

Detecció de *Legionella* spp.: mètode oficial

ISO 11731

Albert Manero i Camps

Mina Pública d'Aigües de Terrassa S.A.



Aigües de Terrassa



INTRODUCCIÓ

1. Medis descrits per l'aïllament de *Legionella*.
2. Marc legal: Normatives i Decrets.



Aigües de Terrassa

Medis descrits per l'aïllament de *Legionella*.

1. Medis utilitzats per a l'aïllament de *Legionella*.

2. Marc legal: Normatives i Decrets.

- x 1977: McDade, primer aïllament de *Legionella*.
- x 1978: Weaver, Agar Mueller-Hinton + hemoglobina + Isovitalex.
- x 1978: Feeley, Agar Mueller-Hinton + L-Cisteïna + pirofosfat.
- x 1979: Feeley, + extracte de llevat + carbó activat = **CYE Agar**
- x 1980: Pascuelle, + ACES + a-cetoglutarat = **BCYE-a Agar**



1984: Dennis, + glicina + vancomicina + polimixina B + cicloheximida = **GVPC Agar**



Marc legal: Normatives i Decrets.

1. Medis utilitzats per a l'aïllament de *Legionella*.

2. Marc legal: Normatives i Decrets.

- × **1991-1999:** protocols i monografies d'actuació i prevenció.
- × **2001: Decret 417/2000**, *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.*
- × **2001: Reial Decret 909/2001**, *pel qual s'estableixen els criteris higienicosanitaris per a la prevenció i control de la Legionel·losi.*
- × **2002: Decret 152/2002**, *pel qual s'estableixen les condicions higienicosanitàries per a la prevenció i control de la Legionel·losi*
- × **2003: Reial Decret 865/2003.**



ISO 11731 *Water quality-Detection and enumeration of Legionella.*



ISO 11731

1. Breu descripció del mètode.
2. Principi del mètode:
 1. Concentració.
 2. Descontaminació.
 3. Sembra i incubació.
 4. Lectura plaques.
 5. Confirmació.
 6. Identificació d'espècie i serogrupat.
 7. Expressió de resultats.



1. Breu descripció del mètode.

2. Principi del mètode.

Concentració

Descontaminació

Sembra i incubació

Lectura plaques

Confirmació

Identificació

Expressió resultats

- ✘ **Mètode quantitatiu d'aïllament per cultiu en medi selectiu i confirmacions posteriors.**
- ✘ **Aplicable a tot tipus d'aigua (de consum, industrial, natural), així com a materials associats com sediments.**



Principi del mètode

1. Breu descripció del mètode.

2. Principi del mètode.

Concentració

Descontaminació
Sembrar i incubació
Lectura plaques
Confirmació
Identificació
Expressió resultats

Concentració:



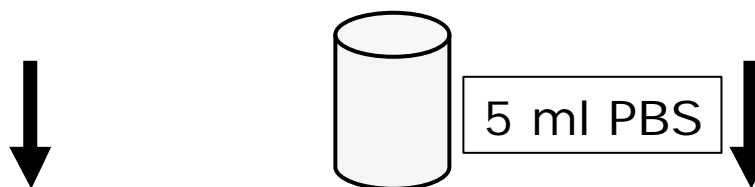
Filtració en membrana de polycarbonat 0.45 mm



Mostres tèrboles

Centrifugació

6000 g 10 min/3000 g 30 min



Agitació/sonicació

Ressuspensió dels microorganismes en 2-25 ml de solució salina



Principi del mètode

Descontaminació:

1. Breu descripció del mètode.

2. Principi del mètode.

Concentració

Descontaminació

Sembra i incubació

Lectura plaques

Confirmació

Identificació

Expressió resultats



Mostra concentrada
5 ml p.e.

0,9 ml

1 ml

Tractament àcid

0,1 ml tampó àcid 10x
5 ± 0,5 min

Tractament tèrmic

50 ± 1° C, 30 ± 2 min



Principi del mètode

Sembra i incubació:



Mostra concentrada
5 ml p.e.

1. Breu descripció del mètode.

2. Principi del mètode.

Concentració

Descontaminació

Sembra i incubació

Lectura plaques

Confirmació

Identificació

Expressió resultats

Submostra 1
(sense tractament)

0,1-0,5 ml



GVPC

Submostra 2
(tractament tèrmic)

0,1-0,5 ml



GVPC

Submostra 3
(tractament àcid)

0,1-0,5 ml



GVPC

Incubar 10 dies a 36 °C (humitat, 2,5% CO₂)



Principi del mètode

Sembra i incubació: mostres amb alta càrrega

1. Breu descripció del mètode.

2. Principi del mètode.

Concentració

Descontaminació

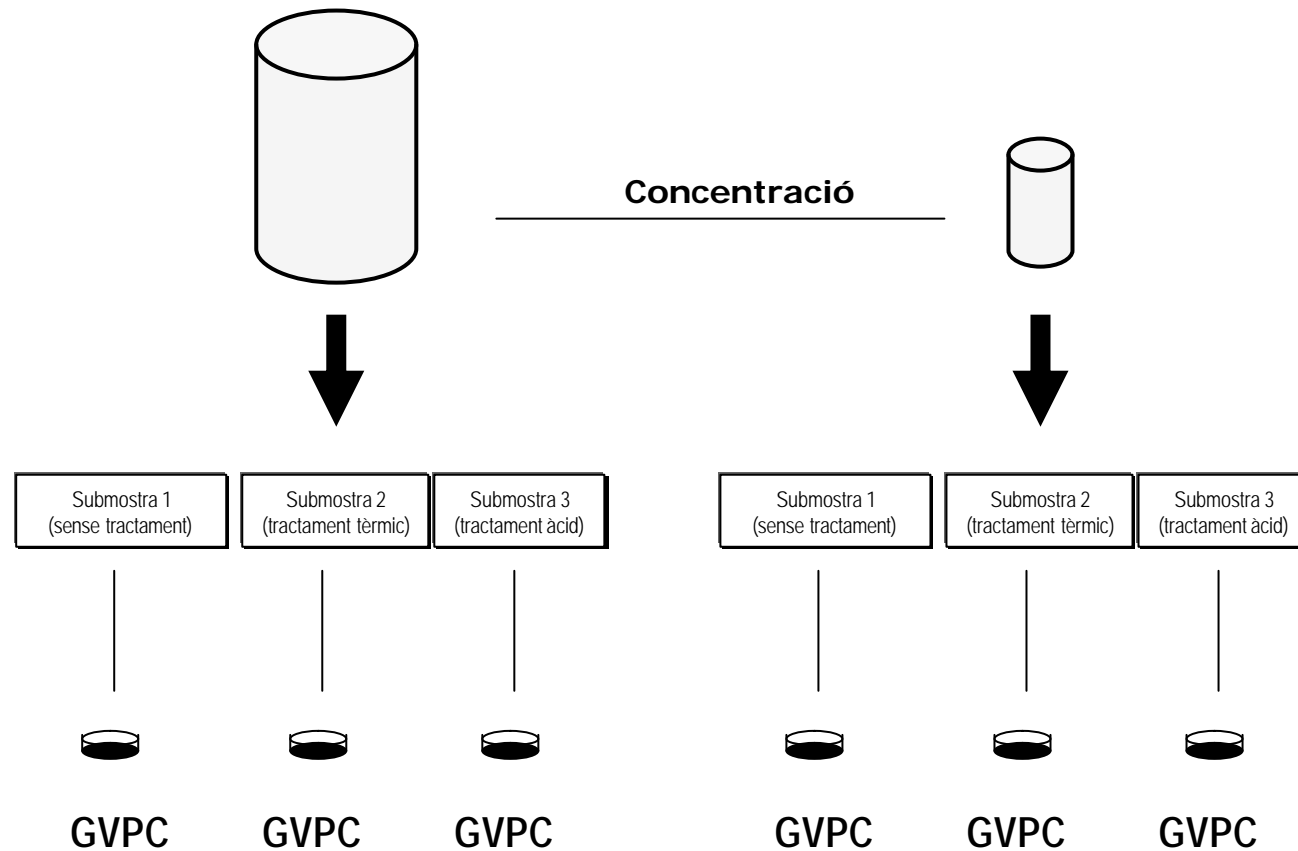
Sembra i incubació

Lectura plaques

Confirmació

Identificació

Expressió resultats



Lectura plaques:

1. Breu descripció del mètode.

2. Principi del mètode.

Concentració

Descontaminació

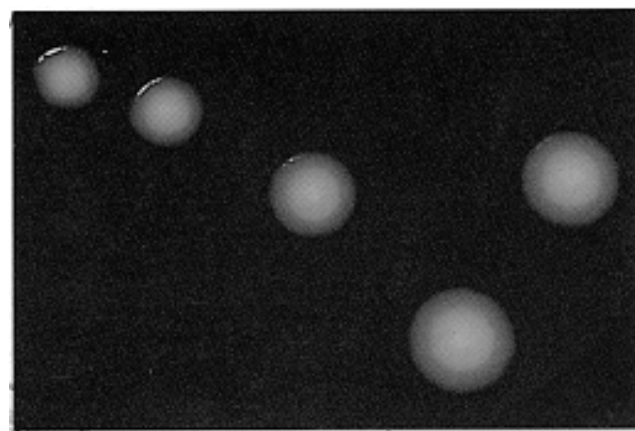
Sembra i incubació

Lectura plaques

Confirmació

Identificació

Expressió resultats



Morfologia:

Colònia 2-3 mm.

Color blanc-blavós o grisós.

Aparença

Fluorescència sota U.V.

Examinar plaques cada 2-4 dies



Principi del mètode

1. Breu descripció del mètode.

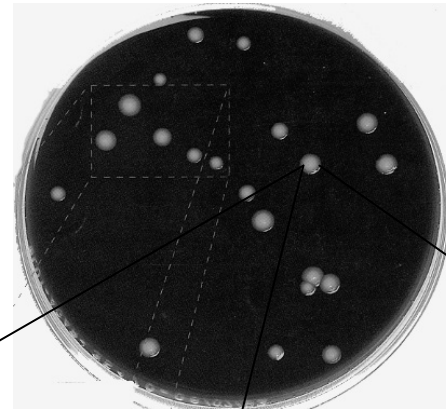
2. Principi del mètode.

- Concentració
- Descontaminació
- Sembra i incubació
- Lectura plaques

Confirmació

- Identificació
- Expressió resultats

Confirmació:



Medi BCYE amb Cisteïna

POSITIU

Medi BCYE sense Cisteïna

NEGATIU

Agar Sang (no Cisteïna)

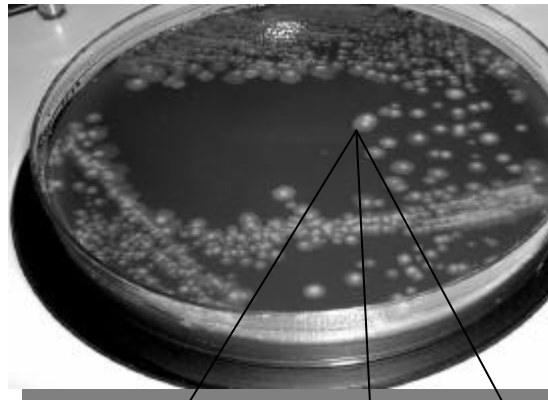
NEGATIU

Legionella sp.



Principi del mètode

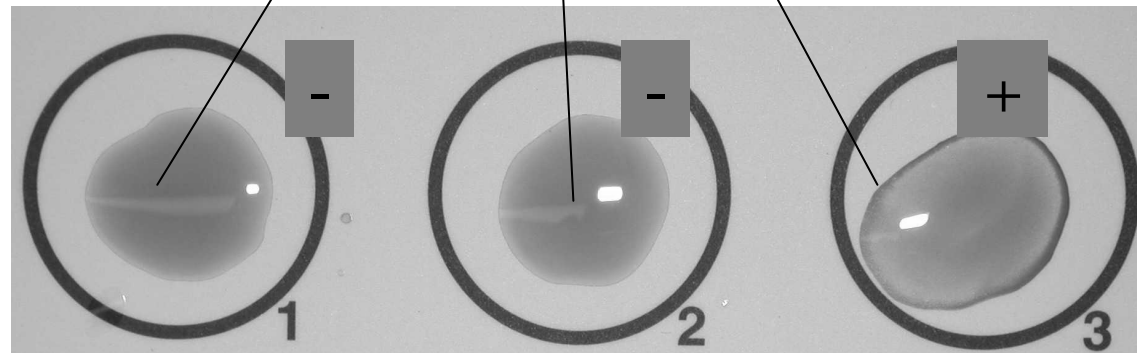
Identificació d'espècie i serogrupat:



Medi BCYE amb Cisteïna



Identificació serològica



Legionella spp.

L. pneumophila
Serogrup 1

L. pneumophila
Serogrup 2-14

1. Breu descripció del mètode.

2. Principi del mètode.

- Concentració
- Descontaminació
- Sembra i incubació
- Lectura plaques
- Confirmació
- Identificació
- Expressió resultats



Expressió resultats:

1. Breu descripció del mètode.

2. Principi del mètode.

Concentració
Descontaminació
Sembra i incubació
Lectura plaques
Confirmació
Identificació
Expressió resultats

- ☰ UFC/L
- ☰ Placa GVPC amb major nombre confirmat.
- ☰ Estimar nombre de mostra original:
 - Mostra concentrada/no concentrada
 - Volum concentrat
 - Tractament
 - Volum sembrat



ISO 11731



Aigües de Terrassa

Laboratori d'Anàlisi d'Aigües Potables i Residuals

Establiment Tècnic Auxiliar de l'Agència Catalana de l'Aigua
Registrat com a Laboratori de Salut Ambiental i Alimentària

Pàgina 1 de 1

RESULTATS

Paràmetres	Unitats	Nivell Guia	Conc. Màxima Admissible	Resultats 2003002382	Mètode d'assaig
CARÀCTERS MICROBIOLÒGICS					
R. Legionella spp. no pneumophila *	UFC/1 l	-	-	<25	P17PN114
R. Legionella pneumophila, serogrup 1 *	UFC/1 l	-	-	50	P17PN114
R. Legionella pneumophila, serogrup 2-14*	UFC/1 l	-	-	<25	P17PN114

CARÀCTERS MICROBIOLÒGICS

R. Legionella spp. no pneumophila *	UFC/1 l	-	-	<25	P17PN114
R. Legionella pneumophila, serogrup 1 *	UFC/1 l	-	-	50	P17PN114
R. Legionella pneumophila, serogrup 2-14*	UFC/1 l	-	-	<25	P17PN114

Observacions del tècnic :

Responsable Secció Aigües Potables

Eva Tusell i Ossourd
Llda. en Ciències Biològiques
Col. núm 20186-C

Terrassa, 16 de juliol de 2003
Directora Tècnica Laboratori

Marta Brull i Fontserè
Llda. en Farmàcia
Col. núm 6.421

L'informe dels resultats analítics només afecta a la mostra analitzada.
L'informe d'assaig no es podrà reproduir parcialment sense l'aprovació per escrit del laboratori d'Aigües de Terrassa.
El laboratori d'Aigües de Terrassa té a disposició dels clients les incerteses dels mètodes dins de l'abast d'acreditació.
*Mètode no contemplat a l'abast acreditat per ENAC (num. 331/LE672)



Mina Pública d'Aigües de Terrassa S.A.

Carrer del Nord, 88 - 08221 Terrassa (Barcelona) - Tel. 93 736 28 31 - Fax 93 785 51 68
www.aiguedeterrassa.es - direccio@aiguedeterrassa.es



Aigües de Terrassa



Aigües de Terrassa

www.aiguesdeterrassa.es

amanero@aiguesdeterrassa.es

Tel. 93 736 28 31