

# Detecció de *Legionella* spp.: mètode oficial

## **Albert Manero i Camps**

Responsable de Secció Microbiologia

Mina Pública d'Aigües de Terrassa, S.A.

amanero@aiguesdeterrassa.es

L'any 1977, McDade va aconseguir aïllar el microorganisme responsable d'un brot de pneumònia aparegut l'any anterior durant una reunió d'ex-legionaris a Filadèlfia. L'anomenaren *Legionella pneumophila*, i aviat es constatà la dificultat d'aquest bacteri per créixer en cultius convencionals. Des de finals dels anys 70, s'han descrit medis per optimitzar el creixement de *L. pneumophila* basats en modificacions de l' Agar Mueller-Hinton, suplementat amb hemoglobina i Isovitalex (Weaver, 1978), o amb L-Cisteïna i pirofosfat fèrric (Feeley, 1978). El mateix Feeley va modificar aquest darrer medi substituint l'hidrolitzat de casseïna per extracte de llevat i el midó per carbó activat (1979). Aquest agar (CYE-Agar), va seguir rebent modificacions, com l'addició del tampó ACES (BCYE-Agar, Pasculle et al., 1980), i l'increment de la seva sensibilitat per l'addició de  $\alpha$ -cetoglutarat (BCYE- $\alpha$  Agar). Per proporcionar selectivitat al medi BCYE- $\alpha$  Agar, diversos autors van proposar diferents combinacions d'antibiòtics i inhibidors, fins a considerar-se la formada per glicina, vancomicina, polimixina B i cicloheximida la millor combinació per a l'aïllament a partir de mostres ambientals (*Legionella* GVPC Selective Agar, Dennis et al., 1984). Seguidament als nous coneixements científics, les Administracions han respost amb normatives o decrets amb l'objectiu de controlar i prevenir la legionel·losi. Primerament apareixeren protocols i monografies d'actuació i prevenció entre els anys 1991 i 1999, fins que l'any 2001 va aparèixer el *Decret 417/2000, del 27 de desembre, pel qual s'estableixen amb caràcter d'urgència les condicions tecnicosanitàries aplicables als aparells i equips de transferència de massa d'aigua en corrent d'aire amb producció d'aerosols per a la prevenció de la legionel·losi*. Posteriorment, es va aprovar el *Reial Decret 909/2001, del 27 de juliol, pel qual s'estableixen els criteris higienicosanitaris per a la prevenció i control de la Legionel·losi*, ampliant la seva aplicació a tots els aparells que acumulen aigua i puguin produir aerosols. Més tard, el *Decret 152/2002, de 28 de maig, pel qual s'estableixen les condicions higienicosanitàries per a la prevenció i control de la Legionel·losi*, va complementar la normativa bàsica i va donar cobertura jurídica a les actuacions entorn a la prevenció de la legionel·losi. Per tal d'incloure els nous coneixements de la malaltia i de l'ecologia d'aquest microorganisme, el passat més de juliol del 2003 es va aprovar el *Reial Decret 865/2003, que deroga l'anterior*. És en l'Annex 4 d'aquest decret on es cita la norma ISO 11731 *Water quality-Detection and enumeration of Legionella*, com a mètode de referència a utilitzar per l'aïllament de *Legionella* en torres de refrigeració i condensadors evaporatius.

Aquesta normativa descriu un mètode quantitatiu d'aïllament en cultiu aplicable a tot tipus d'aigua així com als sediments associats. El principi del mètode es basa en una concentració inicial de la mostra per filtració en membrana o centrifugació. Per tal d'eliminar part de la flora acompanyant, a dues al·lotes de la mostra concentrada se'ls aplica un tractament àcid i un tractament tèrmic respectivament. Tant la mostra sense tractament com les tractades són utilitzades per inocular sobre el medi selectiu GVPC. En aquelles mostres amb presumptes altes concentracions de *Legionella*, el mateix procés es realitza a partir de la mostra sense concentrar. La concentració per filtració es du a terme mitjançant filtres de policarbonat, i es treballa amb un litre de mostra si és possible. En cas de mostres amb alta turbidesa, es treballa preferiblement mitjançant la centrifugació. La ressuspensió dels microorganismes concentrats a la membrana (o *pellet* en cas de centrifugació) es realitza mitjançant l'elució en 2-25 ml de solució salina estèril i posterior agitació o sonicació.

El tractament tèrmic consisteix en aplicar a una al·lota de la mostra una temperatura de  $50 \pm 1^\circ \text{C}$  durant  $30 \pm 2$  min. Per realitzar el tractament àcid, s'aplica un tampó àcid pH  $2,2 \pm 0,2$  durant  $5 \pm 0,5$  minuts. Cada al·lota de la mostra (tractades i sense tractar) és utilitzada per inocular per separat entre 100 i 500  $\mu\text{l}$  sobre plaques del medi GVPC. La incubació de les plaques s'allarga fins uns 10 dies a  $36 \pm 1^\circ \text{C}$ , en una atmosfera humida i preferiblement enriquida amb un 2,5% de  $\text{CO}_2$ . És recomanable examinar les plaques cada 2-4 dies durant la incubació, donat que sovint el creixement de *Legionella* es veu emmascarat pel d'altres microorganismes. Les colònies típiques de *Legionella* solen ser d'una coloració blanc blavosa, però en algunes ocasions poden presentar altres coloracions. Moltes espècies presenten autofluorescència sota llum ultraviolada, i en concret *Legionella pneumophila* la presenta de color verd grogós. Un cop detectades les presumptes colònies de *Legionella*, cal realitzar confirmacions sobre els medis BCYE i BCYE-Cys (el mateix medi però sense Cisteïna). La característica del gènere *Legionella* de no poder créixer en absència de l'aminoàcid Cisteïna, fa que les colònies que presentaven la morfologia característica sobre el medi GVPC, que creixen sobre BCYE i no creixen sobre BCYE-Cys siguin considerades com a *Legionella* sp.

Per aquelles mostres que es vulgui quantificar la presència de diferents espècies del gènere, o bé els diferents serogrups de *Legionella pneumophila*, es poden utilitzar mètodes serològics de diferents tipus.

Finalment, alhora d'expressar els resultats, cal escollir el valor més alt obtingut a partir dels diferents tractaments i no fer la mitjana, així com tenir en compte el nombre de colònies de les diferents morfologies i les concentracions i dilucions que s'han produït al llarg del mètode.