

Nuevo alcance de un test rápido para determinación de *Legionella sp* viable en aguas

Begoña Bedrina Broch jefa de Laboratorio de Biótica

Juan Carlos Montero Rubio jefe de Sección de Microbiología Clínica, Unidad Analítica del Instituto de Ciencias de la Salud de Talavera de la Reina, Red de Laboratorios de Salud Pública de Castilla La Mancha

Carlos Ferrer Torregrosa gerente de Biótica

Guillermo García Miralles técnico de Laboratorio de Biótica

Marisa Jiménez Bono ingeniera de Desarrollo de Biótica

Mireia Lázaro Pastor técnica de Laboratorio de Biótica

Miguel Martínez Osuna técnico de Laboratorio de Biótica

Inmaculada Solís Andrés jefa de Laboratorio de Microbiología de Iproma, Laboratorio y Asesoría

Guillermo Rodríguez Albalat director de I+D de Biótica

Legipid *Legionella* Fast Detection es una prueba basada en la separación y la purificación mediante captura inmuno-magnética y enzimo-inmunoensayo (CEIA) de *Legionella sp* viable en agua. Utiliza anticuerpos inmovilizados en microesferas magnéticas, que reconocen antígenos en la superficie celular. Se aplican a concentrados de muestras. Un laboratorio con ambas técnicas acreditadas por ENAC, analizó la reactividad del test con 71 cepas de *Legionella sp*, positivas por el método de cultivo (ISO 11731). El test detectó 64 de las 71 cepas. Además, demostró con 100 ensayos de muestras naturales de agua la cuantificación por lectura de absorbancia. Finalmente, el laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencias de la Salud de Castilla-La Mancha comparó la técnica de PCR cuantitativa, q-PCR, y el test Legipid, y el nivel de actuación/alerta derivado de los resultados.

Palabras clave

Legionella sp, detección rápida, determinación cuantitativa.

New scope of a quick test for the determination of viable *Legionella sp* in water

Legipid *Legionella* Fast Detection is a test based on the separation and purification by immuno-magnetic capture and enzyme-immunoassay (CEIA) of viable *Legionella sp* in water. It uses antibodies immobilized onto magnetic micro-spheres, recognizing antigens available on the cell's surface. It is added in the concentrates of the samples. A laboratory with both techniques accredited by ENAC, assayed the reactivity of the test with 71 strains of *Legionella sp*, positives by the method of cultivation (ISO11731). The test detected 64 of 71 strains. Moreover, the quantification by absorbance reading was shown with 100 assays of natural samples. Finally, the Laboratory of Microbiology of the Health Sciences Institut of Castilla-La Mancha compared the technique of quantitative PCR, q-PCR, and the Legipid test, and the level of action/alert derived from those results.

Keywords

Legionella sp, fast detection, quantitative determination.



1. Introducción

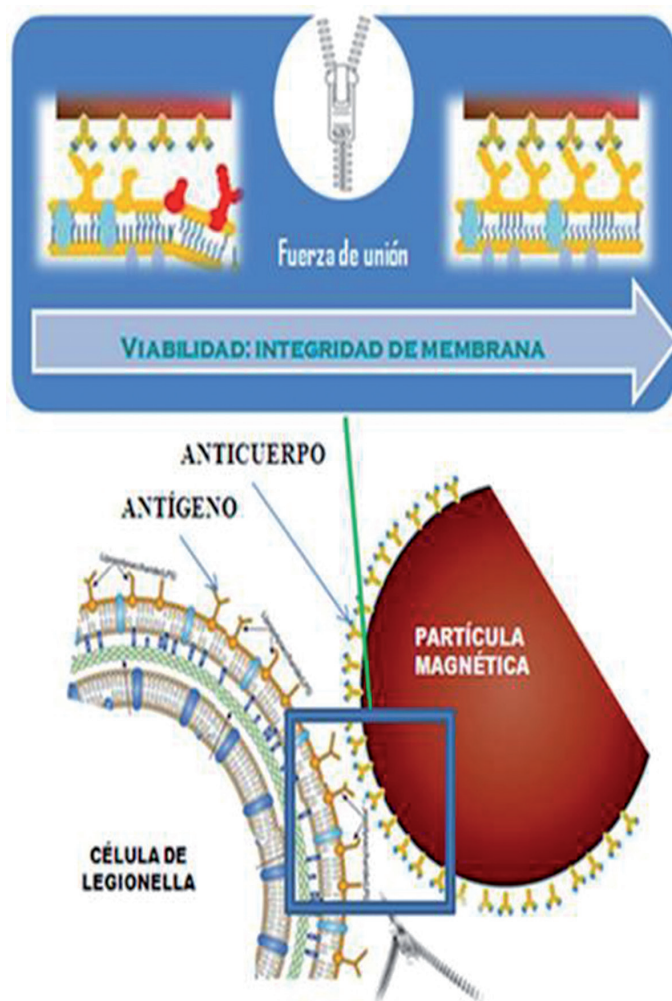
Legipid *Legionella* Fast Detection es un test sencillo y rápido para la detección de *Legionella sp* en agua potable, natural e industrial. El test combina inmunocaptura magnética y enzimoimmunoensayo (CEIA) con reacción colorimétrica enzimática para un ensayo rápido de 1 h, después de preconcentrar una muestra. El usuario potencial de este kit es personal capacitado que realiza ensayos para detectar *Legionella sp* en laboratorios e instalaciones de riesgo (hoteles, hospitales, spa, piscinas, jacuzzis, torres de refrigeración, etc). El test Legipid *Legionella* Fast Detection podría contribuir a una prevención eficiente de la legionelosis.

Esta interacción partícula (anticuerpo)-célula (antígeno) depende de la densidad de estos puntos de anclaje, elevada en la célula intacta (**Figura 1**). Si el recambio de antígenos en superficie se ve reducido (células dañadas, células muertas), la densidad de sitios de unión baja, debilitando la interacción porque la fuerza por punto de unión es menor. Esto hace posible una captura preferente de células intactas, seleccionando adecuadamente la composición de los tampones de trabajo para romper las interacciones débiles.

Los métodos bacteriológicos convencionales requieren al menos de 7 a 15 días. Además, la recuperación

de células viables en muestras ambientales por aislamiento en cultivo es usualmente muy pobre por los requerimientos específicos de crecimiento, interferencia de otras bacterias, y la pérdida y el daño de *Legionella* en la preparación de la muestra para eliminar o reducir el número de otras bacterias. Se ha reportado que *Legionella sp* forma células viables pero no cultivables que pueden causar fracaso del cultivo de *Legionella sp* viable a partir de algunos ambientes. Además, los biofilms colonizan las instalaciones de riesgo y pueden contribuir a la rápida fluctuación de las células libres, dificultando la definición de períodos mínimos de muestreo para mantener la instalación de riesgo bajo control.

Figura 1. Interacción célula-partícula.



2. Protocolo

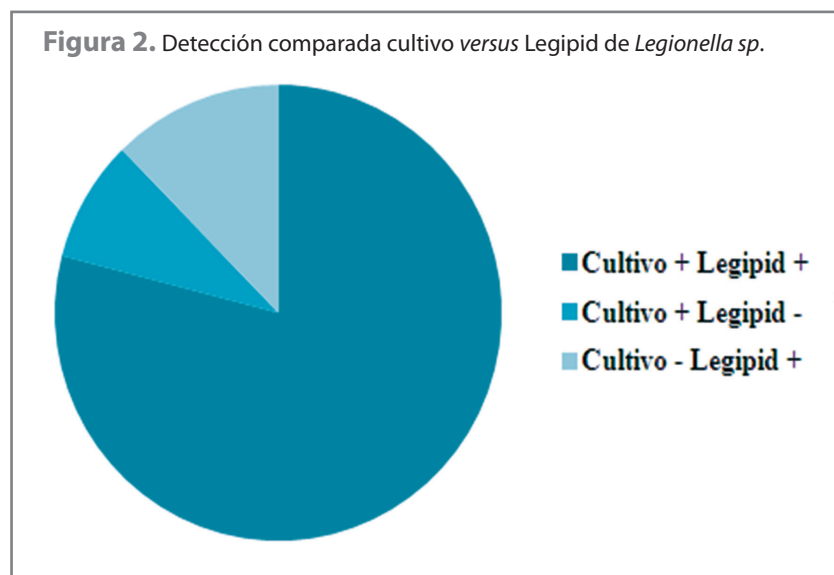
2.1. Preparación general

Consiste en ensamblar el aparato de filtración para realizar la concentración de la muestra de agua original, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De los reactivos del test Legipid guardados en nevera (4 °C), el analista prevé la cantidad que va a necesitar, y dichas cantidades se dejan atemperar fuera de nevera durante un tiempo de 30 minutos, antes de usar.

2.2. Metodología

Un total de 71 cepas de *L. sp* confirmadas positivas por cultivo, se analizaron con el test Legipid en un rango de concentración de entre 10² y 10⁶ UFC/L. Todas las cepas fueron también confirmadas por PCR.

Todas las muestras se analizaron siguiendo el protocolo del test Legipid *Legionella* Fast Detection. Por cada tanda de ensayos se incorporó siempre un control negativo. Tras el análisis a temperatura ambiente, los resultados fueron leídos y registra-



dos como positivos o negativos (detectado/no detectado).

Se obtuvieron muestras de agua de 1 l inoculadas con las cepas ensayadas de *Legionella sp.*, y se analizaron por cultivo siguiendo el método descrito en la norma ISO 11731. Cada muestra se filtró a través de un filtro de membrana de 0,4 μm de diámetro de poro, sobre el cual se deposita un prefiltrado desechable de fibra de vidrio de 2,7 μm de diámetro de poro. Cada filtro de membrana, tras

la filtración, se depositó en un frasco con 10 ml de un eluyente (reactivo L0 del test Legipid o bien solución Ringer 1/40). El material retenido en el filtro fue eluido mediante agitación de vórtex durante 2 minutos. Cada concentrado representa lo que se denomina una muestra preparada.

Cada muestra preparada se sonicó para desagregar los aglomerados de células. El volumen del concentrado, o muestra preparada, se dividió en dos porciones: 9 ml por el test Le-

gipid y del mililitro restante se obtuvieron porciones de 0,1 ml (tres réplicas) para analizar por el cultivo, siguiendo en todo momento la norma ISO 11731. Tras la incubación, se estimó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) de *Legionella*, multiplicando por el factor de dilución si es el caso.

Para el estudio de la cuantificación de *Legionella* en aguas, se hicieron 10 réplicas por muestra, para un total de 10 muestras naturales (potables y torres de refrigeración). Por consiguiente, se dispuso de 100 lecturas de absorbancia para construir una curva que relacionase absorbancias y concentración equivalente por cultivo.

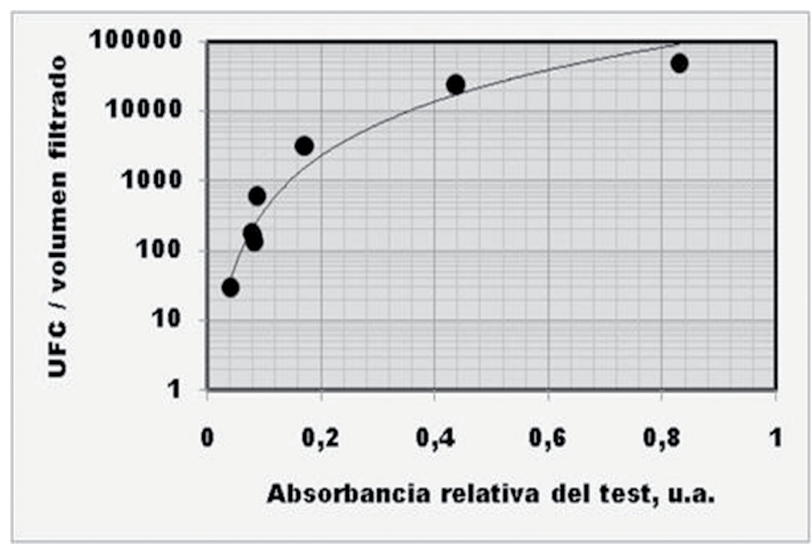
Cada muestra es identificada con un código (P = potable, TR = torre de refrigeración). Se tabulan las absorbancias puntuales de cada una de las 10 réplicas ensayadas por muestra. Se han incorporado los valores medios y las desviaciones de cada muestra, así como el promedio y desviación típica de los blancos (controles negativos). Las concentraciones se encuentran expresadas en escala decimal y logarítmica.

Tabla 1. Estudio de la cuantificación de *Legionella* en función de la absorbancia final del ensayo realizado con el test Legipid.

Código muestra	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Medida 4	Medida 5	Medida 6	Medida 7	Medida 8
P2-L	0,112	0,127	0,112	0,119	0,125	0,122	0,106	0,126
P1-L	0,118	0,107	0,099	0,125	0,113	0,116	0,165	0,178
P3-L	0,222	0,134	0,169	0,180	0,203	0,135	0,190	0,220
P4-L	0,122	0,130	0,221	0,225	0,230	0,115	0,166	0,112
P5-L	0,155	0,152	0,149	0,111	0,136	0,196	0,185	0,188
TR-L	0,219	0,175	0,157	0,202	0,153	0,179	0,175	0,193
P12-V	0,246	0,231	0,244	0,223	0,260	0,228	0,231	0,220
P1-V	0,971	0,831	0,806	0,807	0,975	0,781	0,697	0,813
P13-V	0,525	0,514	0,500	0,498	0,534	0,516	0,525	0,520
P2-V	0,877	1,009	0,972	0,804	0,912	0,953	1,063	0,953



Figura 3. Relación consistente entre la concentración de *Legionella* determinada por cultivo y la absorbancia obtenida en el ensayo de la misma muestra por Legipid.



Para el estudio comparativo con q-PCR, se recogieron cuatro muestras naturales de aguas, 2 l de cada una, y se prepararon tres muestras artificialmente contaminadas, inoculadas con un material de referencia (Bioréferente, Eurofins, Francia). De cada muestra inoculada, se realizó una dilución decimal. Por tanto se ensayaron un total de 10 muestras. Para cada muestra natural, el volumen de 2 l se dividió

en dos porciones de 1 l cada una, que se filtraron por separado. De cada muestra natural se obtienen por tanto dos concentrados. Uno de ellos se utiliza para el ensayo de Legipid y otro para el ensayo de q-PCR. Una de las muestras ensayadas se presentó más sucia de y fue la que más costó filtrar. Dicha muestra requirió el uso de cuatro filtros, y dejó tanto en el prefiltro como en el filtro abundantes restos de

un sedimento arcilloso. En PCR no se pasó el concentrado por ningún tipo de pretratamiento (la muestra no fue diluida) antes de la extracción de los ácidos nucleicos para eliminar posibles interferentes.

3. Resultados

Los resultados obtenidos en el estudio de las cepas ambientales de *Legionella sp* (Figura 2) mostraron una fiabilidad superior al 90% para detectar esas cepas. También hay que señalar que otras 10 cepas ambientales de *Legionella sp* que fueron negativas por cultivo, por lo que no se incluyeron en el estudio, fueron positivas por el test Legipid. Estos casos indican que probablemente no todas las cepas ambientales pueden ser igualmente recuperadas por el cultivo.

Los resultados obtenidos en el estudio de la cuantificación de *Legionella* a partir de la lectura de absorbancia (Tabla 1) mostraron la viabilidad de dicha cuantificación, y la robustez de la curva que relaciona la concentración de la bacteria con la absorbancia final del ensayo. Los resultados obtenidos con estos 100

Medida 9	Medida 10	Medida Blanco	Media ABS	Desviación ABS	CV %	Media ABS relativa	Concentración UFC/test	Concentración Log UFC/test
0,111	0,129	0,079	0,119	0,008	6,8	0,040	30	1,477
0,102	0,178	0,049	0,130	0,031	24,0	0,081	135	2,130
0,146	0,207	0,099	0,181	0,034	18,6	0,082	135	2,130
0,129	0,237	0,089	0,169	0,053	31,7	0,080	162	2,210
0,203	0,149	0,085	0,162	0,029	18,1	0,077	180	2,255
0,188	0,199	0,098	0,184	0,020	11,1	0,086	615	2,789
0,240	0,216	0,065	0,234	0,014	5,8	0,17	3.200	3,505
0,873	0,979	0,102	0,853	0,095	11,1	0,75	12.800	4,107
0,527	0,529	0,083	0,519	0,012	2,3	0,44	24.400	4,387
0,941	1,079	0,127	0,956	0,082	8,6	0,83	49.400	4,694
Media blanco		0,09						
Desv. blanco		0,02						

Figura 4. Equipos para lectura óptica: A) lector multiplaca con conexión PC; B) colorímetro portátil (0,6 kg).

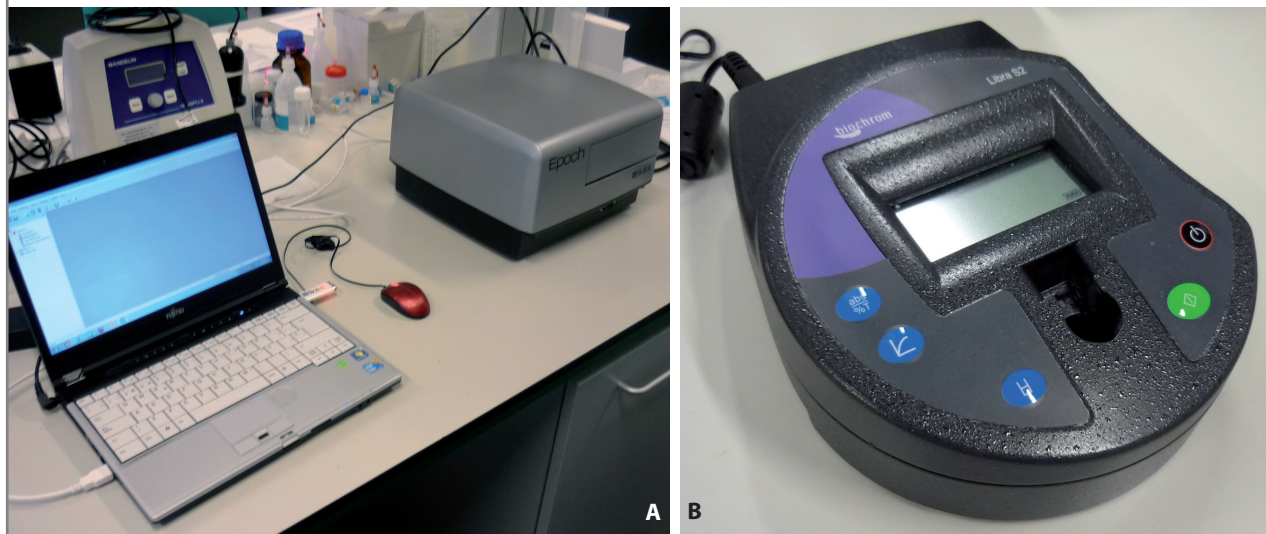


Tabla 2. Comparación de los niveles de acción y alerta utilizando PCR cuantitativa (q-PCR) y el test Legipid.

Diana: <i>Legionella</i>			Legipid no. (%)			
			Acción ≥ 10 ⁴ UFC l ⁻¹	Alerta ≥ 10 ³ UFC l ⁻¹	Satisfactorio < 10 ³ UFC l ⁻¹	Total
q-PCR no. (%)	Acción	≥ 5 x 10 ⁴ UG l ⁻¹	4 (40)			4 (40)
	Alerta	≥ 5 x 10 ³ UG l ⁻¹		2 (10)		2 (20)
	Satisfactorio	< 5 x 10 ³ UG l ⁻¹		1 (10)	3 (30)	4 (40)
Total			4 (40)	3 (30)	3 (30)	10 (100)

ensayos permitieron construir una curva que relaciona la concentración de *Legionella* (determinada por cultivo) con la absorbancia obtenida por el test Legipid (Figura 3).

La curva fue sistemáticamente comprobada durante varios meses, mostrando una gran robustez. Probablemente porque el test Legipid presenta una etapa de separación y purificación del microorganismos diana y sucesivos lavados de las bacterias capturadas antes de su detección. De este modo, el medio en que se desarrolla la reacción colorimétrica, al final del ensayo, es siempre el mismo, y equivalente entre medidas distintas. Esto minimiza o elimina el efecto ma-

triz de la muestra ambiental original sobre la medición de la absorbancia.

Las posibles desviaciones instrumentales han sido también evaluadas, encontrando equivalencia entre lecturas realizadas a distintas longitudes de onda, en el rango de 420-440 nm (Figura 4).

La comparativa entre q-PCR y Legipid se presenta en la Tabla 2, que incorpora la vinculación del valor obtenido con una posible acción de mantenimiento.

En 9 de las 10 muestras ensayadas en esta comparación, los resultados obtenidos hubiesen conducido al mismo nivel de actuación. Mientras que el test Legipid detectó *Legionella*

en las 10 muestras, el test de PCR no la detectó en una de ellas: la muestra sucia que fue costosa de filtrar. En esa muestra, ese resultado podría estar relacionado con la dificultad de su filtración y la presencia de interferentes de la reacción de PCR, ocasionando falsos negativos. El test Legipid detectó la célula viable de *Legionella*, con un coste por ensayo significativamente menor que la q-PCR, y en una hora, mientras que el resultado de q-PCR se obtuvo de un día para otro.

4. Conclusiones

El estudio con cepas ambientales de *Legionella sp* mostró que Legipid *Legionella method* detectó 64 positivos



de 71 cepas confirmadas positivas por cultivo. Probablemente, la serología de la familia *Legionellaceae*, en particular los antígenos comunes bien conocidos de esta familia de bacterias, está en el fundamento que explica los resultados.

Frente a la q-PCR, los resultados obtenidos mostraron una concordancia elevada como técnicas de *screening*, excepto en el caso de una muestra particularmente difícil de filtrar, que la q-PCR dio como negativa y Legipid dio como positiva. Los resultados se obtienen mediante el test Legipid en 1 h, habilitando la posibilidad de una actuación rápida y oportuna. La técnica de q-PCR obtiene el resultado de un día para otro y se mostró más sensible al efecto matriz en el caso comentado.

El test incorpora una etapa de separación y purificación inmunomagnética, de forma que la reacción de lectura está libre de efecto matriz, y tiene lugar siempre en las mismas condiciones y entorno. En consecuencia, ofrece una lectura óptica

Los resultados obtenidos en el estudio de las cepas ambientales de *Legionella sp* mostraron una fiabilidad superior al 90%

libre de desviaciones químicas. También se ha reportado la posibilidad de utilizar una amplia gama de equipos de lectura óptica: espectrofotómetros, lectores de microplacas y colorímetros portables de bajo coste.

El test Legipid proporciona así soluciones ajustadas a las posibilidades económicas del usuario final.

5. Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a Fernando Cebrián Gómez y a la Unidad Analítica del Instituto de Ciencias de la Salud de Talavera de la Reina, Red de Laboratorios de Salud Pública de Castilla-La Mancha, por su labor y su apoyo.

Bibliografía

[1] Bedrina *et al.* (2013). Fast immunosensing

technique to detect *Legionella pneumophila* in different natural and anthropogenic environments: comparative and collaborative trials. BMC Microbiology, núm. 13, pág. 88.

[2] Feldsine P.; Abeyta, C.; Andrews, W.H. (2002). AOAC Int. Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. J. AOAC Int., núm. 85, págs. 1.187-1.200.

[3] Helbig, J.H.; Kurtz, J.B.; Pastoris, M.C.; Pelaz, C.; Luck, P.C. (1997). Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. J. Clin. Microbiol., núm. 35, págs. 2.841-2.845.

[4] International Organization for Standardization (1998). ISO 11731:1998 Water quality detection and enumeration of *Legionella*. Geneva, Switzerland.

[5] Findlay, J.W.A.; Smith, W.C.; Leec, J.W.; Nordblom, G.D.; Dasa, I.; DeSilvae, B.S.; Khanf, M.N.; Bowsberg, R.R. (2000). Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. J. of Pharm. and Biomedical Analysis, vol. 21(6), págs. 1.249-1.273.

[6] Rodríguez, G.; Bedrina, B.; Jiménez, M. (2012). Validation of the Legipid Bioalarm *Legionella* Assay. J. AOAC Int., núm. 95, págs. 1.440-1.451.

[7] Barwick, V.J. (2003). Preparation of Calibration Curves. A Guide to Best Practice. Valid Analytical Measurement Programme. LGC. National Measurement System Chemical and Biological Metrology Website.

PARCITANK, S.A.

SOLUCIONES INTEGRALES DE IMPLANTACIÓN DE PLANTAS DE PROCESO EN METALMECÁNICA

PLANTAS DE PROCESO DE AGUA

DISEÑAMOS, FABRICAMOS E INSTALAMOS COMPLETAMENTE SU PLANTA DE PROCESO DE AGUA, REFRESCOS Y ZUMOS



PLANTAS DE DEPURACION Y PROCESO DE AGUAS RESIDUALES

DISEÑAMOS, FABRICAMOS E INSTALAMOS COMPLETAMENTE SU PLANTA DE PROCESO DE AGUA, REFRESCOS Y ZUMOS

