

Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

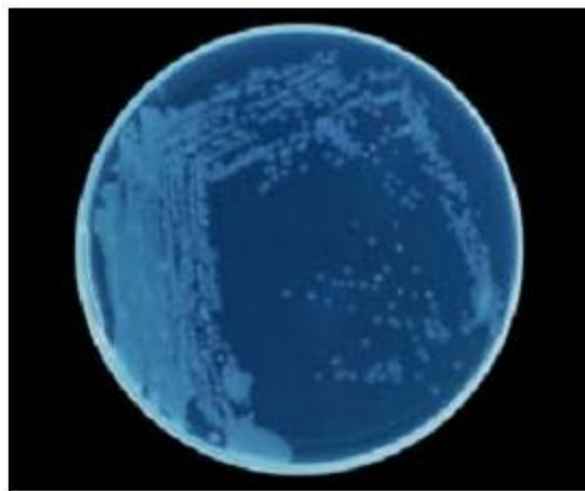
MCC P/A	COSMETIKIT®	DRY PLATES®	MUGPLUS
CRIOTECA®	CHROMOSALM	DESINFECTEST®	CCCNT
PLAQUIS®	KITPRO-PLUS	CROMOKIT®	MBS
M-IDENT®	SEILAGUA®	SALMOQUICK	AIREANO
NEOGRAM	ENVIROCOUNT		

MONOGRAFÍA *Legionella y Legionella pneumophila*

1-El microorganismo y su interrelación con el ser humano

El género *Legionella* comprende diversas especies de bacilos Gram negativos, oxidasa positivos, de vida acuática, entre otras: *Legionella pneumophila*, *L.micdadei*, *L.bozemanii*, *L.dumoffi*, *L.longbeachae*, *L.jordanis*, *L.gormanii*, *L.anisa*, *L.feelei*, *L.sainthelensi*, *L.erythra*, *L.hacklaie*, *L.tucsonensis*... Las especies de *Legionella* sólo crecen en presencia de cisteína y hierro (medios de cultivo con L-cisteína hidrocloreto y pirofosfato férrico). El Agar extracto de levadura con carbón vegetal suele usarse como medio básico, al que se le añaden varios suplementos según el uso sea para muestras clínicas o ambientales. Aún en medios suplementados, la *Legionella* crece despacio (hasta 14 días), por lo que suele ser sobrepasada en el cultivo mixto por otras bacterias de crecimiento más rápido.

La especie *Legionella pneumophila* es el agente causal tanto de la neumonía (Enfermedad del legionario, así llamadas tanto la enfermedad como el género, porque se descubrió en una convención de legionarios en Canadá) como de la fiebre de Pontiac, males tristemente extendidos por todos los países de clima templado a causa de torres de refrigeración y sistemas de acondicionamiento mal mantenidos. Afecta a personas inmunodeprimidas sobre todo, en general a personas mayores de 50 años. Desde los picos de finales del siglo pasado, con continuos brotes que acababan con varios muertos por cada brote y nos tenían aterrizados a todos como nos ha tenido recientemente el COVID-19 (ya que se contagia por el aire, en las microgotas de agua de duchas, fuentes, invernaderos y aires acondicionados), la incidencia ha descendido considerablemente gracias a las medidas específicas tomadas por la legislación y su continuo control de torres de refrigeración, fuentes ornamentales y hasta aguas de consumo (en incluso piscinas en CCAA como la de Madrid).



L. pneumophila crece con colonias típicas (gris azuladas) en el medio más habitual para ella (GVPC) y emite fluorescencia verdosa bajo

luz UVA de 366 nm. Pero dado que su bacdive es muy variable en casi todas las pruebas bioquímicas y enzimáticas (de ahí que no haya medios cromogénicos para ella), debe confirmarse inmunológicamente (mal llamado “serológicamente” en las Normas ISO).

2-Los tipos de productos donde la legislación exige su búsqueda o recuento, así como otros tipos de productos donde a nuestro criterio, sería recomendable analizarlos

-Aguas de torres de refrigeración (edificios públicos y privados, hospitales, empresas...), fuentes públicas, aguas de consumo, piscinas...

-No se busca activamente en el aire (su vía de contagio), aunque se puede encontrar perfectamente con un muestreador de aire y medio GVPC si se activa, por ejemplo, junto a una ducha abierta que la contenga. Somos testigos y protagonistas de ello en aquellos tiempos en los que la Legionella campaba por tantísimos hoteles estacionales.

-Es preocupante la proliferación cada vez mayor de sistemas de refresco ambiental por agua pulverizada en parques temáticos, invernaderos y restaurantes al aire libre.

3-Los métodos oficiales para su detección/recuento

La implantación oficial en países desarrollados de la Norma ISO 11731 (desde 1998, versión actual de 2017), y en España desde el R.D. 865/2003, acabó con el caos (por ejemplo, las decenas de brotes en España que se sucedían año tras año en numerosas ciudades).

La última versión de la ISO 11731 exige el uso del agar selectivo GVPC (o bien MWY) tras filtración de 1 L de agua, BCYE (con y sin antibióticos) para confirmación, y el uso de kits inmunológicos de confirmación definitiva (que pueden ser indistintamente látex, antisueros para inmunofluorescencia, inmunocromatogramas...)

4-Los métodos alternativos que mejoran la rapidez de los resultados y la robustez del análisis

MICROKIT diseñó desde Noviembre de 1997 un **kit Presencia/Ausencia** para enriquecimiento selectivo de Legionella en 500 ml de agua. El medio era una modificación en caldo del BCYE+GVPC ISO 11731 con carbón activo granulado, lo que le confería la transparencia necesaria. La ausencia de Agar permitía también su utilización como Caldo de Enriquecimiento Selectivo Directo sin necesidad de filtración, ahorrando la manipulación y el riesgo de generación de aerosoles propios de la filtración de membrana. Su concentración, permitía su uso en 1000 ml de agua. Se leía por el cambio en la turbidez en las muestras positivas. Probablemente fue el kit más vendido de MICROKIT de todos los tiempos y tuvimos que implantar dos turnos de producción para satisfacer todas las demandas de los clientes. Tras el imperativo legal R.D. 865/2003, que cambió la búsqueda de su presencia y exigió



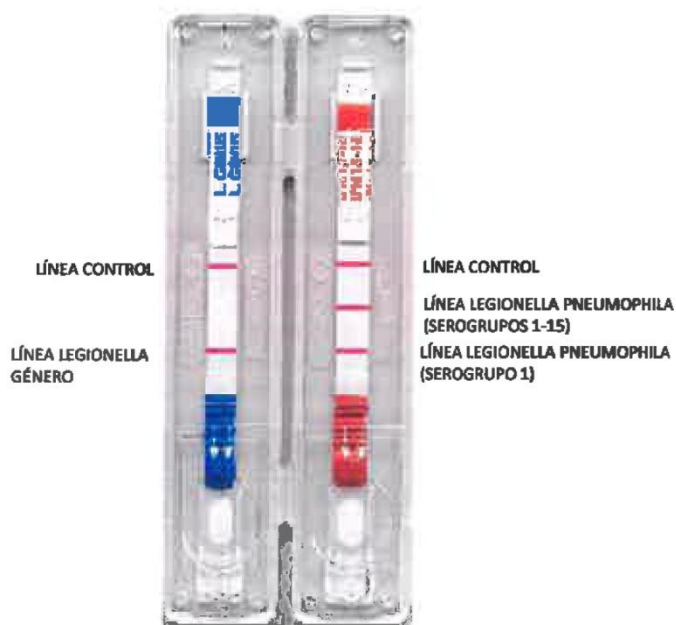
efectuar recuentos de *Legionella pneumophila*, (aunque completamente diferentes respecto a otros países como USA, NZ o UE), el kit dejó de tener sentido, pero se readaptó para ser usado sólo como caldo revitalizante; para evitar multiplicación celular, se comprobó que aplicándolo al agua de muestra durante su transporte al laboratorio (hasta 24 horas a 25°C aprox) y siguiendo después el método ISO 11731 por filtración, no había multiplicación celular pero sí detección incluso para recuentos con sólo 40 ± 10 ufc/l. Incubaciones a temperaturas mayores o menos prolongadas no dan buenos resultados. Este método, seguido de siembra en BCYE +GVPC Agar, recupera contundentemente más Legionella que el método ISO 11731 por filtración de membrana sin previa revitalización de las células subletales (no vivificables): 77,50% de sensibilidad frente al 41,61% del método ISO estricto (sin este paso previo de revitalización). El límite de detección en los laboratorios acreditados con el método ISO 11731, de cerca de hasta 200-800 ufc/l, mejora a, incluso, 40 ± 10 ufc/l si intercalamos el caldo Legionella MICROKIT durante 12-24 horas a 25°C.

Confirmación de colonias sospechosas.

Aunque no es un método alternativo y está dentro de la Norma ISO 11731, queremos destacar aquí la gran aportación actual de MICROKIT en Legionella. Fue la puesta en escena para el mercado medioambiental, desde 2009, de un kit que solo se conocía en hospitales para confirmar las colonias, gracias a un

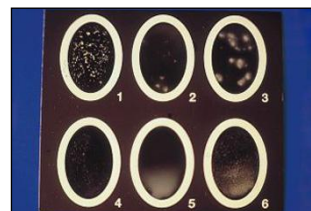
acuerdo de distribución exclusiva con el fabricante en este mercado medioambiental, acuerdo que no todos los distribuidores de clínica respetan, colándose en nuestro mercado, saltándose a la torera los acuerdos y tirando así a la basura nuestro gran esfuerzo por darlo a conocer y sobre todo: conseguir que fuese aceptado por las entidades acreditadoras, desde hace 11 años, en el mercado medioambiental. Rogamos a los clientes que lean esto y lo compren, pero no a nosotros, que lo hagan: es de Ley, además de ser

lo moralmente correcto. Se trata del **Virapid-Legionella**, un inmunocromatograma que presenta grandes ventajas sobre los látex: robustez, independencia de la época del año para dar resultados objetivos (los látex en verano suelen deteriorarse en su transporte, dando resultados falsamente negativos o confusos), fiabilidad avalada por una validación mediante tesis doctoral, posibilidad de guardar muestroteca de los kits, ya que sus resultados permanecen durante décadas... y lo más importante: lo mismo que los látex se tuvieron que adaptar a los nuevos hallazgos de cepas patógenas del serogrupo 16 cambiando su fabricación para añadir éste, ahora deberían adaptarse de nuevo ante cualquier otro nuevo serogrupo que se detectase, mientras Virapid-Legionella no lo necesitó, ni lo necesitará, porque su



mecanismo de detección en la colonia es diferente: Todas las *Legionella spp*, todas las *Legionella pneumophila* (cualquier serogrupo conocido o desconocido) y las *Legionella pneumophila* del serogrupo 1; de modo que si aparece la banda 1, hay *Legionella spp*; si además aparece la banda 2, hay *L.pneumophila*; y si además aparece la banda 3 hay *Legionella pneumophila* serogrupo 1, mientras si no aparece la banda 3 pero sí la 2, es *Legionella pneumophila* serogrupos 1-16 (o 17, 18... conforme vayan apareciendo los nuevos).

Otra de nuestras aportaciones (tampoco es un método alternativo y sigue la Norma ISO 11731) es la importación de Canadá desde 1997 de los 13 **látex policlonales de los serogrupos 2 al 14** para los laboratorios de referencia que deben serogruper perfectamente todas las cepas detectadas aunque no sean del serogrupo 1.



Y nuestra ultima aportación: los **maletines portátiles Genecount** para uso en laboratorio y en casa del cliente, capaces de detectar su recuento por PCR en tiempo real en **sólo 3 horas**, sin personal especialmente cualificado; lo que permite un antes y un después en la detección y recuento de *Legionella spp.* y de *Legionella pneumophila*: ir a las instalaciones de cada cliente y decirle en sólo 3 horas si tienen o no tienen problemas, para así erradicarlos. También importados de Canadá: se nota donde “nació” la Legionella (o al menos su conocimiento por parte del ser humano).

LUMINULTRA®
microbial monitoring



5-Cómo vemos el futuro en la detección de este grupo

Algún día, todos los laboratorios tendrán un maletín portátil Genecount. Mientras tanto, muchos seguirán cambiando de los látex de confirmación de colonias, al Virapid Legionella.