



DETALLES DE LA NORMA UNE-EN ISO 11731:2017 PARA EL RECuento DE *LEGIONELLA SPP*





ÍNDICE

1 Introducción

2 Alcance

3 Muestreo

4 Procedimiento de análisis

4.1 Tipo de muestra

4.2 Concentración de la muestra

4.3 Pretratamiento de la muestra

4.4 Protocolo de ensayo

5 Ventajas y desventajas



1. INTRODUCCIÓN

La monitorización y análisis de *Legionella* es importante para proteger la salud pública, ya que permite identificar aquellas fuentes ambientales con riesgo de legionelosis, validar las medidas de control y verificar su efectividad.

La norma UNE-EN ISO 11731:2017 Calidad del agua. Recuento de *Legionella* contempla el método de cultivo como método de referencia para la detección de *Legionella spp.* pero no es el único método válido. Según el R.D. 3/2023 se podrán utilizar otros métodos de análisis distintos al cultivo, como la PCR, para la detección de *Legionella spp.* en determinadas situaciones.



2. ALCANCE

La norma describe los métodos aplicables a todo tipo de muestras de agua, incluyendo aguas potables, industriales, residuales y naturales, así como matrices relacionadas con el agua como por ejemplo biofilms, hisopos, sedimentos, etc.



3. MUESTREO

Realizar el muestreo, transporte y conservación de las muestras según la ISO 19458.

Novedad: Según lo recogido en el Real Decreto 3/2023, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro, será obligatoria la acreditación para la toma de muestras, así como para los laboratorios de análisis.

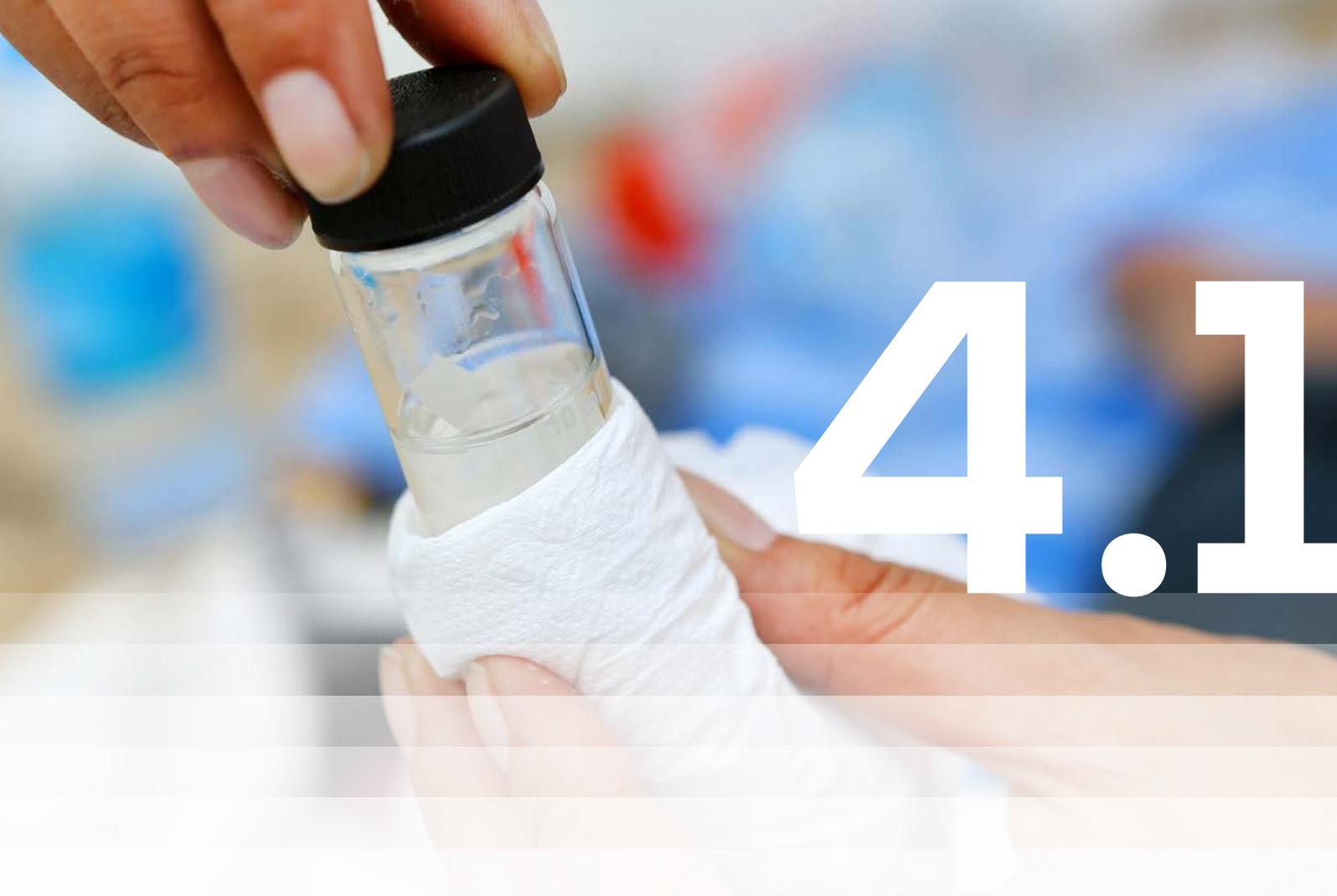
Para el control de las aguas, además de realizar análisis de *Legionella spp*, se deberán determinar in situ al menos los siguientes parámetros: pH (si el efecto del desinfectante depende del pH), temperatura, conductividad y concentración de desinfectante residual.



4. PROCEDIMIENTO

El procedimiento a seguir dependerá del tipo de muestra y de la concentración de *Legionella* y de flora acompañante esperada.

Si no se conoce la concentración de microorganismos en la muestra, se recomienda hacer una concentración de la misma.



4.1

4.1 TIPO DE MUESTRA

- ▶ Agua con poca flora acompañante y alta concentración de *Legionella* ($\geq 10^4$ ufc/l). Ej. Agua potable
- ▶ Agua con poca flora acompañante y poca concentración de *Legionella*. Ej. Agua potable
- ▶ Agua con elevada concentración de flora acompañante.
Ej. Torres de evaporación, aguas de proceso, etc
- ▶ Agua con muy elevada concentración de flora acompañante.
Ej. Aguas residuales



4.2 CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA

- ▶ Por filtración y siembra directa: filtrar la muestra sin tratar o ya tratada a través de un filtro ⁽¹⁾
- ▶ Por filtración y lavado: filtrar la muestra a través de un filtro ⁽²⁾. Lavar con 5-10 ml de diluyente estéril ⁽³⁾ o muestra. Dividir el concentrado en 3 porciones para hacer el pretratamiento de la muestra

⁽¹⁾ Filtros de nitrato de celulosa, de 47 mm de diámetro y tamaño de poro de 0.2 μm o 0.45 μm .

⁽²⁾ Filtros de policarbonato o polietersulfona, de 47 a 142 mm de diámetro y tamaño de poro de 0.2 μm .

⁽³⁾ Page's salino, solución Ringer diluida, PBS, agua estéril



4.3

4.3 PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

- ▶ **Tratamiento por calor:** poner la muestra en un baño de agua a $50 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 30 ± 2 minutos
- ▶ **Tratamiento ácido:** diluir 1 volumen de muestra con 9 volúmenes de solución ácida. Mezclar y dejar durante 5 ± 0.5 minutos

4.4

4.4 PROTOCOLO DE ENSAYO

Agua con ↑Legionella ↓Flora acompañante

Si se espera $>10^4$ ufc/l

Inocular 0,1-0,5 ml en:
BCYE y BCYE+AB

Incubación a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de 7 a 10 días

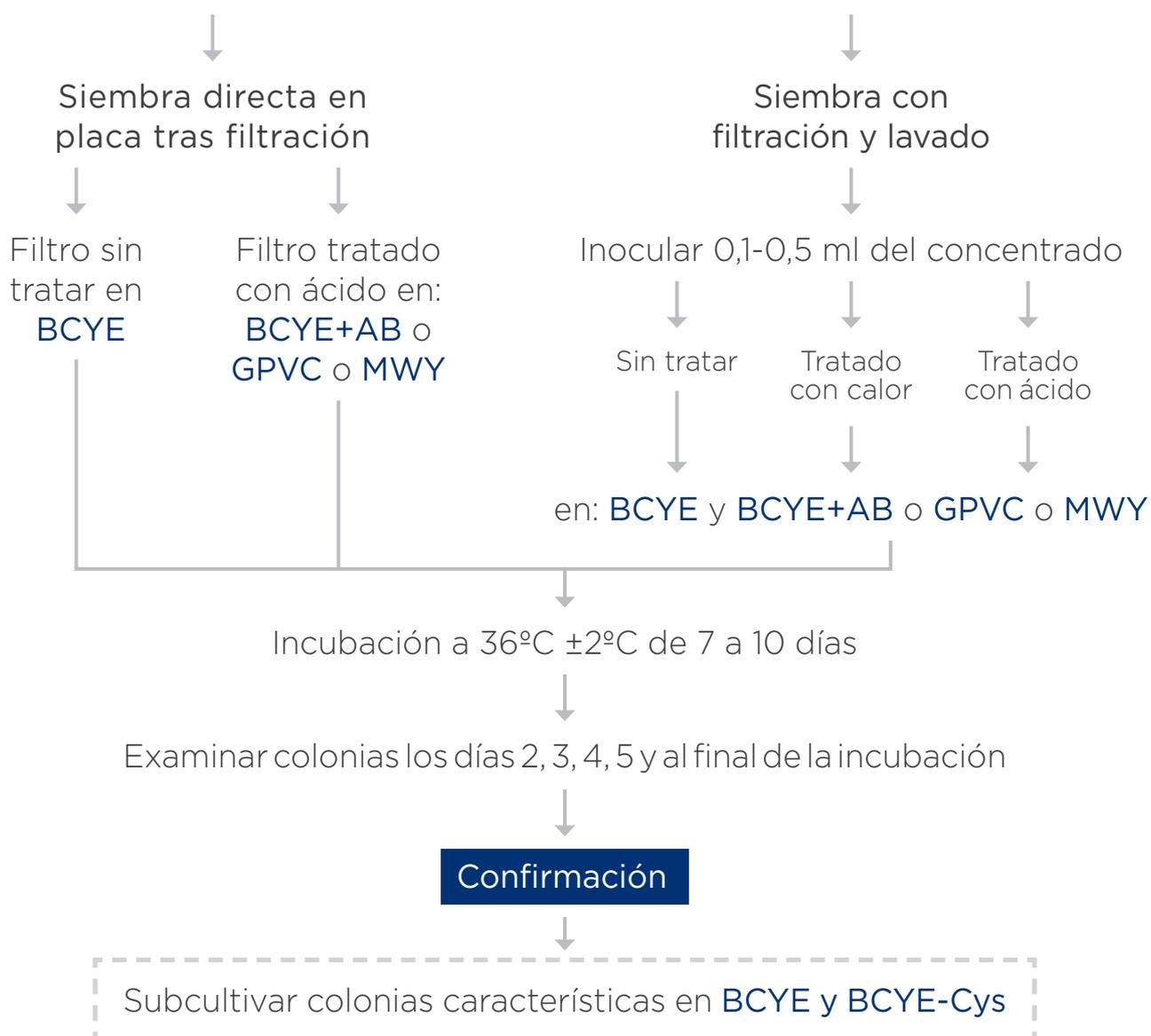
Examinar colonias los días 2, 3, 4, 5 y al final de la incubación

Confirmación

Subcultivar colonias características en **BCYE y BCYE-Cys**

4.4

Agua con ↓Legionella ↓Flora acompañante



4.4

Agua con ↑Flora acompañante

Submuestras

Sin concentrar
(directa)

Concentrada
por filtración

Diluida a 1:10

Dividir cada una de las submuestras en tres partes:

- Sin tratar
- Tratada con calor
- Tratada con ácido

Inocular 0,1-0,5 ml de cada una de las tres partes en: **GPVC** o **MWY**

Incubación a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de 7 a 10 días

Examinar colonias los días 2, 3, 4, 5 y al final de la incubación

Confirmación

Subcultivar colonias características en **BCYE** y **BCYE-Cys**

4.4

Agua con ↑Flora acompañante

↓
Pretratamiento de la muestra
con calor y después con ácido

↓
La muestra se divide en tres partes:

- Sin diluir
- Diluida al 1:10
- Diluida al 1:100

↓
Inocular 0,1-0,5 ml de cada una de
las tres partes en: **GPVC** o **MWY**

↓
Incubación a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de 7 a 10 días

↓
Examinar colonias los días 2, 3, 4, 5 y al final de la incubación

↓
Confirmación

↓
Subcultivar colonias características en **BCYE** y **BCYE-Cys**

5

5. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS DISTINTOS MÉTODOS DE SIEMBRA

MÉTODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Siembra directa	Fácil de contar Buena recuperación	Límite de detección alto
Siembra directa del filtro	Método fácil Límite de detección bajo	Difícil de contar ⁽¹⁾ Influencia del filtro
Filtración y lavado	Fácil de contar Límite de detección bajo	Baja recuperación ⁽²⁾
Siembra después de dilución	Fácil de contar Buena recuperación	Límite de detección muy alto Protocolo más largo

⁽¹⁾ Por el crecimiento de la flora acompañante

⁽²⁾ Comparado con siembra directa o siembra directa del filtro

Referencia	Descripción	Formato
MEDIOS DE CULTIVO		
007854020	BCYE Agar sin cisteína	20 placas x 90 mm
032333020	BCYE Agar sin cisteína	20 placas x 90mm
007853020	BCYE Agar con cisteína	20 placas x 90 mm
032235020	BCYE Agar con cisteína	20 placas x 90 mm
032465030	BCYE Agar con cisteína	20 placas x 55 mm
032432020	BCYE Agar con Antibiótico	20 placas x 90 mm
007712020	GVPC Agar para <i>Legionella</i>	20 placas x 90 mm
032236020	GVPC Agar para <i>Legionella</i>	20 placas x 90 mm
007929120	GVPC Agar para <i>Legionella</i>	120 placas x 90 mm
032457030	GVPC Agar para <i>Legionella</i>	30 placas x 55 mm
199025020	MWY	20 placas x 90mm
007745020	TSA	20 placas x 90mm
032456010	Tampón ácido	1 frasco x 450ml
007202100	Solución Ringer (1/4 strength)	100 tabletas
032114010	Solución Ringer	10 frascos x 90 ml
032395010	Suero fisiológico (PBS)	10 frascos x 100 ml
FILTROS		
253006300	Filtros estériles PES 47mm 0.2 micras,	300 unidades
253005300	Filtros estériles PES 47mm 0.45 micras	300 unidades
253002100	Filtros estériles nitrato de celulosa 47mm 0.2 micras blancos	100 unidades
253001100	Filtros estériles nitrato de celulosa 47mm 0.45 micras blancos	100 unidades
253007100	Filtros estériles nitrato de celulosa 47mm 0.45 micras negros	100 unidades
BOMBA PARA 3 POSICIONES (con Kitasato)		
253131001	Bomba de vacío Microsart	1 unidad
253129001	Kitasato 5L con tapón y tubo	1 unidad
253128001	Manguera de goma para conexión, 1M	1 unidad
253130001	Filtro Vacusart 0.45 micras	1 unidad
RAMPA Y FUNGIBLE DESECHABLE (PP, autoclavable alguna vez)		
253045001	Rampa de filtración Microsart 3 puestos para embudos reutilizables Biosart 250ml	1 unidad
253046050	Embudos Biosart 250ml	50 unidades
RAMPA Y FUNGIBLE REUTILIZABLE		
253105001	Rampa de filtración Microsart 3 puestos para embudos de acero inoxidable de 500ml	1 unidad
MATERIAL ADICIONAL		
061284001	Incubadora IN75, 74L, 20-80°C	1 unidad
192195048	Frasco estéril PET 1000mL sin tiosulfato	48 unidades
192232048	Frasco estéril PET 1000mL con tiosulfato	48 unidades
192085001	Pinzas de acero inoxidable para membranas	2 unidades
119220001	Maletín para control de legionelosis	1 unidad

