

Evaluación de la viabilidad de *Legionella pneumophila* en muestras de agua

Evaluation of the viability of *Legionella pneumophila* in water samples

Majela García Montero¹

Nibaldo González Sosa¹

Humberto Franco Villavicencio¹

Gloria Greite Jimenez Afonso¹

Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil (CICDC). Laboratorio de Diagnóstico de *Legionella*. La Habana, Cuba.

*Autor de correspondencia: majelagm@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: *Legionella pneumophila* se sitúa entre los principales agentes causales de neumonía adquirida en la comunidad y de origen nosocomial. La inhalación de aerosoles potencialmente contaminados con la bacteria, producto de la colonización de redes y otros sistemas que utilizan agua, representa un peligro para la salud de los individuos expuestos.

Objetivo: evaluar la viabilidad de *L. pneumophila* en muestras de agua almacenadas en diferentes intervalos de tiempo para el diagnóstico por cultivo microbiológico de *Legionella* spp.

Métodos: Se contaminaron artificialmente muestras de agua con dos cepas de *L. pneumophila* de serogrupos diferentes y la conformación de una mezcla de ellas, para un total de 15 muestras. Los frascos contaminados fueron procesados a las 24 h, 72 h, 7 días, 14 días y 21 días. Se realizó cultivo microbiológico según ISO 11731: 2004 y PNO 03-013: 2015.

Resultados: Se demostró viabilidad de la bacteria en muestras almacenadas hasta 21 días. El método de concentración por filtración resultó tener los mayores recobrados del microorganismo.

Conclusiones: El tiempo de almacenamiento de las muestras afecta la viabilidad de *L. pneumophila*. Sienta las bases para estudios posteriores de robustez del diagnóstico de *L. pneumophila* como parte del servicio que presta el Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil en los programas de prevención y control *Legionella* spp. en instalaciones de interés turístico e industrial.

Palabras clave: *Legionella*; diagnóstico; viabilidad de microorganismos; evaluación.

Key words: *Legionella*, diagnosis, viability of microorganisms, evaluation.

ABSTRACT

Introduction: *Legionella pneumophila* is one of the main causative agents of community- and hospital-acquired pneumonia. Inhalation of sprays potentially contaminated with the bacterium, due to the colonization of networks and other systems using water, is a hazard to the health of exposed individuals.

Objective: Evaluate the viability of *L. pneumophila* in samples of water stored at various time intervals for the microbiological culture diagnosis of *Legionella* spp.

Methods: Water samples were artificially contaminated with two strains of *L. pneumophila* from different serogroups and a mixture of them, for a total of 15 samples. The contaminated vessels were processed at 24 h, 72 h, 7 d, 14 d and 21 d. Microbiological culture was performed in compliance with ISO 11731: 2004 and PNO 03-013: 2015.

Results: The bacterium was found to be viable in samples stored up to 21 days. The filtration concentration method obtained the greatest amount of the microorganism.

Conclusions: Storage time of the samples affects the viability of *L. pneumophila*. The study lays the foundations for further research about the validity of *L. pneumophila* diagnosis as part of the service offered by the Civil Defense Scientific Research Center in *Legionella* spp. prevention and control programs for tourist and industrial facilities.

Keywords: *Legionella*; diagnosis; viability of microorganisms; evaluation.

Recibido: 26/11/2018.

Aprobado: 08/04/2019.

INTRODUCCIÓN

Legionella pneumophila es el principal agente causal de la enfermedad de los legionarios, infección respiratoria con alto índice de mortalidad.^(1,2) Es una bacteria ubicua en ambientes acuáticos naturales, pero constituye un riesgo al colonizar redes hidráulicas y sistemas de clima en diversas instalaciones.^(3,4)

Diferentes factores afectan la viabilidad *in vitro* de *L. pneumophila*, entre ellos el tiempo y la temperatura de almacenamiento posterior a la toma de la muestra.^(5,6) Resultados falsos negativos o errores en la determinación de la concentración inicial de una muestra traen como consecuencia una subestimación del riesgo de infección del sitio de origen.

Se han desarrollado diversos métodos serológicos y moleculares para su detección en diferentes tipos de muestras; sin embargo, el cultivo continúa siendo la regla de oro.^(7,8) El estándar internacional ISO 11731 guía el proceso de diagnóstico para muestras ambientales.⁽⁹⁾ Los laboratorios no solo deben contar con la capacidad de diagnóstico necesaria para afrontar las investigaciones ambientales, sino además deben evaluar los procedimientos aplicados, independientemente de que estos sean los reconocidos internacionalmente.

La simulación de condiciones es una herramienta que permite la valoración y análisis de parámetros de calidad de las técnicas utilizadas en los laboratorios. La toma de muestra y su posterior tratamiento es el primer y principal paso, a partir del cual depende la toma de decisiones. Los factores que influyen en la preservación de las muestras repercuten en el resultado final que se persigue. Para el Laboratorio de Diagnóstico de Legionella del Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil (CICDC) como parte de un sistema de calidad es importante demostrar su competencia según los procedimientos de trabajo internos, los cuales han sido ajustados a lo descrito en la ISO 11731. Teniendo en cuenta lo planteado anteriormente, se decide evaluar la viabilidad de *L. pneumophila* en muestras de agua a diferentes intervalos de tiempo.

MÉTODOS

El diseño empleado en la siguiente investigación se clasifica como multifactorial. Para ello se prepararon inóculos de dos cepas salvajes de *Legionella pneumophila* pertenecientes a los serogrupos 1 y del 2 -14, previamente caracterizadas por aglutinación en látex por el sistema Dry Spot *L. pneumophila* S1 y S2-14 (Oxoid), así como por PCR tiempo real con el empleo

de LightMix[®] Kit *L. pneumophila* 16 S. Estas cepas forman parte del cepario del CICDC y presentan características culturales distinguibles entre sí. Las concentraciones de ambos inóculos se ajustaron según el tubo 0,5 de la escala nefelométrica de Mc. Farland.

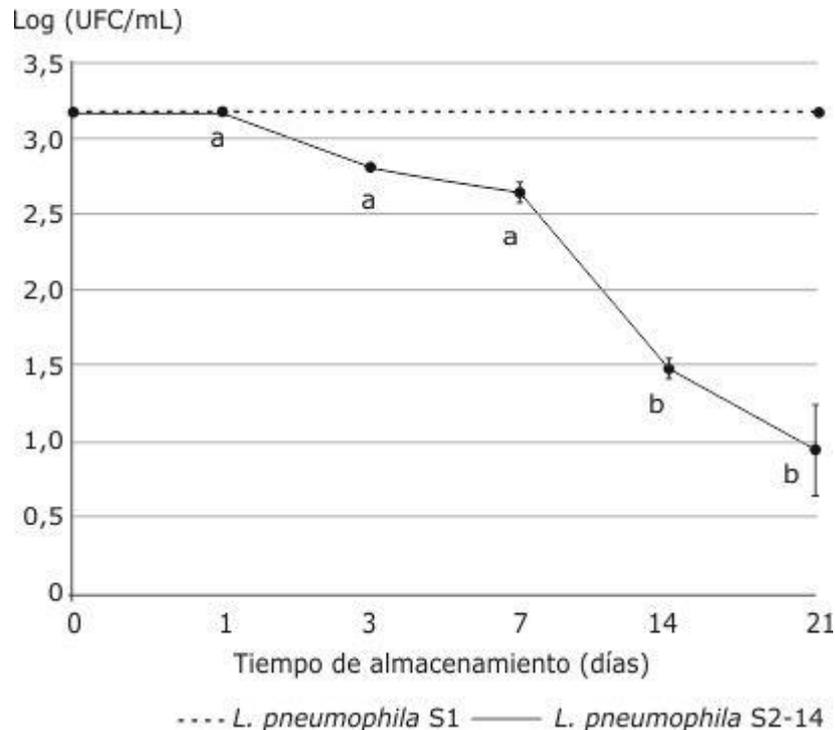
Se contaminaron artificialmente cinco frascos de agua con cada una de las cepas y la mezcla de los dos serogrupos. Se utilizó 1 L de agua (cloro 0 y pH: 7,6) procedente de grifo previamente esterilizada por filtración (filtros NALGENE 0,2 µm), para cada frasco, completando un total de 15. Los frascos inoculados se conservaron a 4 °C, con una concentración inicial estimada de 1 500 UFC/mL. Los periodos de almacenamiento fueron de 24 h, 72 h, 7 días, 14 días y 21 días. Además se utilizó como control negativo una muestra de agua procedente de grifo esterilizada sin contaminar en cada uno de los tiempos. El procesamiento de las muestras se realizó según ISO 11731:2004.⁽⁹⁾ Las muestras de agua fueron concentradas por filtración (membranas de nitrocelulosa, 0,45 µm). La siembra se realizó en medio BCYE con suplemento selectivo GVPC, por triplicados para cada método (siembra directa y siembra del material concentrado). Los cultivos se incubaron a 37 °C y se observaron durante 14 días. Se mantuvo el siguiente orden para el procesamiento de las muestras cada día: 1) *L. pneumophila* S1, 2) *L. pneumophila* S2-14, 3) *L. pneumophila* S1 y S2-14 (mezcla) y 4) control negativo.

A partir de las 48 h se verificó la presencia de características culturales descritas para el género *Legionella* spp.^(10,11) y se realizó conteo de colonias para estimar la concentración. De las muestras 2 y 3 fueron aisladas cinco colonias sugestivas en medio BCYE y se comprobó dependencia al aminoácido L-cisteína. La identificación se realizó por la técnica de aglutinación en látex con el sistema Dry Spot Spot *L. pneumophila* S1 y S2-14 (Oxoid). Se utilizó el programa Statistica 8.0 para el análisis de los resultados. Se empleó como pruebas no paramétricas Kruskal Wallis para variable independiente en la comparación entre los métodos y Friedman para variable dependiente en la evaluación en el tiempo de la viabilidad del microorganismo.

RESULTADOS

En las muestras almacenadas durante 21 días se detectó presencia de *L. pneumophila* para los dos serogrupos utilizados. Se demostró la viabilidad de la bacteria en el máximo periodo de tiempo de almacenamiento evaluado.

Para el serogrupo 2-14 se observó de forma general una disminución gradual de la concentración inicial durante el tiempo de ensayo (Fig. 1). A partir de la primera semana ocurrió una disminución significativa en más de la mitad de la concentración. Al final del estudio ocurrió una variación de 2 logaritmos con respecto a la concentración inicial.

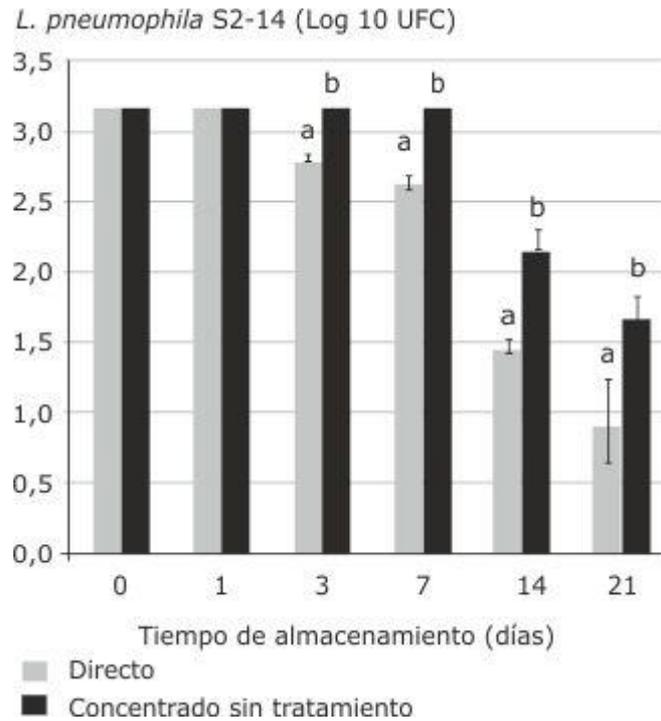


a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$.

Fig. 1 - Viabilidad en el tiempo de *Legionella pneumophila* en muestras de agua.

El recobrado de colonias para *L. pneumophila* serogrupo 1 y la mezcla se mantuvieron constantes durante todo el periodo de estudio, aproximadamente igual a la concentración inicial.

En la figura 2 se comparan los recobrados obtenidos en dos de los métodos empleados: en la siembra directa y la filtración para el caso del serogrupo del 2-14. En el caso del método concentrado se evidencia la eficacia del método de concentración por filtración en el recobrado del microorganismo, especialmente a partir de 14 días de almacenada la muestra, cuando las concentraciones se acercan o son menores que el límite de detección de la siembra directa.⁽¹⁴⁾



a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$.

Fig. 2 - Recobrado de *Legionella pneumophila* S2-14 en dos métodos diferentes.

Los resultados de la comparación de los recobrados obtenidos para el serogrupo 1 por ambos métodos, no aportaron información concluyente, dado precisamente que la concentración para este serogrupo se mantuvo contante en el periodo evaluado, por lo que los autores no consideran necesario mostrar dichos resultados.

Las colonias aisladas de la muestra 2 fueron positivas para el serogrupo correspondiente (S 2-14). En los cultivos de los controles negativos, trabajados junto con las muestras contaminadas, no se obtuvo crecimiento microbiano. En el caso de la muestra 3 (mezcla de serogrupo 1 y serogrupo 2-14), como era esperado, se encontraron colonias positivas a ambos serogrupos.

DISCUSIÓN

Los resultados demuestran la influencia del tiempo de almacenamiento en la determinación de la concentración inicial en una muestra ambiental, independiente de las condiciones en las que se preserven estas. Se corresponde con lo descrito en la ISO 11731, que recomienda procesar lo más rápido posible las muestras, evitando largos períodos de almacenamiento.⁽⁹⁾

La importancia de la extensión del periodo de almacenamiento de las muestras mayor que lo estipulado está dada a la probabilidad de que estas permanezcan hasta 14 días antes de su procesamiento en el laboratorio. Dicha situación se debe a la dinámica de inspecciones que lleva a cabo el centro a diferentes provincias del país. Por lo que se hace necesario evaluar periodos de tiempo superiores a lo dispuesto y recomendado en las regulaciones internacionales y su influencia en la concentración inicial de las muestras.

Las especies del género *Legionella* presentan como intervalo de temperatura de crecimiento de 20 a 45 °C.⁽¹²⁾ La poca variación en la concentración inicial pone de manifiesto y corrobora lo planteado en otros estudios y en la ISO 11731 que la temperatura de conservación debe estar entre 4 °C y 8 °C, dado a la imposibilidad de multiplicación de la bacteria en dicho intervalo,^(9,13) lo cual evita así desviaciones de la concentración inicial en relación con la muestreada en el sitio de origen, a causa del factor temperatura.

Las características intrínsecas de cada cepa afectan la viabilidad del microorganismo y repercuten en la estabilidad de su concentración en el tiempo en una muestra de agua determinada.^(5,6) Por tales razones se aconseja siempre el empleo de técnicas de concentración y se sugiere además, la siembra directa solo ante la sospecha de altas concentraciones de *Legionella* spp. en el sitio de riesgo muestreado. Esto permite estimar concentraciones en la muestra a partir del cálculo aportado por el conteo de colonias. En el caso del método concentrado se informa el resultado como la detección de presencia o ausencia de la bacteria.⁽⁹⁾

Aunque el tiempo de almacenamiento afecta la viabilidad de la bacteria, el empleo del procedimiento de concentración por filtración permite demostrar la presencia del microorganismo en el agua cuando las concentraciones de *Legionella* spp. disminuyen producto del almacenamiento en condiciones diferentes a las de su hábitat de origen. Esto es apoyado por la ISO 11731 en la cual se hace referencia al diagnóstico cualitativo de presencia/ausencia de especies perteneciente al género *Legionella*.

Cuando se procesan grandes cantidades de muestras, el flujo de trabajo conlleva un riesgo de contaminación de una muestra con otra, pero este disminuye o se elimina si se aplican correctamente los procedimientos y las buenas prácticas de laboratorio. Durante la investigación se comprobó que no ocurrió contaminación cruzada, entre una muestra y otra, en el procesamiento de las muestras contaminadas con los diferentes serogrupos. La detección de la mezcla de serogrupos en la muestra 3 evidencia la capacidad real de detectar una posible mezcla de serogrupos en una muestra ambiental. Estos resultados aportan los

primeros elementos de robustez del diagnóstico. Esta evaluación preliminar establece bases para ampliar los estudios de validación del procedimiento de diagnóstico.

Conclusiones

El tiempo de almacenamiento de las muestras afecta la viabilidad de *L. pneumophila*. No obstante, se pone de manifiesto la posibilidad del laboratorio del CICDC de diagnosticar el microorganismo en muestras ambientales conservadas por 21 días. Los resultados de esta investigación preliminar constituyen un paso importante para realizar estudios posteriores de estabilidad de las muestras de agua almacenadas por periodos muy superiores a lo regulado. Sienta las bases para la evaluación de la robustez del diagnóstico de *L. pneumophila* como parte del servicio que presta el CICDC en el Programa de Prevención y Control *Legionella* spp. en instalaciones de interés turístico e industrial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, Stagg HR, Zhang N, Kumar K, *et al.* Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis.* 2014;(10):1011-21.
2. Sikora A, Wójtowicz-Bobin M, Koziół-Montewka M, Magryś A, Gładysz I. Prevalence of *Legionella pneumophila* in water distribution systems in hospitals and public buildings of the Lublin region of eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.* 2015;22(2):195-201.
3. Hilbi H, Jarraud S, Hartland E, Buchrieser C. Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control. *Mol Microbiol.* 2010; 76 (1): 1–11.
4. Gea-Izquierdo E. Legionellosis: a new reality in the Republic of Ecuador? *Salud Uninorte. Barranquilla (Col.)* 2015;31(2):385-93.
5. Akira O, Naoyuki K, Koji Y, Keizo Y. Factors Influencing Survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl and Environ Microbiol.* 2003;69(5):2540-7.
6. Díaz-Flores A, Montero JC, Castro FJ, Alejandres EM, Bayón C, Solís I, *et al.* Comparing methods of determining *Legionella* spp. in complex water matrices. *BMC Microbiol.* 2015;15:91.

7. Mentasti M, Kese D, Echahidi F, Uldum SA, Afshar B, David S, *et al.* Design and validation of a qPCR assay for accurate detection and initial serogrouping of *Legionella pneumophila* in clinical specimens by the ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015;34(7):1387-93.
8. Scaturro M, Fontana S, Dell'eva I, Helfer F, Marchio M, Stefanetti MV, *et al.* A multicenter study of viable PCR using propidium monoazide to detect Legionella in water samples. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2016;85(3):283-8.
9. International Standards Organization, ISO. Water quality- Detection and enumeration of *Legionella*- Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts. Norma ISO 11731-2. Suiza. 2004.
10. Pérez Monrás MF. Legionelas. En: Valdés-Dapena M, Llop A, Zuazo JL, eds. Microbiología y parasitología médicas. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2004. Tomo I. p. 325-32.
11. Ulloa MTF. Retrato microbiológico. *Legionella pneumophila*. Rev Chil Infect. 2008;25(3):208.
12. Van der Kooij DJ, Brouwer-Hanzens A, Veenendaal HR, Wullings BA. Multiplication of *Legionella pneumophila* Sequence Types 1, 47, and 62 in Buffered Yeast Extract Broth and Biofilms Exposed to Flowing Tap Water at Temperatures of 38°C to 42°C. App Env Microb. 2016;82(22).
13. Schwake DO, Alum A, Abbaszadegan M. Impact of Environmental Factors on *Legionella* Populations in Drinking Water. Pathogens. 2015;4(2):269-82.
14. Sepúlveda-Sánchez M, Rodríguez-López ML, Arboleda-Baena CM, Arismendy-González LM, Betancur-Urán J. Verificación del método de filtración por membrana para la detección y cuantificación de *Legionella* spp. en agua potable. Revista Politécnica. 2016;12(22):95-104.