Protocolo para la recolección y el cultivo de muestras ambientales para la detección de *Legionella* spp.

Durante la investigación de un conglomerado de casos o brote asociado a cuidados de la salud

Cipolla Lucía, Rocca Florencia, Armitano Rita,

Martínez Gisela, Prieto Mónica.

Servicio Bacteriología Especial

Departamento de Bacteriología

INEI-ANLIS Malbrán

ENERO, 2023

Cipolla Lucía; Rocca María Florencia; Armitano Rita; Martínez Gisella; Prieto Mónica A. Protocolo para la recolección y el cultivo de muestras ambientales para la detección de Legionella spp. Durante la investigación de un conglomerado de caso o brote asociado a cuidados de la salud. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: ANLIS Dr.C.G.Malbrán, 2023.

Disponible en: http://sgc.anlis.gob.ar/handle/123456789/2486

Contacto: Email:

bacteriologiaespecial@anlis.gob.ar

Servicio Bacteriología Especial. Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas

"Este recurso es el resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley Nº 26.899 y la política de gestión del conocimiento de la ANLIS".

Este obra está bajo una Licencia Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

PROTOCOLO PARA LA RECOLECCIÓN Y CULTIVO DE MUESTRAS AMBIENTALES PARA LA DETECCIÓN DE *Legionella* spp. DURANTE LA INVESTIGACIÓN DE UN CONGLOMERADO DE CASOS O BROTE ASOCIADO A CUIDADOS DE LA SALUD

Ciudad Autónoma de Buenos Aires,
Argentina,
Enero 2023

TABLA DE CONTENIDO O ÍNDICE

TABLA DE CONTENIDO O ÍNDICE 4
1. INTRODUCCIÓN 5
2. CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD 5
3. OBJETIVOS DEL MUESTREO 6
4. EQUIPOS Y MATERIALES 6
5. ELECCIÓN DE LOS SITIOS PARA TOMA DE MUESTRA 7
6. PLAN DE MUESTREO 7
7. MUESTREO DE AGUA POTABLE EN LOS PUNTOS DE USO 8
8. HISOPADOS DE BIOFILMS 8
9. MUESTRAS DE AGUA 8
10. MUESTREO DE AGUA POTABLE EN LOS TANQUES DE AGUA CALIENTE (cisterna, termotanque) 9
11. ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE 11
12. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EXAMEN BACTERIOLÓGICO 11
13. MEDIOS DE CULTIVO PARA LA RECUPERACIÓN DE *Legionella* spp 12
14. PROCEDIMIENTO DE SIEMBRA 12
15. EXÁMEN DE LOS CULTIVOS 13
16. ENRIQUECIMIENTO DE CALOR 14
17. REFERENCIAS 14

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad causada por las bacterias gramnegativas del género *Legionella* se conoce comúnmente como legionelosis. La legionelosis consta de dos síndromes clínicos distintos, la enfermedad del legionario y la fiebre de Pontiac. La enfermedad del legionario se caracteriza por neumonía, mientras que la fiebre de Pontiac es una enfermedad autolimitada, no neumónica, similar a la influenza. Se presume que la inhalación de aerosoles que contienen la bacteria es el principal medio de contraer legionelosis. Los aerosoles de aguas de las torres de refrigeración, los condensadores evaporativos, las duchas y los humidificadores se han identificado como fuentes de infección. Las especies de *Legionella* se han recuperado de una amplia variedad de sistemas de agua domésticos y son ubicuas en ambientes de agua dulce. Los sistemas domésticos son entornos complejos en los que las concentraciones de legionelas pueden fluctuar considerablemente dependiendo de la temperatura del agua, los niveles de biocidas y la presencia de huéspedes naturales (protozoos) para que las bacterias los parasiten. La elección del procedimiento utilizado para recuperar la legionela de las muestras de agua depende del grado esperado de contaminación bacteriana en una fuente de agua en particular. Las aguas potables generalmente tienen densidades bacterianas bajas y se cultivan directamente o se concentran para detectar legionelas. Las aguas no potables, como las de las torres de enfriamiento, generalmente no requieren concentración debido a sus altas concentraciones bacterianas.
Este manual describe procedimientos para procesar muestras ambientales obtenidas durante las investigaciones de brotes de legionelosis. Incluye información sobre la recolección y concentración de muestras de agua, y procedimiento para el examen bacteriológico.

El muestreo solo debe realizarse después de una evaluación ambiental completa y la realización de un plan de muestreo.

2. CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD

El modo de transmisión es a través de la inhalación de aerosoles que contienen *Legionella* spp. La aspiración de agua contaminada con *Legionella* ha sido descripta también como modo de transmisión.
El personal que toma las muestras en un sistema de agua implicado como fuente de infección debería cumplir con todos los procedimientos de seguridad ocupacional y salud.
Se deben tomar las precauciones para evitar la exposición a aerosoles generados durante el muestreo. Aún los chorros de agua que corren lentamente pueden producir aerosoles. Entonces, cuando se tomen muestras de agua, se debe utilizar una máscara facial N95 para minimizar la exposición de aerosoles.
Se debe tomar recaudos también cuando se toman muestras de compost o suelos, para evitar la inhalación de partículas. Cuando se muestrean estos materiales, se debe utilizar una máscara protectora de polvo fuertemente ajustada que proteja tanto la boca como la nariz. Idealmente, también se debería utilizar antiparras protectoras.
En todos los casos de muestreo, se deben lavar las manos y secarlas luego de la toma

de muestras y antes de comer, beber o fumar. El personal encargado de la toma de muestras debería haber recibido capacitación y entrenamiento en el manejo del riesgo y control de *Legionella*. El personal debe ser entrenado también en el correcto uso de escaleras, debe informárseles acerca del riesgo para prevenir caídas cuando se movilizan en espacios aéreos o alrededor de torres de enfriamiento. Se debe utilizar ropa protectora y máscaras para evitar el contacto o inhalación de material inusual.

3. OBJETIVOS DEL MUESTREO

Los objetivos del muestreo ambiental son:

- Confirmación o exclusión del sitio implicado como fuente de infección
- Evaluación del riesgo del/los sistemas de agua implicados
- Diferenciación entre colonización local o sistémica en el sistema de agua
- Controlar la temperatura, presión y flujo de agua en el sistema de distribución
- Selección de la estrategia más apropiada para el control de Legionella en el sitio

4. EQUIPOS Y MATERIALES

- Botellas con capacidad de 1000 ml estériles conteniendo 200 miligramos de tiosulfato para neutralizar restos de cloro u otro biocida con composición halogénica presente en la muestra.
- Solución 0.1N de tiosulfato de sodio (Na2S2O3) (15.81 g / L en agua destilada, filtrar esterilizar, reemplazar cada 12 meses)
- Tubos de plástico estéril de 15 ml con tapa de rosca para hisopados de biofilm.
- Hisopos descartables con punta de polipropileno/dacrón con tallos de madera o plástico. NO usar hisopos con punta de algodón porque inhiben el crecimiento de *Legionella*.
- Etiquetas
- Botella de plástico estéril de 500 mL o 1 L para medir el nivel de cloro, el pH y la temperatura.
- Kit de prueba de pH
- Kit de prueba de cloro lo suficientemente sensible como para detectar niveles de cloro por debajo de 2 ppm y hasta 10 ppm (puede necesitar dos kits).
- El cloro libre se puede medir cuando se sabe que el cloro es el método de desinfección (a diferencia de monocloramina, bromo u otro desinfectante). De lo contrario, medir el cloro total
- Termómetro
- Muestra de hoja de datos y bolígrafos
- Recipiente transportador con refrigerantes donde deben caber las botellas de 1 L, los tubos de plástico de 15 ml para hisopados, el termómetro y los kits de prueba de pH y cloro.
- Termómetro calibrado, rango 10ºC a 100ºC
- Botella plástica con desinfectante recién preparado, ej.: dilución 1/10 de hipoclorito de sodio (lavandina)
- Toallas de papel
- Toallitas embebidas en alcohol

- Guantes de látex descartables
- Camisolines.
- Guantes de goma
- Máscaras faciales N95
- Escalera
- Destornilladores y herramientas
- Refrigerantes
- Bolsas plásticas estériles con cierre zip-lock4. TRANSMISIÓN

5. ELECCIÓN DE LOS SITIOS PARA TOMA DE MUESTRA

Los sitios de muestreo escogidos deben ser representativos de todas las áreas de riesgo identificadas donde *Legionella* spp. puede sobrevivir y proliferar.
El criterio para la elección de los sitios a muestrear depende de la naturaleza de las instalaciones. Para instalaciones amplias pueden necesitarse múltiples muestras. Para comenzar, se deben examinar las instalaciones para establecer todos los sistemas que utilizan agua teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- Áreas que contienen agua a temperaturas apropiadas para el desarrollo de *Legionella*, (mayor a 20°C y menor de 60°C)
- Contaminación cruzada entre agua estancada y agua fluyente
- Sitios en los cuales se puedan formar aerosoles que se liberen al medio ambiente
- Sitios que contienen vegetación o acumulación de polvo y tierra.

Todos los tanques de almacenamiento de agua, cilindros de agua caliente, fuentes decorativas, baños spa, piscinas spa, piscinas termales, vaporizadores, torres de enfriamiento, humidificadores y cualquier sistema de distribución de agua con agua re- circulante o reservorios de agua donde el agua puede llegar a temperaturas mayores a 20 °C pero menores de 60 °C, deben ser considerados fuentes potenciales para el desarrollo de *Legionella* spp. La contaminación puede producirse durante actividades de construcción edilicia o alteraciones del edificio. Cuando se investiguen las fuentes de exposición ante casos de legionelosis se debe determinar si ha existido actividad de plomería o trabajo de construcción en el edificio implicado o cerca del mismo.

6. PLAN DE MUESTREO

- Establecer la posición de todos los tanques maestros, calentadores de agua y cisternas de almacenamiento. Determinar las posiciones de todas las salidas de agua caliente (canilla, duchas, etc.), así como el tanque de origen. Realizar el mismo procedimiento para el agua fría. Una vez realizado el diagrama de distribución tanto para el agua caliente como del agua fría, decidir donde serán recolectadas las muestras.
- Inspeccionar las cañerías. Tomar nota de los materiales tanto de los caños como de las salidas de agua (cobre, galvanizado, acero, PVC, etc.).
- Inspeccionar los sistemas de calentamiento y tomar nota del tipo de sistema: eléctrico o gas.

7. MUESTREO DE AGUA POTABLE EN LOS PUNTOS DE USO

IMPORTANTE: En la mayoría de las situaciones, es apropiado tomar muestras sólo del agua caliente. Sin embargo, hay situaciones en las que es útil tomar algunas muestras de agua fría. Por ejemplo, en climas cálidos, el agua fría puede estar lo suficientemente caliente para una rápida amplificación de *Legionella*. La desalinización también puede elevar la temperatura del agua fría. El agua fría también puede estar caliente debido a la falta de aislamiento entre las tuberías de agua fría y caliente.

CONSIDERACIONES GENERALES:
Recolectar un hisopo del biofilm y una muestra de chorro de agua de cada sitio de muestreo (es decir, cada cabezal de ducha o grifo). Para las duchas, solicitar al personal de mantenimiento de las instalaciones que retire la ducha. Para los grifos, pedir que retiren el aireador.

8. HISOPADOS DE BIOFILMS

1. Abrir el agua durante un par de segundos para humedecer la tubería y luego apagar.
2. Insertar un hisopo estéril con punta de polipropileno o dacrón profundamente en el grifo / tubería. Tratar de ir más allá de la curva y pasar el hisopo alrededor de la superficie interior con firmeza sin romper el vástago del hisopo.
3. Colocar el hisopo en un tubo de plástico estéril de 15 ml y agregue de 3 a 5 ml de agua del mismo grifo para mantener la punta del hisopo húmeda durante el transporte. Agregar una gota de solución de tiosulfato de sodio 0.1N para neutralizar los desinfectantes residuales.
4. Etiquetar el tubo con un identificador único. Registrar el tipo y la ubicación de la muestra en una hoja de datos de muestra y colocar el tubo en el recipiente transportador con refrigerante

9. MUESTRAS DE AGUA

1. Después de recolectar el hisopo de biofilm, abrir el agua y dejar correr hasta que el agua esté tibia pero no caliente. El objetivo es obtener agua que se encuentra actualmente en la tubería detrás del accesorio junto con cualquier material desprendido de la biopelícula. Evitar calentar el agua en exceso (aproximadamente 50ºC o más) ya que la *Legionella* morirá rápidamente a temperaturas elevadas. Recoger 1 L de agua del grifo en una botella estéril de 1 L, dejando un espacio de 2.5 cm en la parte superior.
2. Añadir 0,5 ml de solución de tiosulfato de sodio 0,1 N a la muestra de agua para neutralizar los desinfectantes residuales. Apretar la tapa de la botella para evitar fugas.

3. Etiquetar la botella con un identificador único. Registrar el tipo y la ubicación de la muestra en la Hoja de datos de la muestra y colocar en el recipiente transportador con refrigerante.

Medir los parámetros del agua:
Dejar correr el agua caliente hasta que esté lo más caliente posible. Recojer de 100 a 300 ml de agua en una botella de muestreo de plástico separada. La misma botella se puede utilizar para medir los parámetros del agua en cada sitio de muestreo. Medir la temperatura, el pH y el nivel de cloro de la muestra. Registrar todos los datos medidos en la hoja de datos de muestra. Si el agua tarda más de un minuto en calentarse, podría indicar un problema local, como con una válvula mezcladora o un desequilibrio en todo el sistema.

10. MUESTREO DE AGUA POTABLE EN LOS TANQUES DE AGUA CALIENTE (cisterna, termotanque)

CONSIDERACIONES GENERALES:

Dejar correr chorro de agua por al menos 30 segundos antes de recoger la muestra. Cuando se toman muestras de tanques de almacenamiento o termotanques a partir de una salida directa, se deben tomar dos muestras. Muestra de primer chorro que representará la flora bacteriana de la salida de agua y muestra de segundo chorro que representará la flora bacteriana residente en la fuente de agua. El tiempo apropiado que se debe dejar fluir el agua entre la toma de la primera muestra y la segunda dependerá de la longitud de la cañería entre el tanque y el flujo de agua utilizado. Para la mayoría de las situaciones domésticas que utilizan un flujo moderado, un periodo de 2 minutos es suficiente.

1. Recoger solamente una muestra de agua. Es raro que se pueda obtener una muestra de biofilm de un tanque de agua, ya que esto requeriría drenar completamente el tanque.
2. Solicitar al personal de mantenimiento de las instalaciones que abra la válvula de drenaje del tanque de agua y recoja 1 L de agua en una botella de 1 L estéril.
3. Añadir 0,5 ml de solución de tiosulfato de sodio 0,1 N a la muestra de agua para neutralizar los desinfectantes residuales. Apriete la tapa de la botella para evitar fugas.
4. Etiquetar la botella con un identificador único. Registrar el tipo y la ubicación de la muestra en la hoja de datos de la muestra, y colocarla en el recipiente transportador con refrigerante.

   NOTA: Medir y registrar siempre la temperatura, el pH y el nivel de cloro de la muestra de agua recogida.

   En el cuadro 1 se detallan los potenciales sitios para el muestreo de agua potable:

Cuadro 1: LISTA DE POTENCIALES SITIOS DE MUESTREO DE AGUA POTABLE

SITIO	N° MUESTRAS	TIPO Y VOLÚMEN DE MUESTRA
Cañería de agua entrante (donde el agua ingresa a la instalación / edificio desde el municipio)	1	1 LITRO
Si no es agua de red, cada pozo o torre de agua que suministra agua a la instalación	1 por pozo o torre	1 LITRO
Cada tanque de almacenamiento o cisterna (1)	1 POR TANQUE O CISTERNA	1 LITRO
Calentador de agua centralizado	1	1 LITRO
Tanque de expansión de agua caliente	1	1 LITRO
Ducha (2)	2 por ducha	1 hisopado del biofilm y 1 litro de agua
Grifos (2)	2 o 3 por grifo	1 hisopo de biofilm dentro del grifo (1 hisopo de biofilm del interior del aireador si la inspección visual indica que está cubierto de biofilm), 1 litro de agua a granel.
Fuentes decorativas	2	1 litro de agua y un hisopo del biofilm (el número de hisopos depende del tamaño y la complejidad del accesorio)
Sistemas de rociadores	>2	1 litro de agua y uno o varios hisopados del biofilm de las rosetas
Nebulizadores, bolsas de reanimación manuales, ventiladores de respiración de presión positiva intermitente y otros equipos de cuidado respiratorio que usan agua para llenar o limpiar	>2	Hisopos del biofilm de las superficies húmedas y 1 litro de agua que se utiliza para limpiar el dispositivo
Humidificadores	2	Hisopos del biofilm de las superficies húmedas y el mayor volumen de agua cercano a 1 litro que se pueda recoger
Duchas de seguridad y estaciones de lavado de ojos	2	Hisopos del biofilm de las superficies húmedas y 1 litro de agua

(1) Al tomar muestras de agua de cada tanque de almacenamiento y cada reservorio de agua caliente, generalmente, la muestra del "primer chorro" representa el agua inmediatamente adyacente a la salida y captura la microbiota de la salida y la cañería adyacente. La muestra de "segundo chorro" representa el agua de la fuente alimentadora y captura la microbiota residente en el lugar. El tiempo apropiado que se debe dejar fluir el agua entre la toma de la primera muestra y la segunda dependerá de la longitud de la cañería entre el tanque y el flujo de agua utilizado. Para la mayoría de las situaciones domésticas que utilizan un flujo moderado, un periodo de 2 minutos es suficiente.

(2) Se deben tomar muestras de todas las duchas y grifos de todas las habitaciones de los casos, junto con las duchas y los grifos de los lavabos en las habitaciones adicionales. Elija habitaciones próximas y distales a los elevadores o calentadores de agua y en varios pisos según los resultados de la evaluación ambiental. Idealmente, pruebe al menos un par de puntos de salida en cada piso y / o ala.

11. ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

Enviar las muestras a temperatura ambiente y protegidas de la luz antes de las 24 horas posteriores a su recolección. Si el envío se demora, mantener y enviar refrigeradas a 10º C. NO congelar.
Todas las botellas y/o hisopos deben estar rotulados con información detallada de sitio de toma y si se trata de primer o segundo chorro.

12. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EXAMEN BACTERIOLÓGICO

a) Filtración (agua potable)
Las muestras se filtran y concentran en una cabina de seguridad biológica vertiéndolas en un embudo de filtración estéril de 47 mm que contiene un filtro de policarbonato de 0,2 µm. Se necesita una fuente de vacío y un matraz de brazo lateral para operar el aparato. Se debe tener cuidado para evitar el secado de los filtros. Cuando la muestra ha pasado por el filtro, se retira asépticamente el filtro del soporte con pinzas estériles para filtros, se dobla hacia afuera y se coloca en un tubo de centrífuga estéril de 50 ml que contiene 5 ml de agua estéril. Luego, el tubo de centrífuga se agita durante un (1) minuto para liberar las bacterias y el material orgánico del filtro. Si se requiere más de un filtro para concentrar una muestra, los filtros adicionales se agregan al mismo tubo de muestra.

b) Siembra Directa (agua no potable)
El agua no potable rara vez requiere concentración y puede procesarse directamente. Las muestras que se encuentran con altas concentraciones de bacterias en placas directas pueden tratarse con un tampón de pH bajo o diluirse en serie con agua desionizada estéril, un tampón apropiado o agua del grifo estéril sin cloro para mejorar el aislamiento primario de *Legionella*.

Características microbiológicas de la muestra de agua	Procedimiento sugerido		
Elevado recuento bacteriano (hisopados, agua no potable)	Pre-tratamiento ácido o térmico	Siembra de 0.1 ml en paca de agar BCYE	Incubar a 35°C en atmósfera de 2.5% de CO2. Examinar colonias sospechosas al día 4 y 7
Moderado recuento bacteriano (tanques de agua caliente, agua no potable)	Siembra de 0.1 ml en paca de agar BCYE	Incubar a 35°C en atmósfera de 2.5% de CO2. Examinar colonias sospechosas al día 4 y 7	
Bajo recuento bacteriano (agua potable)	Concentrar por filtración	Siembra de 0.1 ml en paca de agar BCYE	Incubar a 35°C en atmósfera de 2.5% de CO2. Examinar colonias sospechosas al día 4 y 7

13. MEDIOS DE CULTIVO PARA LA RECUPERACIÓN DE *Legionella* spp

El agar carbón tamponado y extracto de levadura (BCYE), que contiene alfa-cetoglutarato al 0,1 % es el medio base utilizado para la recuperación de *Legionella* a partir de muestras ambientales y clínicas. Los medios más utilizados en el procesamiento de muestras ambientales incluyen dos tipos de agar BCYE selectivo complementado con agentes antimicrobianos. El primero, denominado PCV, contiene polimixina B, cicloheximida y vancomicina. El segundo, GPCV, es idéntico a PCV excepto por la adición del aminoácido glicina al medio. Se puede utilizar PCV sin L-cisteína como medio de control negativo. En caso de no estar disponible la mezcla de antibióticos, se puede realizar una descontaminación ácida y térmica previa a la siembra.
Aunque la mayoría de Legionella spp. crecen fácilmente en BCYE, algunas especies requieren suplementos con seroalbúmina bovina para mejorar el crecimiento. *Legionella micdadei* y varias cepas de *Legionella bozemanii* desarrollan mejor en BCYE con 1,0% de seroalbúmina.

14. PROCEDIMIENTO DE SIEMBRA

Muestra concentrada por filtración:
1. Después de agitar con vórtex el filtro inocular 1 placa de BCYE, 2 PCV y 2 GPCV y 1 PCV (-) con 0,1 ml de la suspensión cada una y extender con un ansa estéril o una varilla de plástico desechable estéril.
2. Incubar las placas a 35°C en un frasco con vela o en una incubadora humidificada con una atmósfera de 2,5% de CO2 en el aire.
3. Guardar el resto de la muestra a 4°C.

Muestra sin concentrar:
1. Inocular 0,1 ml de la muestra en placas BCYE y BCYE modificadas como se describe anteriormente y extender con una varilla de vidrio estéril o un esparcidor de plástico desechable estéril.
2. Incubar las placas como se describe arriba.

Tratamiento ácido
Para algunas muestras de agua con altas concentraciones de bacterias, es necesario utilizar un procedimiento selectivo para reducir el número de bacterias no-legionella antes del cultivo. El tratamiento con ácido y el calentamiento de las muestras se utilizan habitualmente para este fin. Las legionelas son más resistentes a un pH más bajo y a una breve exposición a temperaturas más altas que muchas otras bacterias de agua dulce.

Reactivos para el procedimiento de tratamiento ácido
Solución 1: 0.2 M KCl (14.9 g/L en agua destilada)
Solución 2: 0.2 M HCl (16.7 g/L in agua destilada)
Mezclar 18 partes de la solución 1 con 1 parte de la solución 2. Fraccionar en tubos con tapa a rosca en volúmenes de 10 ml y esterilizar por autoclavado (121°C -15 minutos).

1. Colocar 1,0 ml de la suspensión agitada en vórtex en un tubo de centrífuga estéril de 15 ml que contenga 1,0 ml de tampón ácido y mezclar.
2. Incubar la suspensión acidificada durante 15 minutos a temperatura ambiente. (El tratamiento con ácido se puede extender a 30 minutos si las placas crecen demasiado después del tratamiento inicial de 15 minutos).
3. Colocar 0,1 ml de la suspensión en placas BCYE y BCYE modificadas y extiéndalas con una varilla de vidrio estéril o un esparcidor de plástico desechable estéril.
4. Incubar las placas a 35°C en un frasco con vela o en una incubadora humidificada con una atmósfera de 2,5% CO2 en aire.

15.EXÁMEN DE LOS CULTIVOS

1. Examinar todos los cultivos después de 72 a 96 horas de incubación. Las colonias sospechosas son convexas y redondas con bordes enteros (Figura 1). El centro de la colonia suele ser de color blanco brillante con una apariencia texturizada que se ha descrito como "como un cristal tallado" o moteada. El centro blanco de la colonia a menudo está bordeado con autofluorescencia azul, púrpura, verde o roja. Un examen más detallado de las placas de aislamiento primario con luz ultravioleta de onda larga puede detectar fácilmente estas colonias fluorescentes.
2. Las colonias sospechosas pueden ser identificadas rápidamente por MALDITOF-MS. Las colonias identificadas como L. pneumophila o Legionella sp deben ser subcultivadas y remitidas al Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) de la ANLIS Malbrán para confirmación de la identificación y estudios genómicos. Eligir de 2 a 4 colonias representativas por muestra de agua.
   En caso de no contar con MALDITOF-MS, subcultivar cada colonia sospechosa en una placa de agar BCYE y en agar sangre. Si desarrolla en agar sangre, puede descartarse Legionella spp. Si no se detecta crecimiento en agar sangre después de 24-48 horas, continúe la incubación del BCYE hasta observar desarrollo y derivar al LNR para confirmación.
3. Dado que Legionella es una bacteria de crecimiento relativamente lento, las placas negativas se deben volver a incubar hasta 10 días después de la inoculación y luego volver a examinarlas para detectar colonias de Legionella. Desechar las placas después del décimo día.

Figura 1: Colonias de *L. pneumophila* en BCYE, 4 días de incubación

Foto: Servicio Bacteriología Especial, Departamento de Bacteriología, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

16. ENRIQUECIMIENTO DE CALOR

El enriquecimiento con calor de muestras que son negativas para *Legionella* en el cultivo primario puede mejorar significativamente la recuperación de este organismo. Este procedimiento se basa en el hallazgo de que muchas muestras de agua contienen protozoos que pueden servir de huésped para la multiplicación intracelular de legionelas. La incubación de las muestras a 35 °C permite que las legionelas se multipliquen en estos protozoos y alcancen una concentración cultivable. Se incuban alícuotas de veinticinco mililitros de las muestras a 35 °C en tubos de centrífuga de plástico con tapón de rosca de 50 ml. Con muestras de hisopados, se incuba en tubos que deben cerrarse fuertemente para minimizar la evaporación de los 3-5 ml de muestra de agua que los acompañan. Las muestras incubadas se cultivan a intervalos de 2 semanas durante un máximo de 6 semanas. Si se produce un crecimiento excesivo de los medios, las muestras se pueden tratar con ácido como se describió anteriormente.

17. REFERENCIAS

Este protocolo fue realizado en base a la norma ISO 11731:2017 y las recomendaciones y procedimientos utilizados por CDC, Public Health UK, ECDC y OMS.

ISO 11731:2017: Water quality — Enumeration of *Legionella*

Toolkit for Controlling *Legionella* in Common Sources of Exposure. Disponible en: https://www.cdc.gov/legionella/index.html

Chartier Y, Lee JV, et al, editors. *Legionella* and the prevention of legionellosis. 1st edition. Geneva: World Health Organization; 2007. p. 175–92.Available at. http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf

Legionnaires' disease. The control of legionella bacteria in water systems Approved Code of Practice and guidance on regulations. 4°Ed. Disponible en: https://www.hse.gov.uk/pubns/priced/l8.pdf