

Tasa de detección de *Legionella spp.* en muestras ambientales mediante el uso de técnicas rápidas

Juan Carlos Montero
Álvaro Díaz
Eva Alejandres
Javier Castro
Carmen Bayón

Introducción

Difícil cultivo en el Laboratorio

Crecimiento lento.

Requerimientos nutricionales exigentes

- L Cys.
- Hierro.
- Aminoácidos.

Amplia distribución en medios acuáticos estancados o remansados

Nutrientes raros en agua dulce.

Si estuvieran presentes, crecerían competidores de *Legionella* de crecimiento rápido.

AMBIENTE INTRACELULAR

Este aspecto relaciona íntimamente a *Legionella* con los protozoos de vida libre como parásito intracelular.

Introducción

R.D. 865/03 que establecen criterios higiénico – sanitarios para la prevención y control de la legionelosis.

Análisis realizado según la norma ISO 11731, 1998. Water quality - detection and enumeration of *Legionella*. (UNE-ISO 11731, 2007).

Almacenamiento.

Siembra.

Concentración.

Incubación.

Descontaminación.

Confirmación

El único método oficial según la norma ISO es el cultivo en placa.



Limitaciones del recuento en placa de *Legionella spp* (UNE-ISO 11731, 2007)

Yu, 1990; Prats, 2002

Es una bacteria de crecimiento lento (comienzan a verse colonias sobre el quinto día). Aerobia estricta y capnófila, necesita un medio rico en aminoácidos, principal fuente de obtención de energía de este microorganismo. Debido a su lento crecimiento, muchas veces es imposible de aislar debido a la microbiota acompañante.

Cotuk, A. *et al.*, 2005; Amin A. *et al.*, 2013; Gao M.S. *et al.*, 2011

En ocasiones, la propia microbiota acompañante puede incluso inhibir el crecimiento de *Legionella*. Un claro ejemplo lo encontramos en múltiples especies del género *Aeromonas*. Diversos ensayos sugieren además que la presencia de algunos microorganismos en la muestra no disminuye la viabilidad de *Legionella* pero sí su cultivabilidad, lo que indica que la presencia de microbiota autóctona puede llevar a resultados dispares cuando los análisis de aguas se realizan solamente por cultivo.

Lee *et al.* 2002; Bartram *et al.* 2007

Método diseñado originalmente para *Legionella pneumophila*, no todas las especies del género *Legionella* tienen iguales crecimientos en el medio selectivo (GVPC)

Lück PC, 2004

GVPC inhibe algunas cepas de *Legionella pneumophila*

Adenike *et al.*, 1996

Cada vez son más las especies de LLAPs (Patógenos de amebas muy similares genéticamente a *Legionella*) descubiertas que no crecen en cultivo pero sí pueden detectarse por otros métodos.

Akira Ono, 2003

Puede darse una pérdida de cultivabilidad de *Legionella* después de la recolección de la muestra y en el tratamiento de la misma (calor, ácido, restricción de nutrientes, etc).

Chang CW, 2007

Puede darse una pérdida de cultivabilidad de *Legionella* tras la aplicación de un tratamiento de desinfección.

Borges, 2012

Ocasionalmente se ha reportado en el estado de la técnica la presencia de colonias similares de otras especies (familia Chitinofagaceae), que siendo computadas como *Legionella* en realidad no lo son.

Bentham, 2000

La variabilidad de resultados puede ser elevada.

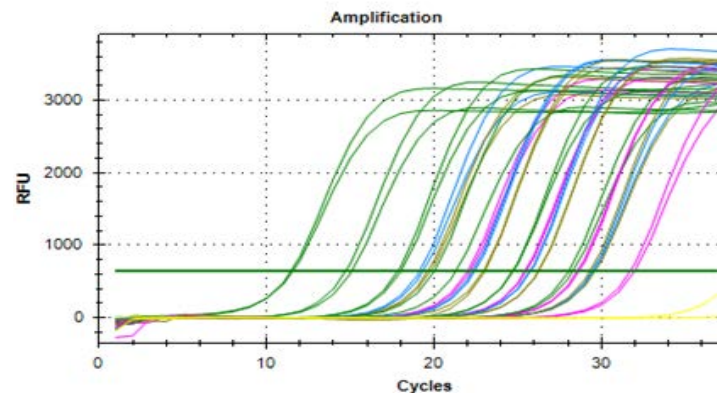
Tabla 1.- Limitaciones descritas en la documentación bibliográfica asociadas al recuento en placa de *Legionella spp.* siguiendo la normativa vigente.

Introducción

qPCR

Reacción en cadena de la Polimerasa. ISO/TS 12869:2012 (Water quality – Detection and quantification of *Legionella* spp. and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

General testing conditions	Expression of the results	Technical protocol for the characterization and the validation of the method
Procedure	Test report	Quality controls
Concentration DNA extraction DNA amplification Quantitative detection		



Limitaciones del recuento de *Legionella spp* mediante PCR cuantitativa

Whiley H. &
Taylor M.,
2014; Lee *et al.*, 2011

No existe una equivalencia clara entre los resultados obtenidos por PCR (expresados en Unidades Genómicas) y los de cultivo (expresados en Unidades Formadoras de Colonias). Siendo estos últimos los utilizados para establecer los niveles de acción en las legislaciones nacionales, así como en las guías europeas y en las de

ANSES
Request No.
2009-SA-
330, 2011

Debido a la falta de una correspondencia con las UFC tampoco hay una relación consolidada del valor de UG con el riesgo de legionelosis, por lo que la interpretación del resultado con el fin de tomar una decisión sobre la instalación es complicada. La solución sería establecer niveles de actuación específicos para resultados de PCR.

Wilson D. *et al.*, 2004

El DNA debe ser extraído mediante el uso de kits de extracción y/o ciclos frío/calor. Pese a los diversos kits de extracción existentes, esta etapa puede presentar una variabilidad significativa en cuanto a la recuperación de esta bio-molécula, antes de su amplificación. La pérdida de material durante el proceso se reduce si éste se automatiza, pero aumenta considerablemente el coste por ensayo.

AFNOR: NF-
T90-471,
2010

El DNA se desnaturaliza durante el proceso por lo que no estará disponible para una confirmación posterior. Además, es imposible diferenciar células vivas de muertas, ya que el DNA se amplificará igualmente.

Catalan *et al.*,
1997

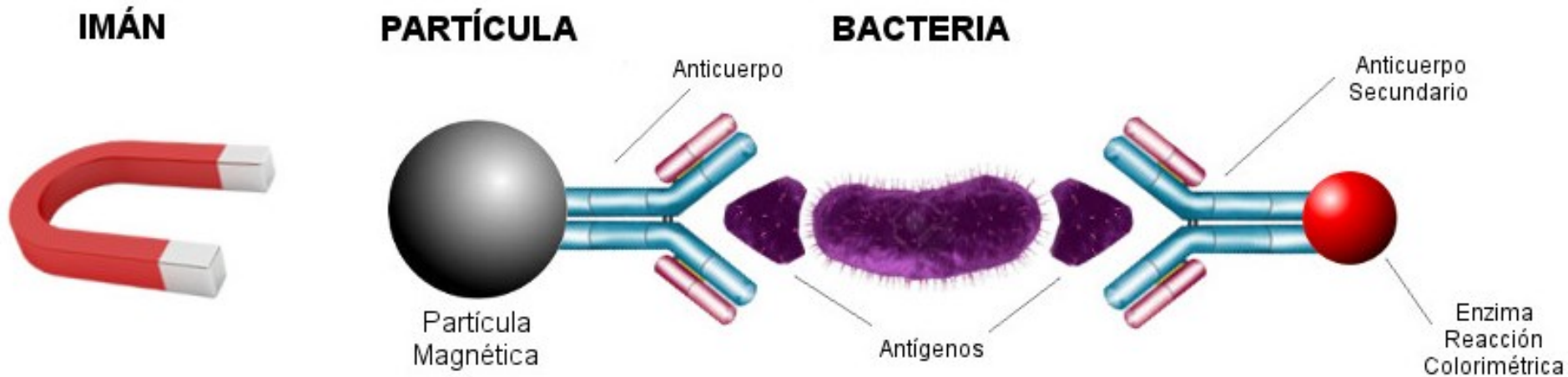
Podemos hallar presencia de inhibidores competitivos en la reacción que nos den como resultado falsos negativos. Para muestras sucias, sobre todo aguas en reutilización, la presencia de materiales metálicos o materia orgánica en suspensión tiene elevadas probabilidades de arrojar resultados falsos negativos.

Yang S. &
Rothman R.E.,
2004

Es un método caro y que requiere un instrumental especializado y un operario altamente cualificado para ser desarrollado con fluidez.

Tabla 2.- Limitaciones descritas en la documentación bibliográfica asociadas al recuento de *Legionella spp.* mediante PCR cuantitativa.

Introducción



- ❑ Enzimoimmunoensayo combinado con una retención magnética del microorganismo diana.
- ❑ Cuantificación mediante método colorimétrico.
- ❑ Resultado en U.F.C

Limitaciones:

- Bacteria no disponible para posteriores estudios.
- Se desconocen otras por el momento.



Objetivo

Comparar efectividad y eficiencia de los métodos rápidos de detección y recuento de *Legionella* spp frente al método de la norma ISO 11731, 1998. (Water quality – detection and enumeration of *Legionella*. UNE-ISO 11731, 2007) para tener elementos objetivos que permitan tomar decisiones respecto a su implantación en un laboratorio de salud pública.

Metodología (Madrid)

- ▶ Se realizó un experimento con 20 muestras de 250 mL cada una, desglosadas de la siguiente manera:
 - Un control negativo.
 - Una muestra con 10^3 UFC de *Legionella* spp. (Bioréference, Eurofins, France).
 - Seis muestras con 10^3 UFC de *Legionella* spp. más un conjunto de microbiota interferente conocida, divididas en dos bloques.
 - 3 muestras adicionadas con Mix 1: *P. aeruginosa*, *E. faecalis* y *E. coli*.
 - 3 muestras adicionadas con Mix 2: *P. aeruginosa* y Ascomycetes.
 - Seis concentrados de muestras ambientales procedentes de torres de refrigeración positivas (MA¹, MA², MA³, MA⁴, MA⁵, MA⁶).
 - Las seis muestras anteriores adicionadas con 10^3 UFC de *Legionella* spp.

Identificación	SIM log UFC	+/-	Cultivo log UFC	+/-
CN	ND	-	ND	-
L. spp (10 ²)	3.37	+	3.52	+
L. spp (10 ³) + MIX 1	2.45	+	ND	-
L. spp (10 ³) + MIX 1	3.15	+	ND	-
L. spp (10 ³) + MIX 1	3.51	+	ND	-
L. spp (10 ³) + MIX 2	3.26	+	3.00	+
L. spp (10 ³) + MIX 2	3.67	+	3.48	+
L. spp (10 ³) + MIX 2	3.67	+	NA	+
MA ₁	0.37	-	ND	-
MA ₂	2.68	+	ND	-
MA ₃	2.57	+	ND	-
MA ₄	3.32	+	4.36	+
MA ₅	2.57	+	ND	-
MA ₆	1.98	+	3.04	+
L. spp (10 ³) + MA ₁	2.86	+	2.54	+
L. spp (10 ³) + MA ₂	2.94	+	3.60	+
L. spp (10 ³) + MA ₃	3.08	+	3.00	+
L. spp (10 ³) + MA ₄	2.57	+	3.30	+
L. spp (10 ³) + MA ₅	3.01	+	3.58	+
L. spp (10 ³) + MA ₆	3.21	+	3.40	+

Tabla 3.- Resultados del experimento Cultivo – SIM realizado en la Comunidad de Madrid.

Resultados (Madrid)

		Separación Inmunomagnética		
		Positivo	Negativo	Total
Cultivo	Positivo	13	0	13
	Negativo	6	1	7
	Total	19	1	20

Tabla 4.- Tabla de contingencia relacionando positivos – negativos de cultivo en placa y SIM.

Resultados (Madrid)

Separación Inmunomagnética

Cultivo	Separación Inmunomagnética			Total
		Acción $\geq 10^4$ UFC I -1	Alerta $\geq 10^3$ UFC I -1	
Acción $\geq 10^4$ UFC I -1	0	1	0	1
Alerta $\geq 10^3$ UFC I -1	0	7	2	9
Satisfactorio $< 10^3$ UFC I -1	0	3	7	10
Total	0	11	9	20

Tabla 4.- Tabla de contingencia relacionando los resultados por niveles de acción de cultivo en placa y SIM.

Metodología (Castilla - La Mancha)

Primer estudio:

14 muestras inoculadas con *Legionella* spp. (Bioréference, Eurofins, France).

- Niveles de dopaje realizados:
 - 5 muestras 10^4
 - 5 muestras 10^3
 - 4 muestras 10^2

4 muestras naturales provenientes de torres de refrigeración.

Estas 18 muestras de 2 litros se procesaron por PCR y Separación Inmunomagnética.

Metodología (Castilla - La Mancha)

Segundo estudio:

65 muestras naturales provenientes de diferentes equipos e instalaciones para analizar la máxima variabilidad de los métodos.

Agua sanitaria (caliente y fría)

Torres de refrigeración

Nebulizadores

Balnearios

Estas muestras, también de 2 litros, se concentraron mediante filtración en 20 mL, de los cuales se utilizaron:

10 mL para PCR

9 mL para Separación inmunomagnética

1 mL restante para cultivo en placa (sin tratamiento)

Resultados (Castilla - La Mancha)

				Separación Inmunomagnética			Total
				Acción	Alerta	Satisfactorio	
Legionella spp		Sanitaria	Torres	$\geq 10^4$ UFC/vol	$\geq 10^3$ UFC/vol	$< 10^3$ UFC/vol	
				qPCR	Acción	$\geq 10^5$ UG/vol	$\geq 10^6$ UG/vol
Alerta	$\geq 10^4$ UG/vol	$\geq 10^5$ UG/vol	0		2	1	3
Satisfactorio	$< 10^4$ UG/vol	$< 10^5$ UG/vol	1		5	62	68
Total				11	9	2	74/83 (89%)

Tabla 5.- Tabla de contingencia relacionando los resultados por niveles de actuación de qPCR y SIM.

Resultados (Castilla - La Mancha)

		Separación Inmunomagnética			Total
		Acción	Alerta	Satisfactorio	
Legionella spp		$\geq 10^4$ CFU l ⁻¹	$\geq 10^3$ CFU l ⁻¹	$< 10^3$ CFU l ⁻¹	
Cultivo	Acción	$\geq 10^4$ CFU l ⁻¹	0	0	0
	Alerta	$\geq 10^3$ CFU l ⁻¹	0	2	1
	Satisfactorio	$< 10^3$ CFU l ⁻¹	1	2	59
Total			1	4	60
					61/65 (94%)

Tabla 6.- Tabla de contingencia relacionando los resultados por niveles de actuación de cultivo en placa y SIM.

Resultados (Castilla - La Mancha)

		qPCR			Total	
		Acción	Alerta	Satisfactorio		
Legionella spp	Sanitaria	$\geq 10^5$ UG/vol	$\geq 10^4$ UG/vol	$< 10^4$ UG/vol		
	Torres	$\geq 10^6$ GU l ⁻¹	$\geq 10^5$ GU l ⁻¹	$< 10^5$ GU l ⁻¹		
Cultivo	Acción	$\geq 10^4$ CFU l ⁻¹	0	0	0	
	Alerta	$\geq 10^3$ CFU l ⁻¹	0	0	3	
	Satisfactorio	$< 10^3$ CFU l ⁻¹	0	1	61	
Total			0	1	64	61/65 (94%)

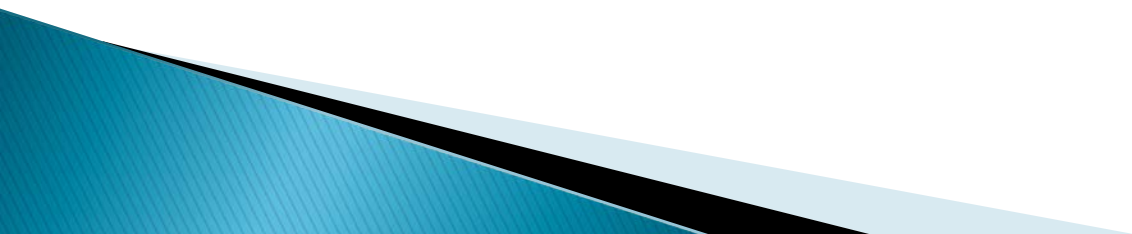
Tabla 7.- Tabla de contingencia relacionando los resultados por niveles de actuación de cultivo en placa y qPCR.

Conclusiones

- ❑ Los resultados de los métodos analizados presentan un porcentaje de coincidencia frente a nivel de actuación cercano al 90%.
- ❑ Los métodos alternativos utilizados muestran ser tanto o más efectivos para la detección de *Legionella* spp. en muestras de rutina que el método de referencia.
 - La elección de uno u otro se debe motivar en otro tipo de elementos tales como coste, objetivos del análisis, disponibilidad de medios y personal o el tipo de muestras gestionadas en el laboratorio.
- ❑ Frente a muestras muy sucias el método que peor respuesta presenta es el cultivo en placa, debido principalmente a la presencia de microbiota interferente.
- ❑ En el caso de qPCR, esta suciedad puede provocar inhibiciones en la detección, debido a sustancias presentes en la muestra.

Agradecimientos





Resultados (Castilla - La Mancha)

Matriz	Número de muestras por cultivo		Número de muestras por qPCR	
	Con microbiota	Sin microbiota	Con inhibición	Sin inhibición
Torres de refrigeración				
Detectado	3*	0	0	6
No detectado	6	7	1	13
Agua sanitaria fría/caliente				
Detectado	2	2	0	12
No detectado	13	32	7**	26
total	24	41	1	57

* Número de muestras

** Cuatro de ellas inhibidas de forma parcial, inhibiéndose sólo una réplica

Tabla 8.- Impacto de interferentes (microbiota, inhibidores/suciedad) en los resultados obtenidos por cultivo y qPCR.