

# **P**rocedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades  
Infecciosas y Microbiología Clínica

**20.**

Diagnóstico microbiológico  
y  
control de la legionelosis

2 0 0 5

**Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón**

**Coordinador: Carmen Pelaz Antolín**

**Autores: Vicente Ausina  
Vicente Catalán  
Emilia Cercenado  
Carmen Pelaz Antolín**



ISBN: 84-609-9044-3

## INDICE:

### ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Introducción
2. Manifestaciones clínicas y tratamiento
3. Epidemiología
4. Ecología y transmisión de la bacteria
5. Diagnóstico microbiológico de las infecciones causadas por *Legionella*
  - 5.1. Definición de caso
  - 5.2. Cultivo e identificación de *Legionella*
  - 5.3. Detección de *Legionella* por inmunofluorescencia directa
  - 5.4. Diagnóstico serológico
  - 5.5. Detección de antígeno de *Legionella pneumophila* en muestras de orina
  - 5.6. Detección de *Legionella* en muestras clínicas con técnicas de PCR
6. Prevención y control de la legionelosis
  - 6.1. Medidas generales de prevención y control
  - 6.2. Prevención y control de legionelosis en hospitales
    - 6.2.1. Circunstancias favorecedoras de la legionelosis hospitalaria
    - 6.2.2. Fuentes de exposición hospitalarias
  - 6.3. Detección de *Legionella* en muestras de agua
    - 6.3.1. Cultivo e identificación de *Legionella* en muestras de agua
    - 6.3.2. Detección de antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1 en muestras de agua
    - 6.3.3. Detección de *Legionella* en muestras de agua por técnicas de PCR
  - 6.4. Investigación de brotes de legionelosis
    - 6.4.1. Definición de brote
    - 6.4.2. Creación de un grupo de trabajo
    - 6.4.3. Estudio epidemiológico
- 6.4.4. Estudio ambiental**
  - 6.4.5. Formulación de hipótesis
  - 6.4.6. Medidas a tomar
  - 6.4.7. Estudios de epidemiología molecular
- 6.4.8. Elaboración de un informe**
7. Bibliografía

### DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-LP-01. Detección de *Legionella* en muestras clínicas mediante cultivo
2. PNT-LP-02. Detección de *Legionella* en muestras de agua mediante cultivo
3. PNT-LP-03. Identificación de los aislados de *Legionella*
4. PNT-LP-04. Detección de anticuerpos frente a *Legionella pneumophila* en suero mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI)
5. PNT-LP-05. Detección de antígeno de *Legionella pneumophila* en orina
6. PNT-LP-06. Procedimientos para la prevención y control de la legionelosis en los hospitales
7. PNT-LP-07. Tipificación molecular de *Legionella pneumophila* mediante polimorfismo de fragmentos de ADN amplificados (AFLP)

### ÍNDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. Propósito y alcance
2. Fundamento
3. Documentos de consulta
4. Muestras
5. Reactivos
6. Aparatos y material
7. Procedimiento
8. Obtención y expresión de resultados
9. Responsabilidades
10. Anotaciones al procedimiento
11. Limitaciones del procedimiento
12. Bibliografía
13. Anexos

# **P**rocedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades

Infecciosas y Microbiología Clínica

**Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón**

## **20.DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO Y CONTROL DE LA LEGIONELOSIS. 2005**

**Coordinador: Carmen Pelaz Antolín**

**Autores: Vicente Ausina  
Vicente Catalán  
Emilia Cercenado  
Carmen Pelaz Antolín**

## 1. INTRODUCCIÓN

La familia *Legionellaceae* incluye un género, *Legionella*, que a su vez engloba 48 especies y más de 70 serogrupos. Más de la mitad de las especies han causado patología en el hombre, pero *Legionella pneumophila* origina más del 90% de las infecciones. *L. pneumophila* comprende 16 serogrupos, siendo el serogrupo 1 el más frecuentemente aislado en pacientes (más del 80 % de los casos confirmados).

*Legionella* es un bacilo gramnegativo ampliamente distribuido en ambientes acuáticos naturales y artificiales, y además, es un parásito intracelular de amebas y otros protozoos de agua dulce, en los que utiliza un mecanismo de multiplicación intracelular similar al usado en las células del organismo humano. La enfermedad se produce cuando individuos susceptibles inhalan la bacteria contenida en aerosoles procedentes de una fuente ambiental contaminada.

## 2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y TRATAMIENTO

La legionelosis puede tener dos presentaciones clínicas diferentes: la enfermedad del legionario y la Fiebre de Pontiac. En la primera, la enfermedad suele manifestarse como una neumonía, aunque el espectro clínico puede variar desde una enfermedad leve-moderada hasta la enfermedad grave con fallo multiorgánico. La Fiebre de Pontiac, es una enfermedad autolimitada que da lugar a un cuadro clínico similar al de la gripe.

La neumonía causada por *Legionella* es clínicamente indistinguible de otras neumonías y se caracteriza por un período de incubación que oscila entre 2 y 10 días, aunque este periodo podría ser algo mayor. El comienzo de la enfermedad suele ser abrupto, con fiebre alta, malestar general, debilidad, mialgias, dolor de cabeza y tos inicialmente no productiva, y frecuentemente requiere hospitalización. El patrón radiológico también es similar al de otras neumonías, siendo común el infiltrado alveolar. Por tanto, el diagnóstico de la enfermedad debe realizarse por métodos microbiológicos. Las manifestaciones extrapulmonares generalmente incluyen confusión, diarrea y dolor pleural, a veces los primeros síntomas son diarrea, dolor muscular y moderada cefalea. La enfermedad puede llegar a cursar con confusión mental e insuficiencia respiratoria y renal.

El tratamiento de los pacientes con antimicrobianos, generalmente macrólidos o quinolonas, es eficaz, y en pacientes hospitalizados con neumonía comunitaria el tratamiento empírico debería incluir fármacos eficaces frente a *L. pneumophila*, ya que el retraso en la aplicación de un tratamiento adecuado se ha asociado con un aumento de la mortalidad de la enfermedad.

## 3. EPIDEMIOLOGÍA

Los datos sobre la incidencia de la neumonía por *L. pneumophila* son variables, suponiendo del 2 al 15 % de las neumonías comunitarias que requieren hospitalización. Estas diferencias parecen depender

del lugar geográfico y del grupo de pacientes investigados, habiéndose observado también fluctuaciones temporales. Es más frecuente en personas entre 40 y 70 años, aunque cada vez se detectan más casos en personas más jóvenes. Es dos a tres veces más frecuente en varones que en mujeres y es rara en niños. El riesgo de contraer la enfermedad depende del estado de salud de las personas afectadas, aumentando el riesgo en inmunodeprimidos, diabéticos, pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, en personas de edad avanzada, así como en fumadores y alcohólicos.

La legionelosis puede adquirirse en el hospital y en la comunidad. Dentro de la legionelosis hospitalaria se pueden definir los casos en tres niveles según el grado de información epidemiológica y microbiológica: (i) Brote cuando se producen dos o más casos relacionados epidemiológicamente en el mismo hospital. (ii) Casos agrupados cuando éstos se producen sin coincidir en el tiempo. (iii) Casos esporádicos cuando éstos se producen de forma aislada en el tiempo. En la comunidad, también se puede presentar la enfermedad en forma de brotes, casos agrupados (asociados a la misma instalación o edificio sin coincidir en el tiempo) y casos esporádicos, y la adquisición de la enfermedad puede estar asociada a instalaciones de varios tipos de edificios, incluyendo los hoteles.

En los últimos años se ha producido un notable incremento del diagnóstico de casos y brotes de legionelosis, tanto en nuestro país, como en el resto del mundo. Sin embargo, la precocidad en el diagnóstico, debido a la utilización de pruebas de detección de antígeno en orina, ha determinado una disminución de la mortalidad de la enfermedad.

En España, la legionelosis es una enfermedad de declaración obligatoria desde 1995 (Real Decreto 2210/1995 de 28 de diciembre). Los casos y los brotes de legionelosis identificados en el Estado español se declaran desde los Servicios de Vigilancia Epidemiológica de las Comunidades Autónomas al Centro Nacional de Epidemiología, a través de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. La información sobre el número de casos diagnosticados se completa con datos del estudio epidemiológico relacionado con su aparición, tanto en el ámbito comunitario como en el nosocomial. El número de casos y brotes notificado a la mencionada Red ha sufrido una tendencia creciente en nuestro país. En 2000 se declararon 752 casos (tasa de 1,91 por 100.000 habitantes) y en 2004 la cifra ascendió a 1.074 casos (2,62 por 100.000). Los brotes declarados también aumentaron. En el quinquenio 2000-2004 se notificaron 184 brotes en los que resultaron afectadas 1.825 personas, mientras que en el quinquenio anterior (1994-1999) las cifras fueron 43 brotes y 483 casos. Estos datos proceden del Centro Nacional de Epidemiología.

#### 4. ECOLOGÍA Y TRANSMISIÓN DE LA BACTERIA

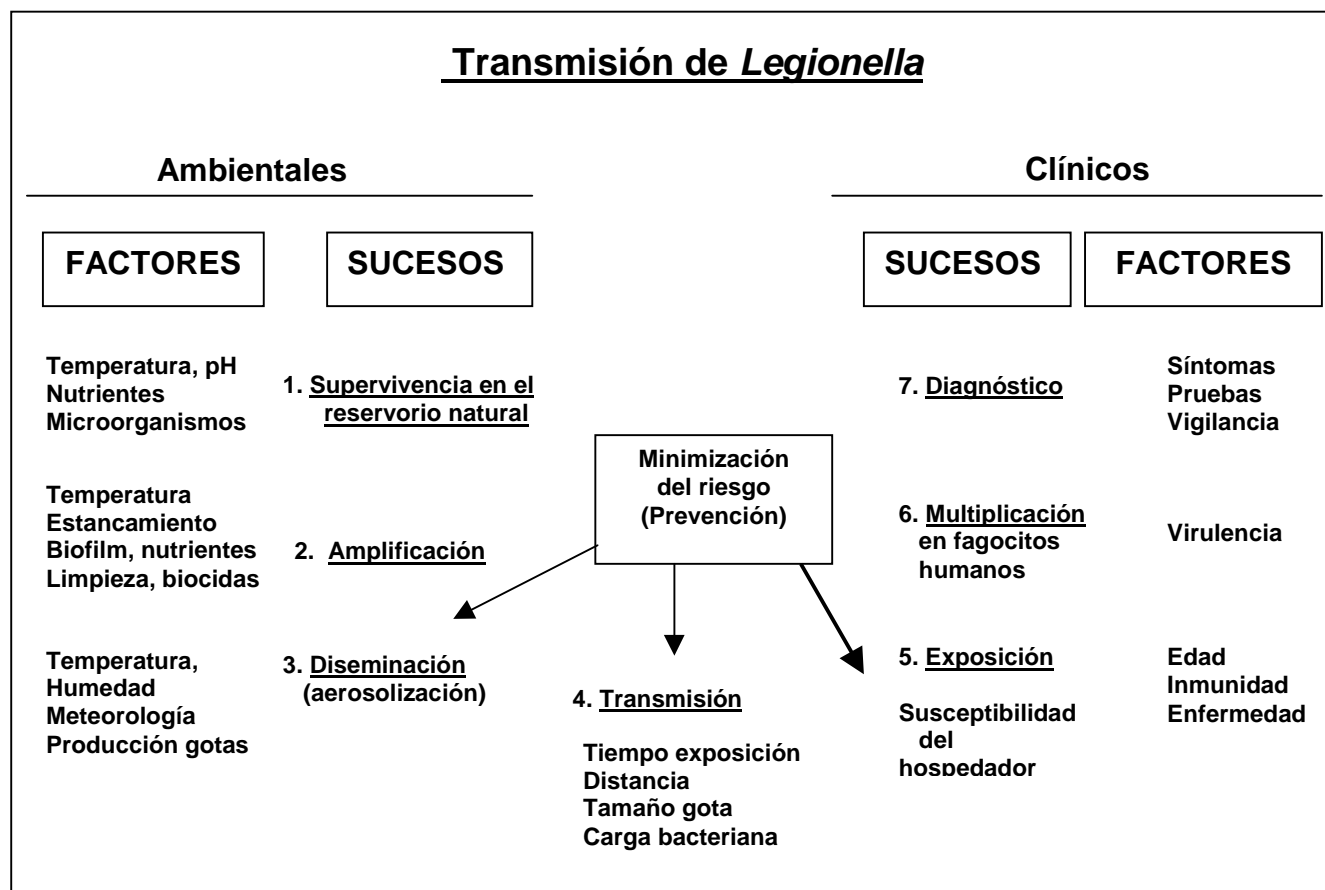
*Legionella* es una bacteria que se encuentra ampliamente distribuida en los ecosistemas acuáticos de todo el mundo (como ríos, lagos, fuentes termales, tierra húmeda y lodos, agua de lluvia, etc.), donde es capaz de sobrevivir en un amplio rango de condiciones físico-químicas. Sin embargo, la mayor parte de los casos de legionelosis se asocian a ambientes acuáticos creados o manipulados por el hombre, en los que la temperatura del agua se encuentra por encima de la temperatura ambiente. *Legionella* es una bacteria termotolerante, capaz de multiplicarse entre los 20 y 45°C; puede sobrevivir entre los 40 y 60°C, inactivándose por encima de los 70°C.

La transmisión de *Legionella* es aérea y la vía de entrada al organismo humano es a través del sistema respiratorio, fundamentalmente mediante la inhalación de aerosoles (dispersión de gotas de agua

en el aire) conteniendo la bacteria, generados por sistemas de agua contaminados. En ocasiones se ha considerado la microaspiración de agua contaminada para justificar algunos casos de legionelosis nosocomial. No se ha demostrado la transmisión de la bacteria persona a persona, ni se ha documentado la existencia de reservorios animales.

El conocimiento del nicho ecológico de *Legionella* proporciona una información de gran utilidad para entender la transmisión de la bacteria, siendo este el primer paso para abordar el control de su diseminación. Aunque *Legionella* es una bacteria ampliamente distribuida en ambientes acuáticos, su presencia en un sistema de agua no es suficiente para implicar a una cepa como agente causal de infección. La aparición de la enfermedad depende de una serie de requisitos encadenados que se ven favorecidos por una serie de factores, como se detalla en la Figura 1.

**Figura 1.** Requisitos y factores que intervienen en la transmisión de *Legionella* (Adaptado de en ASHRAE 2000)



Por otra parte, *Legionella* consigue nutrientes en su hábitat natural que son aportados por otros microorganismos: bacterias (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*), amebas, protozoos ciliados y otros, que en el caso de los sistemas de agua, como cañerías, acumuladores e interiores de las torres de refrigeración, se hallan dentro de biocapas (biofilms) que recubren las superficies. Las amebas y protozoos se consideran hospedadores naturales y

amplificadores de *Legionella* spp. Hasta ahora se conocen cinco géneros de amebas (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmanella*, *Vahlkamphia* y *Echinamoeba*) y un género de protozoo (*Tetrahymena*) capaces de permitir el crecimiento intracelular de *L. pneumophila*.

Además, las biocapas integran algas (cianobacterias) que se adhieren a las paredes de las conducciones y depósitos de agua. La formación de biocapas se ve favorecida por el estancamiento

del agua, por la existencia de ramales o tramos ciegos de uso infrecuente, por la disminución del flujo de agua, por los materiales usados en la construcción de las cañerías o de las bombas, y por la temperatura del agua. Las biocapas facilitan el crecimiento de *Legionella*, y paralelamente la protegen frente a la acción de los biocidas y las técnicas de prevención aplicadas contra ella, como son el hipercalentamiento o la hipercloración.

En la literatura científica aparecen recogidas una variedad de instalaciones relacionadas con casos/brotos de legionelosis, como son la red de distribución de agua sanitaria (caliente o fría), de edificios como hospitales y hoteles, torres de refrigeración o condensadores evaporativos, equipos de terapia respiratoria, piscinas climatizadas con movimiento de agua, aguas termales en centros de rehabilitación y recreo, cruceros, barcos, fuentes ornamentales, viviendas particulares, humidificadores, máquinas productoras de hielo, unidades de trasplantes y unidades de odontología.

## 5. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES CAUSADAS POR *Legionella*

### 5.1. DEFINICIÓN DE CASO

Según el protocolo recogido en la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, los casos de legionelosis se clasifican en:

1) Caso confirmado: caso con clínica compatible y confirmado con alguna de las siguientes pruebas de laboratorio:

- Aislamiento de cualquier especie o serogrupo de *Legionella* a partir de secreciones respiratorias, tejido pulmonar o sangre.
- Seroconversión: aumento del título de anticuerpos en 4 veces o más, en sueros tomados en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad, siempre que el título de la segunda muestra sea  $\geq 128$ , frente a *L. pneumophila* serogrupo 1, por inmunofluorescencia indirecta.
- Demostración de antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1 en orina.

2) Caso sospechoso o probable: caso con clínica compatible y/o resultado positivo en alguna de las siguientes pruebas de laboratorio consideradas presuntivas:

- Título alto de anticuerpos ( $>256$ ) frente a *L. pneumophila* serogrupo 1 en suero tomado en fase convaleciente.
- Seroconversión: aumento del título de anticuerpos en 4 veces o más, en sueros tomados en la fase aguda y convaleciente, siempre que el título de la segunda muestra sea  $\geq 128$ , frente a cualquier especie o serogrupo de *Legionella*, por inmunofluorescencia indirecta.
- Observación microscópica de cualquier especie o serogrupo de *Legionella* en extensiones de secreciones respiratorias o tejido pulmonar por inmunofluorescencia directa, utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales marcados con fluoresceína.

La definición clínica de caso es la siguiente:

- Enfermedad del legionario: enfermedad respiratoria aguda con diarrea y vómitos. La mitad de los casos pueden presentar signos focales de neumonía, fiebre alta, cefalea y mialgias y una tercera parte confusión mental o delirio.
- Fiebre de Pontiac: síndrome febril agudo y autolimitado.

### 5.2. CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE *Legionella*

El aislamiento de la bacteria en cultivo es el método de referencia y proporciona un diagnóstico de confirmación de la infección causada por *Legionella*. Es el único método disponible que permite detectar infecciones causadas por cualquiera de las especies y serogrupos de *Legionella* (aproximadamente 15-20 % de las infecciones se deben a especies o serogrupos diferentes de *L. pneumophila* serogrupo 1). Tiene como inconveniente el tiempo que tarda en crecer el microorganismo, de 3 a 10-12 días.

La sensibilidad del cultivo en muestras respiratorias oscila entre un 20 y un 80% y varía en función del tipo de muestra, siendo la especificidad del 100%. Esta baja sensibilidad se debe, entre otros, a los siguientes factores: la naturaleza de la bacteria que crece con dificultad aún en medios selectivos, la limitada supervivencia de la bacteria en las muestras clínicas, la aplicación de una terapia antibiótica previa a la toma de muestra y la experiencia microbiológica requerida para su aislamiento.

Aunque se puede considerar un método tedioso e incluso de difícil realización, es muy recomendable su utilización de forma rutinaria, ya que permite realizar posteriores estudios que ayudan a mejorar el conocimiento de la bacteria, como las investigaciones epidemiológicas para detectar las posibles fuentes de infección, o la realización de estudios de sensibilidad frente a antimicrobianos.

Las muestras recomendadas para realizar el cultivo de la bacteria incluyen secreciones respiratorias, tejido pulmonar y sangre y, en función del tipo y nivel de contaminación, pueden ser agrupadas en:

- A) Secreciones respiratorias contaminadas: esputo expectorado y muestras del tracto respiratorio inferior contaminadas con microbiota del tracto respiratorio superior, como aspirados, lavados o cepillados bronquiales.
- B) Secreciones respiratorias no contaminadas: muestras del tracto respiratorio inferior no contaminadas, como las obtenidas con cepillo telescópico y por aspiración pulmonar trasparietal.
- C) Tejidos: tejido pulmonar obtenido por biopsia o necropsia, o tejido de otros órganos.
- D) Otras muestras menos frecuentes, como líquido pleural, líquido cefalorraquídeo (LCR) o sangre.

Para el cultivo de *Legionella* se utiliza un medio específico, BCYE $\alpha$  (*buffered charcoal yeast extract* suplementado con  $\alpha$ -cetogluturato), que contiene los elementos requeridos por la bacteria, como hierro y cisteína, y un medio selectivo suplementado con antibióticos, BMPA (BCYE $\alpha$  suplementado con

polimixina, cefamandol y anisomicina). Para el primer aislamiento las placas deben incubarse a 35-37°C, en condiciones de aerobiosis y humedad, y aunque el crecimiento de la bacteria generalmente empieza a ser visible a partir del 3<sup>er</sup> día de incubación, los cultivos se deben mantener en estas condiciones 10-12 días antes de considerarlos negativos. Pequeñas cantidades de CO<sub>2</sub> (2,5-5%) pueden favorecer el crecimiento de algunas especies. Cuando se procesan muestras contaminadas (esputo) se recomiendan tratamientos de descontaminación, ya que ayudan a eliminar la microbiota acompañante y favorecen el reconocimiento de las colonias de *Legionella*. Los tratamientos utilizados son de 2 tipos, calor (50°C 30 min) y tratamiento ácido (pH de 2,2 durante 5 min).

Como la mayoría de las cepas de *Legionella* empleadas en el control de los medios de cultivo se adaptan rápidamente a los medios tras sucesivos subcultivos, se recomienda la utilización de un tejido infectado con la bacteria para comprobar el crecimiento.

Aunque el género *Legionella* comprende 48 especies y más de 70 serogrupos, la mayoría de los cultivos recuperados de muestras de pacientes pertenecen a la especie *L. pneumophila*, siendo *L. pneumophila* serogrupo 1 el que se identifica con mayor frecuencia. Se debe tener en cuenta que mientras *L. pneumophila* crece bien en los medios de cultivo utilizados, no ocurre lo mismo con otras especies, que crecen con más dificultad, requieren más tiempo y, en ocasiones pueden llegar a perderse en subcultivos sucesivos.

Las especies de *Legionella* pueden identificarse por una variedad de métodos. Estos incluyen la inmunofluorescencia (IF) con anticuerpos poli o monoclonales, aglutinación en porta o con partículas de látex, ensayos con anticuerpos género-específicos mediante *dot-blot* en colonias y amplificación específica del ADN mediante técnicas de PCR. También se pueden utilizar algunas pruebas bioquímicas, aunque no suelen ser muy útiles debido a que aportan resultados variables.

También recientemente se han desarrollado métodos de secuenciación de fragmentos de genes, utilizando como dianas el gen 16S ribosomal o el gen *mip* (*macrophage infectivity potentiator*). La identificación se realiza por comparación de la secuencia obtenida con las secuencias conocidas e incluidas en las bases de datos de secuencias existentes. En el caso del fragmento 16S ribosomal se utiliza la base de datos "Gene Bank Database" ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) y en el caso del gen *mip* la base de datos del EWGLI ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)).

### 5.3. DETECCIÓN DE *Legionella* POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

La microscopía directa con anticuerpos fluorescentes es un método rápido y fue el primer método diagnóstico usado para detectar *Legionella* en tejido pulmonar y secreciones respiratorias. La inmunofluorescencia directa es un procedimiento de tinción que permite detectar con rapidez la presencia de cualquier serogrupo de *L. pneumophila* en

muestras clínicas. Se realiza con reactivos polivalentes, algunos de los cuales están disponibles comercialmente. Estos reactivos contienen un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer todos los serogrupos de *L. pneumophila*. Los anticuerpos, marcados con fluoresceína, se unen a los antígenos de la pared de *L. pneumophila*, un posterior lavado elimina los anticuerpos no fijados y al examinar la extensión con un microscopio de fluorescencia se puede observar la fluorescencia en la pared de estas bacterias.

Su realización está indicada cuando interese alcanzar un diagnóstico etiológico rápido en una neumonía o en otra infección sospechosa de estar causada por *Legionella*. La sensibilidad del método oscila entre el 25 y el 75% siendo la especificidad del 95%. Sin embargo, es un método que tiene muchas limitaciones por lo que debe interpretarse con cautela. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de que el paciente esté infectado por *Legionella* y un resultado positivo debe interpretarse como un diagnóstico presuntivo. Por ello, actualmente no se recomienda su utilización como único método diagnóstico.

### 5.4. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Se han desarrollado una variedad de pruebas para detectar anticuerpos específicos en muestras de suero, incluyendo inmunofluorescencia indirecta (IFI), microaglutinación y métodos de enzimo-inmunoensayo (ELISA), así como ensayos de hemaglutinación indirecta y contra-inmuno-electroforesis. La IFI ha sido el método diagnóstico más utilizado durante años y por ello, el más evaluado, principalmente para *L. pneumophila* serogrupo 1. Las pruebas de microaglutinación presentan la ventaja de que por su facilidad de realización permiten ensayar un gran número de muestras a la vez, presentando una sensibilidad del 80% y una especificidad que oscila entre el 97 y 99%. También existen disponibles ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos frente a *Legionella*, aunque éstos no han sido suficientemente evaluados.

La IFI se realiza utilizando un sustrato antigénico de *L. pneumophila* serogrupo 1 inactivado con calor, o un pool conteniendo antígenos de varios serogrupos. Estos antígenos están comercializados, estandarizados y prefijados en los portaobjetos sobre los que se añaden diluciones seriadas del suero del paciente. La detección de anticuerpos en el suero del paciente se realiza mediante una reacción antígeno-anticuerpo que se revela con una antiglobulina humana marcada con fluoresceína, que permite la visualización de los microorganismos con un microscopio de fluorescencia. La sensibilidad de la IFI oscila entre 78-91%, siendo la especificidad del 99%.

Para la determinación del título de anticuerpos en el suero de un paciente es preferible realizar un ensayo de IFI en una pareja de sueros, tomados en la fase aguda y convalescente de la enfermedad, para demostrar una seroconversión (aumento del título al menos al cuádruple). Se considera positiva una seroconversión en la que el segundo suero

presente un título  $\geq 1/128$ . La seroconversión se produce en alrededor del 70-80% de los casos confirmados con cultivo, se puede producir en la primera semana tras el inicio de los síntomas, aunque también puede requerir de 6 semanas a 2 meses en aparecer, e incluso no producirse.

Cuando se cuenta con un suero único la interpretación de los resultados es más compleja, ya que el nivel de anticuerpos de la población general puede variar de unos lugares a otros, y en general este nivel no se conoce. Por ello, títulos superiores a 1/256 son sugerentes de enfermedad reciente o pasada, pero títulos inferiores a este valor deben considerarse negativos. Por otro lado, un resultado negativo no descarta la enfermedad, ya que en ocasiones se han detectado fallos en la producción de anticuerpos.

Para aumentar la sensibilidad es importante utilizar reactivos que detecten inmunoglobulinas totales (IgG, IgM e IgA).

Aunque la IFI ha sido una herramienta diagnóstica de gran utilidad, las limitaciones que presenta y el tiempo requerido en tener un resultado hacen que en los últimos años haya disminuido su uso, sin embargo es de gran utilidad para realizar diagnósticos retrospectivos y en investigaciones epidemiológicas.

#### 5.5. DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE *L. pneumophila* EN MUESTRAS DE ORINA

En el transcurso de un episodio neumónico por *L. pneumophila* se libera antígeno específico que puede detectarse en la orina. La detección de este antígeno ofrece un diagnóstico rápido de confirmación de neumonía por *L. pneumophila* reciente o pasada, por lo que estos ensayos se deberán realizar únicamente en presencia de un cuadro clínico compatible, o con menor sospecha clínica en el caso de brotes hospitalarios. Estas técnicas han revolucionado el diagnóstico de esta enfermedad y han mostrado ser extraordinariamente útiles, ya que permiten la detección de un mayor número de casos y la aplicación de un tratamiento antibiótico específico en las fases iniciales de la enfermedad. También permiten el reconocimiento temprano de brotes epidémicos, favoreciendo una rápida respuesta en la aplicación de medidas preventivas.

El antígeno detectado es un componente soluble del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de *Legionella*, es termoestable, y es detectable desde el inicio de la sintomatología, y en algunos casos hasta muchos meses después (en algún caso hasta más de 1 año), no viéndose los resultados claramente influenciados por la administración previa de antibióticos.

Estos antígenos se han detectado por varias técnicas, como aglutinación con partículas de látex, hemaglutinación pasiva y radioinmunoensayo (RIA). La primera técnica disponible comercialmente que demostró ser una técnica útil, sensible y específica, fue el RIA, que presentaba una sensibilidad del 60% en orina directa y del 80% en orina concentrada,

siendo la especificidad en ambos casos del 100%. La utilización de la técnica del RIA exigía disponer de instalaciones adecuadas para trabajar con isótopos radioactivos, por lo que ha sido sustituida por técnicas de enzimoimmunoensayo (EIA) de similares características, que se han incorporado a muchos laboratorios.

En la actualidad existen varias técnicas de EIA comercializadas, siendo las de Binax, Biotest y Bartels las más utilizadas. La sensibilidad empleando orina concentrada es similar en los tres EIA (80-90%), con una especificidad del 98-100%, destacando la elevada sensibilidad del EIA de Bartels empleando orina directa (60-75%), que casi permite obviar la necesidad de concentrar la orina. El diseño propio de estas técnicas y la baja incidencia de infecciones por *Legionella* en algunas áreas provoca que se tenga tendencia a acumular muestras hasta tener un número suficiente para optimizar los pocillos, con el consecuente retraso en la obtención de los resultados, lo cual atenta directamente contra la principal ventaja de estas técnicas.

Hoy día, se dispone también de una técnica de inmunocromatografía (ICT) más rápida, que ofrece resultados en 15 minutos o menos dependiendo de la concentración de antígeno en la orina. Es técnicamente menos compleja que las técnicas de EIA, no requiere equipamiento específico y se realiza de forma individualizada. Los resultados obtenidos son absolutamente equiparables con los de las técnicas de EIA en sensibilidad y especificidad, exhibiendo específicamente una concordancia global con el EIA de Binax del 98%.

Todas las técnicas descritas detectan con una gran sensibilidad el antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1, siendo además capaces de detectar "in vitro" antígeno soluble de todos los serogrupos de *L. pneumophila*. El EIA de Biotest es el único que según el fabricante tiene capacidad para detectar todos los serogrupos de *L. pneumophila*, así como otras especies de *Legionella*, aunque no garantiza la misma sensibilidad para todos los serogrupos y especies.

La capacidad de detectar antígeno de otros serogrupos está en función de las características propias de cada antígeno, como la capacidad de pasar a la orina, la cantidad excretada y su inmunogenicidad. Los antígenos de otros serogrupos de *L. pneumophila* podrían no excretarse por la orina, ya que pueden pasar a través de las paredes de los capilares glomerulares o no hacerlo, en función de su tamaño y de su carga.

Es interesante destacar que el tratamiento térmico de la orina no supone la desaparición de la positividad y sí la eliminación de falsos positivos en muestras negativas. También es importante conocer que la concentración del antígeno presente en la orina por ultrafiltración selectiva incrementa significativamente la sensibilidad sin que se vea afectada la especificidad.



## 5.6. DETECCIÓN DE *Legionella* EN MUESTRAS CLÍNICAS POR TÉCNICAS DE PCR

La gran ventaja que presenta el aislamiento en cultivo como método de referencia es la disponibilidad del microorganismo, lo cual permite la realización de posteriores estudios de caracterización con fines taxonómicos y epidemiológicos. Sin embargo, el aislamiento en cultivo de este microorganismo presenta una serie de dificultades como son: 1) La pérdida progresiva de viabilidad de la bacteria tras la toma de muestra. 2) El enmascaramiento de las colonias cuando se procesan muestras contaminadas (esputo), donde el éxito en el aislamiento de la bacteria está correlacionado con el número de estos microorganismos presentes en la muestra. 3) El tiempo requerido para la obtención de los resultados, que en ocasiones es alto.

Para solventar estos inconvenientes, en los últimos tiempos, se han desarrollado métodos diagnósticos basados en la detección de ADN de *Legionella* en muestras humanas, utilizando métodos de hibridación con sondas génicas específicas o basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción de PCR consiste en la amplificación "in vitro" de ADN o ARN mediante la acción de una ADN polimerasa termorresistente (Taq polimerasa), a partir de una secuencia definida de una cadena de ADN utilizada como punto de inicio. Aunque estas técnicas han revolucionado en los últimos años el campo diagnóstico de las enfermedades infecciosas debido a su gran rapidez, sensibilidad, especificidad y versatilidad, sin embargo, en el caso de *Legionella*, los primeros ensayos no cumplieron las expectativas y en alguna ocasión una vez comercializados fueron retirados del mercado. A pesar de estos inicios poco prometedores, se han desarrollado métodos dirigidos principalmente a tres dianas del cromosoma bacteriano: el gen *mip* (*macrophage infectivity potentiator*) y los genes 5S rRNA y 16S rRNA del ribosoma. Los productos de amplificación se detectan mediante la visualización de los amplicones con bromuro de etidio tras su separación en geles de agarosa, mediante hibridación con sondas específicas o mediante secuenciación.

Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de la PCR convencional es que se trata de un método cualitativo, por lo que el empleo de diferentes sondas marcadas fluorogénicamente en un sistema de PCR a "tiempo real" está desplazando el uso de la PCR convencional. Este método permite la cuantificación del número de células presentes en la muestra, y además reduce el riesgo de contaminaciones y el tiempo requerido en el procesamiento de las muestras, eliminando la necesidad de un análisis posterior de los amplicones obtenidos. Si a esto 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 *Chlamydomphila pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*, el valor de esta metodología se podría

ver muy incrementado en el diagnóstico etiológico de las neumonías atípicas adquiridas en la comunidad.

Sin embargo, estos ensayos basados en la PCR son escasos y aún se encuentran en fase experimental, por lo que ninguno de ellos se utiliza en la actualidad de forma rutinaria en el diagnóstico de infecciones causadas por *Legionella*. A esto hay que añadir la presencia de inhibidores en las muestras clínicas, como hemoglobina, urea o heparina, que pueden dar lugar a la aparición de falsos negativos debidos a inhibición de la amplificación, por lo que es fundamental la preparación de la muestra de modo que se eliminen eficazmente estos inhibidores.

## 6. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA LEGIONELOSIS

### 6.1. MEDIDAS GENERALES DE PREVENCIÓN Y CONTROL

Conocer los factores que favorecen la transmisión de *Legionella* y su nicho ecológico (detallados anteriormente) proporciona una información de gran utilidad a la hora de abordar la prevención de la enfermedad. El desarrollo de la enfermedad depende principalmente de la intensidad de la exposición a aerosoles, medida por el tiempo de exposición y por la concentración de la bacteria en el aerosol y, de la susceptibilidad de las personas expuestas. Por ello, las medidas de prevención y control de la enfermedad que se proponen van en dos direcciones, de un lado evitar las condiciones que favorecen la supervivencia y multiplicación de la bacteria, mediante la limpieza de las instalaciones y el control de la temperatura del agua, y de otro lado, controlar la eliminación de los aerosoles, evitando que su eliminación se realice en zonas muy transitadas, en lugares cercanos a ventanas o tomas de aire de otros sistemas, o en lugares donde las personas expuestas sean especialmente susceptibles.

En general, en instalaciones que acumulan agua y pueden generar aerosoles los aspectos técnicos que ayudan a minimizar la multiplicación de la bacteria se pueden resumir en, al menos, 5 puntos:

- 1) Evitar temperaturas de almacenamiento o distribución de agua comprendidas entre 25°C y 45°C.
- 2) Evitar la presencia de suciedad, la acumulación de sustratos y la formación de biocapas.
- 3) Evitar el estancamiento del agua, especialmente importante en lugares donde hay escasez de agua, en instalaciones con funcionamiento intermitente (por temporada baja, períodos vacacionales, reparaciones, etc.), así como en sistemas de agua complejos, como por ejemplo los sometidos a modificaciones.
- 4) Evitar la utilización de materiales que favorecen el crecimiento de microorganismos, o que se degraden por efecto del cloro o la temperatura, o que sean de difícil limpieza.

- 5) Poner todos los medios disponibles para que el sistema opere correctamente y en buenas condiciones de mantenimiento. Es importante introducir programas de revisión, limpieza y desinfección periódicas, así como realizar muestreos y análisis periódicos.

Para aplicar estas medidas debe organizarse un plan de mantenimiento de las instalaciones en el que es importante contemplar, al menos, los siguientes aspectos:

- 1) Cada instalación debe conocerse en su totalidad, mediante la elaboración de planos, que deben ser completos y actualizados. También se deben identificar los puntos de la instalación que presenten un riesgo de exposición a aerosoles (puntos de riesgo), teniendo en cuenta a las personas (número y estado de salud) expuestas. Todo ello para adoptar un plan de medidas encaminadas a disminuir este riesgo.
- 2) El plan de mantenimiento debe incluir una clara distribución de tareas entre personal suficientemente entrenado, y se debe establecer un sistema ágil de comunicación entre todos los responsables.
- 3) Existencia de un libro de mantenimiento actualizado en el que se registren todas las incidencias y actividades realizadas y se reflejen los resultados obtenidos.

Estos aspectos se encuentran recogidos en el Real Decreto 865/2003, en Órdenes o Decretos de prevención de legionelosis de algunas Comunidades Autónomas (Madrid, Valencia, Cataluña, Galicia, Extremadura, Navarra, Andalucía, Cantabria, detalladas en orden cronológico de su publicación), y en la norma UNE 100030 IN 2001.

## 6.2. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LEGIONELOSIS EN HOSPITALES

Se ha revisado detalladamente la prevención de legionelosis en hospitales, según la legislación vigente en nuestro país, las recomendaciones de diferentes organismos internacionales y las experiencias profesionales de Sabrià y cols.

### 6.2.1. Circunstancias favorecedoras de la legionelosis hospitalaria

En los centros sanitarios coinciden una constelación de factores que favorecen la incidencia y gravedad de las legionelosis. Se han documentado muchos brotes prolongados en hospitales, que se han atribuido a la contaminación de los sistemas de abastecimiento de agua. Muchos hospitales describen experiencias de casos o brotes sucesivos en el tiempo, que en la mayor parte de las ocasiones suelen corresponder a legionelosis nosocomial endémica, situación frecuente en la actualidad.

Actualmente se consideran muy poco probables los brotes nosocomiales asociados a torres de refrigeración, sin embargo, estas instalaciones han estado implicadas en brotes de legionelosis comunitaria, produciendo en ocasiones un elevado número de casos, por lo que también deben ser consideradas.

Concentración de enfermos de riesgo. En los hospitales hay enfermos con diferentes tipos de inmunodepresión y, por tanto, con un riesgo elevado de desarrollar formas graves de legionelosis. Los casos de legionelosis de adquisición nosocomial tienen unos costes asociados y una mortalidad más alta que los comunitarios.

Los factores que más predisponen para la adquisición de la enfermedad se concentran en el ámbito hospitalario: tratamiento inmunodepresor (terapia antirrechazo en los enfermos con trasplante de médula ósea u órgano sólido), y una serie de procesos de base, como neoplasias, quimioterapia citotóxica, diabetes, insuficiencia renal terminal y diferentes procesos que exigen el uso de glucocorticoides. Existe también un moderado incremento del riesgo en personas de más de 65 años, fumadores, pacientes con enfermedad respiratoria crónica o insuficiencia cardíaca y en los alcohólicos. En los enfermos con SIDA, aunque la incidencia de legionelosis es similar a la de la población no infectada por el VIH, la enfermedad suele ser más grave.

Algunos autores han señalado también la fuerte asociación existente entre *Legionella* y cirugía, debido a que cerca del 90% de los casos nosocomiales publicados se han producido en pacientes operados. Estos autores han indicado que las infecciones por *Legionella* aumentan con el uso de anestesia general y la intubación endotraqueal; han insistido también en el hecho de que los factores de riesgo para la legionelosis nosocomial son los mismos que los de las neumonías por aspiración.

Estructuras de soporte hidromecánico que favorecen la contaminación de las aguas. El reservorio clínico de *Legionella* en los hospitales es, con gran frecuencia, el sistema de distribución de agua sanitaria caliente, aunque también puede verse implicado el circuito de agua sanitaria fría. En los últimos años las torres de refrigeración han perdido protagonismo como origen de los casos de legionelosis nosocomial.

Los hospitales suelen ser edificios grandes, que disponen de redes de agua sanitaria caliente complejas y, a menudo, de torres de refrigeración. Si bien ambos sistemas son reservorios conocidos de infección por *Legionella*, en los últimos años la mayoría de casos esporádicos y brotes de legionelosis en hospitales se han relacionado con la exposición al agua de las redes de agua sanitaria que con frecuencia están colonizadas por *Legionella*.

Diferentes estudios han demostrado que la colonización de los sistemas de agua sanitaria de los hospitales por *Legionella* oscila entre el 12 y el 80%. Entre los factores que condicionan la contaminación de las aguas de los centros sanitarios destacan el diseño del sistema de distribución de agua sanitaria, la antigüedad del mismo, la temperatura, el pH, la composición iónica y la conductividad del agua, así como los materiales empleados para la fabricación de cañerías y válvulas. Además, el volumen, la disposición y la antigüedad de los acumuladores influyen en la concentración de *Legionella*.

Las siguientes variables han sido relacionadas con la colonización de los hospitales por *Legionella*: tamaño del hospital, presencia de acumuladores de gran tamaño, baja temperatura en los puntos periféricos del sistema de agua caliente e intercambiadores de calor antiguos.

Es también un hecho probado que uno de los factores clave de la legionelosis nosocomial es el de la amplificación del inóculo. La reapertura de tramos del circuito de agua sanitaria reparados, en los que ha hiperproliferado *Legionella*, justifican muchos de los brotes hospitalarios.

La despresurización y el consiguiente estancamiento del agua en las plantas más elevadas del hospital durante las horas de máximo consumo, o la reparación y puesta en marcha de una bomba de recirculación, son circunstancias que amplifican enormemente el inóculo bacteriano y ponen en peligro a la población hospitalaria.

Otro aspecto determinante de la colonización por *Legionella* es la temperatura de las aguas, ya que *Legionella* es termotolerante. Desde el año 1.998, el Reglamento de Instalaciones Térmicas de Edificios (RITE) (Real Decreto 1751/1998), a diferencia de otras reglamentaciones previas más tolerantes, obliga a que las temperaturas de acumulación sean como mínimo de 55°C (siendo recomendables los 60°C), de forma que en el punto más distal de la red la temperatura mínima sea de 50°C. De todos modos, las altas temperaturas influyen negativamente en la vida de las cañerías, pueden incrementar los depósitos calcáreos que facilitan la colonización por *Legionella* y disminuyen la capacidad desinfectante del cloro al facilitar su evaporación.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es la formación de biocapas en el interior de cañerías, acumuladores e interiores de las torres de refrigeración, donde *Legionella* utiliza la presencia de otros microorganismos (bacterias, amebas, protozoos ciliados y algas) para su supervivencia y multiplicación. Por ejemplo, los sistemas de distribución de agua sanitaria se hallan frecuentemente colonizadas por *Hartmannella vermiformis*. La formación de estas biocapas se ve favorecida por el estancamiento del agua, existencia de ramales o tramos ciegos de uso infrecuente, la disminución del flujo de agua, los materiales usados en la construcción de las cañerías o de las bombas, y la temperatura del agua. Las biocapas facilitan el crecimiento de *Legionella* y la protegen frente a la acción de los biocidas y las técnicas de prevención aplicadas contra ella, como son el hipercalentamiento o la hipercloración.

### **6.2.2. Fuentes de exposición hospitalarias**

El hospital ofrece múltiples fuentes potenciales de exposición. Los aerosoles más habitualmente implicados en la aparición de legionelosis nosocomial son los generados por las duchas y grifos de agua caliente de los lavabos.

La colonización orofaríngea y la aspiración de agua sanitaria podrían explicar algunos casos. Se han descrito casos asociados con el uso de

nebulizadores y equipos de terapia respiratoria, material de irrigación, piscinas de hidroterapia, equipos de extinción de incendios utilizados recientemente y cubitos de hielo producidos por máquinas situadas en plantas de hospitalización, entre otras fuentes.

Aunque las torres de refrigeración son una causa poco probable de brotes nosocomiales, éstas también deben ser consideradas.

### **6.3. DETECCIÓN DE *LEGIONELLA* EN MUESTRAS DE AGUA**

*Legionella* es una bacteria ampliamente distribuida en ambientes acuáticos, sin embargo, su presencia en un sistema de agua no es suficiente para que se produzca enfermedad.

La búsqueda de *Legionella* en una muestra de agua puede tener diferentes finalidades: 1) Detectar las fuentes de infección implicadas en brotes/casos de legionelosis. 2) Determinar la eficacia de tratamientos aplicados en instalaciones asociadas a casos, o incluidas en los planes de mantenimiento, en cumplimiento de la legislación de prevención de legionelosis vigente. 3) Conocer la situación de las instalaciones de riesgo en los hospitales en relación a *Legionella*, en cumplimiento de los programas de prevención de legionelosis, con independencia de su relación con casos.

La finalidad de estos análisis es la detección de la bacteria en la instalación a estudiar, por lo que deben optimizarse todos los pasos del procedimiento, incluyendo la toma de muestra, que será diseñada en función de la finalidad del análisis.

Un resultado negativo no excluye la presencia de la bacteria en la instalación analizada, por lo que no debe transmitir una sensación (falsa) de seguridad. Un resultado positivo debe acompañarse de una medida correctora que disminuya o elimine la bacteria.

Los métodos disponibles de detección de *Legionella* en aguas incluyen el cultivo e identificación de la bacteria, el ensayo de inmunoenzima (EIA) de similares características al utilizado en la detección de antígeno en muestras de orina, y la amplificación de un fragmento específico del genoma de la bacteria mediante técnicas de PCR.

#### **6.3.1. Cultivo e identificación de *Legionella* en muestras de agua**

El aislamiento de la bacteria en cultivo es el método de referencia y se basa en la norma ISO 11731/98. Es el único método disponible que permite detectar cualquier especie y serogrupo de *Legionella*. Se ha demostrado que *L. pneumophila* es la especie más frecuentemente recuperada de muestras ambientales, siendo la prevalencia del serogrupo 1 similar a la de la suma de otros serogrupos de *L. pneumophila*, a diferencia de lo que ocurre en humanos, donde *L. pneumophila* serogrupo 1 es el predominante.

El cultivo permite la realización de estudios posteriores, como las investigaciones epidemiológicas dirigidas a detectar las fuentes de infección causantes de los casos, ensayos de sensibilidad frente a productos biocidas y análisis

moleculares. Tiene como inconveniente el tiempo que tarda en crecer el microorganismo, de 3 a 12-15 días.

Antes de realizar el cultivo de *Legionella* a partir de muestras de agua, es necesario realizar una adecuada toma de muestra. Para su aislamiento en cultivo, al igual que ocurre en el procesamiento de muestras clínicas, estos microorganismos requieren medios específicos, como BCYE $\alpha$  que contiene los elementos requeridos por la bacteria (hierro y cisteína) y medio selectivo suplementado con antibióticos, como GVPC (BCYE $\alpha$  suplementado con glicina, vancomicina, polimixina y cicloheximida). Se obtienen colonias visibles a partir del 3<sup>o</sup>-7<sup>o</sup> día de incubación a 35-37°C y en condiciones de aerobiosis y humedad, aunque en ocasiones pueden requerir hasta 12-15 días de incubación. Pequeñas cantidades de CO<sub>2</sub> (2,5-5%) pueden favorecer el crecimiento de algunas especies. Como en las muestras de agua la concentración de *Legionella* puede ser baja, y además puede ir acompañada de otro tipo de microbiota, es necesario concentrar y reducir la microbiota acompañante presente en las muestras antes de inocular los medios de cultivo.

Los métodos de identificación de los cultivos son los mismos que los utilizados en la identificación de cultivos de origen humano.

### **6.3.2. Detección de antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1 en muestras de agua**

Se ha desarrollado un método capaz de detectar antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1 en muestras de agua mediante un ensayo de EIA, que está disponible comercialmente (Binax, Portland, USA). Aunque el mismo fabricante tiene comercializados ensayos parecidos para la determinación de antígeno en muestras de orina y muestras de agua, los ensayos no son intercambiables y cada uno de ellos debe usarse únicamente con el tipo de muestra para la que fue diseñado. Este un ensayo de EIA ofrece una alternativa rápida para la detección de antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1 en muestras de agua, tanto potable como de torres de refrigeración.

El ensayo puede realizarse en menos de 1 hora y en el mismo lugar de la toma de muestra, y se realiza en unos tubos de reacción que contienen el anticuerpo al que se añade la muestra de agua y el anticuerpo conjugado con peroxidasa. Los antígenos de *L. pneumophila* serogrupo 1 quedarán unidos por un lado a los anticuerpos de las paredes del tubo y por otro a los anticuerpos con la peroxidasa. Tras varios lavados se eliminan los antígenos no unidos, y la presencia de peroxidasa se revela añadiendo un colorante combinado con peróxido de hidrógeno. Se produce un color azul que se tornará amarillo tras la adición de la solución de parada. Finalmente se mide la intensidad del color amarillo con un espectrofotómetro, y la absorbancia leída será proporcional a la cantidad de antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1 existente.

La sensibilidad de este ensayo se ha determinado estudiando aguas en las que se inocularon

previamente concentraciones conocidas de *L. pneumophila* serogrupo 1. Así, para agua potable el límite de detección es 70 ufc/ml y el volumen de muestra recogida no debe ser inferior a 1 L. Para aguas procedentes de torres de refrigeración el límite de detección es de 800 ufc/ml con un volumen de muestra de al menos 100 ml, y de 200 ufc/ml para volúmenes no inferiores a 500 ml. No se deben recoger sedimentos ni restos de las paredes de los depósitos.

En cuanto a la especificidad del test, no se han observado reacciones cruzadas con bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella terrigena*, *Yersinia ruckeri*, *Pseudomonas aeruginosa* y diferentes especies de otros bacilos gramnegativos no fermentadores, a concentraciones superiores a 10<sup>8</sup> ufc/ensayo. La única excepción con la que se puede producir una reacción cruzada es *Pseudomonas fluorescens*.

Un resultado negativo no descarta la presencia de la bacteria en la muestra de agua analizada, ya que *L. pneumophila* serogrupo 1 podría encontrarse en concentraciones inferiores al límite de detección del método. También se produce un resultado negativo si la muestra de agua contiene una *Legionella* distinta de *L. pneumophila* serogrupo 1. Además, el método no diferencia entre bacterias vivas o muertas, por lo que no está recomendada su utilización después de la aplicación de tratamientos con biocidas, ya que se podrían obtener falsos positivos debido a la presencia de bacterias muertas.

### **6.3.3. Detección de *Legionella* en muestras de agua con técnicas de PCR**

Al igual que con las muestras clínicas, la gran ventaja que presenta el aislamiento en cultivo como método de referencia es la disponibilidad de la bacteria, para la realización de estudios posteriores. Sin embargo, también presenta una serie de inconvenientes, como son la imposibilidad de detectar bacterias viables no cultivables y el enmascaramiento de los cultivos cuando las muestras proceden de sistemas biocontaminados. Además, el tiempo requerido para la obtención de un resultado es generalmente largo de cara a la necesidad de establecer una actuación rápida ante la presencia de la bacteria.

Para salvar estas dificultades, en los últimos años también se han desarrollado métodos de detección de *Legionella* basados en la amplificación del ADN cromosómico en muestras de agua mediante PCR. Los ensayos se han dirigido fundamentalmente a las mismas dianas utilizadas con muestras respiratorias, el gen *mip* y los genes ribosómicos 5S ARNr y 16S ARNr. Básicamente, la investigación de *Legionella* por PCR se efectúa en 3 fases: 1) Concentración por filtración o centrifugación. 2) Lisis bacteriana, extracción y purificación de los ácido nucleicos. 3) Amplificación de una o varias secuencias específicas mediante PCR. La visualización de los productos amplificados se ha realizado en geles de agarosa

teñidos con bromuro de etidio o mediante hibridación o secuenciación.

Al igual que en las muestras clínicas, uno de los principales inconvenientes de la PCR convencional es que se trata de un método cualitativo. El empleo de un sistema de PCR a "tiempo real" permite la cuantificación del número de células presentes en la muestra, reduce el riesgo de contaminaciones, así como el tiempo requerido en el procesamiento de las muestras, eliminando la necesidad de un análisis posterior de los amplicones obtenidos. Recientemente se ha publicado la detección y cuantificación de *L. pneumophila* basada en la amplificación del gen *dotA* (*defective organelle trafficking*), un gen implicado en la infectividad del microorganismo.

Otro de los inconvenientes de la PCR es la imposibilidad de diferenciar entre células vivas y muertas, debido fundamentalmente a la persistencia del ADN una vez que la bacteria ha muerto. Para solventar este problema se han comenzado a emplear moléculas diana diferentes, que se emplean como marcadores de viabilidad, y uno de los mejores candidatos propuestos es el ARNm, debido principalmente a su corto tiempo de vida medio. De esta manera, mediante una reacción de PCR a tiempo real previa se puede obtener un ADNc específico, que se puede amplificar por PCR como cualquier muestra de ADN, permitiendo la detección de células con actividad metabólica, y en consecuencia, células vivas.

También la gran variedad de inhibidores de la PCR que pueden encontrarse presentes en muestras medioambientales puede dificultar su desarrollo. Se han descrito varios métodos para su eliminación como: 1) La filtración a través de resinas de exclusión molecular o de intercambio iónico como el Chelex-100® (Bio Rad), para evitar la materia orgánica y metales pesados. 2) La adición de polivinilpirrolidona para la eliminación de fenoles. 3) La separación de las células mediante partículas inmunomagnéticas. Sin embargo, actualmente no existe un método universalmente 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.

Un resultado obtenido mediante PCR convencional se debe expresar como presencia o ausencia de *Legionella* (o *L. pneumophila* en el caso de investigar la especie en lugar del género) en el volumen de agua analizado, o como el número de células de *Legionella* en el volumen de agua analizado, en el caso de una PCR cuantitativa o a "tiempo real". Además, se deberá incluir en los ensayos una serie de controles necesarios para su validación, como los que se indican a continuación:

- Control proceso positivo: consiste en una muestra de agua estéril conteniendo un número conocido de células de *L. pneumophila* que se procesa de igual modo que las muestras a analizar y que permite comprobar la eficacia de los procesos que se efectúan.

- Control de proceso negativo: consiste en una muestra de agua estéril, que se procesa de igual modo que las muestras a analizar y que permite controlar la contaminación en todos los procesos que se efectúan.

- Recta de calibrado: en el caso de la PCR a "tiempo-real", paralelamente a las muestras ensayadas se preparará una recta de calibrado, como mínimo de cinco puntos de concentración diferentes y que se analizarán por triplicado cada uno de ellos.

- Control negativo de PCR: consiste en una muestra de agua estéril que se amplifica paralelamente a las muestras y que permite garantizar la ausencia de contaminación por ADN.

- Control positivo de PCR: consiste en una muestra conteniendo un número de copias conocido del fragmento diana de *Legionella*. En el caso de PCR cuantitativa, se emplearán dos muestras con número de copias diferentes que se interpolarán en la recta de calibrado preparada.

- Control interno de inhibición (CIP): debe ser un fragmento de ADN que se amplifica con el mismo juego de cebadores que el fragmento diana, pero que tiene un tamaño diferente en el caso de la PCR convencional, o bien que hibrida con una sonda de secuencia diferente en el caso de la PCR cuantitativa o a "tiempo-real". De este modo se puede evaluar en cada muestra la presencia de inhibidores de la reacción.

La automatización del proceso de preparación de muestras, y el desarrollo de un método que permita la detección y tipificación de *L. pneumophila* serogrupo 1 en el mismo ensayo, incrementarán el valor de esta metodología.

#### 6.4. INVESTIGACIÓN DE BROTES DE LEGIONELOSIS

La aparición de varios casos de legionelosis debe hacer sospechar un origen ambiental común, debido a la proliferación y emisión de *Legionella* a partir de algún sistema contaminado. Ello debe desencadenar una rápida investigación multidisciplinar que incluya aspectos epidemiológicos, microbiológicos y ambientales, con el objetivo de identificar, en el menor tiempo posible, el foco productor de los aerosoles contaminados origen de la infección. Los resultados obtenidos en la investigación deben ser concordantes y, en cualquier caso, su valoración debe ser conjunta para orientar y garantizar una correcta interpretación de los mismos.

La aparición de un brote debe hacer reforzar las medidas de vigilancia clínica y epidemiológica de la neumonía, la disponibilidad de métodos para su diagnóstico, así como reforzar las medidas de vigilancia ambiental y la capacidad de intervención.

El estudio de un brote de legionelosis debe incluir, al menos los aspectos que se detallan a continuación.

##### 6.4.1. Definición de brote

Un brote de legionelosis se define como la aparición de 2 o más casos relacionados epidemiológicamente.

#### **6.4.2. Creación de un grupo de trabajo**

En este grupo deben participar técnicos de todos los servicios relacionados con la investigación, servicios de neumología (incluso servicios de urgencias), microbiología clínica, vigilancia epidemiológica, sanidad ambiental, y microbiología ambiental. Es importante mantener una estrecha colaboración entre todos los especialistas que intervienen y realizar reuniones periódicas para consensuar los pasos a seguir y cómo se han de realizar. En caso de que se considere necesario informar a la opinión pública, se definirá con claridad quién y cómo se informará.

#### **6.4.3. Estudio epidemiológico**

Para la definición de caso se utilizarán los criterios epidemiológicos (acotando el período de tiempo y el área geográfica implicada) y los de diagnóstico clínico y microbiológico recogidos en los protocolos de las enfermedades de declaración obligatoria de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Centro Nacional de Epidemiología).

Después de aceptar la definición de caso se procederá a realizar una encuesta epidemiológica que incluya las variables de persona, lugar y tiempo, y las variables de exposición de los pacientes a las posibles fuentes de infección. El estudio de la aparición de casos en el tiempo ayuda a determinar el período posible de exposición. La localización geográfica de los casos puede ayudar a filiar el origen del brote y a delimitar el área en el que se realizarán los estudios ambientales. Los casos pueden agruparse en función del lugar de residencia, lugar de trabajo, visitas frecuentes a lugares comunes, estancia en algún complejo concreto, como hospital, hotel, balneario, centro de ocio, o bien distribuirse heterogéneamente por todo un área geográfica.

#### **6.4.4. Estudio ambiental**

Es fundamental que los expertos comunitarios de sanidad ambiental investiguen las posibles fuentes de infección en el área geográfica relacionada con los casos, siguiendo la normativa indicada en el Real Decreto 865/2003 y en los Decretos u Órdenes publicados en la Comunidad Autónoma implicada.

La encuesta ambiental debe recoger información sobre cada instalación, sus condiciones higiénico-sanitarias y régimen de funcionamiento. Además debe recoger cualquier incidencia ocurrida en el período anterior (al menos un mes) a la aparición de los primeros casos, sobre todo las incidencias que implicaron la parada y nueva puesta en funcionamiento de la instalación.

El estudio ambiental debe incluir la toma de muestras de agua de las instalaciones revisadas, que tiene por objeto detectar la presencia de la bacteria mediante su aislamiento en cultivo y su posterior identificación.

Es importante que la toma de muestras de agua se realice lo antes posible, y siempre, antes de proceder a la aplicación de cualquier tratamiento de desinfección. Si las muestras de agua se toman pasadas 48-72 horas desde la aparición de los primeros casos, no se tiene la seguridad de que la

toma se realiza en ausencia de desinfectantes. En edificios/instalaciones que hayan sido sometidos a tratamiento de desinfección, se deben dejar pasar al menos 15 días desde el tratamiento para realizar la toma de muestras.

#### **6.4.5. Formulación de hipótesis**

Con los datos del estudio epidemiológico y los derivados de la investigación ambiental se establecerá la hipótesis más plausible sobre la/s posible fuente/s de infección causante de los casos. La hipótesis será comprobada posteriormente mediante los estudios epidemiológicos analíticos, como los de cohorte y de casos y controles, y los de epidemiología molecular. Los estudios epidemiológicos serán especialmente útiles cuando no se resuelva el brote con las medidas adoptadas.

#### **6.4.6. Medidas a tomar**

En función del tipo de infección y de los resultados de la investigación ambiental, y pendientes de comprobar la hipótesis establecida, se deben tomar las primeras medidas de prevención que se consideren más oportunas para controlar el brote. Algunas de estas medidas se encuentran recogidas en el Real Decreto 865/2003 y en Decretos de algunas Comunidades Autónomas, y básicamente son de 3 tipos: limpieza y desinfección, reparación de defectos estructurales o de funcionamiento y paralización parcial o total de la instalación.

Una vez terminada la investigación del brote y establecidas las conclusiones que de ella deriven se adoptarán las medidas de prevención a largo plazo que se consideren más eficaces.

#### **6.4.7. Estudios de epidemiología molecular**

*L. pneumophila* serogrupo 1 es la más implicada en infección humana y también es la más distribuida en el ambiente, por lo que la identidad de especie y serogrupo no será suficiente para implicar una cepa como causante de un brote de legionelosis. Por ello, resulta imprescindible tipificar las cepas procedentes de los pacientes y las ambientales, mediante su estudio genotípico. La epidemiología molecular es, en estos casos, de gran interés para corroborar la hipótesis establecida inicialmente y adoptar medidas de prevención eficaces.

Para realizar estos estudios es imprescindible contar con cultivos del mayor número posible de pacientes y con cultivos del mayor número de instalaciones relacionadas posible. Se ha demostrado la coexistencia de varias cepas *Legionella* diferentes en una misma instalación, por lo que es importante identificar al menos 5 ó 6 colonias de cada muestra analizada.

La genotipificación de los cultivos de los pacientes define de manera precisa el tipo de *Legionella* que produce los casos, siendo éste el que se busca entre los cultivos ambientales. Para ello se comparan los cultivos humanos y ambientales mediante técnicas de epidemiología molecular (genotipificación).

Muchas han sido las técnicas utilizadas para discriminar los aislados de *Legionella*: análisis de plásmidos, electroforesis de proteínas (PAGE),

análisis multienzimático, digestión del ADN cromosómico (RFLP), digestión del ADN cromosómico en combinación con hibridación con sondas (ribotipificación), digestión del ADN cromosómico con enzimas de restricción de corte poco frecuente (PFGE). También se han utilizado diferentes tipos de amplificación del ADN, como la amplificación arbitraria (AP-PCR), la amplificación al azar (RAPD), o de regiones repetidas en el cromosoma (REP-PCR), o de fragmentos intergénicos repetidos en el cromosoma (ERIC). Otra técnica utilizada en la caracterización molecular de

*Legionella* es la combinación de la digestión del ADN con la amplificación de los fragmentos de restricción (AFLP), que además, cuenta con una base de datos europea a la que se puede acceder ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)) para la asignación de tipos.

Actualmente, la necesidad de disponer de métodos de caracterización molecular que ofrezcan resultados rápidos y reproducibles, con la posibilidad de ser compartidos en tiempo real por diferentes laboratorios, ha llevado al desarrollo de métodos de secuenciación de genes basados en técnicas de MLST (*multilocus sequence typing*). Una variante de esta técnica es el SBT (*sequence-based typing*) en la que se emplean tanto genes "housekeeping" como genes devirulencia, y ha sido empleada para la

tipificación molecular de *L. pneumophila* serogrupo 1.

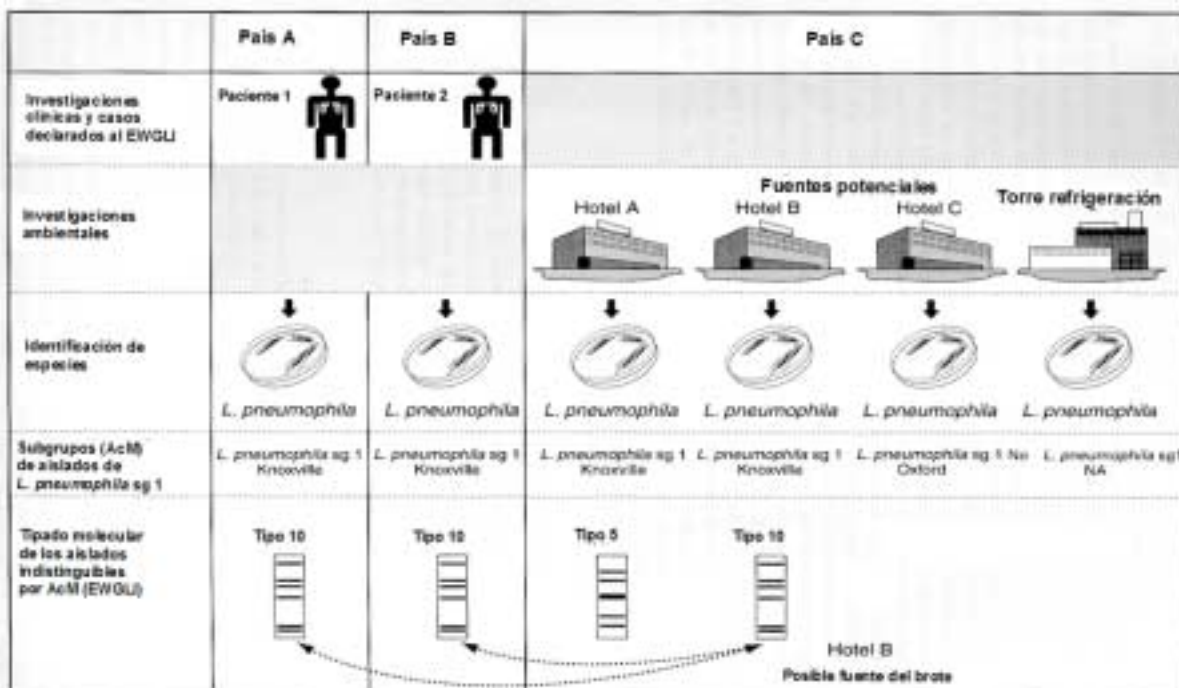
Los resultados obtenidos con el estudio de seis genes, *flaA*, *pilE*, *Asd*, *mip*, *mompS* y *proA*, que son los que se han empleado en el primer estudio piloto de SBT en el EWGLI, son muy prometedores, existiendo actualmente una base de datos a la que se puede acceder para la asignación de alelos ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)).

Aunque los brotes de legionelosis pueden aparecer en distintos ámbitos (hospitalario, comunitario o relacionado con viajeros) la estrategia para la tipificación epidemiológica de los cultivos de *Legionella* puede ser la misma. En la Figura 2 se detalla la estrategia propuesta por el EWGLI para la investigación de brotes de legionelosis asociados con viajes, basada en la combinación de tipificación con anticuerpos monoclonales junto con un método molecular.

#### 6.4.8. Elaboración de un informe

Una vez cerrado el brote clínicamente y terminadas las primeras investigaciones se debe elaborar un informe que incluya los aspectos más relevantes y las primeras conclusiones, independientemente de que algunas investigaciones parciales continúen.

**Figura 2.** Estrategia abordada por el EWGLI para la tipificación epidemiológica de en la investigación de legionelosis asociada a viajeros (Fry y cols. 1999)



## 7. BIBLIOGRAFÍA

### 7.1 GENERAL

1. Bartlett JG, Breiman RF, Mandell LA, File TM Jr. Community-acquired pneumonia in adults: Guidelines for management. *Clin Infect Dis* 1998;26:811-838.
2. Edelstein PH. Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires' Disease: time for a change. *Anne Intern Med* 1998; 129: 328-30.
3. Fields BS, Benson RF, and Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:506-526.
4. Pasculle AW. Update on *Legionella*. *Clin Microbiol Newsl* 2000; 22:97-101.
5. Swanson MS, Hammer BK. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu. Rev Microbiol* 2000; 54:567-613.

### 7.2 IDENTIFICACIÓN DE *Legionella*

1. Benson RF and Fields BS. Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect* 1998; 13:90-99.
2. Fry NK, Warwick S, Saunders NA and Emblet TM. The use of 16S ribosomal RNA analysis to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. *J Gen Microbiol* 1991; 137:1215-1222.
3. Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA and Heuzenroeder MW. Sequence-based classification scheme for genus *Legionella* targeting the *mip* gen. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1560-1567.

### 7.3 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

1. Plouffe JF, File TM, Breiman RF, Hackman BA, Salstrom SJ, Marston BJ and Fields BS. Reevaluation of the definition of Legionnaires' Disease: use of the urinary antigen assay. Community Based Pneumonia Incidence Study Group. *Clin Infect Dis* 1995; 20:1286-1291.
2. Wilkinson, H.W., Cruce, D.D. and Broome, C.V. Validation of *Legionella pneumophila* indirect immunofluorescence assay with epidemic sera. *J Clin Microbiol* 1981; 13:139-146.
3. Wilkinson, H. W., Fikes B. J. and Cruce D. D. Indirect immunofluorescence test for serodiagnosis of Legionnaires' disease: evidence for serogroup diversity of Legionnaires' disease bacterial antigens and for multiple specificity of human antibodies. *J Clin Microbiol* 1979; 9: 397-383.

### 7.4 DETECCIÓN DE ANTÍGENO EN ORINA

1. Benson RF, Tang PW, Fields B. 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; 38:2763-2765.
2. Domínguez JA, Matas L, Manterola JM, Blavia R, Sopena N, Padilla E, Giménez M, Sabrià M, Morera J, Ausina V. 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
3. Domínguez J, Galí N, Blanco S, Pedroso P, Prat C, Matas L, Ausina V. Assessment of a new test to detect *Legionella* urinary antigen for the diagnosis of Legionnaires' Disease. *Diag Microbiol Infect Dis* 2001; 41:199-203.
4. Harrison T, Uldum S, Alexiou-Daniel S, Bangsberg J, Bernander S, Drasar V, Etienne J, Helbig J, Lindsay D, Lochman I, Marques T, de Ory F, Tartakovskii I, Wewalka, Fehrenbach F. A multicenter evaluation of the Biotest *Legionella* urinary antigen EIA. *Clin Microbiol Infect* 1998; 4:359-365.

5. Stout JE. Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease: the expanding role of the *Legionella* urinary antigen test. *Clin Microbiol Newsl* 2000; 22:62-64.
6. Vergis EN, Yu VL. New directions for future studies of community-acquired pneumonia: optimizing impact on patient care. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18:847-851.

### 7.5 DETECCIÓN DE *Legionella* EN MUESTRAS CLÍNICAS CON TÉCNICAS DE PCR

1. Ballard AL, Fry NK, Chau L, Surman SB, Lee JV, Harrison TG, Towner KJ. Detection of *Legionella pneumophila* using a real-time PCR hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4215-4218.
2. Bernander S, Hanson HS, Johansson B, von Steding K. A nested polymerase chain reaction for detection of *Legionella pneumophila* in clinical specimens. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3: 95-101.
3. Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M and Hillyard DR. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1709-1712.
4. Hayden, R.T.; Uhl, J.R.; Qian, X.; Hopkins, M.K.; Aubry, M.C.; Limper, A.H.; Lloyd, R.V.; and Cockerill, F.R. 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; 39:2618-2626.
5. Jaulhac B, Nowicki M, Bornstein N, Meunier O, Prevost G, Piemont Y, Fleurette J and Monteil H. Detection of *Legionella* spp. In bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 920-924.
6. Lisby, G., and Dessau, R. Construction of a DNA amplification assay for detection of *Legionella* species in clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13:225-231.
7. 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; 39:2904-2910.
8. Welti SM, Jaton K, Altwegg M, Sahli R, Wenger A and Bille J. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45: 85-95.

### 7.6 DETECCIÓN DE *LEGIONELLA* EN MUESTRAS DE AGUA CON TÉCNICAS DE PCR

1. Catalán V, Moreno C, Dasi MA, Muñoz C and Apraiz D. Nested polymerase chain reaction for detection of *Legionella pneumophila* in water. *Res. Microbiol* 1994; 145:603-610.
2. Mahbubani MH, Bej AK, Miller R, Haff L, DiCesare J and Atlas RM. Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Mol Cell Probes* 1990; 4:175-187.
3. Yañez MA, Carrasco-Serrano C, Barbera VM and Catalán V. Quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of *dotA* gene. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 3433-41.

### 7.7 TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *L. pneumophila*

1. Fry NK, Alexiou-Daniel S, Bangsberg JM, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, Forsblom B, Gaia V, Helbig JH, Lück PC, Lindsay D, Pelaz C, Uldum S, Harrison TG. A multi-center evaluation of genotypic methods for the epidemiological typing of *Legionella*



*pneumophila* serogroup 1: Results of a pan-European study. Clin Microbiol Infect 1999, 5: 462-477.

2. Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R, Harrison TG. A consensus sequence-based epidemiological typing scheme for clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. J Clin Microbiol 2005; 43:2047-2052.

3. Lück, P.C.; Helbig, J.H.; Gunter, U.; Assmann, M.; Blau, R.; Koch, H.; Klepp, M. Epidemiologic investigation by macrorestriction analysis and by using monoclonal antibodies of nosocomial pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 10. J Clin Microbiol 1994; 32:2692-2697.

## 7.8 PREVENCIÓN DE LEGIONELOSIS

1. ASRHAE Guideline 12-2000. Minimizing the risk of legionellosis associated with building water systems. 2000. Atlanta, GA. American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers, pp.1-17.

2. CPNSW. Code of Practice for the control of legionnaires´disease. 1991. New South Wales. Sydney. NSW Health Department, ISBN: 0 7305 3453 7.

3. Guía para la prevención y control de la legionelosis. Departamento de Sanidad y Seguridad Social. 2001. Barcelona. Generalitat de Catalunya. Cuadernos de Salud Pública nº16.

4. HSE book. Legionnaires´ Disease: The control of Legionella bacteria in water systems. Approved Code of Practice and Guidance (L8). 2000. 3ª Ed. ISBN: 0 7176 1772 6.

5. Vargas F. Ed: Martín-Bourgon C, Boix R y Pelaz C. Recomendaciones para la prevención y control de la legionelosis. 1999. Ministerio de Sanidad y Consumo. ISBN: 84-7670-507-7.

## 7.9 PREVENCIÓN Y CONTROL DE LEGIONELOSIS EN HOSPITALES

1. Carratalá J, Gudiol F, Pallarés R, Dorca J, Verdaguer R, Ariza J, et al. Risk factors for nosocomial *Legionella pneumophila* pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 1994; 149: 625-629.

2. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for prevention of nosocomial pneumonia. Morb Mortal Wkly Rep 1997; 46: RR-1: 1-79.

3. Freije MR. *Legionellae* control in health care facilities. A guide for minimizing risk. Indianapolis: HC Information Resources, Inc., 1996. (<http://www.hcinfo.com>).

4. Kool JL, Fiore AE, Kioski CM, Brown EW, Benson RF, Pruckler JM et al. More than 10 years of unrecognized nosocomial transmission of legionnaires´disease among transplant patients. Infect Control Hosp Epidemiol 1998; 19:898-904.

5. Lepine LA, Jernigan DB, Butler JC, Pruckler JM, Benson RF, Kim G et al. A recurrent outbreak of nosocomial legionnaires´disease detected by urinary antigen testing: evidence for long-term colonization of a hospital plumbing system. Infect Control Epidemiol 1998; 19: 893-897.

6. Sabrià M, Yu VL. Hospital-acquired legionellosis: solutions to a presentable infection. The Lancet Infect Dis 2002; 2:368-373.

7. Yu VL. Nosocomial legionellosis. Curr Opin Infect Dis 2000; 13:385-388.



Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Detección de <i>Legionella</i> en muestras clínicas mediante cultivo</b>	Fecha: PNT-LP-01	
		Edición Nº 01	Página 2 de 7

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el procedimiento de aislamiento de *Legionella* en cultivo a partir de muestras de origen humano. Se describe el tipo de muestra y su procesamiento en el laboratorio.

## 2. FUNDAMENTO

*Legionella* es una bacteria de morfología bacilar. Es aerobia y habitualmente vive en medios acuáticos. Es una causa relativamente frecuente de neumonía y excepcionalmente causa otros tipos de infecciones. El cultivo es el único método que permite el diagnóstico etiológico de las infecciones causadas por cualquier especie o serogrupo. Para su aislamiento en cultivo, estos microorganismos requieren medios específicos, obteniéndose colonias visibles a partir del 3<sup>o</sup>-7<sup>o</sup> día de incubación, aunque en ocasiones pueden requerir hasta 10-12 días de incubación para visualizar su crecimiento.

Existen 48 especies de *Legionella*, pero *L. pneumophila* es la especie que más frecuentemente causa infecciones en humanos. El serogrupo 1 de *L. pneumophila* es el que más frecuentemente se aísla de muestras clínicas.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1<sup>a</sup>. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología. 2003.

## 4. MUESTRAS

Las muestras adecuadas para cultivo pueden ser agrupadas, en función del tipo y nivel de contaminación, en:

- A) Secreciones respiratorias contaminadas: esputo expectorado y muestras del tracto respiratorio inferior contaminadas con microbiota del tracto respiratorio superior, como aspirados bronquiales o transtraqueales, y lavados o cepillados bronquiales.
- B) Secreciones respiratorias no contaminadas: muestras del tracto respiratorio inferior no contaminadas, como las obtenidas mediante cepillo telescópico y aspirado pulmonar transparietal.
- C) Tejidos: tejido pulmonar obtenido en biopsia o necropsia, o tejido de otros órganos. Los tejidos son inoculados directamente en los medios de cultivo.
- D) Otras muestras menos frecuentes, como líquido pleural, líquido cefalorraquídeo (LCR) o sangre.

La sensibilidad del cultivo documentada de muestras respiratorias oscila entre un 20 y un 80 %, lo cual refleja cierta dificultad del método, debido a varios factores entre los que se pueden mencionar la progresiva pérdida de viabilidad de la bacteria tras la toma de la muestra y la experiencia microbiológica requerida.

## 4.1. CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE

Todas las muestras para cultivo deben ser conservadas en condiciones de refrigeración (5°C) hasta su procesamiento, que debería realizarse antes de las 48 h. Si ello no fuera posible, se conservarán congeladas (-20°C), evitando en lo posible ciclos de congelación-descongelación, que afectan a la viabilidad de la bacteria.

En muestras de pequeño volumen, es preferible diluir utilizando una pequeña cantidad (1 ml) de agua destilada estéril no bacteriostática. No utilizar soluciones salinas ni tampones que contengan fosfato de alta molaridad que pueden inhibir el crecimiento de la bacteria.

Si se requiere transporte, se realizará a 5°C, excepto cuando las muestras estuvieran congeladas, en cuyo caso deben transportarse en este estado. El transporte se realizará en contenedores estériles, con cierre fuerte, y de un tamaño lo suficientemente pequeño para evitar la desecación de la muestra, ya que ésta afecta a la viabilidad de *Legionella*. Se utilizarán contenedores y empresas de mensajería autorizadas para el transporte de material biológico (ver Procedimiento 1a de SEIMC).

Una vez procesadas las muestras es recomendable su conservación a -20°C hasta tener el resultado definitivo por si fuera necesario procesarlas de nuevo.

## 4.2. CRITERIOS DE RECHAZO

Se debe rechazar cualquier muestra en la que se observen las siguientes incidencias:

1. Defectos en la identificación de la muestra: etiquetado inadecuado o erróneo, o cumplimentación incorrecta de la hoja de petición del análisis.
2. Muestras enviadas erróneamente, por ejemplo orina con una petición de esputo, o esputos con petición de antígeno.
3. Mal estado de conservación de la muestra: temperatura inadecuada, muestras en medio no apropiado, mala conservación (biopsias secas).
4. Muestras derramadas por envase inadecuado o mal cerrado.

No se debe rechazar ninguna muestra sin contactar primero con el médico responsable del paciente y se debe realizar cualquier esfuerzo para salvar las muestras que se han obtenido con riesgo o con problemas para el paciente (biopsia pulmonar, aspirado transtraqueal, líquido pleural, etc.).

En general, una muestra es suficiente, ya que el aumento del número de muestras no mejora el rendimiento en el aislamiento de *Legionella* en cultivo. Las muestras para cultivo es preferible tomarlas antes de la aplicación de un tratamiento antibiótico, sin embargo su aplicación o duración no son criterios de rechazo de muestras.

El esputo de los pacientes con enfermedad de los legionarios generalmente no es purulento y puede ser sanguinolento o acuoso. De hecho, los esputos muy purulentos hacen muy improbable el diagnóstico de legionelosis. Por este motivo, el recuento del número de

Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Detección de <i>Legionella</i> en muestras clínicas mediante cultivo</b>	Fecha: PNT-LP-01	
		Edición Nº 01	Página 3 de 7

leucocitos en muestras respiratorias no se puede utilizar para determinar la aceptabilidad de una muestra. No se ha estudiado la influencia de células epiteliales en el resultado del cultivo, aunque parece que las muestras con más de 20 células epiteliales por extensión serán probablemente negativas. Por lo tanto, no existen criterios de rechazo en base a la citología de las muestras respiratorias.

## 5. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

### 5.1. REACTIVOS

#### 5.1.1. Tampón ácido (pH 2,2)

Solución ácida de KCl/HCl 0,2N (pH 2,2) para usar en el tratamiento de descontaminación de las secreciones respiratorias contaminadas.

1. Solución A: Ácido clorhídrico (HCl) 0,2 mol/L, disolviendo 17,4 ml de HCl concentrado en 1 L de agua destilada
2. Solución B: Cloruro potásico (KCl) 0,2 mol/L, disolviendo 14,9 g de KCl en 1 L de agua destilada
3. KOH 1 mol/L, disolviendo 5,6 g de KOH en 100 ml de agua destilada

Preparar el tampón ácido mezclando 3,9 ml de solución A y 25 ml de solución B. Ajustar el pH a 2,2 por adición de KOH 1 mol/L.

Almacenar en frascos de vidrio con tapón de rosca, a temperatura ambiente y protegidos de la luz, un máximo de 1 mes. Evitar la excesiva manipulación del frasco conteniendo el tampón ácido para evitar posibles contaminaciones, por lo que es preferible conservarlo en alícuotas.

#### 5.1.2. Leche descremada

Para conservación de los aislados confirmados como *Legionella* se utiliza generalmente leche descremada, aunque ésta puede ser inhibitoria para algunas especies. Partir de un preparado comercial y seguir las instrucciones de uso, diluyendo al 10% en agua destilada. Repartir en viales con tapón de rosca conteniendo 0,5 ml de leche/vial, esterilizar en autoclave a 121°C, enfriar y almacenar hasta su uso a -20°C.

Alternativamente se pueden utilizar otros métodos de conservación disponibles, siempre que se haya comprobado su eficacia.

### 5.2. MEDIOS DE CULTIVO

#### 5.2.1. Agar BCYE $\alpha$ (Buffered charcoal yeast extract, suplementado con $\alpha$ -cetogluturato)

##### Composición por litro

ACES buffer	10 g
KOH	2,8 g
Carbón activo	2 g
Extracto de levadura	10 g
Agar	14 g
$\alpha$ -Cetogluturato	1 g
L-Cisteína HCl	0,4 g en 10 mL
Pirofosfato férrico	0,25 g en 10 mL
Agua destilada	Hasta 1 litro

#### Preparación:

1. Preparar soluciones independientes de L-cisteína y pirofosfato férrico (III) disolviendo 0,4 g y 0,25 g, respectivamente, en 10 ml de agua destilada. Si el pirofosfato se disuelve mal, agitar con imán a 50°C. Esterilizar cada solución por filtración a través de una membrana de 0,22  $\mu$ m de poro. Almacenar en alícuotas, en frascos limpios y estériles a -20°C durante no más de 3 meses.
2. Añadir el polvo de ACES (N-2-acetamido-2-ácido aminoetanosulfónico) a 500 ml de agua destilada y disolver en un baño de agua a 45-50°C. Añadir el hidróxido potásico (KOH) en lentejas a 480 ml de agua destilada y disolver con agitación suave. Para preparar el tampón ACES mezclar ambas soluciones.
3. Añadir secuencialmente el carbón, el extracto de levadura y  $\alpha$ -cetogluturato (sal monopotásica) a 980 ml de tampón ACES.
4. Preparar una solución 0,1 mol/L de KOH disolviendo 5,6 g en 1 L de agua destilada. Preparar una solución 0,1 mol/L de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) añadiendo cuidadosamente 5,3 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1L de agua destilada. Usar las soluciones de 0,1 de mol/L KOH ó 0,1 mol/L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para ajustar el pH a 6,9.
5. Añadir el agar, mezclar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Posteriormente atemperar a 45-50°C en un baño de agua. Adicionar las soluciones de L-cisteína y pirofosfato férrico asépticamente, mezclando bien después de cada adición.
6. Dispensar en placas de Petri. El pH final del medio es de 6,9 a 25°C.
7. Almacenar a 4°C y protegido de la luz y la deshidratación, hasta un máximo de 1 mes.

Alternativamente se pueden utilizar medios comerciales, siempre que cumplan con los controles detallados en el apartado 5.2.4.

#### 5.2.2. Agar BCYE $\alpha$ - Cys ( BCYE $\alpha$ sin L-Cisteína)

Preparar este medio igual que BCYE $\alpha$ , pero omitiendo la adición de L-cisteína.

#### 5.2.3. BMPA (BCYE $\alpha$ suplementado con polimixina B, cefamandol y anisomicina)

Este medio es idéntico al BCYE $\alpha$  excepto que se le adiciona un suplemento de tres antibióticos, polimixina B, cefamandol y anisomicina.

##### Preparación:

1. Preparar el medio de cultivo de igual manera que el BCYE $\alpha$ , siguiendo los puntos 1, 2 y 3 del apartado 5.2.1.
2. Después de la adición aséptica de las suspensiones de L-cisteína y pirofosfato férrico, añadir el suplemento antibiótico correspondiente (BMPA) recién reconstituido, según las instrucciones del fabricante.
3. Dispensar en placas de Petri y enfriar a temperatura ambiente. Finalmente almacenar a 4°C y protegido de la luz y la deshidratación, hasta un máximo de 1 mes.

Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Detección de <i>Legionella</i> en muestras clínicas mediante cultivo</b>	Fecha: PNT-LP-01	
		Edición Nº 01	Página 4 de 7

Alternativamente se puede preparar el medio a partir de todos sus componentes. Legionella CYE agar base contiene carbón activo, extracto de levadura y agar, de los que se añade la cantidad suficiente para 1 L de BCYE $\alpha$ . El suplemento selectivo BMPA contiene, para 1 L de medio, 80.000 U de polimixina B, 4 mg de cefamandol y 80 mg de anisomicina, que se añadirán al medio en condiciones de esterilidad.

#### 5.2.4. Control de los medios de cultivo

Debe evitarse un calentamiento prolongado durante la esterilización, ya que puede afectar a las calidades nutricionales del medio BCYE $\alpha$ . La variación de los ingredientes del medio, lote a lote (particularmente  $\alpha$ -cetoglutarato) puede también afectar a su rendimiento, por lo que es esencial comprobar la capacidad de cada nuevo lote de permitir el crecimiento de *L. pneumophila* serogrupo 1, en 3 días de incubación.

En la evaluación de la capacidad del medio para soportar el crecimiento bacteriano es normal usar cepas de referencia o cultivos de organismos previamente aislados, mantenidos en el laboratorio. Sin embargo, en el caso de *Legionella* este método puede ser engañoso, ya que pueden adaptarse fácilmente a crecer en medios de cultivo que no soportarían el aislamiento primario de cepas salvajes.

Cada lote de medio preparado será sometido a tres controles antes de su uso. En el caso de medios de cultivo comerciales, comprobar que cumplen los mismos requisitos antes de su utilización.

1. Comprobar su pH. Después de la esterilización en autoclave, y una vez el medio enfriado, comprobar, y corregir en su caso, el pH, antes de dispensarlo en placas de Petri.
2. Comprobar su esterilidad. En cada lote de medio de cultivo preincubar el 2% de placas a 35°C durante 24 h, para comprobar la ausencia de crecimiento bacteriano.
3. Comprobar su capacidad para el crecimiento de *Legionella*. Comprobar que el medio de cultivo preparado soporta el crecimiento de *Legionella*, y que las colonias que produce presentan el aspecto característico. Lo ideal sería utilizar medios y materiales de referencia. Al no disponer de estos materiales se propone un procedimiento alternativo para el control de los medios de cultivo: Una placa de cada lote de medio se inocula con 0,1 ml de la dilución 1/100 de un homogeneizado control y se incuba a 36°C durante 96 h. Al menos deben crecer 100 colonias por placa; en caso contrario, se debe descartar el lote de medio.

#### Preparación del homogeneizado control:

Homogeneizar un tejido con una cepa de *L. pneumophila*, de forma que contenga  $>10^7$  ufc/gramo. Para ello, se tritura y diluye el tejido en caldo Mueller-Hinton, de forma que 0,1 ml de homogeneizado contengan al menos  $10^6$  ufc. Posteriormente, se diluye en leche desnatada al 1/10, se divide en alícuotas de 0,2 ml que se guardan congeladas a  $-70^\circ\text{C}$  y tienen una duración viable de hasta 1 año. En el momento de uso descongelar, atemperar y diluir 1/100 en agua destilada antes de cultivarlo en los medios, lo que arrojará un

recuento de colonias de al menos 100 ufc/0,1 ml, lo que permite su visualización en los medios de cultivo.

## 6. APARATOS Y MATERIAL

- Autoclave
- Cabina de seguridad biológica tipo II-A
- Estufa de 36°C, opcionalmente con 2,5-5 % de CO<sub>2</sub>
- Agitador vórtex
- Baño de agua a 50°C
- Medidor de pH
- Balanza de precisión
- Lupa binocular con al menos 30 aumentos e iluminación incidente oblicua (microscopio de disección)
- Nevera 2 a 8°C
- Congelador de -18 a -20°C y congelador de -70 a -80°C
- Material de vidrio estéril: frascos de 1 L y viales de distinta capacidad con tapón de rosca, pipetas de 5 y 10 ml, bolitas de vidrio.
- Material de plástico estéril: puntas con filtro para micropipetas automáticas, frascos de distinta capacidad, placas de Petri, pipetas Pasteur.
- Material de disección estéril: tijeras, pinzas, bisturios desechables
- Material de laboratorio: asas de siembra, papel de parafilm para sellar, contenedores para desechar material infeccioso, micropipetas, pipeteadores, mascarilla protectora, guantes.

## 7. PROCEDIMIENTO

El procesamiento completo de la muestra se debe realizar en una cabina de seguridad biológica tipo II-A, utilizando mascarilla protectora y guantes.

### 7.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS E INOCULACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Según el tipo y nivel de contaminación, las muestras para cultivo se prepararán de manera diferente. En general, las muestras serán homogeneizadas antes de inocular las placas de medio, excepto las muestras contaminadas que serán sometidas a un tratamiento de descontaminación previo a la inoculación. Se procederá como se detalla a continuación:

A) Secreciones contaminadas (esputo expectorado, aspirado nasotraqueal y endotraqueal, lavado o cepillado bronquial y otras muestras contaminadas con microbiota del tracto respiratorio superior)

1. Colocar la muestra en una placa de Petri estéril.
2. Seleccionar en la muestra la zona de aspecto más lechoso o sanguinolento y separarla del resto. Las infecciones por *Legionella* se caracterizan por tos no productiva y por tanto, no son características las muestras purulentas. Se prepararán 3 fracciones:

- Preparar una dilución 1/10 de la muestra utilizando agua destilada estéril como diluyente, en un frasco con tapón de rosca (en las muestras ya diluidas, como los lavados bronquiales, no es necesario realizar este paso). Añadir bolitas de vidrio estériles y agitar en un Vortex. Inocular 0,1 ml en una placa de BMPA.

Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Detección de <i>Legionella</i> en muestras clínicas mediante cultivo</b>	Fecha: PNT-LP-01	
		Edición Nº 01	Página 5 de 7

- Transferir aproximadamente 0,3 ml de la muestra a un vial con tapón de rosca y mantener en un baño a 50°C durante 30 min. Inocular 0,1 ml (3 gotas con una pipeta Pasteur estéril) en una placa de BCYE $\alpha$ .
- Preparar también una dilución 1/10 de la muestra (0,1 ml) en tampón ácido (0,9 ml). Añadir bolitas de vidrio estériles y agitar en un Vortex. Incubar 5 min a temperatura ambiente (25°C) e inocular inmediatamente 0,1 ml en una placa de BCYE $\alpha$ .

**B) Secreciones no contaminadas** (punción transtraqueal, cepillo telescópico y aspirado pulmonar transparietal)

Preparar una dilución 1/5 de la muestra utilizando agua destilada como diluyente en un frasco con tapón de rosca (en las muestras ya diluidas no es necesario realizar este paso). Añadir bolitas estériles de vidrio y agitar en un Vortex. Inocular 0,1 ml en una placa de BCYE $\alpha$  y 0,1 ml en otra de BMPA.

**C) Tejidos** (Biopsia pulmonar y bronquial y otros tejidos)

1. Colocar el tejido en una placa de Petri estéril.
2. Utilizando un bisturí estéril cortar las áreas de tejido no necrosado en pequeñas piezas.
3. Realizar improntas con varios cortes del tejido sobre una placa de BCYE $\alpha$ , presionando cada corte sobre el medio de cultivo, con ayuda de las pinzas.
4. Utilizar una pieza de tejido de 5 x 5 x 5 mm para triturarla en un mortero. Añadir 1 ml de agua destilada y triturar hasta homogeneizar.
5. Colocar 0,2 ml del homogeneizado en un tubo estéril con tapón de rosca y añadir 0,2 ml de agua destilada, mezclar bien con un Vortex.
6. Inocular 0,1 ml en una placa de BCYE $\alpha$ .

**D) Otras muestras** menos frecuentes (líquido pleural y líquido cefalorraquídeo).

1. Centrifugar la muestra a 3.000 xg a 10°C durante 30 min.
2. Descartar todo el sobrenadante excepto 0,5 ml y resuspender utilizando un agitador Vortex.
3. Inocular 0,1 ml en una placa de BCYE $\alpha$  y otra de BMPA.

En el caso de hemocultivos, extraer y procesar por el procedimiento habitual, e incubar con agitación en medio difásico selectivo para *Legionella*. Normalmente no se realizan hemocultivos para *Legionella*.

Alternativamente se puede utilizar BMPA en lugar de BCYE $\alpha$  para el aislamiento primario.

**7.2. CONDICIONES DE INCUBACIÓN**

Una vez secos los inóculos a temperatura ambiente, se extenderán por toda la placa con ayuda de un asa bacteriológica.

Todas las placas inoculadas serán incubadas a 36°C, en aerobiosis y en condiciones de humedad, durante 12-15 días. Para conseguir las condiciones de humedad se puede colocar en la base del

incubador un recipiente con agua destilada conteniendo una pequeña cantidad de sulfato de cobre (renovar esta solución 1 ó 2 veces por semana). La incubación en una atmósfera de 2,5-5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) puede ser beneficioso para el crecimiento de algunas especies de *Legionella*.

**7.3. EXAMEN DE LAS PLACAS**

La clave para el aislamiento de *Legionella* a partir de muestras clínicas es la observación diaria de los medios de cultivo utilizando una lupa binocular. El crecimiento de la bacteria empieza a ser visible a partir del 3<sup>er</sup> día de incubación, pero puede requerir más tiempo, por lo que los cultivos se mantendrán en incubación hasta 12-15 días antes de considerarlos negativos. Las placas se deben examinar cada 1 ó 2 días, ya que las colonias de *Legionella* pueden quedar enmascaradas por el crecimiento de otros microorganismos, incluyendo hongos.

Las colonias de *Legionella* son lisas con un borde entero, tienen un aspecto granular, como "polvo de vidrio" y a veces presentan un brillo azul-verdoso o rosa-púrpura, con un aspecto cristalino característico. Cada colonia nueva con estas características debe ser anotada e identificada.

Aunque se pueden identificar las colonias individuales cuando éstas tienen un tamaño que lo permite, es preferible recuperar del cultivo primario las colonias sospechosas de ser *Legionella*, mediante subcultivo en BCYE $\alpha$  y BCYE $\alpha$  sin cisteína (o agar sangre). Ello permite disponer de crecimiento suficiente para realizar los ensayos necesarios para su identificación y evita el riesgo de perder las colonias sospechosas por contaminación de los cultivos primarios durante la incubación prolongada. Además permite su conservación para realizar estudios posteriores.

**7.4. IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS DE *Legionella***

Seleccionar al menos tres colonias características de *Legionella* por cada muestra inoculada y subcultivar paralelamente en BCYE $\alpha$  y BCYE $\alpha$  sin cisteína. Incubar a 36°C durante al menos 2 días. Se consideran *Legionella* aquellas colonias con crecimiento en BCYE $\alpha$  y sin crecimiento en BCYE $\alpha$  sin cisteína (o ausencia de crecimiento en agar sangre). *Legionella oakridgensis* es la única especie que no requiere cisteína en el aislamiento primario, aunque sí lo requiere en sucesivos subcultivos.

En general, una colonia de *Legionella* en subcultivo crece en BCYE $\alpha$  a las 48 h de incubación a 36°C, aunque algunas especies pueden requerir una incubación más prolongada y la presencia de CO<sub>2</sub> (2,5-5%). A las 48-72 h el crecimiento aparecerá confluyente en algunas zonas y con pequeñas colonias aisladas en otras.

Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Detección de <i>Legionella</i> en muestras clínicas mediante cultivo</b>	Fecha: PNT-LP-01	
		Edición Nº 01	Página 6 de 7

La identificación de las colonias de *Legionella* incluye:

1. Morfología característica de las colonias
2. Comprobación de crecimiento en BCYE $\alpha$  y ausencia de crecimiento en BCYE $\alpha$  sin cisteína (o en agar sangre).
3. Tinción de Gram. *Legionella* es un bacilo gramnegativo que se tiñe débilmente con la coloración de contraste, por lo que es recomendable la utilización de fuchsina básica al 0,1% en vez de safranina en esta tinción.

La confirmación definitiva de las colonias de *Legionella* se realizará siguiendo los métodos recogidos en el PNT-LP-03.

Finalmente, los aislados se conservarán congelados (-20°C ó -80°C)

En el Anexo I se resume este procedimiento.

### 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Si se recuperan colonias que cumplan con las características anteriores serán informadas inmediatamente como "aislamiento de *Legionella* spp. en cultivo". Si tras haber mantenido los cultivos en incubación durante 12-15 días no se recupera ninguna colonia que cumpla estas características será informado como "no se aísla *Legionella* spp. en cultivo".

### 9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico será el responsable del procesamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los controles. El facultativo será responsable de la supervisión de las tareas mencionadas, de mantener al día los procedimientos de validación final de los resultados, de su interpretación y del informe de los mismos.

### 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Cuando se aplican tratamientos de descontaminación se debe ser riguroso con los tiempos ya que ambos tratamientos también afectan a la viabilidad de *Legionella*.

En la confirmación de las colonias con morfología sugerente, se puede utilizar agar sangre en lugar de BCYE $\alpha$  sin cisteína para demostrar el requerimiento de este aminoácido para el crecimiento de *Legionella*.

El examen de las placas incubadas debe ser muy minucioso, ya que, en el caso de muestras contaminadas como el esputo, la abundante microbiota acompañante dificultará el reconocimiento de las colonias de *Legionella*.

En la investigación de brotes, los aislados de *Legionella* recuperados de las muestras de pacientes deberán enviarse a un laboratorio de referencia para su posterior identificación y comparación con los cultivos ambientales.

### 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La principal limitación del procedimiento de cultivo es el tiempo requerido para tener un resultado (aproximadamente de 4 a 10 días). Además, un resultado negativo no excluye una infección por *Legionella*.

A pesar de que el medio de cultivo de *Legionella* contiene antifúngicos (anisomicina), las contaminaciones por hongos son frecuentes, y esto hace que, en ocasiones, se reduzca considerablemente el tiempo de incubación de los medios, lo que podría impedir la detección de la bacteria. Lo mismo ocurre cuando hay un excesivo desarrollo de otras colonias bacterianas. Se deberán extremar las precauciones para evitar la contaminación cruzada de unas placas de cultivo a otras en el caso de que exista contaminación con hongos filamentosos.

Se debe tener en cuenta que *L. pneumophila* se adapta bien a los medios de cultivo utilizados; sin embargo, no ocurre lo mismo con otras especies, que crecen con más dificultad, requieren más tiempo y, en ocasiones pueden llegar a perderse en sucesivos subcultivos.

### 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Segunda edición. Editor HD Isenberg. 2005. ASM Press Washington, D.C. USA.
2. Edelstein PH. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. J Clin Microbiol 1981; 14:298-303.
3. Edelstein PH, Snitzer JB and Bridge JA. Enhancement of recovery of *Legionella pneumophila* from contaminated respiratory tract specimens by heat. J Clin Microbiol 1982; 16:1061-1065.
4. Fields BS, Benson RF and Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 506-526.

Servicio de Microbiología Hospital.....	<b>Detección de <i>Legionella</i> en muestras clínicas mediante cultivo</b>	Fecha: PNT-LP-01	
		Edición Nº 01	Página 7 de 7

**Anexo I: Detección de *Legionella* en muestras clínicas mediante cultivo**

**PROCEDIMIENTO:** En general, las muestras serán homogeneizadas antes de inocular los medios de cultivo, excepto las muestras contaminadas que serán sometidas a un tratamiento de descontaminación previo a la inoculación. Se procederá como se detalla a continuación, según el tipo y nivel de contaminación de las muestras:

**A) Secreciones contaminadas** (esputo expectorado, aspirado nasotraqueal y transtraqueal, lavado o cepillado bronquial y otras muestras contaminadas con microbiota del tracto respiratorio superior). Seleccionar la zona de aspecto más lechoso o sanguinolento y preparar 3 fracciones:

- Preparar una dilución 1/10 de la muestra utilizando agua destilada estéril como diluyente, en un frasco con tapón de rosca, añadir bolitas de vidrio estériles y agitar en un Vortex, e inocular 0,1 ml en una placa de BMPA.
- Transferir aproximadamente 0,3 ml de la muestra a un vial con tapón de rosca y mantener en un baño a 50°C durante 30 min e inocular 0,1 ml en una placa de BCYE $\alpha$ .
- Preparar una dilución 1/10 de la muestra (0,1 ml) en tampón ácido (0,9 ml). Añadir bolitas de vidrio estériles y agitar en un Vortex. Incubar 5 min a temperatura ambiente (25°C) e inocular inmediatamente 0,1 ml en una placa de BCYE $\alpha$ .

**B) Secreciones no contaminadas** (punción telescopado y aspirado pulmonar transparietal)

- Preparar una dilución 1/5 de la muestra utilizando agua destilada como diluyente en un frasco con tapón de rosca, añadir bolitas estériles de vidrio y agitar en un Vortex, inocular 0,1 ml en una placa de BCYE $\alpha$  y 0,1 ml en otra de BMPA.

**C) Tejidos** (Biopsia pulmonar y bronquial y otros tejidos)

- Colocar el tejido en una placa de Petri estéril y, con un bisturí estéril, cortar las áreas de tejido no necrosado en pequeñas piezas. Realizar improntas con varios cortes del tejido sobre una placa de BCYE $\alpha$ , presionando cada corte sobre el medio de cultivo, con ayuda de las pinzas.
- Utilizar una pieza de tejido de 5 x 5 x 5 mm para triturarla en un mortero. Añadir 1 ml de agua destilada y triturar hasta homogeneizar. Colocar 0,2 ml del homogeneizado en un tubo estéril con tapón de rosca y añadir 0,2 ml de agua destilada estéril, mezclar bien con un Vortex. Inocular 0,1 ml en una placa de BCYE $\alpha$ .

Alternativamente se puede utilizar BMPA en lugar de BCYE $\alpha$  para el aislamiento primario.

Una vez secos los inóculos, se extenderán por toda la placa y se incubarán a 36°C con humedad, durante 12-15 días, revisando las placas cada día.

Subcultivar 2 ó 3 colonias sospechosas en BCYE $\alpha$  y BCYE $\alpha$  sin cisteína, e incubar a 36°C durante al menos 2 días.

Identificar las colonias de *Legionella* en base a su morfología, ausencia de crecimiento en BCYE $\alpha$  sin cisteína y tinción de Gram (bacilo gramnegativo).

Confirmar la identificación según el PNT-LP-03.

Conservar en congelación





Servicio de Microbiología	<b>Detección de <i>Legionella</i> en muestras de agua mediante cultivo</b>	Fecha: PNT-LP-02	
Hospital.....		Edición Nº 01	Página 2 de 9

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este documento es describir un procedimiento de detección y recuento de *Legionella* en muestras de agua y sedimentos mediante cultivo y estimación de su número. Es aplicable a muestras de origen ambiental que incluyen agua potable, aguas industriales y naturales, y materiales asociados como sedimentos, depósitos y lodos. El procedimiento descrito está basado en el Standard Internacional ISO 11731/1998 "Water quality - detection and enumeration of *Legionella*", y contempla el método para muestras con abundante microbiota, como pueden ser aguas procedentes de torres de refrigeración, y el método para muestras que presentan baja microbiota, como pueden ser las procedentes de redes de distribución de agua fría clorada.

Estos análisis deben ser realizados en laboratorios acreditados para aislamiento de *Legionella* en aguas, que participen en un control de calidad externo para este tipo de ensayos, y capaces de demostrar su límite de detección.

## 2. FUNDAMENTO

*Legionella* es una bacteria que se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente, en hábitats naturales como ríos y lagos, y en sistemas artificiales, como en redes de distribución de agua de hospitales y hoteles, en equipos de transferencia de masa de agua en corriente de aire (torres de refrigeración y equipos análogos), en piscinas con agua templada y en movimiento, humidificadores, etc. La vía de transmisión son los bioaerosoles generados a partir de estos sistemas acuáticos contaminados.

El cultivo permite la detección de cualquier especie o serogrupo. Para su aislamiento en cultivo, estos microorganismos requieren medios específicos, obteniéndose colonias visibles a partir del 3<sup>o</sup>-7<sup>o</sup> día de incubación, aunque en ocasiones pueden requerir hasta 12-15 días de incubación. Como en las muestras de agua la cantidad de *Legionella* puede ser pequeña, y además puede ir acompañada de otro tipo de microbiota, en la mayoría de los casos es necesario concentrar y descontaminar las muestras antes de inocular los medios de cultivo.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Estándar Internacional ISO 11731. Water quality - detection and enumeration of *Legionella*. 1998.
- Estándar Internacional ISO 3696. Water for analytical laboratory use – specification and test methods. 2001.
- AS/NZS 3896. Waters – examination for legionellae including *Legionella pneumophila*. 1998.
- 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. BOE núm 171, Viernes 18 de Julio de 2003, pp.: 28055-69.

## 4. MUESTRAS

La toma de muestras de agua deberá realizarse antes de la aplicación de cualquier tratamiento de desinfección. En caso de que las instalaciones hayan sido sometidas a algún tratamiento, la toma se realizará pasados al menos 15 días desde la aplicación del mismo, y se recogerá en un informe el tipo de tratamiento realizado y la fecha de aplicación del mismo.

En la investigación de brotes es imprescindible realizar los muestreos de las instalaciones de las zonas epidemiológicamente implicadas, en las primeras 72 horas tras la detección de los primeros casos, y siempre antes de la aplicación de cualquier tratamiento de desinfección.

### 4.1. PUNTOS DE MUESTREO

Los puntos de muestreo y su número dependerán de la finalidad del análisis, y con carácter general, en sistemas de agua el muestreo se diseñará en base a la evaluación del riesgo de la instalación a muestrear, y de manera que los resultados sean representativos de la totalidad del sistema. La toma de muestra para los sistemas de agua fría se hará del depósito de almacenamiento de agua, de la salida más lejana y de la más cercana al depósito, y de otros puntos terminales (duchas y grifos, lavamanos, fuentes, etc.) que se consideren de interés. Para los sistemas de agua caliente, del depósito de almacenamiento y calentamiento, de la salida más cercana y de la más lejana al depósito, de la salida más cercana al retorno, así como de otros puntos terminales que se consideren de interés. En torres de refrigeración se tomarán muestras del agua de aporte, agua del depósito (en el punto más alejado del aporte) y del retorno.

En la investigación de brotes, cuando el edificio (instalación) sea un hotel u hospital se hará una toma de muestras de agua más exhaustiva, incluyendo además de los puntos anteriormente detallados, los siguientes:

- 1) Duchas y grifos de la/s habitación/es ocupada/s por la/s persona/s infectadas.
- 2) Varios puntos terminales elegidos entre los más alejados del sistema de distribución
- 3) Duchas o grifos de habitaciones de varios pisos de manera que sean representativos del sistema de distribución de agua del edificio completo.

### 4.2. TOMA DE MUESTRA

Las muestras de agua (generalmente de 1 L) se recogerán en recipientes estériles de vidrio, polietileno o similar. Si han sido usados previamente, se deberán limpiar, aclarar con agua destilada o agua del grifo y esterilizar en autoclave durante 20 min. Si los recipientes no resisten el autoclave se pasteurizarán con flujo de agua caliente (>70°C) o con vapor durante al menos 5 min. Para recoger lodo, depósitos o sedimentos se pueden usar contenedores más pequeños y estériles, con tapón de rosca.

Servicio de Microbiología  Hospital.....	<b>Detección de <i>Legionella</i> en muestras de agua mediante cultivo</b>	Fecha: PNT-LP-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 9

En los depósitos se tomará el agua de la parte baja de los mismos, si existen sedimentos recoger parte de ellos, y si existen incrustaciones también rascar parte de ellas. Para tomar muestra de los puntos terminales, como duchas y grifos, se elegirán preferiblemente servicios o habitaciones no utilizados en los días previos a la toma, y la toma se realizará en 3 pasos: 1) Abrir la ducha o grifo suavemente y recoger los primeros 100 ml aproximadamente. 2) Rascar con una torunda de algodón, o espátula en el caso de haber incrustaciones duras, e incluir en el agua. 3) Dejar correr otra pequeña cantidad de agua (hasta completar 1 L) para que arrastre los restos del rascado. La torunda se podrá sembrar directamente en los medios de cultivo, en cuyo caso se introducirá humedecida en una pequeña cantidad de agua en un contenedor pequeño estéril y con tapón de rosca.

Se recogerán detalles sobre el origen (punto concreto de la toma, instalación/edificio, dirección de la instalación) y volumen de la muestra así como la posible presencia de algún biocida. Cuando la muestra de agua contiene o se sospecha que contenga un biocida oxidante (por ejemplo cloro), añadir un exceso de tiosulfato potásico o tiosulfato sódico al contenedor, antes o simultáneamente al muestreo.

#### 4.3. TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El análisis microbiológico debe comenzar lo antes posible tras la recepción de la muestra en el laboratorio. El tiempo máximo recomendado entre la toma de muestra y su procesamiento es de 2 días, no debiendo exceder 5 días. Las muestras de agua no deben ser congeladas para su almacenamiento y, en caso necesario, serán mantenidas a 2-6°C.

El transporte de muestras de agua al laboratorio se realizará a temperatura ambiente (evitando temperaturas altas en verano) y protegidas de la luz solar, en el menor tiempo posible (24-48 h) en embalajes adecuados para evitar su rotura o vertido.

Se desecharán muestras con su contenido vertido o carente de información.

### 5. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

#### 5.1. REACTIVOS

##### 5.1.1. Tampón ácido pH 2,2

Solución ácida de KCl/HCl 0,2N (pH 2,2) para usar en el tratamiento de descontaminación de las muestras contaminadas.

- Solución A: Ácido clorhídrico (HCl) 0,2 mol/L, disolviendo 17,4 ml de HCl concentrado en 1 L de agua destilada
- Solución B: Cloruro potásico (KCl) 0,2 mol/L, disolviendo 14,9 g de KCl en 1 L de agua destilada
- KOH 1 mol/L, disolviendo 5,6 g de KOH en 100 ml de agua destilada

Preparar el tampón ácido mezclando 3,9 ml de solución A y 25 ml de solución B. Ajustar el pH a 2,2 por adición de KOH 1 mol/L.

Almacenar en frascos de vidrio con tapón de rosca a temperatura ambiente protegidos de la luz un máximo de 1 mes. Evitar la excesiva manipulación su para evitar posibles contaminaciones. Es preferible conservar en alícuotas.

##### 5.1.2. Solución salina Page

###### Composición:

Cloruro sódico (NaCl)	0,120 g
Sulfato magnésico (MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O)	0,004 g
Cloruro cálcico (CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O)	0,004 g
Fosfato disódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0,142 g
Fosfato potásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,136 g
Agua destilada	1000 ml

Añadir los productos químicos al agua destilada, disolver, mezclar bien y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

##### 5.1.3. Solución de Ringer

Usar una preparación comercial (normalmente en forma de tabletas). Preparar una dilución 1/40 de la solución Ringer en agua destilada. Dispensar al volumen requerido y esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min.

##### 5.1.4. Leche descremada

Para conservación de los aislados de *Legionella* se utiliza generalmente leche descremada, aunque ésta puede ser inhibitoria para algunas especies. Partir de un preparado comercial y seguir las instrucciones de uso, diluyendo al 10% en agua destilada. Repartir en viales con tapón de rosca con 0,5 ml de leche/vial, esterilizar en autoclave a 121°C, enfriar y almacenar hasta su uso a -20°C.

Alternativamente se pueden utilizar otros métodos de conservación disponibles, siempre que previamente se haya comprobado su eficacia.

#### 5.2. MEDIOS DE CULTIVO

En la preparación de medios de cultivo y tampones se deberán emplear reactivos de grado analítico, aunque se podrán emplear de otro grado siempre que se demuestre que no afecta al ensayo. Preparar los medios de cultivo conforme a las instrucciones del fabricante empleando agua que cumpla con la norma ISO 3696 Grado 3.

Se detalla a continuación la composición y preparación de los medios de cultivo requeridos, aunque éstos pueden ser adquiridos comercialmente, en cuyo caso se prepararán y/o utilizarán según las instrucciones del fabricante. Someter a los mismos controles que los medios preparados en el laboratorio.

##### 5.2.1. Agar BCYE $\alpha$ (buffered charcoal yeast extract suplementado con $\alpha$ -cetoglutarato)

###### Composición por litro:

ACES buffer	10 g
KOH	2,8 g
Carbón activo	2 g
Extracto de levadura	10 g
Agar	14 g
$\alpha$ -Cetoglutarato	1g
L-Cisteína HCl	0,4 g en 10 mL
Pirofosfato férrico	0,25 g en 10 mL
Agua destilada	Hasta 1 litro

Servicio de Microbiología  Hospital.....	Detección de <i>Legionella</i> en muestras de agua mediante cultivo	Fecha: PNT-LP-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 9

#### Preparación:

1. Preparar soluciones independientes de L-cisteína y pirofosfato férrico (III) disolviendo 0,4 g y 0,25 g respectivamente en 10 ml de agua destilada. Si el pirofosfato se disuelve mal, agitar con imán a 50°C. Esterilizar cada solución por filtración a través de una membrana de 0,22 µm de poro y de baja adsorción. Almacenar en frascos limpios y estériles a -20°C durante no más de 3 meses.
2. Añadir el polvo de ACES (N-2-acetamido-2-ácido aminoetanosulfónico) a 500 ml de agua destilada y disolver en un baño de agua a 45-50°C. Añadir el hidróxido potásico (KOH) en lentejas a 480 ml de agua destilada y disolver con agitación suave. Para preparar el tampón ACES mezclar ambas soluciones.
3. Añadir secuencialmente el carbón, el extracto de levadura y α-cetoglutarato (sal monopotásica) a 980 ml de tampón ACES.
4. Preparar una solución 0,1 mol/L de KOH disolviendo 5,6 g en 1 L de agua destilada. Preparar una solución 0,1 mol/L de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) añadiendo cuidadosamente 5,3 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1 L de agua destilada. Usar las soluciones de 0,1 de mol/L de KOH ó 0,1 mol/L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para ajustar el pH a 6,9.
5. Añadir el agar, mezclar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Posteriormente atemperar a 45-50°C en un baño de agua y adicionar las soluciones de L-cisteína y pirofosfato férrico asépticamente, mezclando bien después de cada adición.
6. Dispensar en placas de Petri. El pH final del medio es de 6,9 a 25°C.
7. Almacenar a 4°C, protegido de la luz y la deshidratación, hasta un máximo de 1 mes.

Alternativamente se pueden utilizar medios comerciales, siempre que cumplan con los controles detallados en el apartado 5.2.4.

#### 5.2.2. Agar BCYEα sin Cisteína

Preparar este medio igual que BCYEα, pero omitiendo la adición de L-cisteína.

#### 5.2.3. Medio selectivo Agar GVPC (BCYEα suplementado con glicina, vancomicina, polimixina B y cicloheximida)

Este medio es idéntico al BCYEα pero contiene además glicina (a una concentración final de 3 g por litro de medio) y 3 suplementos antibióticos, polimixina B (a una concentración final de 80.000 UI/L), vancomicina (a una concentración final de 0,001 g/L) y cicloheximida (a una concentración final de 0,08 g/L). Los suplementos de antibióticos se esterilizan mediante filtración por filtros de baja adsorción y de 0,22 µm de tamaño de poro, y se conservan en recipientes estériles a -20°C durante un periodo máximo de 6 meses, debiéndose descongelar a temperatura ambiente antes de su uso.

Solución de polimixina B: Disolver la cantidad apropiada (normalmente 200 mg) de polimixina B sulfato en 100 ml de agua destilada para conseguir una concentración de 14.545 UI/ml. Mezclar y,

después de esterilizar, dispensar en alícuotas de 5,5 ml.

Solución de vancomicina: Disolver 20 mg de vancomicina en 20 ml de agua destilada, mezclar y, después de esterilizar, dispensar en alícuotas 1 ml.

Solución de cicloheximida: Disolver 2 g de cicloheximida en 100 ml de agua destilada, mezclar y, después de esterilizar, dispensar en volúmenes de 4 ml. Se debe tener en cuenta que la cicloheximida es hepatotóxica, por lo que cuando se manipula el polvo deben usarse guantes y mascarilla.

Para la preparación del GVPC, se prepara el agar BCYEα como se ha descrito anteriormente, añadiendo 3 g de glicina después de la adición del α-cetoglutarato. Posteriormente se ajusta el pH a 6,9, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min y después de adicionar las suspensiones de L- cisteína y hierro, se añade asépticamente el volumen necesario de cada suplemento de antibiótico al medio final. Mezclar bien, dispensar en las placas de Petri, enfriar a temperatura ambiente permitiendo que se elimine el exceso de humedad y conservar un máximo de 1 mes en condiciones de refrigeración y protegidas de la luz y la deshidratación.

#### 5.2.4. Control de los medios de cultivo

Debe evitarse un calentamiento prolongado durante la esterilización, ya que puede afectar a las calidades nutricionales del medio BCYEα. La variación de los ingredientes del medio, lote a lote (particularmente α-cetoglutarato) puede también afectar a su rendimiento, por lo que es esencial comprobar la capacidad de cada nuevo lote de permitir el crecimiento de *L. pneumophila* serogrupo 1 en 3 días de incubación.

En la evaluación de la capacidad del medio para soportar el crecimiento bacteriano es normal usar cepas de referencia o cultivos de organismos previamente aislados, mantenidos en el laboratorio. Se debe tener en cuenta que para *Legionella* este método puede ser engañoso, ya que pueden adaptarse fácilmente a crecer en medios de cultivo que no soportarían el aislamiento primario de cepas salvajes.

Cada lote de medio preparado será sometido a tres controles antes de su uso. En el caso de medios de cultivo comerciales, se debe comprobar que cumplen los mismos requisitos antes de su utilización.

1. Comprobar su pH. Después de la esterilización en autoclave, y una vez el medio enfriado, comprobar, y corregir en su caso, el pH, antes de dispensarlo en placas de Petri.
2. Comprobar su esterilidad. En cada lote de medio de cultivo preincubar el 2% de placas a 35°C durante 24 h, para comprobar la ausencia de crecimiento bacteriano.
3. Comprobar su capacidad para el crecimiento de *Legionella*. Comprobar que el medio de cultivo preparado soporta el crecimiento de *Legionella*, y que las colonias que produce presentan el aspecto característico. Lo ideal sería utilizar medios y materiales de referencia. Al no disponer de estos materiales se pueden utilizar cualquiera de los siguientes procedimientos:

Servicio de Microbiología	<b>Detección de <i>Legionella</i> en muestras de agua mediante cultivo</b>	Fecha: PNT-LP-02	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 5 de 9

- a) Usar placas de un lote previo de medio conocido que soporte el crecimiento de *Legionella* junto con placas de un lote nuevo, e inocular ambas con una muestra de agua conocida que contenga *Legionella*.
- b) Obtener una cepa tipo liofilizada de *Legionella pneumophila* serogrupo 1, de una colección de cultivos reconocida nacionalmente. Recuperar según las recomendaciones dadas y subcultivar en BCYE $\alpha$  para ver su pureza. Si no se dispone de un cultivo tipo, usar una cepa recientemente aislada y confirmada como de *L. pneumophila* serogrupo 1. Las cepas de *L. pneumophila* almacenadas se deben sustituir después de 10 subcultivos. Después de la incubación, hacer una suspensión visible y dispensar en volúmenes de 1 ml en caldo glicerol estéril ó solución salina de Page, para almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ , o en agua destilada para almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Usar alícuotas de una suspensión de uno (ó más) aislados y descongelar a temperatura ambiente. Agitar vigorosamente, esperar de 5 a 10 min para que se deposite el aerosol, e inocular un volumen medido (por ej. 0,1 ml) en 2 placas del medio a controlar.

Después de la incubación, anotar y comparar los resultados para asegurar que el número y la morfología de las colonias son las esperadas.

En ocasiones, puede ser interesante también efectuar un control cuantitativo de la productividad del medio. Para ello, podrían utilizarse el método ecométrico de Mossel (Mossel D, Trees MG, Laarhoven BV, Anniek MT, Lighttenberg M, Maria EBW. Quality assurance of selective cultura media for bacteria, moulds and yeast: An attempt to standardization at international level. J Appl Bacteriol, 1983; 54: 313-327) o el cálculo de la relación de productividad mediante la técnica modificada de Miles & Misra (Basu S, Pal A, Desai PK. Quality control of culture media in a microbiology laboratory. Indian J Med Microbiol 2005; 23:159-163).

## 6. APARATOS Y MATERIAL

- Estufa de  $36^{\circ}\text{C}$ , opcionalmente con 2,5-5% de  $\text{CO}_2$
- Sistema de vacío
- Sistema de filtración: soporte (o rampa de soportes) para filtros de 47 mm de diámetro, con pie y válvula de control de vacío, y embudos abiertos en su parte inferior, para encajar sobre los soportes
- Agitador vortex
- Baño de agua a  $50^{\circ}\text{C}$
- Medidor de pH
- Balanza de precisión
- Lupa binocular de al menos 30 aumentos, e iluminación incidente oblicua (microscopio de disección)
- Nevera 2 a  $8^{\circ}\text{C}$
- Congelador  $-18$  a  $-20^{\circ}\text{C}$
- Centrífuga capaz de alcanzar 6.000 xg, con tapa de seguridad
- Tubos de centrífuga

- Estándar de turbidez de McFarland (McFarland Barium sulfate standard set) conteniendo 1 vial de cada estándar de turbidez de 1 a 10
- Filtros de ésteres de celulosa, de policarbonato o de nylon de 47 mm de diámetro y con tamaño de poro de  $0,45\ \mu\text{m}$
- Matraces de vidrio de 1 L, con una salida lateral para vacío, con tapón adaptador para conectar la goma de vacío
- Filtros protectores de bomba de vacío, que evitan la entrada de agua en la bomba de vacío
- Material de vidrio estéril: frascos de 1 L y viales de distinta capacidad con tapón de rosca, pipetas de 5 y 10 ml
- Material de plástico estéril: puntas con filtro para micropipetas automáticas, frascos de distinta capacidad, placas de Petri, pipetas Pasteur
- Material de disección estéril (tijeras y pinzas)
- Material de laboratorio (asas de siembra, papel de parafilm para sellar, contenedores para desechar material infeccioso, papel de manos secante, micropipetas, pipeteadores)

## 7. PROCEDIMIENTO

*Legionella* se puede manipular en un laboratorio de microbiología convencional conforme al Nivel de Contención 2. Se debe tener en cuenta que la infección se produce por la inhalación del microorganismo, por lo que es aconsejable valorar la capacidad de producir aerosoles durante todo el procedimiento. Las centrifugaciones y agitaciones vigorosas pueden producir aerosoles, por lo que es recomendable dejar reposar 5 a 10 min antes de abrir los contenedores, y en caso de duda, utilizar una cabina de seguridad de tipo II-A.

Para asegurar la detección de *Legionella* en una muestra de agua normalmente se utilizan técnicas de concentración, filtración en el caso de aguas limpias o centrifugación en el caso de aguas con turbidez. Si se sospecha que una muestra de agua puede contener una elevada concentración de *Legionella* (superior a  $10^5$  ufc/L) se cultivará la muestra directamente o después de diluir. Si por el contrario, se sospecha que la muestra contiene baja cantidad de microbiota se puede sembrar el filtro directamente en el medio de cultivo (o tras un tratamiento ácido realizado también directamente en el filtro).

### 7.1. CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA

La concentración de una muestra de agua se realiza mediante filtración en el caso de aguas limpias o mediante centrifugación en el caso de aguas con elevada turbidez.

#### 7.1.1. Concentración mediante filtración

Utilizar un sistema de filtración por vacío, con pie y válvula de control de vacío, usando membranas de nylon o policarbonato en el caso de muestras en las que después de filtrar se vaya a eluir la bacteria del filtro, y de ésteres de celulosa en el caso que se vaya a incubar el filtro directamente en la superficie del medio. En todos los casos los filtros tendrán un tamaño de

Servicio de Microbiología  Hospital.....	<b>Detección de <i>Legionella</i> en muestras de agua mediante cultivo</b>	Fecha: PNT-LP-02	
		Edición N° 01	Página 6 de 9

poro de 0,45 µm y 47 mm de diámetro. Si al comenzar a filtrar la muestra se produce la rápida colmatación de la membrana, la muestra se concentrará por centrifugación siguiendo el procedimiento descrito en el apartado siguiente.

En el caso de aguas en las que se sospecha la presencia de una elevada microbiota acompañante, una vez terminada la filtración, retirar cuidadosamente el filtro del soporte con pinzas estériles y situarlo directamente en un frasco estéril con tapón de rosca que contenga de 5 a 25 ml de diluyente (soluciones de Ringer o Page, muestra filtrada o agua destilada estéril) y agitar vigorosamente durante al menos 2 min. Los filtros pueden cortarse con tijeras estériles ó rasparse con un raspador estéril, para ayudar a su suspensión. El concentrado también puede introducirse en un baño de sonicación de 2 a 10 min.

En el caso de muestras en las que se sospecha una reducida microbiota acompañante, se podrá depositar el filtro directamente en la superficie del medio de cultivo, sin haber efectuado ningún tratamiento, o bien después de haber realizado un tratamiento ácido sobre el propio filtro.

Antes de iniciar la filtración de otra muestra de agua, limpiar el soporte con alcohol de 96°, secar y flamear, y esterilizar en autoclave después de filtrar cada lote de muestras.

#### 7.1.2. Concentración mediante centrifugación

Se centrifugará 1 L de muestra agitándola previamente para resuspender los sedimentos. Centrifugar a 6.000 g durante 10 min (o 3.000 xg durante 30 min), manteniendo la temperatura entre 15 y 25°C. Eliminar el sobrenadante asépticamente y resuspender el depósito en 2 a 20 ml de diluyente (soluciones de Ringer o Page, sobrenadante desechado ó agua destilada estéril). Anotar el volumen de diluyente utilizado.

#### 7.2. SEDIMENTOS, DEPÓSITOS Y LODOS

Si la consistencia de este tipo de muestras lo permite, plaquear una fracción no diluida, de igual modo que un concentrado. Si la muestra requiere ser diluida para reducir el número de microorganismos acompañantes diluir con agua destilada estéril, solución salina Page o con solución de Ringer diluida (Ver reactivos). Mezclar bien agitando en un vortex durante no menos de 2 min. y añadir bolitas de vidrio estériles, para ayudar a la disgregación del material.

#### 7.3. DESCONTAMINACIÓN E INOCULACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Se recomienda analizar los concentrados inmediatamente, en caso contrario se almacenarán a 2-6°C, en oscuridad durante no más de 14 días. En investigaciones de brotes o con propósitos epidemiológicos, se recomienda conservar una fracción de concentrado, de igual modo, durante al menos 3 meses, por si fuera necesario repetir el proceso.

Dividir las muestras, concentradas ó no concentradas en 3 fracciones:

- A) Sin tratamiento de descontaminación:
  - Inocular de 0,1 a 0,5 ml de concentrado (o muestra no concentrada) en una placa de GVPC
- B) Tratamiento con calor:
  - Transferir 0,5 ml de concentrado (o muestra no concentrada) a un frasco con tapón de rosca
  - Mantener en un baño a 50°C durante 30 min
  - Inocular de 0,1 a 0,5 ml en una placa de GVPC, tan pronto como sea posible después de retirarla del baño de calor
- C) Tratamiento ácido:
  - Centrifugar de 1 a 10 ml de muestra (concentrada o no concentrada) a 6.000 g durante 10 min (o 3.000 g durante 30 min.)
  - Eliminar la mitad del sobrenadante con una pipeta estéril y agitar el sedimento vigorosamente
  - Añadir tampón ácido pH 2,2 (Ver reactivos) hasta el volumen original, mezclando suavemente
  - Mantener en contacto durante 5 min
  - Inocular inmediatamente de 0,1 a 0,5 ml en una placa de GVPC
  - Para los cálculos posteriores se debe tener en cuenta que el concentrado se ha diluido ½.

Alternativamente, se puede emplear tampón ácido pH 2,2 10X, que se diluye 1/10 con la propia muestra (concentrada o directa), y se mantienen en contacto igualmente durante 5 min, evitando la centrifugación, antes de inocular en GVPC.

En muestras donde se presupone una microbiota acompañante escasa, se puede realizar el análisis directamente transfiriendo la membrana sobre la superficie del medio de cultivo, o bien después de un tratamiento ácido directamente sobre el filtro. En este caso se podrán emplear membranas de ésteres de nitrocelulosa y el tratamiento ácido se efectuará como se indica a continuación:

- Añadir 20 ml de tampón ácido pH 2,2 directamente sobre el filtro, antes de retirar el embudo de filtración
- Mantener en contacto durante 5 min
- Eliminar el tampón ácido mediante filtración
- Lavar el filtro con 10 ml de agua destilada
- Con la ayuda de pinzas estériles, colocar el filtro directamente en una placa de GVPC, colocando la parte superior del filtro hacia arriba y evitando burbujas de aire entre el filtro y el medio de cultivo.

#### 7.4. CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Una vez secos los inóculos a temperatura ambiente, se extenderán por toda la placa con ayuda de un asa bacteriológica.

Todas las placas de GVPC inoculadas se incubarán a 36°C, en aerobiosis y condiciones de humedad, durante 12-15 días. Para proporcionar las condiciones de humedad se puede colocar en la base del incubador un recipiente con agua destilada

Servicio de Microbiología  Hospital.....	Detección de <i>Legionella</i> en muestras de agua mediante cultivo	Fecha: PNT-LP-02	
		Edición N° 01	Página 7 de 9

con una pequeña cantidad de sulfato de cobre (renovar esta solución 1 ó 2 veces por semana). La incubación en una atmósfera de aire con 2,5-5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) puede ser beneficiosa para el crecimiento de algunas especies de *Legionella*.

#### 7.5. EXAMEN DE LAS PLACAS

La clave para el aislamiento de *Legionella* a partir de aguas es la observación diaria de los medios de cultivo utilizando una lupa binocular. El crecimiento de la bacteria empieza a ser visible a partir del 3<sup>er</sup> día de incubación, pero puede requerir más tiempo, por lo que los cultivos se mantendrán en incubación hasta 12-15 días antes de considerarlos negativos. Las placas se deben examinar cada 1 ó 2 días, ya que las colonias de *Legionella* pueden quedar enmascaradas por el crecimiento de otros microorganismos.

Las colonias de *Legionella* crecidas directamente sobre el medio de cultivo son lisas con un borde entero, tienen un aspecto granular, como "polvo de vidrio" y a veces presentan un brillo azul-verdoso o rosa-púrpura, con un aspecto cristalino característico. Cuando la bacteria crece directamente sobre los filtros de ésteres de celulosa produce colonias lisas con un borde entero, pero de aspecto blanquecino o amarillento.

Aunque se pueden identificar las colonias individuales cuando éstas tienen un tamaño que lo permite, es preferible recuperar del cultivo primario las colonias sospechosas de ser *Legionella*, mediante subcultivo en BCYE $\alpha$  y BCYE $\alpha$  sin cisteína (o agar sangre). Ello permite disponer de crecimiento suficiente para realizar los ensayos necesarios para su identificación y evita el riesgo de perder las colonias sospechosas por contaminación de los cultivos primarios durante la incubación prolongada. Además permite su conservación, por si fuera necesario realizar estudios posteriores.

#### 7.6. IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS DE *Legionella*

Seleccionar al menos 3 colonias características de *Legionella* por cada placa de GVPC inoculada, para subcultivar paralelamente en BCYE $\alpha$  y BCYE $\alpha$  sin cisteína (o agar sangre). Subcultivar cada colonia en ambos medios en las mismas condiciones de incubación, durante al menos 2 días. *L. oakridgensis* es la única especie que no requiere cisteína en el aislamiento primario, aunque si lo requiere en sucesivos subcultivos.

En general, una colonia de *Legionella* en subcultivo crece en BCYE $\alpha$  a las 48 h de incubación a 36°C, aunque algunas especies pueden requerir una incubación más prolongada y la presencia de 2,5-5% de CO<sub>2</sub>. A las 48-72 h el crecimiento aparecerá confluyente en algunas zonas y con pequeñas colonias aisladas en otras.

La identificación de las colonias de *Legionella* incluye:

##### 1. Morfología característica

2. Comprobación de crecimiento en BCYE $\alpha$  y ausencia de crecimiento en BCYE $\alpha$  sin cisteína (o en agar sangre).
3. Tinción de Gram. *Legionella* es un bacilo gramnegativo que se tiñe débilmente con la coloración de contraste, por lo que es recomendable la utilización de fuchsina básica al 0,1% en vez de safranina en esta tinción.

La confirmación definitiva de las colonias de *Legionella* se realizará siguiendo los métodos recogidos en el PNT-LP-03. Se deben confirmar al menos 5 ó 6 colonias por muestra de agua analizada, ya que es frecuente que una muestra contenga varias especies o serogrupos de *Legionella*. Finalmente, los aislados se conservarán congelados.

En el Anexo I se resume este procedimiento.

#### 8. CONTROL DEL PROCEDIMIENTO

Se recomienda que por cada serie de muestras analizadas se realicen controles de proceso tanto positivos como negativos, que se tratarán de igual modo que las muestras. Como control positivo del proceso, se inoculará 1 L de agua estéril con una suspensión bacteriana de *L. pneumophila* (National Collection of Type Cultures, NCTC 11192) y como control negativo 1 L de agua estéril con una suspensión bacteriana de *E.coli* (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT 434).

Las suspensiones bacterianas empleadas se podrán preparar en el momento a partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento y se titularán para conocer la concentración de microorganismo inoculado. En este caso, las cepas empleadas deberán ser sustituidas después de 10 subcultivos.

Alternativamente se podrán preparar suspensiones bacterianas que se conservarán congeladas en alícuotas. Para ello, preparar suspensiones bacterianas que se dispensarán en alícuotas de 1 mL y se conservarán en glicerol estéril a -20°C o en agua o solución salina de Page a -70°C. Después de descongelar la alícuota a temperatura ambiente, y esperar de 5 a 10 min para que se deposite el aerosol, se tomarán una porción para preparar el control positivo de proceso y otra porción se titulará para conocer la concentración inoculada en la muestra control.

#### 9. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Para estimar el recuento, cada día se deben contar y anotar, el número de colonias características en cada una de las placas de GVPC, para cada muestra de agua analizada, aunque la identificación se realice en 2 ó 3 colonias por placa.

Para estimar el nº de unidades formadoras de colonia (ufc) de *Legionella* en la muestra de agua original o sedimento, seleccionar aquella placa de GVPC que contenga el mayor número de colonias. No es adecuado calcular la media de los recuentos de todas las placas de GVPC incubadas, ya que éstas no son replicados. Estimar el número de ufc de *Legionella*

Servicio de Microbiología	<b>Detección de <i>Legionella</i> en muestras de agua mediante cultivo</b>	Fecha: PNT-LP-02	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 8 de 9

en la muestra original de agua aplicando la siguiente fórmula:

$$C = \frac{N \times V}{J} \times \frac{1}{S}$$

Donde:

- C es el número de ufc por litro de la muestra original
- N el número de colonias en la placa de GVPC con mayor número de colonias
- V el volumen (ml) del concentrado utilizado
- J el volumen (ml) inoculado en la placa
- S el volumen (litros) que fue usado del litro original

El propósito de este procedimiento es demostrar la presencia o ausencia de *Legionella*, por lo que la presencia de colonias se informará como el número de colonias de *Legionella* estimado expresado en ufc/L, y la ausencia de colonias como *Legionella* por debajo del límite de detección.

## 10. RESPONSABILIDADES

El personal técnico será el responsable del procesamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los controles. El facultativo será responsable de la supervisión de las tareas mencionadas, de mantener al día los procedimientos de validación final de los resultados, del cálculo y expresión de los resultados, así como de su interpretación e informe de los mismos.

## 11. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Cuando se aplican tratamientos de descontaminación previos a la inoculación de los concentrados en los medios de cultivo, se debe ser riguroso con los tiempos ya que los tratamientos aplicados también son agresivos para *Legionella*.

En la confirmación de las colonias con morfología sugerente, se puede utilizar agar sangre en lugar de BCYE $\alpha$  sin cisteína para demostrar el requerimiento de este aminoácido para el crecimiento de *Legionella*.

El examen de las placas incubadas debe ser muy minucioso, ya que la abundante microbiota acompañante dificultará el reconocimiento de las colonias de *Legionella*.

Resultados negativos no excluyen la posible existencia de *Legionella* en la muestra estudiada, ya que la bacteria podría encontrarse en una concentración inferior al límite de detección del método, estar enmascarada o bien inhibido su crecimiento por la presencia de otros microorganismos.

En la investigación de brotes, los aislados de *Legionella* recuperados de las muestras de agua deberán enviarse a un laboratorio de referencia para su posterior identificación y comparación con los cultivos de los pacientes. En estos casos es muy importante recuperar varias colonias de la misma muestra de agua (5 ó 6 colonias), independientemente del recuento obtenido.

## 12. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La principal limitación del procedimiento de cultivo es el tiempo requerido para tener un resultado (aproximadamente de 4 a 15 días), lo cual hace que, en ocasiones haya que tomar medidas antes de conocer el resultado. Además, el aislamiento en cultivo no permite detectar células viables no cultivables con capacidad infectiva, ni aislar el microorganismo a partir de muestras que presentan una abundante microbiota.

A pesar de que el medio de cultivo de *Legionella* contiene antifúngicos (cicloheximida), las contaminaciones por hongos son frecuentes, y esto hace que, en ocasiones, se reduzca considerablemente el tiempo de incubación de los medios, lo que podría impedir la detección de la bacteria. Lo mismo ocurre cuando hay un excesivo desarrollo de otras colonias bacterianas. Se deberán extremar las precauciones para evitar la contaminación cruzada de unas placas de cultivo a otras en el caso de que exista contaminación con hongos filamentosos.

Se debe tener en cuenta que *L. pneumophila* se adapta bien a los medios de cultivo utilizados, sin embargo, no ocurre lo mismo con otras especies, que crecen con más dificultad, requieren más tiempo y, en ocasiones pueden llegar a perderse en sucesivos subcultivos.

## 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Bopp CA, Summer JW, Morris GK and Wells JG. Isolation of *Legionella* spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium. J Clin Microbiol 1981; 13:714-719.
2. Edelstein PH. Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. J Clin Microbiol 1982; 16:697-699.
3. Ta AC, Stout JE, Yu VL and 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; 33:2118-2123.



Servicio de Microbiología  Hospital.....	<b>Detección de <i>Legionella</i> en muestras de agua mediante cultivo</b>	Fecha: PNT-LP-02	
		Edición N° 01	Página 9 de 9

### **Anexo I: Detección de *Legionella* en muestras de agua mediante cultivo**

**PROCEDIMIENTO:** En general, las muestras de agua son concentradas y descontaminadas antes de su inoculación en los medios de cultivo. Las muestras de aguas en las que se supone una alta concentración de *Legionella* se pueden sembrar directamente en los medios.

#### 1) Concentración:

- a) En muestras limpias, filtrar mediante vacío, usando membranas de nylon, policarbonato o ésteres de celulosa de tamaño de poro 0,45 µm. Transferir el filtro a un frasco y lavar con 5 a 25 ml de diluyente (soluciones de Ringer o Page, muestra filtrada o agua destilada estéril). Suspender agitando vigorosamente durante 2 min, o cortando el filtro con tijeras estériles y agitando, o raspando con un raspador estéril, o en un baño de sonicación de 2 a 10 min. Anotar volumen de concentrado.

Cuando se sospecha una reducida microbiota acompañante se puede sembrar el filtro directamente en una placa de GVPC, evitando burbujas, o realizar el tratamiento ácido sobre el filtro antes de sembrarlo.

- b) En muestras con elevada turbidez, centrifugar a 6.000 xg durante 10 min (ó 3.000 xg durante 30 min) y resuspender el sedimento en 2 a 20 ml de diluyente.

Los sedimentos y las torundas de rascado se pueden sembrar directamente en los medios.

#### 2) Descontaminación e inoculación de los medios de cultivo: Preparar 3 alícuotas:

- a) Sin tratamiento. Inocular de 0,1 a 0,5 ml de concentrado en una placa de GVPC.  
b) Tratamiento con calor. Transferir 0,5 ml de concentrado a un frasco con tapón de rosca y mantener en baño a 50°C durante 30 min. Inocular de 0,1 a 0,5 ml en una placa de GVPC.  
c) Tratamiento ácido. Se puede usar cualquiera de las siguientes dos opciones:
- Centrifugar de 1 a 10 ml de muestra a 6.000 xg durante 10 min (ó 3.000 xg durante 30 min.), eliminar la mitad del sobrenadante y agitar el sedimento vigorosamente, añadir tampón ácido (pH 2,2) hasta el volumen original, mantener en contacto durante 5 min, e inocular inmediatamente de 0,1 a 0,5 ml en una placa de GVPC. Anotar la dilución (1/2) y el volumen inoculado.
  - Diluir 0,1 ml de concentrado en 0,9 ml de tampón ácido y mantener en contacto 5 min, e inocular de 0,1 a 0,5 ml en una placa de GVPC.

El tratamiento ácido sobre el filtro se realizará de la siguiente manera: Añadir 20 ml de tampón ácido (pH 2,2) sobre el filtro antes de retirar el embudo, mantener en contacto 5 min, eliminar el tampón mediante filtración, lavar con 10 ml de agua destilada, e inocular el filtro directamente en una placa de GVPC.

Una vez secos los inóculos, se extenderán por toda la placa (excepto si se ha sembrado el filtro directamente).

#### 3) Incubación:

- Incubar a 36°C con humedad durante 12-15 días, revisando las placas cada día.
- Subcultivar 2 ó 3 colonias sospechosas/placa GVPC en BCYE $\alpha$  y BCYE $\alpha$  sin cisteína, e incubar a 36°C durante al menos 2 días. Identificar en base a su morfología, ausencia de crecimiento en BCYE $\alpha$  sin cisteína y tinción de Gram (bacilo gramnegativo).
- Confirmar 5 ó 6 colonias/muestra de agua según el PNT-LP-02.



Servicio de Microbiología  Hospital.....	Identificación de los aislados de <i>Legionella</i>	Fecha: PNT-LP-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 6

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este documento es describir los procedimientos de identificación de aislados de *Legionella* al nivel de especie y serogrupo, mediante la utilización de dos tipos de ensayos serológicos disponibles comercialmente: la aglutinación con partículas de látex y la inmunofluorescencia directa (IFD). Aunque existen en el mercado reactivos distribuidos por varias casas comerciales y cualquiera de los ensayos podrían ser utilizados, en este procedimiento se describen detalladamente la aglutinación con partículas de látex utilizando el kit Legionella Latex Test® (distribuido por OXOID) y la IFD Monofluo™ *Legionella pneumophila* IFA test (distribuido por Bio Rad Laboratories), por ser los más ampliamente utilizados en los laboratorios de microbiología clínica y ambiental.

Es de aplicación a cualquier tipo de cultivo, independientemente de que éste se haya obtenido tras el procesamiento de muestras humanas o de muestras ambientales.

## 2. FUNDAMENTO

*Legionella* es una bacteria de morfología bacilar, aerobia, que se tiñe débilmente con la tinción de Gram (bacilo gramnegativo). Su equipo enzimático comprende la presencia de una catalasa, de una citocromo oxidasa y de una gelatinasa, destacando la ausencia de actividad ureásica y nitrato reductasa.

El género *Legionella* se divide en 48 especies, alguna de las cuales comprende varios serogrupos, haciendo un total de 70 serogrupos. Aunque aproximadamente la mitad de estas especies han estado implicadas en infecciones humanas, se considera que el principal patógeno del género es *L. pneumophila*, y de los 16 serogrupos que comprende, *L. pneumophila* serogrupo 1 es el que causa la mayor parte de los casos y el que se encuentra más distribuido en el ambiente.

Tras su aislamiento en cultivo estos microorganismos se identifican generalmente en base a su reacción con reactivos serológicos, aunque adicionalmente se pueden utilizar algunas pruebas bioquímicas.

El ensayo de aglutinación consiste en una reacción antígeno-anticuerpo que permite diferenciar con rapidez *L. pneumophila* serogrupo 1, *L. pneumophila* serogrupos 2 a 14, o *Legionella* spp., que incluye los 2 serogrupos de *L. longbeachae*, los 2 serogrupos de *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei* y *L. anisa*.

El ensayo de IFD es un procedimiento de tinción que permite detectar con rapidez la presencia de cualquier serogrupo de *L. pneumophila* directamente en muestras clínicas o en cultivos. Se realiza con un reactivo polivalente capaz de reconocer todos los serogrupos de *L. pneumophila*.

La IFD es útil en laboratorios de microbiología de los hospitales, donde el número de cultivos a identificar es pequeño, y con una reacción se identifican más del 95% de los aislados recuperados

de pacientes. La aglutinación con partículas de látex puede ser una buena opción en laboratorios donde se procesan muestras de agua, donde, en ocasiones, el número de colonias a identificar es elevado, así como la variedad de especies o serogrupos encontrados. Alternativamente se pueden utilizar otros reactivos disponibles comercialmente.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- PNT-LP-01 "Detección de *Legionella* en muestras clínicas mediante cultivo".
- PNT-LP-02 "Detección de *Legionella* en muestras de agua mediante cultivo".
- Manual de instrucciones del kit de aglutinación Legionella Latex test® (OXOID), proporcionado por el fabricante.
- Manual de instrucciones del kit "Monofluo™ *Legionella pneumophila* IFA test Kit" (Bio Rad Laboratories), suministrado por el fabricante.

## 4. MUESTRAS

Aunque se pueden identificar las colonias individuales cuando éstas tienen un tamaño que lo permite, es preferible recuperar del cultivo primario las colonias sospechosas de ser *Legionella*, mediante subcultivo en medio BCYE $\alpha$ . Ello permite tener crecimiento suficiente para realizar los ensayos necesarios para la identificación y, en caso necesario, su conservación para realizar estudios posteriores. Además, evita el riesgo de perder las colonias sospechosas por contaminación de los cultivos primarios durante la incubación prolongada (12-15 días).

Antes de realizar un ensayo de identificación hay que asegurarse de que se parte de un cultivo puro en BCYE $\alpha$ , procedente del subcultivo de una única colonia, y si fuera necesario, subcultivar de nuevo en BCYE $\alpha$  y BCYE $\alpha$  sin cisteína (o agar sangre), debiéndose evitar la identificación de cultivos viejos.

Cuando se requiera enviar los cultivos de *Legionella* a otro laboratorio, el transporte se realizará en medio BCYE $\alpha$  en placa, o en tubo con agar inclinado, sellado con parafilm, a temperatura ambiente y en el menor tiempo posible. Se utilizarán contenedores y empresas de mensajería que cumplan la normativa europea de transporte de material biológico (Ver Procedimiento 1a de la SEIMC).

## 5. PROCEDIMIENTOS DE IDENTIFICACIÓN

*Legionella* puede manipularse en un laboratorio de microbiología convencional conforme al Nivel de Contención 2, teniendo en cuenta que la infección se produce tras la inhalación del microorganismo, por lo que se debe evitar la producción de aerosoles durante todo el procedimiento.

Aunque se pueden realizar algunas pruebas bioquímicas en los subcultivos, la única que se

Servicio de Microbiología  Hospital.....	Identificación de los aislados de <b>Legionella</b>	Fecha: PNT-LP-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

considera definitiva es el requerimiento de L-cisteína. Todas las especies requieren este aminoácido para su crecimiento, a excepción de *L. oakridgensis*, que puede no requerirlo en el cultivo primario, pero sí en sucesivos subcultivos.

#### 5.1. PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Legionella* MEDIANTE AGLUTINACIÓN CON *Legionella* LATEX TEST® DE OXOID

El método consiste en una reacción antígeno-anticuerpo mediante una aglutinación en porta, utilizando como reactivo partículas de látex azul sensibilizadas con anticuerpos específicos que aglutinan visiblemente en presencia de antígenos de la pared celular de *Legionella*, tras un minuto de contacto. Permite la diferenciación de *L. pneumophila* serogrupo 1, *L. pneumophila* serogrupos 2 a 14 y *Legionella* spp. que incluye otras 7 especies diferentes. La aglutinación se puede realizar directamente de colonias o preparando una suspensión bacteriana en solución salina 0,85%

Los valores de sensibilidad y especificidad, según el fabricante, son 99 y 100%, respectivamente.

No existen estudios comparativos sobre los diferentes métodos de identificación comercializados, por lo que alternativamente se pueden utilizar otros métodos.

##### 5.1.1. Reactivos y productos

Nombre: *Legionella* Latex Test Kit®

Referencia: DR800M

Suministrador: OXOID Diagnostic Reagents, England

Presentación: Kit para 50 determinaciones

Conservación: 2-8°C

Caducidad: la indicada por el fabricante

El contenido del Kit es el siguiente:

- Reactivo de látex para *L. pneumophila* serogrupo 1 (tapón negro)
- Reactivo de látex para *L. pneumophila* serogrupos 2 al 14 (tapón amarillo)
- Reactivo de látex para otras especies de *Legionella* (los 2 serogrupos de *L. longbeachae*, los 2 serogrupos de *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei* y *L. anisa*) (tapón blanco)
- Suspensión de control positivo para 25 determinaciones (tapón rojo)
- Suspensión de control negativo para 25 determinaciones (tapón verde)
- Látex Control, conteniendo partículas azules de látex sensibilizadas con globulina no reactiva (tapón azul)
- 2 frascos con solución tampón fosfato salino pH 7,3 (tapón rosa)
- 50 tarjetas de reacción desechables, con 6 pocillos de aglutinación
- Homogeneizadores de plástico desechables.

##### 5.1.2. Procedimiento operativo

1. Atemperar los reactivos de látex y las tarjetas de reacción.

2. Dispensar 1 gota de cada reactivo de látex (tapón negro, amarillo, blanco y azul) sobre 4 círculos de la tarjeta de reacción, en el borde del pocillo.
3. Añadir a cada pocillo 1 gota de tampón diluyente (tapón rosa), en el borde del pocillo. No mezclar con el reactivo de látex en este punto.
4. Recoger una pequeña cantidad de crecimiento bacteriano (o una colonia) y emulsionar suavemente con el tampón de dilución (se recomienda una suspensión ligera).
5. Mezclar suavemente con el látex cubriendo toda el área del pocillo.
6. Repetir los puntos 4 y 5 para cada reactivo de latex.
7. Rotar la tarjeta de reacción suavemente, durante 1 min.

En cada lote de aglutinaciones se debe incluir un control positivo (tapón rojo) y otro negativo (tapón verde), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el Anexo I se resume este procedimiento.

##### 5.1.3. Obtención y expresión de resultados

Se considera un resultado positivo cuando aparece aglutinación visible (no emplear lupa para la lectura) de las partículas de látex azul en menos de 1 min. de contacto, y no hay aglutinación con el látex control. Una reacción positiva indica que se han detectado los antígenos específicos *L. pneumophila* serogrupo 1, de *L. pneumophila* serogrupos 2 a 14, ó de *Legionella* spp..

Se considera un resultado negativo cuando no aparece aglutinación visible con los reactivos de látex y tampoco hay aglutinación con el látex control, tras 1 min. de contacto. Una reacción negativa indica que no se han detectado los antígenos específicos contenidos en el reactivo de látex.

Se considera un resultado no interpretable cuando aparece aglutinación con el látex control, lo que indica que el cultivo es autoaglutinable.

##### 5.1.4. Anotaciones al procedimiento

Según el fabricante, se puede dar reacción cruzada entre los serogrupos 1 y 9 de *L. pneumophila*, por lo que algunas cepas podrían presentar aglutinación con ambos reactivos de látex.

Los cultivos envejecidos pueden producir reacciones filamentosas que dificultan la interpretación de los resultados.

##### 5.1.5. Limitaciones del procedimiento

La aglutinación con partículas de de látex se considera una identificación presuntiva, que puede ser útil cuando se identifican colonias procedentes de muestras de agua, pero que, en el caso de la investigación de un brote, requiere una confirmación por otro método, como el que se describe a continuación.

Un resultado negativo con todos los reactivos de látex no excluye que el cultivo pertenezca al género *Legionella*, ya que los reactivos de látex no incluyen los serogrupos 15 y 16 de *L. pneumophila*, ni las restantes 40 especies.

Servicio de Microbiología	<b>Identificación de los aislados de <i>Legionella</i></b>	Fecha: PNT-LP-03	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 4 de 6

## 5.2. PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN DE *L. pneumophila* CON EL REACTIVO MONOFLUO™ *Legionella pneumophila* IFA TEST® DE BIO RAD LABORATORIES

El reactivo colorante Monofluo anti *Legionella pneumophila* contiene un único anticuerpo monoclonal marcado con isotiocianato de fluoresceína (FICT), que reacciona con una proteína de la membrana externa de todos los serogrupos de *L. pneumophila*. Un posterior lavado elimina el anticuerpo no fijado, y al examinar la extensión con un microscopio de fluorescencia se puede ver la pared de estas bacterias. Su uso está indicado para la detección e identificación de *L. pneumophila* directamente en muestras clínicas o en cultivos. Se detalla a continuación el procedimiento de identificación de cultivos.

Los valores de sensibilidad y especificidad, según el fabricante, son del 100%, tanto para muestras directas como para cultivos.

### 5.2.1. Reactivos y productos

Nombre: MONOFLUO™ *Legionella pneumophila* IFA Test Kit®

Referencia: 32514

Fabricante: Bio Rad Laboratories, Redmond, WA 98052, USA

Distribuidor: Bio Rad Laboratories, 92430 Mames la Coquette, France

Presentación: Kit para prueba de anticuerpos para la detección e identificación de *Legionella pneumophila* en muestras clínicas y cultivos

Conservación: 2-8°C

Caducidad: la indicada por el fabricante

El contenido del Kit es el siguiente:

- 12 portaobjetos para microscopía de fluorescencia (de 2 pocillos)
- Frasco cuentagotas con 1,3 ml de reactivo colorante anti *L. pneumophila* (tapón azul)
- Frasco cuentagotas con 2 ml de suspensión de antígeno control positivo (tapón rojo)
- Frasco cuentagotas con 4 ml de medio de montaje (tapón blanco)

Además se requieren los siguientes reactivos no incluidos en el Kit:

- Aceite de inmersión
- Solución fisiológica normal (NaCl al 0,85% en agua desionizada)

### 5.2.2. Aparatos y material

- Estufa 36°C
- Microscopio con iluminación fluorescente incidente con lente de 40 aumentos
- Nevera 2-8°C
- Congelador -18-20°C
- Portaobjetos para inmunofluorescencia (los portas incluidos en el Kit son de 2 pocillos, pero para identificación de cultivos se pueden usar portas con pocillos más pequeños)
- Cubreobjetos
- Cámara húmeda
- Placa calefactora 35-40°C

- Estándar de turbidez de McFarland (McFarland Barium sulfate standard set) conteniendo 1 vial de cada estándar de turbidez de 1 a 10
- Material de plástico estéril: puntas de micropipeta, pipetas Pasteur
- Material de vidrio estéril: frascos con tapón de rosca
- Material de laboratorio: asas bacteriológicas, contenedores para desechar material infeccioso, micropipetas

### 5.2.3. Procedimiento operativo

1. Preparar suspensión bacteriana en agua destilada estéril, partiendo de un cultivo puro en BCYE $\alpha$ , hasta lograr una turbidez equivalente al estándar N°1 de McFarland, que se corresponde aproximadamente con una concentración de  $3 \times 10^8$  bacterias por ml. Agitar hasta homogeneizar la suspensión.
2. Colocar 2 gotas de la suspensión, con una pipeta Pasteur, en un pocillo del portaobjetos, y aspirar para que el pocillo quede cubierto con una fina película de suspensión bacteriana. En el caso de utilizar pocillos más pequeños añadir menor cantidad de suspensión bacteriana y aspirar.
3. Secar al aire o con ayuda de una placa calefactora a 35-37°C
4. Fijar al calor pasando el porta por la llama suavemente varias veces
5. Añadir 1-2 gotas de reactivo colorante (tapón azul), o menor cantidad (10  $\mu$ l) en el caso de utilizar pocillos más pequeños (cantidad suficiente para que cubra todo el pocillo y no se seque durante la incubación).
6. Colocar el porta en la cámara húmeda e incubar a 35-37°C durante 30 min
7. Escurrir el reactivo y enjuagar con agua destilada
8. Dejar en agua destilada durante 2-10 min
9. Escurrir y dejar secar al aire, a temperatura ambiente
10. Poner una gota de líquido de montaje (tapón blanco) y un cubrir con un cubreobjetos
11. Observar las preparaciones en el microscopio de fluorescencia a 40 aumentos.

Las tinciones se pueden conservar 24 horas, en oscuridad a 2-8°C, o durante más tiempo a -20°C, en cuyo caso se deben atemperar antes de su observación microscópica.

De forma simultánea se realizará una tinción del control positivo (tapón rojo) y un control negativo (un cultivo de organismo gramnegativo, como por ejemplo *Escherichia coli*), que se procesarán separadamente de las muestras para evitar contaminaciones cruzadas. Para ambos proceder de la forma siguiente:

1. Colocar una gota de control positivo (tapón rojo) en un porta y una gota de suspensión bacteriana control negativo en otro porta, y aspirar para eliminar el exceso de líquido.
2. Secar al aire y fijar al calor, pasando los portas suavemente por la llama.
3. Continuar el procedimiento de igual manera que las muestras.

Servicio de Microbiología  Hospital.....	Identificación de los aislados de <i>Legionella</i>	Fecha: PNT-LP-03	
		Edición N° 01	Página 5 de 6

En el anexo I se detalla este procedimiento de manera resumida.

#### 5.2.4. Obtención y expresión de resultados

Se considera un resultado positivo cuando se observan bacilos o cocobacilos con una fluorescencia de color verde claro, de características morfológicas y de coloración similares a las observadas en el control positivo. Este resultado será interpretado como presencia de *L. pneumophila* en el cultivo analizado. En el caso de cultivos de origen ambiental, también se pueden observar morfologías filamentosas.

Se considera un resultado negativo cuando los organismos aparecen sin coloración, con una coloración roja oscuro o dorado anaranjado. En estos casos únicamente se puede considerar que el cultivo analizado no pertenece a la especie *L. pneumophila*, pero no se pueden descartar otras especies diferentes.

#### 5.2.5. Anotaciones al procedimiento

Se deben extremar las precauciones para evitar las contaminaciones cruzadas (es decir, que pasen las células de *Legionella* de un porta positivo a otro negativo).

La confirmación de que un cultivo es positivo para *L. pneumophila* se debe hacer en base al aspecto característico de las colonias, la ausencia de crecimiento en BCYE $\alpha$  sin cisteína, la morfología de los bacilos fluorescentes y los resultados de la tinción de Gram.

#### 5.2.6. Limitaciones del procedimiento

Un resultado negativo no excluye la posibilidad de que el cultivo pertenezca al género *Legionella*, ya que el reactivo empleado no incluye especies diferentes de *L. pneumophila*, por lo que podría tratarse de otra especie.

### 6. RESPONSABILIDADES

El personal técnico será el responsable del procesamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los controles. El facultativo será responsable de la supervisión de las tareas mencionadas, de mantener al día los procedimientos de validación final de los resultados, de su interpretación y del informe de los mismos.

### 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Segunda edición. Editor HD Isenberg. ASM Press Washington, DC. USA. 2005.
2. Edelstein PH, Beer KB, Sturge JC, Watson AJ, Goldstein LC. Clinical utility of a monoclonal direct fluorescent reagent specific for *Legionella pneumophila*: comparative study with other reagents. J Clin Microbiol 1985; 22:419-421.
3. Gosting LH, Cabrian K, Sturge JC, Goldstein LC. Identification of a species-specific antigen in *Legionella pneumophila* by a monoclonal antibody. J Clin Microbiol 1984; 20:1031-1035.

Servicio de Microbiología	<b>Identificación de los aislados de <i>Legionella</i></b>	Fecha: PNT-LP-03	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 6 de 6

### **Anexo I: Identificación de aislados de *Legionella***

**PROCEDIMIENTO:** Se detallan dos procedimientos de identificación de cultivos de *Legionella*, disponibles comercialmente:

Aglutinación con partículas de látex con *Legionella* Latex Test Kit® (OXOID)

- Dispensar 1 gota de cada reactivo de látex (tapón negro, amarillo, blanco y azul) sobre 4 círculos de la tarjeta de reacción, en el borde del pocillo.
- Añadir a cada pocillo 1 gota de tampón diluyente (tapón rosa) en el borde del pocillo. No mezclar con el reactivo de látex en este punto.
- Recoger una pequeña cantidad de crecimiento bacteriano (o una colonia) y emulsionar suavemente con el tampón de dilución (se recomienda una suspensión ligera).
- Mezclar suavemente con el látex cubriendo todo el área del pocillo.
- Repetir los puntos 4 y 5 para cada reactivo de latex.
- Rotar la tarjeta de reacción suavemente durante 1 min y anotar el resultado.

En cada lote de aglutinaciones se debe incluir un control positivo y otro negativo, siguiendo las instrucciones del fabricante.

IFD con MONOFLUO™ *Legionella pneumophila* IFA Test Kit®

- Preparar suspensión bacteriana en agua destilada estéril, partiendo de un cultivo puro en BCYE $\alpha$ , hasta lograr una turbidez equivalente al estándar N°1 de McFarland (aproximadamente  $3 \times 10^8$  bacterias/ml) y homogeneizar agitando.
- Colocar 2 gotas de la suspensión en un pocillo del portaobjetos (o menor cantidad si se usan pocillos de menor tamaño), y aspirar para que el pocillo quede cubierto con una fina película de suspensión bacteriana.
- Secar al aire y fijar al calor pasando el porta por la llama suavemente varias veces.
- Añadir 1-2 gotas (o 10  $\mu$ l en pocillos menores) de reactivo colorante (tapón azul) (cantidad suficiente para que cubra todo el pocillo y no se seque durante la incubación).
- Colocar el porta en la cámara húmeda e incubar a 35-37°C durante 30 min
- Escurrir el reactivo y enjuagar con agua destilada.
- Dejar en agua destilada durante 2-10 min, escurrir y secar a temperatura ambiente.
- Poner una gota de líquido de montaje (tapón blanco) y un cubrir con un cubreobjetos.
- Leer en un microscopio de fluorescencia a 40 aumentos y anotar el resultado.

En cada lote de tinciones introducir un porta control positivo y otro negativo, y procesar separadamente.





Servicio de Microbiología  Hospital.....	Detección de anticuerpos frente a <i>Legionella pneumophila</i> en suero mediante inmunofluorescencia indirecta	Fecha: PNT-LP-04	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este procedimiento es describir la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la determinación cualitativa y/o semicuantitativa de anticuerpos IgG, IgM e IgA anti *Legionella pneumophila* en suero.

## 2. FUNDAMENTO

Esta prueba se basa en el método clásico de la inmunofluorescencia indirecta. Para ello se utiliza un sustrato antigénico inactivado con calor que generalmente contiene *L. pneumophila* serogrupo 1, aunque también pueden contener una mezcla polivalente de los serogrupos 1 a 6 de *Legionella pneumophila*. Estos antígenos están comercializados, estandarizados y prefijados en los portaobjetos sobre los que se añaden diferentes diluciones del suero del paciente. En el caso de que existan anticuerpos en el suero del paciente frente al correspondiente antígeno, se formará un complejo antígeno-anticuerpo. La posterior adición sobre este complejo de una antiglobulina humana marcada con fluoresceína (FITC) permite la visualización de los microorganismos con un microscopio de luz fluorescente con 400 o 500 aumentos. Los anticuerpos no específicos y demás proteínas se eliminan por medio de un lavado antes de añadir la antiglobulina marcada, y un segundo lavado tras la adición de ésta, eliminará el conjugado sobrante.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 10. "Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica". SEIMC 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a. "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología". SEIMC 2003.

## 4. MUESTRAS

Para la realización de la técnica de IFI en suero se requiere sangre (5-7 ml) obtenida por punción venosa, que tras centrifugación a 3.000 xg durante 10 min permitirá la separación del suero, que se congelará a -20°C hasta su utilización. Se debe comprobar si existe un suero pareado y anotarse.

Para un aprovechamiento máximo de esta técnica se recomienda:

- a) Realizar solamente esta prueba con sueros pareados.
- b) Recoger las muestras de suero con al menos dos semanas de diferencia, y preferiblemente con seis semanas de diferencia.
- c) Realizar la prueba en las dos muestras simultáneamente.
- d) Guardar las muestras de suero congeladas a -20°C hasta su utilización.
- e) No realizar las pruebas en suero hemolítico ni hiperlipémico.

## 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Todos los reactivos se suministran comercialmente:

- Control positivo y control negativo
- Tampón fosfato salino (PBS)
- Conjugado marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)
- Medio de montaje
- Agua destilada o desionizada

## 6. APARATOS Y MATERIAL

- Portas impregnados con antígenos
- Tubos de reacción adecuados para la elaboración de las series de dilución o placas de microtitulación
- Micropipetas automáticas (10-100 µl y 100-1000 µl)
- Micropipeta multicanal 10-50 µl
- Puntas con filtro para micropipetas
- Gradilla
- Cubreobjetos de 60x24 mm
- Cámara húmeda
- Estufa 37°C
- Cubetas de lavado
- Sujeta-portas
- Mezclador Vortex
- Matraz aforado de 500 ml ó 1.000 ml para la preparación del tampón
- Frasco lavador para el tampón
- Cronómetro
- Microscopio de fluorescencia con filtros para una longitud de onda de excitación de 450-490 nm y emisión 560-590 nm, y con objetivos de 40x y 50x.

## 7. PROCEDIMIENTO

1. Descongelar los sueros a analizar.
2. Antes de comenzar con la realización de la técnica, atemperar los portas, controles y conjugados, manteniéndolos a temperatura ambiente durante 5 min.
3. Reconstituir los controles positivo y negativo con 0,5 ml de agua destilada. Dejar 15 min a temperatura ambiente hasta su total reconstitución.
4. Utilizando placas de microtitulación, realizar diluciones seriadas de los sueros (1/8, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1.024) con tampón PBS. Como ejemplo, se puede proceder de la siguiente forma: añadir en el primer pocillo 70 µl de PBS y 10 µl de suero. En los 7 siguientes pocillos añadir 50 µl de PBS. De la primera dilución ya hecha, se pasarán 50 µl al siguiente pocillo, mezclando y volviendo a pasar 50 µl al siguiente y así sucesivamente.
5. Sacar los portas con el antígeno teniendo cuidado de no tocar las áreas de aplicación. Para el marcado de los portas usar sólo lápiz duro, nunca rotulador.

Servicio de Microbiología  Hospital.....	Detección de anticuerpos frente a <i>Legionella pneumophila</i> en suero mediante inmunofluorescencia indirecta	Fecha: PNT-LP-04	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

6. Aplicar 10 µl de cada dilución en cada pocillo comenzando por la dilución al 1/1.024 y terminando por la 1/8.
7. Incluir en un pocillo un control positivo y en otro un control negativo.
8. Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 30 min.
9. Extraer el porta de la cámara húmeda y lavar estáticamente durante 5 min en una cubeta con PBS y otros 5 minutos cambiando el PBS. No mover el porta dentro del PBS. Sacar los portas y enjuagarlos en otra cubeta con agua destilada.
10. Dejar secar los portas completamente.
11. Añadir 10 µl del conjugado a cada pocillo cubriéndolos completamente con el mismo.
12. Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 30 min.
13. Repetir el punto nº 8 y dejar secar.
14. Aplicar 3-4 gotas de medio de montaje por cada porta y cubrir con el cubreobjetos sin que se formen burbujas. Eliminar el medio de montaje excesivo con un papel humedecido en tampón PBS.
15. Realizar una observación inmediata en el microscopio de fluorescencia con el objetivo de 40x o de 50x. Si esto no fuera posible, guardar los portas en un lugar oscuro y frío y protegidos de la desecación (máximo 24 h).
16. Durante la observación al microscopio, se recomienda no concentrarse mucho tiempo en la misma área, es preferible desplazarse por toda la preparación con el fin de evitar pérdidas de fluorescencia.

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

### 8.1 OBTENCIÓN DE RESULTADOS:

Para la aceptación de los resultados es imprescindible haber validado el resultado de los controles: el positivo debe presentar una fluorescencia intensa y brillante de color verde manzana, y el negativo, ausencia de fluorescencia. Los controles son un suero con anticuerpos y otro sin anticuerpos anti-*Legionella*. El suero control positivo debe proporcionar el título esperado dentro del rango de una dilución más o menos. Si el título no es el esperado, se debe repetir todo el procedimiento.

Evaluación positiva: la fluorescencia específica es de un color verde manzana con una intensidad generalmente de 1+ (débil), 2+ (regular), 3+ (brillante), hasta 4+ (muy brillante).

Evaluación negativa: ausencia de fluorescencia.

Las fluorescencias amarillentas o verde oscuras son inespecíficas y no deben tenerse en cuenta.

Título: el título es el valor recíproco de la mayor dilución en la cual se puede observar como mínimo una fluorescencia de 1+. Ejemplo: en caso de valorarse una dilución 1/64 como positiva y una dilución 1/128 como negativa, el título será de 1/64.

Seroconversión: se considera seroconversión cuando al analizar dos muestras de suero del paciente obtenidas con una diferencia de 20 días, se observa

un aumento del nivel de anticuerpos como mínimo del cuádruple y el título de la segunda muestra es  $\geq 1/128$ .

### 8.2 EXPRESIÓN DE RESULTADOS:

- Un título único inferior a 1/256 debe considerarse como negativo.
- Un título igual o superior a 1/128 debe considerarse como resultado presuntivo de enfermedad o contacto previo.
- Seroconversión: se observa un aumento del título al menos al cuádruple entre los dos sueros pareados.

## 9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico será el responsable del procesamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los controles. El facultativo será responsable de la supervisión de las tareas mencionadas, de mantener al día los procedimientos de validación final de los resultados, de su interpretación y del informe de los mismos.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La interpretación de los resultados debe hacerse utilizando los criterios diagnósticos recogidos en la definición de caso (apartado 5.1 del documento científico), la cual está en función del tipo de resultado obtenido (seroconversión o título alto) y del tipo de anticuerpos detectados (*L. pneumophila* serogrupo 1 o *Legionella* de otras especies o serogrupos).

Es preferible realizar la determinación de anticuerpos en sueros pareados, que dos determinaciones en ensayos diferentes, ya que se evitan posibles variaciones de una o dos diluciones, disminuye el error debido al azar y se aumenta la exactitud de la técnica.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La principal limitación es la necesidad de realizar la técnica en sueros pareados para poder demostrar una seroconversión, ya que en ocasiones no se llega a disponer de una segunda muestra de suero. Además, la seroconversión puede tardar hasta dos meses en producirse desde el inicio de los síntomas, lo que provoca un retraso en el diagnóstico.

Se debe tener en cuenta que alrededor del 20-30% de los casos confirmados con cultivo no seroconvierten, por lo que un resultado negativo no excluye la enfermedad.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Edlestein PH. Detection of antibodies to Legionella spp. In NR Rose, EC de Macario, JD Folds, HC Lane, and RM Nakamura (eds). Manual of clinical laboratory immunology, vol. 5. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1997. pp. 502-509
2. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev 2002;15:506-526.

Servicio de Microbiología  Hospital.....	Detección de anticuerpos frente a <i>Legionella pneumophila</i> en suero mediante inmunofluorescencia indirecta	Fecha: PNT-LP-04	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

3. Wilkinson HW, Cruce DD, Broome CV. Validation of *Legionella pneumophila* indirect immunofluorescence assay with epidemic sera. J Clin Microbiol 1981;13:139-146.
4. Wilkinson HW, Farshy CE, Fikes BJ, Cruce DD, Yealy LP. Measure of immunoglobulin G-, M-, and A-specific titers

against *Legionella pneumophila* and inhibition of titers against non-specific, gramnegative bacterial antigens in the indirect immunofluorescence test for legionellosis. J Clin Microbiol 1979; 10:685-689.

**Anexo I: Detección de anticuerpos frente a *Legionella pneumophila* en suero mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

**PROCEDIMIENTO:** Son necesarios 5-7 ml de sangre obtenidos por punción venosa. Tras centrifugación a 3.000xg durante 10 min se separa el suero, que se congelará a -20°C hasta su utilización. Se debe realizar la prueba con sueros pareados (al menos dos semanas de diferencia, y preferiblemente 6 semanas de diferencia entre la extracción de las dos muestras). Se procederá según se describe a continuación:

1. Descongelar los sueros a analizar
2. Atemperar los portas, controles y conjugados dejando a temperatura ambiente 5 min.
3. Reconstituir los controles positivo y negativo con 0,5 de agua destilada y dejar 15 min a temperatura ambiente
4. Utilizando placas de microtitulación, realizar diluciones seriadas de los sueros (1/8, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1.024) con tampón PBS. Como ejemplo, se puede proceder de la siguiente forma: añadir en el primer pocillo 70 µl de PBS y 10 µl de suero. En los 7 siguientes pocillos añadir 50 µl de PBS. De la primera dilución ya hecha, se pasarán 50 µl al siguiente pocillo, mezclando y volviendo a pasar 50 µl al siguiente y así sucesivamente.
5. Sacar los portas con el antígeno teniendo cuidado de no tocar las áreas de aplicación. Para el marcado de los portas usar sólo lápiz duro, nunca rotulador.
6. Aplicar 10 µl de cada dilución en cada pocillo comenzando por la dilución al 1/1.024 y terminando por la 1/8.
7. Incluir en un pocillo un control positivo y en otro un control negativo.
8. Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 30 min.
9. Extraer el porta de la cámara húmeda y lavar estáticamente durante 5 min en una cubeta con PBS y otros 5 min cambiando el PBS. No mover el porta dentro del PBS. Sacar los portas y enjuagarlos en otra cubeta con agua destilada.
10. Dejar secar los portas completamente.
11. Añadir 10 µl del conjugado a cada pocillo cubriéndolos completamente con el mismo.
12. Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 30 min.
13. Repetir el punto n° 8 y dejar secar.
14. Aplicar 3-4 gotas de medio de montaje por cada porta y cubrir con el cubreobjetos sin que se formen burbujas. Eliminar el medio de montaje excesivo con un papel humedecido en tampón PBS.
15. Realizar una observación inmediata en el microscopio de fluorescencia con el objetivo de 40x o de 50x. Si esto no fuera posible, guardar los portas en un lugar oscuro y frío y protegidos de la desecación (máximo 24 h).
16. Durante la observación al microscopio, se recomienda no concentrarse mucho tiempo en la misma área, es preferible desplazarse por toda la preparación, con el fin de evitar pérdidas de fluorescencia.



Servicio de Microbiología  Hospital.....	<b>Detección de antígeno de <i>Legionella pneumophila</i> en orina</b>	Fecha: PNT-LP-05	
		Edición N° 01	Página 2 de 8

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir los métodos de detección de antígeno soluble de *Legionella pneumophila* en muestras de orina, basados en técnicas de enzimoimmunoensayo (EIA) e inmunocromatografía (ICT).

Se describe la metodología e interpretación de resultados de tres técnicas de EIA disponibles comercialmente: Legionella Urinary Antigen® (Binax, Portland, USA), Biotest Legionella Urine Antigen® (Biotest AG, Dreilich, Germany) y Bartels EIA Legionella Urinary Antigen® (Trinity Biotech Co. USA), así como del ensayo de ICT Binax Now™ Legionella Urinary Antigen Test® (Binax, Portland, USA). También se describen los procedimientos de concentración de las muestras de orina utilizando ultracentrifugación selectiva y ultrafiltración mediante centrifugación con los sistemas Urfil-10 Concentrator y Amicon Ultra-4 (ambos suministrados por Millipore), respectivamente.

## 2. FUNDAMENTO

Durante un episodio neumónico causado por *L. pneumophila* se libera antígeno soluble que puede ser detectado en la orina. Es detectable desde el inicio de la sintomatología, hasta muchos meses después (en algún caso hasta más de 1 año), y no se ve afectado por la administración previa de antibióticos.

Un resultado positivo se considera confirmatorio de la enfermedad reciente o pasada, por lo que estas técnicas se deberán realizar únicamente en presencia de un cuadro clínico compatible, o con menor sospecha clínica en el caso de brotes hospitalarios.

Los ensayos de EIA son de tipo sandwich, donde la presencia del antígeno se revela con un anticuerpo policlonal frente a *L. pneumophila*. Permiten estudiar muchas muestras a la vez o muestras aisladas, y los resultados se obtienen en 3 ó 4 horas.

El ensayo de ICT se realiza sobre una membrana de nitrocelulosa en la que se encuentran adsorbidos anticuerpos frente a *Legionella pneumophila* (en la línea de muestra) y anticuerpos anti-conjugado (sobre la línea control), de forma que cuando la muestra contiene antígeno, este queda retenido en la línea de muestra y en la línea control. En el caso de muestras negativas que no contienen antígeno, el conjugado es retenido únicamente en la línea control. Los resultados obtenidos con ICT son equiparables con los de las técnicas de EIA en sensibilidad y especificidad, permite la realización individual de los ensayos, y los resultados se obtienen en 15 minutos.

Por su facilidad de realización y lectura el ensayo de ICT es especialmente útil en pequeños laboratorios con un número reducido de muestras, siendo muy útil para determinaciones urgentes. Las técnicas de EIA pueden ser una buena opción para laboratorios con un número considerable de determinaciones.

Todas las técnicas descritas detectan el antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1, con gran sensibilidad. El EIA de Biotest es el único que según el fabricante tiene capacidad para detectar todos los serogrupos de *L. pneumophila*, así como otras especies de *Legionella*, aunque no garantiza la misma sensibilidad para todos los serogrupos y especies.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003.
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 19 de "Técnicas rápidas de detección de antígeno", 2005.
- Manual de instrucciones del EIA Legionella Urinary Antigen® (Binax, Portland, USA), suministrado por el fabricante.
- Manual de instrucciones del EIA Biotest Legionella Urinary Antigen® (Biotest AG, Dreilich, Germany), suministrado por el fabricante.
- Manual de instrucciones del EIA de Bartels EIA Legionella Urinary Antigen® (Trinity Biotech Co. USA), suministrado por el fabricante.
- Manual de instrucciones del ICT Binax Now™ Legionella Urinary Antigen Test® (Binax, Portland, USA), suministrado por el fabricante.
- Manual de instrucciones del ensayo de ultracentrifugación selectiva Urfil-10 Concentrator® (Millipore) suministrado por el fabricante.
- Manual de instrucciones del ensayo de ultrafiltración mediante centrifugación Amicon Ultra-4® (Millipore) suministrado por el fabricante.

## 4. MUESTRAS

Para estas determinaciones se requieren al menos 2,5 ml de orina, pero es preferible utilizar 10 ml. Si la muestra no se puede procesar inmediatamente, se puede mantener a 4°C durante 1 semana. Para períodos más largos congelar a -20°C. Se debe conservar una fracción de orina sin tratar hasta conocer el resultado final.

Serán rechazadas las muestras mal etiquetadas o recogidas en contenedores no estériles, así como muestras con volumen insuficiente para realizar la determinación (menos de 2'5 ml.).

Las muestras de pacientes que tengan una determinación de detección de antígeno de *L. pneumophila* positiva (máximo 1 mes) o negativa previa (máximo 1 semana) no serán estudiadas y serán informadas como muestra no procedente por positivo o negativo previo, respectivamente.

### 4.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ORINA

Para aumentar la sensibilidad de los ensayos, es preferible trabajar con orinas previamente

Servicio de Microbiología	<b>Detección de antígeno de <i>Legionella pneumophila</i> en orina</b>	Fecha: PNT-LP-05	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 3 de 8

concentradas. También es recomendable trabajar con orinas hervidas para eliminar sedimentos y evitar falsos positivos. Ambos procesos se realizarán antes de comenzar cualquiera de los ensayos. En caso de no disponer de sistemas de concentración, se procederá con la orina sin concentrar.

Para hervir las muestras de orina se requiere el siguiente material:

- Pipetas Pasteur
- Baño de ebullición
- Tubos vidrio 10 ml
- Centrífuga

El hervido de las orinas se realiza antes de iniciar la concentración, de la siguiente manera:

1. Hervir durante aproximadamente 5 min y dejar atemperar
2. Centrifugar 15 min a 1.500 xg
3. Guardar aproximadamente 1 ml del sobrenadante como orina directa.
4. Si fuera necesario, se realizarán nuevos pasos de centrifugación de 5 min hasta conseguir eliminar la turbidez.
5. Concentrar 2,5-10 ml del sobrenadante por ultrafiltración selectiva aproximadamente 25 veces. Alternativamente puede utilizarse la ultrafiltración por centrifugación.

#### 4.1.1. Concentración por ultrafiltración selectiva

El sistema de ultrafiltración selectiva consiste en una celda donde se pone la muestra en contacto con un material absorbente mediante una membrana de permeabilidad selectiva, que permite el paso del agua y solutos de bajo peso molecular, concentrándose progresivamente el antígeno al disminuir el volumen de líquido.

#### Material:

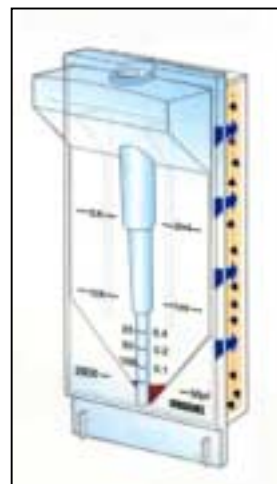
- Pipetas Pasteur
- Tubos vidrio 10 ml

#### Reactivos:

Nombre: Urfil-10 Concentrator®  
Referencia: 12.263  
Suministrador: Millipore  
Presentación: 32 concentradores por caja  
Conservación: 18-25°C  
Caducidad: 1 año

#### Procedimiento (Figura 1)

1. Añadir 2,5-10 ml del sobrenadante de la orina previamente hervida y centrifugada por el orificio situado en la parte superior del concentrador.
2. Esperar hasta que el volumen de líquido disminuya hasta el nivel de concentración deseado.
3. Retirar la muestra ya concentrada con una pipeta Pasteur por el orificio superior del concentrador.



**Figura 1.** Imagen del sistema de concentración Urfil-10 Concentrator

#### 4.1.2. Concentración por ultrafiltración mediante centrifugación

El dispositivo combina una membrana de ultrafiltración de baja adsorción en una carcasa vertical acoplada a un tubo de centrifugación. El agua y solutos de bajo peso molecular atraviesan la membrana como consecuencia de la centrifugación, concentrándose progresivamente el antígeno.

#### Material

- Pipetas Pasteur
- Tubos vidrio 10 ml

#### Reactivos

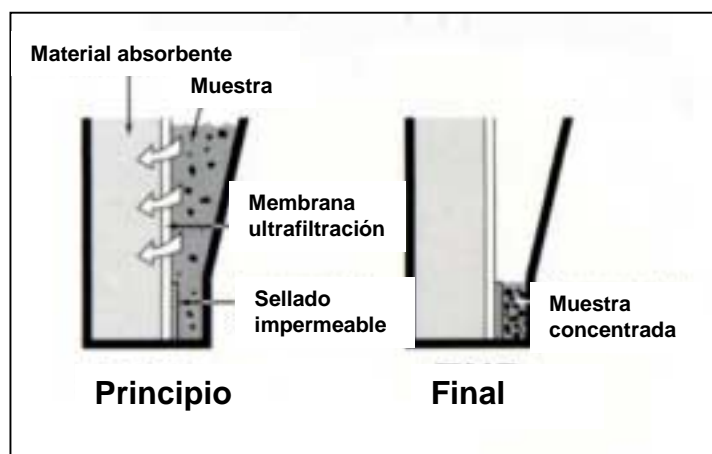
Nombre: Amicon® Ultra-4  
Suministrador: Millipore  
Conservación: 18-25°C  
Caducidad: 1 año

#### Procedimiento (Figura 2)

1. Añadir 2,5-4 ml del sobrenadante de la orina previamente hervida y centrifugada al tubo de centrifugación.
2. Centrifugar los tubos a 3000g durante 15-20 minutos hasta que se haya concentrado la muestra (unas 25 veces).

Retirar el tubo concentrador de la muestra ya concentrada con una pipeta Pasteur.

Servicio de Microbiología  Hospital.....	<b>Detección de antígeno de <i>Legionella pneumophila</i> en orina</b>	Fecha: PNT-LP-05	
		Edición N° 01	Página 4 de 8



**Figura 2.** Imagen del sistema de concentración Amicon® Ultra-4

## 5. PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS

### 5.1. PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE *L. PNEUMOPHILA* SEROGRUPO 1 MEDIANTE EL ENSAYO DE EIA DE BINAX

El EIA es de tipo sandwich donde la presencia de antígeno se revela con un anticuerpo policlonal frente a *L.pneumophila* serogrupo 1 y una proteína conjugada con peroxidasa.

#### 5.1.1 Reactivos y productos

Nombre: Legionella Urinary Antigen ELISA® (Binax, Portland, USA).

Referencia: 851-000

Suministrador: CBF LETI SA.

Presentación: kit para 96 determinaciones.

Conservación: 6°C

Caducidad: la indicada por el fabricante.

Contenido del kit:

- Placa de microtiter de 96 pocillos
- 1 vial control positivo
- 1 vial control negativo
- 1 vial tampón de lavado (10x)
- 1 vial conjugado
- 1 vial de sustrato de color
- 1 vial de solución de parada

#### 5.1.2. Aparatos y material

- Pipeta automática 100 µl
- Puntas de pipeta
- Lector placas EIA a una longitud de onda de 450 nm

#### 5.1.3. Procedimiento operativo

Distribuir las muestras y controles en el soporte de disposición de muestras.

1. Dispensar 100 µl de control positivo y control negativo en los pocillos B1 y C1, respectivamente. Reservar el primer pocillo (A1) para el blanco.
2. Añadir 100 µl de cada muestra en los pocillos correspondientes.
3. Añadir 100 µl de conjugado en todos los pocillos ocupados excepto en el pocillo A1 (blanco).
4. Incubar a temperatura ambiente (20-25°C) durante aproximadamente 2 horas.

5. Preparar la dilución de uso (1x) de la solución de lavado, mezclando los 40 ml de solución 10x con 360 ml de agua destilada. Conservar a temperatura ambiente hasta la caducidad del kit.
6. Lavar 3 veces todos los pocillos incluido el blanco, con 300 µl de solución de lavado (1x). El lavado se ha de hacer manualmente vertiendo el contenido de los pocillos de la placa y golpeando la placa invertida sobre un papel absorbente limpio.
7. Añadir 200 µl de sustrato de color en todos los pocillos incluido el blanco.
8. Incubar a temperatura ambiente (20-25°C) en ausencia de luz durante 15 min.
9. Añadir 50 µl de solución de parada en todos los pocillos incluido el blanco.
10. Leer las absorbancias a 450 nm, utilizando como blanco el pocillo A1.

Se debe incluir un control positivo y otro negativo en cada ensayo y se procesarán como las muestras.

#### 5.1.4. Interpretación y cálculo de resultados

Para que un ensayo sea considerado válido la lectura de la absorbancia del control negativo deberá ser  $\leq 0,100$  y la absorbancia del control positivo  $\geq 3$  veces la absorbancia del control negativo.

Se consideran positivas aquellas muestras en las que el cociente entre su absorbancia y la absorbancia del control negativo es  $\geq 4$ . Se consideran negativas las muestras en las que este cociente es  $< 3$ . Las muestras en las que este cociente se encuentre entre 3 y 4 se consideran como valor límite, siendo necesaria la solicitud de una nueva muestra.

#### 5.1.5. Anotaciones al procedimiento

Todos los reactivos se deben atemperar antes de su uso. El sustrato de color debe conservarse en frasco oscuro ya que es sensible a la luz. La solución de parada debe manipularse con precaución ya que contiene ácido sulfúrico, que puede causar quemaduras.

Un lavado insuficiente puede dar lugar a resultados erróneos. Si la absorbancia del control negativo es superior a 0,100 el número de lavados debe incrementarse.

#### 5.1.6. Limitaciones del procedimiento

El ensayo ha sido validado únicamente para muestras de orina y no para otro tipo de muestras clínicas que puedan contener también antígenos de *Legionella*. No se puede utilizar este ensayo con muestras de agua, para las que el fabricante tiene comercializado otro ensayo, denominado Equate Legionella Water Test®, por lo que ambos ensayos no son intercambiables.

El ensayo ha sido validado y es específico únicamente para *L. pneumophila* serogrupo 1, por lo que un resultado negativo no descarta una infección por *Legionella pneumophila* de otros serogrupos u otras especies del género.

Servicio de Microbiología	<b>Detección de antígeno de <i>Legionella pneumophila</i> en orina</b>	Fecha: PNT-LP-05	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 5 de 8

## 5.2. DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE *Legionella* MEDIANTE EL ENSAYO DE EIA DE BIOTEST

El EIA es de tipo sandwich y la presencia de antígeno se revela con anticuerpos policlonales marcados con peroxidasa que reaccionan con *L. pneumophila* serogrupo 1, así como con el resto de los serogrupos de *L. pneumophila* y otras especies.

### 5.2.1. Reactivos y productos

Nombre: Biotest Legionella Urine Antigen EIA® (Biotest AG, Dreieich, Germany)

Referencia: 807 600

Suministrador: IZASA

Presentación: kit para 96 determinaciones

Conservación: 6°C

Caducidad: la indicada por el fabricante

Contenido del kit:

- 12 placas de microtiter individuales con 8 pocillos
- 1 vial control positivo
- 2 viales control negativo
- 1 vial tampón de lavado (500x)
- 1 vial conjugado
- 2 viales sustrato
- 1 vial solución de parada

### 5.2.2. Aparatos y material

- Pipeta automática 100 µl
- Puntas de pipeta
- Cámara húmeda
- Estufa de cultivos a 36°C
- Papel absorbente
- Lector placas EIA a una longitud de onda de 450 nm

### 5.2.3. Procedimiento operativo

1. Dispensar 100 µl de los controles negativos en los pocillos B1 y C1, respectivamente, y 100 µl del control positivo en el pocillo D1 del soporte. Reservar el primer pocillo para el blanco.
2. Añadir 100 µl de muestra en los pocillos correspondientes.
3. Incubar a aproximadamente 36°C en la estufa durante aproximadamente 1 hora en cámara húmeda.
4. Preparar la solución de lavado 1x, mezclando 1 ml de solución (500x) con 500 ml de agua desionizada. Conservar a temperatura ambiente hasta 1 semana.
5. Lavar 3 veces todos los pocillos incluido el blanco, con 500 µl de solución de lavado (1x). El lavado se ha de hacer manualmente vertiendo el contenido de los pocillos de la placa y golpeando la placa invertida sobre un papel absorbente limpio.
6. Añadir 100 µl de conjugado en todos los pocillos.
7. Incubar en cámara húmeda a 36°C en estufa durante aproximadamente 1 hora.
8. Lavar 3 veces todos los pocillos incluido el blanco, con 500 µl de solución de lavado (1x), igual que en el lavado anterior.
9. Añadir 100 µl de sustrato en todos los pocillos.

10. Incubar a temperatura ambiente (20-25°C) en ausencia de luz durante 10 min.

11. Añadir 100 µl de solución de parada en todos los pocillos.

12. Leer las absorbancias a 450 nm, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Debe incluirse un control positivo y otro negativo en cada ensayo y se procesarán como las muestras.

### 5.2.4. Interpretación y cálculo de resultados

Para que un ensayo sea considerado válido la lectura de la absorbancia del control negativo deberá ser <0,100 y la absorbancia del control positivo >0,600.

Se consideran positivas aquellas muestras con una lectura de absorbancia superior al valor de corte. Se consideran negativas las muestras con una lectura de absorbancia inferior al valor de corte. El valor de corte se calcula sumando 0,200 a la absorbancia del control negativo.

Las muestras con lecturas de absorbancia intermedias, comprendidas entre la absorbancia del control negativo + 0,100 y el valor de corte, se consideran como valores límite, siendo necesaria la solicitud de una nueva muestra.

### 5.2.5. Anotaciones al procedimiento

Todos los reactivos se deben atemperar antes de su uso. El sustrato de color debe conservarse en frasco oscuro ya que es sensible a la luz. La solución de parada debe manipularse con precaución ya que contiene ácido sulfúrico, que puede causar quemaduras.

Un lavado insuficiente puede dar lugar a resultados erróneos. Si la absorbancia del control negativo es superior a la esperada se deben incrementar el número de lavados.

### 5.2.6. Limitaciones del procedimiento

El ensayo ha sido validado únicamente para muestras de orina y no para otro tipo de muestras clínicas que puedan contener antígeno de *Legionella*.

A pesar de que el ensayo muestra una alta reactividad con distintas especies de *Legionella*, no garantiza la misma sensibilidad para todas las especies descritas, por lo que un resultado negativo no descarta una infección por *Legionella*.

## 5.3. DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE *L. pneumophila* SEROGRUPO 1 MEDIANTE EL ENSAYO DE EIA DE BARTELS

El EIA es de tipo sandwich y la presencia de antígeno se revela con un anticuerpo policlonal frente a *L. pneumophila* serogrupo 1 conjugado con peroxidasa.

### 5.3.1. Reactivos y productos

Nombre: Bartels EIA Legionella Urinary Antigen® (Trinity Biotech Company)

Referencia: B 1029-440

Suministrador: Innogenetics SA

Presentación: kit para 96 determinaciones

Conservación: 6°C

Caducidad: la indicada por el fabricante

Contenido del kit:

- Placas de microtiter de 96 pocillos
- 1 vial control positivo



Servicio de Microbiología	<b>Detección de antígeno de <i>Legionella pneumophila</i> en orina</b>	Fecha: PNT-LP-05	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 6 de 8

- 1 vial control negativo
- 1 vial tampón de lavado (20x)
- 1 vial conjugado
- 1 vial Substrato A
- 1 vial Substrato B
- 1 vial Solución de parada

### 5.3.2. Aparatos y material

- Pipeta automática 100 µl
- Puntas de pipeta
- Estufa de 36°C
- Lector placas EIA a una longitud de onda de 450 nm

### 5.3.3. Procedimiento operativo

Distribuir las muestras y controles en el soporte de disposición de muestras.

1. Dispensar 100 µl de control positivo y control negativo en los pocillos B1 y C1, respectivamente. Reservar el primer pocillo para el blanco.
2. Añadir 100 µl de muestra en los pocillos correspondientes.
3. Añadir 100 µl de conjugado en todos los pocillos.
4. Incubar a 36°C durante 50 min.
5. Preparar la solución de lavado a la dilución de uso, diluyendo 1/20 en agua destilada estéril (50 ml solución en 950 ml de agua). Esta solución puede conservarse en un recipiente no metálico, a temperatura ambiente hasta un máximo de una semana.
6. Lavar 4 veces todos los pocillos incluido el blanco, con 400 µl de solución de lavado (1x). El lavado se ha de hacer manualmente vertiendo el contenido de los pocillos de la placa y golpeando la placa invertida sobre un papel absorbente limpio.
7. Añadir 50 µl de substrato A en todos los pocillos incluido el blanco.
8. Añadir 50 µl de substrato B en todos los pocillos incluido el blanco.
9. Incubar a 36°C 10 min en ausencia de luz.
10. Añadir 100 µl de solución de parada en todos los pocillos incluido el blanco.
11. Leer las absorbancias a una longitud de onda de 450 nm, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Debe incluirse un control positivo y otro negativo en cada ensayo y se procesarán como las muestras.

### 5.3.4. Interpretación y cálculo de resultados

Para que un ensayo sea considerado válido la lectura de la absorbancia del control negativo deberá ser  $\leq 0,120$  y la del control positivo  $\geq 4$  veces el valor de la absorbancia del control negativo.

Se consideran positivas aquellas muestras con una lectura de absorbancia  $\geq 4$  veces la absorbancia del control negativo. Se consideran negativas aquellas muestras con una lectura de absorbancia  $< 4$  veces la absorbancia del control negativo.

### 5.3.5. Anotaciones al procedimiento

Todos los reactivos deben atemperarse antes de su uso. La solución de parada contiene ácido fosfórico, que puede resultar corrosivo, por lo que debe manejarse con cuidado, evitando el contacto con piel, ojos y mucosas.

Los micropocillos no utilizados se pueden sellar y volver a guardar. Los micropocillos no deben ser reutilizados.

### 5.3.6. Limitaciones del procedimiento

El ensayo ha sido validado para muestras de orina, y es específico únicamente para *L. pneumophila* serogrupo 1, por lo que un resultado negativo no descarta una infección por otros serogrupos de *Legionella pneumophila* u otras especies del género.

## 5.4. DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE *Legionella pneumophila* SEROGRUPO 1 MEDIANTE EL ENSAYO DE ICT

Como ocurre con las técnicas de EIA, el ensayo de ICT es una técnica de diagnóstico rápido de la legionelosis debidas a *L. pneumophila* serogrupo 1, que permite estudiar muestras aisladas o muchas muestras simultáneamente. La reacción es visible en 15 min.

Consiste en una membrana de nitrocelulosa donde están adsorbidos en diferentes líneas anticuerpos frente a *L. pneumophila* serogrupo 1, formando la línea de muestra, y anticuerpos anti-conjugado, formando la línea control. Por otro lado, los anticuerpos conjugados con partículas de oro coloidal se encuentran desecadas sobre un soporte inerte. El conjugado así preparado y la membrana de nitrocelulosa se combinan formando la tarjeta de reacción. Dicha tarjeta contiene una abertura donde se inserta el escobillón con la muestra. En el caso de muestras que contengan antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1, éste será capturado por el anticuerpo fijado en la línea de muestra y será detectado por el anticuerpo conjugado. El anticuerpo anti-conjugado también capturará al anticuerpo conjugado formando la línea control.

### 5.4.1. Reactivos y productos

Nombre: Binax Now™ *Legionella* Urinary Antigen Test®

Referencia: 852-000

Subministrador: CBF LETI SA

Presentación: Kit para 22 determinaciones

Conservación: Temperatura ambiente

Caducidad: La indicada por el fabricante

Calibración: No procede

Contenido del kit:

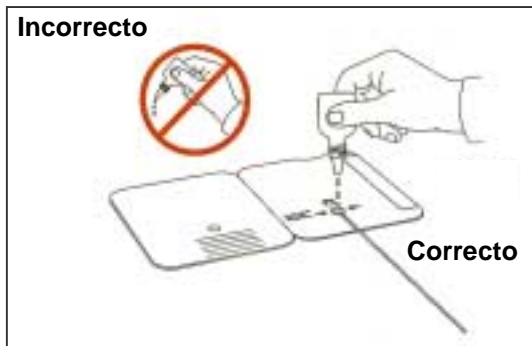
- 1 vial reactivo A
- 1 escobillón control positivo
- 1 escobillón control negativo
- 24 escobillones para muestras
- 22 tarjetas de reacción

### 5.4.2. Procedimiento operativo

1. Introducir el escobillón para muestras directamente en la orina del paciente.

2. Escurrir adecuadamente el escobillón contra las paredes del recipiente para eliminar el exceso de muestra

3. Introducir el escobillón en la tarjeta de reacción
4. Añadir dos gotas del reactivo A, según la figura 3
5. Cerrar la tarjeta de reacción y leer el resultado a los 15 min



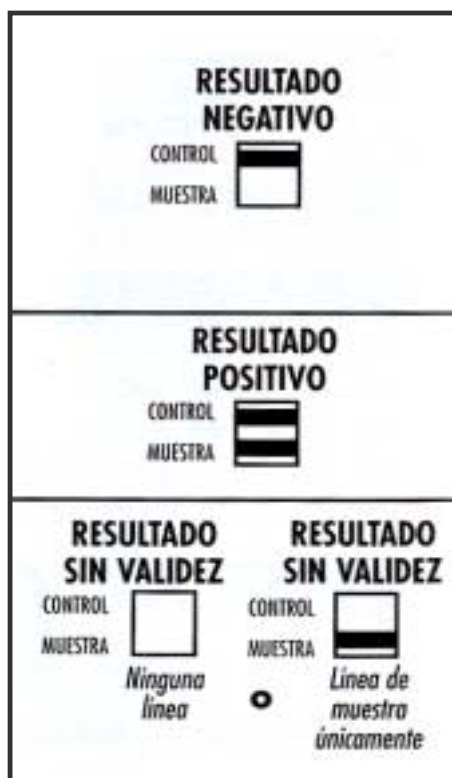
**Figura 3.** Adición del reactivo A en posición vertical

Se deben comprobar los controles positivo y negativo incorporados en cada lote de ensayos.

#### 5.4.3. Interpretación y de los resultados

Como muestra la figura 4, un test es negativo cuando únicamente se obtiene banda de color rosa en la línea control, y es positivo cuando se obtiene banda de color en la línea control y también en la línea de muestra. El test no será válido si no aparece banda de color en la línea control, independientemente de lo que ocurra en la línea de muestra, en cuyo caso se repetirá el ensayo.

En muestras muy hemáticas la hemoglobina puede interferir en la lectura de las líneas. En estos casos se solicitará nueva muestra.



**Figura 4.** Lectura de los resultados del ensayo de ICT

#### 5.4.4. Anotaciones al procedimiento

La falta de color en la banda control podría deberse a la adición de cantidad insuficiente de Reactivo A, por lo que se recomienda añadir este reactivo manteniendo el envase en posición vertical, como indica la figura 3.

No se recomienda utilizar torundas diferentes de las suministradas en el kit. Las torundas control deben manipularse con las mismas precauciones que las muestras.

#### 5.4.5. Limitaciones del procedimiento

El ensayo ha sido validado únicamente para muestras de orina y no para otro tipo de muestras clínicas. Tampoco puede utilizarse con muestras de agua.

Un resultado negativo no descarta la posibilidad de una infección debida a *L. pneumophila* serogrupo 1, en la que los niveles de antígeno en orina se encuentren por debajo del límite de detección del ensayo. Un resultado negativo tampoco descartaría una infección causada por *L. pneumophila* de otros serogrupos u otras especies del género.

### 6. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

En el caso de tener un resultado positivo el informe recomendado sería: "detección de antígeno soluble de *Legionella pneumophila* serogrupo 1: positiva", cuando se utilizan los ensayos de EIA (Binax o Bartles) o el ensayo de ICT. Si se utiliza el ensayo de EIA de Biotest se expresará como "detección de antígeno soluble de *Legionella*: positiva".

En el caso de tener un resultado negativo se expresaría como "detección de antígeno soluble de *Legionella pneumophila* serogrupo 1: negativa", cuando se utilizan los ensayos de EIA (Binax o Bartles) o el ensayo de ICT. En caso de utilizar el ensayo de EIA de Biotest se expresará como "detección de antígeno soluble de *Legionella*: negativa".

En cualquier caso, se debe indicar si la muestra de orina ha sido concentrada o no, ya que el factor de concentración puede influir en el resultado final.

En el caso de que no proceda la realización de los ensayos por disponer de ensayos previos, se informará también el motivo: "detección de antígeno soluble de *Legionella*: no procedente por determinación previa positiva hace menos de un mes" o "detección de antígeno soluble de *Legionella pneumophila*: no procedente por determinación previa negativa hace menos de una semana o aún pendiente".

### 7. RESPONSABILIDADES

El personal técnico será el responsable del procesamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los controles. El facultativo será responsable de la supervisión de las tareas mencionadas, de mantener al día los procedimientos de validación final de los resultados, de su interpretación y del informe de los mismos.

Servicio de Microbiología	<b>Detección de antígeno de <i>Legionella pneumophila</i> en orina</b>	Fecha: PNT-LP-05	
Hospital.....		Edición Nº 01	Página 8 de 8

## 8. LIMITACIONES GENERALES DE LOS PROCEDIMIENTOS

La detección de antígeno mediante estas técnicas puede confirmar una infección por *Legionella* tanto pasada como reciente, por lo que estos ensayos se deben realizar exclusivamente en presencia de un cuadro clínico compatible, o con menor sospecha clínica en el caso de brotes hospitalarios.

Algunos autores han observado que algunos de los ensayos de EIA pueden detectar no sólo *L. pneumophila* serogrupo 1, sino también otros serogrupos de *L. pneumophila*. Si bien este hecho no tiene repercusión clínica, si podría influir en los datos de prevalencia de los distintos serogrupos de *L. pneumophila*.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Blanco S, Prat C, Pallarés MA, Matas L, Domínguez J. Centrifugal ultrafiltration method for rapid concentration of *Legionella pneumophila* urinary antigen, J Clin Microbiol 2004; 42:4410-4412.
2. Berdal BP, Farshy CE and Feeley JC. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay. J Clin Microbiol 1979; 9:575-578.

3. Domínguez JA, Manterola JM, Blavia R, Sopena N, Belda FJ, Padilla E, Giménez M, Sabrià M, Morera J, Ausina V. Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in nonconcentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration. J Clin Microbiol 1996 ; 34:2334-2336.
4. Domínguez JA, Galí N, Pedroso P, Fargas A, Padilla E, Manterola JM, Matas L. Comparison of the Binax *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest *Legionella* urine antigen EIA for detection of *Legionella* antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. J Clin Microbiol 1998; 36:2718-2722.
5. Domínguez J, Galí N, Matas L, Pedroso P, Hernández A, Padilla E, Ausina V. Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for the detection of *Legionella* antigen in urine samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:896-898.
6. Fields BS, Benson RF and Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev 1002; 15:506-526.
7. Sopena N, Sabrià M, Pedro-Botet ML, Reynaga E, García -Núñez M, Domínguez J, Matas L. Persistente of *Legionella* urinary antigen excretion and related factors in Legionnaires' Disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 845-848.



Servicio de Microbiología  Hospital.....	<b>Procedimientos para la prevención y control de la legionelosis en los hospitales</b>	Fecha: PNT-LP-06	
Edición N° 01		Página 2 de 12	

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir los procedimientos más aceptados para la prevención y control de la legionelosis hospitalaria. Se contemplan el sistema de distribución de agua caliente y fría y las torres de refrigeración o dispositivos análogos de los hospitales. Se incluyen medidas generales de prevención, investigación de brotes hospitalarios de legionelosis, diseño y mantenimiento de las instalaciones y una revisión de distintos sistemas de desinfección de choque y procedimientos complementarios.

Es un documento de consulta para las personas que intervienen en esta tarea, como el servicio de mantenimiento del hospital y el grupo encargado del control de la infección nosocomial.

## 2. FUNDAMENTO

En los centros sanitarios coinciden una serie de factores que favorecen la incidencia y gravedad de la legionelosis. De un lado, la concentración de enfermos de riesgo con diferentes tipos de inmunodepresión y, por tanto, con un riesgo elevado de desarrollar formas graves de legionelosis. De otro lado, los hospitales suelen ser edificios grandes, que disponen de redes de agua sanitaria complejas y en ocasiones antiguas, donde la colonización por *Legionella* puede ser elevada.

Muchos hospitales describen experiencias de casos o brotes sucesivos en el tiempo, que en la mayor parte de las ocasiones suelen corresponder a legionelosis nosocomial endémica, situación frecuente en la actualidad. Estos brotes se han atribuido a la contaminación de los sistemas de abastecimiento de agua, fundamentalmente el agua caliente, aunque también puede verse implicado el circuito de agua sanitaria fría. En los últimos años las torres de refrigeración han perdido protagonismo como origen de los casos de legionelosis nosocomial.

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Real Decreto 865/2003, de 18 de Julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. BOE nº 171, 18-7-2003.
- AENOR, INFORME UNE 100030 IN. "Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones". 2001.
- Real Decreto 1751/1998, de 31 de Julio, por el que se aprueba el reglamento de instalaciones térmicas en los edificios y sus instrucciones técnicas complementarias, y se crea la comisión asesora para las instalaciones térmicas de los edificios. BOE nº 186, 5-8-1998.
- Orden de 9 de diciembre de 1975 del Ministerio de Industria, por el que se aprueban las Normas básicas para instalaciones interiores de suministro de agua. BOE nº.11,13/1/1976, y BOE nº.37, 12/2/1976.

## 4. FUENTES DE EXPOSICIÓN HOSPITALARIAS

El hospital ofrece múltiples fuentes potenciales de exposición. Los aerosoles más habitualmente implicados en la aparición de legionelosis nosocomial son los generados por las duchas y grifos de agua caliente de los lavabos. Se han descrito casos asociados con el uso de nebulizadores y equipos de terapia respiratoria, material de irrigación, piscinas de hidroterapia, equipos de extinción de incendios utilizados recientemente y cubitos de hielo producidos por máquinas situadas en plantas de hospitalización, entre otras fuentes. La colonización orofaríngea y la aspiración de agua sanitaria podrían explicar algunos casos.

Actualmente se consideran muy poco probables los brotes nosocomiales asociados a torres de refrigeración. Sin embargo estas instalaciones deben ser contempladas ya que pueden ocasionar casos/brotes de legionelosis comunitaria (Murcia, Zaragoza, Barcelona).

## 5. MEDIDAS GENERALES PARA LA PREVENCIÓN DE LAS LEGIONELOSIS NOSOCOMIALES

Las recomendaciones que se detallan a continuación están basadas, con pequeñas modificaciones, en varias publicaciones recientes, en el Real Decreto 865/2003 y en la guía elaborada por el Departamento de Salud Pública de la Generalidad de Cataluña.

### 5.1. SANEAMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LAS INSTALACIONES

Para prevenir la legionelosis nosocomial hay dos medidas generales de gran relevancia:

- a) Inspección y limpieza periódica de intercambiadores de calor y acumuladores.
- b) Monitorización periódica de la temperatura del agua sanitaria caliente y de las concentraciones de cloro en el agua fría.

Si a pesar de llevar a cabo estas medidas persiste la colonización de las aguas y se dan casos de legionelosis nosocomial deben considerarse, además de las medidas de choque, los sistemas activos o complementarios de desinfección que se detallan más adelante.

Una medida de gran importancia, que seguramente evitará muchos brotes epidémicos de legionelosis nosocomial, es el establecimiento de un sistema obligatorio de alerta rápida del servicio de mantenimiento del hospital y del grupo encargado del control de la infección nosocomial, de todos los incidentes o actuaciones que se realicen sobre el circuito de agua sanitaria. En este sentido, son de especial relevancia, por el riesgo que suponen, las interrupciones en las bombas de impulsión de agua o los trabajos que comporten el estancamiento prolongado de esta. En estos casos debe procederse siempre a una limpieza y desinfección adecuados del tramo afectado antes de regularizar el suministro.

Servicio de Microbiología	<b>Procedimientos para la prevención y control de la legionelosis en los hospitales</b>	Fecha: PNT-LP-06	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 3 de 12

Además, se tendrán en cuenta las torres de refrigeración del hospital y los equipos de terapia respiratoria, como los nebulizadores.

## 5.2. MUESTRAS AMBIENTALES Y MEDIDAS DE ACTUACIÓN SEGÚN LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Está demostrado que la detección de *Legionella* en las aguas de un hospital suele asociarse al diagnóstico de casos de neumonía por este microorganismo con el tiempo.

Cada hospital debe tener una información permanente de su situación con respecto a la *Legionella* y debe realizarse, como mínimo, un muestreo de la red de agua sanitaria con una periodicidad anual. No es aceptable esperar a la aparición de casos para la realización de estudios ambientales, ya que éstos serán prácticamente siempre positivos. Muchas veces el muestreo ambiental contribuye a detectar el primero de una serie de casos que probablemente han ido ocurriendo en los años anteriores.

El número de puntos de muestreo depende del diseño de la red. Es necesario tomar siempre, al menos, una muestra del final de cada ramificación, es decir, del grifo más alejado, tanto de agua caliente como del agua fría, del punto de retorno de la red de agua caliente y de la salida de los acumuladores.

En todas estas muestras se practicarán cultivos cuantitativos según la técnica descrita en el PNT-LP-02. Es importante conocer la especie y serogrupos de las cepas de *Legionella* recuperadas del agua. En algunos hospitales ha transcurrido largo tiempo hasta que se han diagnosticado por cultivo los primeros casos de neumonía nosocomial por *L. micdadei* o por *L. pneumophila* serogrupo 6 tras antigenurias repetidamente negativas.

### 5.2.1. Hospitales con cultivos ambientales negativos

No es necesario tomar ninguna medida complementaria. Se recomienda seguir practicando muestreos ambientales con una periodicidad anual.

### 5.2.2. Hospitales con cultivos ambientales positivos

Es necesario aplicar una serie de medidas complementarias que se señalan a continuación:

- a) Áreas con enfermos transplantados: La presencia de *Legionella* en las aguas obligará a considerar la implantación de un sistema de desinfección local y/o general complementario, como se detalla posteriormente.
- b) En el resto de áreas de hospitalización: Se pueden dar dos situaciones:
  - Si existen antecedentes de legionelosis en el centro o se detectan como consecuencia de los programas de vigilancia activa instaurados hay que proceder a implementar protocolos de desinfección de choque y procedimientos complementarios.

- Si no se conocen casos de legionelosis nosocomial deben ponerse en marcha las siguientes medidas:

#### - Vigilancia activa de los casos de neumonía nosocomial

Tiene particular interés esta medida en las áreas de hospitalización convencional. Es en estas áreas donde suelen darse la mayoría de casos esporádicos y brotes de legionelosis.

En las áreas de cuidados intensivos los problemas que suelen plantearse son mucho menores. Los enfermos ingresados en ellas están menos expuestos a los aerosoles generados por el agua sanitaria (no se duchan ni asean personalmente); además, si en estas unidades se dan casos de neumonía se pondrán en marcha exploraciones invasoras que suelen permitir filiar la etiología de las mismas. Por el contrario, en las áreas de hospitalización convencionales es donde resulta más complicado realizar una vigilancia epidemiológica de la neumonía nosocomial, dada la diversidad de servicios implicados y la variedad de patología que se atienden en ellas.

Además, es habitual que en las áreas de hospitalización convencional los enfermos desarrollen neumonías de gravedad moderada, que suelen evolucionar favorablemente con tratamiento empírico y que pocas veces llegan a catalogarse etiológicamente.

La vigilancia activa de la legionelosis implica la búsqueda sistemática de la neumonía nosocomial y la aplicación, en todos los casos, de técnicas diagnósticas para *Legionella*.

- Los centros en estas condiciones deben de disponer de técnicas adecuadas para el diagnóstico de las legionelosis (cultivo en medio BCYE $\alpha$ , técnicas de detección de antígeno en orina y serología). Se debe sensibilizar a los clínicos de la disponibilidad de estas técnicas y de la conveniencia de tratar de filiar etiológicamente todos los casos de neumonía nosocomial.

Se debe considerar también la posibilidad de incluir una fluoroquinolona o un macrólido en los protocolos de tratamiento de las neumonías nosocomiales.

## 6. DISEÑO Y MANTENIMIENTO DE LAS INSTALACIONES

Teniendo en cuenta los medios a través de los cuales se transmite *Legionella*, en el medio hospitalario, la mejor forma de prevención es la adopción de medidas dirigidas a evitar la colonización, la multiplicación y la dispersión de

Servicio de Microbiología  Hospital.....	<b>Procedimientos para la prevención y control de la legionelosis en los hospitales</b>	Fecha: PNT-LP-06	
Edición N° 01		Página 4 de 12	

*Legionella* en las instalaciones. Las actuaciones preventivas estarán encaminadas a la realización de un buen diseño de estas instalaciones que favorezca posteriormente un buen mantenimiento.

Este mantenimiento preventivo debe contemplar los siguientes aspectos:

- Evitar la acumulación de materiales que forman la biocapa (mediante un programa de limpieza y tratamiento fisicoquímico del agua).
- Evitar que la temperatura del agua se encuentre dentro del intervalo óptimo de crecimiento de *Legionella*.
- Evitar el estancamiento y la baja renovación del agua.
- Realizar un tratamiento de desinfección permanente de todas las aguas de abastecimiento público y de abastecimiento propio utilizadas para este tipo de instalaciones, reduciendo al máximo la probabilidad de la llegada de la bacteria.

## 6.1. DISEÑO DE LA RED DE AGUA SANITARIA, TORRES DE REFRIGERACIÓN Y DISPOSITIVOS ANÁLOGOS

### 6.1.1. Red interna de agua potable

La red interna de agua potable deberá garantizar la total estanqueidad, el aislamiento y la correcta circulación del agua. Se procurará que esta red sea lo más mallada posible (con tuberías intercomunicadas) y se suprimirán los ramales o instalaciones fuera de uso o de baja circulación, para disminuir el riesgo de proliferación de los microorganismos.

La temperatura del agua en el circuito de agua fría deberá ser inferior a 20°C, siendo preciso que las tuberías de esta red estén suficientemente alejadas de las del agua caliente e, incluso, si es necesario, que estén aisladas térmicamente.

Las instalaciones del circuito tienen que permitir la llegada de agua sanitaria caliente periódicamente a una temperatura de 70°C, con el fin de poder realizar el tratamiento de choque térmico. La temperatura del agua no ha de ser inferior a 50°C en el punto más alejado del circuito o en la tubería de retorno al acumulador. Las tuberías deben disponer de sistemas de aislamiento térmico a fin de que la diferencia de temperatura entre el agua de entrada a la distribución y el agua de retorno no sea superior a 3°C. Es recomendable que sean de cobre, acero inoxidable o materiales plásticos resistentes a la temperatura y al cloro, y no cedan al agua sustancias indeseables que comprometan su potabilidad química y sus características organolépticas.

Se recomienda que los grifos sean de características tales que minimicen la formación de aerosoles.

#### 6.1.1.1. Red de agua sanitaria fría

*Características técnicas de los depósitos.* Si hay depósitos, éstos tienen que estar situados en lugares de fácil acceso para facilitar la limpieza y el mantenimiento. Toda el agua de la instalación

deberá pasar por este depósito con el fin de garantizar la renovación permanente y evitar estancamientos, ya que eso supone una pérdida de cloro residual libre, con la consiguiente pérdida de garantía sanitaria.

Han de estar tapados con una cubierta impermeable y disponer de bocas de acceso para facilitar la limpieza. Estas cubiertas o tapas deben ajustar perfectamente, sobresalir 15 cm, como mínimo, y con las medidas de protección necesarias para evitar cualquier contaminación accidental o intencionada.

Han de disponer de bocas de entrada, salida, desbordamiento y drenaje. Es conveniente que el suelo del depósito tenga una pendiente hacia un punto determinado, donde estará la boca de drenaje, que permita el vaciado total. La tubería de salida al sistema debe estar al menos 15 cm por encima del fondo del depósito. Se recomienda que haya, como mínimo, un dispositivo de ventilación que no permita la entrada de agua exterior ni cuerpos extraños. Es preciso que esté cubierto con una malla de paso inferior a 1 mm.

#### 6.1.1.2. Red de agua sanitaria caliente

*Características técnicas de los acumuladores.* Los depósitos acumuladores deben ser verticales, con la entrada de agua por la parte inferior y la salida por la superior. La relación altura-diámetro debe ser elevada (mucho más altura que anchura) y han de tener elementos que permitan reducir al máximo la velocidad residual del agua de entrada al acumulador.

Deben estar dotados de una boca de registro para la limpieza interior y de una conexión para la válvula de vaciado.

Las superficies interiores de los depósitos acumuladores deben ser de materiales resistentes a la agresividad del agua a 70°C y del cloro. La temperatura del agua almacenada en el depósito acumulador debe ser, como mínimo, de 60°C.

#### 6.1.2. Torres de refrigeración y dispositivos análogos

Estos aparatos deberán situarse de manera que se reduzca al mínimo el riesgo de exposición para las personas. A este efecto se deberán ubicar en lugares alejados de las personas, de las tomas de aire acondicionado y de las ventanas.

Los equipos y aparatos han de ser fácilmente accesibles para la inspección, la limpieza y la desinfección. Estarán dotados, al menos, de un dispositivo para realizar la toma de muestras del agua de recirculación, en un lugar accesible.

Las bandejas de recogida de agua de los equipos y los aparatos de refrigeración deben estar dotadas de fondo con la pendiente adecuada y un tubo de desagüe, de manera que se puedan vaciar completamente.

Estos aparatos tienen que estar dotados de separadores de gotas de alta eficacia. La cantidad de agua arrastrada tiene que ser inferior al 0,1% del caudal de agua en circulación en el aparato. Los

Servicio de Microbiología  Hospital.....	<b>Procedimientos para la prevención y control de la legionelosis en los hospitales</b>	Fecha: PNT-LP-06	
Edición N° 01		Página 5 de 12	

materiales de los sistemas de refrigeración deben resistir la acción agresiva del agua y del cloro u otros desinfectantes, con la finalidad de evitar la corrosión.

Asimismo, tienen que evitarse los materiales particularmente favorables para el desarrollo de las bacterias y los hongos. Han de evitarse las zonas de estancamiento de agua en los circuitos, como tuberías de *bypass*, equipos o aparatos de reserva, ramales ciegos y similares. Los equipos o aparatos de reserva, en caso de disponer de ellos, tienen que aislarse del sistema mediante válvulas de cierre hermético y estar equipados con una válvula de drenaje situada en el punto más bajo, para poder vaciarlos cuando estén en parada técnica.

## 6.2. MANTENIMIENTO DE LAS INSTALACIONES

### 6.2.1. Programa básico de mantenimiento, limpieza y desinfección de los sistemas de agua sanitaria fría y caliente

El mantenimiento adecuado de los elementos de la red interna, tanto del agua caliente como del agua fría, es esencial para evitar la colonización y el crecimiento de *Legionella*. Periódicamente, tienen que revisarse estos elementos (válvulas, tuberías, grifos, duchas) y sustituir los defectuosos, especialmente aquellos susceptibles de haber sufrido corrosiones y/o incrustaciones importantes.

Cualquier reforma o reparación de la red interior del agua sanitaria deberá prever, si es posible, el tratamiento de desinfección por hipercloración del tramo sobre el cual se ha realizado la actuación, antes de volver a ponerla en servicio. Igualmente, cuando se hagan nuevas instalaciones o ampliaciones, se realizará este tratamiento de desinfección de choque. La desinfección puede hacerse mediante la adición en el tramo de red que tiene que desinfectarse de una dosis de cloro de 20-30 ppm durante un período de 2-3 h, una vez finalizado este período, se efectuará el vaciado, el aclarado y la puesta en servicio; durante todo el tratamiento no puede consumirse el agua. En el caso de las instalaciones que hayan estado temporalmente fuera de uso y que quieren volver a ponerse en servicio, como medida preventiva, se llevará a cabo una fase previa de limpieza y desinfección.

#### 6.2.1.1. Mantenimiento de la red de agua sanitaria fría

**Captación.** El agua de consumo público no debe contener microorganismos ni sustancias químicas en concentraciones que puedan suponer un riesgo para la salud de las personas, ni a corto ni a largo plazo.

El agua de consumo humano puede proceder de la red de abastecimiento público o de abastecimientos propios, que tendrán que cumplir de antemano los requerimientos de la normativa vigente, recogida en la Reglamentación tecnicosanitaria para el abastecimiento y el control de la calidad de las aguas potables de consumo público.

Antes del inicio de cualquier actividad con abastecimiento propio se recomienda realizar un análisis de control del agua, para valorar la calidad sanitaria. Con el fin de garantizar en todo momento la potabilidad microbiológica del agua de los abastecimientos propios, es imprescindible realizar un tratamiento de desinfección.

**Tratamiento de desinfección.** La desinfección del agua es necesaria, tanto en los casos en que el suministro se haga mediante captación propia, como en los que procediendo el agua de la red de abastecimiento público se disponga de depósito, ya que, aunque el agua procedente de la red contenga una concentración de cloro adecuada, durante su almacenamiento en el depósito, el cloro residual libre se pierde y, por tanto, hace falta una re-cloración para mantener los niveles de desinfectante que garanticen las condiciones microbiológicas adecuadas y una renovación continua del agua en el depósito por recirculación.

Habrà que instalar un dosificador automático de cloro en la tubería de entrada en el depósito que sea accionado por la entrada de agua al sistema, y que esté controlado por un analizador automático de cloro residual que accione el dosificador de cloro, instalado en la entrada del depósito, en función de los valores de cloro residual libre que se midan en el agua de la tubería de salida.

**Control de la desinfección.** Se recomienda que el control de cloro residual libre sea diario, al menos en un punto de la red interna. La selección de los puntos de muestreo tiene que hacerse revisando las características de diseño de la red interna, buscando los puntos más representativos y accesibles al final de la red. Para este proceso es conveniente disponer de los planos de la red de agua sanitaria del edificio.

La determinación del cloro residual libre puede realizarse por un método de análisis basado en una prueba colorimétrica (reacción del cloro con la N,N-dietil-p-fenilendiamina [DPD]). Este método de análisis está comercializado en forma de *kits* y puede encontrarse fácilmente en el mercado.

El intervalo óptimo de cloro residual libre en el agua es de 0,2-0,8 ppm. Si se detecta que el valor de cloro residual libre está por debajo del mínimo indicado (<0,2 ppm), hará falta revisar inmediatamente el sistema de desinfección, comprobando el funcionamiento correcto del dosificador y la reserva de cloro.

**Limpieza de los depósitos.** Los depósitos deben limpiarse periódicamente, siendo recomendable hacerlo como mínimo una vez al año, de la forma siguiente: hay que vaciarlos y retirar los sedimentos, limpiar las paredes y el suelo con un cepillo duro con agua y lejía a una concentración orientativa de 100 mg de Cl<sub>2</sub>/L (que se consigue, por ejemplo, diluyendo 20 ml de lejía de 50 g de cloro activo en 10 L de agua, en cualquier caso ajustar los cálculos según la composición de cloro detallada en la etiqueta del envase), aclarar muy bien las paredes y el suelo con agua a presión y, finalmente, llenar y controlar la



Servicio de Microbiología  Hospital.....	<b>Procedimientos para la prevención y control de la legionelosis en los hospitales</b>	Fecha: PNT-LP-06	
		Edición N° 01	Página 6 de 12

concentración de cloro residual libre hasta los niveles adecuados para el consumo, antes de ponerlos en servicio.

Con el fin de poder realizar correctamente estas operaciones, hace falta que haya una boca de limpieza (drenaje) que permita la evacuación completa de los sedimentos y del agua utilizada en esta operación.

El personal encargado de hacer estas operaciones de limpieza y desinfección tendrá que adoptar medidas de protección personal (protección respiratoria y ropa adecuada), y estar debidamente entrenado para ello.

#### 6.2.1.2. Mantenimiento de la red de agua sanitaria caliente

En lo que concierne al mantenimiento, los intercambiadores de calor más recomendados son los de placas. Hay que realizar las operaciones de limpieza y desinfección de los circuitos primarios y secundarios de los intercambiadores de calor y de los acumuladores (para eliminar barros e incrustaciones). La limpieza tiene que realizarse con medios mecánicos (cepillos metálicos) y desmontar la batería para hacer la limpieza y la desinfección con una solución de 20-30 mg de Cl<sub>2</sub>, durante un tiempo mínimo de 30 min.

Aunque en cada aparato el proceso de limpieza es específico, en general se recomienda el siguiente: aislar la unidad del sistema, desmontar el intercambiador, limpiarlo mecánicamente (cepillos metálicos) sacando la totalidad de las incrustaciones, observar la posible formación de corrosiones y decidir sobre su correcto funcionamiento; si los problemas de corrosión son importantes o es inviable la eliminación de incrustaciones por medios mecánicos o químicos, es aconsejable sustituirlo. Realizar la desinfección externa del intercambiador por inmersión en una solución de 20-30 mg de Cl<sub>2</sub>/L durante 30 min. Si la inmersión es inviable, podrá realizarse la desinfección rociando la unidad con esta solución. Posteriormente, se aclarará con agua de la red de agua fría.

A continuación hay que limpiar y desinfectar los acumuladores de agua caliente de la misma manera que en los supuestos de los depósitos generales de agua para el consumo. Es aconsejable que dispongan de los desagües de fondos correspondientes para que puedan eliminarse los productos generados en las diferentes operaciones. A continuación, se procederá a montar nuevamente la unidad intercambiadora.

Antes de la puesta en servicio, se realizará un tratamiento por choque térmico aumentando la temperatura del agua hasta 70°C y manteniéndola durante un mínimo de 2 h. Se debe poner en servicio la unidad y regular los termostatos para que la temperatura del agua sea, como mínimo, de 50°C en toda la instalación.

En el libro de mantenimiento se harán constar las operaciones de limpieza y desinfección realizadas,

la periodicidad y todas las anomalías e incidencias encontradas.

El programa básico de mantenimiento de los sistemas de agua sanitaria fría y caliente se detalla resumidamente en el Anexo I.

#### 6.2.1.3. Mantenimiento de las torres de refrigeración y equipos análogos

Se detallan a continuación los aspectos mínimos que deben tenerse en cuenta en la revisión, la limpieza y la desinfección de este tipo de instalaciones.

Revisión. La revisión de todas las partes de una instalación incluirá la comprobación del correcto funcionamiento y el buen estado de conservación y limpieza. Debe realizarse con la periodicidad siguiente:

1. Anualmente, el condensador y el separador de gotas
2. Semestralmente, el relleno
3. Mensualmente, la bandeja

Se debe revisar el estado de conservación y limpieza general, con la finalidad de detectar la presencia de sedimentos, incrustaciones, productos de la corrosión, lodos o cualquier circunstancia que altere o pueda alterar el buen funcionamiento de la instalación. Si se detecta algún componente deteriorado, hay que repararlo o sustituirlo.

Hay que revisar también la calidad fisicoquímica y microbiológica del agua del sistema y determinar mensualmente los parámetros siguientes: temperatura, pH, conductividad, sólidos totales en disolución, turbidez, sólidos en suspensión, concentraciones de cloro o biocida utilizado, productos de corrosión y contaminación microbiológica. Si es necesario, se incluirán otros parámetros que se consideren útiles en la determinación de la calidad del agua, la efectividad del programa de mantenimiento o el tratamiento del agua.

Cuando se detecten cambios en la calidad fisicoquímica o microbiológica del agua, hará falta aplicar las medidas correctoras necesarias para la recuperación de las condiciones del sistema. Hay que efectuar la desinfección automática del agua del circuito de refrigeración, de manera que se garantice la inocuidad microbiológica.

Limpieza y desinfección. Las torres de refrigeración tendrán que someterse a una limpieza y desinfección general preventiva dos veces al año, como mínimo (preferentemente al inicio de otoño y de primavera). Además, a causa del riesgo de contaminación general, deberán limpiarse y desinfectarse siguiendo el procedimiento detallado en los Anexos IIa ó IIb, en las situaciones siguientes:

- Antes de la puesta en funcionamiento inicial de la instalación, con la finalidad de eliminar la contaminación que se haya producido durante la construcción.
- Antes de poner en funcionamiento la instalación cuando haya estado parada un mes o más tiempo.

Servicio de Microbiología  Hospital.....	<b>Procedimientos para la prevención y control de la legionelosis en los hospitales</b>	Fecha: PNT-LP-06	
Edición N° 01		Página 7 de 12	

- Antes de poner en funcionamiento la instalación, si con motivo de operaciones de mantenimiento o de obras de reforma hubiera podido contaminarse.

En el Anexo II se detalla resumidamente el programa básico de mantenimiento de las torres de refrigeración y equipos análogos.

## 7. SISTEMAS DE DESINFECCIÓN DE CHOQUE Y COMPLEMENTARIOS

### 7.1. DESINFECCIÓN DE CHOQUE

Se aconseja como medida de urgencia en casos de brotes. Se utilizan indistintamente el choque térmico o el choque con hipoclorito sódico. Tras el calentamiento o la cloración de choque se observa una disminución drástica de los niveles de colonización ambiental que persiste un período de tiempo variable de acuerdo con la complejidad del sistema tratado. La recolonización es la regla, y se produce debido a la resistencia intrínseca de *Legionella* al calor y al cloro, con lo que no se consigue erradicar de los biofilms o de los quistes de las amebas (en estos últimos puede sobrevivir con concentraciones de cloro en agua de 50 ppm).

#### 7.1.1. Choque térmico

El método consiste en calentar el agua de los acumuladores del circuito a 75-85°C y, posteriormente, realizar una apertura secuencial de todos los grifos y duchas del edificio durante un tiempo determinado, idealmente durante 30 min, con el fin de conseguir un flujo de agua por los mismos a temperatura de 60°C o superior durante este período de tiempo (existen diferentes modalidades).

#### 7.1.2. Choque con hipoclorito sódico

Consiste en clorar masivamente el sistema de agua sanitaria durante un período corto de tiempo (3-6 h). Para ello, se vacía el sistema a tratar y se rellena de nuevo con agua previamente clorada en los acumuladores a 40 o 50 ppm con el objetivo de alcanzar las 15-20 ppm en puntos distales del circuito (existen diferentes modalidades).

### 7.2. MEDIDAS DE DESINFECCIÓN ACTIVA O COMPLEMENTARIAS

Se deben introducir cuando se persigue una desinfección continuada del sistema. Según se intente desinfectar un área concreta del hospital o todo el sistema de agua sanitaria del mismo se habla de desinfección local (parcial, de áreas concretas) o general (sistémica, de todo el circuito).

Estos métodos son especialmente recomendables para el circuito de agua sanitaria caliente.

#### 7.2.1. Desinfección local (desinfección del agua sanitaria de un área del hospital)

- Sistema de hipercalentamiento instantáneo. Los sistemas de calentamiento instantáneo se basan en el aumento brusco de la temperatura del agua (90°C) (mediante la interposición en el circuito de un intercambiador de calor) en un punto de la red próximo al área que deba protegerse, para luego

enfriarla (mezclándola con agua fría) cerca de su salida a grifos o duchas, con el fin de alcanzar su temperatura habitual en aquella zona. Es complejo de instalar en hospitales con redes antiguas y no posee efecto residual.

- Luz ultravioleta. La emisión de luz ultravioleta (UV) mata a las bacterias al producir dímeros de timina en el ADN que impiden su replicación genómica. Las lámparas UV se sitúan dentro de una cámara de cuarzo con piezas de acero inoxidable pulidas para minimizar la formación de depósitos y minerales. Estos equipos se intercalan en puntos clave del sistema de distribución de agua que alimente áreas concretas e idealmente pequeñas. Es importante que la distancia de la cañería entre el equipo UV y la salida del agua al exterior (puntos de uso) no sea muy grande dada la ausencia de efecto residual. Es aconsejable que los equipos dispongan de un sensor de UV y de prefiltros que eviten la acumulación de sedimentos en las paredes del equipo con el fin de asegurar una intensidad adecuada de la radiación. Es un sistema fácil de instalar, no posee efectos adversos sobre las cañerías ni sobre el agua, no produce mal olor ni mal gusto, ni genera subproductos químicos. Es más eficaz en áreas pequeñas; es un buen complemento a un sistema de desinfección sistémica en áreas que alberguen enfermos muy inmunocomprometidos. Su mayor desventaja es la ausencia de protección residual en lugares distales y su limitado poder de penetración.
- Filtros bacterianos. Se instalan a la salida del agua (duchas o grifos). Muy eficaces. Dado que deben cambiarse con frecuencia (3-7 días), el coste anual es extraordinariamente elevado en comparación a otros métodos de desinfección local.

#### 7.2.2. Desinfección general o sistémica (desinfección de la red de agua sanitaria de hospital)

- Desinfección térmica (hipercalentamiento). Consiste en la aplicación periódica y continuada de choques de calor, siguiendo la metodología descrita anteriormente. El calentamiento del agua fue el primer método de desinfección utilizado para eliminar *Legionella* del sistema de distribución del agua. Es un sistema rápido y sencillo, de eficacia transitoria, útil en casos en los que se requiera actuar con rapidez, pero con problemas técnicos diversos que desaconsejan su uso como sistema habitual de desinfección. Temperaturas superiores a 60°C inhiben el crecimiento de *Legionella*. Experimentalmente, para reducir en un logaritmo la población de *Legionella* se requieren unos tiempos de exposición distintos según la temperatura del agua: 40 h a 45°C, 6 h a 50°C, menos de 5 min a 60°C y 1 min a 70°C. El hipercalentamiento de agua es la modalidad de menor coste, no necesita un equipo especial, se puede iniciar inmediatamente y disminuye drásticamente las cifras de *Legionella* en todos los puntos del sistema de distribución. Sin embargo, es un sistema que

Servicio de Microbiología  Hospital.....	<b>Procedimientos para la prevención y control de la legionelosis en los hospitales</b>	Fecha: PNT-LP-06	
Edición N° 01		Página 8 de 12	

requiere mucho personal disponible para la apertura y el control del tiempo de flujo y la temperatura del agua. Se pueden producir quemaduras, aunque el riesgo es bajo si se toman las precauciones adecuadas. El inconveniente más importante, sin embargo, es que produce una desinfección transitoria con una recolonización invariable que está en relación directa con el tiempo de apertura de grifos y las dimensiones y la complejidad del circuito de agua sanitaria del hospital. Hay que repetirlo con mucha frecuencia a lo largo del año, lo que entraña un cierto cansancio del personal y un difícil cumplimiento, además acelera los depósitos calcáreos de la red y es relativamente caro a largo plazo.

- Cloración continua. El cloro (hipoclorito sódico) es un agente oxidante utilizado como desinfectante en el control de patógenos. Ha sido uno de los primeros métodos utilizados en la lucha contra *Legionella*, el que más éxitos transitorios ha alcanzado, más fracasos a largo plazo ha conseguido y el que más problemas en las redes de distribución de agua sanitaria ha causado. Debe considerarse actualmente como un método alternativo y usarse en su modalidad de choque para actuar rápidamente en situaciones de brotes nosocomiales sobre el agua caliente. En agua fría constituye un sistema de desinfección adecuado, aun a pesar de la relativa tolerancia de *Legionella* al cloro (0,1 mg/L de cloro libre mata el 99% de *Legionella* en 40 min y el 100% de *E. coli* en 1 min). La modalidad de cloración continua es poco eficaz en agua caliente, dado que el cloro se evapora en el agua (especialmente con recirculaciones lentas), y para alcanzar valores adecuados en puntos periféricos se requiere la inyección de dosis muy altas al inicio del circuito, lo que produce corrosión. Su acción sobre el biofilm es mínima; la formación de trihalometanos (carcinógenos) debido a su reacción con materiales orgánicos y clorofenoles (responsables del mal olor) son también limitaciones a su uso en forma continua.

- Cloración discontinua. Es un método relativamente sencillo, y cuyos efectos a largo plazo sobre las cañerías han resultado ser satisfactorios. Consiste en permitir la entrada de agua fría clorada (a unos niveles moderados de cloro residual) en el circuito de agua sanitaria caliente de forma periódica, mediante la interposición de un cortocircuito (por ejemplo, cada día por la noche durante 2 h). Se consigue así una desinfección por cloración del circuito de agua sanitaria caliente. La purga periódica del sistema de agua caliente, hace posible que todos los cabos distales de los complejos sistemas de fontanería, entren en contacto con el agua conteniendo en todo momento los niveles de cloro adecuados, desinfectándose progresivamente las áreas que presentan dificultad de acceso, no resultando agresivo este tratamiento con los elementos de los sistemas de fontanería.

- Ionización cobre/plata. Los metales pesados, como los iones de cobre y plata, son buenos agentes bactericidas. Estos cationes forman uniones estáticas con las cargas negativas de la pared celular de los microorganismos que producen la lisis y muerte celular. La emisión de cationes por todo el sistema de distribución de agua creados por la ionización de una célula de flujo que contiene electrodos compuestos por una aleación de cobre/plata es un proceso aniónico, activo en superficie, y microbicida. La tasa de iones liberados se controla mediante un microprocesador. Las concentraciones recomendadas por los fabricantes son de 0,2-0,4 y 0,02-0,04 mg/L de iones cobre y plata, respectivamente, en agua caliente, y de 0,2 (Cu) y 0,002 (Ag) ppm en agua fría.

Una evaluación controlada de la ionización cobre/plata en varios hospitales ha demostrado la caída drástica de la colonización ambiental por *Legionella* y la disminución o desaparición de los casos de legionelosis nosocomial, incluso en aquellos hospitales donde se aplica vigilancia activa sistemática de la neumonía nosocomial en el enfermo no sometido a ventilación mecánica.

La eficacia de la ionización cobre/plata no se ve afectada por una elevada temperatura del agua, a diferencia de la luz ultravioleta y la cloración. No genera carcinógenos ni malos olores, penetra el biofilm y deja un residuo bactericida estable. Por otra parte, posee cierto efecto desincrustante (por su acción corrosiva sobre los depósitos organominerales depositados en la pared de las cañerías) con lo que mejora la circulación de agua por el circuito.

Los electrodos acumulan depósitos de cal, de manera que tienen que lavarse regularmente para asegurar el máximo rendimiento (puede colocarse un filtro previo al contacto del agua con los mismos). Unos niveles excesivos de iones pueden causar coloración del agua y una decoloración de superficies de porcelana. La monitorización periódica de los mismos es necesaria para asegurar la eficacia del sistema.

Uno de los inconvenientes de este sistema es la dificultad de controlar los niveles apropiados de cada ión, ya que no se pueden efectuar por sistemas de medición "in situ".

### 7.3. RESUMEN

Como resumen de los métodos preventivos, algunos estudios preliminares sugieren que la ionización de plata/cobre es el método más eficaz y el que presenta una mejor relación coste-eficacia para efectuar la desinfección en continuo. La hipercloración continua con hipoclorito sódico es poco viable en el circuito de agua sanitaria caliente por los motivos expuestos anteriormente; desconocemos las posibles experiencias con dióxido de cloro que, desde un punto de vista teórico, obviaría muchos de los problemas del cloro

Servicio de Microbiología	<b>Procedimientos para la prevención y control de la legionelosis en los hospitales</b>	Fecha: PNT-LP-06	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 9 de 12

convencional. La cloración discontinua y periódica, a niveles moderados de cloro podría ser una buena alternativa. Tanto el hipoclorito sódico como el dióxido de cloro y la cloramina pueden utilizarse en el circuito de agua fría a concentraciones moderadas, y los resultados son buenos, aunque como se ha comentado, los tratamientos de choque periódicos utilizados como método de prevención, a elevadas concentraciones de estos compuestos producen un deterioro progresivo de los sistemas en contacto, que obliga a la larga a su reposición, debido a que poseen un alto poder oxidante. Como métodos de desinfección local se aconseja la luz ultravioleta, aun cuando, en la mayoría de casos, deberá asociarse a un sistema de desinfección continua. Los filtros son eficaces pero muy caros.

En casos de brotes nosocomiales, la desinfección térmica de choque puede usarse como control de emergencia ya que no requiere un equipo especial y puede ser iniciada inmediatamente. El choque puntual con hipoclorito sódico constituye también una buena alternativa, pero su puesta en práctica es más laboriosa que el térmico. La desinfección térmica de choque se aconseja, asimismo, en aquellas áreas que se cierren temporalmente o que se hayan construido recientemente y que se abran.

Una vez superada la crisis se tienen que considerar soluciones a largo plazo, dada la posibilidad de que aparezcan casos esporádicos durante todo el año.

De todas formas, la completa eliminación de *Legionella* del sistema de distribución del agua es muy difícil de conseguir, especialmente con un solo método de desinfección. Se pueden combinar modalidades para asegurar una más completa desinfección o minimizar los efectos sobre las instalaciones.

## 8. INVESTIGACIÓN DE BROTES HOSPITALARIOS DE LEGIONELOSIS

La eclosión de un brote hospitalario es debido generalmente a la proliferación de *Legionella*, presente en los sistemas de agua sanitaria (generalmente caliente) o, mucho más raramente, en las torres de refrigeración, alcanzando inóculos muy elevados. Este fenómeno suele coincidir con alteraciones transitorias del funcionamiento de algún punto del sistema hidromecánico. Por otra parte, la aparición de un brote de legionelosis nosocomial debe hacer sospechar la existencia de casos previos y, en todo caso, ha de reforzar las medidas de vigilancia de la neumonía intrahospitalaria y la disponibilidad de métodos para el diagnóstico microbiológico de esta infección.

La investigación de los brotes hospitalarios de legionelosis debe incluir los siguientes pasos:

### 8.1. DEFINICIÓN DE BROTE

Un brote de legionelosis de origen nosocomial se define como la aparición de dos o más casos

relacionados epidemiológicamente, aparecidos en un periodo de 6 meses.

### 8.2. CREACIÓN DE UN GRUPO DIRECTIVO

En este grupo deben de participar miembros de los servicios de microbiología, medicina preventiva, enfermedades infecciosas, neumología, de otras especialidades implicadas y del servicio de mantenimiento del hospital. El grupo ha de incluir también técnicos comunitarios expertos en vigilancia epidemiológica y sanidad ambiental.

Es conveniente mantener reuniones periódicas con expertos en el tema y con miembros del comité de Dirección del hospital. En estas reuniones se consensuarán los pasos a seguir y, en caso necesario, se definirá con claridad quien y como se informará a la opinión pública.

### 8.3. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO

Después de aceptar la definición de caso de acuerdo con los criterios epidemiológicos y microbiológicos convencionales, se procederá a realizar una encuesta epidemiológica que incluya inexcusablemente los siguientes aspectos:

#### Distribución espacial y temporal de los casos

El estudio de la aparición de casos en el tiempo ayuda a determinar el periodo posible de exposición.

La localización geográfica de los casos puede ayudar a filiar el origen del brote. Los casos pueden agruparse en una planta, verticalmente en el mismo lado del edificio pero en plantas distintas, siguiendo la distribución de las conducciones del aire o del agua, o bien distribuirse heterogéneamente por todo el hospital.

#### Exposición de los pacientes a fuentes hospitalarias de riesgo

Se debe interrogar a los enfermos sobre aquellos aspectos de su estancia hospitalaria que puedan estar relacionados con la adquisición de la infección por *Legionella*. El antecedente de exposición al agua del sistema de distribución del hospital es siempre fundamental, especialmente cuando este está colonizado por *Legionella*.

A pesar de que no existe evidencia directa de que la ingesta de agua se relaciona con la adquisición de la enfermedad, este dato debe recogerse en la encuesta y analizarlo en el contexto de los estudios epidemiológicos que se planteen.

#### Revisión de las prácticas del personal que atienden a los enfermos

Las entrevistas con el personal son sumamente valiosas. Así es posible conocer si se utiliza agua del grifo en los equipos de terapia respiratoria (nebulizadores y humidificadores), en los equipos de ventilación mecánica, en los lavados de la sonda nasogástrica o nutriciones enterales, entre otros.

#### Revisión de los procedimientos de mantenimiento

Es fundamental investigar, de forma conjunta con el servicio de mantenimiento del hospital, diferentes aspectos relacionados con el circuito de agua sanitaria y/o torres de refrigeración y, especialmente,

Servicio de Microbiología	<b>Procedimientos para la prevención y control de la legionelosis en los hospitales</b>	Fecha: PNT-LP-06	
Hospital.....		Edición Nº 01	Página 10 de 12

cualquier modificación del mismo como son la interrupción o el funcionamiento inadecuado de estos sistemas. Los puntos concretos a revisar son:

- a) Puntos centrales del sistema de agua fría
  - Limpieza del depósito y fecha en la que se ha realizado
  - Funcionamiento del clorador
  - Control del cloro
  - Averías del sistema de distribución
- b) Puntos centrales del sistema de agua caliente
  - Fecha de la última limpieza de todos los acumuladores
  - Fuera de servicio transitorio de los acumuladores por avería u otra causa
  - Funcionamiento intermitente o avería de las bombas de inyección del agua sanitaria caliente o de otros elementos
- c) Puntos periféricos (grifos y duchas del sistema de agua caliente)
  - Averías o paros en el circuito del agua sanitaria debido a obras mayores o menores.
  - Disminución de la temperatura o del flujo habitual del agua sanitaria caliente (el flujo de agua en los tramos más altos del circuito disminuye en horas de máximo consumo, lo que comporta el estancamiento prolongado del agua sanitaria caliente y un incremento notable del inóculo de *Legionella*).
  - Situación y fecha de cambio de las alcachofas de las duchas
- d) Torres de refrigeración
  - Control de desinfección continua
  - Limpieza y desinfección. Fecha de en que se ha realizado

#### Formulación de hipótesis

Realizada la encuesta epidemiológica y revisados los procedimientos de mantenimiento, se formulará la hipótesis, que se comprobará con estudios epidemiológicos analíticos y epidemiología molecular.

#### 8.4. TOMA DE MUESTRAS AMBIENTALES

El conocimiento de la cadena epidemiológica de *Legionella* spp. obligan a investigar la presencia de la bacteria en el circuito del agua sanitaria caliente del edificio a nivel central (central térmica) y periférico (duchas y grifos de lavabos) y en los sistemas de enfriamiento (torres de refrigeración y de cogeneración), mediante la toma de muestras de agua (revisar los procedimientos recogidos en el PNT-LP-02 de cultivo de la bacteria en muestras de agua). Si a partir de la encuesta epidemiológica, se sospecha la existencia de otros posibles focos de infección (nebulizadores, humidificadores de oxígeno, equipos de ventilación mecánica), deberán tomarse muestras de los mismos.

#### 8.5. PRIMERAS MEDIDAS DE PREVENCIÓN A TOMAR

En función del conocimiento de este tipo de infección y pendientes de comprobar la hipótesis

establecida en función de los resultados del procesamiento ambiental, deberán tomarse las primeras medidas de prevención. Éstas consisten en un hipercalentamiento con apertura de grifos y duchas de todo el edificio durante 30 min, verificando que la temperatura en los puntos distales sea igual o supere los 60°C (choque térmico), y/o paro de las torres de refrigeración si las investigaciones apuntan a estas últimas como foco probable de infección. En su defecto puede realizarse un choque con hipoclorito sódico.

#### 8.6. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS ANALÍTICOS Y DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Los estudios epidemiológicos analíticos, como los de cohorte y de casos y controles, permitirán comprobar las hipótesis establecidas. Éstos serán especialmente útiles cuando no se resuelva el brote con las medidas adoptadas.

*Legionella pneumophila* serogrupo 1 es la más universalmente distribuida en el ambiente y en la infección en humanos, por lo que la identidad de especie y de serogrupo no será suficiente para implicar una cepa como causante de un brote de legionelosis. Resulta imprescindible tipificar las cepas procedentes de muestras clínicas y las de origen ambiental mediante un estudio genotípico, como se explica en el documento científico, y en el caso de disponer de la técnica molecular AFLP, como se detalla en el PNT-LP-07. La epidemiología molecular es, en estos casos, de gran interés para corroborar la hipótesis establecida inicialmente y adoptar medidas de prevención eficaces.

#### 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Alary M, Joly JR. Factors contributing to the contamination of hospital water distribution systems for *Legionellae*. J Infect Dis 1992; 165:565-569.
2. Goetz A, Yu VL. Copper- silver ionization: cautious optimism for *Legionella* disinfection and implications for environmental culturing. Am J Infect Control 1997; 25:449-451.
3. Goetz AM, Stout JE, Jacobs SL, Fisher MA, Ponzer RE, Drenning S et al. nosocomial legionnaires´disease discovered in community hospitals following cultures of the water system: seek and we shall find. Am J Infect Control 1998; 26:6-11.
4. Liu WK, Helaing DE, Yeomans JT, Elliot TS. Monitoring of hospital water supplies for *Legionellae*. J Hosp Infect 1993; 24:1-9.
5. Liu Z, Stout JE, Tedesco L, Boldin M, Hwang C, Diven WF. Controlled evaluation of copper-silver ionization in eradicating *Legionella pneumophila* from a hospital water distribution system. J Infect Dis 1994; 169:919-922.
6. Modol JM, Sabrià M. Prevención de la legionelosis en los hospitales y centros sociosanitarios. Med Clin (Barc.) 2002; 119 (Supl. 2):41-45.
7. Yu-sen EL, Stout JE, Yu VL, Vidic RD. Disinfection of water distribution systems for *Legionella*. Sem Res Infect 1998; 13:147-59.

Servicio de Microbiología	<b>Procedimientos para la prevención y control de la legionelosis en los hospitales</b>	Fecha: PNT-LP-06	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 11 de 12

- **Anexo I.** Programa básico de mantenimiento, limpieza y desinfección de los sistemas de agua sanitaria fría y caliente (RD 865/2003)

#### **PROCEDIMIENTO. Revisión de la instalación**

En la revisión de una instalación tiene que comprobarse el correcto funcionamiento y el buen estado de conservación y limpieza

1. La revisión general del funcionamiento de la instalación, incluyendo todos los elementos, tiene que realizarse una vez al año y reparar o sustituir los elementos defectuosos
2. La revisión del estado general de conservación y limpieza de la instalación debe realizarse trimestralmente en los depósitos acumuladores y mensualmente en los puntos terminales de la red, las duchas y los grifos. Cuando se detecte la presencia de suciedad, incrustaciones o sedimentos se realizará la limpieza

Deben abrirse los grifos y las duchas semanalmente en las estancias no ocupadas y dejar correr el agua unos minutos. Hay que comprobar la temperatura del agua con la periodicidad siguiente:

- Mensualmente, en el depósito de agua fría de consumo humano y en una muestra representativa de duchas y grifos (muestra rotatoria a lo largo del año). No debe superar los 20°C
- Diariamente, en el depósito de agua caliente. No ha de ser inferior a 60°C
- Mensualmente, en una muestra representativa de grifos (muestra rotatoria), incluyendo las más próximas y las más alejadas de los acumuladores. No ha de ser inferior a 50°C
- Anualmente, en todos los grifos y duchas

#### **Limpieza y desinfección**

Se tendrá en cuenta que una desinfección no será efectiva si no va acompañada de una limpieza exhaustiva

La limpieza y desinfección se realizará al menos una vez al año en la instalación completa y, además, en los supuestos siguientes:

- Cuando se ponga en marcha la instalación por primera vez
- Después de una parada superior a un mes
- Después de una reparación o modificación estructural
- Cuando una revisión general así lo aconseje

El procedimiento que hace falta seguir en el caso de la desinfección con cloro es el siguiente:

1. Clorar el circuito de agua sanitaria (caliente y fría) con 20-30 ppm de cloro residual libre, a una temperatura no superior a 30°C y un pH de 7-8. Abrir por sectores todos los grifos y duchas, de forma secuencial, durante 5 min cada uno. La concentración de cloro residual en estos puntos ha de ser superior a 5 ppm. La duración total del procedimiento ha de ser de 3 h
2. Neutralizar la cantidad de cloro residual libre y vaciar el depósito
3. Limpiar a fondo las paredes de los depósitos con un cepillo duro, realizar las reparaciones necesarias y aclarar con agua limpia
4. Volver a llenar con agua y regular el dosificador de cloro para el funcionamiento habitual (0,2-0,8 ppm de cloro residual libre)

Los elementos desmontables, como grifos y duchas, tienen que limpiarse a fondo con un cepillo duro y sumergirlos en una solución que contenga 20 ppm de cloro residual libre, durante 30 min.

Posteriormente, deben aclararse con abundante agua fría. Los elementos difíciles de desmontar o sumergir tienen que cubrirse con un trapo limpio impregnado con la misma solución durante el mismo tiempo

El procedimiento a seguir en el caso de la desinfección térmica es el siguiente:

1. Elevar la temperatura del agua del depósito hasta 70°C o más y mantenerla durante un período de 12 h. Abrir por sectores todos los grifos y duchas, de forma secuencial, dejando correr el agua para que en los puntos terminales de la red se alcance una temperatura de 60°C durante 10 min como mínimo. La duración total de este procedimiento será como mínimo de 2 h
2. Vaciar el sistema, limpiar a fondo las paredes de los depósitos acumuladores, realizar las reparaciones necesarias y aclarar con agua limpia. Volver a llenar para su funcionamiento habitual (depósito, dosificador de desinfectante).

Servicio de Microbiología  Hospital.....	<b>Procedimientos para la prevención y control de la legionelosis en los hospitales</b>	Fecha: PNT-LP-06	
		Edición N° 01	Página 12 de 12

## Anexo II. Torres de refrigeración y equipos análogos

### Anexo IIa. Protocolo de limpieza y desinfección preventiva de las instalaciones con posibilidad de parada

1. Parar los ventiladores y tapar las oberturas de la torre para evitar emisiones de aerosoles al medio. Los operarios adoptarán las medidas de seguridad adecuadas, como caretas protectoras, ropas impermeables y protecciones frente al riesgo biológico y químico
2. Clorar el agua del sistema, al menos hasta concentraciones de 5 ppm de cloro residual libre, y hacer la adición de biodispersantes capaces de actuar sobre las biocapas y anticorrosivos compatibles con el cloro y el biodispersante, en cantidad adecuada, manteniendo el pH entre 7 y 8. La concentración de cloro residual libre deberá mantenerse durante 3 h mientras se hace recircular el agua a través del sistema. Cada hora se realizará la determinación de cloro residual libre y se restablecerán los valores iniciales en caso de necesidad
3. Al cabo de 3 h, adicionar tiosulfato sódico en cantidad suficiente para neutralizar el cloro, hacer recircular el agua de la misma manera que en el punto anterior. La cantidad de tiosulfato a añadir, expresada en kg, se calcula multiplicando 0,005 por los m<sup>3</sup> de agua a neutralizar por la concentración de cloro en ppm que tiene en este momento el agua a neutralizar
4. Vaciar y aclarar el sistema
5. Realizar el mantenimiento del aparato y reparar todas las anomalías detectadas:
  - Las piezas desmontables serán limpiadas y desinfectadas. La desinfección, si se puede, se hará por inmersión en solución de agua clorada a 15 ppm de cloro residual libre durante un período de al menos 20 min, y aclarar posteriormente
  - Las piezas no desmontables y los puntos de difícil acceso se limpiarán y desinfectarán pulverizándolos con una solución de agua clorada a 15 ppm de cloro residual libre; se dejará transcurrir un período de tiempo de al menos 20 min
  - En el caso de que el equipo, por sus dimensiones o diseño, no admita la pulverización, la limpieza y desinfección se realizará mediante nebulización eléctrica, utilizando un desinfectante adecuado para esta finalidad (la nebulización eléctrica no puede realizarse con cloro)
6. Una vez realizado el mantenimiento mecánico del equipo, realizar la limpieza final. Se utilizará agua a presión con detergentes. Han de mantenerse tapadas las oberturas de la torre de refrigeración para evitar las emisiones al medio, durante esta operación
7. Después de un buen aclarado, introducir en el circuito de agua una cantidad de cloro suficiente para llegar a unos niveles de 15 ppm de cloro residual libre y añadir anticorrosivos compatibles con el cloro en cantidad adecuada. Con los ventiladores apagados se pondrá en funcionamiento el sistema de recirculación, se controlará cada 30 min las concentraciones de cloro residual libre y restablecerán los valores iniciales en caso de necesidad. Esta recirculación se hará durante 2 h
8. Al cabo de 2 h, añadir tiosulfato sódico en cantidad suficiente para neutralizar el cloro y hacer recircular el agua hasta verificar que la concentración de cloro residual libre en el agua de retorno a la torre sea de 0 ppm. La cantidad de tiosulfato a añadir se calculará según el punto 3
9. Vaciar el sistema y añadir el desinfectante de mantenimiento. El caso de que sea cloro se mantendrán unos valores de cloro residual libre de 2 ppm mediante un dosificador continuo, añadiendo el anticorrosivo y antiincrustante compatibles con el cloro en cantidad adecuada

### Anexo IIb. Protocolo de limpieza y desinfección preventiva de instalaciones sin posibilidad de parada

- La limpieza y desinfección, tanto del relleno como de la balsa y del resto de componentes, de torres de refrigeración industriales, sin posibilidad de parada, se realizará al menos dos veces al año, preferiblemente en primavera y el otoño, según el procedimiento siguiente:
1. Ajustar el pH entre 7 y 8, para mejorar la acción del ácido hipocloroso (HClO)
  2. Añadir hipoclorito sódico (NaClO) en cantidad suficiente para mantener en el agua una concentración máxima residual de cloro libre residual de 5 ppm
  3. Añadir la cantidad adecuada de biodispersante para que actúe sobre la biocapa y permita el ataque del cloro en su interior, así como un inhibidor de la corrosión, específico para cada sistema
  4. Hacer recircular el agua por espacio de 4 h manteniendo los valores de cloro residual libre. Se realizarán determinaciones cada hora, para asegurar el contenido de cloro residual previsto
  5. Una vez finalizada la operación de limpieza, renovar la totalidad del agua del circuito abriendo la purga al máximo posible y manteniendo el nivel de la balsa
- Normalizar las condiciones de operación. Con el fin de eliminar la biocapa que pudiera permanecer en los intercambiadores y zonas muertas (baja velocidad del circuito), se mantendrá una concentración de cloro residual libre entre 1-2 ppm y la cantidad adecuada de biodispersante durante 24 h





Servicio de Microbiología	<b>Tipificación molecular de <i>Legionella pneumophila</i> mediante polimorfismo de fragmentos de ADN amplificados (AFLP)</b>	Fecha: PNT-LP-07	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 2 de 9

## 1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objeto de este documento es describir el procedimiento de genotipificación de *Legionella pneumophila* mediante la comparación del polimorfismo encontrado según el tamaño de los fragmentos de ADN cromosómico amplificados (*Amplified Fragment Length Polimorphism*, AFLP), para reconocer la relación epidemiológica entre aislados o diferenciar aislados no relacionados. Es de aplicación en el estudio epidemiológico de cultivos de *L. pneumophila*, clínicos y/o ambientales, siendo especialmente útil en investigaciones epidemiológicas de brotes de legionelosis.

## 2. FUNDAMENTO

*Legionella* se encuentra ampliamente distribuida en ambientes acuáticos y se detecta con frecuencia en una gran variedad de instalaciones. La frecuencia de *L. pneumophila* serogrupo 1 (produciendo enfermedad y en el ambiente) y su gran heterogeneidad hacen que la identidad de especie y serogrupo no sea suficiente para implicar una cepa como causante de un caso/brote de legionelosis. Por tanto, para la comparación de las cepas clínicas y ambientales (epidemiológicamente relacionadas) se requieren procedimientos de genotipificación o de tipificación molecular.

Esta comparación permite la adecuada identificación de las fuentes ambientales implicadas en enfermedad, y confirmar, desde el punto de vista microbiológico, las hipótesis establecidas en las investigaciones de los brotes. Sin embargo, la consideración final del origen ambiental de un brote requiere el análisis conjunto de los datos epidemiológicos, microbiológicos y ambientales.

La técnica AFLP consiste en la comparación del polimorfismo de los fragmentos amplificados de ADN. Para ello, el ADN cromosómico es digerido con un enzima de restricción de corte frecuente (PstI), a la vez que se realiza el ligado de unos adaptadores específicos que sirve de diana en una posterior reacción de amplificación, que se realiza con unos iniciadores específicos. Los fragmentos de ADN son separados en función de su peso molecular (Pm) y carga mediante una electroforesis convencional en geles de agarosa, que se tiñen con bromuro de etidio para visualizar las bandas (fragmentos de ADN), al hacer incidir luz ultravioleta (UV). La imagen se recoge en una fotografía y se compara el polimorfismo de las bandas, en número y tamaño, entre las cepas analizadas. Como el patrón de bandas obtenido es en ocasiones complejo de analizar, se recomienda utilizar sistemas computerizados de análisis de fragmentos.

Ha sido una técnica ampliamente utilizada en investigaciones epidemiológicas, llegando a ser estandarizada en varios laboratorios del EWGLI (European Working Group on Legionella Infections). En la actualidad el EWGLI cuenta con una base de datos europea de tipos de AFLP con cepas representativas, a la que se puede acceder para la

asignación de tipos, a través de su dirección web ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)).

## 3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 1a de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", 2003
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n° 10 de "Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica", 2000
- Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n°18 de "Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología", 2005
- PNT-LP-01 de "Detección de *Legionella* en muestras clínicas mediante cultivo"
- PNT-LP-02 de "Detección de *Legionella* en muestras de agua mediante cultivo"
- PNT-LP-03 de "Identificación de los aislados de *Legionella*"

## 4. MUESTRAS

Las muestras a utilizar son cultivos de *L. pneumophila* procedentes del procesamiento de muestras clínicas o ambientales, identificados a nivel de especie y serogrupo, y con información epidemiológica suficiente como para considerar que proceden de la investigación de un brote de legionelosis. Los procedimientos para el cultivo de *Legionella* tras el procesamiento de muestras clínicas ó de muestras de agua, y la identificación de los cultivos en especie y serogrupo, se encuentran detallados en los PNT correspondientes (PNT-LP-01, PNT-LP-02 y PNT-LP-03).

Antes de realizar un ensayo de tipificación hay que asegurarse de que se parte de un cultivo puro en medio BCYE $\alpha$ , procedente del subcultivo de una única colonia, y si fuera necesario, subcultivar de nuevo en BCYE $\alpha$  y BCYE $\alpha$  sin cisteína. Se debe evitar trabajar con cultivos viejos, es preferible realizar subcultivos.

Cuando se requiera enviar los cultivos de *Legionella* a otro laboratorio, el transporte se realizará en medio BCYE $\alpha$  en placa, o en tubo con agar inclinado, sellado con parafilm, a temperatura ambiente y en el menor tiempo posible. Se adjuntará la información necesaria. Se utilizarán contenedores y empresas de mensajería que cumplan los requisitos para el envío de material biológico (Ver Procedimiento 1a de la SEIMC).

*Legionella* puede manipularse en un laboratorio de microbiología convencional conforme al Nivel de Contención 2, teniendo en cuenta que la infección se produce por la inhalación del microorganismo, por lo que se debe evitar la producción de aerosoles en la manipulación de los cultivos.

## 5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- 1) Tampón Tris-EDTA pH 8 (TE)
  - Preparar Tris HCl (1 M) disolviendo 60,57 g de Tris en 400 ml de agua destilada y ajustar el pH a

Servicio de Microbiología	<b>Tipificación molecular de <i>Legionella pneumophila</i> mediante polimorfismo de fragmentos de ADN amplificados (AFLP)</b>	Fecha: PNT-LP-07	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 3 de 9

- 8, enrasando posteriormente con agua destilada hasta 500 ml.
- Preparar EDTA (ácido etilen-diamino-tetraacético) 0,5 M disolviendo 186,12 g de EDTA-Tritriplex en 100 ml de solución de NaOH 5 N y 400 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8 y enrasar hasta 1 L con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 min.
  - Mezclar 4 ml de EDTA 0,5 M pH 8 con 20 ml de Tris-HCl 1 M y 1.600 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8 y enrasar hasta 2 L con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 min y conservar a temperatura ambiente.
- 2) Solución de SDS (dodecil sulfato sódico) al 10%
- Preparar 100 ml de solución con 10 g de lauril sulfato en 100 ml de agua destilada.
  - Mezclar y conservar a temperatura ambiente. Manejar con precaución utilizando mascarilla.
- 3) Enzima Proteinasa K a una concentración final de 20 mg/ml
- Preparar una solución con 200 mg de proteinasa K en 10 ml de agua destilada.
  - Repartir en alícuotas de 1 ml y conservar a -20°C hasta su uso.
- 4) Solución de NaCl 5 M
- Preparar una solución con 146,1 g de NaCl en 500 ml de agua destilada.
  - Mezclar y conservar a temperatura ambiente hasta su uso.
- 5) Solución de CTAB (bromuro de hexadecil-trimetilamonio) al 10% en NaCl 0,7 M
- Disolver 4,1 g de NaCl en 80 ml de agua destilada y añadir 10 g de CTAB.
  - Calentar a 65°C en un baño de agua, agitando de vez en cuando hasta su disolución. Enrasar hasta 100 ml con agua destilada.
  - Repartir en alícuotas de 2 ml y conservar a temperatura ambiente hasta su uso.
- 6) Solución de cloroformo/alcohol isoamílico (proporción 24:1)
- Preparar 50 ml de una solución de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) con 48 ml de cloroformo y 2 ml de alcohol isoamílico.
  - Mezclar y conservar a 4°C hasta su uso. Manejar con precaución, utilizando guantes y mascarilla.
- 7) Solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (proporción 25:24:1)
- Estabilizar la solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) añadiendo la cantidad necesaria de 8-Hidroxiquinoleína, siguiendo las instrucciones del fabricante.
  - Mezclar y conservar a 4°C hasta su uso. Manejar con precaución, utilizando guantes y mascarilla.
- 8) Isopropanol
- Mantener a 4°C hasta su uso
- 9) Etanol absoluto y solución de etanol al 70%
- Preparar la solución de etanol al 70% mezclando 70 ml de etanol absoluto y 30 ml de agua destilada.
  - Mantener etanol absoluto y al 70% a -20°C hasta su uso.
- 10) Agarosa
- Preparar 50 ml de agarosa al 0,7% en TBE 1x y 200 ml de agarosa al 1,5% en TBE 1x, como se detalla más adelante.
- 11) Tampón TBE pH 8,3 en concentraciones 10x y 1x
- Preparar solución TBE concentrado 10x mezclando 216 g de Tris HCl con 9,3 g de EDTA Tritriplex y 111,3 g de ácido bórico en 1.400 ml de agua destilada. Medir el pH y, si no es necesario rectificarlo, añadir agua destilada hasta completar 2 L. Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 min y conservar a 4°C hasta su uso.
  - Preparar solución tampón TBE 1x mezclando 200 ml de tampón TBE 10x con 1.800 ml de agua destilada y mantener a 4°C hasta su uso.
- 12) Tampón de carga
- Preparar 50 ml de colorante que contiene glicerol al 30%, azul de bromofenol al 0,25% y xilencianol al 0,25%. Para ello, mezclar 17,24 ml de glicerol (87%), 0,125 mg de azul de bromofenol y 0,125 mg de xilencianol en 32,76 ml de agua destilada. Conservar a 4°C.
- Este colorante se puede adquirir preparado comercialmente, en cuyo caso se seguirán las instrucciones de uso y conservación del fabricante.
- 13) Solución de Bromuro de Etidio (1 µg/ml)
- Preparar 500 ml de solución de bromuro de etidio mezclando 50 µl de bromuro (10 mg/ml) en 500 ml de agua destilada.
  - Conservar a 4°C y oscuridad hasta su uso.
  - Manejar con precaución, utilizando guantes.
- Para desechar el bromuro utilizado se debe inactivar previamente:
- Añadir 0,8 g de carbón activo por cada 500 ml de bromuro de etidio.
  - Dejar la mezcla expuesta a la luz solar durante 3 meses, agitándola de vez en cuando.
  - Filtrar, eliminar el sobrenadante y desechar el filtro en contenedores para material infeccioso.
- 14) Enzima de restricción PstI y su tampón correspondiente
- Preparar el tampón y la enzima siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 15) Adaptadores específicos
- Los 2 adaptadores utilizados son: AFLP-LG1 (5'-CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA-3') y AFLP-LG2 (5'-TGT ACG CAG TCT AC-3').
  - Preparar una solución stock de cada adaptador a una concentración de 1 µg/µl, diluyendo una cantidad de µg de adaptador liofilizado en igual cantidad de µl de agua destilada.
  - Diluir 1/10 en agua destilada cada solución y mantener a -20°C hasta su uso.
- 16) Enzima T4 ADN Ligasa y su tampón correspondiente
- Preparar el tampón y la enzima siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 17) Solución de acetato amónico 7,5 M

Servicio de Microbiología	<b>Tipificación molecular de <i>Legionella pneumophila</i> mediante polimorfismo de fragmentos de ADN amplificados (AFLP)</b>	Fecha: PNT-LP-07	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 4 de 9

- Diluir 583,1 g de acetato amónico en 1 L de agua destilada.
- Conservar a temperatura ambiente hasta su uso.
- 18) Solución de MgCl<sub>2</sub> 50 mM
  - Se puede utilizar un preparado comercial que se puede fraccionar en alícuotas (5 ó 10 µl) antes de su conservación. Conservar a -20°C hasta su uso.
- 19) Iniciador específico AFLP PstI G (5'-GACTGCGTACATGCAGG-3')
  - Preparar una solución stock del iniciador a una concentración de 1 µg/µl diluyendo una cantidad de µg de adaptador liofilizado en igual cantidad de µl de agua destilada. Mantener a -20°C.
  - Preparar 1 ml de una dilución 1/10 de la solución stock en agua destilada. Mantener a -20°C hasta su uso (0,1 µg/µl).
- 20) Patrón de peso molecular de ADN
  - Utilizar un marcador de Pm con un rango de fragmentos de 100 a 10.000 pares de bases. Se puede utilizar un preparado comercial, como Ladder Mix (MBI-Fermentas) a una concentración de 0,5 mg/ml.
  - Conservar a -20°C.
- 21) Solución HCl 1 N
  - Preparar una solución con 10 ml de HCl y 110 ml de agua destilada.
  - Mezclar y conservar a temperatura ambiente.
- 22) Solución de NaOH 5 N
  - Preparar una solución con 200 g de NaOH en 1 L de agua destilada.
  - Mezclar y conservar a temperatura ambiente.
- 23) Tubos de reacción conteniendo la mezcla para la reacción de PCR
  - Tubos de 0,5 ó 0,2 ml de capacidad conteniendo una mezcla de reacción de PCR liofilizada. Cada tubo contiene: 1-1,5 U de *Taq* ADN polimerasa, 10 mM de Tris-HCl pH 9, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, estabilizadores y soroalbúmina bovina (BSA).

## 6. APARATOS Y MATERIAL

- Termociclador con tapa térmica
- Baño de agua (o bloque térmico) capaz de mantener temperaturas de 37, 50 y 65°C
- Transiluminador con luz ultravioleta y cámara fotográfica Polaroid (o captador automático de imágenes con luz ultravioleta)
- Microcentrífuga para alcanzar 12.000 xg, a 4°C
- Congelador -20°C
- Nevera de 4°C
- Horno microondas
- Balanza
- Agitador Vortex
- Desecador a vacío
- Equipo de electroforesis convencional, que consta de:
  - Cubeta de electroforesis pequeña con soporte para gel
  - Cubeta de electroforesis grande con soporte para gel

- Fuente de electroforesis
- Cinta de autoclave
- Peines para cada cubeta de electroforesis
- Papel parafilm
- Asa de siembra
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml
- Micropipetas automáticas (de 1-10 µl y 10-100 µl)
- Puntas con filtro para micropipetas automáticas
- Bandeja de plástico para la tinción de los geles
- Guantes y mascarilla

## 7. PROCEDIMIENTO

La técnica de AFLP consta de 4 pasos: Extracción y cuantificación del ADN, reacción de restricción-ligado, amplificación de los productos digeridos y separación y visualización de los fragmentos de ADN amplificados.

### 7.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN CROMOSÓMICO

#### 7.1.1. Extracción

La extracción del ADN se puede realizar utilizando un kit de extracción comercial o mediante el siguiente procedimiento:

- Recoger dos asas cargadas de un cultivo puro en BCYE $\alpha$ , y emulsionar en un tubo que contiene la siguiente mezcla: 567 µl de TE (pH 8), 30 µl de SDS al 10% y 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml) previamente atemperada. Agitar con vortex e incubar 1 h a 37°C.
- Añadir 100 µl de NaCl 5 M y agitar con vortex. Así aumentará la concentración de sal y se evitará la precipitación de los ácidos nucleicos. Añadir 80 µl de CTAB/NaCl, previamente atemperado en un baño a 65°C. Agitar con vortex e incubar 10 min a 65°C en baño.
- Añadir 700 µl de la mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y agitar por inversión. Centrifugar a 12.000 xg, durante 5 min a 4°C. Transferir la fase acuosa (superior) a otro tubo ( $\approx$  400 µl).
- Añadir 700 µl de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) (fase inferior) y agitar con vortex hasta su definitiva emulsión. Centrifugar a 12.000xg, durante 5 minutos a 4°C y transferir la fase acuosa (superior) a otro tubo.
- Para precipitar el ADN, añadir 0,6 volúmenes de isopropanol, agitar y centrifugar a 12.000 xg durante 5 min a 4°C. Retirar el sobrenadante y lavar el precipitado con 400 µl de etanol al 70%. Agitar y centrifugar a 12.000 xg, durante 5 min a 4°C. Descartar nuevamente el sobrenadante y secar el precipitado a temperatura ambiente (en un desecador a vacío).
- Resuspender el extracto de ADN en 50 µl de TE, agitar y conservar a -20°C hasta su uso.

#### 7.1.2. Cuantificación del ADN

Para comprobar la concentración de ADN de cada extracto proceder de la siguiente manera:

- Hacer un blanco con 100 µl de TE 1x.

Servicio de Microbiología	<b>Tipificación molecular de <i>Legionella pneumophila</i> mediante polimorfismo de fragmentos de ADN amplificados (AFLP)</b>	Fecha: PNT-LP-07	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 5 de 9

- Diluir la muestra 1/100 en TE 1x (para la lectura se necesitan 100 µl)
- Leer la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm
- La concentración de ADN se calcula con la siguiente fórmula:

Concentración de ADN (µg/ml) = (absorbancia de la muestra – absorbancia del blanco) x 50

Calcular el volumen correspondiente de extracto para conseguir una concentración de ADN de 0,5 µg/µl, según la fórmula siguiente:

500 / concentración de ADN del extracto (ng/ml) = Volumen (µl) de extracto para diluir en 1 ml de TE

## 7.2. REACCIÓN DE RESTRICCIÓN-LIGADO

Se utiliza PstI como enzima de restricción, y los adaptadores específicos de *L. pneumophila* llamados AFLP-LG1 y AFLP-LG2. Proceder de la siguiente forma:

- Preparar una mezcla de reacción en un tubo conteniendo cantidad suficiente de cada reactivo para el número “n” de muestras a analizar, teniendo en cuenta que el volumen total de mezcla para cada reacción es de 20 µl:
  - 2xn µl de tampón T4-ligasa 10x
  - 2xn µl AFLP-LG1 (0,1 µg/µl)
  - 2xn µl AFLP-LG2 (0,1 µg/µl)
  - 2xn µl PstI (10 U/µl)
  - 1xn µl T4-ligasa (1U/µl)
  - 8xn µl de agua destilada
- Dispensar en cada tubo de reacción: 17 µl de la mezcla y 3 µl del extracto de ADN correspondiente e incubar a 37°C durante 3 h, para que tenga lugar la reacción de restricción/ligado (cada 20 µl de mezcla de reacción contienen: 1,5 µg de extracto de ADN, 0,2 µg de cada adaptador AFLP-LG2, 20 U del enzima de restricción PstI, tampón T4 ligasa 1x y 1 U de T4 ADN-ligasa). Como consecuencia de esta reacción se obtendrán distintos fragmentos de ADN resultantes de la digestión con PstI, todos ellos flanqueados por los adaptadores.
- Añadir a cada tubo de reacción 47 µl de agua destilada, 33 µl de acetato amónico 7,5 M y 100 µl de etanol absoluto, para la precipitación de los productos de restricción-ligado. Incubar 5 min (no exceder este tiempo de incubación) a temperatura ambiente. Centrifugar a 12.000xg durante 10 min a 4°C y eliminar el sobrenadante. Lavar añadiendo 100 µl de etanol al 70%. Centrifugar a 12.000xg durante 10 min a 4°C, retirar el sobrenadante con micropipeta y secar el precipitado a temperatura ambiente (en un desecador a vacío).
- Añadir 100 µl de TE pH 8 a cada tubo de reacción, mezclar y conservar el ADN ligado y purificado a – 20°C hasta su uso.

## 7.3. AMPLIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE RESTRICCIÓN-LIGADO

La amplificación de los productos de restricción-ligado se realiza mediante una reacción de PCR, utilizando un iniciador específico llamado AFLP-PstI-G. Se procede de la siguiente manera:

- Preparar, inmediatamente antes de la reacción de PCR, una dilución 1/100 en agua destilada (libre de nucleasas) del producto de restricción-ligado.
- Preparar una mezcla de reacción en un tubo conteniendo cantidad suficiente de cada reactivo, para el número “n” de muestras a analizar, de manera que el volumen final de cada reacción sea de 25 µl: 17,75 xnµl de agua destilada, 0,5 xnµl MgCl<sub>2</sub> 50 mM (para suplementar la cantidad de MgCl<sub>2</sub> contenida en la mezcla liofilizada hasta 2,5 mM), 1,75 xnµl del iniciador AFLPPSTI-G (0,1 µg/µl).
- En cada tubo con la mezcla de reacción liofilizada, dispensar 20 µl de la mezcla de reacción anteriormente preparada y 5 µl de la dilución 1/100 del producto de restricción-ligado. Incluir un tubo control negativo que contenga agua destilada (libre de nucleasas) en lugar de producto de restricción-ligado (éste debe tenerse en cuenta en los cálculos anteriores).
- Colocar los tubos de reacción en el termociclador. El programa de amplificación dura aproximadamente 4 horas y consiste en un primer ciclo de desnaturalización a 94°C durante 4 min, seguido de 33 ciclos de: 1 min a 94°C (desnaturalización), 1 min a 60°C (apareamiento de las cadenas de ADN con el iniciador) y 2,5 min a 72°C (extensión del ADN usando como molde una de las hebras del ADN-ligado/purificado), terminando el programa a 4°C.
- Los productos amplificados se conservan a 4°C hasta su separación.

## 7.4. SEPARACIÓN Y VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

La separación de los productos amplificados se realiza mediante una electroforesis convencional en geles de agarosa. Proceder de la siguiente manera:

- Preparar 2 L de TBE 1x diluyendo 200 ml de TBE 10x en 1.800 ml de agua destilada.
- Preparar un gel de agarosa al 1,5%. Para ello, mezclar 3 g de agarosa con 200 ml de TBE 1x, fundir en horno microondas y mantener en baño a 50°C. Verter la agarosa fundida sobre un soporte de electroforesis (previamente montado con cinta de autoclave y peine), y dejar solidificar a temperatura ambiente. Retirar el peine y la cinta de autoclave.
- Poner el gel en la cubeta de electroforesis llena de TBE 1x, de manera que los pocillos queden en el polo negativo (negro).
- Mezclar 5 µl de cada ADN-amplificado con 2 µl de colorante (en un trozo de papel parafilm) y cargarlos en los pocillos. Se carga una muestra por pocillo, incluyendo en cada gel una cepa control,

Servicio de Microbiología	<b>Tipificación molecular de <i>Legionella pneumophila</i> mediante polimorfismo de fragmentos de ADN amplificados (AFLP)</b>	Fecha: PNT-LP-07	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 6 de 9

con un patrón de bandas conocido, y varios pocillos con el marcador de peso molecular (por ejemplo, uno en cada extremo del gel y otro en medio).

- Para los pocillos con el control de Pm, se mezclan 3 µl de agua destilada con 1 µl de colorante y 2 µl del marcador de peso molecular (0,5 mg/ml).
- Las condiciones de la electroforesis son: 3,45 voltios/cm (en el caso de una cubeta 20/25 en la que la distancia entre los dos electrodos es de 29 cm, 29x3,45=100 voltios), durante 4 h.
- Teñir con solución de bromuro de etidio durante 20 min y lavar con agua destilada.
- Colocar el gel en un transiluminador y hacer incidir luz UV (con la protección necesaria, gafas y guantes).
- Efectuar un registro gráfico de la imagen, por ejemplo fotografiar con cámara Polaroid utilizando un carrete de fotos con negativo, o utilizar un captador de imágenes automático. Es importante optimizar la calidad de la imagen.

En el Anexo I se incluye un resumen de este procedimiento.

## 8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Cada cepa presentará un perfil de bandas o fragmentos de ADN. Las bandas aparecen separadas en el carril en función de la relación masa/carga. Antes de dar por válido un gel y pasar a su interpretación, es necesario comprobar que el control de Pm y la cepa de control interno presentan las bandas esperadas, en número y posición.

Cuando las cepas comparadas presentan idénticos perfiles, es decir el mismo número de bandas y en la misma posición, consideramos que las cepas son genéticamente iguales (con la técnica aplicada) y pertenecen al mismo tipo de AFLP. Esto indica que el origen de las cepas puede ser común, pero es recomendable confirmar la identidad de las mismas aplicando una segunda técnica molecular, como por ejemplo electroforesis en campo pulsado (PFGE) utilizando *Sfi*I como enzima de restricción (Consultar el procedimiento de la SEIMC n°18 de "Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología"), o secuenciación de genes (SBT).

Cuando las cepas comparadas presentan perfiles claramente diferentes, es decir, distinto número de bandas o diferentes alturas, o ambas diferencias, consideramos que las cepas son genéticamente diferentes (con la técnica aplicada) y pertenecen a distinto tipo de AFLP. Esto indica que el origen de las cepas es diferente.

Cuando las cepas comparadas presentan perfiles similares pero no idénticos, consideramos que las cepas son genéticamente relacionadas (con la técnica aplicada). En estos casos es recomendable aplicar una segunda técnica molecular que ayude a establecer el grado de relación, como PFGE-*Sfi*I o secuenciación de genes (SBT).

## 8.1 ANÁLISIS COMPUTERIZADO DE LOS RESULTADOS

Es preferible realizar un análisis computerizado de los patrones de bandas obtenidos. El análisis se basa en el cálculo de los coeficientes de similitud de los patrones de bandas para cada par de cepas. Los resultados se expresan en una matriz de similitud que puede representarse gráficamente en forma de dendrograma de homologías.

Para ello, es importante estandarizar las condiciones experimentales para que los patrones electroforéticos sean reproducibles y la comparación de los resultados pueda realizarse entre patrones incluidos en distintos geles.

El primer paso en el análisis es la normalización de los geles, que consiste en asignar la misma posición a bandas del mismo tamaño. La normalización se realiza con programas informáticos, aunque se requiere una cuidadosa supervisión visual.

El segundo paso consiste en el cálculo de la similitud entre 2 cepas, y para ello se pueden utilizar diversos coeficientes, como Dice, Jaccard o Pearson. El más utilizado es el coeficiente de Dice que se basa en la posición de las bandas una vez definidas la totalidad de las mismas, cuyo cálculo está explicado con detalle en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC n°18 de "Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología" (2005).

Por último, el algoritmo matemático más utilizado para construir un dendrograma a partir de una matriz de similitud es el método de agrupación por pares no ponderado, UPGMA (*unweighted pair group method with averages*).

En la estandarización del procedimiento de AFLP realizada por varios laboratorios de referencia europeos ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)), para la tipificación epidemiológica de *L. pneumophila* serogrupo 1, y la asignación de tipos de AFLP, se incluyeron en el análisis las bandas comprendidas entre 100 pb y 3.500 pb, con un 2% de tolerancia, y se utilizó el punto de corte del 90% de similitud para la asignación de tipos. El punto de corte puede ser modificado en función de los resultados obtenidos y de la finalidad del análisis.

## 9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico será el responsable del procesamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los controles. El facultativo será responsable de la supervisión de las tareas mencionadas, de mantener al día los procedimientos de validación final de los resultados, de su interpretación y del informe de los mismos.

## 10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Para la asignación de tipos se puede utilizar la base de datos europea de AFLP, introduciendo en la página web del EWGLI ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)) el peso molecular de

Servicio de Microbiología	<b>Tipificación molecular de <i>Legionella pneumophila</i> mediante polimorfismo de fragmentos de ADN amplificados (AFLP)</b>	Fecha: PNT-LP-07	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 7 de 9

las bandas o el % de la distancia recorrida por cada banda en el gel.

El bromuro de etidio es mutagénico por contacto, por lo que debe utilizarse con precaución y en áreas especialmente designadas para ello. Su eliminación debe realizarse como se ha detallado anteriormente, o siguiendo lo indicado en el apartado 5 (solución nº 13) de este procedimiento.

### 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La principal limitación del procedimiento es que la interpretación de los resultados entraña cierta dificultad, y debe realizarse con detenimiento. La asignación de tipos o patrones se basa en la diferente altura de las bandas de ADN observadas en cada gel de electroforesis, por lo que se debe ser muy cuidadoso en la normalización del método, y seguir con mucha precisión todos los pasos detallados en el procedimiento, optimizando aquéllos pasos que ayuden a mejorar la calidad de las imágenes, como puede ser el análisis computerizado de los fragmentos, lo que aportará mayor poder de resolución y menor riesgo de error que el ojo humano, pues los patrones obtenidos son con frecuencia difíciles de interpretar.

Esta metodología se debe utilizar sólo en laboratorios que cuenten con experiencia en la aplicación de métodos de genotipificación, y que conozcan muy bien los requisitos exigibles a una técnica para que ésta pueda ser utilizada como método de genotipificación en la investigación de brotes, como son los siguientes parámetros: Tipabilidad (porcentaje de cepas asignadas a un tipo dado). Reproducibilidad (capacidad de asignación de un mismo tipo a una cepa analizada en pruebas separadas e independientes). Discriminación (probabilidad de que el método asigne tipos diferentes a dos cepas no relacionadas muestreadas al azar). Se calcula aplicando la fórmula del Índice de Diversidad de Simpson. Concordancia epidemiológica (coherencia epidemiológica de los resultados).

No es recomendable la utilización de la técnica de manera esporádica en una investigación epidemiológica puntual, sin conocer previamente los antecedentes de la enfermedad y de la bacteria en el entorno geográfico implicado.

### 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Fry NK, Bangsberg JM, Bernander S, Etienne J, Forsblom B, Gaia V, Hasenberger P, Lindsay D, Papoutsi A, Pelaz C, Struelens M, Uldum SA, Visca P, Harrison TG. 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 2000; 19: 773-780.
2. Fry NK, Bangsberg JM, Bergmans A, Bernander S, Etienne J, Franzin L, Gaia V, Hasenberger P, Baladrón Jiménez B, Jonas D, Lindsay D, Mentula S, Papoutsi A, Struelens M, Uldum SA, Visca P, Wannet W, Harrison TG. Designation of European Working Group on *Legionella* Infections amplified fragment length polymorphism types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and results of intercentre proficiency testing using a standard protocol. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21: 722-728.
3. Struelens MJ and the Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM) of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin Microbiol Infec 1996; 2: 2-11.
4. Valsangiacomo C, Baggi F, Gaia V, Balmelli T, Peduzzi R, Piffaretti J-C. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. J Clin Microbiol 1995; 33: 1716-1719.

Servicio de Microbiología	<b>Tipificación molecular de <i>Legionella pneumophila</i> mediante polimorfismo de fragmentos de ADN amplificados (AFLP)</b>	Fecha: PNT-LP-07	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 8 de 9

### **Anexo I: Tipificación molecular de *Legionella pneumophila* mediante AFLP**

**PROCEDIMIENTO:** La técnica de AFLP consta de 4 pasos: 1) Extracción de ADN, 2) Reacción de restricción-ligado, 3) Amplificación de los productos digeridos y 4) Separación y visualización de los fragmentos de ADN amplificados.

1) **Extracción de ADN:** La extracción del ADN se puede realizar utilizando un kit de extracción comercial o mediante el siguiente procedimiento:

- Recoger dos asas cargadas de un cultivo puro en BCYE $\alpha$ , y emulsionar en un tubo que contiene la siguiente mezcla: 567  $\mu$ l de TE (pH 8), 30  $\mu$ l de SDS al 10% y 3  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg/ml) previamente atemperada. Agitar con vortex e incubar 1 h a 37°C.
- Añadir 100  $\mu$ l de NaCl 5 M y agitar con vortex. Así aumentará la concentración de sal y se evitará la precipitación de los ácidos nucleicos. Añadir 80  $\mu$ l de CTAB/NaCl, previamente atemperado en un baño a 65°C. Agitar con vortex e incubar 10 min a 65°C en baño.
- Añadir 700  $\mu$ l de la mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y agitar por inversión. Centrifugar a 12.000 xg, durante 5 min a 4°C. Transferir la fase acuosa (superior) a otro tubo ( $\approx$  400  $\mu$ l).
- Añadir 700  $\mu$ l de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) (fase inferior) y agitar con vortex hasta la definitiva emulsión. Centrifugar a 12.000xg, durante 5 minutos a 4°C y transferir la fase acuosa (superior y transparente) a otro tubo.
- Para precipitar el ADN, añadir 0,6 volúmenes de isopropanol, agitar y centrifugar a 12.000 xg durante 5 min a 4°C. Retirar el sobrenadante y lavar el precipitado con 400  $\mu$ l de etanol al 70%. Agitar y centrifugar a 12.000 xg, durante 5 min a 4°C. Descartar nuevamente el sobrenadante y secar el precipitado a temperatura ambiente (en un desecador a vacío).
- Resuspender el extracto de ADN en 50  $\mu$ l de TE, agitar y conservar a -20°C hasta su uso.

Calcular el volumen correspondiente de extracto para conseguir una concentración de ADN de 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l

2) **Reacción de restricción-ligado:** utilizando PstI como enzima de restricción y los adaptadores específicos AFLP-LG1 y AFLP-LG2. Proceder de la siguiente forma:

- Preparar una mezcla de reacción en un tubo conteniendo cantidad suficiente de cada reactivo para el número "n" de muestras a analizar, teniendo en cuenta que el volumen total de mezcla para cada reacción es de 20  $\mu$ l:
  - 2xn  $\mu$ l de tampón T4-ligasa 10x
  - 2xn  $\mu$ l AFLP-LG1 (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l)
  - 2xn  $\mu$ l AFLP-LG2 (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l)
  - 2xn  $\mu$ l PstI (10 U/ $\mu$ l)
  - 1xn  $\mu$ l T4-ligasa (1U/ $\mu$ l)
  - 8xn  $\mu$ l de agua destilada
- Dispensar en cada tubo de reacción: 17  $\mu$ l de la mezcla y 3  $\mu$ l del extracto de ADN correspondiente e incubar a 37°C durante 3 h. Cada 20  $\mu$ l de mezcla de reacción contienen: 1,5  $\mu$ g de extracto de ADN, 0,2  $\mu$ g de cada adaptador AFLP-LG2, 20 U del enzima de restricción PstI, tampón T4 ligasa 1x y 1 U de T4 ADN-ligasa). Como consecuencia de esta reacción se obtendrán distintos fragmentos de ADN resultantes de la digestión con PstI, todos ellos flanqueados por los adaptadores.

Servicio de Microbiología	<b>Tipificación molecular de <i>Legionella pneumophila</i> mediante polimorfismo de fragmentos de ADN amplificados (AFLP)</b>	Fecha: PNT-LP-07	
Hospital.....		Edición N° 01	Página 9 de 9

- Añadir a cada tubo de reacción 47 µl de agua destilada, 33 µl de acetato amónico 7,5 M y 100 µl de etanol absoluto, para la precipitación de los productos de restricción-ligado. Incubar 5 min (no exceder este tiempo de incubación) a temperatura ambiente. Centrifugar a 12.000xg durante 10 min a 4°C y eliminar el sobrenadante. Lavar añadiendo 100 µl de etanol al 70%. Centrifugar a 12.000xg durante 10 min a 4°C, retirar el sobrenadante con micropipeta y secar el precipitado a temperatura ambiente (en un desecador a vacío).

- Añadir 100 µl de TE pH 8 a cada tubo de reacción, mezclar y conservar el ADN ligado y purificado a -20°C hasta su uso.

3) Amplificación de los productos de restricción-ligado: Se realiza mediante una reacción de PCR con el iniciador específico AFLP-PstI-G. Se procede de la siguiente manera:

- Preparar, inmediatamente antes de la reacción de PCR, una dilución 1/100 en agua destilada (libre de nucleasas) del producto de restricción-ligado.
- Preparar una mezcla de reacción en un tubo conteniendo cantidad suficiente de cada reactivo, para el número "n" de muestras a analizar, de manera que el volumen final de cada reacción sea de 25 µl: 17,75 nµl de agua destilada, 0,5xn µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM (para suplementar la cantidad de MgCl<sub>2</sub> contenida en la mezcla liofilizada hasta 2,5 mM), 1,75 xnµl del iniciador AFLPPSTI-G (0,1 µg/µl).
- En cada tubo con la mezcla de reacción liofilizada, dispensar 20 µl de la mezcla de reacción anteriormente preparada y 5 µl de la dilución 1/100 del producto de restricción-ligado. Incluir un tubo control negativo que contenga agua destilada (libre de nucleasas) en lugar del producto de restricción-ligado (éste debe tenerse en cuenta en los cálculos anteriores).
- Colocar los tubos de reacción en el termociclador. El programa de amplificación dura aproximadamente 4 horas y consiste en un primer ciclo de desnaturalización a 94°C durante 4 min, seguido de 33 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 2,5 min a 72°C, terminando el programa a 4°C.
- Los productos amplificados se conservan a 4°C hasta su separación.

4) Separación y visualización de los productos amplificados: La separación de los productos amplificados se realiza mediante una electroforesis convencional en geles de agarosa. Proceder de la siguiente manera:

- Preparar 2 L de TBE 1x diluyendo 200 ml de TBE 10x en 1.800 ml de agua destilada.
- Preparar un gel de agarosa al 1,5%. Para ello, mezclar 3 g de agarosa con 200 ml de TBE 1x, fundir en horno microondas y mantener en baño a 50°C. Verter la agarosa fundida sobre un soporte de electroforesis previamente montado, y dejar solidificar a temperatura ambiente. Retirar el peine y la cinta de autoclave.
- Poner el gel en la cubeta de electroforesis llena de TBE 1x, de manera que los pocillos queden en el polo negativo (negro).
- Mezclar 5 µl de cada ADN-amplificado con 2 µl de colorante y cargarlos en los pocillos. Se carga una muestra por pocillo, incluyendo en cada gel una cepa control, con un patrón de bandas conocido, y varios pocillos con el marcador de peso molecular (por ejemplo, uno en cada extremo del gel y otro en medio).
- Para los pocillos con el control de Pm, se mezclan 3 µl de agua destilada con 1 µl de colorante y 2 µl del marcador de peso molecular (0,5 mg/ml).
- Las condiciones de la electroforesis son: 3,45 voltios/cm (en el caso de una cubeta 20/25 en la que la distancia entre los dos electrodos es de 29 cm, 29x3,45=100 voltios), durante 4 h.
- Teñir con solución de bromuro de etidio durante 20 min y lavar con agua destilada.
- Colocar el gel en un transiluminador y hacer incidir luz UV (con la protección necesaria, gafas y guantes).
- Efectuar un registro gráfico de la imagen, por ejemplo fotografiar con cámara Polaroid utilizando un carrete de fotos con negativo, o utilizar un captador de imágenes automático. Es importante optimizar la calidad de la imagen.