis of 99 cases of hospital-acquired Legionnaires' disease. 42th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Diego (California, USA), 2002, Abstract nº 1368, p. 331.
15. Garcia Cruz A, Pedro-Botet ML, Sopena N, **Garcia Nuñez M**, Reynaga E, Dominguez MJ, Rey Joly C, Sabria M. Bacterial pneumonia in HIV patients: comparative study of *Streptococcus pneumoniae* vs *Legionella pneumophila* sg 1. 13th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Glasgow (UK), 2003. Abstract nº 280. In: Clin Microbiol Infect 2003; 9 (suppl 1): 52.
16. Sarroca O, Mengual M, Pedro Botet ML, Sopena N, **Garcia Nuñez M**, Reynaga E, Rey-Joly C, Sabria M. Descriptive analysis of 124 cases of Legionnaires' disease in

- the elderly. 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago (IL, USA), 2003. Abstract n° 122, p. 341.
17. Pedro Botet ML, Garcia Cruz A, Sarroca O, Sopena N, **Garcia-Nuñez M**, Ragull S, Rey Joly C, Sabria M. Is *Legionella* coincidental or opoortunistic infection in HIV-positive patient? 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Prague (Czech Republic), 2004. Abstract n° 136. In: Clinical Microbiology and Infection 2004; 10 (suppl 3): 20.
 18. Pedro Botet ML, Gomez J, Roig J, Vilaseca Z, Sopena N, Sarroca O, Garcia Cruz A, Ragull S, **Garcia-Nuñez M**, Rey Joly C, Sabria M. Fluoroquinolones vs. macrolides in the treatment of Legionnaires' disease. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Prague (Czech Republic), 2004. Abstract n° 1852. In: Clinical Microbiology and Infection 2004; 10 (suppl 3): 529.
 19. Barrabeig I, **Garcia-Nuñez M**, Dominguez A, Rovira A, Ragull S, Pedrol A, Elorza JM, Pedro Botet ML, Sopena N, Sabria M Community outbreak of *Legionella* in hospitalet (Spain), usefulness of the epidemiological and molecular data to identify the source. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Prague (Czech Republic), 2004. Abstract n° 435. In: Clinical Microbiology and Infection 2004; 10 (suppl 3): 88.
 20. **Garcia-Nuñez M**, Ragull S, Junyent E, Pedro-botet ML, Sopena N, Sabria M. Prevalence and degree of *Legionella* colonization in cooling towers. 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Prague (Czech Republic), 2004. Abstract n° 437. In: Clinical Microbiology and Infection; 10 (suppl 3): 89.
 21. Ragull S, **Garcia-Nuñez M**, Junyent E, Pedro-Botet ML, Sopena N, Dominguez A, Sabria M. Diversity of *Legionella* subtypes in cooling towers. Why only one environmental strain causes the clinical cases? 14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Abstract n° 369. Prague (Czech Republic), 2004. In: Clinical Microbiology and Infection. 2004; 10 (suppl 3): 71.
 22. Soler-Membrives A, **Garcia-Nuñez M**, Ragull S, Sopena N, Pedro-Botet ML, Sabria M. Efficacy of various biocides against *L. pneumophila* depending on the contact time. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ECCMID). Copenhagen (Denmark), 2005. Abstract n° 485. In: Clinical microbiology and infection. 2005; 11 (suppl 2): 126.

23. Sopena N, Force L, Pedro-Botet ML, Barrufet P, Sauca G, **Garcia-Nuñez M**, Tolchinsky G, Capdevila JA, Sabria M. Comparative study of *Legionella pneumophila* pneumonia according to sporadic and outbreak presentation. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ECCMID). Copenhagen (Denmark), 2005. Abstract nº 356. In: Clinical microbiology and infection. 2005; 11 (suppl 2): 85.
24. J. Ferrer, **M. Garcia-Nuñez**, E. Junyent, A. Sagrista, S. Ragull, A. Soler, I. Sanchez, ML. Pedro-Botet, N. Sopena, Sabria M. Persistence and genomic stability of *Legionella* in potable water system in a hotel over a 20-month period. 6th Internal Conference on *Legionella*. Chicago (IL, USA). 2005. Abstract nº 14, p. 50.
25. Pedro-Botet ML, Sopena N, Garcia-Cruz A, Mateu L, **Garcia-Nuñez M**, Dominguez M, Ragull S, Rey-Joly C, Sabria M. Community-acquired pneumonia (CAP) in HIV-infected patients: comparative study of *Streptococcus pneumoniae* (SP) and *L. pneumophila* sg. 1. 6th Internal Conference on *Legionella*. Chicago (IL, USA). 2005. Abstract nº 5, p. 50.
26. Pedro-Botet ML, Sopena N, Tural C, Garcia-Cruz A, Mateu L, Soler A, **Garcia-Nuñez M**, Roure S, Rey-Joly C, Sabria M. Severe Legionnaires' disease (LD) successfully treated with levofloxacin and azithromycin. 6th Internal Conference on *Legionella*. Chicago (IL, USA). 2005. Abstract nº 6, p. 51.
27. Ragull S, **Garcia-Nuñez M**, Soler A, Sanchez I, Pedro-Botet ML, Sopena N, Dominguez A, Sabria M. Diversity of *Legionella* subtypes in cooling towers. Why only one environmental strain causes de clinical cases. 6th Internal Conference on *Legionella*. Chicago (IL, USA). 2005. Abstract nº 41, p. 64.
28. Pedro-Botet ML, Sopena N, Mateu L, Casas I, Roure S, Sarroca O, Esteve M, **Garcia-Nuñez M**, Rey-Joly C, Sabria M. Trends observed in Legionnaires' disease (LD) in a hospital of Catalonia (Spain) (1983-2005). 6th Internal Conference on *Legionella*. Chicago (IL, USA). 2005. Abstract nº 44, p. 65.
29. Sanchez I, Ragull I, **Garcia-Nuñez M**, Soler A, Sopena N, Pedro-Botet ML, Montenegro R, Sabria M. Genomic diversity and persistence of *Legionella pneumophila* clones in 23 cooling towers from two different areas. 6th Internal Conference on *Legionella*. Chicago (IL, USA). 2005. Abstract nº 46, p. 66.
30. Modol J, Mateu L, **Garcia-Nuñez M**, Pedro-Botet ML, Sopena N, Ragull S, Sabria M. Impact of the cooper-silver ionization system on water disinfection and hospital-

- acquired *Legionella* disease. 6th Internal Conference on *Legionella*. Chicago (IL, USA). 2005. Abstract nº 38, p. 88.
31. Ragull S, Montenegro R, **Garcia-Nuñez M**, Sanchez I, Soler A, Sopena N, Pedro-Botet ML, Esteve M, Sabria M. Fluctuation in *Legionella pneumophila* counts in cooling towers over a one year period. 6th Internal Conference on *Legionella* Chicago (IL, USA), 2005. Abstract nº 43, p. 90.
32. Sopena N, Pedro-Botet ML, Tolchinsky G, Mateu L, **Garcia-Nuñez M**, Sabria M. Community-acquired *Legionella* pneumonia in elderly patients: risk factors, clinical characteristics and outcome. 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Washington (USA), 2005. Abstract nº 42.
33. Pedro-Botet ML, Mateu L, Sopena N, Roure S, Garcia-Núñez M, Rey-Joly C, Sabria M, Legionella Study Group (GEleg). Legionnaires' disease (LD) in the elderly. Descriptive analysis of 124 cases. 21th Annual Meeting of the European Working Group of *Legionella* Infections (EWGLI). Lisboa (Portugal), 2006.
34. **Garcia-Nuñez M**, Ragull S, Sopena N, Pedro-Botet ML, Morera J, Sabria M. A single environmental clone of *Legionella pneumophila* serogroup 1 causing hospital-acquired Legionnaires' disease over a 13-year period. 21th Annual Meeting of the European Working Group of *Legionella* Infections (EWGLI). Lisboa (Portugal), 2006.
35. Casas I, Pedro-Botet ML, Sopena N, Esteve M, Mateu L, Roure S, **Garcia-Nuñez M**, Rey-Joly C, Sabria M. Trends observed in Legionnaires' disease (LD) in a hospital in Catalonia (Spain) (1983-2005). 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Francisco (USA), 2006.
36. Ragull S, **Garcia-Nuñez M**, Sopena N, Pedro-Botet ML, Esteve M, Montenegro R, Sabria M. Fluctuation in *Legionella pneumophila* counts and persistence of DNA subtypes in 15 cooling towers over a year period. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Munich (Germany), 2007. Abstract nº 1871. In: *Clinical Microbiology and Infection* 2007; 13 (suppl 1): 536.
37. Tolchinsky G, Mateu L, Pedro-Botet ML, Sopena N, **Garcia Nuñez M**, Sabria M, Rey-Joly C. Community-acquired Legionnaires' disease in the urinary antigen era. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Munich (Germany), 2007. Abstract nº 1150. In: *Clinical Microbiology and Infection* 2007; 13 (suppl 1): 312.

38. **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 (ICAAC). Washington (USA), 2007. Abstract nº 1790.
39. Barrabeig I, Rovira A, **Garcia M**, Vilamala A, Ferrer MD, Escofet A, Jansa JM. Outbreak of Legionnaires' disease associated with exposure to a mist machine. 23rd European Working Group for *Legionella* Infections (EWGLI). Madrid (Spain), 2008.

Comunicaciones en congresos nacionales

1. Reynaga E, **Garcia-Nuñez M**, Pedro-Botet ML, Sopena N, Santaeugenia S, Sanchez L, Sabriá M. Sistema de ionización Cu/Ag, Desinfección del agua y legionelosis nosocomial. IX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Abstract nº 494. En: *Enf Infec Microbiol Clin* 2000; 18; (Supl 1): 152.
2. Pedro-Botet ML, Modol JM, Prats R, Reynaga E, **Garcia M**, Sopena N, Sabriá M. Impacto del estudio ambiental y de la antigenuria sobre la legionelosis nosocomial en hospitales de Cataluña. IX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Abstract nº 455. En: *Enf Infec Microbiol Clin* 2000; 18; (supl 1): 140.
3. **Garcia-Nuñez M**, Pedro-Botet ML, Sopena N, Modol JM, Reynaga E, Morera J, Rey-Joly C, Sabriá M. Virulencia, Subtipaje molecular y legionelosis nosocomial. Análisis de los aislados ambientales de *Legionella pneumophila* de 20 hospitales. III Foro de Debate Nacional en Infecciones Bacterianas, Sevilla 2001.
4. Dominguez MJ, Pedro-Botet ML, Sopena N, Sirera G, Reynaga E, Vilaseca Z, **Garcia-Nuñez M**, Dominguez J, Rey-Joly C, Sabria M. Enfermedad del Legionario en pacientes con infección por el VIH. X Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Sevilla, 2002.
5. Garcia Cruz A, Dominguez MJ, Pedro-Botet ML, Sopena N, **Garcia-Nuñez M**, Reynaga E, Rey-Joly C, Sabria M. Pneumònia bacteriana en pacients infectats pel VIH: Estudi comparatiu entre *S. pneumoniae* i *L. pneumophila* sg. 1. X Congrés Català-Balear de Medicina Interna. Barcelona, 2003.
6. Barrabeig I, Rovira A, **Garcia M**, Prellezo H, Escofet A, Amat A, Ferrer MD, Oliva JM, Arboix M, et al. Brote comunitario de neumonía por *Legionella* relacionado con

un sistema de nebulización. XXV Reunión Científica anual de la sociedad Española de Epidemiología. Córdoba, 2007.

AGRADECIMIENTOS

Un montón de cosas que agradecer y muy complicadas de explicar. Son tantos los recuerdos de las experiencias vividas a lo largo de estos años, ¡qué son muchos años!!! Millones de agradecimientos a todos aquellos que en algún momento han interactuado en este trabajo, y que han influido en él, ya que, para vivir y crecer se necesita al igual que mis amigas las bacterias cierto "*quorum-sensing*"

En primer lugar agradecer al Dr. Miguel Sabrià la dirección de este trabajo y el hecho de que confiara en mí para llevarlo a cabo, a pesar de que *al principio no las tuviera todas consigo*. Gracias Miquel por tu esfuerzo personal y paciencia, por tu inagotable capacidad de trabajo y análisis, por todo lo que he aprendido de ti tanto a nivel personal como profesional, por darme la oportunidad de ver mundo congresos tras congresos y sobretodo, gracias por tener siempre "*un moment*".

Siguiendo, agradecer a Luisa la co-dirección de esta tesis y su positividad. Junto con Nieves, me habéis dado sabios consejos y ánimos durante todas las etapas, ¡qué no son pocas! Gracias por vuestra calidad humana y permitirme trabajar con vosotras en un sinfín de proyectos. Gracias chicas por esas charlas a media voz en los viajes en avión. Un placer, sin duda.

Al resto del grupo UMI-NEUMO, gracias por su apoyo en general. Al Dr. Morera y a Eduard por tener siempre un gesto amable y consejo sabio, por las facilidades que me han dado para llevar a cabo este trabajo y por que tal vez sin ellos el laboratorio no hubiera sobrevivido.

No olvidarme de dos personas que hace tiempo que volaron. Al Dr. Nieto, el "culpable" de mi incorporación al grupo UMI-NEUMO. Siempre recordaré los nervios de aquellos primeros viernes y aquel: "*Hola Marian, ¿algún problema?*". Hasta que al final se oyó: *¡Bien, sabía que no me equivocaba!* A Rosa Prats, que, aunque sin apenas conocerla, no sería justo no valorar la gran "carrada" que representó la recolección y procesamiento de las primeras muestras.

Al pensar en la gente del "*lab*", recuerdo las diferentes etapas....

Al principio cuando simplemente éramos el CIS (al final del pasillo de Inmuno), agradecer muy especialmente a Sandra su "*Hola, tú debes ser la chica nueva de la UMI. Te presentaré al resto*". Gracias Sandra, por dedicarme tanto tiempo a enseñarme a "moverme" por el laboratorio y a "sobrevivir" en el hospital. Por los chocolates de media tarde, por los helados-paseos por el parking del hospital y demostrarme que en el trabajo también se pueden encontrar amigas incondicionales. Gracias a ti y a Luís, por vuestro apoyo y ánimos hasta el final, por esas charlas hasta altas horas de la noche y por prestarme una habitación que perdí por una buena causa, vuestro Diego.

Gracias también todos los demás, Eva, Carme P, Carme S y Miquel, por ayudarme a ordenar "el caos" de laboratorio que me encontré y sobretodo gracias por aquellas tardes de canto, ¡hasta parecía una coral! Un recuerdo especial a Trini, por sus charlas-cotilleos a altas horas de la tarde.

No olvidarme de la gente del principio del Pasillo (Immuno). Especialmente darle las gracias a Carme Roura por su tan oportuno: "*Tranquil.la, qui treballa, remena, si es trenca no passa res*"; y por los primeros viajes de tren compartidos, tan amenos, que me ayudaron a coger el tranquillo a esto de ir a "Can Ruti".

Luego, poco a poco con las bajas y los nuevos fichajes, pasamos a ser la "Unitat de recolçament". La filosofía y el "taranná" del laboratorio cambiaron. Todo era jovialidad (juventud de los nuevos), buen humor y algún que otro mal rollo pero, ¿donde no los hay? Era bonito, y agobiante a veces, compartiendo "poyata", "mesa" y "ordenador con internet". El nombre del lab nos venía de perlas porque nos apoyábamos unos con los otros, y en aquel espacio tan reducido se solucionaban los problemas técnicos y personales. Gracias a todos, Sonia, Eva (de nuevo), Anna S, Anna M, Maribel, Adolfo, Bárbara, Laura, Pedro...

Y luego vino el traslado, siempre se había oído hablar de él pero nunca llegaba, y finalmente nos convertimos en el Institut d' Investigació Germans Trias i Pujol (Laboratori de Recerca). Ha sido una experiencia nueva, comprobar que infectólogos, microbiólogos, neumólogos, oncólogos, digestólogos, nefrólogos, neurólogos y todos los demás -ólogos pueden ser vecinos y convivir en armonía ya que a todos nos une una cosa en común: "la biología". Gracias a todos, incluyendo a la gente que estuvo de paso, por tantas horas de risas, agobios, confidencias de poyata, coreografías y bailoteos....

A Sonia, por los momentos vividos y las horas extras de brotes legionelósicos que sin duda han sido más amenos junto a ti. Por tu comprensión, aguantar mis neuras y malos

rollos, enseñarme a ser un poquito egoísta y sobretodo por ser incapaz de hacerle una putada a nadie.

A Laura, por ser como es, con ese aire frágil pero de carácter fuerte y perseverante, por aguantarme día a día, por las risas, y sobretodo por facilitarme las cosas leyéndose los manuales de instrucciones de los aparatos, ¡le encantan!

Un recuerdo especial a mi otro "lab" la gente de Aqualab. Con ellos comparto un amor especial por la *Legionella*, sus análisis y sus "ISOs". Espero que todavía continúen las merendolas para celebrar el "noséqué".

A mi *familia*, especialmente a mis padres por anteponer nuestras necesidades a las suyas. Ha sido difícil que pudierais comprender el esfuerzo que representaba tantas horas de trabajo, ordenador y de viaje cada día. Gracias por haberme enseñado los valores de la vida y haberme "hecho" como soy, ¡no sé a quien habré salido...! Por enseñarme que la constancia llega a buen puerto, y que hay que trabajar pero sobretodo disfrutar. Gracias por estos últimos meses, los peores de nuestras vidas, en los que por mala suerte tuvimos que compartir mis conocimientos sobre las infecciones. A mi padre, quien no ha podido ver esta tesis finalizada y a quien le hacía mucha ilusión. Papá, ¡brindo por lo que brindo!

A Xevi, ¡No hay palabras! Por ponerme horarios, por enseñarme a priorizar y que en la vida hay algo más que la ciencia y que todo es compatible. Gracias por tu apoyo y ánimos y sobretodo confiar en mi, aunque solamente lo hagas "*para que te retire*".

Para finalizar, recordar todas las aventuras que he vivido viniendo a Can Ruti, que sin duda han influido en el día a día de este trabajo: en tren y bus, luchando contra horarios, averías, huelgas y demás; con Carles, mi salvación durante años, ¡qué descanso de tren!; y ahora, finalmente, en mi coche, siendo autosuficiente, libre, sin horarios pero, echando a veces de menos, la siestecita del tren.

A TODOS, ¡¡¡UN MILLÓN DE GRACIAS!!!!

