



Validación de un método de aislamiento para Legionella pneumophila por medio de técnicas de concentración

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Trabajo de grado
Bogotá D.C., abril 2022



Validación de un método de aislamiento para Legionella pneumophila por medio de técnicas de concentración

Cristian Sebastián Cufiño Castiblanco

María Alejandra Lara Sanabria

Asesor externo

Marcela Gómez Garzón, M.Sc. en Microbiología

Asesor interno

Mónica Alejandra Rodríguez Aristizábal, M.Sc. en Ciencias Ambientales

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá D.C., abril 2022

Tabla de contenido

RESUMEN

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo general.....	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
4. JUSTIFICACIÓN	15
5. ANTECEDENTES	17
6. MARCO TEÓRICO	21
7. DISEÑO METODOLÓGICO	34
7.1. Tipo de investigación.....	34
7.2. Nivel, alcance o enfoque de la investigación.....	34
7.3. Población objeto de estudio.....	35
7.4. Muestra.....	35
7.5. Definición de las variables.....	35
7.6. Procedimientos, técnicas y herramientas para la investigación.....	36
7.7. Validación de los ensayos microbiológicos.....	39
7.8. Confirmación en lámina mediante la coloración de Gimenez.....	41
8. RESULTADOS	43
9. DISCUSIÓN	49
10. CONCLUSIONES	57
11. PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO	58
12. ANEXOS	59

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agradecimientos

En primer lugar, deseamos agradecer al Todopoderoso por otorgarnos sabiduría y resignación; A quienes supieron guiar nuestros pasos hacia el conocimiento de la ciencia y nos han impulsado a superarnos cada día. Con estas palabras, pretendemos reconocer a todos y a cada uno de los docentes involucrados en este trabajo, en especial a la Doctora Vilma Martínez quien nos dio los primeros preámbulos para el inicio de nuestra investigación; también, a quien fue nuestro asesor interno, el profesor Walter Andrés Rincón por ser nuestro gran apoyo en los momentos de angustia y brindarnos su orientación. De igual manera damos las gracias a la docente Mónica Rodríguez por continuar el proceso de asesoría en una circunstancia desesperada.

No hubiera sido posible culminar esta investigación sin la valiosa ayuda y apreciación de la Doctora Marcela Gómez, quien, al ser nuestra asesora externa, nos impartió su amplia experiencia y conocimiento para el correcto desarrollo del trabajo, igualmente queremos destacar su continuo apoyo absoluto en todo momento, por ser una persona muy especial y nuestro mayor soporte, gracias y mil gracias. Así mismo, a la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, por acogernos y permitirnos desarrollar todo el trabajo dentro sus instalaciones y proporcionar todos los implementos necesarios para finalizar satisfactoriamente el trabajo.

De igual manera agradecemos a nuestra alma mater, la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, docentes y demás planta administrativa por dejarnos ser parte de su academia y formarnos como profesionales y personas integrales. Por último, y no menos importante, a nuestros padres y hermanos por su constante apoyo durante toda la realización del proyecto, por sus consejos y motivarnos a ser cada día mejores.

“Me caí, pero me levanté de la primera, como se levantan las flores en primavera”.

René Pérez

Lista de tablas

	Pág.
Tabla N°1. Principales guías y normas sobre el control y prevención de <i>Legionella spp.</i>	27
Tabla N°2. Caracterización de las variables estadísticas.....	36
Tabla N°3. Resultados de crecimiento de los controles negativos.....	43
Tabla N°4. Desarrollo en el agar BCYE en los 4 tratamientos de la membrana realizados.....	44
Tabla N° 5. Crecimiento de <i>L. pneumophila subsp. fraseri</i> efectuando el método de referencia y el método alternativo durante las 12 réplicas.....	46
Tabla N° 6. Estimación del límite de detección del método por filtración de membrana en el Celltrazone.....	47
Tabla N° 7. Valores estadísticos representativos de la validación para recuperación de <i>Legionella pneumophila</i>	47
Tabla N°8. Control de calidad del agar BCYE suplementado de la casa comercial Neogen para microorganismos.....	50
Tabla N°9. Recuentos de <i>Legionella pneumophila sg 1</i> con membrana con tamaños de poro 0,45 y 0,2 micras.....	51

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Filtración y precipitación mediante el uso de membrana dual del equipo Huro path S	33
Figura 2. Crecimiento de <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i> en el medio de cultivo BCYE y colonia característica del microorganismo.....	43
Figura 3. Coloración de Gimenez en <i>Legionella pneumophila</i> en 100x.....	48

Lista de abreviaturas

IFA	Inmunofluorescencia directa
DFA	Tinción directa con anticuerpos fluorescentes
BAL	Lavado broncoalveolar
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (Agar Extracto de levadura de carbón tamponado)
GVPC	Glycine Vancomycin Polymyxin Cycloheximide Medium (Medio Glicina Vancomicina Polimixina Cicloheximida)
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
NAAT	Nucleic Acid Amplification Tests (Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos)
UAT	Urinary Antigen Tests (Prueba de Antígeno Urinario)
ISO	International Organization for Standardization (Organización Internacional de Normalización)
NTP	Notas Técnicas de Prevención
ASTM	American Society for Testing and Materials (Sociedad Americana para Pruebas y Materiales)
AEAS	Asociación Española de Abastecimientos de Agua y Saneamiento
UFC	Unidades formadoras de colonia



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Validación de un método de aislamiento para *Legionella pneumophila* por medio de técnicas de concentración

Resumen

El aislamiento y detección de *Legionella pneumophila* en agua potable puede ser un proceso difícil, debido a que algunas de las técnicas existentes no concentran ni recuperan la cantidad estandarizada por entes internacionales, así mismo, es un microorganismo exigente, y lo tanto, requiere de medios especiales para su crecimiento. El objetivo del estudio fue validar un método de concentración por medio de la implementación del equipo Celltrazone para mejorar la recuperación de la bacteria en agua potable. Para lograr una mejor concentración de *L. pneumophila* y que pudiera reflejarse en el medio de cultivo, se ensayaron varias técnicas de tratamiento para el filtro obtenido por el equipo como el vortex, sonicado y agitación, sin embargo, el no aplicar ningún procedimiento y realizar una siembra directa desde la membrana obtuvo los mejores resultados. El análisis estadístico demostró que el método aplicado puede concentrar hasta 1×10^2 (100 UFC), se alcanzó una sensibilidad del 100% y una especificidad del 80% y un valor aceptable de exactitud (87,5%). El método de filtración de membrana utilizando el equipo Celltrazone permitió aumentar la concentración del *L. pneumophila* en agua potable, cumpliendo con los intervalos normalizados por ISO y la OMS, por lo tanto, el método es apto para su aplicación permitiendo obtener resultados confiables.

Palabras Clave: *Legionella pneumophila*, medio BCYE, Celltrazone, dilución, filtración por membrana, validación, límite de detección.

Abstract

The isolation and detection of *Legionella pneumophila* in drinking water can be a difficult process, because some of the existing techniques do not concentrate or recover the amount standardized by international entities, likewise, it is a demanding microorganism, and therefore, requires special media for its growth. The objective of the study was to validate a concentration method through the implementation of Celltrazone equipment to improve the recovery of the bacterium in drinking water. To achieve a better concentration of *L. pneumophila* that could be reflected in the culture medium, several treatment techniques were tested for the filter obtained by the equipment, such as vortexing, sonication and agitation; however, not applying any procedure and performing a direct seeding from the membrane obtained the best results. Statistical analysis showed that the applied method can concentrate up to 1×10^2 (100 CFU), a sensitivity of 100% and a specificity of 80% and an acceptable accuracy value (87.5%) were achieved. The membrane filtration method using the Celltrazone equipment allowed to increase the concentration of *L. pneumophila* in drinking water, complying with the intervals standardized by ISO and WHO, therefore, the method is suitable for its application allowing to obtain reliable results.

Key words: *Legionella pneumophila*, BCYE medium, Celltrazone, dilution, membrane filtration, validation, detection limit.

1. Planteamiento del problema

Legionella pneumophila es un microorganismo que coloniza la red de tuberías de agua potable de diversas edificaciones antiguas, como lo son muchos de los hospitales colombianos. Las malas condiciones de la infraestructura de los sistemas de calderas posibilita al patógeno su establecimiento y constante proliferación en un amplio rango de temperaturas, permitiendo que llegue a infectar pacientes susceptibles al desarrollo de neumonía nosocomial por el contacto con agua contaminada(1).

En Colombia, existe la Guía Técnica Colombiana GTC 257:2015(2), que expone los criterios y las acciones que se deben llevar a cabo para controlar y prevenir la aparición y multiplicación del microorganismo en instalaciones y equipos de diferentes sistemas de agua potable. Sin embargo, la Guía no presenta una metodología para el aislamiento y detección del patógeno en agua potable, por lo tanto, no hay un protocolo establecido para buscar la presencia *L. pneumophila* en la red de abastecimiento de agua en edificaciones, como las instituciones hospitalarias.

Actualmente en el País no se tienen notificaciones de brotes causados por este microorganismo, a pesar de que en el Registro Individual de Prestación de Servicios (RIPS) existan datos sobre la incidencia de las dos enfermedades causadas por el patógeno, que están registrados como A481: Enfermedad de los Legionarios y A482: Enfermedad de los legionarios no neumónica (Fiebre de Pontiac), lo que sugiere que la enfermedad puede estar presente, pero no es detectada.

Aunque, el cultivo es el principal método de diagnóstico, *L. pneumophila* es un patógeno exigente nutricionalmente lo que implica el uso de medios especiales y aplicar técnicas que permitan concentrar las muestras de agua para lograr su recuperación, factores que se suman al problema.

Pregunta problema

¿Cómo mejorar el aislamiento de *Legionella pneumophila* por medio de técnicas de filtración celular en agua potable?

2. Hipótesis

Mediante una técnica de filtración por membrana utilizando el equipo Celltrazone, se puede generar mayor recuperación de *Legionella pneumophila*, optimizando su cultivo e identificación en muestras de agua potable.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Validar un método que mejore el aislamiento de *Legionella pneumophila* en agua, por medio del equipo Celltrazone.

3.2 Objetivos específicos

- Valorar la recuperación de *Legionella pneumophila* aplicando pre-tratamientos para las membranas de filtración celular.
- Analizar la viabilidad del ensayo microbiológico para el aislamiento de *L. pneumophila* mediante el uso de parámetros estadísticos.
- Identificar a *Legionella pneumophila* mediante coloración Giménez sobre concentrados de agua potable.

Actividades para dar cumplimiento a cada objetivo

- Generar diluciones de cepas control.
- Aplicar las técnicas de concentración, siembra por el método de Kass e interpretación de crecimiento de las colonias para cada una de las diluciones.
- Implementar coloración de Gimenez para determinar la presencia de *Legionella pneumophila* en el agua potable.

4. Justificación

Legionella pneumophila es un microorganismo que vive y se desarrolla en medios acuáticos naturales, es resistente a la cloración en sistemas de distribución de agua potable lo que permite su crecimiento en ambientes artificiales, incluyendo sistemas de tuberías y saneamiento, afectando la estructura de equipos como calentadores, duchas, grifos, entre otros(3). *L. pneumophila* es un patógeno oportunista e intracelular, capaz de replicarse en protozoarios, monocitos y macrófagos alveolares humanos, que le proporcionan un hábitat para su supervivencia. Además, tiene la capacidad de formar biofilm, un micro-ecosistema que se adhiere a la superficie de los materiales de la plomería gracias a la cantidad de sustratos presentes que le proporciona, como el plástico, en este nicho se pueden encontrar presentes amebas y otras especies bacterianas con las que generan relaciones simbióticas que permiten la supervivencia del microorganismo(4).

La infección por *L. pneumophila* se adquiere por la inhalación de aerosoles provenientes de la red sanitaria contaminada. El hombre puede desarrollar dos presentaciones clínicas; la enfermedad del Legionario, un tipo de neumonía grave, con un período de incubación de 2 a 14 días, presentando sintomatología de tos, mialgias, fiebre, escalofríos, dificultad para respirar, dolor de cabeza y diarrea, y la segunda es la denominada fiebre de Pontiac, que se refiere a una enfermedad febril aguda, benigna, con un cuadro clínico similar a la gripe autolimitada o en algunos casos se presenta como asintomática(5).

Existen factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad del Legionario, como lo son la enfermedad pulmonar crónica, el tabaquismo o ser adulto mayor a 50 años. Además, al ser un patógeno oportunista, también, está implicado en infecciones en pacientes con inmunosupresión en tratamiento con glucocorticoides, neoplasias hematológicas o quimioterapia(6). Estos pacientes suelen adquirir más fácilmente el microorganismo por una disfunción del sistema inmune y no responder adecuadamente a la infección, donde la clínica más habitual es la neumonía. En los pacientes que permanecen mayor tiempo en el hospital, la bacteria puede diseminarse fuera del pulmón y causar endocarditis, pericarditis, esplenomegalia, entre otros(6)(7).

En Colombia, aunque son pocos los estudios de la presencia de *L. pneumophila*, existen datos de incidencia de la enfermedad del Legionario y la Fiebre de Pontiac, en estudio retrospectivo realizado entre 2009 y 2013(8). Los datos de la enfermedad en el país, se obtuvieron a partir del sistema de registros de salud personal (Registro Individual de Prestación de Servicios, RIPS) utilizando los códigos ICD-10 A48.1 (enfermedad del legionario) y A48.2 (fiebre de Pontiac). Durante este período se registraron 206 casos, presentando mayor incidencia la enfermedad del legionario no neumónica (0.39 casos), siendo las mujeres las principales afectadas con 8 casos. Estos registros están basados en información secundaria y no en datos microbiológicos.

En Colombia, hoy en día hay deficiencias para el aislamiento del microorganismo, debido a que en la normativa de control y prevención del microorganismo no se contempla ni recomienda ningún procedimiento para tal fin en red de agua en edificaciones(2). Por lo tanto, el aporte de esta investigación es realizar una propuesta de un protocolo con diferentes técnicas que permitan concentrar mayor cantidad del microorganismo y menos pérdida por el uso de reactivos agresivos y obtención de un número considerable de colonias en el aislamiento que permita obtener información verídica sobre la situación sanitaria.

Con este trabajo se pretende implementar la automatización de la filtración de membrana utilizando un equipo que realiza dicha acción, debido a que en la actualidad los procesos microbiológicos se están implementando con nuevas tecnologías; De igual modo, hay que resaltar que para el aislamiento de *Legionella spp* se utilizan métodos de filtración y precipitación manuales, lo que hace que este tipo de técnicas tengan desventajas como un mayor tiempo invertido en el procesamiento y a la probabilidad de cometer mayores errores humanos.

Para determinar la incidencia de *L. pneumophila* se deben realizar muestreos no solamente en los lugares de mayor impacto en la salud humana, como lo son los hospitales, sino en otras edificaciones con diferente razón socioeconómica, como complejos turísticos, edificios, viviendas, balnearios, cárceles, entre otros, ya que pueden encontrarse personas con factores predisponentes y otras susceptibilidades que permitan el desarrollo de la enfermedad del Legionario. Por consiguiente, para

investigaciones futuras sobre la presencia del microorganismo en estos establecimientos, se podría implementar el método que se propone en el trabajo en curso, ya que sería un complemento de los datos hallados y, por otro lado, un aviso para que las autoridades de salud inicien un control más estricto sobre la presencia del patógeno en los sistemas de agua.

5. Antecedentes

Primeros años con Legionella pneumophila

En julio de 1976 en Filadelfia, Pensilvania, se reportó un brote explosivo de neumonía de origen común causado por la bacteria *Legionella spp.*, que afectó principalmente a los asistentes de la convención de la Legión Americana en el hotel Bellevue Stratford. Se reportaron 221 casos, de los cuales 34 fueron mortales debido a la exposición del microorganismo, donde su propagación parecía ser a través del aire(9). Una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA) se utilizó para detectar anticuerpos en los pacientes del brote de Filadelfia y fue fundamental para determinar la causa de la enfermedad.

En los Estados Unidos entre 1976 y al final de 1978 hubo aproximadamente 10 brotes confirmados con unos 500 casos, Durante el mismo período 21 casos de la enfermedad del legionario ocurrió en Canadá. De estos, 18 serológicamente casos confirmados ocurrieron en Ontario. Todos los 18 eran adultos; una mujer murió(10). Entre 1979 y 1988 las investigaciones de laboratorio respaldaron el diagnóstico de neumonía por *Legionella spp* en 108 pacientes en el sur de Australia durante los últimos 10 años. *Legionella pneumophila* fue responsable de 91 infecciones(11).

En el estudio de Morris y col. en 1979 se aisló al microorganismo en el agua de una fuente de enfriamiento y un arroyo, en Indiana, Estados Unidos, que causó un brote en dicha ciudad(12). Fliermans y col. en el año 1979 describieron una técnica para aislar a *Legionella pneumophila* en hábitats acuáticos no asociados a epidemia y detectaron diversos serogrupos, por medio de microscopía de epifluorescencia(13). Adicionalmente, Shands y col. en 1985 tras manipular y concentrar 30 veces el microorganismo en sistemas de agua de un hospital, observaron un aumento de casos repentinos de legionelosis y concluyeron que el agua potable es una fuente epidémica de contaminación, especialmente cuando se encuentra en las redes de suministro(14).

Glavin y col.(15) en 1979 por medio del uso de tejido de biopsia de pulmón de pacientes con neumonía grave y el uso de la microscopía electrónica de transmisión

estableció la presencia intracelular del patógeno en los macrófagos alveolares humanos, dentro de fagolisosomas, libres en el citoplasma y rara vez en las estructuras que se asemejaban a un retículo endoplásmico rugoso dilatado.

El estudio de Tilson y col. realizado en 1980, se describió que el patógeno vive y se desarrolla en medio acuático, pero no era un microorganismo de vida libre, ya que generaba asociación con la cianobacteria *Fischerella sp*(16), en ese mismo año Rowbotham y col. identificó la capacidad de *L. pneumophila* de asociarse con amebas de vida libre, *Acanthamoeba spp* y *Naegleria spp*, que le proveen las condiciones ambientales y nutricionales ideales para su desarrollo. Además, se observó el cambio morfológico que sufre dentro de la ameba, el cual corresponde a la limitación de la movilidad(17).

Identificación inicial de *Legionella pneumophila*

Legionella fue cultivada por primera vez en el año 1977 usando un agar Mueller-Hinton suplementado con hemoglobina e IsoVitaleX, y se determinó que el aminoácido L-cisteína era esencial para su crecimiento. Esto llevó al desarrollo del agar Feeley-Gorman que mejoró la recuperación de la bacteria de tejidos(18).

Después de pasado el brote de la enfermedad del legionario en la Convención de la Legión Americana en Filadelfia, fue desarrollado un método de identificación para la enfermedad del Legionario por medio del descubrimiento de un antígeno de la bacteria hallada en la orina y esputo de pacientes con la enfermedad mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas - ELISA de tipo sándwich, el estudio fue llevado a cabo primero por Tilton(19) y poco después por Berdal y col.(20) ambos en 1979. En estos dos estudios se evaluó un grupo pequeño de pacientes y se recomendó como prueba rápida para diagnosticar la patología en muestras clínicas que se obtienen fácilmente. El antígeno detectado es un componente de la porción de lipopolisacárido de la pared celular de *Legionella spp* y es termoestable en 1981(21).

Los antígenos, generalmente, se detectan en la orina a los pocos días del inicio de la enfermedad y pueden permanecer así durante varias semanas después del inicio de la terapia antimicrobiana adecuada. Además, en el estudio de Kohler y col. en

1984(22) se demuestra que el antígeno se excreta pasados 3 días después de la aparición de los síntomas y puede persistir durante más de 300 días. Así mismo, la investigación indicó que este se detectó en el 88% de los pacientes evaluados durante los días 1 a 3, el 80% durante los días 4 a 7, el 89% evaluado durante los días 8 a 14 y el 100% evaluado después del día 14.

Para identificar el ciclo infeccioso, se realizó la observación mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido y microscopía fluorescente después de marcar varios componentes bacterianos y de células huésped. En 1983 Horwitz(23) realizó experimentos que describieron el ciclo de *L. pneumophila* en las células fagocíticas humanas. El estudio determinó que las bacterias ingresan a las células enrollando la fagocitosis y una vez fagocitadas, residen dentro de un fagosoma único que no se fusiona con los lisosomas al bajar el pH.

Con la llegada de la biología molecular y su implementación en las investigaciones científicas, en 1988, se realizó el primer ensayo para detectar el ADN de *L. pneumophila*, realizando una sonda ribosómica radiomarcada específica para todas las cepas de *Legionella spp* de la empresa Gen Probe(24).

Además, en 1989 se detectó el primer gen asociado a la virulencia del patógeno y fue designado como macrophage infectivity potentiator (*mip*) que codifica una proteína de 24 kDa de la superficie (Mip) donde su acción sigue siendo desconocida(25). El primer informe de la PCR se publicó en 1989, cuando se usó por primera vez como herramienta de detección del microorganismo en el agua. Investigadores de la Universidad de Stanford combinaron esta técnica junto con el Southern blot donde se halló el material genético, demostrando su uso para detectar los reservorios de *L. pneumophila*(26).

Sin embargo, en 1992 se conoció que el gen *mip* es necesario para la infección eficaz en conejillos de indias, células fagocíticas de mamíferos y protozoos, y se mostró involucrado en la patogenia de huéspedes tanto en mamíferos como protozoarios(27). Así, el primer método utilizado para identificar el microorganismo en muestra de tejido pulmonar de biopsia y secreción respiratoria fue el examen microscópico con tinción directa con anticuerpos fluorescentes (DFA) en 2002(5).

Keserue y col. en el año 2012 presentaron un método de detección rápida para *Legionella pneumophila* en agua recogida de grifo mediante filtración, separación inmunomagnética, tinción fluorescente doble y citometría de flujo(28). Durante el procedimiento se enfatiza en la utilización de un método de filtración por membrana que resalta la norma UNE-EN-ISO 11731 de España, el cual fue relevante para lograr un aislamiento adecuado del patógeno en las muestras de agua utilizadas. También se muestra la importancia a tener en cuenta de la presencia de células viables, pero no cultivables - VBNC, las cuales no son factibles para su desarrollo en cultivo.

6. Marco teórico

6.1. Microbiología de *Legionella pneumophila*

6.1.1 Generalidades

Actualmente el género *Legionella* incluye 64 especies, 257 especies sin clasificar, 6 especies ambientales identificadas, donde *L. pneumophila* posee 15 serogrupos y 29 subespecies(29), está a su vez es la especie comúnmente más aislada. *L. pneumophila* es una bacteria en forma de bacilo, aerobia, no esporulada, que mide entre 0,3 a 0,9 μm de ancho y 1,5 a 20 μm de longitud, es una bacteria heterotrófica, quimioorganotrofa y móvil en su forma transmisible, con uno o dos flagelos polares rectos curvos(30), Se propagan a través de partículas de agua en aerosol convirtiéndose en uno de los patógenos responsables de neumonía adquirida en la comunidad y nosocomial(31).

Aunque *Legionella* es considerada una bacteria Gram negativa, por presentar un alto contenido de fosfolípidos, como la fosfatidilcolina, es débil su coloración con Gram, por lo que es necesario utilizar otras técnicas como la inmunofluorescencia. Además, en la pared bacteriana contiene grandes cantidades de ácidos grasos de cadena ramificada y ubiquinonas y coenzima Q(31).

Para su crecimiento óptimo tiene un rango de temperatura de 25 a 45 °C, pero clínicamente se desarrolla en temperaturas de 36 ± 1 °C con 5% de CO₂. Se ha observado el crecimiento en cultivo puro a 15 °C, pero, generalmente, se aceptan temperaturas de ≥ 25 °C para su crecimiento en ambientes de agua dulce. Sin embargo, es inactiva a temperatura por debajo de 20 °C y no puede sobrevivir en agua con temperaturas superiores a 60 °C. Además, puede sobrevivir un rango de pH de 5.0 a 8.5(32).

Bioquímicamente, es un microorganismo “oxidasa variable”, catalasa positiva débil, licua la gelatina, y las reacciones de reducción de nitrato y ureasa son negativas. La mayoría produce β –lactamasas y un pigmento marrón que se incrementa con la

adición de tirosina al medio de cultivo, no oxida ni fermenta carbohidratos y requieren L-cisteína, HCL y sales de hierro para su crecimiento(31).

6.1.2 Patogenicidad

Presenta diferentes factores de virulencia como flagelos, pili, lipopolisacárido y Sistemas de Secreción tipo II (T2SS) y tipo IV (T4SS)(26). Adicionalmente, es capaz de formar biofilm por medio de Proteína Similar al Colágeno de *Legionella* (Lcl) y está compuesta por polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN(4). La matriz extracelular del biofilm puede ser monoespecie o multiespecie, se encuentran involucrados protozoos como *Hartmannella vermiformis* y *Acanthamoebae castellanii*. Así mismo, es capaz de crecer sobre restos celulares de amebas muertas y adherirse a protozoos y formar biofilms en ausencia de superficies abióticas(4). Stewart y col. demostraron que *Legionella pneumophila* es capaz de crecer y sobrevivir en un biofilm formado por *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium sp* o *Pseudomonas fluorescens* (33).

Las infecciones en humanos causadas por el género *Legionella* son producidas, generalmente, por la especie *pneumophila*. En el estudio realizado por Yu y col. se evidenció que el 91,5% de los aislamientos realizados correspondían a *L. pneumophila*, seguida por *L. longbeachae* (3,9%) y *L. bozemanii* (2,4%), se encontró la presencia de otras especies como *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. feeleeii*, *L. wadsworthii* y *L. anisa* con 2,2% en conjunto(34).

La enfermedad generada es conocida como Legionelosis, tiene dos presentaciones, la enfermedad del legionario o fiebre de Pontiac(35). Es una enfermedad de gran incidencia mundial que afecta a gran parte de la población, sin embargo, algunos factores intervienen en la severidad de la enfermedad como el grado de contaminación del reservorio acuático, la susceptibilidad del huésped y la intensidad de la exposición(36). La infección se adquiere por inhalación, aspiración o microaspiración de aerosoles. Las gotitas que transportan el patógeno pueden originarse al rociar agua o al gorgotear el aire a través del agua contaminada. La inmunodepresión, las enfermedades crónicas y la vejez son factores predisponentes para el desarrollo de la enfermedad.

6.1.3 Técnicas diagnósticas en muestras clínicas

L. pneumophila al no ser capaz de fermentar carbohidratos habituales, utiliza los aminoácidos como cisteína, arginina, isoleucina, leucina, treonina, valina y metionina y otros compuestos orgánicos como el almidón, como su principal fuente de carbono y energía para su crecimiento extracelular e intracelular, debido a esto, los cultivos tradicionales resultan inapropiados, por lo que se necesita utilizar medios especiales para su detección. A pesar de ello, la siembra en agar continúa siendo el método “Gold standard” para el aislamiento y detección del microorganismo(26).

Para realizar la siembra, se aceptan muestras específicas que incluyen aquellas del tracto respiratorio inferior, como esputo, líquido pleural, aspirado bronquial y líquido de lavado alveolar bronquial (BAL) o en algunos casos tejido pulmonar o biopsia. La sensibilidad de detección del cultivo es del 10% a 80% y la recuperación depende de la muestra, experiencia y capacidad del personal que realice el cultivo(26).

El medio de cultivo más utilizado para el aislamiento de *L. pneumophila* es conocido como BCYE, agar carbón tamponado y extracto de levadura enriquecido con α -cetoglutarato con y sin agentes selectivos añadidos que contiene los elementos requeridos por la bacteria, como hierro y cisteína(5), existe presentación de BCYE sin antibióticos (BCYG) y BCYE con antibióticos (PAV). Otros medios de cultivo como BMPA (BCYE α suplementado con polimixina, cefamandol y anisomicina), Legionella GVPC Agar, este medio tiene como base BCYE con adición de glicina, antibióticos como vancomicina, polimixina B y cicloheximida que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas, hongos y levaduras(26). El medio suplemento selectivo Wadowski-Yee Modificado (MWY) a diferencia de los anteriores, posee en su composición azul de bromotimol y púrpura de bromocresol, indicadores de pH que permiten identificar el crecimiento del microorganismo por el viraje de color.

Se han desarrollado diversas técnicas serológicas que detectan los anticuerpos IgM o IgG formados contra *Legionella pneumophila*, este tipo de diagnóstico fue fundamental en el primer brote causado en Filadelfia, Estados Unidos. Entre estos ensayos se encuentra la inmunofluorescencia indirecta (IFI), Inmunoensayo enzimático (EIA) y la microaglutinación que se utiliza ampliamente en Europa(37).

Además, se han empleado otras pruebas como la hemaglutinación indirecta para detección de los serogrupos 1 a 4, la contraelectroforesis y aglutinación de látex para diagnosticar la enfermedad del legionario(5). La IFI desarrollada por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y en los centros de investigación europeos difieren en la cepa empleada, *L. pneumophila* serogrupo 1, *Philadelphia* 1 y *L. pneumophila* serogrupo 1 *Pontiac* 1 respectivamente.

También, se han introducido pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el kit de Wampole Laboratories utiliza un grupo solubilizado e inactivado por calor de los serogrupos 1 a 6 de *L. pneumophila* y detecta IgG e IgA. El kit Zeus Scientific, Inc. emplea una suspensión sonicada inactivada con formalina de los serogrupos 1 a 6 de *L. pneumophila* y detecta IgG, IgM e IgA(5).

Otra técnica realizada es la prueba de antígeno urinario (UAT) que ha sido de gran importancia para un diagnóstico rápido de brotes. Permite un diagnóstico temprano y el inicio de una terapia oportuna. Actualmente se tiene varias presentaciones de la prueba, como EIA, ELISA, inmunocromatografía rápida (TIC) en tira o tarjeta, similar a una prueba de embarazo(5). “Los formatos TIC rápidos y EIA más utilizados son altamente específicos para *L. pneumophila* (entre 95 y 100%), con sensibilidades del 70 al 90%, dependiendo de si la orina se concentra artificialmente”(30). En su mayoría, las técnicas se basan en un anticuerpo de captura específico para *L. pneumophila* serogrupo 1. Para este tipo de prueba se debe tener en cuenta que el almacenamiento prolongado de la muestra de orina puede degradar el antígeno, produciendo resultados falsos positivos(5).

Las pruebas moleculares representan un gran potencial para detectar diferentes serogrupos de *L. pneumophila*, pero al ser técnicas muy costosas, requiere de más recursos por parte de los laboratorios para adquirir esta tecnología. Los ensayos NAAT o amplificación de ácidos nucleicos “incluyen alta sensibilidad y especificidad, tiempo de respuesta rápido y uso generalizado”(5), además, se han validado para ser parte del diagnóstico clínico del patógeno mencionado. Entre los test tipo NAAT se destacan la PCR convencional, qPCR simple o múltiple, amplificación isotérmica, entre otros. Dichas pruebas permiten detectar una limitada cantidad de genes para la detección de que incluyen las subunidades 5S y 16S del ARN, el gen de la proteína

inhibidora de macrófagos *mip* y varias dianas cromosómicas alternativas, como *dotA*, *gyrB*, *dnaJ*, *wzm* y *wzt* (26).

6.1.4 Técnicas de concentración y detección en agua potable

Debido a que *Legionella pneumophila* es una bacteria ambiental capaz de sobrevivir en diferentes condiciones fisicoquímicas, existen técnicas que permiten concentrar y obtener mayor cantidad del microorganismo en medios de cultivo en muestras de agua potable, es decir, más unidades formadoras de colonia (UFC) por placa sembrada. Algunas entidades y centros de investigación recomiendan diferentes métodos; los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) dentro de su Guía de laboratorio para el procesamiento de muestras ambientales recomienda que las muestras se deben descontaminar mediante una exposición de 15 minutos a tampón ácido y se deben colocar medios de cultivo a base de extracto de levadura de carbón tamponado (BCYE), PAV y medio de agar GPAV(38).

En cuanto a métodos específicos de concentración el CDC y el Instituto de Higiene en Graz, Austria, recomiendan la filtración con membrana, sin embargo, primero indica el uso de un filtro de policarbonato de 0,2 μm (39). Por el contrario, el Centro Médico para Asuntos de Veteranos (VAMC) recomienda la centrifugación como procedimiento ideal para la concentración del microorganismo, con una velocidad de 1,000 x g por 10 minutos(38). No obstante, en el estudio realizado por Ta y col. se demostró que la filtración por membrana era más efectiva que la centrifugación y recuperó más del doble de cantidad. Aproximadamente, la filtración recuperó 76 al 77% del rendimiento esperado, mientras que la centrifugación solo del 31 al 36%(38).

La Organización Internacional de Normalización (ISO) para *Legionella* en su norma 11731:2017 propone tres métodos para el aislamiento, dentro de ellos menciona la concentración del microorganismo con filtración de membrana, usando material de nitrato de celulosa o éster de celulosa mixto (MCE) con tamaños de poro de 0,2 o 0,45 μm cuando se coloca directamente sobre la placa de agar. Por otro lado, es necesario el uso de filtros de membrana de policarbonato o poliestersulfona con tamaño de poro de 0,2 μm para la concentración y elución(40). En el trabajo de

Sepúlveda y col. se determinó que el método de filtración de membrana de nitrocelulosa permite obtener 1 hasta 200 UFC en agua potable(41).

En el estudio de Lösch y col. trabajaron las muestras de agua por filtración con membrana de tamaño de poro de 0,45µm y al vacío, se transfirió a 10ml de buffer Ringer 1/40, posteriormente se agitó durante 2 min con vortex(42). Para reducir la contaminación por otros microorganismos, se trataron térmicamente a 50°C durante 30 min en un baño de agua con el fin de obtener muestras más puras(43).

Díaz y col. proceso cada muestra agitando manualmente y luego se filtró a través de un prefiltro de fibra de vidrio de 2,7µm y un filtro de nailon de 0,4µm superpuesto(44) La pre filtración permitió la separación de bacterias de las partículas más grandes. Entre otras técnicas se están intentando generar nuevas alternativas más eficientes como el método de filtro de membrana de nitrocelulosa para captura e inmunodetección en muestras de agua, permitiendo una reducción considerable del tiempo y manteniendo el mismo límite de detección(45).

En un estudio realizado en el Instituto de Higiene de Graz en Austria menciona unas recomendaciones para el aislamiento y cultivo de *L. pneumophila* en hospitales, un volumen de agua tibia inicial de 250-500 ml es ideal para obtener buenos resultados, para realizar filtración de las muestras, los filtros necesarios son de policarbonato o nitrocelulosa con un poro de 0,2µm, así mismo, sugiere implementar tratamiento ácido, ya que mejoró el rendimiento máximo de colonias en comparación con tratamiento térmico. Por el contrario, no se encontró diferencia en los medios selectivos (MWY, BMPA alfa y GVPC) en la cantidad de UFC, sin embargo, el agar GVPC fue más selectivo inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos de la flora bacteriana acompañante(46).

6.2 Normatividad

Legionella pneumophila por ser un microorganismo capaz de colonizar y persistir en los sistemas hídricos, llevó a la descripción e implementación de leyes y/o normativas con el propósito de contener el crecimiento y desarrollo del patógeno, para evitar brotes comunitarios e intrahospitalarios. Algunos de los documentos revisados sólo

describen recomendaciones y pautas, mientras que otros son de carácter obligatorio para la gestión de riesgo ante la presencia de la bacteria. En la Tabla 1, se hace un resumen de las diferentes normas y guías establecidas a nivel mundial.

Tabla 1. Principales guías y normas sobre el control y prevención de *Legionella spp.*

Ente regulador	Nombre y/o número	Año de publicación	Descripción
Organización Internacional de Normalización (ISO)	ISO:11731	2017	Resalta el análisis de <i>Legionella</i> , el aislamiento del microorganismo en muestras con diferentes características, medios de cultivo, además, los tiempos de incubación necesarios. Recomienda al test de aglutinación en látex como método ideal para identificar serotipos de <i>L. pneumophila</i> y otras especies(40).
Organización Mundial de la Salud (OMS)	No Aplica	Desde 1990 - 2018	Establece parámetros para el aislamiento descritos en siete documentos principales, sobre el impacto de <i>Legionella</i> en la salud; proporciona una descripción general del contagio, la ecología y la identificación de la bacteria en el laboratorio, también evalúa la gestión para la salud pública(47).
UNIÓN EUROPEA			
Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC)	European Technical Guidelines for the Prevention, Control and Investigation, of Infections Caused by	1986	Presenta procedimientos para el control y prevención de <i>Legionella spp.</i> , en sistemas de agua(48).

Legionella
species

La Asociación Española de Normalización	UNE-EN ISO 11731:2017	2017	Determina los métodos de cultivo para el aislamiento de Legionella y su recuento, aplicables a todo tipo de muestras de agua(49).
Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo – España	NTP 538	1999	Menciona las medidas que se deben adoptar para la prevención y control de <i>Legionella</i> en instalaciones de agua y resalta las buenas prácticas de desinfección (50).
La Asociación Española de Normalización	UNE 10030 IN	2017	Proporciona algunos parámetros para la prevención de la propagación por <i>Legionella pneumophila</i> en instalaciones y equipos, control de la multiplicación ambiental(51).
Ministerio de Sanidad y Consumo de España	Real Decreto 865	2010	Establece los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis(51). Tiene como objetivo la prevención y control de la legionelosis en las instalaciones en la que es capaz de crecer y proliferar. Determina las acciones que se deben seguir según la cantidad de UFC en diferentes dispositivos sanitarios, donde con una concentración mayor de 1000 UFC/L se clasifica como peligrosa ante la exposición con el ser humano(52).

ESTADOS UNIDOS Y SUDAMÉRICA

Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC)	Guidelines for environmental infection control in health-care facilities	2003	Describe los procedimientos empleados para procesar muestras ambientales obtenidas durante brotes de legionelosis. Incluye información de la recolección y concentración de muestras de agua, preparación de para el examen bacteriológico, fuentes de reactivos y técnicas de muestreo de aire, acciones ante brotes(39).
Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM)	Guía Estándar D5952-08	2016	Describe las pautas para detección de posible infección por el microorganismo en los sistemas de agua, detección de casos de Legionelosis, sin embargo, no presenta pautas para evitar la multiplicación del patógeno(47).
Sociedad Americana de Calefacción, Industria de Ingenieros de Refrigeración y Aire Acondicionado (ASHRAE)	Directriz ASHRAE 12-2000	2000	Describe las pautas para detección de posible infección por el microorganismo en los sistemas de agua, detección de casos de Legionelosis, sin embargo, no presenta pautas para evitar la multiplicación del patógeno(47).
Sistema Nacional de Medio Ambiente de Brasil	Ley Federal 6.938/81	1981	Afirma que en los casos de infección por el patógeno, serán responsables las partes involucradas de tomar medidas para prevenir su proliferación(47).
ASIA			
Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo de Hong Kong	Código de prácticas para la prevención de la enfermedad	-----	Sugiere el diseño, operación, mantenimiento y manejo de instalaciones para evitar la propagación de <i>L. pneumophila</i> (47).

del legionario			
Instituto de Epidemiología Ambiental Ministerio del Medio Ambiente de Singapur	Código de prácticas para el Control de la bacteria Legionella en torres de enfriamiento	2001	Menciona pautas para la prevención y el control de la bacteria, evitar su aparición y limitar el riesgo de brotes(53).
OCEANÍA			
Ministerio de Salud de Nueva Zelanda	Guía de prevención de Legionelosis	2011	Se destacan los principales protocolos para el control de la bacteria, además, tiene como prioridad manejar los peligros asociados con <i>Legionella</i> y evitar las posibles fuentes de colonización, también, verificar la correcta desinfección en torres de refrigeración y sistemas de distribución de agua fría y caliente(54).

Fuente: Elaboración propia

En África, únicamente Sudáfrica cuenta con “Regulaciones para agentes biológicos peligrosos”, que incluyen a *Legionella* pero sin dar pautas concretas de la bacteria(47). Por otro lado, en Australia se han redactado un total 25 regulaciones actualizadas junto con un código de prácticas redactado en 2004 para controlar la enfermedad del Legionario(47). También, existe una guía especializada para gestionar los riesgos de contaminación para controlar el crecimiento del microorganismo en sistemas de torres de enfriamiento(55).

En Colombia existe la Guía Técnica Colombiana GTC 257 para la Prevención y Control de la Proliferación y de *Legionella* en instalaciones, es una adopción modificada de UNE 100030 IN:2005 de España, donde se mencionan las principales condiciones de diseño y parámetros de limpieza y desinfección para evitar la

propagación del microorganismo en las edificaciones, el uso de medidas adecuadas de temperatura, hipercloración y otras técnicas como el choque térmico. Así mismo, esta norma presenta algunas generalidades de la bacteria, modo de colonización y proliferación en los sistemas de acueducto y su exposición; además, muestra las principales instalaciones de mayor riesgo. Pero no presenta ningún método para su recuperación y detección(2).

6.3 Validación de métodos microbiológicos

La validación de un proceso es la forma de demostrar que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto(56). Para la OMS, la validación de un método se basa en demostrar con un alto grado de confianza, por medio de evidencia documentada que un proceso específico producirá de forma consistente y permanente productos que poseerán las características de calidad predefinidas(57). En cuanto a los métodos microbiológicos, existen diversos documentos que esclarecen conceptos y procedimientos para examinar bacterias mediante cultivos. La Asociación Española de Abastecimientos de Agua y Saneamiento (AEAS) en 2016 designó un Grupo de Trabajo para crear la Guía para el Funcionamiento de los Laboratorios de Ensayo de Aguas, dando los criterios para la validación de los métodos microbiológicos.

La validación de los ensayos microbiológicos debe intentar reproducir las condiciones reales de los mismos. Esto puede conseguirse utilizando muestras naturales o, en su defecto, muestras inoculadas preferiblemente no esterilizadas para que exista microbiota interferente, con una concentración conocida de microorganismos a evaluar(56). La Guía para el Funcionamiento de los Laboratorios de Ensayos de agua clasifica los métodos microbiológicos en cualitativos y cuantitativos.

- Cualitativos: también denominados “de investigación”, son aquellos cuya respuesta es la presencia o ausencia del microorganismo detectado directa o indirectamente de una cantidad de muestra(56). Dentro de este tipo de validación se encuentran parámetros como el límite de detección, la sensibilidad, especificidad, eficiencia, exactitud relativa, sensibilidad relativa, especificidad relativa, desviación positiva (falsos positivos) y desviación negativa (falsos negativos).

- Cuantitativos: denominados “de detección y recuento”, son métodos cuya respuesta es la cantidad de microorganismos medido directamente (recuento en masa o volumen) o indirectamente (NMP, absorbancia de color, impedancia, etc.) en una cierta cantidad de muestra(56). También se incluyen parámetros tales como; límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, incertidumbre, repetibilidad, reproducibilidad, especificidad, sensibilidad, exactitud y precisión.

La Norma Española UNE-EN ISO 8199 de calidad de agua presenta los requisitos y orientaciones sobre las manipulaciones que son comunes a las distintas técnicas de cultivo para el examen microbiológico del agua, en particular la preparación de las muestras, los medios de cultivo, el equipamiento general y material de vidrio (58). Para la presente investigación se tomaron en cuenta los procedimientos de incorporación de placa, reparto de placa y filtración de membrana, donde esta última se realiza en el equipo Celltrazone.

Para la técnica de filtración en membrana debe tener un número de colonias típicas entre 20 y 100 UFC (la suma de las colonias típicas y atípicas no debe superar las 200 UFC) para filtros de 47-50 mm de diámetro(56).

6.4 Equipo Celltrazone y procesador de muestras Huro Paths

El procesador HURO PATH S es un dispositivo fabricado en Corea del Sur enfocado en el diagnóstico in vitro de preparación de muestras para su examen en citopatología. Tiene un mecanismo especial, que utiliza métodos de filtración y precipitación a través de filtros patentados de doble membrana, que permiten una fácil preparación de láminas, y excelente velocidad de procesamiento de muestras (Figura 1).

La muestra citológica se recolecta, normalmente con un cepillo pequeño, de la misma manera que para una prueba de Papanicolaou convencional, pero en lugar de ser fijada en una lámina se transfiere directamente a un líquido conservante.

En el laboratorio, la muestra es fijada con el método de precipitación y filtración eliminando la mucosidad, sangre y elementos no deseados permitiendo obtener

resultados diagnósticos más precisos. Con este procesador, se mejora la precisión de la prueba en comparación con las pruebas de Papanicolaou convencionales, ya que el resultado de la lámina para la lectura es más fácil debido a la impresión celular uniforme en monocapa, sin residuos innecesarios, mucosidad, células inflamatorias(59).

El equipo está enfocado en el diagnóstico in vitro para detección de células anormales mediante la examinación de células extraídas de diversas muestras como, por ejemplo: útero, esputo, orina, etc. Este equipo utiliza métodos de filtración y precipitación a través de membrana dual; la primera membrana del filtro retiene los residuos innecesarios y la segunda membrana toma sólo las células requeridas para la impresión de la lámina después de drenar el líquido innecesario, lo que hace un excelente concentrador de muestras. Por esta razón permite la concentración de bacterias.

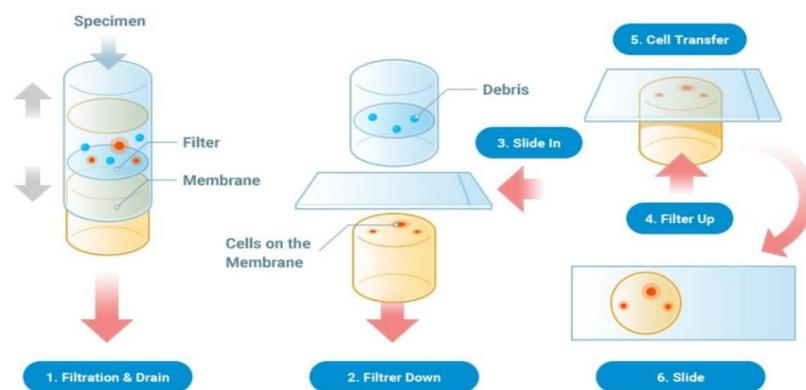


Figura 1. Filtración y precipitación mediante el uso de membrana dual del equipo Huopath S

Fuente: HURO PATH S Slide Sample Processor User manual. 2016

7. Diseño metodológico

7.1 Tipo de investigación

La investigación realizada se considera de tipo mixta, debido a que necesita varios enfoques que se fundamentan en bases teóricas, requiere de análisis de información para la toma de decisiones y una descripción de los componentes de la problemática presentada, así mismo, se enfoca en el desarrollo de la parte experimental, por medio de técnicas de concentración, proceso de aislamiento con el uso de cultivos y la detección de patógeno con otros procedimientos.

7.2 Nivel, alcance o enfoque de la investigación

Exploratorio: la búsqueda de *Legionella pneumophila* en la red de agua sanitaria no es un procedimiento que se lleve a cabo con frecuencia en el país, ni hay un método aprobado o estandarizado para encontrar este microorganismo en el agua potable. Por ello, la presente investigación trata de avanzar en este tema aplicando un nuevo método para aislar y detectar el patógeno, además, permitirá que el procedimiento sea una base para ser aplicado en futuras investigaciones sobre el microorganismo mencionado y, así mismo, ser replicado en otros laboratorios.

Descriptivo: para realizar el protocolo del método de aislamiento y detección, se llevó a cabo una búsqueda teórica para conocer las propiedades del microorganismo y características de su crecimiento en medios de cultivo, para identificar los materiales o suplementos necesarios para ser adicionados a los agares y para reconocer las técnicas más adecuadas que permitan obtener mayor recuperación de *Legionella pneumophila*.

Experimental: el proyecto está enfocado en la recuperación de *Legionella pneumophila* en las muestras de agua potable basado en el procedimiento de un protocolo, para ello, se necesita probar diferentes técnicas de laboratorio que permitan obtener en mayor cantidad el microorganismo y a su vez, detectarlo en las muestras preparadas. También, se requiere de material específico de laboratorio como medios de cultivo y equipos especializados para llevar a cabo el propósito de la investigación.

7.3 Población objeto de estudio

La presente investigación tiene por objeto de estudio la bacteria *Legionella pneumophila*, que es un microorganismo que crece en los sistemas de agua potable, principalmente en edificaciones antiguas (hospitales, cárceles, edificios, viviendas) y puede convertirse en un problema de salud pública afectando en mayor medida a las personas inmunocomprometidas.

7.4 Muestra

Para la presente investigación se utilizará el agua potable tomada de un grifo para simular las condiciones ambientales y de crecimiento de la bacteria. Es necesario tomar esta sustancia debido a que transita por los sistemas sanitarios, ya que este es el ambiente natural para que *Legionella pneumophila* pueda crecer. Así mismo, este líquido está en permanente contacto con la superficie de la tubería y sus accesorios. Adicionalmente, la toma de la muestra no representa dificultad, pues, no se requieren instrumentos o materiales costosos o complejos de manejar.

7.5 Definición de las variables

Para el análisis estadístico se deben conocer las variables a utilizar, además, de identificar la demostración del proceso que permitirán realizar su medición de forma empírica y cuantitativa, como la determinación de la cantidad de UFC en el medio de cultivo, así mismo, la naturaleza de la variable y su nivel de medición. En la tabla 2 se observan los parámetros con los datos específicos para la investigación en curso.

- Control de sesgos: Para evitar sesgos del observador el investigador que realice los recuentos de colonias no conocerán la concentración bacteriana inicial del agua o el proceso que se está evaluando. Para evitar errores en la lectura se realizará registro fotográfico para confirmar recuentos bacterianos.

Tabla 2. Caracterización de las variables estadísticas

Nombre de la Variable	Definición Operativa	Relación	Naturaleza y Nivel de Medición	Nivel Operativo
Método Celltrazone + Vortex	Recuento de colonias	Independiente	Cuantitativa discreta	UFC
Método Celltrazone + Baño sonicador	Recuento de colonias	Independiente	Cuantitativa discreta	UFC
Método Celltrazone + Agitación	Recuento de colonias	Independiente	Cuantitativa discreta	UFC

Fuente: Elaboración propia

- Instrumento de Medición: Hoja Excel

- Procesamiento de Datos: Stata

- Plan de Análisis: Se realizará análisis univariado con determinación de medias, desviaciones estándar (DS) y se realizará una ANOVA para el análisis de varianza de un factor entre los recuentos de UFC que se realicen. Los resultados serán presentados en tablas y gráficas.

7.6 Procedimientos, técnicas y herramientas para la investigación

- Cepa control: la cepa utilizada para llevar a cabo la investigación corresponde a *Legionella pneumophila* subsp. *fraseri* ATCC® 33156™ de la marca Liofilchem.

- Mantenimiento de cepas control: la cepa fue sembrada en agar Legionella CYE(60), suplementado con Legionella BCYE growth supplement de la marca Liofilchem(61). Las cajas sembradas se incubaron a 36 ± 2 ° C durante 48 horas en atmósfera del 2.5% de CO₂.

- Identificación de colonias: las correspondientes a *Legionella pneumophila*, pueden ser de pequeñas a grandes, lisas, de incoloras a pálidas, color gris azulado y ligeramente mucoides. *Legionella pneumophila* subsp. *fraseri* ATCC® 33156™ no presenta fluorescencia azul-blanca cuando se observa bajo luz ultravioleta.

- Procedimientos pre validación: Para establecer el protocolo final se emplearon varias técnicas. Inicialmente se sometieron los filtros a cuatro procesos: sonicación, agitación, vortex y ninguno. Por medio de la siembra en agar BCYE se identificó la técnica que permite la recuperación a las bacterias de la membrana, y, por consiguiente, una mayor cantidad en el recuento de colonias (UFC). Para realizar lo anterior se siguieron una serie de pasos que se presentan a continuación:

1. Preparación de diluciones: a partir del crecimiento de la cepa *Legionella pneumophila* subs *fraseri* ATCC® 33156™ en medio BCYE se preparó una solución madre de la bacteria en un caldo Mueller Hinton con una concentración de 0,5 en la escala MacFarland ($1,5 \times 10^8$) confirmado mediante espectrofotometría con el equipo MicroScan Turbidity Meter de la marca Siemens con absorbancia de 0,1. A partir de esta dilución se realizan diluciones seriadas desde 1×10^7 hasta 1×10^3 , donde se utilizan 20 mL del solvente que en este caso es agua potable que fue recolectada de un grifo para recrear las condiciones ambientales de manera in vitro; y 2 mL de volumen de dilución previa empleando tubos falcón estériles de 50 mL. Hay que resaltar que únicamente se realizó la validación a partir de la contaminación del agua potable con la cepa control, mas no se hizo muestreo ni verificación en un sistema de agua específico.

2. Procesamiento de las diluciones por el equipo Celltrazone:

El procesamiento de las muestras se realizó mediante el uso del equipo Celltrazone con su software Huro Paths, siguiendo las especificaciones del manual realizado por

el fabricante(59), sin embargo, se realizaron algunas modificaciones con respecto al volumen de la muestra. (Anexo 12.1)

3. Procesos y tratamiento del filtro

En todos los ensayos se corrieron 5 diluciones (1×10^7 hasta 1×10^3) y cada una se procesó por duplicado. Para la obtención del filtro, se debe separar la parte superior, dejando así la base descubierta donde se encuentra la membrana dual; se retira la primera membrana plástica que está adherida a la base y esto se realiza empleando pinza estéril, con esto se puede despegar la siguiente membrana que es más gruesa y es la empleada para cada proceso que se llevó a cabo.

- **Sonicación:** Cada membrana obtenida se introdujo en una placas de Petri de 50 mm de diámetro que contenía 2 mL de buffer del Celltrazone y se colocaron en baño sonicador Elmasonic Easy 30 H de la marca alemana Elma, durante 10 minutos con una frecuencia de 60 Hz. Se utilizó un asa calibrada de 10 μ L que fue introducida en la suspensión obtenida, la siembra se realizó empleando el método de Kass y se incubó a 36 ± 2 °C durante 48 horas en atmósfera del 2.5% de CO₂.
- **Agitación:** En placas multipozos de 6 espacios se colocaron las membranas obtenidas y se agregó 2 mL de buffer del equipo Celltrazone, posteriormente se llevó al equipo ThermoFisher que realizó la agitación por 5 minutos a una velocidad de 1250 rpm. En la solución producida se introdujo el asa calibrada de 10 μ L y se realizó la siembra por el método de Kass y se incubó a 36 ± 2 °C durante 48 horas en atmósfera del 2.5% de CO₂.
- **Vortex:** Las membranas se resuspendieron en 2 mL de buffer del equipo dentro de tubos falcón con volumen de 10 mL y se agitó en durante 15 minutos cada una, en el Vortex V-1 plus de la marca Boeco Germany. Para la siembra, el asa calibrada de 10 μ L fue insertada en la suspensión, y posteriormente, la estría se realizó utilizando el método de Kass se incubó a 36 ± 2 °C durante 48 horas en atmósfera del 2.5% de CO₂.

- Ningún procedimiento: Una vez la membrana es recuperada del equipo Celltrazone, se sitúa directamente sobre el agar BCYE durante 30 segundos, es retirada y se realiza la siembra empleando el método de Kass con asa calibrada de 10 µL y se incubó a 36 ± 2 °C durante 48 horas en atmósfera del 2.5% de CO₂.

7.7 Validación de los ensayos microbiológicos

De acuerdo al documento de Validación de Métodos Microbiológicos del Invima(62), el método a validar debe ser comparado con el método de referencia que permita esclarecer la capacidad de recuperación del protocolo a ensayar en cuanto a la cantidad de UFC. Para realizar la validación se escogió como método de referencia la siembra directa de cada concentración empleada, y de este procedimiento mencionado y el método alternativo (seleccionado en este estudio) se realizaron 12 réplicas para cada dilución.

Para obtener los resultados estadísticos se efectuó el conteo de UFC, donde se descartó la concentración con colonias “incontables”, así mismo, para establecer una comparación con los métodos mencionados se evaluó el crecimiento de todas las diluciones, donde (+) significa desarrollo de colonias en el medio de cultivo y (-) donde no hubo formación ni de al menos una UFC. Para evaluar estadísticamente el método escogido se calcularon los siguientes parámetros:

- Límite de detección: es el menor número de microorganismos que pueden detectarse en una muestra con un nivel aceptable de confianza. Para hallar el límite de detección(62):

Para el recuento de unidad formadora de colonias (UFC) de cada dilución y se determinará el límite de detección con la siguiente fórmula:

$$P(+) = 1 - e^{-m}, \text{ donde,}$$

e: Es la base de logaritmo natural

m: en el número promedio de UFC por porción analítica.

- Sensibilidad: fracción del número total de cultivos o colonias positivas que son asignadas correctamente con el método utilizado(62).

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a+b} \times 100$$

- Especificidad: fracción del número total de cultivos o colonias negativas que son asignadas correctamente con el método utilizado(62).

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{c+d} \times 100$$

- Falsos positivos: ocurre cuando un método da un resultado positivo sin confirmación y el método de referencia da un resultado negativo(62).

$$\text{Falso (+)} = \frac{c}{a+c} \times 100$$

- Falsos negativos: ocurre cuando un método da un resultado negativo sin confirmación y el método de referencia da un resultado positivo(62).

$$\text{Falso (-)} = \frac{b}{b+d} \times 100$$

- Exactitud relativa: grado de concordancia entre los resultados del método evaluado y los obtenidos utilizando un método de referencia reconocido(62).

$$\text{Exactitud relativa} = \frac{a+d}{n} \times 100$$

- Sensibilidad relativa: es la habilidad del método alternativo de detectar el microorganismo deseado cuando él es también detectado por el método de referencia(62).

$$SR = \frac{a}{N+} \times 100$$

- Especificidad relativa: es la habilidad del método alternativo de no detectar el microorganismo no deseado cuando él también no es detectado por el método de referencia(62).

$$ER = \frac{d}{N-} \times 100$$

- Selectividad: relación entre el número de colonias objetivo y el número total de colonias en la muestra(62).

$$\text{Selectividad: } \text{Log} = \frac{(a+c)}{n}$$

7.8. Confirmación en lámina mediante la coloración de Giménez

Esta tinción para la presente investigación es empleada para confirmar la presencia y la pureza de las muestras procesadas en el Celltrazone, donde las láminas son generadas a partir de este equipo cuando son cargadas al tiempo con la muestra procesada.

Es una técnica de coloración que se basa en el uso de fucsina carbólica y verde de malaquita como colorante de contraste, fue utilizado por Domingo Giménez en 1964 para la identificación de Rickettsias, con esta tinción las bacterias se observan de color amarillo contra un fondo verde azulado(63). En 1980, Greer y col. utilizó esta tinción para identificar a *Legionella pneumophila* y encontró que era exitoso en cortes de tejido congelados y frotis de tejido pulmonar fresco(64). Las bacterias del género *Legionella spp* bajo observación microscópica con aumento de 100x se identifican de color magenta con un fondo azul claro.

Utilizamos el protocolo de la tinción de Giménez estandarizado por Murcia y col.(65), el procedimiento siguió los siguientes pasos:

- Se fijaron las láminas con metanol durante 1 minuto y se dejaron secar

- Se aplicó carbol fucsina por 4 minutos
- Se lavó con agua destilada
- Decoloración con Ácido Acético por 30 segundos
- Se lavó con agua destilada
- Contraste con verde de malaquita por 15 segundos
- Se lavó con agua destilada
- Se dejó secar al aire de 1 a 2 minutos
- Montaje de las láminas con resina
- Visualización bajo 100x

8. Resultados

8.1 Crecimiento y mantenimiento de la cepa control

Después de cultivar la cepa en el medio de mantenimiento Culti Control™ y su posterior repique en el medio BCYE, se obtuvo crecimiento de *L. pneumophila* subsp. *fraseri*, como se presenta en la figura 2. Durante el estudio se mantuvo la cepa mediante dos repliques semanales en medios BCYE, con el fin de trabajar el microorganismo joven. Y como respaldo se generaron congelados a -80°C.

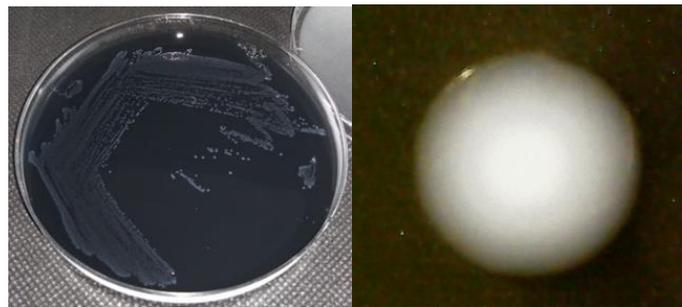


Figura 2. Crecimiento de *L. pneumophila* subsp. *fraseri* en el medio de cultivo BCYE (Izquierda) y colonia característica del microorganismo (Derecha), se observan de color blanco-grisceoso brillantes, con apariencia de vidrio esmerilado y de bordes regulares.

Se realizó un control de crecimiento de otros microorganismos en el medio, para determinar su selectividad con las cepas del género *Legionella* spp. En la tabla 3, se puede observar los resultados obtenidos de la siembra de las diluciones 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 que son recomendadas por el Manual de Microbiología de Merck(66). La siembra se llevó a cabo por el método de Kass y la lectura se realizó a las 48 horas de incubación a 37°C.

Tabla 3. Resultados de crecimiento de los controles negativos.

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
1×10^4	Inhibido	Inhibido	Inhibido
1×10^3	Inhibido	Inhibido	Inhibido
1×10^2	Inhibido	Inhibido	Inhibido

Fuente: Elaboración propia

8.2 Validación del protocolo

Después de realizar las siembras con las diluciones con cada uno de los procedimientos mencionados en el numeral 6.6.3, en la tabla 4 se muestran los resultados de crecimiento.

Tabla 4. Desarrollo en el agar BCYE en los 4 tratamientos de la membrana realizados.

	Sonicado	Agitación	Vortex	Ninguno
1×10^7	 Creció	 Creció	 Creció	 Creció
1×10^6	 Creció	 Creció	 Creció	 Creció
1×10^5	 Creció	 Creció	 Creció	 Creció



Fuente: Elaboración propia

Como se evidencia en la tabla 4, los resultados muestran que al no aplicar ninguna técnica en el procesamiento del filtro antes de realizar el cultivo permite obtener una mayor recuperación a partir de la dilución 1×10^4 y 1×10^3 .

8.3 Análisis estadístico del método

La Tabla 5 representa el crecimiento (+) o no crecimiento (-) en agar BCYE de *L. pneumophila* subsp. *fraseri*, en el Método de Referencia (MR) y Método Alternativo (MA) que fue el escogido con anterioridad.

El parámetro del límite de detección normalmente tiene una probabilidad determinada del 95% o $p(+)=0,95$ (56), para hallarlo, fue necesario procesar, además, las diluciones 10^2 y 10^1 e identificar la cantidad de colonias que podrían crecer. Los resultados mostrados en la Tabla 6, evidencian que el límite de detección se presentó en la dilución 10^2 donde se sitúa más cerca de 0,95, debido a que para las diluciones 1×10^5 , 1×10^4 y 1×10^3 no se encontraba diferencia entre sus valores de probabilidad y con la solución con una concentración de 1×10^1 este valor era igual a cero (0) y no es representativo para el ensayo.

Tabla 5. Crecimiento de *L. pneumophila* subsp. *fraseri* efectuando el método de referencia y el método alternativo durante las 12 réplicas.

	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Réplica 4		Réplica 5		Réplica 6		Réplica 7		Réplica 8		Réplica 9		Réplica 10		Réplica 11		Réplica 12		
Nivel	MR	MA	MR	MA	MR	MA	MR	MA																	
1 1×10^3	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	
2 1×10^4	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
3 1×10^5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
4 1×10^6	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
5 1×10^7	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Fuente: Elaboración propia

Tabla 6. Estimación del límite de detección del método por filtración de membrana en el Celltrazone.

Dilución	Recuento promedio de UFC	<i>Legionella pneumophila</i> $P(+)=1 - e^{-m}$
1x10 ⁵	327	1
1x10 ⁴	101	1
1x10 ³	33	1
1x10 ²	3	0,88
1x10 ¹	0	0

Fuente: Elaboración propia

Se determinaron los parámetros estadísticos que permitieron validar el proceso microbiológico cualitativo del estudio. A continuación, en la tabla 7 se presentan los resultados de cada variable.

Tabla 7. Valores estadísticos representativos de la validación para recuperación de *Legionella pneumophila*.

Parámetro estadístico	Resultados
Límite de detección	1x10 ²
Sensibilidad	100 %
Especificidad	80 %
Falsos positivos	20%
Falsos negativos	0 %
Exactitud relativa	87,5%
Sensibilidad relativa	75%

Especificidad relativa	100%
Selectividad	-0.30

Fuente: Elaboración propia

8.4 Coloración de Giménez

La confirmación en lámina fue realizada en todas las diluciones generadas de todos los ensayos llevados a cabo. La Figura 3. es un ejemplo de cómo se observó el microorganismo bajo la tinción mencionada, además, muestra la presencia de bacilos pleomórficos de color magenta en contraste con un fondo azul claro, por tanto, se evidencia la presencia de bacterias, específicamente, *Legionella pneumophila*. Así mismo, se demuestra su utilidad y definición en frescos de agua potable.

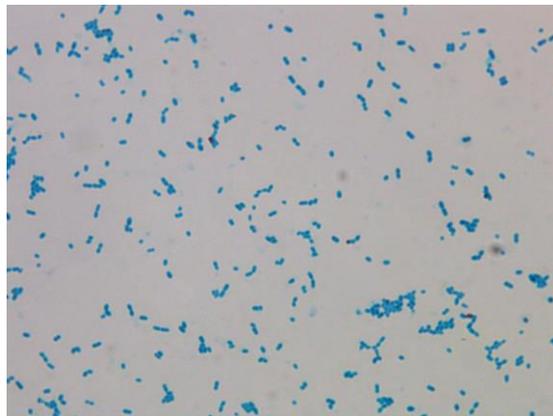


Figura 3. Coloración de Gimenez con *Legionella pneumophila* en 100x. Se presenta la tinción de la concentración 1×10^5 que permite detallar mejor la morfología bacteriana y características del coloreado.

9. Discusión

Los métodos de filtración por membrana son técnicas que se usan para mejorar la detección de microorganismos y patógenos que pueden proliferar en suministros de agua potable debido a que permiten el paso de ciertas partículas desechando restos de contaminantes. Cada método presenta variaciones en el momento de procesar el filtro, y por ende, pueden presentarse variaciones en la recuperación. Algunos protocolos adicionan tratamientos con ácidos o con calor, que ayudan a que las muestras de agua queden mucho más purificadas para la detección de los microorganismos(67). Es importante que todos los métodos cumplan con los requisitos y normativas que permitan garantizar la veracidad y confiabilidad de los resultados que se obtienen

Legionella pneumophila es un microorganismo ubicuo que habita en el agua y su capacidad para contaminar sistemas de aguas de hoteles, hospitales, spas, etc., ha generado mundialmente un control exhaustivo para evitar su propagación mediante su pronta detección, eliminación y control, especialmente en países de la Unión Europea. En el caso de Colombia, hasta la fecha la normativa existente no hace ninguna referencia sobre la metodología para la detección del patógeno, y tampoco estipula el límite de detección para de crecimiento bacteriano que sea adecuado en instalaciones sanitarias. Algo importante a resaltar es que en esta norma tampoco se determinan las acciones a seguir cuando se presenten casos de Legionelosis, pero esto es un tema que requiere de atención prioritaria por parte de las autoridades sanitarias.

Por lo anterior y mediante esta investigación, se pretendió generar las bases para la validación de un nuevo método basado en filtración por membrana con el fin de aumentar la recuperación de *Legionella pneumophila*. La peculiaridad de este procedimiento se fundamenta en que se utiliza un equipo basado en la filtración por membrana dual, que tiene como ventaja la reproducibilidad en los ensayos y que no se requieren volúmenes tan altos para la técnica. Hay que tener en cuenta que este trabajo es la primera etapa y se basa en la validación de un método microbiológico cualitativo.

Para la siembra de la bacteria se utilizó el medio de cultivo BCYE que tiene componentes nutricionales necesarios para el crecimiento *Legionella* y cierto tipo de flora acompañante no puede crecer fácilmente, aunque hay que tener en cuenta la concentración de los otros microorganismos; Liofilchem®, casa comercial utilizada menciona que *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* pueden crecer en el medio BCYE suplementado(61), sin embargo, no mencionan las concentraciones de desarrollo. En nuestra revisión encontramos que el Agar BCYE de la casa comercial Neogen(68), en el ítem “Control de Calidad” proporciona las concentraciones a las cuales *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* son inhibidas (Tabla 8). Y en el Manual de Microbiología de Merck(66) se menciona que con un inóculo de 5000 UFC *E. coli* y 50-500 UFC de *P. aeruginosa* no hay recuperación y, por lo tanto, no hay crecimiento.

Como se evidenció en nuestro estudio, se inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en las concentraciones referidas en la literatura, y adicionalmente, se demostró la selectividad y calidad del Agar BCYE utilizado.

Tabla 8. Control de calidad del agar BCYE suplementado de la casa comercial Neogen para microorganismos.

<u>MICROORGANISM</u>	<u>ATCC</u>	<u>APPROX. INOCULUM (CFU)</u>	<u>EXPECTED RESULTS</u>
<i>Legionella bozemanii</i>	33217	50-200	>50% grey/white colonies
<i>Legionella pneumophila</i>	33152	50-200	>50% grey/white colonies
<i>Legionella pneumophila</i>	33156	50-200	>50% grey/white colonies
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	10 ³ -10 ⁴	Complete to partial inhibition
<i>Escherichia coli</i>	8739	10 ³ -10 ⁴	Complete to partial inhibition
<i>Escherichia coli</i>	25922	10 ³ -10 ⁴	Complete to partial inhibition
<i>Enterococcus faecalis</i>	19433	10 ³ -10 ⁴	Partial inhibition
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	10 ³ -10 ⁴	Partial inhibition

Fuente: Neogen. 2021

Las características de la membrana que se emplea durante el proceso de filtración es un factor importante para el éxito en la recuperación y crecimiento del microorganismo. El tamaño del poro es fundamental para garantizar una buena

filtración de la bacteria. La norma ISO 11731:2017 recomienda el uso de membranas de nitrato de celulosa o de éster mixto de celulosa con tamaño de poro de 0,2 o 0,45 μm . El estudio de De Giglio y col.(40), se basó en la comparación de las membranas con tamaños recomendados por la norma ya mencionada, el ensayo se llevó a cabo en tres laboratorios de investigación en diferentes universidades en Italia; en sus resultados obtuvieron mejores recuentos con el uso de filtros con un tamaño de poro de 0,45 μm en los tres laboratorios como se muestra en la Tabla 9, al contrario con aquella con medida de 0,2 μm , donde mencionaron que las características de estas membranas pueden ocasionar una oclusión en la malla y una reducción en la cantidad de UFC sembradas.

Tabla 9. Recuentos de *Legionella pneumophila* sg 1 con membrana con tamaños de poro 0,45 y 0,2 micras.

Recuentos de <i>L. pneumophila</i> sg 1 (UFC/100mL)				
Tamaño poro	0,45 micras		0,2 micras	
	Recuento medio	Intervalos	Recuento medio	Intervalos
1	12,13	10.49 a 14.03	2,27	1,62 a 3,17
2	9,07	7,66 a 10,73	2,6	1,89 a 3,56
3	8,27	6,93 a 9,86	1,87	1,29 a 2,7

Fuente: Elaboración propia

De Giglio y col.(40) concluyeron en su trabajo que las membranas de poros más grandes evitan la obstrucción o reducción de flujo bacteriano, además, de que pueda entrar en contacto más fácilmente con los nutrientes y componentes del medio de cultivo y por las fuerzas electrostáticas unirse a la superficie del agar. *Legionella pneumophila* tiene unas medidas de entre 0,3 a 0,9 μm de ancho y 1,5 a 20 μm de longitud, y por lo tanto, la membrana utilizada para nuestro estudio tiene un tamaño de poro entre 5 a 9 μm que es capaz de retener el microorganismo y al tiempo permite

evitar la obstrucción y facilitar el contacto con el medio de cultivo, por lo que aumentó la recuperación de *Legionella* en el agar.

La revisión bibliográfica mostró que los filtros debían ser sometidos a un procedimiento que asegurara la mayor recuperación. Durante el proceso de Pre-validación se probaron diferentes opciones, por ejemplo según Bartie y col. en su evaluación de métodos de detección de especies de *Legionella* utilizando muestras sembradas, mencionan que aplicar un procedimiento de sonicado y vortex pueden contribuir a mejorar la suspensión del microorganismo pero teniendo en cuenta las condiciones de la membrana, sus resultados indicaron que la concentración por filtración de membrana utilizando filtros de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm, seguida de sonicación durante 10 minutos, sería el método de concentración y resuspensión más apropiado para las muestras(69).

Adicionalmente, los autores recomiendan que para mejorar el porcentaje de recuperación del microorganismo se debe implementar el uso de membranas de un poro más pequeño. De acuerdo a nuestros resultados el uso de vortex o sonicado es insuficiente para lograr separar las bacterias que permanecen retenidas en los poros de la membrana, y evidenciamos que al colocar el filtro directamente sobre el medio y realizar la estría se logra el crecimiento del microorganismo. Una ventaja de este protocolo es que al evitar manipular la membrana se pierden menos microorganismos.

La norma ISO 11731:2017 proporciona tres métodos diferentes para la recuperación de *Legionella pneumophila* en diferentes muestras de agua. Uno de estos procedimientos se basa en la colocación directa de la membrana sobre el medio de cultivo y se utiliza cuando se espera una baja concentración de microorganismos que interfieren, no obstante, mencionan que tiene una baja sensibilidad a comparación de la elución de la membrana y la siembra directa de la muestra que ya se encuentran documentadas. Como se pudo evidenciar con nuestros resultados, la colocación directa de la membrana sobre el agar recuperó mayor cantidad de UFC que la siembra directa y la elusión, y principalmente en más bajas concentraciones del microorganismo, esto se debe a la implementación de membrana dual que maneja el filtro utilizado por el equipo Celltrazone, que permite mayor recuperación de bacterias, y por ende, mayor crecimiento de UFC en el medio.

Un estudio elaborado por Schulze y col.(70) evaluó cuatro métodos distintos donde pretendían aislar *Legionella spp* de agua potable. Dichos métodos se basaron en (A) inoculación de 1 y 0,1 ml directamente en el medio de crecimiento sólido selectivo, (B) filtración a través de filtros de membrana de nitrato de celulosa, (C) filtración a través de filtros de policarbonato e inoculación del residuo resuspendido correspondiente, y (D) filtración de 100 y 10 ml a través de filtros de nitrato de celulosa e incubación de los filtrar directamente sobre el medio. Según los resultados, para determinar la mejor detección de *Legionella* recomiendan, el método D como el método más simple y sensible. De igual modo Matuszewska(71) evidencia que las investigaciones muestran que el aislamiento más exitoso es el método de filtración por membrana, donde los filtros se colocan directamente en el medio de cultivo. Al comparar estos estudios, se pueden encontrar varias similitudes con nuestros resultados que reafirman en demostrar que el mejor método es la siembra por un método directo del filtro.

Basados en los resultados estadísticos, se determinó que el método aplicado es útil para recuperar el microorganismo en el agua, incluso en bajas concentraciones que se consideran potencialmente peligrosas para la salud. Teniendo en cuenta los parámetros de validación determinamos que se tiene como mínima cantidad de colonias obtenidas, una concentración de 1×10^2 UFC como se evidencia en la tabla 6, cumpliendo así con lo dictaminado con la norma ISO 11731:2017 donde la filtración por membrana y posterior cultivo debe cumplir un límite de detección mínimo de 1×10^4 UFC, y también, con el establecido por la OMS con un intervalo de 1×10^2 a 1×10^3 UFC(66). En el trabajo realizado por Ezerrano y col.(72) mencionan que los inmunosensores basados en filtración tienen apenas un límite de detección entre 1×10^8 hasta 1×10^6 y para alcanzar una concentración de 1×10^4 se necesitaba aplicar un paso de preconcentración y, aun así, no lograron alcanzar los estándares establecidos para la vigilancia de *Legionella spp* según la OMS.

Según la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica en su documento de Validación y verificación analítica de métodos microbiológicos(73) recomiendan que los valores de sensibilidad y especificidad sean superiores al 90%, el método realizado por nosotros presentó una sensibilidad del 100%, es decir, que

identificó todas las muestras que contenían el microorganismo y responden positivamente al método. A pesar de que la especificidad del método fue del 80%, Pita-Fernández y col.(74) mencionan que este valor determina que una prueba es “buena” y que permite dar validez a los resultados obtenidos, así mismo, afirma que una prueba debe ser rechazada cuando el porcentaje de especificidad es menor del 50%.

En el estudio de Grúas y col.(75) se utilizó ScanVIT-Legionella™ para muestras de agua, el método se basa en la tecnología de sonda genética que permite la cuantificación y la detección simultánea de *Legionella sp* y reportaron una sensibilidad del 73%, además, los autores de esta investigación concluyeron que la falencia de la técnica fue el tamaño del poro, al ser muy pequeño se evitó el paso del microorganismo al medio de cultivo. En contraste con nuestro estudio, la alta sensibilidad al utilizar el equipo Celltrazone indica que el protocolo propuesto si es capaz de detectar en todas las diluciones realizadas con el microorganismo.

Boulanger(76) menciona en su investigación “Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation” que se logró recuperar tan solo un promedio del 53% de los organismos *L. pneumophila* sembrada mediante filtración con membranas planas de policarbonato, lo que evidencia en comparación con nuestros resultados que lograron recuperar en mayor proporción a la bacteria

De igual manera se puede analizar otros valores como falsos positivos y negativos, estos son determinados porque se pretende demostrar la no influencia de microbiota acompañante en el resultado del ensayo, lo ideal es que fueran 0%, como se observa en el caso de los falsos negativos; sin embargo, para el caso de los falsos positivos al ser del 20% es un valor que corresponde a muestras que arrojaron resultado positivo cuando la correcta caracterización indica que es negativo. Al analizar estos valores se llega a pensar que el método es bueno, pero puede ser mejorado.

Para la exactitud se considera un valor de la “cercanía” entre los resultados obtenidos del nuevo método y el de referencia, este puede ser evaluado al determinar la recuperación de cantidades conocidas de un microorganismo que se ha añadido a

una muestra. Dicho parámetro se altera a partir de la dilución de una suspensión microbiana; o examinando la presencia/ausencia; también, a partir de una identificación taxonómica; y al comparar el nuevo método con un método de prueba establecido (aquí el nuevo método debe dar resultados equivalentes o mejores al método establecido). Sandle(77) establece que al comparar entre dos métodos, a veces se establece un valor del 70%, en el caso de nuestro ensayo se obtuvo un valor de 87,5%, por lo tanto, lo consideramos como aceptable.

La selectividad es una medida que determina si existen sustancias que interfieren en la determinación del analito de acuerdo a un procedimiento dado. Según esto, se puede mencionar que nuestro método es muy selectivo con un valor de -0,30, que se considera incluso mejor que el valor guía de -1 sugerido por ISO/TR 13843(58) para métodos de recuento de colonias.

Es necesario mencionar que aunque existen técnicas que permiten una detección más rápida ya sea por métodos de inmunodetección o incluso las técnicas moleculares que proporcionan alta especificidad y sensibilidad, estas requieren equipos sofisticados y costosos, instalaciones adecuadas y personal capacitado. Los compuestos inhibidores de PCR presentes en muestras ambientales pueden causar falsos negativos. Las muestras que tengan inhibición deben diluirse y volver a analizarse. Los falsos positivos pueden deberse a la incapacidad de la PCR para diferenciar entre células vivas y ADN libre. Por ello el cultivo sigue siendo de los métodos predilectos para determinar niveles de contaminación de *Legionella spp* en suministros de agua(78).

La estructura de la pared de *Legionella pneumophila* es similar a la de otras bacterias Gram negativas, con una membrana externa, un polímero de peptidoglicano que contiene ácido m-diaminopimélico y una membrana citoplasmática, sin embargo, tiene otros componentes como grandes cantidades de ácidos graso de cadena ramificada, ubiquinonas (coenzima Q) y fosfatidilcolina que dificulta la tinción por el método de Gram, por lo que se requiere el uso de otras coloraciones, como por ejemplo la coloración de Giménez(31). La coloración de Giménez fue implementada inicialmente para la búsqueda de bacterias del género Rickettsias, su uso para determinar a *Legionella spp* es buena, ya que evita el uso de otras técnicas de confirmación en

lámina como la inmunofluorescencia directa, que pueden ser más costosas al necesitar kits y equipos especiales para la visualización del resultado, además, los colorantes pueden ser preparados fácilmente y emplearlos en otros procedimientos rutinarios. Con la estandarización de la coloración realizada por Murcia y col.(65) se logró obtener un mejor color y contraste, permitiendo distinguir claramente la bacteria, además, con la generación de las láminas que son realizadas por el equipo Celltrazone en el proceso de filtración sobre láminas cargadas negativamente, se obtienen preparaciones concentradas que facilitan la visualización y evitan el desperdicio de muestra. Así mismo, hay un ahorro de tiempo, pues no es necesario que el investigador las genere manualmente, en especial cuando se procesan muchas muestras.

Finalmente, se acepta la hipótesis propuesta, debido a que se produjo una mayor cantidad de *Legionella pneumophila* que se vio reflejado en el valor de las unidades en el medio de cultivo, además, de obtener concentraciones que se acoplan a las mencionadas por las normas internacionales, así mejorando su recuperación en muestras de agua potable.

10. Conclusiones

1. Utilizando el equipo Celltrazone se logró validar el método por filtración de membrana para el aislamiento de *Legionella pneumophila*. Se identificó que implementando este equipo se obtiene una mayor recuperación basado en el crecimiento del microorganismo en el medio sembrado con concentración, aún por debajo de lo establecido por la normativa internacional, por lo tanto, es competente para detección en muestras con baja concentración del microorganismo.
2. Los resultados demostraron que no realizar algún tratamiento previo de los filtros permitieron alcanzar recuentos mayores en las placas de agar donde se probaron concentraciones menores como 1×10^4 o 1×10^3 , a diferencia de la siembra directa que no obtuvo recuentos en estas dos últimas diluciones en la mayoría de medios.
3. Se utilizaron diversos parámetros de validación estadísticos para evaluar la viabilidad del nuevo método tales como sensibilidad con un valor de 100%, especificidad con un valor de 80%, exactitud con un valor de 87,5%, entre otros, que evidencian la capacidad de que el método puede pasar a la etapa de implementación, utilizando muestras en los diferentes servicios de hospitales.
4. La detección de *Legionella sp* puede ser algo difícil debido a su morfología ya que no permite que sea teñida fácilmente con coloraciones de rutina como Gram, no obstante, mediante la implementación de otro tipo de tinciones como Giménez, se logró distinguir el microorganismo, con el fin de ser visualizada más fácilmente.

11. Perspectivas para el futuro

Se espera que el protocolo sea empleado en agua potable de sistemas sanitarios de edificaciones de mayor exposición de contaminación por *Legionella pneumophila*, como por ejemplo, hospitales, especialmente, en los dos Hospitales San José en Bogotá D.C., que hacen parte de la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud. Se debería realizar el muestreo en zonas de mayor riesgo para pacientes con factores predisponentes que permitan el desarrollo de la enfermedad del Legionario. Entre estos lugares se encuentra unidad de cuidados intensivos (UCI), neumología, pediatría, urgencias, onco-hematología y terapia respiratoria.

12. Anexos

12.1 Protocolo para el manejo del equipo Celltrazone con muestras de agua

- El equipo debe ser conectado y, posteriormente, encender con el interruptor de la parte trasera.
- Para iniciar el menú, se debe presionar en la pantalla la opción de "POWER" y una vez aparezcan las opciones de muestra, elegir la de orina denominada "URIN".
- Se introduce en el espacio correspondiente el filtro y la lámina especial con carga positiva para el equipo, se agrega la muestra (10 mL de la dilución) y se presiona "START", inmediatamente el equipo inicia con la succión y precipitación.
- Una vez terminado el proceso, se retiró el filtro y la lámina y se repitió el paso anterior hasta culminar con todas las muestras.
- Se debe realizar limpieza del sistema, para esto se realizaron dos lavados con agua destilada al inicio y final y uno intermedio con alcohol antiséptico al 70%, de cada uno se agregan 10 mL un filtro empleado para este propósito y se realizan los mismos pasos de succión de una muestra normal.
- Para apagar el equipo, primero se presiona el botón "ESC" para salir de la opción de orina y, después, oprimir "POWER OFF" para salir del menú y cuando se indique en la pantalla, bajar el interruptor para apagar totalmente.

Referencias

1. Lucas RMO. Vigilancia epidemiológica, prevención y control de la legionella en el hospital. In: Revista de Salud Ambiental [Internet]. 2015 [cited 2020 Sep 25]. Available from: <https://ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/view/738/681>
2. Icontec. Guía Técnica Colombiana GTC 257 de 2015. Bogotá; 2015.
3. Burillo A, Pedro-Botet ML, Bouza E. Microbiology and Epidemiology of Legionnaire's Disease. Infectious Disease Clinics of North America [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2020 Sep 25];31(1):7–27. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891552016300885?via%3Dihub>
4. Abdel-Nour M, Duncan C, Low DE, Guyard C. Biofilms: The Stronghold of Legionella pneumophila. International Journal of Molecular Sciences [Internet]. 2013 Oct 31 [cited 2020 Sep 25];14(11):21660. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3856027/>
5. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. Clinical Microbiology Reviews [Internet]. 2002 [cited 2020 Sep 27];15(3):506. Available from: [/pmc/articles/PMC118082/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC118082/)
6. Cunha BA, Burillo A, Bouza E. Legionnaires' disease. The Lancet [Internet]. 2016 Jan 23 [cited 2020 Sep 27];387(10016):376–85. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673615600782/fulltext>
7. Garcia-Nuñez M, Sopena N, Ragull S, Pedro-Botet ML, Morera J, Sabria M. Persistence of Legionella in hospital water supplies and nosocomial Legionnaires' disease. FEMS immunology and medical microbiology [Internet]. 2008 Mar [cited 2020 Sep 27];52(2):202–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18093139/>
8. Patiño-Barbosa AM, Gil-Restrepo AF, Restrepo-Montoya V, Villamil-Gomez WE, Cardona-Ospina JA, Rodríguez-Morales AJ. Is Legionellosis Present and Important in Colombia? An Analyses of Cases from 2009 to 2013. Cureus [Internet]. 2017 Mar 28 [cited 2022 Sep 28];9(3). Available from: [/pmc/articles/PMC5409816/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5409816/)
9. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, et al. Legionnaires' Disease. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM197712012972201> [Internet]. 2010 Jan 13 [cited 2020 Sep 30];297(22):1189–97. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM197712012972201>
10. Clayton AJ. Legionnaires' disease: an illness whose time has come. Can Med Assoc J [Internet]. 1979 [cited 2020 sep 30];120(12):1482-1483. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1704222/>
11. Steele TW. Legionnaires' disease in South Australia, 1979-1988. Med J Aust [Internet]. 1989 [cited 2020 sep 30];151(6):322-328. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2687665/>
12. Morris GK, Patton CM, Feeley JC, Johnson SE, Gorman G, Martin WT, et al. Isolation of the Legionnaires' disease bacterium from environmental samples. Annals of Internal Medicine [Internet]. 1979 [cited 2020 Oct 7];90(4):664–6. Available from: https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/0003-4819-90-4-664?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%20%20pubmed
13. Fliermans, CB, Cherry WB, Orrison LH, Thacker AL. Isolation of Legionella pneumophila from Nonendemic-Related Aquatic Habitats. Applied and environmental microbiology [Internet]. 1979 [cited 2022 Feb 9];37(6):1239–42. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC243385/pdf/aem00210-0201.pdf>

14. Shands KM, Ho JL, Meyer RD, Gorman GW, Edelstein PH, Mallison GF, et al. Potable Water as a Source of Legionnaires' Disease. *JAMA* [Internet]. 1985 Mar 8 [cited 2020 Oct 8];253(10):1412–6. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/397245>
15. Glavin FL, Winn WC, Craighead JE. Ultrastructure of lung in Legionnaires' disease. Observations of three biopsies done during the Vermont epidemic. *Annals of internal medicine* [Internet]. 1979 [cited 2020 Oct 2];90(4):555–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/434634/>
16. Tison DL, Pope DH, Cherry WB, Fliermans CB. Growth of *Legionella pneumophila* in Association with Blue-Green Algae (Cyanobacteria). *Applied and environmental microbiology* [Internet]. 1980 [cited 2020 Oct 7];39(2):456–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC291353/pdf/aem00232-0184.pdf>
17. Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology* [Internet]. 1980 [cited 2020 Oct 7];33(12):1179. Available from: [/pmc/articles/PMC1146371/?report=abstract](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1146371/?report=abstract)
18. Feeley JC, Gorman GW, Weaver RE, Mackel DC, Smith HW. Primary isolation media for Legionnaires disease bacterium. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 1978 [cited 2020 Sep 30];8(3):320. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC275239/>
19. Tilton RC. Legionnaires' disease antigen detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Annals of Internal Medicine* [Internet]. 1979 [cited 2020 Oct 9];90(4):697–8. Available from: https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/0003-4819-90-4-697?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed
20. Berdal BP, Farshy CE, Feeley JC. Detection of *Legionella pneumophila* Antigen in Urine by Enzyme-Linked Immunospecific Assay. *Journal of clinical microbiology*. 1979;575–8.
21. Kohler RB, Zimmerman SE, Wilson E, Allen SD, Edelstein PH, Wheat LJ, White A. Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires' disease: detection and partial characterization of urinary antigen. *Ann Intern Med*. 1981 May;94(5):601-605. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7235392/>
22. Kohler RB, Winn WC, Wheat1 LJ. Onset and Duration of Urinary Antigen Excretion in Legionnaires Disease. *Journal of clinical microbiology* [Internet]. 1984 [cited 2020 Oct 11];20(4):605–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC271393/pdf/jcm00123-0035.pdf>
23. Horwitz MA. Formation of a novel phagosome by the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. [cited 2020 Oct 4]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2187375/pdf/je15841319.pdf>
24. Doebbeling BN, Bale MJ, Koontz FP, Helms CM, Wenzel RP, Pfaller MA. Prospective evaluation of the Gen-Probe assay for detection of legionella in respiratory specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1988 Dec;7(6):748-52
25. Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Toews GB, Cary Engleberg I N. A *Legionella pneumophila* Gene Encoding a Species-Specific Surface Protein Potentiates Initiation of Intracellular Infection. *INFECTION AND IMMUNITY* [Internet]. 1989 [cited 2020 Oct 14];57(4):1255–62. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC313258/pdf/iai00064-0257.pdf>
26. Mercante JW, Winchell JM. Current and Emerging *Legionella* Diagnostics for Laboratory and Outbreak Investigations. *Clinical Microbiology Reviews* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Oct 21];28(1):95. Available from: [/pmc/articles/PMC4284297/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4284297/)
27. Cianciotto NP, Fieldst BS. *Legionella pneumophila* mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages (intracellular parasitism/evolution/*Hwimannella*/*Tebwhymena*/*FK506*-bnidng proteins). 1992 [cited 2020

- Oct 14];89:5188–91. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC49255/pdf/pnas01085-0417.pdf>
28. Keserue HA, Baumgartner A, Felleisen R, Egli T. Rapid detection of total and viable *Legionella pneumophila* in tap water by immunomagnetic separation, double fluorescent staining and flow cytometry. *Microbial biotechnology* [Internet]. 2012 Nov [cited 2020 Oct 24];5(6):753. Available from: </pmc/articles/PMC3815896/>
 29. Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, et al. NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database* [Internet]. 2020 [cited 2020 Nov 8];2020. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=446&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
 30. Manske C, Hilbi H. Metabolism of the vacuolar pathogen *Legionella* and implications for virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. 2014 [cited 2020 Nov 14];4(SEP). Available from: </pmc/articles/PMC4158876/>
 31. García-Núñez M. Colonización, citopatogenicidad y persistencia de *Legionella* spp. en agua sanitaria hospitalaria. Tesis Doctoral [Internet]. 2009 [cited 2020 Dec 9]. Available from:
<https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2009/tdx-0217110-115805/mgn1de1.pdf>
 32. Van der Kooij D, Brouwer-Hanzens AJ, Veenendaal HR, Wullings BA. Multiplication of *Legionella pneumophila* Sequence Types 1, 47, and 62 in Buffered Yeast Extract Broth and Biofilms Exposed to Flowing Tap Water at Temperatures of 38°C to 42°C. *Applied and Environmental Microbiology* [Internet]. 2016 [cited 2022 Dec 9];82(22):6691. Available from:
</pmc/articles/PMC5086563/>
 33. Stewart CR, Muthye V, Cianciotto NP. *Legionella pneumophila* Persists within Biofilms Formed by *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium* sp., and *Pseudomonas fluorescens* under Dynamic Flow Conditions. *PLoS ONE* [Internet]. 2012 Nov 21 [cited 2022 Dec 17];7(11). Available from: </pmc/articles/PMC3503961/>
 34. Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, et al. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *The Journal of infectious diseases* [Internet]. 2002 Jul 1 [cited 2022 Dec 17];186(1):127–8. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12089674/>
 35. Mudali G, Kilgore PE, Salim A, McElmurry SP, Zervos M. Trends in Legionnaires' Disease-Associated Hospitalizations, United States, 2006–2010. *Open Forum Infectious Diseases* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2022 Dec 17];7(8). Available from:
<https://academic.oup.com/ofid/article/7/8/ofaa296/5872667>
 36. Arias J. Neumonía atípica, importancia de la detección oportuna de *legionella pneumophila* en Colombia. a propósito de un caso importado detectado en Bogotá en el año 2015 [Internet]. AREANDINA. Fundación Universitaria del Área Andina; 2016 [cited 2020 Dec 18]. Available from: <https://digitk.areandina.edu.co/handle/areandina/634>
 37. Harrison TG, Taylor AG. A rapid microagglutination test for the diagnosis of *Legionella pneumophila* (serogroup 1) infection. *Journal of Clinical Pathology* [Internet]. 1982 [cited 2020 Dec 19];35(9):1028. Available from: </pmc/articles/PMC497857/?report=abstract>
 38. Ta AC, Stout JE, Yu VL, Wagener MM. Comparison of Culture Methods for Monitoring *Legionella* Species in Hospital Potable Water Systems and Recommendations for Standardization of Such Methods. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* [Internet]. 1995 [cited 2021 Jan 18];33(8):2118–23. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228346/pdf/332118.pdf>

39. Centers for Disease Control and Prevention. Legionnaires Disease: Laboratory Guidance for Processing Samples | CDC [Internet]. 1992 [cited 2021 Jan 18]. Available from: <https://www.cdc.gov/legionella/labs/procedures-manual.html>
40. De Giglio O, Diella G, Trerotoli P, Consonni M, Palermo R, Tesauro M, et al. Legionella Detection in Water Networks as per ISO 11731:2017: Can Different Filter Pore Sizes and Direct Placement on Culture Media Influence Laboratory Results? *International Journal of Environmental Research and Public Health* Article [Internet]. 2020 [cited 2021 Jan 18]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7142469/pdf/ijerph-17-02077.pdf>
41. Sepúlveda M, Rodríguez M, Arboleda C, Arismendy L, Betancur J. Verificación del método de filtración por membrana para la detección y cuantificación de legionella spp. en agua potable [Internet]. 2016 [cited 2021 Jan 18]. Available from: <https://revistas.elpoli.edu.co/index.php/pol/article/view/881/1480>
42. Lösch LS, Merino LA. Presencia de Legionella spp. en depósitos domiciliarios de agua potable en Resistencia, Chaco, Argentina. Informe preliminar. *Revista Argentina de Microbiología* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2021 Jan 18];48(4):329–32. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754116300554>
43. Dimitriadi D, Velonakis E. Detection of Legionella spp. from Domestic Water in the Prefecture of Arta, Greece . *Journal of Pathogens* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jan 18];2014:1–5. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jpath/2014/407385/>.
44. Díaz-Flores Á, Montero JC, Castro FJ, Alejandres EM, Bayón C, Solís I, et al. Comparing methods of determining Legionella spp. in complex water matrices. *BMC Microbiology* [Internet]. 2015 Dec 12 [cited 2021 Jan 19];15(1). Available from: </pmc/articles/PMC4436101/>
45. Párraga-Niño N, Quero S, Ventós-Alfonso A, Uria N, Castillo-Fernandez O, Ezenarro JJ, et al. New system for the detection of Legionella pneumophila in water samples. *Talanta* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2021 Jan 19];189:324–31. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914018307057?via%3Dihub>
46. Reinthaler FF, Sattler J, Schaffler-Dullnig K, Weinmayr B, Marth E. Comparative study of procedures for isolation and cultivation of Legionella pneumophila from tap water in hospitals. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 1993 [cited 2021 Jan 20];31(5):1213. Available from: </pmc/articles/PMC262906/?report=abstract>
47. Van Kenhove E, Dinne K, Janssens A, Laverge J. Overview and comparison of Legionella regulations worldwide. *American Journal of Infection Control* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2021 Jan 20];47(8):968–78. Available from: <http://www.ajicjournal.org/article/S0196655318309957/fulltext>
48. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. ESGLI European Technical Guidelines for the Prevention, Control and Investigation, of Infections Caused by Legionella species. 2017 [cited 2021 Jan 20]; Available from: https://www.escmid.org/fileadmin/src/media/PDFs/3Research_Projects/ESGLI/ESGLI_European_Technical_Guidelines_for_the_Prevention_Control_and_Investigation_of_Infections_Caused_by_Legionella_species_June_2017.pdf
49. AENOR. UNE-EN ISO 11731:2017 Calidad del agua. Recuento de Legionella [Internet]. Madrid; 2017. Available from: <https://tienda.aenor.com/norma-une-en-iso-11731-2017-n0059300>
50. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. NTP 538: Legionelosis: medidas de prevención y control en instalaciones de suministro de agua [Internet]. Madrid; 1999. Available from:

https://www.insst.es/documents/94886/327064/ntp_538.pdf/4f52d14a-744b-46ee-ac49-ea8619dd00e9

51. Ministerio de Sanidad y Consumo. BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO LEGISLACIÓN CONSOLIDADA Real Decreto 865/2003 [Internet]. Jul 4, 2003. Available from: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2003/BOE-A-2003-14408-consolidado.pdf>
52. Serrano Suárez A. Relación de Legionella spp. con parametros microbiológicos y fisicoquímicos en aguas [Internet]. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa). Universitat de Barcelona; 2009 [cited 2021 Jan 22]. Available from: <http://www.tdx.cat/handle/10803/284890>
53. Institute of Environmental Epidemiology Ministry of the Environment. Code for Practice for the Control of Legionella Bacteria in Cooling Towers [Internet]. Singapore; Available from: <https://www.nea.gov.sg/docs/default-source/resource/practices-/code-of-practice-for-control-of-legionella-bacteria-in-cooling-towers.pdf>
54. Ministry of Health. The Prevention of Legionellosis in New Zealand: Guidelines for the control of legionella bacteria | Ministry of Health NZ [Internet]. New Zealand.; 2011 [cited 2021 Jan 24]. Available from: <https://www.health.govt.nz/publication/prevention-legionellosis-new-zealand-guidelines-control-legionella-bacteria>
55. Health and Human Services. A guide to developing risk management plans for cooling tower systems [Internet]. [cited 2021 Jan 27]. Available from: <https://silo.tips/download/a-guide-to-developing-risk-management-plans-for-cooling-tower-systems>
56. Asociación Española de Abastecimientos de Agua y Saneamiento. OPERATING GUIDE: WATER ANALYSIS LABORATORIES PART II CRITERIA TO VALIDATE PHYSICO-CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL ANALYSIS METHODS DRAFTING TEAM Experts in microbiological analysis. [cited 2021 Jan 31]; Available from: https://www.aeas.es/images/publicaciones/manuales/AEAS_Operating_Guide_Water_Analysis_Laboratories_Part_II.pdf
57. World Health Organization. Who expert committee on specifications for pharmaceutical preparation. [Internet]. 1992 [cited 2021 Feb 1]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39645/WHO_TRS_823.pdf;jsessionid=3AF814E252888AB5A77CAB77EBD7672F?sequence=1
58. Asociación Española de Normalización. UNE-EN ISO 8199:2019 Calidad del agua. Requisitos y orientaciones generales para el recuento de microorganismos mediante cultivo [Internet]. [cited 2021 Feb 1]. Available from: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0061957>
59. Celltrazone. HURO PATH S Slide Sample Processor User manual [Internet]. Celltrazone. Geumcheon-Gu, Seoul, Korea; [cited 2021 Feb 3]. Available from: https://dmec.moh.gov.vn/documents/10182/8891204/upload_00086670_1542882291262.pdf?version=1.0&fileId=8898267
60. Liofilchem. Legionella CYE Agar Base [Internet]. 2015 [cited 2021 Feb 4]. Available from: http://www.liofilchem.net/login/pd/ts/620125_TS.pdf
61. Liofilchem. Legionella BCYE Growth Supplement [Internet]. [cited 2021 Feb 4]. Available from: http://www.liofilchem.net/login/pd/pi/81056_PI.pdf
62. Invima. VALIDACION DE TECNICAS ANALITICAS [Internet]. 2015 Mar [cited 2021 Feb 20]. Available from: <https://www.invima.gov.co/documents/20143/1433420/Validaci%C3%B3n+cualitativa+Microbiolog%C3%ADa.pdf>

63. Giménez DF. Staining Rickettsiae in Yolk-Sac Cultures. <http://dx.doi.org/10.3109/10520296409061219> [Internet]. 2009 [cited 2022 Jan 4];39(3):135–40. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10520296409061219>
64. Greer PW, Chandler FW, Hicklin MD. Rapid Demonstration of Legionella pneumophila in Unembedded Tissue: An Adaptation of the Giménez Stain. *American Journal of Clinical Pathology* [Internet]. 1980 Jun 1 [cited 2022 Jan 4];73(6):788–90. Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/article/73/6/788/1777877>
65. Murcia L CAMM. Estandarización de la técnica de coloración de Gimenez para la tinción de cepas de Legionella pneumophila. [Bogota DC]; 2021.
66. Merck. Merck Microbiology Manual 12th Edition [Internet]. Merck . [cited 2022 Jan 23]. Available from: <http://www.laboquimia.es/index.php>
67. Rodríguez-Martínez S, Blanky M, Friedler E, Halpern M. Legionella spp. isolation and quantification from greywater. *MethodsX* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Mar 1];2:458–62. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221501611500059X>
68. Neogen. Agar BCYE | Medio de aislamiento de Legionella | NEOGEN [Internet]. [cited 2022 Feb 3]. Available from: <https://www.neogen.com/es/categories/microbiology/bcye-agar-legionella-isolation-medium/>
69. Bartie C, Venter SN, Nel LH. Evaluation of detection methods for Legionella species using seeded water samples. *Water SA* [Internet]. 2001 Apr 1 [cited 2022 Feb 3];27(4):523–8. Available from: <https://www.ajol.info/index.php/wsa/article/view/4966>
70. Schulze-Röbbecke, R., Hartemann, P., Fimmers, R., & Hagenau, C. Comparison of membrane filtration methods for the recovery of legionellae from naturally contaminated domestic drinking water supplies. [Internet]. 1999 [cited 2022 Feb 3] *Zentralblatt Für Hygiene Und Umweltmedizin*, 202(1), 51–59. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0934-8859\(99\)80053-4](https://doi.org/10.1016/S0934-8859(99)80053-4)
71. Matuszewska, R., & Krogulska, B. [Detection and isolation of bacteria of Legionella species from the water environment]. [Internet] 2000 [cited 2022 Feb 3] *Roczniki Panstwoweo* Available from: *Zakladu Higieny*, 51(2), 183–190. <https://europepmc.org/article/med/10959198>
72. Ezenarro JJ, Párraga-Niño N, Sabrià M, del Campo FJ, Muñoz-Pascual FX, Mas J, et al. Rapid Detection of Legionella pneumophila in Drinking Water, Based on Filter Immunoassay and Chronoamperometric Measurement. *Biosensors* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2022 Feb 25];10(9). Available from: [/pmc/articles/PMC7558583/](https://pmc/articles/PMC7558583/)
73. Cercenado E, Cantón R. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. [cited 2022 Feb 7]; Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia48.pdf>
74. Pita Fernández S, Pértegas Díaz S. Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. [Internet]. 2010 [cited 2022 Mar 1]. p. 120–4. Available from: https://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.asp
75. Gruas C, Álvarez I, Lara C, García CB, Savva D, Arruga MV. Identification of Legionella spp. in Environmental Water Samples by ScanVIT-Legionella™ Method in Spain. *Indian Journal of Microbiology* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2022 Feb 7];53(2):142. Available from: [/pmc/articles/PMC3626958/](https://pmc/articles/PMC3626958/)
76. Boulanger, C. A., & Edelstein, P. H. Precision and accuracy of recovery of Legionella pneumophila from seeded tap water by filtration and centrifugation.[Internet] 1995 *Applied*

and Environmental Microbiology, [cited 2022 Feb 7] 61(5), 1805–1809. Available from:
/pmc/articles/PMC3626958/
<https://doi.org/10.1128/AEM.61.5.1805-1809.1995>

77. Sandle T. Approaching Microbiological Method Validation. 2015 [cited 2022 Feb 7]; Available from:
https://www.researchgate.net/publication/287992312_Approaching_Microbiological_Method_Validation
78. Bedrina, B., Macián, S., Solís, I., Fernández-Lafuente, R., Baldrich, E., & Rodríguez, G. . Fast immunosensing technique to detect *Legionella pneumophila* in different natural and anthropogenic environments: comparative and collaborative trials. (2013) [cited 2022 Feb 7] *BMC Microbiology*, 13(1), 88. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-88>