



Comparación de dos métodos de análisis de *Legionella pneumophila* en agua: Legiolert frente a ISO 11731

Se realiza una comparación de dos métodos de detección de *Legionella pneumophila* con muestras reales de agua caliente sanitaria. De dichas muestras se recogen dos alícuotas. Una es analizada en el Laboratorio Municipal de Vitoria-Gasteiz por el método ISO11731. La otra alícuota es analizada prácticamente a la vez en el laboratorio de Amvisa por el método Legiolert. Además de muestras reales se introducen en el estudio algunas muestras de control de calidad (inoculadas). A la vista de los resultados se ven las ventajas e inconvenientes de cada método y se concluye que el método Legiolert presenta importantes ventajas comparándolo con la ISO 11731 en la detección de *Legionella pneumophila*, pues es más sensible, de más fácil manejo y menos laborioso. Es importante considerar de forma correcta los resultados (poner siempre un blanco para comparar y buscar no solo color marrón, sino también cualquier tipo de turbidez).

Palabras clave

Legionella, agua, métodos de análisis, Legiolert, ISO 11731.

COMPARISON OF TWO METHODS OF ANALYSIS OF *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* IN WATER: LEGIOLERT VS. ISO 11731

Two methods for the detection of Legionella pneumophila in naturally contaminated samples of domestic hot water were compared. Two aliquots were collected from each sample. One aliquot from each sample was analyzed in the Municipal Laboratory of Vitoria-Gasteiz using the ISO11731 method. The other aliquot was analyzed concurrently in the Amvisa laboratory by the Legiolert method. In addition to naturally contaminated samples, some quality control samples (inoculated) were introduced in the study. The results show the advantages and disadvantages of each method and conclude that the Legiolert method has important advantages compared to ISO 11731 in the detection of Legionella pneumophila, because it is more sensitive, easier to handle and less laborious. It is important to evaluate the results as described in the test protocol (always use a negative control for reading the results and look for not only brown color but also any turbidity).

Keywords

Legionella, water, analysis methods, Legiolert, ISO 11731.

Nuria López-Molina

directora técnica de Laboratorio de Microbiología en el Laboratorio Municipal de Vitoria-Gasteiz, del Departamento de Deporte y Salud del Ayuntamiento de Vitoria-Gasteiz

Laura Muro Molina

jefa de sección Microbiología del Área de Tratamiento y Control de Calidad de Aguas Municipales de Vitoria-Gasteiz (Amvisa)



1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO DEL ESTUDIO

Legionella es una bacteria de origen ambiental y causa una enfermedad denominada legionelosis de la que se distinguen dos formas clínicas. Por un lado, la 'Enfermedad del Legionario', con un periodo de incubación que varía entre 2 a 10 días, y que se caracteriza por neumonía con fiebre alta, pudiendo ser grave. Y, por otro lado, la otra forma clínica, menos grave, que se conoce como 'Fiebre de Pontiac', con un periodo de incubación de 1 a 3 días, que se manifiesta como un síndrome febril agudo y, en principio, sin riesgo para el paciente. La legionelosis es una enfermedad de declaración obligatoria desde 1997 en España.

La *Legionella* es capaz de sobrevivir en un amplio intervalo de condiciones fisicoquímicas, multiplicándose entre 20 °C y 45 °C, destruyéndose a 70 °C. Su temperatura óptima de crecimiento es 35-37 °C. Su nicho ecológico natural son las aguas superficiales, como lagos, ríos, estanques, formando parte de su flora bacteriana. Desde estos reservorios naturales la bacteria puede colonizar los sistemas de abastecimiento de las ciudades y, a través de la red de distribución de agua, se incorpora a los sistemas de agua fría de consumo (AFC), caliente sanitaria (ACS) u otros sistemas que requieren agua para su funcionamiento como las torres de refrigeración. Si existe en la instalación un mecanismo productor de aerosoles, la bacteria puede dispersarse al aire. Las gotas de agua que contienen la bacteria pueden permanecer suspendidas en el aire y penetrar por inhalación en el aparato respiratorio.

Las instalaciones que con mayor frecuencia se encuentran contaminadas con *Legionella* y han sido

identificadas como fuentes de infección son los sistemas de distribución de agua sanitaria, caliente y fría, y los equipos de enfriamiento de agua evaporativos, tales como las torres de refrigeración y los condensadores evaporativos, tanto en centros sanitarios como en hoteles u otro tipo de edificios (Real Decreto 865/2003).

El Real Decreto 865/2003 establece los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. Dentro de su ámbito de aplicación, figuran entre otros el agua caliente sanitaria con acumulador y circuito de retorno como instalaciones con mayor probabilidad de proliferación y dispersión. También, pero con menor probabilidad de proliferación y dispersión, aparecen las instalaciones interiores de agua fría para consumo humano, además de otros tipos de instalaciones.

Según la ISO 11731:2017 (Anexo A), hay más de 60 especies de *Legionella*. Y la especie *Legionella pneumophila* contiene al menos 15 serogrupos diferentes. Pero de entre todas esas variables, es el serogrupo 1 de *L. pneumophila* el causante del 70% al 90% de todos los casos de la enfermedad del legionario para los que se ha efectuado un aislamiento de la cepa bacteriana.

El Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), en su informe de vigilancia anual correspondiente al año 2018, en el que se recogieron datos de 30 países, publica que el serogrupo 1 de *L. pneumophila* sigue siendo el patógeno más comúnmente identificado, representando 909 de los 1.073 casos confirmados por cultivo (85%). No cita, ni hay dato, lo que se incrementaría esta proporción si se sumaran los otros serotipos de *L. pneumophila*. En el informe que engloba el periodo de 2009 a 2015,

en la misma casuística (casos confirmados por cultivo) muestra que el 95-99% de los casos se atribuyeron a *Legionella pneumophila*.

El Laboratorio Municipal de Vitoria-Gasteiz, como autoridad sanitaria local, realiza control y vigilancia de *Legionella spp* en distintas instalaciones del municipio. Dicho control comprende toma de muestras y análisis de *Legionella spp* según ISO 11731, estando ambos procesos acreditados por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) según la norma UNE-EN ISO 17025.

En el laboratorio de Amvisa no se realizan estudios de *Legionella spp*, al no ser obligatorios por legislación en agua de captación, ni en agua de consumo en la legislación vigente en el momento de este estudio. Uno de los problemas para implantar el análisis de *Legionella spp* es la complejidad de dicho análisis y la necesidad de personal cualificado siguiendo el método ISO 11731. Al conocer el método Legiolert, se decide comenzar a realizar la determinación de *Legionella pneumophila* por dicho método. El objetivo es tener un mapa de la presencia de esta bacteria en las captaciones utilizadas y saber si se detecta en el agua de consumo.

Antes de poner en marcha dicho método, ambos laboratorios se proponen colaborar para realizar un estudio de funcionamiento de ambos métodos en las mismas muestras, para comprobar la fiabilidad del método Legiolert.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MUESTRAS A ESTUDIAR

Se selecciona para el estudio muestras de agua caliente sanitaria, dentro del programa de toma de muestras de rutina desarrollado por el Labo-

ratorio Municipal de Vitoria-Gasteiz. Dichas muestras proceden de grifos de agua caliente y duchas de distintas instalaciones interiores de la ciudad.

2.2. RECOGIDA DE MUESTRAS

La recogida de muestras es realizada por el Inspector de aguas del Laboratorio Municipal de Vitoria-Gasteiz (**Figura 1**). Dicha toma de muestras está acreditada por ENAC. En cada uno de los puntos de muestreo recoge, además de las alícuotas necesarias para el análisis de rutina en el Laboratorio Municipal, una alícuota extra para el análisis por Legiolert en el laboratorio de Amvisa. Las muestras se van numerando secuencialmente en el Laboratorio Municipal y son ciegas para Amvisa, es decir, desconoce el nombre de la instalación, su ubicación, su histórico, etc. El Laboratorio Municipal es el que traza todos los datos del número secuencial asignado con la información de cada muestra.

Se añaden al estudio las muestras inoculadas para control de calidad preparadas por el Laboratorio Municipal y también algunas muestras inoculadas preparadas por el laboratorio de Amvisa.

FIGURA 1. Recogida de muestras en una instalación interior de Vitoria.



2.3. ANÁLISIS EN LABORATORIO AMVISA

Las muestras recibidas se dejan atemperar. Cada una de las muestras se homogeneiza, se añade 100 mL en un frasco estéril, se mide la dureza, se añade el reactivo de Idexx necesario para compensar dicha dureza, y se añade el reactivo Legiolert (**Figura 2**).

Tras homogenizar bien la muestra con los reactivos se vierte en un blister especial para Legiolert, que se sella y se lleva a incubar durante 7 días a $39\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$, controlando diariamente la humedad del incubador, de forma que no baje del 75%.

El resultado proporcionado por este método es NMP/100 mL de *Legionella pneumophila*. Los resultados se multiplican por 10 para pasarlos a NMP/1 L y poder comparar con el método ISO.

2.4. ANÁLISIS EN LABORATORIO MUNICIPAL VITORIA-GASTEIZ

Todas las muestras y algunos controles se analizan según ISO 11731:1998, procedimiento acreditado en el Laboratorio Municipal en el momento de este estudio (números marcados en las tablas con color verde claro). En los análisis llevados a cabo por la ISO 11731:1998 se hace una siembra directa (por si hubiera un recuento muy elevado de *Legionella spp*) y, posteriormente, la muestra se concentra por filtración (**Figura 3**).

Se filtra 1 L de agua seguida de un procedimiento de elución del filtro en diluyente estéril. Se realiza

FIGURA 2. Análisis de muestras en el laboratorio de Amvisa mediante Legiolert de Idexx.



FIGURA 3. Análisis en el Laboratorio Municipal de Vitoria-Gasteiz según el procedimiento de ISO 11731.





otra siembra de esta preparación. Aparte, hay 2 pretratamientos de la muestra desde el concentrado con el filtro: un tratamiento térmico a 50 °C (± 1 °C) durante 30 minutos (± 2), y un tratamiento ácido, diluyendo un volumen del concentrado con la solución ácida marcada en la ISO para obtener (pH 2,2) durante 5 minutos ($\pm 0,5$). En todos los casos descritos se inocularon placas de GVPC.

Sin embargo, algunos de los controles de calidad preparados se analizan según ISO 11731:2018 (números marcados en las tablas con verde oscuro), para el que el laboratorio se estaba preparando para su acreditación (acreditado desde 10/09/19). En estos casos, el protocolo es similar, adaptando los cambios, pero los medios de cultivo inoculados fueron BCYE y BCYE-AB y/o GVPC.

El resultado proporcionado por este método es ufc/L de *Legionella spp*, con posterior identificación por serología de *Legionella pneumophila* (Legionella látex test de OXOID).

3. RESULTADOS DEL ESTUDIO

3.1. MUESTRAS ANALIZADAS

En el periodo del estudio, que se desarrolló entre julio de 2018 y mayo de 2019, se analizaron 63 muestras en paralelo por las 2 técnicas en los 2 laboratorios. Tras extraer 3 muestras del estudio por distintos motivos (solo se analizaron por Amvisa o no se analizaron a la vez en los dos laboratorios), finalmente se incluyen en el estudio un total de 60 muestras.

De las 60 muestras, 43 (72%) eran muestras de rutina programadas por el Laboratorio Municipal de distintas instalaciones de la ciudad de Vitoria-Gasteiz. Así mismo, se prepararon y analizaron 17 muestras (28%) de

TABLA 1				
RESULTADOS NEGATIVOS EN AMBAS TÉCNICAS. Nota: ND = no detectado.				
Nº	Tipo	Información de la muestra	ISO 11731 (ufc/L)	Legiolert (NMP/L)
4	CCI-2	Sobranter Inter A. Microorganismo diana: <i>Leg. bozemanii</i>	6.000	< 10
6	ACS	Centro deportivo CD1 (Retorno ACS 1)	ND < 25	< 10
7	ACS	Centro deportivo CD1 (Retorno ACS 2)	ND < 25	< 10
10	ACS	Centro deportivo CD2 (ducha 2)	ND < 25	< 10
12	ACS	Centro Cívico CC1 (ducha piscina)	ND < 25	< 10
13	ACS	Centro Cívico CC1 (ducha)	ND < 25	< 10
15	ACS	Hotel H1 (ducha 2)	ND < 100	< 10
18	CCI-4	Laboratorio (ducha 1). Sin inocular. Blanco de CCI-5, 6, 7 y 8)	ND < 20	< 10
21	CCI-7	Inoculada 4. Microorganismo diana: <i>Leg. anisa</i>	60.000	< 10
25	CCI-9	Laboratorio (grifo 1). Sin inocular. Blanco de CCI-9, 10 y 11.	ND < 20	< 10
28	CCI-12	Inoculada 8. Microorganismo diana: <i>Legionella bozemanii</i>	140.000	< 10
29	ACS	Residencia ancianos RA1 (ducha 1)	ND < 25	< 10
30	ACS	Residencia ancianos RA1 (ducha 2)	ND < 25	< 10
31	ACS	Residencia ancianos RA2 (ducha 1)	ND < 25	< 10
32	ACS	Residencia ancianos RA2 (ducha 2)	ND < 25	< 10
33	ACS	Residencia ancianos RA3 (ducha 1)	ND < 25	< 10
34	ACS	Residencia ancianos RA3 (ducha 2)	ND < 25	< 10
35	ACS	Centro deportivo CD3 (ducha 1)	ND < 25	< 10
36	ACS	Centro deportivo CD3 (ducha 2)	ND < 25	< 10
37	ACS	Centro deportivo CD3 (ducha 3)	ND < 25	< 10
38	ACS	Centro deportivo CD3 (ducha 4)	ND < 25	< 10
40	ACS	Residencia ancianos RA4 (baño geriátrico 1)	ND < 25	<10
49	ACS	Residencia ancianos RA4 (baño geriátrico 2)	ND < 50	<10
53	ACS	Hotel H3- (ducha 1)	ND < 25	<10
54	ACS	Hotel H3- (ducha 1-bis)	ND < 25	<10
55	Torre	Hotel H3-agua purga torre refrigeración	ND < 100	<10

control, 2 blancos y el resto inoculadas artificialmente con *Legionella spp*, 11 en el Laboratorio Municipal y 4 en el de Amvisa. Las muestras de control fueron muestras ciegas para el laboratorio receptor y para los analistas.

3.2. RESULTADOS COINCIDENTES EN AMBAS TÉCNICAS PARA *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

Prácticamente en un 50% de las muestras analizadas se encontraron resultados coincidentes por ambas técnicas.

Como se aprecia en la **Tabla 1**, un total de 26 (43%) de las 60 muestras analizadas han dado resultados negativos para *Legionella pneumophila* en ambas técnicas (se marcan en negrita aquellos resultados en que se detecta por ISO 11731 *Legionella spp* distinta a *Legionella pneumophila* y, por tanto, son negativos a *Legionella pneumophila*).

Señalar que el límite de detección es inferior con el método Legiolert que con el método ISO. Límite de detección Amvisa con Legiolert: < 10 NMP/L. El menor límite de detección del Laboratorio Municipal por ISO 11731 fue < 25 ufc/L, pero varió en algunas muestras, según tipo de muestra y volúmenes sembrados según circunstancias (< 100 ufc/L en algunos casos).

Según la **Tabla 2**, un total de 14 (23%) de las 60 muestras han resultado positivas para *Legionella pneumophila* en ambas técnicas. Las muestras 2, 19, 20, 22, 42 y 44 presentan un recuento significativamente más alto con el método ISO.

3.3. RESULTADOS DISCORDANTES ENTRE ISO 11731 Y LEGIOLERT

Los resultados discordantes apreciados son:

- Hay 8 muestras en las que no se ha detectado *Legionella pneumophila* con método ISO que, sin embargo, han resultado positivas con Legiolert (**Tabla 3**). Dos de las muestras fueron inoculadas con *Legionella pneumophila* en el laboratorio de Amvisa, por lo que el método ISO ha fallado en la detección. En cuanto a 5 muestras, se demuestra que para algunas de ellas el método Legiolert puede ser más sensible que el método ISO. Además, en la muestra 48, por la abundancia de flora natural que presenta, no se pueden dar resultados con el método

TABLA 2

RESULTADOS POSITIVOS EN AMBAS TÉCNICAS.

Nº	Tipo	Información de la muestra	ISO 11731 (ufc/L)	Legiolert (NMP/L)
2	CCI-1	Inoculada 1. Microorganismo diana: <i>Leg. pneumophila sr 1</i>	3.400	142
9	ACS	Centro deportivo CD2 (ducha 1)	410	361
19	CCI-5	Inoculada 2. Microorganismo diana: <i>Leg. pneumophila sr 1</i>	64.000	307,1
20	CCI-6	Inoculada 3. Microorganismo diana: <i>Leg. pneumophila sr 1</i>	340.000	2.272,6
22	CCI-8	Inoculada 5. Microorganismo diana: <i>Leg. pneumophila sr 1</i>	4.100	596
23	ACS	Hotel H2 (ducha 1)	660	989
24	ACS	Hotel H2 (ducha 2)	730	406
26	CCI-10	Inoculada 6. Microorganismo diana: <i>Leg. pneumophila sr 1</i>	370.000	> 22.726
27	CCI-11	Inoculada 7. Microorganismo diana: <i>Leg. pneumophila sr 1</i>	630.000	> 22.726
42	ACS	Residencia ancianos RA4 (baño geriátrico 3)	234.000	854
43	CCI-13	Inoculada 9. Microorganismo diana <i>Leg. pneumophila sr 1</i> (Proced 7,8,9)	7.700	7.350
44	CCI-14	Inoculada 10. Microorganismo diana <i>Leg. pneumophila sr 1</i> (Proced 1)	62.000	17.178
60	CCI-15	Inoculada 11 (Amvisa). Microorganismo diana: <i>Leg. pneumophila sr 1</i>	2.000	1.308,5
62	CCI-17	Inoculada 13 (Amvisa). Microorganismo diana: <i>Leg. pneumophila sr 1</i>	130	139

TABLA 3

RESULTADOS NEGATIVOS CON ISO Y POSITIVOS CON LEGIOLERT. Nota: ND = no detectado.

Nº	Tipo	Información de la muestra	ISO 11731 (ufc/L)	Legiolert (NMP/L)
8	ACS	Centro deportivo CD1 (ducha)	ND < 25	66
11	ACS	Centro deportivo CD2 (ducha 3)	ND < 25	474
14	ACS	Hotel H1 (ducha 1)	ND < 100	921
16	ACS	Centro Cívico CC2 (ducha 1)	ND < 100	4.489
17	ACS	Centro Cívico CC2 (ducha 2)	ND < 100	6.890
48	ACS	Residencia ancianos RA4 (baño geriátrico 1 izqda.)	No aceptable	22.766
61	CCI-16	Inoculada 12 (Amvisa). Microorganismo diana: <i>Leg. pneumophila sr 1</i>	ND < 25	447,5
63	CCI-18	Inoculada 14 (Amvisa). Microorganismo diana: <i>Leg. pneumophila sr 1</i>	ND < 25	80



ISO, mientras que con el método Legiolert se consigue un recuento muy alto de *Legionella pneumophila*.

- 12 muestras resultaron inicialmente negativas con Legiolert y se detecta *L. pneumophila* sr 2-14 con método ISO 11731 (Tabla 4). Proceden de 3 instalaciones distintas y se han detectado por ISO 11731 y confirmado por látex siempre el mismo grupo de serotipo: *Legionella pneumophila* serotipo 2-14. En las muestras 46 y 52 se ha detectado algo de turbidez en pocillos grandes de Legiolert, que se ha considerado como negativo.

Los resultados discordantes entre los 2 métodos en este grupo de muestras han hecho sospechar que podía haber algún problema. En principio se pensaba que se podía tratar de una *Legionella pneumophila* de serotipo extraño que no se detecta por Legiolert, por lo que se contactó con Idexx y se les suministró la cepa asilada por ISO 11731 para que hicieran las pruebas pertinentes.

Idexx realizó el estudio en diciembre de 2019. El Laboratorio Municipal envió al laboratorio de Idexx en Newmarket (Reino Unido) 2 aislamientos que se subcultivaron en placas de BCYE y agar sangre y se incubaron a 37 °C. Las placas se examinaron en busca de crecimiento colonial después de 48 horas. Los aislados se utilizaron para realizar una prueba de aglutinación de látex (Oxoid) y se reintrodujeron en el reactivo Idexx Legiolert en diluciones de

TABLA 4				
RESULTADOS POSITIVOS CON ISO Y FALSOS NEGATIVOS INICIALES CON LEGIOLERT (POR NO CONSIDERAR POCILLOS CON TURBIDEZ).				
Nº	Tipo	Información de la muestra	ISO 11731 (ufc/L)	Legiolert (NMP/L)
39	ACS	Residencia ancianos RA4 (ducha habitación A)	830	<10
41	ACS	Residencia ancianos RA4 (baño geriátrico 2)	62.000	<10
45	ACS	Residencia ancianos RA4 (retorno módulo 1)	54.000	<10
46	ACS	Residencia ancianos RA4 (acumulador)	4.700	<10
47	ACS	Residencia ancianos RA4 (baño geriátrico 1 ducha.)	2.900	<10
50	ACS	Residencia ancianos RA4 (ducha habitación A)	Detectado < 220	<10
51	ACS	Residencia ancianos RA4 (ducha habitación B)	1.400	<10
52	ACS	Residencia ancianos RA4 (ducha habitación C)	8.140	<10
56	ACS	Residencia ancianos RA5 (baño geriátrico)	300	<10
57	ACS	Residencia ancianos RA5 (ducha 1)	300	<10
58	ACS	Residencia ancianos RA6 (baño 1)	230	<10
59	ACS	Residencia ancianos RA6 (baño 2)	300	<10

1×10^1 a 1×10^8 ufc/100 mL. El análisis se realizó siguiendo el protocolo de agua potable de 100 mL de Legiolert.

Ambos aislamientos produjeron pozos grandes no pigmentados pero turbios en Legiolert después de 7 días de incubación, lo que es indicativo de *L. pneumophila*. Esta reacción se observó claramente en pozos grandes. Sin embargo, los pozos pequeños eran menos visibles y podían causar dificultades durante la interpretación. Es estadísticamente improbable que estén presentes

pozos pequeños positivos en ausencia de pozos grandes positivos.

En un ensayo posterior realizado en ambos laboratorios de Vitoria-Gasteiz se comprobó que comparando los pozos con turbidez con una muestra blanco (izquierda), sí se puede apreciar la diferencia (Figura 4). La turbidez sin pigmentación debe considerarse positiva.

Por tanto, las muestras que no se consideraron positivas se deberían haber contado como tal con un entrenamiento adecuado. Si así se hubiera considerado, no hubiera habido ningún resultado positivo según ISO y negativo según Legiolert. Dicho de otra manera, el método Legiolert identificó todas las muestras positivas que se identificó con el método ISO, además de 8 muestras positivas que el método ISO no reveló.

» Durante la comparativa se comprobó que el método Legiolert, al igual que método ISO, identificó todas las muestras positivas analizadas, además de 8 muestras positivas más que el método ISO no detectó

FIGURA 4. Comparación de turbidez en las muestras: blanco (muestra de la izquierda); positivo con turbidez sin pigmentación (muestra del centro); y positivo con pigmentación (muestra de la derecha).



4. DISCUSIÓN

Antes de las conclusiones finales, el estudio comparativo entra en fase discusión:

- Se analizan un total de 63 muestras. Si se descartan las muestras que no se han podido comparar por los dos métodos, por distintas razones, se tienen resultados comparados de 60 muestras. Se decide asimismo descartar del estudio las 12 muestras en las que no se ha detectado positivos en Legiolert, por considerar positivos solo los pocillos de color marrón y no considerar los pocillos con turbidez. Tras estas consideraciones, el resultado se muestra en la **Tabla 5**.

- En cuanto a las muestras positivas por ambas técnicas:

- En recuentos bajos los resultados ISO y Legiolert son comparables. Podría ser interesante comprobar recuentos menores que los ensayados, para comprobar si el límite de detección real de Legiolert es mejor que el de ISO.

- En recuentos altos en ISO (5 de los 6 siendo muestras inoculadas), los recuentos en Legiolert son menores, pero se detectan con ambos métodos, que es lo importante y porque estos resultados conllevarían siempre al menos una segunda muestra según la norma UNE 10003. El resultado en ISO puede estar sobredimensionado en recuentos altos por la metodología analítica (resultados obtenidos de siembras directas, muestras con muchos tipos de colonias y flora en las placas con selección de

colonias confirmadas sobreestimadas, variación en volúmenes de siembra y factores de concentración, etc.).

- En cuanto a las 8 muestras que son positivas por Legiolert, fueron informadas como 'No detectadas' (y un caso 'No aceptable') por ISO 11731, perdiendo información importante en la vigilancia de ciertas instalaciones, y más si se tiene en cuenta el potencial para reducir los riesgos para los ciudadanos, dado que el 75% de estas muestras fueron recogidas en instalaciones en uso en Vitoria en aquel momento.

5. CONCLUSIONES

El estudio concluye que:

- El método Legiolert no solo es comparable sino que es más sensible que el método ISO, aunque es importante considerar de forma correcta los resultados (poner siempre un blanco para comparar y buscar no solo color marrón sino también cualquier tipo de turbidez).

- El método Legiolert tiene un límite de detección bajo (<10 NMP/L). Con el conocimiento adecuado, es de muy fácil interpretación. En ciertas muestras, por ejemplo muestras con flora abundante, puede darse el caso que no se detecte *Legionella pneumophila* con el método ISO o no se puedan dar resultados, mien-

TABLA 5

RESUMEN DE RESULTADOS.		
Muestras	Número	Porcentaje
Muestras totales	48	100,00%
Negativas en ambas	26	54,17%
Positivas en ambas	14	29,17%
Positivas solo Legiolert	8	16,67%
Positivas solo ISO	0	0,00%



» El método ISO 11731 es el marcado por la legislación actual en España para la determinación de *Legionella spp* a través del RD 865/2003. No obstante, la nueva Directiva del Parlamento Europeo relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano permite el uso de métodos rápidos de cultivos como Legiolert, que facilitan el trabajo de los laboratorios

tras que sí se detectan con el método Legiolert. Resulta más barato que la ISO 11731:2017 que usa dos líneas de placas distintas frente a una que se utilizaba en la ISO 11731:1998.

- La ISO 11731 tiene una duración mínima de ejecución de 10-12 días, y requiere gran cualificación de analistas de laboratorio y tiempo de dedicación. Esto implica que se generen cuellos de botella en algunos momentos de urgencia, que por cierto, cada vez suceden más a menudo. Actualmente es la técnica de referencia según la legislación aplicable, se debe seguir usando, pero para apoyar, agilizar y obtener resultados en menor tiempo con menor coste laboral, se considera el sistema Legiolert muy interesante vistas las grandes ventajas que se obtienen. Es una plataforma fácil de usar que reduce notablemente el flujo de trabajo del laboratorio, el tiempo de los resultados y la cualificación de los analistas.

- El estudio de todos los resultados positivos para *Legionella spp* por ISO 11731 obtenidos en 2018 en el Laboratorio Municipal (parte perteneciente a este trabajo y parte ajena a él) indica que fueron positivos para *Legionella pneumophila* un 94% de los aislamientos (35% *L. pneumophila* sr1 + 59% *L. pneumophila* sr 2-14) y un 6% para otros serotipos de *Legionella spp*. Estos resultados son concordantes a los de otros años obtenidos por el Laboratorio Municipal y con los resultados epidemiológicos actuales sobre la incidencia de *Legionella pneumophila*.

- El método ISO 11731 es el marcado por la legislación actual en España (RD 865/2003) para la determinación de *Legionella spp*. En el último momento de la edición de este artículo, ha sido aprobada la nueva Directiva del Parlamento Europeo relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. Esta nueva directiva establece la norma ISO 11731 para el cumplimiento del valor establecido en aguas destinadas al consumo humano (< 1.000 ufc/L). Sin embargo, para el control de la verificación y complementar los métodos de cultivo, la Directiva permite usar métodos rápidos de cultivo, métodos no basados en el cultivo y métodos moleculares. Por tanto, queda abierta la posibilidad del uso de Legiolert, pues se considera que podrá facilitar la vigilancia, dar velocidad al proceso y disminuir gastos. Junto con la próxima modificación del RD 865/2003, se espera y desea que se abran las posibilidades a permitir el uso nuevos métodos analíticos, entre ellos el sistema Legiolert, que facilitan considerablemente los análisis y el control en las instalaciones con riesgo de proliferación de *Legionella*. Y en concreto que fuera sobre *Legionella pneumophila*.

- Por tanto, y para concluir, el método Legiolert obtiene resultados comparables, con mejor límite de detección, presentando grandes ventajas respecto al método ISO 11731. Las más importantes son el número de muestras que se pueden procesar en menor tiempo, y con analistas

que requieren menos cualificación y muchísimas menos horas de trabajo laboral. Además, el tiempo en que se pueden dar resultados se acorta de 10-12 días a 7 días. Y se reduce el gasto. Resumiendo y simplificando, Legiolert permite hacer bien, y más con menos.

6. AGRADECIMIENTOS

Agradecer a Idexx, y muy especialmente a Paloma Pascual, por el suministro de material necesario para este estudio, las orientaciones, la abundante documentación enviada y por su cercanía y disponibilidad para todo lo necesario. Agradecer igualmente al laboratorio de Idexx de Newmarket (Reino Unido) el estudio extra llevado a cabo con los aislamientos dudosos y todo lo aprendido con sus aportaciones.

Y un especial agradecimiento a las analistas, tanto del Laboratorio Municipal como de Amvisa (Nuria Cifuentes), sin las cuales no habría sido posible este estudio.

Bibliografía

- [1] 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.
- [2] Directiva (UE) 2020/2184 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2020, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.
- [3] UNE-EN ISO 11731:2017 (ISO 11731:2017). Calidad del agua. Recuento de *Legionella*
- [4] Sánchez Guillén, L.A. (2016). Compendio de *Legionella* y legionelosis. Artes gráficas, ISBN: 978-84-608-2940-9.
- [5] AWT (2019). *Legionella 2019: a position statement and guidance document*. Association of Water Technologies.
- [6] European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. Annual Epidemiological Report for 2018. 