



QUÉ CAMBIOS NOS APORTA LA ISO 11731:2017 PARA EL RECuento DE *LEGIONELLA SPP*





ÍNDICE

1 Introducción

2 Alcance

3 Muestreo

4 Procedimiento de análisis

4.1 Tipo de muestra

4.2 Concentración de la muestra

4.3 Pretratamiento de la muestra

4.4 Protocolo de ensayo

5 Ventajas y desventajas



1. INTRODUCCIÓN

La monitorización y análisis de *Legionella* es importante para proteger la salud pública, ya que permite identificar aquellas fuentes ambientales con riesgo de legionelosis, validar las medidas de control y verificar su efectividad.



2. ALCANCE

La norma acoge métodos aplicables a todo tipo de muestras de agua, incluyendo aguas potables, industriales, residuales y naturales, así como matrices relacionadas con el agua como por ejemplo biofilms, hisopos, sedimentos, etc.



3. MUESTREO

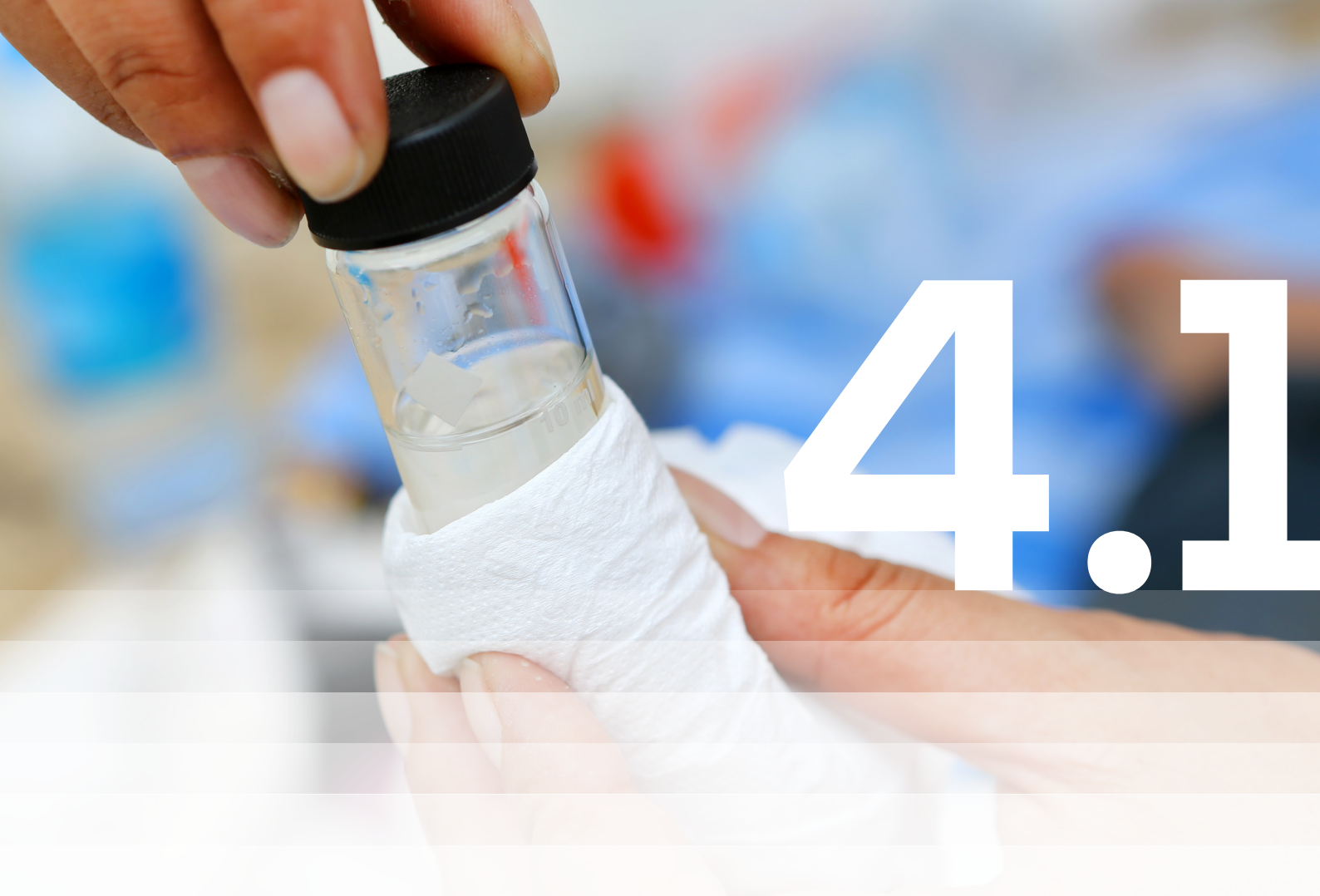
Realizar el muestreo, transporte y conservación de las muestras según la ISO 19458.



4. PROCEDIMIENTO

El procedimiento a seguir dependerá del tipo de muestra y de la concentración de *Legionella* y de flora acompañante esperada.

Si no se conoce la concentración de microorganismos en la muestra, se recomienda hacer una concentración de la misma.



4.1

4.1 TIPO DE MUESTRA

- ▶ Agua con poca flora acompañante y alta concentración de *Legionella* ($\geq 10^4$ ufc/l). Ej. Agua potable
- ▶ Agua con poca flora acompañante y poca concentración de *Legionella*. Ej. Agua potable
- ▶ Agua con elevada concentración de flora acompañante.
Ej. Torres de evaporación, aguas de proceso, etc
- ▶ Agua con muy elevada concentración de flora acompañante.
Ej. Aguas residuales



4.2 CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA

- ▶ Por filtración y siembra directa: filtrar la muestra sin tratar o ya tratada a través de un filtro ⁽¹⁾
- ▶ Por filtración y lavado: filtrar la muestra a través de un filtro ⁽²⁾. Lavar con 5-10 ml de diluyente estéril ⁽³⁾ o muestra. Dividir el concentrado en 3 porciones para hacer el pretratamiento de la muestra

⁽¹⁾ Filtros de nitrato de celulosa, de 47 mm de diámetro y tamaño de poro de 0.2 μm o 0.45 μm .

⁽²⁾ Filtros de policarbonato o polietersulfona, de 47 a 142 mm de diámetro y tamaño de poro de 0.2 μm .

⁽³⁾ Page's salino, solución Ringer diluida, PBS, agua estéril



4.3 PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

- ▶ **Tratamiento por calor:** poner la muestra en un baño de agua a $50 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 30 ± 2 minutos
- ▶ **Tratamiento ácido:** diluir 1 volumen de muestra con 9 volúmenes de solución ácida. Mezclar y dejar durante 5 ± 0.5 minutos

4.4

4.4 PROTOCOLO DE ENSAYO

Agua con ↑Legionella ↓Flora acompañante

Si se espera $>10^4$ ufc/l

Inocular 0,1-0,5 ml en:
BCYE y **BCYE+AB**

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

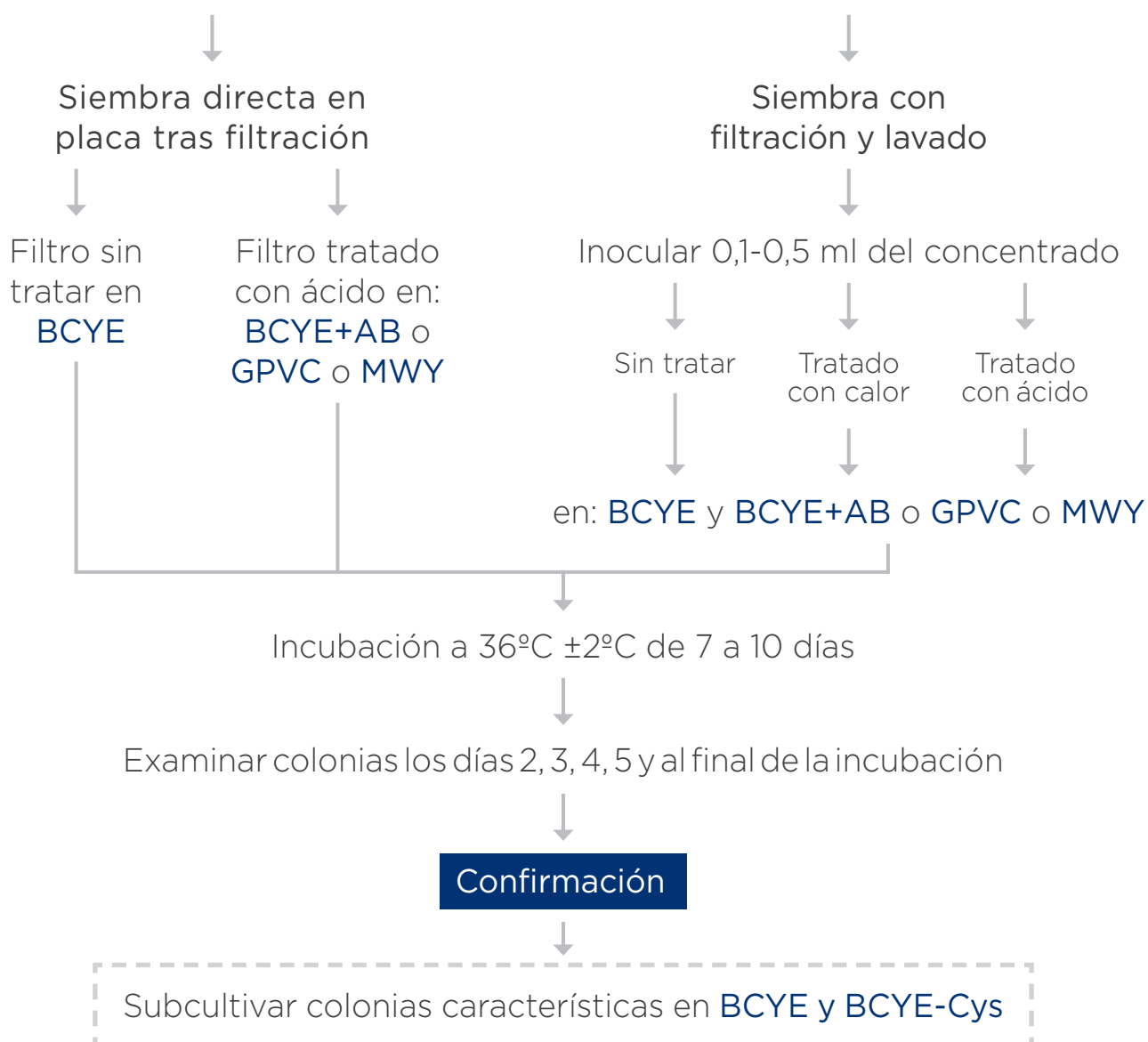
Examinar colonias los días 2, 3, 4, 5 y al final de la incubación

Confirmación

Subcultivar colonias características en **BCYE** y **BCYE-Cys**

4.4

Agua con ↓Legionella ↓Flora acompañante



4.4

Agua con ↑Flora acompañante

Submuestras

Sin concentrar
(directa)

Concentrada
por filtración

Diluida a 1:10

Dividir cada una de las submuestras en tres partes:

- Sin tratar
- Tratada con calor
- Tratada con ácido

Inocular 0,1-0,5 ml de cada una de las tres partes en: **GPVC** o **MWY**

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

Examinar colonias los días 2, 3, 4, 5 y al final de la incubación

Confirmación

Subcultivar colonias características en **BCYE** y **BCYE-Cys**

4.4

Agua con ↑Flora acompañante

Pretratamiento de la muestra
con calor y después con ácido

La muestra se divide en tres partes:

- Sin diluir
- Diluida al 1:10
- Diluida al 1:100

Inocular 0,1-0,5 ml de cada una de
las tres partes en: **GPVC** o **MWY**

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

Examinar colonias los días 2, 3, 4, 5 y al final de la incubación

Confirmación

Subcultivar colonias características en **BCYE** y **BCYE-Cys**

5

5. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS DISTINTOS MÉTODOS DE SIEMBRA

MÉTODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Siembra directa	Fácil de contar Buena recuperación	Límite de detección alto
Siembra directa del filtro	Método fácil Límite de detección bajo	Difícil de contar ⁽¹⁾ Influencia del filtro
Filtración y lavado	Fácil de contar Límite de detección bajo	Baja recuperación ⁽²⁾
Siembra después de dilución	Fácil de contar Buena recuperación	Límite de detección muy alto Protocolo más largo

⁽¹⁾ Por el crecimiento de la flora acompañante

⁽²⁾ Comparado con siembra directa o siembra directa del filtro

Referencia	Descripción	Formato
007854020	BCYEa Agar sin cisteína	20 placas x 90 mm
007853020	BCYEa Agar con cisteína	20 placas x 90 mm
032235020	BCYEa Agar con cisteína	20 placas x 90 mm
032432020	BCYEa Agar con Antibiótico	20 placas x 90 mm
007712020	GVPC Agar para <i>Legionella</i>	20 placas x 90 mm
032236020	GVPC Agar para <i>Legionella</i>	20 placas x 90 mm
007929120	GVPC Agar para <i>Legionella</i>	120 placas x 90 mm



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

