

Verificación de un método alternativo de detección y cuantificación de *Legionella* spp. en un laboratorio de salud pública: separación inmunomagnética (SIM) e identificación mediante reacción colorimétrica

Verificação de um método alternativo de detecção e quantificação de *Legionella* spp. num laboratório de saúde pública: separação imunomagnética e identificação por reação colorimétrica (SIM)

Verification of an Alternative Method of Detection and Quantification of *Legionella* spp. in a Public Health Laboratory: Immunomagnetic Separation (IMS) and Identification by Colorimetric Reaction

Eva Álvarez Merchán, Juan Manuel Fernández Gallego, Juan Carlos Montero Rubio

Instituto de Ciencias de la Salud, de Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. España.

Cita: Álvarez-Merchán E, Fernández-Gallego JM, Montero-Rubio JC. Verificación de un método alternativo de detección y cuantificación de *Legionella* spp. en un laboratorio de salud pública: separación inmunomagnética (SIM) e identificación mediante reacción colorimétrica. Rev. Salud ambient. 2021; 21(1):4-15.

Recibido: 6 de mayo de 2020. **Aceptado:** 30 de diciembre de 2020. **Publicado:** 15 de junio de 2021.

Autor para correspondencia: Juan Carlos Montero Rubio.

Correo e: jcmontero@jccm.es

Instituto de Ciencias de la Salud, de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. España.

Financiación: Este grupo no ha contado con ningún tipo de financiación para el desarrollo de su trabajo.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses que hayan influido en la realización y preparación de este trabajo.

Declaraciones de autoría: Todos los autores contribuyeron al diseño del estudio y a la redacción del artículo. Asimismo todos los autores aprobaron su versión final.

Resumen

El Real Decreto 865/2003 para la prevención y control de la legionelosis menciona el método de cultivo de la norma ISO 11731 para el ensayo de *Legionella* spp, norma en torno a la cual, se definen límites paramétricos. Las debilidades observadas en esta ISO (falsos negativos y elevados tiempos de espera), han hecho necesario buscar métodos alternativos. Se estudia si el método de separación inmunomagnética y cuantificación por colorimetría de *Legionella* spp, Legipid® Legionella Fast Detection, (SIM), es adecuado y eficiente en un laboratorio oficial de Salud Pública para muestras ambientales de agua. En ausencia de una metodología normalizada para verificar métodos alternativos, se ha diseñado un método para realizar esta verificación, teniendo en cuenta los criterios específicos para análisis microbiológicos y la guía para kits de ensayo de ENAC. Así, se han calculado los parámetros de precisión y recuperación en las muestras inoculadas y, además, la linealidad a partir de la pendiente y la ordenada en el origen de la relación entre absorbancia y unidades formadoras de colonias, comparando los datos experimentales obtenidos con los resultados de la validación del método. Los resultados fueron satisfactorios en todos los casos. Una dispersión inferior al 20 %, una recuperación del 4 - 71 % y una linealidad conforme con la validación a un nivel de significación superior al 95 %. En base a estos resultados se considera que el método SIM es un método válido para la detección y cuantificación de *Legionella* spp. en un laboratorio oficial de salud pública.

Palabras clave: *Legionella* spp.; verificación; separación inmunomagnética; cuantificación; precisión; recuperación; linealidad.

Resumo

O Real Decreto 865/2003 para a prevenção e controle da legionelose menciona o método de cultivo da norma ISO 11731 para o teste de *Legionella spp.*, uma norma em torno da qual são definidos limites paramétricos. As fragilidades observadas nesta ISO (falsos negativos e longos tempos de espera) obrigaram à procura de métodos alternativos. Estuda-se, se o método de separação imunomagnética e quantificação por colorimetria de *Legionella spp.*, Legipid® *Legionella Fast Detection*, (SIM), é adequado e eficiente num laboratório oficial de Saúde Pública, para amostras ambientais de água. Na ausência de uma metodologia padronizada para verificar métodos alternativos, desenhou-se um método para realizar essa verificação, tendo em conta os critérios específicos para análises microbiológicas e o guia ENAC para kits de teste. Assim, foram calculados os parâmetros de precisão e recuperação nas amostras inoculadas e, adicionalmente, a linearidade da inclinação e da ordenada na origem da relação entre absorbância e unidades formadoras de colônia, comparando os dados experimentais obtidos com os resultados de método de validação. Os resultados foram satisfatórios em todos os casos. Uma dispersão inferior a 20 %, uma recuperação de 4 % - 71 % e uma linearidade de acordo com a validação a um nível de significância superior a 95 %. Com base nesses resultados, o método SIM é considerado um método válido para a deteção e quantificação de *Legionella spp.* num laboratório oficial de saúde pública.

Palavras-chave: *Legionella spp.*; verificação; separação imunomagnética; quantificação; exatidão; recuperação; linearidade.

Abstract

Spanish Royal Decree 865/2003 on the prevention and control of legionellosis mentions the culture method of standard ISO 11731 for testing *Legionella spp.*, a standard which sets different parametric levels. The weaknesses that have been detected in the method of said standard (false negatives and high waiting times) have made it necessary to look for alternatives. The aim of this study is to determine whether the method of immunomagnetic separation (IMS) and quantification of *Legionella spp.* Legipid® *Legionella Fast Detection* is suitable and effective for analyzing environmental water samples in an official public health laboratory. In the absence of a standardized methodology for verifying alternative methods, we devised a method for carrying out this verification taking into account specific criteria for microbiological analysis and the ENAC's guide for test kits. Thus, we calculated the parameters of precision and recovery of the inoculated samples, as well as the linearity from the slope and the ordinate at the origin of the absorbance-colony forming unit (CFU) relationship, and compared the experimental data we obtained with the results of the validation of the method. The results were satisfactory in all cases: a dispersion below 20 %, a recovery in the 4-71 % range, and a linearity compliant with the validation with a significance level exceeding 95 %. Based on these results, we consider the ISM method to be a valid method for detecting and quantifying *Legionella spp.* in an official public health laboratory.

Keywords: *Legionella spp.*; verification; immunomagnetic separation; quantification; accuracy; recovery; linearity.

INTRODUCCIÓN

La legionelosis es una enfermedad con una amplia distribución geográfica, hasta el punto de que puede considerarse mundial. Sin embargo, su incidencia es más alta en los países más desarrollados, seguramente debido a que poseen un mayor número de instalaciones en las que la *Legionella spp.* es capaz de proliferar y diseminarse. Así, en Europa, Australia y Estados Unidos son detectados entre 10 y 15 casos por millón de habitantes al año¹ y además parece que es una enfermedad cuya incidencia va en aumento. En 2017 se observó un aumento del 30 % en el número de habitantes europeos afectados en comparación con el año anterior² y en enero de 2018 las autoridades del CDC (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de EE. UU.) informaron de un aumento en la incidencia de la legionelosis en Estados Unidos, multiplicándose por 4,5 anualmente desde el año 2000³⁻⁵.

No cabe duda que una característica que contribuye a la alta incidencia de la enfermedad es la capacidad de la bacteria de crecer y multiplicarse en el interior de protozoos, siendo estos su hospedador natural^{6,7}. Esta característica no solo les confiere resistencia a las fluctuaciones que pudiesen ocurrir en su ambiente acuático, incluida la desinfección, sino que también parece estar relacionada con su capacidad infectiva⁸. Pero además, esta propiedad está íntimamente relacionada con la dificultad para ser cultivada en el laboratorio, puesto que al encontrarse de forma libre o concentrada en vacuolas intracelulares, una unidad formadora de colonias contada en placa podría ser el resultado del crecimiento de una sola célula o de cientos de bacterias vivas presentes en una vesícula, en el caso de encontrarse en el interior de hospedadores⁹. A este respecto se han encontrado diferencias de resultados por cultivo de entre 1 y 2 unidades logarítmicas entre alícuotas de una misma muestra analizadas con diferencia de tiempo entre 6 y 48 horas, debido seguramente a la liberación por lisis de las bacterias contenidas en su interior¹⁰.

El método de cultivo de *Legionella* spp., además, tiene otras debilidades que se manifiestan habitualmente en la práctica diaria de un laboratorio. Por ejemplo, esta bacteria posee un lento crecimiento en cultivo, en torno a cinco días o una semana, lo que además de retrasar la resolución de algunas situaciones sanitarias de riesgo urgentes, como los brotes, permite, sobre todo en muestras muy sucias, que crezcan antes otros microorganismos acompañantes. Esto último impide en algunos casos el aislamiento posterior de colonias de *Legionella* spp., bien porque colonizan toda la placa con un crecimiento invasivo o confluyente^{11,12}, bien porque algunos microorganismos que han crecido más rápidamente inhiben el crecimiento en placa de la propia *Legionella* spp.^{13,14}.

Todo ello lógicamente puede llevar a subestimar el riesgo real de una instalación. Sin embargo, en España el cultivo es el método exigido por el RD 865/2003 y por tanto el de referencia para su detección y cuantificación. Este Real Decreto dice en su artículo 6 que con carácter complementario se tendrá en cuenta lo establecido en la norma UNE 100030 IN, en la que se especifica que *“el análisis debe realizarse de acuerdo con la norma UNE-EN ISO 11731 o, alternativamente, mediante la utilización de técnicas que cuentan con una certificación nacional o internacional que valide su protocolo, siendo el método de referencia, el de cultivo”*.

Asimismo, el Real Decreto 865/2003 dispone que los análisis de aislamiento de *Legionella* spp. en agua deben ser realizados en laboratorios acreditados, o con un sistema implantado de control de calidad para este tipo de ensayos¹⁵. Esto en la práctica requiere demostrar conformidad con la norma UNE-EN ISO 17025 sobre requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Y esta norma exige la necesidad de *“usar métodos y procedimientos apropiados para todas las actividades del laboratorio”* y, para conseguirlo, exige al laboratorio *“verificar que puede llevar a cabo apropiadamente los métodos antes de utilizarlos, asegurando que puede lograr el desempeño requerido”*¹⁶.

La validación y la verificación han sido desarrolladas en las normas de la serie ISO 16140. En este sentido, la norma UNE-EN ISO 16140-1 define la validación de un método como el *“establecimiento de las características de comportamiento de un método y la provisión de evidencia objetiva, que demuestre que se cumplen los requisitos de comportamiento para un uso previsto”*¹⁷. Y, además, la norma UNE-EN ISO 16140-2, añade como requisito que los estudios de validación *“se desarrollen por parte de organizaciones dedicadas a la validación de métodos”*¹⁸. La validación por tanto no es una obligación de los laboratorios de ensayo, sino de los laboratorios que desarrollan y comercializan los métodos, y son

ellos los que deben establecer *“las características de comportamiento de un método”* y proveer *“de evidencia objetiva”* de que se adecua al *“uso previsto”*.

En este caso concreto, el método de separación inmunomagnética (SIM) con cuantificación espectrofotométrica, está validado, siendo la AOAC International (Association of Official Analytical Collaboration) la entidad competente que lo ha certificado, por lo que cumple el primer requisito requerido en la UNE-EN ISO 17025.

También la norma UNE-EN ISO 16140-1 define la verificación como la *“demostración de que un método validado, utilizado por un usuario, funciona conforme a las especificaciones del método determinadas en el estudio de validación y que resulta adecuado para sus objetivos”*¹⁷. Este por tanto sí es un objetivo de los laboratorios de salud pública. Por desgracia, en la actualidad, no hay un criterio normalizado para la verificación de métodos en muestras ambientales, como ya existe en muestras clínicas con la guía EP-15 *User verification of precision and bias estimation*. En la actualidad dentro del entorno de la ISO 17025 se está trabajando en la elaboración de la norma UNE-EN ISO 16140-3: *“Protocolo para la verificación de métodos de referencia y métodos alternativos validados implementados en un laboratorio”*¹⁹. Por tanto, se hace necesario el diseño y desarrollo de un procedimiento *ad hoc* para cada método, si se quiere dar cumplimiento a los requerimientos de la norma UNE-EN ISO 17025 en un método alternativo ya validado.

En este trabajo, para el diseño de un protocolo de verificación, tratándose de un método microbiológico, se ha considerado necesario aplicar los criterios específicos de acreditación recogidos en el documento de la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) CEA-ENAC-20 rev.1 de mayo de 2017. En este, se indica que para métodos cuantitativos normalizados y basados en métodos normalizados, se deben confirmar al menos recuperación y reproducibilidad de las características de funcionamiento del método, y se menciona que *“el laboratorio debe disponer de un control de calidad para realizar el seguimiento de la validez de los ensayos”* como así se recoge en la norma UNE-EN ISO/IEC 17025²⁰. Además, como este método se presenta en forma de kit de ensayo, se han seguido las directrices recogidas en la *Guía para la selección y utilización de kits de ensayo por los laboratorios acreditados de ENAC*²¹.

Bajo estos criterios, en este trabajo se lleva a cabo la verificación del método SIM como una alternativa al cultivo para la detección y cuantificación de *Legionella* spp. en aguas, aplicando las directrices de las normas UNE-EN ISO 16140, la legislación vigente y los criterios de acreditación que exige ENAC.

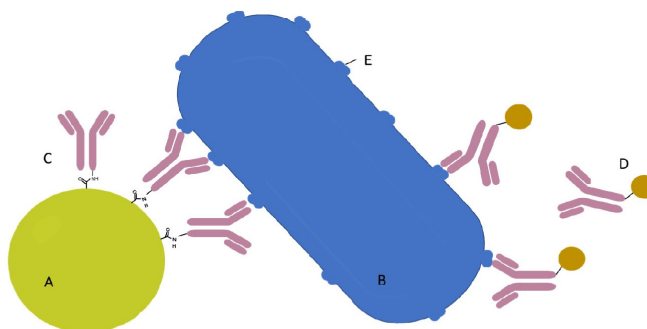
MATERIAL Y MÉTODOS

1. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Este método se basa en la unión de partículas magnéticas a la bacteria mediante anticuerpos que han sido inmovilizados en dichas partículas. De este modo,

se forman complejos que pueden separarse fácilmente del resto de sustancias presentes en la muestra mediante un imán. Una vez formados los complejos, estos son incubados con anticuerpos policlonales específicos conjugados con una enzima, obteniéndose complejos marcados que pueden ser observados por colorimetría tras añadir el sustrato enzimático (figura 1).

Figura 1. Esquema del método de separación inmunomagnética



A. Partícula magnética ; B. Célula de *Legionella* ; C. Anticuerpo de captura ; D. Anticuerpo de lectura (conjugado) ; E. Antígenos

2. MATERIAL

Para la realización del ensayo se utilizaron los eluyentes y reactivos suministrados en el kit Legipid® Legionella Fast Detection.

La filtración se realizó sobre membranas de polycarbonato 0,4 µm, suministrados por Millipore™ (ref. HTTP04700).

Cepas y/o material de referencia utilizado en la verificación

El material de referencia utilizado en la verificación fue la suspensión (Levertest Lp, ref.:711-10-00), consistente en *Legionella pneumophila* serogrupo 1 (ATCC 33152). Cada lote deriva de cultivos ensayados por triplicado en placas Agar BCYE α + GVPC incubadas a 36 ± 1 °C durante 3-4 días.

Descripción de las muestras

Se utilizaron muestras de agua representativas de dos tipos de matrices. Teniendo como base los criterios recogidos en el anexo H de la norma UNE-EN ISO 11731 se seleccionó el agua de consumo como matriz de aguas con una baja concentración de microbiota acompañante y agua procedente de torres de refrigeración como matriz para aguas con una alta concentración de microbiota acompañante.

Las muestras fueron seleccionadas entre las recogidas de forma rutinaria por el laboratorio.

El ensayo se llevó a cabo a partir de un volumen de muestra de partida de 10 litros, del que se toman alícuotas de 1 litro, y se dopan individualmente.

3. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Cada muestra analizada se concentra con un equipo de filtración a vacío y filtros estériles de polycarbonato. Posteriormente se eluye por agitación utilizando el agitador vórtex. Sobre este concentrado se añade una suspensión de partículas magnéticas inmuno-activadas con un anticuerpo anti-*Legionella*. Las células presentes en la muestra preparada se unirán a los anticuerpos inmovilizados en la superficie de las partículas, para formar complejos de bacterias/partículas. A continuación, los complejos obtenidos son incubados con anticuerpos policlonales específicos conjugados con una enzima, obteniéndose complejos marcados que son detectados por colorimetría tras añadir el sustrato enzimático (Legipid® Legionella Fast Detection. Biótica, España).

La lectura se obtiene mediante un fotómetro (Primelab 2.0 Multitest, Water ID, Alemania). Un control negativo (sin microorganismo diana) se ensaya en paralelo en otra cubeta de control. La variabilidad entre lotes está sujeta a control de calidad realizado por el fabricante.

El cálculo se lleva a cabo sustituyendo el resultado obtenido en la ecuación de la recta obtenida en su proceso de validación^{22,23}.

$$Y = 2,3061X + 4,9815$$

Donde,

$$X = \log_{10}(A_r)$$

$$Y = \log_{10}N \left(\frac{UFC}{9 \text{ ml del concentrado}} \right)$$

Siendo,

A_r - la absorbancia relativa medida por el fotómetro.

N - el número de UFC equivalentes detectadas en la muestra analizada.

Estos cálculos son realizados por el programa incorporado en el fotómetro PrimeLab. Los resultados se reportan como unidades formadoras de colonia equivalentes (UFC eq), es decir, la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) que se habrían obtenido utilizando el método de cultivo en ausencia de microbiota interferente, células de *Legionella* spp. libres e intactas, con los antígenos expresados y accesibles a los anticuerpos.

4. VERIFICACIÓN DE LA RECTA DE CALIBRADO DEL MÉTODO DE SEPARACIÓN INMUNOMAGNÉTICA (SIM) Y DETECCIÓN COLORIMÉTRICA DE *LEGIONELLA* SPP

Fundamento

En la validación del método publicada se encontró una relación lineal entre la absorbancia y las UFC equivalentes. El objetivo de este análisis, siguiendo los requerimientos de la *Guía para la selección y utilización de kits de ensayo por los laboratorios acreditados*, es verificar que los resultados obtenidos experimentalmente en el ensayo de nuestro laboratorio se encuentran dentro de los intervalos de confianza obtenidos en la validación del método²².

Desarrollo experimental

Se llevó a cabo la inoculación con el material de referencia *Legionella pneumophila* serogrupo 1, en formato de suspensión (Levertest Lp, ref.: 711-10-00, Biótica, España), a tres niveles de contaminación, utilizando 1, 0,5 y 0,2 ml del patrón, completando hasta llegar a un volumen de 9 ml con el eluyente L0 suministrado en el kit Legipid® *Legionella* Fast Detection.

Se analizaron 5 réplicas y un control negativo para cada uno de los niveles. Con los resultados se compararon los valores obtenidos para la pendiente y la ordenada en el origen con los intervalos de confianza al 95 %.

Los criterios de aceptación y rechazo (valores logarítmicos en base 10) fueron:

- para la pendiente, el intervalo [1,83, 2,78].
- para la ordenada en el origen, el intervalo [4,53, 5,43].

5. VERIFICACIÓN DE LA REPRODUCIBILIDAD Y LA RECUPERACIÓN

Fundamento

Los criterios específicos de acreditación para análisis microbiológicos (CEA-ENAC-20 Rev. 1 mayo 2017) exigen que, en un método de ensayo cuantitativo, al menos, deben confirmarse los parámetros de reproducibilidad y recuperación²⁰.

La reproducibilidad se define como la "precisión de la medida bajo condiciones de medida de reproducibilidad". Estas condiciones "incluyen medidas con localizaciones, analistas, sistemas de medida y replicados de medida diferentes sobre un mismo objeto u objetos similares"¹⁷.

Para determinar la reproducibilidad del método se ha utilizado la sistemática de verificación propuesta por el Gabinete de Servicios para la Calidad (GSC)²⁴.

La recuperación es "la proximidad de la concordancia entre el valor de una cantidad medida y el valor de una cantidad asignada a un mesurando"¹⁷. En este caso, se calcula como el cociente entre el valor obtenido y el valor de referencia, expresado en forma de porcentaje:

$$\text{Recuperación}(\%) = \frac{V_{\text{obtenido}}}{V_{\text{referencia}}} \cdot 100$$

Desarrollo experimental

Las matrices utilizadas en el cálculo de la reproducibilidad y la recuperación se seleccionaron en base a los criterios de la UNE-EN ISO 11731 (Anexo H)²⁵. En concreto se seleccionaron dos matrices representativas de las muestras recibidas habitualmente, al menos en cuanto a microbiota acompañante y grado de contaminación no microbiana se refiere, y que, además, son consideradas como ejemplo de dos de los niveles establecidos en la norma UNE-EN ISO 11731, publicada en 2017:

- A. Aguas de consumo: representativa de aguas con poco nivel de microorganismos acompañantes.
- B. Torres de refrigeración: representativa de aguas con alto nivel de microorganismos acompañantes.

La reproducibilidad y la recuperación del método se analizaron en tres niveles de concentración de *Legionella* spp. diferentes, a partir de la inoculación en las matrices seleccionadas del mismo material de referencia (Levertest Lp, ref.: 711-10-00, Biótica, España) que en el ensayo de verificación de la recta de calibrado.

Los criterios de aceptación y rechazo en este caso son:

- A. Para la reproducibilidad: el criterio es tener unos valores de dispersión de resultados menores a los obtenidos en la validación publicada en la UNE-EN ISO 11731 para los diferentes métodos de cultivo y los diferentes niveles de contaminación de fondo (niveles de microbiota acompañante). En la tabla 1 se presentan los valores de validación obtenidos y descritos en la norma de recuento de *Legionella* spp. mediante cultivo.

- B. Para la recuperación: no existe en la norma UNE-EN ISO 11731 ningún valor objetivo publicado obtenido de la validación, ni se ha encontrado otro valor de referencia en la bibliografía, por lo que la evaluación no se llevará a cabo y se quedará el resultado únicamente como dato orientativo del funcionamiento del método y como referencia para el posterior control de calidad.

Este ensayo se desarrolla en dos etapas:

1. Titulación del material de referencia (etapa preliminar)

Se titularon tres niveles de contaminación: alto, medio y bajo (1,0 ml, 0,5 ml y 0,2 ml). Para ello se realizó el ensayo Legipid® en cada uno de ellos por triplicado con un control negativo por cada tanda. A partir de los resultados, se calcula la media aritmética, la desviación típica y la incertidumbre de la cepa, sobre los valores expresados en logaritmos de base 10. Estos resultados de titulación serán considerados el valor de referencia para los ensayos de reproducibilidad y recuperación.

Tabla 1. Parámetros para las características de funcionamiento de ensayo interlaboratorio. Recuperado de UNE-EN ISO 11731:2017, Calidad del agua. Recuento de *Legionella*. Anexo H. Datos de funcionamiento

Procedimiento	Concentración de microorganismos interferentes	Reproducibilidad (%)
Inoculación directa	Baja	56,4 %
Filtro sobre placa	Baja	65,9 %
Filtración con elución	Baja	49,5 %
Filtración con elución	Alta	54,0 %
Inoculación directa e inoculación tras dilución	Alta	78,5 %
Inoculación directa e inoculación tras dilución	Muy alta	46,0 %

2. Verificación de la Reproducibilidad y la Recuperación

Se inoculan 10 muestras de un litro para cada nivel de contaminación titulado (alto, medio y bajo) y para cada matriz seleccionada (agua de consumo y torres de refrigeración) y se analizan por el método que estamos verificando. Posteriormente se realizan los cálculos estadísticos descritos en el fundamento de la reproducibilidad y la recuperación.

En la titulación se realizan 5 réplicas por cada matriz y nivel seleccionados y, del mismo modo en la inoculación de matrices se realizan 10 réplicas por cada matriz y nivel.

RESULTADOS

1. VERIFICACIÓN DE LA CURVA

Los resultados obtenidos en la verificación de la curva se recogen en la tabla 2, siendo para la pendiente y la ordenada en el origen 2,27 y 5,27 respectivamente. Ambos se encuentran dentro de los intervalos de confianza propuestos por el fabricante.

Tabla 2. Resultados de la verificación de la curva

Datos experimentales		Parámetros de la recta de verificación		Intervalos de confianza de la recta de validación ²³	
Log ₁₀ UFC	Media ABS Log ₁₀	Pendiente	Ordenada	Para la pendiente, 95 %	Para la ordenada, 95 %
4,83	-0,22	2,27	5,27	[1,83-2,78]	[4,53-5,43]
4,12	-0,47				
3,31	-0,88				

2. VERIFICACIÓN DE LA EXACTITUD Y LA REPRODUCIBILIDAD: AGUAS DE CONSUMO

En la tabla 3 se muestran los resultados de la titulación e inoculación de la matriz aguas de consumo, con 3 niveles de contaminación del microorganismo diana. Los valores de reproducibilidad son muy similares, en torno al 44 %. Sin embargo, en el caso de la exactitud, los resultados obtenidos en los diferentes niveles están más dispersos, encontrándose entre el 23,20 % y el 71,42 %.

3. VERIFICACIÓN DE LA EXACTITUD Y LA REPRODUCIBILIDAD: TORRES DE REFRIGERACIÓN

Para la matriz torres de refrigeración se presentan los mismos resultados que en el caso anterior (tabla 4). La reproducibilidad, en este caso, se sitúa entre el 27,72 % y el 48,57 % y la exactitud entre el 3,85 % y el 13,38 %, más bajas que para la matriz anterior.

Tabla 3. Resultados experimentales obtenidos para la matriz aguas de consumo

	Matriz Aguas de consumo							
	Titulación			Matriz			Parámetros	
	Media Xr	Desviación Sr	Nº réplicas	Media Xr	Desviación Sr	Nº réplicas	Reproducibilidad (%)	Recuperación (%)
R. Alto (1ml)	4,36E+04	1,21E+04	5	1,01E+04	4,74E+03	10	46,86	23,20
R. Medio (0,5 ml)	1,78E+04	9,65E+03	5	5,47E+03	2,35E+03	10	42,89	30,77
R. Bajo (0,1 ml)	5,02E+03	2,99E+03	5	3,59E+03	1,59E+03	10	44,25	71,42

Tabla 4. Resultados experimentales obtenidos para la matriz torres de refrigeración

	Matriz Torres de refrigeración							
	Titulación			Matriz			Parámetros	
	Media Xr	Desviación Sr	Nº réplicas	Media Xr	Desviación Sr	Nº réplicas	Reproducibilidad (%)	Recuperación (%)
R. Alto (1ml)	4,30E+05	8,76E+04	5	5,75E+04	2,29E+04	10	38,89	13,38
R. Medio (0,5 ml)	3,33E+05	1,32E+05	5	1,80E+04	4,98E+03	10	27,72	5,40
R. Bajo (0,1 ml)	5,59E+05	2,47E+05	5	2,15E+04	1,05E+04	10	48,57	3,85

DISCUSIÓN

En primer lugar, se quiere destacar que, como se explicó en la introducción, no existe una normativa en la que se describa una metodología específica para verificar las capacidades de un laboratorio en la realización de un método siguiendo las especificaciones de su validación para muestras ambientales y, por tanto, basándose en la incompleta normativa que hoy existe, ha sido necesario realizar un diseño de verificación para esta técnica alternativa. Quizás, este estudio y otros como este, podrían servir de base para establecer una sistemática adecuada a este propósito.

Por otro lado, y ya examinando los resultados obtenidos en la verificación de la recta de calibrado, se comprueba que estos son conformes con los resultados publicados en la validación realizada por los desarrolladores del método^{22,23}. Así, los valores experimentales obtenidos para la pendiente y la ordenada en el origen se encuentran dentro de los intervalos de confianza establecidos en la validación (tabla 2), demostrando el cumplimiento de los requisitos establecidos para el uso previsto del kit, así como la competencia técnica del propio laboratorio.

En cuanto al análisis de la recuperación y la reproducibilidad, en primer lugar, hay que tener en cuenta que en este trabajo se han seleccionado las mismas matrices que en la validación publicada en la norma de referencia (Anexo H de la norma UNE-EN ISO 11731:2017)²⁵. Estas matrices se clasificaron en función de la cantidad de microbiota acompañante en la muestra, pues esta es una característica que afecta considerablemente en las técnicas de cultivo, disminuyendo la sensibilidad del método al inhibir o enmascarar el crecimiento del microorganismo diana y provocando una tasa de resultados no concluyentes de hasta un 20 %^{26,27}. Lo ideal para evaluar los datos de funcionamiento de la cuantificación de *Legionella* spp. mediante SIM habría sido seleccionar las matrices de forma más específica para el método verificado, pero, como se explica en el apartado de Material y métodos, se han elegido las matrices en función del Anexo H de la UNE-EN ISO 11731:2017. Sin embargo, esta elección de matrices hubiera tenido el gran inconveniente de que no se habrían podido comparar los resultados frente al método considerado de referencia.

Antes de un análisis más pormenorizado de los datos obtenidos, se debe tener en cuenta que el trabajo realizado es una verificación de los parámetros de validación y, por tanto y atendiendo a las recomendaciones de las diferentes guías referenciadas en la bibliografía, se realizan un número muy limitado de réplicas. Para un análisis más ajustado se deberá comprobar si este comportamiento se mantiene en los resultados que se

obtengan en el posterior control de calidad¹⁶. Por tanto, estos datos pueden ser modificados hacia una mayor o menor reproducibilidad y recuperación cuando se vayan obteniendo nuevos datos.

En los resultados obtenidos, lo primero que llama la atención en la recuperación es el amplio rango que presenta para las diferentes matrices analizadas, entre 71,42 % y un 3,85 %. Esta inestabilidad podría simplemente reflejar la alta reproducibilidad de las técnicas de detección de *Legionella* spp., como se discutirá más adelante, aunque también podría ser debida a una inadecuada selección de las matrices, como se explicó anteriormente. Pero, como se dijo también anteriormente, estos datos deben ser considerados con bastante cautela debido al bajo número de réplicas realizadas.

En todo caso, se puede observar que en torres de refrigeración las recuperaciones más bajas se producen en el nivel medio y bajo, sin embargo, en aguas de consumo las recuperaciones más altas se observan en niveles bajos. Como en el caso de la reproducibilidad estos comportamientos se deberán analizar para observar si se mantienen o son corregidos al aumentar el número de muestras.

Sin embargo, la reproducibilidad muestra unos resultados mucho más parecidos en todos los niveles y matrices analizadas, estando prácticamente en todos en torno al 40 %. Pero lo más importante es que en todos los casos son más bajos que los de la validación publicada en la norma de referencia, la UNE-EN ISO 11731 y, por tanto, muestran un método ligeramente más preciso o en consonancia con el método de referencia²⁵. Así, para aguas de consumo los datos de precisión obtenidos están en un rango entre el 42,9 % y el 46,9 %, mientras que el valor de referencia en el método de cultivo es, en el mejor de los casos (filtración con elución), de 49,5 % (tabla 1). Por su parte, el rango para torres de refrigeración se sitúa entre el 27,72 % y el 48,57 %. En este caso el resultado más bajo obtenido en la validación en el método de cultivo es de 54,0 % (tabla 1).

Si se comparan, tanto los valores de referencia de reproducibilidad obtenidos en la técnica de cultivo, como los valores obtenidos en esta verificación, con los obtenidos en validaciones de otros tipos de microorganismos que habitualmente son manejados en laboratorios de microbiología de aguas y alimentos, se observa que se obtienen valores especialmente altos (tabla 5)²⁸⁻³¹. Esta alta dispersión analítica muestra la naturaleza extraordinariamente compleja de la *Legionella* spp., algo que, sin duda, afecta a nuestra capacidad de estudio de esta bacteria y se debe tener en cuenta en la interpretación de los resultados de las muestras de rutina.

Tabla 5. Reproducibilidad de los ensayos de: Enterococos intestinales, *E. coli* y bacterias coliformes, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter* spp.

Microorganismo	Enterococos intestinales ³¹	<i>E. coli</i> y bacterias coliformes ³⁰	<i>Listeria monocytogenes</i> ²⁹	<i>Campylobacter</i> spp. ²⁸
Reproducibilidad (%)	4,45	3,3	2,73	2,53

Sin duda esta falta de precisión y recuperación es la principal motivación para buscar técnicas alternativas y, sobre todo, complementarias en la detección y recuento de *Legionella* spp., y no solo porque la presencia de microbiota acompañante o el origen heterogéneo de las unidades formadoras de colonia de una placa condicionen el resultado en la técnica de cultivo, como se describió brevemente en el apartado de introducción. Nuestra capacidad analítica también puede verse afectada por el estado metabólico de la bacteria, ya que *Legionella* spp. es una bacteria pleomórfica y hasta la fecha se ha podido evidenciar la diferenciación de 14 formas que presentan notables diferencias entre ellas³². Estas formas se alternan en complejos ciclos de vida descritos en dos esquemas fundamentales interconectados entre sí, uno de desarrollo extracelular y otro intracelular³³ y recientes estudios demuestran que no todas sus formas son igualmente cultivables, tal y como se reflejaba en la monografía sobre *Diagnóstico microbiológico y control de la legionelosis de la Sociedad Española de Infectología y Microbiología Clínica (SEIMC)*³⁴.

El ciclo de desarrollo extracelular es el que ocurre en los medios de cultivo artificiales ricos en nutrientes y también en comunidades microbianas libres como las presentes en las biopelículas³⁵. Se puede describir sintéticamente como un ciclo bifásico de alternancia entre las formas denominadas de fase exponencial replicativa (EPF), y las de fase estacionaria transmisiva (SPF)³².

La forma EPF es considerada como no infecciosa, sin embargo, la SPF sí lo es, constituyendo el modelo de *Legionella* spp. para estudiar los mecanismos moleculares de diferenciación en formas transmisivas³³. Ambas pueden dar lugar a formas filamentosas (FF) y, pese a que los mecanismos de filamentosidad aún no se conocen demasiado, se observa como la diferenciación hacia FF está ligada a situaciones de estrés, como la falta de nutrientes o la presencia de antibióticos. Estas FF también son capaces de iniciar infecciones en células epiteliales del pulmón y macrófagos^{32,36}.

Por su parte, y también de forma muy simplificada, en el desarrollo intracelular podemos distinguir dos formas fundamentales: las formas infecciosas maduras (MIF) y las formas de fase replicativa (RPF). Las formas MIF son fundamentalmente transmisivas, móviles y dependiendo

de sus necesidades ecológicas pueden presentar características morfológicas y fisiológicas relacionadas con la adaptación y supervivencia tanto en medio extracelular, como en el interior de un hospedador y diferentes comportamientos en cuanto a su virulencia en función del tipo de hospedador infectado. Sin embargo, las formas RPF, no son virulentas, metabólicamente activas, no persistentes en el medio ambiente y, además, morfológicamente indistinguibles de las formas replicativas del ciclo extracelular (EPF)^{37,38}.

El problema es que tanto las formas MIF como las formas EPF y SPF pueden entrar en el estado de forma viable, pero no cultivable (VBNC). En este estado fisiológico reversible, la bacteria no crece en el medio de cultivo, pero conserva no solo las características de célula viable, sino en el caso de las células MIF también las de transmisividad y virulencia^{39,40}. La incubación fuera del rango normal de temperatura, la ausencia de nutrientes, la variación de concentración de oxígeno o la presencia de metales pesados son factores que inducen esta diferenciación⁴¹. En medios con escasez de nutrientes y a 45 °C se estima que entre un 70 % y un 90 % de las formas MIF entran en estado de VBNC³².

Todo lo anterior nos lleva a la conclusión de que con el cultivo no es posible controlar todas las situaciones de riesgo asociadas a una instalación, puesto que con esta técnica no es posible detectar y cuantificar la *Legionella* spp. en todas sus formas o con cualquiera que sea su microbiota acompañante. Sin embargo, es indispensable para obtener células vivas que nos sirvan para identificaciones serológicas o moleculares más precisas cuando epidemiológicamente sea necesario.

Por tanto, otros procedimientos, basados en otras técnicas, se convierten en herramientas complementarias al método de referencia, aumentando el control sobre las instalaciones de riesgo, facilitando una estrategia de prevención basada en una evaluación integral del riesgo y favoreciendo un control efectivo en situaciones de brotes, ya que se puede detectar *Legionella* spp. donde antes no se era capaz debido a las limitaciones del cultivo.

Esto significa que con las técnicas alternativas no siempre se van a obtener resultados equivalentes a la técnica de cultivo, sobre todo en muestras reales, pues precisamente con estas técnicas lo que se pretende es

soslayar aquellos escenarios en los que no es posible cultivar *Legionella* spp. Pero los resultados sí deben de ser comparables, tanto para dar cumplimiento a las obligaciones legislativas como para poder realizar una evaluación adecuada del riesgo de una instalación. Una de las dificultades para poder comparar los resultados es que las distintas técnicas miden propiedades diferentes de la bacteria y por tanto los resultados se expresan en diferentes unidades. Para evitar este problema, en este caso, los resultados se han convertido en unidades formadoras de colonias equivalentes, que se corresponden con el resultado que cabría esperar mediante cultivo si todas las células están libres, intactas, accesibles, poco o nada agregadas, expresan sus antígenos relacionados con la virulencia, y son capaces de crecer *in vitro*.

Estas nuevas técnicas poseen sus fortalezas, pero también sus debilidades, algunas todavía por revelarse cuando su uso sea más generalizado. Por ejemplo, no sabemos cómo puede afectar a la técnica de inmunoensayo, y en concreto a la absorbancia final de los complejos formados, la presencia de óxidos de hierro o cualquier otra sustancia que coloree la muestra, ni tampoco sabemos si en las distintas formas descritas en párrafos anteriores se producen con igual facilidad las uniones Ag-Ac. En este sentido es necesario discutir ciertas dificultades que han surgido a lo largo del desarrollo experimental en esta verificación.

El principal problema fue la imposibilidad de usar un material de referencia fabricado en el laboratorio a partir de la técnica de cultivo. Esto es debido a que *Legionella pneumophila*, en un medio de cultivo rico en nutrientes, sigue el ciclo bifásico descrito en los párrafos anteriores sobre el desarrollo extracelular de la bacteria, presentando ambas formas dificultades para ser detectadas mediante separación inmunomagnética^{35,42}. Por tanto hubo que usar el material refrigerado adecuado que se dispone actualmente de forma comercial (Levertest Lp, ref.: 711-10-00, Biótica, España).

Este material de referencia, al ser titulado (etapa preliminar), presenta un intervalo de concentración tan amplio que los resultados de distintos niveles de dopaje en volumen se encuentran en el mismo orden de magnitud. Un ejemplo de lo anteriormente expuesto se puede observar en la tabla 3, en aguas de consumo para los niveles de 0,5 ml y 1 ml. Esta incertidumbre tan amplia podría ser debida a la complejidad del propio microorganismo, que en ocasiones forma agregados que, al romperse, aumentan la superficie de interacción para la reacción antigénica, aumentándose así el número de UFC detectadas. Etapas de desagregación durante la preparación del material podrían reducir la agregación, pero todavía sería distinta a la que puede encontrarse en el medio natural. Además, el propio método de refrigeración como conservación del material disminuye

la expresión antigénica. Actualmente se está trabajando en materiales congelados y ultracongelados, que aumenten su estabilidad.

Como conclusión final, se puede afirmar que el SIM, al igual que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es un método adecuado para la cuantificación de la *Legionella* spp. y además ofrece ciertas características como la rapidez del análisis o la posibilidad de detectar células viables pero no cultivables, que lo convierten en una herramienta que puede suplir algunas de las carencias del método de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Legionelosis. [actualizado en 2018; citado el 02 de marzo de 2020] Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/legionellosis>.
2. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Legionnaires' disease. En: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019.
3. Yackley JK, Sweat D, Fill MMA, Garman K, Dunn JR. Notes from the field: Legionellosis outbreak associated with a hotel aquatics facility - Tennessee, 2017. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2018; 67(2):77-8.
4. CDC. Legionella: surveillance and reporting. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2017.
5. Beer KD, Gargano JW, Roberts VA, Reses HE, Hill VR, Garrison LE, et al. Outbreaks associated with environmental and undetermined water exposures-United States, 2011-2012. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2015; 64:849-51.
6. Rasch J, Krüger S, Fontvieille D, Ünal CM, Michel R, Labrosse A, et al. Legionella-protozoa-nematode interactions in aquatic biofilms and influence of Mip on *Caenorhabditis elegans* colonization. Int J Med Microbiol 2016; 306(6):443-51.
7. Rowbotham TJ. Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. Isr. J. Med. Sci. 1986; 22(9):678-89.
8. Lau HY, Ashbolt NJ. The role of biofilms and protozoa in Legionella pathogenesis: Implications for drinking water. J Appl Microbiol. 2009; 107(2):368-78.
9. Berk SG, Ting RS, Turner GW, Ashburn RJ. Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. Appl Environ Microbiol. 1998; 64(1):279-86.
10. McCoy WF, Downes EL, Leonidas LF, Cain MF, Sherman DL, Chen K, et al. Inaccuracy in Legionella tests of building water systems due to sample holding time. Water Res. 2012; 46(11):3497-506.
11. Yu VL. Legionella pneumophila (Legionnaires' disease). En: Principles and Practice of Infectious Disease 1990; 1764-74.
12. Prats Pastor G, Domínguez García A. Legionella: el microorganismo. Medicina clínica 2002; 119(2):9-13.
13. Gião MS, Azevedo NF, Wilks SA, Vieira MJ, Keevil CW. Interaction of legionella pneumophila and helicobacter pylori with bacterial species isolated from drinking water biofilms. BMC Microbiology. 2011; 11:57.

14. Buse HY, Donohue MJ, Ashbolt NJ. Hartmannella vermiformis inhibition of Legionella pneumophila cultivability. *Microb Ecol.* 2013; 66(3):715-26.
15. Real Decreto 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. BOE nº 171, de 18 de julio.
16. International Standards Organization: International standard ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva, Switzerland: International Standards Organization (International Organization for Standardization); 2017.
17. International Standards Organization: International standard ISO 16140-1. Microbiology of the food chain. Method validation. Part 1: Vocabulary. Geneva, Switzerland: International Standards Organization (International Organization for Standardization); 2016.
18. International Standards Organization: International standard ISO 16140-2. Microbiology of the food chain. Method validation. Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Geneva, Switzerland: International Standards Organization (International Organization for Standardization); 2016.
19. International Standards Organization: International standard ISO 16140-3. Microbiology of the food chain. Method validation. Part 3: Protocol for the verification of validated reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. Geneva, Switzerland: International Standards Organization (International Organization for Standardization); under development.
20. Entidad Nacional de Acreditación (ENAC): CEA-ENAC-20 Rev. 1: Criterios específicos de Acreditación. Análisis microbiológico. Madrid, España: Entidad Nacional de Acreditación; 2017.
21. Entidad Nacional de Acreditación (ENAC): G-ENAC-20 Rev. 1: Guía para la selección y utilización de kits de ensayo por los laboratorios. Madrid, España: Entidad Nacional de Acreditación; 2017.
22. Rodríguez Albalat G, Bedrina Broch B, Jiménez Bono M. Validation of the Legipid® Bioalarm Legionella assay. *J AOAC Int.* 2012; 95(5):1440-51.
23. Rodríguez Albalat G, Bedrina Broch B, Jiménez Bono M. Method modification of the Legipid® Legionella fast detection test kit. *J AOAC Int.* 2014; 97(5):1403-9.
24. Cruz C, Laso J. Precisión de los métodos cuantitativos en microbiología. Comparativa de distintas sistemáticas de cálculo. *Vi Iberolab Precisión.* 2010; (1):1-4.
25. International Standards Organization: International standard ISO 11731. Water quality- Enumeration of Legionella. Geneva, Switzerland: International Standards Organization (International Organization for Standardization); 2017.
26. Lee TC, Vickers RM, Yu VL, Wagener MM. Growth of 28 Legionella species on selective culture media: a comparative study. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(10):2764-8.
27. García MT, Jones S, Peláez C, Millar RD, Abu Kwaik Y. Acanthamoeba polyphaga resuscitates viable non-culturable Legionella pneumophila after disinfection. *Environ Microbiol.* 2007; 9(5):1267-77.
28. Asociación Española de Normalización. UNE-EN ISO 10272-2. Microbiología de la cadena alimentaria - Método horizontal para la detección y enumeración de Campylobacter spp. Parte 2: Técnica de recuento de colonias. Madrid, España: (AENOR); 2018.
29. Asociación Española de Normalización. UNE-EN ISO 11290-2. Microbiología de la cadena alimentaria - Método horizontal para la detección y el recuento de Listeria monocytogenes y Listeria spp. Parte 2: Método de recuento. Madrid, España: (AENOR); 2018.
30. International Standards Organization: International standard ISO 9308-3. Water quality - Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria - Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) for the detection and enumeration of E. coli in surface and wastewater. Geneva, Switzerland: International Standards Organization (International Organization for Standardization); 1998.
31. International Standards Organization: International standard ISO 7899-1. Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci - Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) for surface and wastewater. Geneva, Switzerland: International Standards Organization (International Organization for Standardization); 1998.
32. Robertson P, Abdelhady H, Garduño RA. The many forms of a pleomorphic bacterial pathogen-the developmental network of Legionella pneumophila. *Front Microbiol.* 2014; 5:670.
33. Oliva G, Sahr T, Buchrieser C. The life cycle of L. pneumophila: Cellular differentiation is linked to virulence and metabolism. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018; 8:3.
34. Ausina V, Catalán V, Cercenado E, Peláez-Antolín C. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: Diagnóstico microbiológico y control de la legionelosis. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 2005.
35. Molofsky AB, Swanson MS. Differentiate to thrive: Lessons from the Legionella pneumophila life cycle. *Mol Microbiol.* 2004; 53(1):29-40.
36. Piao Z, Sze CC, Barysheva O, Iida KI, Yoshida SI. Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by Legionella pneumophila. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(2):1613-22.
37. Garduño RA, Garduño E, Hiltz M, Hoffman PS. Intracellular growth of Legionella pneumophila gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect Immun.* 2002; 70(11):6273-83.
38. Faulkner G, Garduño RA. Ultrastructural Analysis of Differentiation in Legionella pneumophila. *Microbial Cell Biology.* 2002; 184(24):7025-41.
39. Al-Bana BH, Haddad MT, and Garduño RA. Stationary phase- and mature infectious-forms of Legionella pneumophila produce distinct viable but non-culturable cells. *Environ Microbiol.* 2014; 16(2):382-95.
40. Fonseca M V, Swanson MS. Nutrient salvaging and metabolism by the intracellular pathogen Legionella pneumophila. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4:12.
41. Kirschner, AKT. Determination of viable legionellae in engineered water systems: Do we find what we are looking for? *Water Res.* 2016; 93:276-88.
42. Rodgers FG. Ultrastructure of Legionella pneumophila. *J Clin Pathol.* 1979; 32(12):1195-202.
43. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(3): 506-26.
44. Ducret A, Chabaliere M, Dukan S. Characterization and resuscitation of "non-culturable" cells of Legionella pneumophila. *BMC Microbiol.* 2014; 14:3.

45. Camaró-Sala ML, Martínez-García R, Olmos-Martínez P, Catalá-Cuenca V, Ocete-Mochón MD, Gimeno-Cardon, C. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015; 33(7):31-6.
46. Díaz-Flores A, Montero JC, Castro FJ, Alejandres EM, Bayón C, Solís I, et al. Comparing methods of determining *Legionella* spp. in complex water matrices. *BMC Microbiol.* 2015; 15:91.
47. 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. *BMC Microbiol.* 2013; 13:88.
48. Dietersdorfer E, Kirschner A, Schrammel B, Ohradanova-Repic A, Stockinger H, Sommer R, et al. Starved but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. *Water Res.* 2018; 141:428-38.
49. Cebrián F, Montero JC, Fernández PJ. New approach to environmental investigation of an explosive Legionnaires' disease outbreak in Spain: early identification of potential risk sources by rapid *Legionella* spp. immunosensing technique. *BMC Infect Dis.* 2018; 18(1):696.
50. Epalle T, Girardot F, Allegra S, Maurice-Blanc C, Garraud O, Riffard S. Viable but not culturable forms of *Legionella pneumophila* generated after Heat Shock Treatment are infectious for macrophage-like and alveolar epithelial cells after resuscitation on *Acanthamoeba polyphaga*. *Microb Ecol.* 2015; 69(1):215-24.
51. Oliver JD. Recent findings on the viable but non-culturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2010; 34(4):415-25.
52. Whiley H, Taylor M. *Legionella* detection by culture and qPCR: Comparing apples and oranges. *Crit Rev Microbiol.* 2016; 42(1):65-74.
53. Entidad Nacional de Acreditación (ENAC): NT-20 Rev. 2: Alcances de acreditación: ensayos de agua. Madrid, España: Entidad Nacional de Acreditación; 2007.
54. Alleron L, Khemiri A, Koubar M, Lacombe C, Coquet L, Cosette P, et al. VBNC *Legionella pneumophila* cells are still able to produce virulence proteins. *Water Res.* 2013; 47(17):6606-17.