

Investigación y cuantificación de *Legionella sp* mediante separación inmunomagnética

Guillermo Rodríguez Albalat

Biótica, bioquímica analítica, S.L. Parque Científico de la Universidad Jaime I – Castellón

guiller@biotica.es

RESUMEN

¿Por qué necesitamos una determinación rápida de *Legionella*? Es conocido que los métodos basados en su cultivo tienen una baja recuperación. Entre otros factores, el lento crecimiento en una placa, el crecimiento interferente de otros microorganismos acompañantes y la variabilidad del estado fisiológico de *Legionella* en las muestras ambientales. Además, el tiempo de obtención de un resultado (10-12 días) hace difícil una monitorización fiable y oportuna del riesgo.

Entre los métodos independientes del cultivo, aquellos que utilizan inmuno-partículas magnéticas proporcionan la separación de la célula diana completa del resto de la muestra. Esta unión partícula-bacteria se debe a un ligando (por ejemplo, anticuerpos) inmovilizado en la superficie de la partícula que se une a antígenos expresados en la superficie de las células de *Legionella*. Por ello esta interacción depende de la integridad de dicha envoltura y es independiente de la capacidad de crecimiento de la célula, a menudo limitada en la *Legionella* salvaje.

Las células capturadas pueden dirigirse utilizando un imán, permitiendo su marcado con un anticuerpo conjugado a una enzima y el lavado de los complejos marcados. Así cada pellet puede llevarse a un medio de composición constante para desarrollar una reacción colorimétrica que depende de la cantidad de *Legionella* inmovilizada y marcada.

La tecnología de separación inmunomagnética (SIM) permite cuantificar *Legionella sp* en muestras de agua. Este trabajo resume los principios de su funcionamiento, los resultados de su aplicación en situación de rutina y de brote, y su futuro en el desarrollo de un biosensor in situ completamente automatizado.

Palabras clave: *Legionella*; separación inmunomagnética; cuantificación.

INTRODUCCIÓN

La detección y la desinfección de *Legionella* son sensibles a las estrategias con que esta responde a las fluctuaciones ambientales, y que configuran su estilo

de vida. Puede sobrevivir en el agua en un amplio rango de condiciones ambientales¹. Desde el agua alcanza los pulmones por inhalación de aerosoles, invade los macrófagos alveolares para multiplicarse intracelularmente, y del mismo modo invade y se replica en amebas en el medio acuático²⁻⁵. La enfermedad puede evolucionar hacia una neumonía fatal⁶. Ante condiciones fluctuantes, *Legionella* transita entre una forma replicativa intracelular y una transmisiva libre, de baja actividad metabólica y mayor grosor de envoltura externa, donde expresa factores de virulencia relacionados con la supervivencia, persistencia y diseminación ambiental⁷⁻¹², más expresados en la cepa salvaje que en la de laboratorio¹³⁻¹⁹.

Tras desinfección, y en ausencia de tratamiento también, se ha detectado un estado fisiológico incapaz de formar una colonia en un medio estándar, pero con características de células viables: integridad de membrana, actividad metabólica y virulencia. Este estado viable pero no cultivable (viable but non culturable, VBNC), recupera cultivabilidad en contacto con amebas, incluso después de 30-60 min a 70 °C²⁰. Las biofilms pueden soltar formas VBNC, protegidas del desinfectante por material en suspensión, e indetectables por cultivo²¹. La cultivabilidad en general también mejora al añadir piruvato y glutamato al medio estándar (BCYE)²². Esta fase libre viva, cultivable o no, debe ser objeto de la detección.

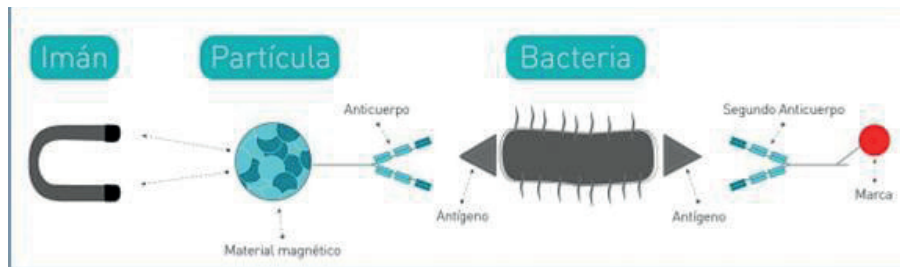
Profundizar en la ecología microbiana de *Legionella* arroja cuestiones sobre cómo interpretar los resultados de cultivo, y también de qPCR, dado que detecta células muertas y vivas. Los resultados con propidio de monoazida o reactivos similares para identificar las membranas celulares dañadas no siempre son concluyentes²³⁻²⁴ ni resultan apropiados para discriminar células muertas de vivas²⁵. Una aproximación distinta es la separación inmunomagnética (SIM), con aplicaciones descritas en la literatura²⁶⁻²⁹. Partículas paramagnéticas tapizadas con anticuerpos se unen a los antígenos de superficie de la célula diana. Este trabajo presenta casos reales de aplicación de un método SIM³⁰ certificado por AOAC para la determinación de *Legionella sp*, que cumple con los requisitos de la versión actualizada de la norma UNE-EN 1000³⁰.

MATERIAL Y MÉTODOS

La muestra original de agua se concentra por filtración. El concentrado se eluye y dispensa en una cubeta para análisis, donde se añade una suspensión de partículas magnéticas, que se unen a *Legionella*, para formar complejos bacteria/partícula. Estos complejos pueden

separarse por un imán, y son lavados, resuspendidos e incubados con un anticuerpo anti-*Legionella* conjugado con una enzima, para formar complejos marcados. Estos se miden por colorimetría, añadiendo sustratos enzimáticos. Los resultados se expresan en unidades formadoras de colonia equivalentes (UFCeq) (figura 1).

Figura 1. Principio de la tecnología de separación inmunomagnética (SIM): partículas magnéticas con anticuerpos en superficie se unen a las células de Legionella, y los complejos se marcan con un segundo anticuerpo conjugado con una enzima para su lectura final.



RESULTADOS

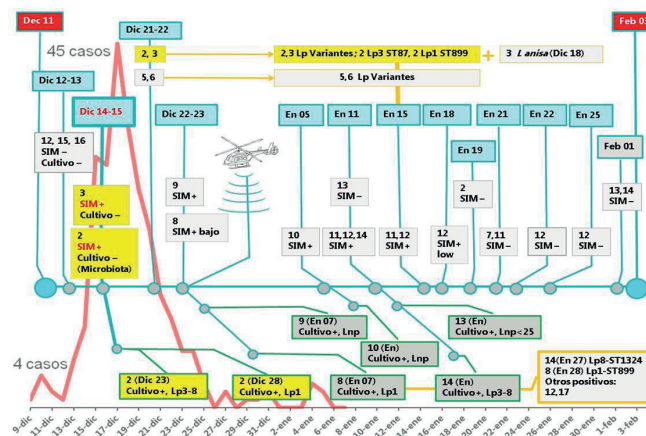
CASOS EN SITUACIÓN DE BROTE: MANZANARES

El brote con mayor tasa de ataque en la historia de la legionelosis (14,9/1000 habitantes) fue declarado el 11 de diciembre de 2015 en el municipio de Manzanares en Ciudad Real (Castilla La Mancha). Sin embargo, la tasa de letalidad se mantuvo baja (1,4 %), y en parte podría atribuirse a la detección rápida de fuentes de riesgo potencial mediante una técnica SIM, por parte del Laboratorio Regional de Salud Pública de Talavera de la Reina (Toledo).

Parte de la estrategia consistió en identificar las instalaciones sospechosas, clausuradas hasta obtener

resultados analíticos, a partir de muestras por duplicado que se analizaron tanto por el método ISO11731 de cultivo como por el método SIM (figura 2). Se descartaron instalaciones con resultados negativos por SIM, en menos de 24 horas, centrando la atención en aquellas que resultaron positivas. Esto permitió profundizar en la búsqueda de cepas relacionadas con el brote, en muestras positivas por SIM cuyo resultado inicial por cultivo fue no concluyente, aunque finalmente fue posible aislar una colonia coincidente con la cepa aislada en casos declarados. Los resultados fueron consistentes con la hipótesis epidemiológica que apuntó a una torre de refrigeración (OR=3,9; p: 0,003) y una fuente decorativa (OR=5,7; p=0,03) como las causas más probables del brote.

Figura 2. Principales Fuentes (1-17) analizadas durante el brote de legionelosis en Manzanares, Ciudad Real, entre Diciembre de 2015 y Febrero de 2016, por cultivo (línea verde), SIM (línea azul) y SBT (línea naranja). Las fuentes más probables se indican en amarillo.



Casos en situación de rutina

Las técnicas independientes del cultivo agilizan la decisión en entornos de riesgo (hospitales, hoteles, piscinas, playas, etc). La técnica SIM sustenta operativas para procurar espacios saludables.

Por ejemplo, un estudio de 2017 aplicó SIM a la monitorización de 29 puntos de la red de distribución de agua en un Hospital de Valencia. Cada muestra se ensayó por cultivo ISO 11731 y SIM, por tres laboratorios acreditados ISO17025. Hasta en un 38 % de los ensayos por cultivo el resultado no fue concluyente por la interferencia de microbiota. SIM redujo la tasa de resultados no concluyentes a cero y presentó una sensibilidad (67 %) superior a la del cultivo (45 %). En particular, en una muestra de una ducha en un vestuario de un quirófano, hongos interferentes impidieron la detección por cultivo de Legionella, siendo positiva por SIM e inicialmente negativa por qPCR (días después se detectó ADN) (figura 3).

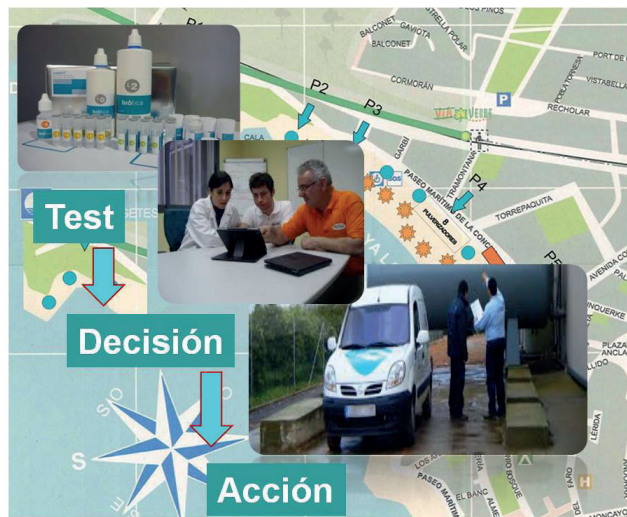
Figura 3. Quirófano en un hospital: muestra de agua/ ducha de un vestuario. Hongos interferentes dificultaron la interpretación de los resultados positivos de cultivo en una placa (10-12 días). La misma muestra fue positiva y cuantificable por SIM en solo 1 hora, días más tarde confirmada también por PCR (inicialmente negativa, el ADN se detectó solo tras tratamientos de la muestra).



Otro ejemplo son las playas, que reúnen turismo senior creciente con instalaciones (duchas, lavapiés, nebulizadores, etc) de riesgo potencial. En 2014 se aplicó una estrategia de mantenimiento y desinfección con un método SIM en las playas del municipio de Oropesa del Mar (Castellón) (figura 4). Tras la desinfección (RD 865/2003 y D 173/2000) al inicio de la campaña, el 2 de Junio se analizaron 70 muestras por un laboratorio ISO17025 mediante SIM, que pudo reportar resultados en 24 horas. Se obtuvieron tres positivos, lo que permitió focalizar medidas correctoras puntuales en dos días – 4

y 6 de junio- y repetir solo las muestras inicialmente positivas el día 9 de junio, comprobando que tras la desinfección fuesen negativas por SIM. Se hizo un segundo muestreo durante los meses de junio, julio y agosto, con una cadencia de 7-8 muestras semanales hasta completar la totalidad de 140 puntos terminales. Otro entorno con demanda de actividades acuáticas son las piscinas. El Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad reconoció en su escrito oficial de fecha 26 de octubre de 2015, la utilización de un método SIM30 para la determinación de Legionella spp en el ámbito del RD 742/2013, de 27 de septiembre, por el que se establecen los criterios técnico sanitarios de las piscinas. El método fue aplicado en los vasos, grande y pequeño, en los circuitos de retorno y en una balsa de riego, en un complejo deportivo de la Universidad Jaime I. Las muestras (100 mL) se ensayaron por PCR, cultivo y SIM, por un laboratorio ISO17025. Tres de las cinco muestras fueron no concluyentes por cultivo. SIM y PCR coincidieron en 4 de las 5 muestras, en términos de presencia/ausencia.

Figura 4. En una semana de trabajo se desarrolló un primer muestreo rápido con SIM, las acciones sobre los puntos positivos y la comprobación de dichas acciones, en playas.



En un futuro inmediato la tecnología SIM podrá automatizarse para disponer de sensores para la determinación in situ de Legionella sp, que a su vez se integrarán en redes de información para dar lugar a un esquema avanzado de vigilancia y control de este problema de salud pública.

Figura 5. Unidad prototipo funcional de un biosensor para la determinación automatizada de *Legionella* sp en aguas (Proyecto ULISENS, SME Instrument Phase II).



DISCUSIÓN

Las técnicas rápidas basadas en la detección de células enteras pueden ayudar a mejorar el manejo de la legionelosis. Se ha demostrado su utilidad en el escenario del brote, donde se necesitan tiempos de respuesta más rápidos y es crucial identificar en 24-48 h posibles fuentes de infección. Un período de análisis de diez días es demasiado largo y los métodos independientes del cultivo deben aplicarse de inmediato. Las fuentes positivas deben ser verificadas en paralelo con el cultivo estándar con el fin de aislar la cepa causante, pero, además, SIM anticipa las instalaciones potencialmente implicadas, dirigiendo los esfuerzos al aislamiento en las muestras positivas, más arduos si el contenido de aerobios es alto. Las técnicas SBT pueden ayudar a dirigir los esfuerzos de identificación de la fuente.

Para un análisis estándar de control de rutina, SIM puede utilizarse para anticipar una concentración sostenida de *Legionella* en las instalaciones. Los puntos críticos pueden ser mapeados rápidamente. Únicamente en los casos en que se encuentren manchas calientes de *Legionella*, el cultivo deberá utilizarse para confirmación o tipificación.

La variabilidad observada en los cultivos y la mayor sensibilidad del método SIM sugiere la necesidad de revisar los procedimientos diagnósticos actuales de la *Legionella* en hospitales. En el caso de playas, temperaturas mayores durante más tiempo alarga la temporada turística. La concentración de personas sensibles a *Legionella*, sugiere extender igualmente la monitorización de las instalaciones y los tratamientos de agua, desde la primavera (marzo-abril) a otoño (octubre-noviembre), adaptándose a este comportamiento sociodemográfico. Una estrategia basada en la asignación de puntos críticos para controlar *Legionella* por prueba rápida en las campañas anuales, habilita acciones correctoras oportunas y una vigilancia regular. Lo mismo en las piscinas, activas todo el año.

En conclusión, SIM ayuda a la vigilancia/control de rutina de las instalaciones por titulares y administración en un breve espacio de tiempo, lo que permite actuar de forma rápida y prevenir situaciones de riesgo, ayuda a la actuación y decisión en caso de brotes, permitiendo detectar las instalaciones sospechosas en un tiempo breve. También permite detectar niveles bajos/medios de *Legionella* lo que facilita la toma de medidas antes de que los recuentos sean muy elevados, previniendo los tratamientos de choque que habría que realizar; esto es importante también para la conservación de las instalaciones.

En su ciclo evolutivo, la tecnología SIM proporcionará equipos robustos completamente automatizados capaces de funcionar de forma desatendida *in situ*. Este es el objetivo del proyecto europeo ULISENS (Ultra Legionella Immunoanalysis of Legionella for Early Sensing, SME Instrument Phase II).

Este es un futuro posible para nuestra salud ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fliermans. Ecology of legionella: from data to knowledge with a little wisdom. *Microb Ecol.* 1996; 32:203-28.
2. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15:506-26.
3. Fields BS. The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* 1996; 4:286-90. .
4. Molmeret M, Horn M, Wagner M, et al. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71:20-8. .
5. Newton HJ, Ang DKY, van Driel IR, et al. Molecular pathogenesis of infections caused by legionella pneumophila. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23:274-98. .
6. Muldrow LL, Tyndall RL, Fliermans CB. Application of flow cytometry to studies of pathogenic free-living amoebae. *Appl Environ Microbiol.* 1982; 44:1258-69.
7. Molofsky AB, Swanson MS. Differentiate to thrive: lessons from the legionella pneumophila life cycle. *Mol Microbiol.* 2004; 53:29-40. .
8. Brüggemann H, Hagman A, Jules M, et al. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the *in vivo* transcriptional program of legionella pneumophila. *Cell Microbiol.* 2006; 8:1228-40.
9. Edwards RL, Dalebroux ZD, Swanson MS. Legionella pneumophila couples fatty acid flux to microbial differentiation and virulence. *Mol Microbiol.* 2009; 71:1190-204.
10. 1Byrne B, Swanson MS. Expression of legionella pneumophila

- virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun.* 1998; 66:3029–34.
11. Hammer BK, Swanson MS. Co-ordination of legionella pneumophila virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol Microbiol.* 1999; 33:721–31.
 12. Faulkner G, Berk SG, Garduño E, et al. Passage through tetrahymena tropicalis triggers a rapid morphological differentiation in legionella pneumophila. *J Bacteriol.* 2008; 190:7728–38.
 13. Hwang MG, Katayama H, Ohgaki S. Effect of intracellular resuscitation of legionella pneumophila in acanthamoeba polyphage cells on the antimicrobial properties of silver and copper. *Environ Sci Technol.* 2006, 40:7434-9.
 14. García MT, Jones S, Pelaz C, et al. Acanthamoeba polyphaga resuscitates viable non-culturable legionella pneumophila after disinfection. *Environ Microbiol.* 2007, 9:1267-77.
 15. Allegra S, Berger F, Berthelot P, et al. Use of flow cytometry to monitor legionella viability. *Appl Environ Microbiol.* 2008, 74:7813-6.
 16. Alleron L, Merlet N, Lacombe C, et al. Long-term survival of legionella pneumophila in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol.* 2008, 57:497-502.
 17. Gião MS, Wilks SA, Azevedo NF, et al. Validation of SYTO 9/propidium iodide uptake for rapid detection of viable but noncultivable legionella pneumophila. *Microb Ecol.* 2009, 58:56-62.
 18. Shevchuk O, Jäger J, Steinert M. Virulence Properties of the Legionella Pneumophila Cell Envelope. *Frontiers in Microbiology.* 2011; 2:74.
 19. Zhan X-Y, Hu C-H, Zhu Q-Y. Legionella pathogenesis and virulence factors. *Ann Clin Lab Res.* 2015; 3:1–16
 20. Epalle T, Girardot F, Allegra S, et al. Viable but non 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, 69:215-24.
 21. Shen Y, Huang C, Lin J, et al. Effect of Disinfectant Exposure on Legionella pneumophila Associated with Simulated Drinking Water Biofilms: Release, Inactivation, and Infectivity. *Environ Sci Technol.* 2017; 51(4):2087-95,
 22. Ducret A, Chabalier M, Dukan S. Characterization and resuscitation of 'non-culturable' cells of Legionella pneumophila. *BMC Microbiology,* 2014; 14:3.
 23. Chiao TH, Clancy TM, Pinto A, et al. Differential resistance of drinking water bacterial populations to monochloramine disinfection. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48:4038-47.
 24. Yañez MA, Nocker A, Soria-Soria E, et al. Quantification of viable Legionella pneumophila cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *J. Microbiol. Methods.* 2011; 85:124-30.
 25. Taylor MJ, Bentham RH, Ross KE. Limitations of Using Propidium Monoazide with qPCR to Discriminate between Live and Dead Legionella in Biofilm Samples. *Microbiology Insights.* 2014; 7:15-24.
 26. Lund, A.; Hellemann, A. L.; Vartdal, F. Rapid isolation of K88 β Escherichia coli by using immunomagnetic particles. *J Clin Microbiol* 1988; 26(12):2572-5.
 27. Morgan J, Winstanley C, Pichup R, et al. Rapid Immunocapture of Pseudomonas putida Cells from Lake Water by Using Bacterial Flagella. *Applied and Environ. Microbiol.* 1991; 57(2):503-9.
 28. Stark M, Reizenstein E, Uhlen M et al. Immunomagnetic separation and solid-phase detection of Bordetella pertussis. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(4):778-84.
 29. Hsu T, Wu S, Bing-Mu H, et al. Surveillance of parasitic Legionella in surface waters by using immunomagnetic separation and amoebae enrichment. *Pathogens and global Health* 2015, 109(7):328-35.
 30. Rodriguez G, Bedrina B, Jiménez M. Method Modification of the Legipid® Legionella Fast Detection Test Kit. *J AOAC Int.* 2014; 97(5):1403-9.