



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.

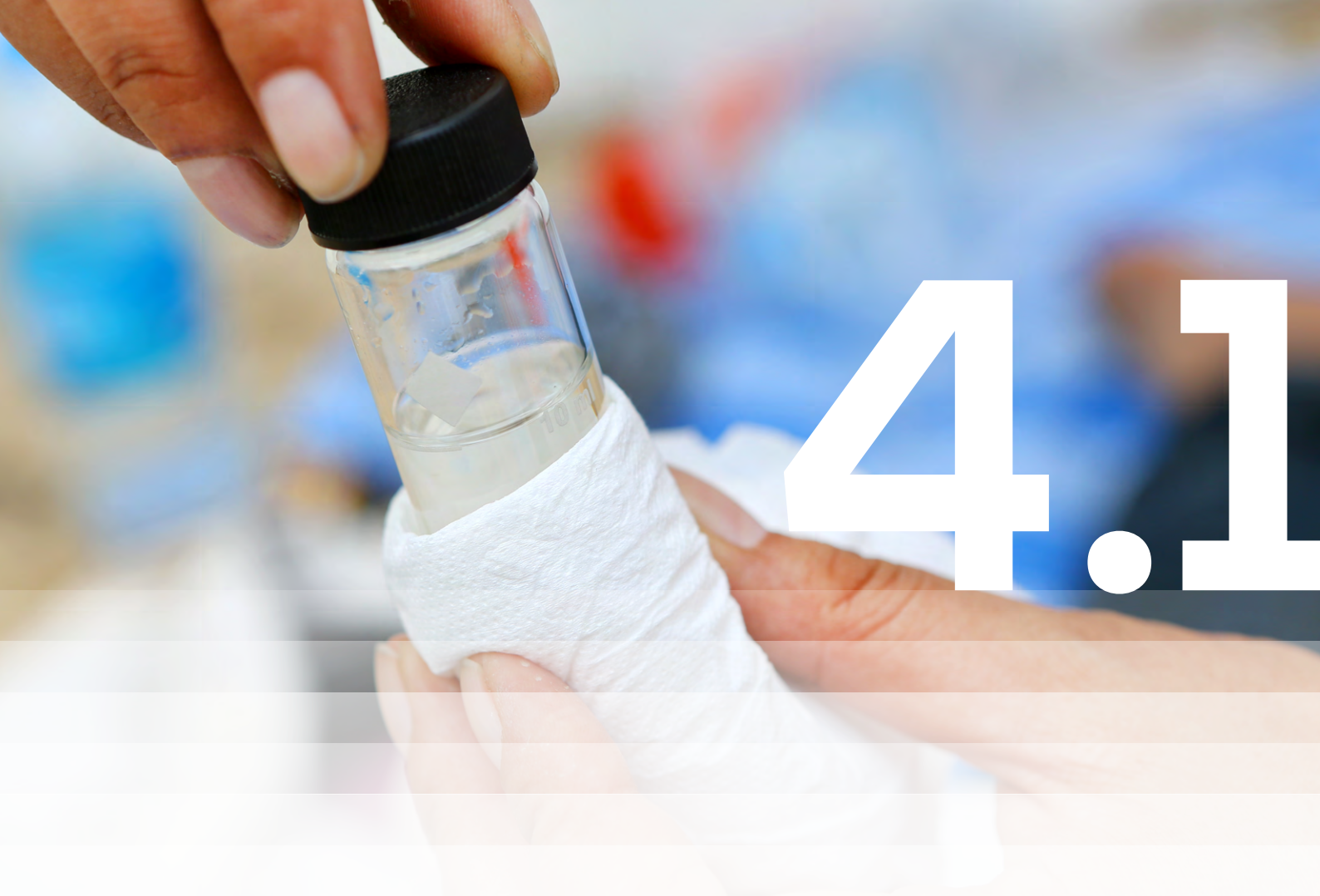
Para el control de las aguas, además de realizar análisis de *Legionella spp*, se deberán determinar in situ al menos los siguientes parámetros: pH (si el efecto del desinfectante depende del pH), temperatura, conductividad y concentración de desinfectante residual.



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 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

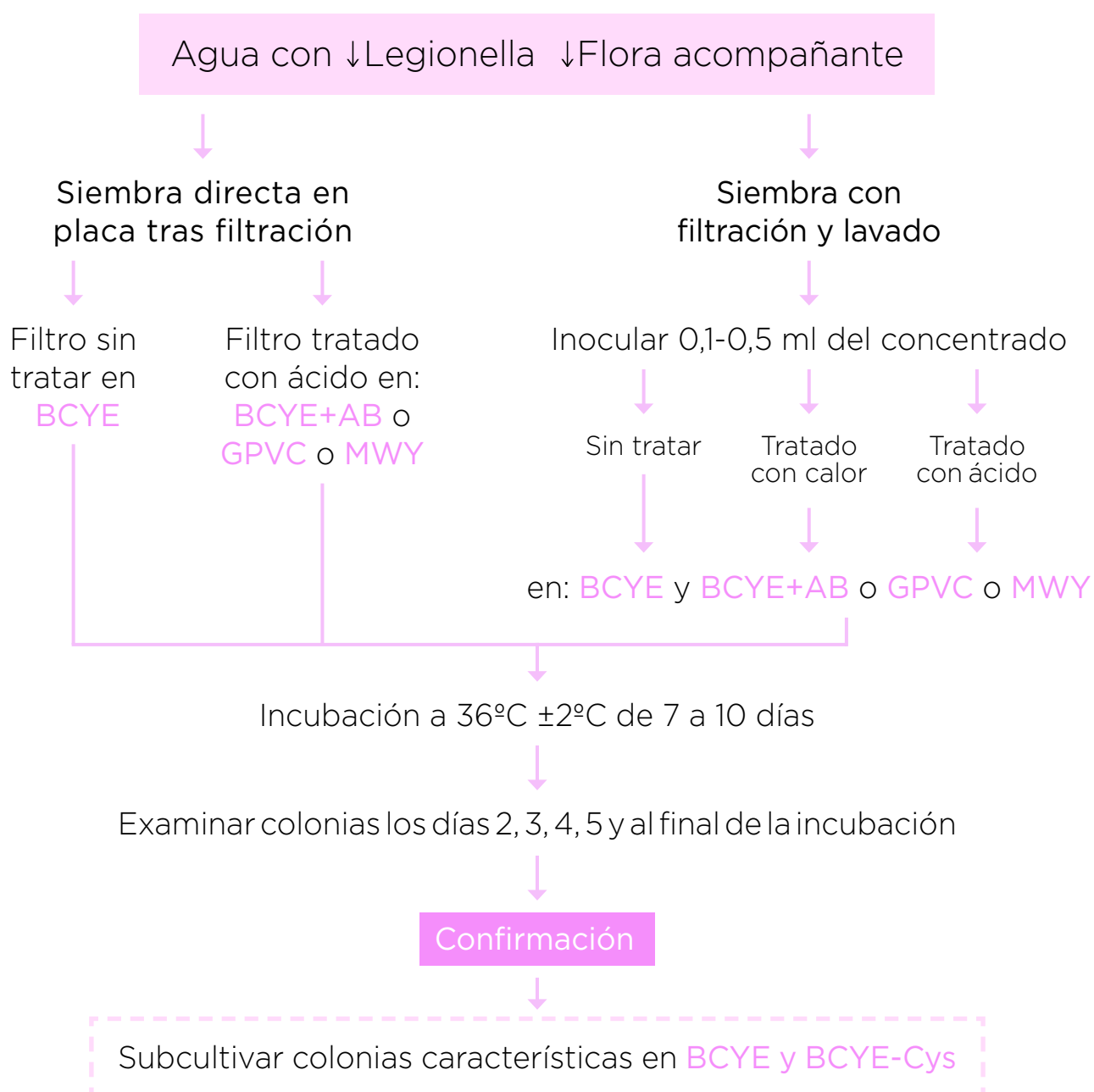
Incubación a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de 7 a 10 días

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



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



LA REVOLUCIÓN EN EL ANÁLISIS
DE *LEGIONELLA* YA HA LLEGADO



ANTECEDENTES

La nueva UNE 100030 es resultado de años de trabajo de un grupo de expertos en prevención de *Legionella* motivados para disponer de herramientas necesarias para hacer frente a los brotes de legionelosis.

La legionelosis es un problema de salud pública muy importante, con una incidencia muy elevada.

En Europa, Australia y los Estados Unidos de América, **se detectan entre 10 y 15 casos de legionelosis por cada millón de habitantes al año.**



OBJETIVOS

La nueva UNE 100030 ha sido publicada:

- ▶ Para dar respuesta a la necesidad de actualizar los conocimientos
- ▶ Como resultado de la evolución de los métodos de análisis presentes en el mercado
- ▶ Para poder reaccionar de forma más rápida frente a los brotes



NOVEDADES

La nueva UNE 100030 publicada en abril de 2017 **permite realizar los controles rutinarios de *Legionella* con técnicas de análisis alternativas al método ISO 11731.**

Análisis de *Legionella* en:

- ▶ Controles oficiales: método ISO 11731:1998
- ▶ Controles rutinarios: método ISO 11731:1998 y 2017, y métodos alternativos
- ▶ PCR-rt, inmunomagnetismo y otros métodos



ELECCIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS

ASPECTOS A TENER EN CUENTA

- ▶ El método debe ser ISO (ISO 11731) o disponer de un protocolo validado por un organismo competente de certificación nacional o internacional (Anexo F)
 - PCR-rt: validación AFNOR
 - Inmunomagnetismo: certificado PTM AOAC
- ▶ Capacidad de detección de *Legionella spp* no únicamente *Legionella pneumophila* (Anexo E)
- ▶ Límite de detección < 100 ufc/l. La normativa fija unos límites de actuación en función de la carga de *Legionella spp* detectada en la instalación
- ▶ Presencia de flora interferente
- ▶ Tratamiento de la muestra, según tipo de muestra a analizar

MÉTODOS ALTERNATIVOS vs. MÉTODO ISO 11731

	PCR-rt	ISO 11731	INMUNOMAGNETISMO
Fundamento	Detección de ADN de <i>Legionella</i> presente en la muestra	Detección de microorganismos capaces de crecer en BCYE con cisteína	Detección basada en la unión antígeno/anticuerpo; reacción enzimática colorimétrica ⁽¹⁾
Dispone de certificado nacional o internacional	AFNOR	ISO	Certificado PTM-AOAC
Detección de <i>Legionella</i> spp no solamente <i>L.pneumophila</i>	Sí	Sí	Sí
Interferencia de matriz	NO	Sí	Sí
Detección de células viables no cultivables (CVNC)	Sí ⁽²⁾	NO	Sí
Inhibición por flora interferente habitual en aguas	NO	Sí	Sí
Detección <i>Legionella</i> en presencia de amebas	Sí	NO	NO ⁽³⁾
LOQ < 100 ufc/L	Sí	Sí	NO ⁽⁴⁾
Tratamiento previo de la muestra	Sí	Sí	Sí
Tiempo de obtención de resultados	4 horas	5-10 días	2 horas
Tipo de muestras	Aguas de cualquier tipo, Biofilms	Aguas de cualquier tipo, Biofilms	Aguas de cualquier tipo, Biofilms ⁽⁵⁾

(1) Este tipo de reacción no sigue una distribución normal, por lo que para la cuantificación del analito es necesario realizar una curva de calibración en cada serie de análisis. Los métodos de inmunoensayo tienen un coeficiente de variación muy elevado, por lo que es recomendable realizar la prueba por duplicado.

(2) Se dispone de un reactivo para eliminar el ADN de las células no viables.

(3) No se puede garantizar la capacidad de detectar *Legionella* spp en presencia de amebas ya que el anticuerpo es incapaz de unirse a las partículas magnéticas al estar físicamente protegido.

(4) Para obtener un resultado positivo la densidad óptica (OD) debe ser superior a 0.04. Según la Ley de Lambert Beer, una OD inferior a 0.100 no puede ser cuantificable. La ecuación facilitada por el fabricante para el cálculo de resultado es $Y = 2.3061X + 4.9815$ por lo que el límite de cuantificación real (LQ) de la técnica podría llegar a ser de 4.74x10² ufc/L (si necesita información más detallada puede solicitarla a bioser@bioser.com)

(5) En muestras muy sucias puede haber interferentes que inhiben la interacción antígeno/anticuerpo.



CONCLUSIONES

La **técnica PCR-rt cumple con todos los requisitos definidos en la UNE 100030:2017** por lo que se considera una de las técnicas alternativas más robustas para la realización de los controles rutinarios de *Legionella*:

- ▶ Detecta *Legionella spp* y no únicamente *L.pneumophila* (Anexo E)
- ▶ Dispone de certificación AFNOR (Anexo F)
- ▶ Tiene un límite de detección (LOD): $LOD < 100 \text{ ufc/L}$
- ▶ Tiene la capacidad de inhibir la flora interferente habitual presente en las aguas de las instalaciones a controlar
- ▶ Permite la obtención de resultados en 4 horas, por lo que aporta agilidad en el diagnóstico y respuesta frente a los brotes



Edificio Numancia 1, C/ Viriat, 47, Planta 14, 08014 Barcelona | +34 93 226 44 77 | bioser@bioser.com
www.bioser.com

