

Sistema de detección y cuantificación *on line* de *Legionella* viable en aguas

Amical Arnau Ripollés gerente de Iproma
Inmaculada Solís jefa de Laboratorio de Microbiología de Iproma
Carlos Ferrer gerente de Biótica, Bioquímica Analítica
Marisa Jiménez ingeniera electrónica de Biótica, Bioquímica Analítica
Guillermo Roríguez director científico de Biótica, Bioquímica Analítica

Legionella es un patógeno oportunista presente en aguas naturales a bajas concentraciones (Brenner, 1979) y que en instalaciones que utilizan agua proliferativa (Berry, 2006) y puede alcanzar concentraciones elevadas, dispersándose al ambiente en aerosoles y produciendo infecciones de tipo neumonía (Shelton, 1994; Friedman, 2002). Es muy resistente a tratamientos físicos, mecánicos y químicos (Borges, 2012). Además, esto hace imprevisible las variaciones de concentración de la bacteria libre e infectiva en las instalaciones. En este contexto, su monitorización *in situ* y automatizada mediante una técnica rápida es un reto cuyo logro hará posible detectar con suficiente antelación incrementos de concentración de *Legionella*.

Palabras clave

Legionella, automatizado, inmunomagnetismo, vigilancia, prevención, rapidez.

On-site monitoring and detection system for Legionella in waters

Legionella is an opportunistic pathogen present in natural waters at low concentrations (Brenner, 1979) and it can proliferate at installations using water (Berry, 2006) reaching high levels, spreading to the environment in aerosols and producing pneumonia infections (Shelton, 1994; Friedman, 2002). It is very resistant to physical, mechanical and chemical treatments (Borges, 2012). Additionally, it makes unpredictable the variations in concentration of free and infective bacteria in facilities. In this context, automated on-site monitoring through a rapid technique is a challenge whose achievement will make possible to detect in advance increases in concentration of Legionella.

Keywords

Legionella spp, automation, immunomagnetism, surveillance, prevention, fast detection.



1. Introducción

La implementación de una acción efectiva y oportuna en respuesta a un dato microbiológico depende de la rapidez de obtención del dato y de su representatividad sobre el entorno del que deriva. Para generar su medición rápida e *in situ*, la automatización de la medida microbiológica es un hito clave. Sin embargo, el nivel de automatización en el campo de la microbiología ha estado a la zaga de otros importantes segmentos relacionados con los ensayos ambientales. La lenta incorporación de estas tecnologías en el mercado se debe en parte a la complejidad de una automatización que sea adecuada para la singularidad de la determinación microbiológica.

La necesidad de información rápida y fiable de resultados microbiológicos es de gran relevancia para la salud pública (Samendra, 2014), particularmente en una época de austeridad financiera, un tiempo en el que la efectividad de la prevención del riesgo biológico y el coste del cuidado de la salud al paciente se ven comprometidos cada vez más, y en el que el alto coste sanitario producido por la enfermedad infecciosa se halla bajo severa vigilancia en todo el mundo. En particular, el nivel de la bacteria *Legionella* debe ser controlado en los entornos de riesgo, como las torres de refrigeración, instalaciones ampliamente utilizadas y con frecuencia asociadas a episodios y brotes epidémicos de legionelosis (Bartram, 2007), un tipo de neumonía con una tasa de mortalidad de 12-15%. La bacteria se contrae por inhalación de los aerosoles generados en las instalaciones, y la carga infectiva de esas microgotas diseminadas por el aire dependerá del nivel de *Legionella* libre presente en el agua. Su determinación rápida es crítica.

La cuantificación rápida de la bacteria *Legionella* en aguas mediante un procedimiento automatizado e independiente del cultivo representa un salto científico-tec-

nológico. Este trabajo describe un equipo biosensor automatizado para la cuantificación *in situ* y fiable del nivel de *Legionella* spp en aguas, denominado Legiolab. Este sistema, combina la inmunocaptura y separación magnética de la célula intacta de *Legionella* con técnicas de colorimetría. Está basado en un método validado y certificado por AOAC-RI, para la determinación cuantitativa de *Legionella* spp en aguas (Rodríguez, 2012; Rodríguez, 2014), considerando la célula la unidad mínima de infección.

Este sistema, como *early warning system* integra el procesado automático de la preconcentración, análisis y reporte del resultado en el entorno de la toma de muestra, a pie de instalación, en un formato *all-in-one*. Permite la captura específica y concentración de *Legionella* mediante microesferas magnéticas inmuoactivadas y, seguidamente, las bacterias capturadas serán marcadas con un segundo anticuerpo conjugado con una enzima reveladora, para desarrollar un color que puede ser cuantificado. Un brazo robotizado permite el desarrollo del análisis. Como novedad, es la primera vez que un test rápido y validado por un organismo internacional de certificación para la cuantificación de *Legionella* es automatizado.

Los organismos concentrados de *Legionella* se pueden detectar y cuantificar mediante el equipo automatizado en sólo 1 hora, en el entorno real de las instalaciones de riesgo, frente a los 7-12 días que requiere el método convencional de cultivo que sólo puede desarrollarse en el entorno controlado de un laboratorio. El límite teórico de cuantificación con este ensayo es equivalente a 70 unidades formadoras de colonia (ufc), lo que permite el uso de su información para el cumplimiento de los niveles satisfactorios, de alerta y de acción que sobre *Legionella* contemplan las regulaciones europeas, y a nivel mundial. Por consiguiente, si hasta hoy solo pueden tomarse medidas reactivas a datos históricos, mediante la tecnología

Figura 1. Fundamento de la captura de célula intacta (longitud de 1-2 micrómetros) mediante anticuerpos inmovilizados en la superficie de una partícula magnética (soporte móvil, diámetro 0,9-1,0 micrómetros, para formar complejos partícula-bacteria).

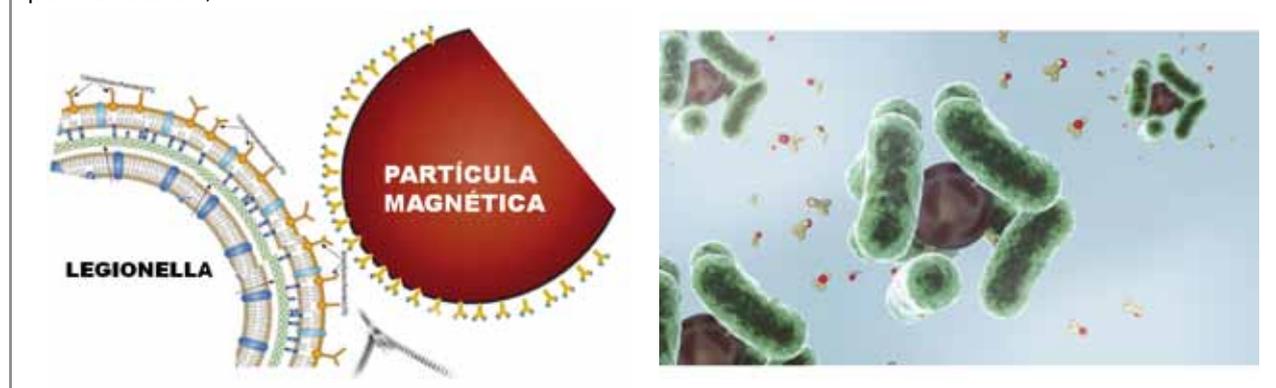
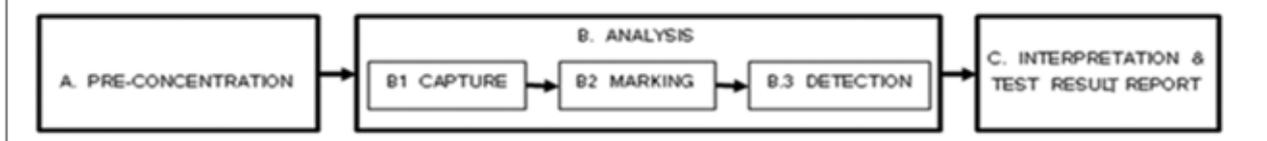
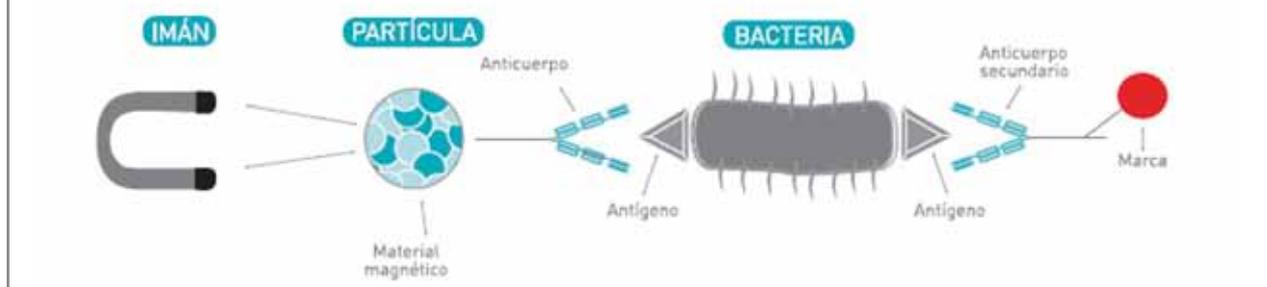


Figura 2. Etapas básicas del ensayo automatizado.**Figura 3.** Sistema de captura sobre soporte inmunoadactivado y revelado por enzimoimmunoensayo.

aquí propuesta se podrán tomar decisiones oportunas para evitar que las instalaciones alcancen niveles infecciosos y sostenidos de este patógeno en sus aguas, añadiendo el valor de la prevención en tiempo real y reduciendo drásticamente la probabilidad de diseminación y contagio en la población.

2. Metodología

2.1. Reactivos y procedimiento

La inmovilización de anticuerpos (Ab) en soportes móviles (partículas magnéticas, PM) de dimensiones controladas, va a reportar unas características diferenciales a los reactivos de captura y métodos de ensayo derivados, controlando las composiciones de los medios de reacción y de lavado. La envoltura celular no es una capa rígida e inerte que separa el contenido celular del exterior, sino la estructura principal a través de la cual *Legionella* interactúa con los cambiantes entornos que puede encontrar a lo largo de su ciclo de vida (Shevchuk, 2011).

El procedimiento de ensayo comprende la mezcla de las partículas magnéticas funcionalizadas con los anticuerpos de captura, con una muestra preconcentrada obtenida mediante la filtración de un volumen conocido de la muestra original. Durante una primera incubación, las partículas colisionan con las bacterias diana (*Legionella* sp) y quedan unidas formando complejos *Legionella*-partícula (Figura 1).

Estos complejos se pueden lavar fácilmente porque las partículas y sus complejos pueden separarse del resto de la muestra aplicando un imán. Los complejos lavados se resuspenden e incuban con un reactivo que contiene el

anticuerpo de lectura, conjugado con una enzima que, en presencia de sus substratos, genera un color proporcional a la cantidad de *Legionella* presente (Figuras 2 y 3).

En la etapa final, los complejos y partículas se separan con el imán, para medir la absorbancia del sobrenadante. Este valor de absorbancia se introduce en una ecuación de correspondencia que proporciona un valor equivalente al que se hubiese podido obtener mediante el método de referencia, el cultivo, y por tanto viene expresado como 'unidades formadoras de colonia (ufc)' refiriéndose al volumen de la muestra original, generalmente de 1 litro.

2.2. Preconcentración de la muestra

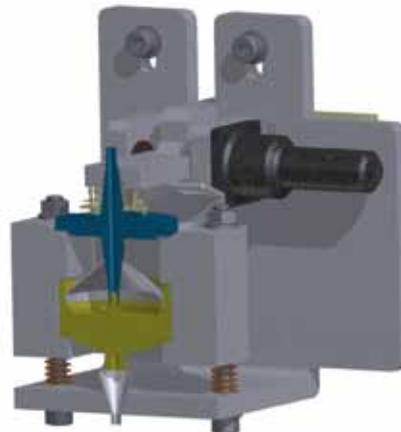
La finalidad de esta etapa es aumentar la concentración de *Legionella* en la alícuota de medida para entrar en el rango de detección del método, una etapa que es común a todos los métodos. Generalmente, este objetivo se alcanza en laboratorio haciendo pasar la muestra original a través de un filtro de membrana en una rampa de vacío. Hay muestras ambientales que pueden ser filtradas en un tiempo corto, del orden de unos minutos, pero otras pueden tardar en filtrar un volumen equivalente algo más de una hora. En todos los casos, el resultado del ensayo se refiere al volumen realmente filtrado en cada caso. El elemento de filtración propuesto se integra en un dispositivo que establece un flujo de filtración con aspiración por bomba peristáltica o de vacío (Figura 4) y una elución con vibración en contraflujo.

2.3. Captura

El sistema de retención magnética se basa en un dispositivo que integra un imán en un cartucho de aspiración



Figura 4. Prototipo de preconcentración de muestra con aspiración por vacío (izquierda) y esquema del dispositivo de filtración desarrollado a partir del prototipo de laboratorio (derecha).



(pipeta magnética), lo que permite simultáneamente la gestión de la retención y resuspensión de las partículas magnéticas y su trasiego entre cubetas, junto con el movimiento de líquidos.

Las cubetas, cada una con un reactivo diferente, se disponen secuencialmente en un cartucho receptor (**Figura 5**), y un brazo robotizado traslada la pipeta magnética de una a otra. De esta forma, las partículas y los complejos formados con las bacterias se trasladan de una cubeta a la siguiente, soltándolas o recuperándolas según sea preciso, al mismo tiempo que procura la homogenización de los medios reactivos por acción de pipetting repetido.

2.4. Lectura e interpretación del resultado

El sobrenadante final, tanto del control negativo como de la muestra, es transferido a una celda de lectura, alojada en un colorímetro. Aquí se mide la absorbancia o la transmitancia a una determinada longitud de onda, 420

nm. La diferencia, o absorbancia relativa, se introduce en una ecuación que proporciona la cantidad del microorganismo en la cubeta test. Como esta cantidad es la que procede de la muestra original, dicha cantidad referida al volumen original de muestra proporciona la concentración de *Legionella* en la muestra original, expresada en ufc/L. Distintos colorímetros pueden ser incorporados en el equipo definitivo. De entre ellos, existen opciones de interés identificadas en el mercado, que pueden proporcionar además la posibilidad de ir incorporando otros parámetros fisicoquímicos sobre la misma muestra, así como la opción de generar informes analíticos en distintos formatos. En estos equipos, la cubeta se aloja en una pieza que asegura su correcto posicionamiento con respecto al haz de luz (**Figura 6**).

2.5. Integración

El equipo se ubica integrado en una carcasa exterior calorífuga, para habilitar su ubicación y funcionamiento en

Figura 5. Cartucho para reactivos (izquierda) para su uso secuencial por parte de la pipeta magnética accionada mediante brazo robotizado (derecha).

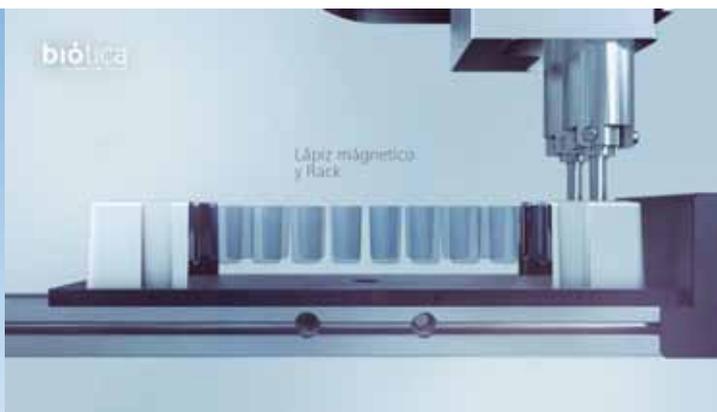
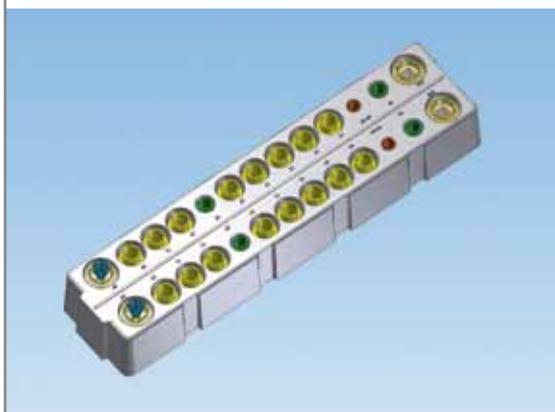


Figura 6. Pieza adaptadora para alojar la cubeta de lectura en un fotómetro.



campo, en la proximidad de la instalación monitorizada (**Figura 7**).

Una versión básica del equipo se ha presentado en la Feria de Chillventa 2014, en Alemania (**Figura 8**), un evento referente a nivel internacional en el mundo de la climatización, refrigeración y ventilación.

2.6. Validación

Para la validación se han tenido en cuenta las normas ISO 16140, ISO/TR 13843, ISO 17994, con el máximo alcance que ha sido posible en cada caso. Para distintos niveles de *Legionella* se han realizado ensayos en paralelo con los métodos de referencia y el propuesto por Legiolab. En este punto es importante presentar la misma porción analítica (la misma muestra concentrada) a ambos métodos, para reducir el impacto en la comparación de los

efectos de sobre-dispersión bien descritos en la ISO/TR 13843. Igualmente es conveniente presentar esa misma porción analítica a ambos métodos al mismo tiempo, para reducir el impacto en la comparación de alteraciones en el analito que pudiesen darse con el tiempo transcurrido antes del ensayo. La validación se ha llevado a cabo sobre una versión básica del equipo (**Figura 9**) para obtener y verificar la curva de calibrado del test inmunomagnético implementado en la máquina.

3. Resultados y discusión

El módulo de filtración de Legiolab consigue de forma automatizada una recuperación del microorganismo diana (evaluada por técnica de cultivo) para muestras ambientales (torres de refrigeración) equivalente al sistema de referencia (filtración por rampa de vacío). Las muestras ambientales complejas, en partículas las torres de refrigeración, dieron en algunas ocasiones recuperaciones por cultivo muy bajas o incluso en algún caso nula para el sistema tradicional de filtración, mientras que el dispositivo integrado en Legiolab proporcionó una recuperación algo mayor de forma consistente, utilizando de forma combinada un prefiltro de 2,7 μm y un filtro de acetato de celulosa de 0,45 μm de diámetro de poro y 50mm de diámetro de disco. Esto sugiere que el proceso de elución se ha mejorado.

Para matriz de torres de refrigeración, se analizaron las muestras de agua contaminada naturalmente con tres niveles diferentes de contaminación (bajo, medio y alto) por muestra. Se ensayaron cinco réplicas por nivel y por método (el método de referencia o cultivo, RM, y el mé-



Figura 7. Equipo ensamblado como unidad de análisis (izquierda) y esquema de equipo instalado a pie de torre de refrigeración (abajo).

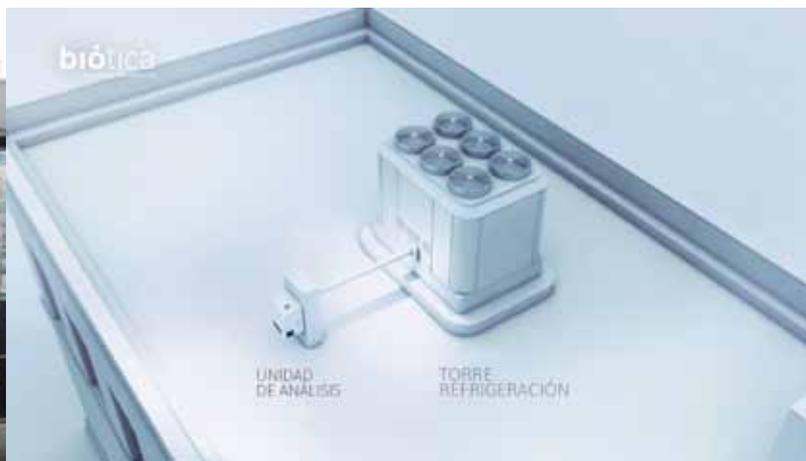




Figura 8. Presentación del equipo en la Feria de Chillventa.



Figura 9. Pruebas de validación de la versión básica del equipo automatizado. En paralelo se conducen sendos ensayos; un control negativo y una muestra positiva con un nivel conocido de *Legionella*.



Tabla 1. Comparativa con el método de cultivo (RM, método de referencia; TM, método test).

Nivel	Media Log ₁₀ RM	Media Log ₁₀ LL
Bajo	2,42	2,56
Medio	3,26	3,52
Alto	4,36	4,48

todo inmunomagnético o método test, TM), cubriendo el rango de interés para la verificación de la curva de calibración usando muestras naturalmente contaminadas (**Tabla 1**). Los resultados obtenidos en el estudio son comparables para ambos métodos en los niveles ensayados.

4. Conclusiones

El equipo biosensor presentado está basado en la captura inmunomagnética de las bacterias diana en la muestra, en un formato *all-in-one*, y es el núcleo de sistemas de detección temprana de *Legionella* en torres de refrigeración, integrado en la instalación de riesgo monitorizada, sin requerir intervención humana para su funcionamiento. Proporciona una correspondencia con el método de referencia y, en consecuencia, una información de fácil interpretación para actuar sobre la instalación y asegurar el cumplimiento de las especificaciones de mantenimiento y prevención. Es una herramienta que permitirá tomar decisiones oportunas para evitar que las instalaciones alcancen niveles infectivos y sostenidos de este patógeno en sus aguas, añadiendo el valor de la prevención en tiempo real y reduciendo la probabilidad de diseminación y contagio en la población.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen la cooperación de la compañía EWK y de la ingeniería Samesa.

Bibliografía

- [1] Bartram, J.; Chartier, Y.; Lee, J.V.; Pond, K.; Surman-Lee, S. (2007). *Legionella* and the prevention of legionellosis. World Health Organization, Geneva-Switzerland.
- [2] Berry, D.; Xi, C.; Raskin, L., (2006). Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Curr. Opin. Biotechnol.*, núm. 17, págs. 297-302
- [3] Borges, A.; Simões, M.; Martínez-Murcia, A.; Saavedra, M.J. (2012). Detection of *Legionella* spp. in natural and man-made water systems using standard guidelines. *J. Microbiol. Res.*, núm. 2(4), págs. 95-102.
- [4] Brenner, D.J.; Steigerwalt, A.G.; McDade, J.E. (1979). Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann. Intern. Med.*, núm. 90, págs. 656-658.
- [5] Friedman, H.; Yamamoto, Y.; Klein, T.W. (2002). *Legionella pneumophila* pathogenesis and immunity. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* núm. 13, págs. 273-279.
- [6] International Organization for Standardization (1998). ISO 11731:1998 Water quality-detection and enumeration of *Legionella*. Geneva-Switzerland
- [7] Rodríguez, G.; Bedrina, B.; Jiménez, M. (2012). Validation of the LegipidBioalarm *Legionella* Assay. *J. AOAC. Int.*, núm. 95, págs. 1.440-1.451.
- [8] Rodríguez, G.; Bedrina, B.; Jiménez, M. (2014). Method modification of the Legipid *Legionella* Fast Detection Test Kit. *J. AOAC. Int.*, núm. 97(5), págs. 1.403-1.409.
- [9] Samendra, P.S.; Masaaki, K.; Charles, P.G.; Ian, L.P. (2014). Rapid detection technologies for monitoring microorganisms in water. *Biosens J.* núm. 3, pág. 109.
- [10] Shelton, B.G.; Flanders, W.D.; Morris, G.K. (1994). Legionnaires' disease outbreaks and cooling towers with amplified *Legionella* concentrations. *Curr. Microbiol.*, núm. 28(6), págs. 359-363.
- [11] Shevchuk, O.; Jäger, J.; Steinert, M. (2011). Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope. *Frontiers in Microbiology*, vol. 2, artículo 74, págs. 1-12.
- [12] Stout, J. (2014). Update on disinfection methods of potable water in large buildings. Conferencia dictada durante el II Congreso del Grupo Europeo para el Estudio de las Infecciones por *Legionella*, Barcelona, 19 de septiembre de 2014.