



Nota técnica

Implementación de técnica de cultivo para la investigación de *Legionella pneumophila* en depósitos domiciliarios de agua potable en Resistencia, Chaco.

Lösch, Liliana S.; Merino, Luis A.

RESUMEN

Legionella pneumophila es una bacteria ambiental capaz de sobrevivir en un amplio intervalo de condiciones físico-químicas y de colonizar los sistemas de distribución y almacenamiento del agua potable. Es el principal patógeno transmitido por el agua que produce el 90% de los casos de legionelosis. El objetivo del trabajo fue realizar la puesta a punto de la técnica por cultivo para la vigilancia de *L. pneumophila* en depósitos domiciliarios de agua potable acorde con la normativa internacional. En las muestras de agua analizadas no se obtuvo desarrollo de *L. pneumophila*; la cepa utilizada como control positivo, permitió constatar la aptitud de los medios utilizados para la detección de este patógeno en las muestras de agua. La vigilancia de este microorganismo en el agua de consumo humano representa el primer paso en pos de abordar el control de su diseminación hacia huéspedes susceptibles.

El género *legionella* pertenece a la familia *legionellaceae*, conformada por 54 especies de las cuales 25 están relacionadas a enfermedad humana.¹ Son bacterias heterótrofas que se encuentran en una gran variedad de ambientes acuáticos y pueden proliferar a temperaturas superiores a 25°C. *Legionella pneumophila* fue relacionada por primera vez a cuadros de neumonía en 1976. *L. pneumophila* es una bacteria ambiental capaz de sobrevivir en un amplio intervalo de condiciones físico-químicas, multiplicándose entre 20°C y 45°C y destruyéndose a 70°C. Su temperatura óptima de crecimiento es entre 35-37°C. Este microorganismo se encuentra presente en suelos y ambientes acuáticos naturales, además puede sobrevivir como parásito intracelular de amebas y ciliados o en ambientes con bajas condiciones de nutrientes²⁻³

A partir del ambiente, *L. pneumophila* puede pasar a colonizar los sistemas de abastecimiento de aguas de las ciudades y, a través de la red de distribución, incorporarse a los sistemas de almacenamiento del agua potable o bien otros sistemas que requieren agua para su funcionamiento como las torres de refrigeración. En estas instalaciones, bien por estar mal diseñadas, sin mantenimiento o con un mantenimiento inadecuado, se favorece el estancamiento del agua y el acúmulo de sustancias que permiten la multiplicación de la bacteria. De esta manera lodos y materia orgánica pueden acabar construyendo una biocapa que permite la incorporación de los microorganismos.¹⁻⁴

La presencia de esta biocapa junto a una temperatura adecuada, propicia la multiplicación de *Legionella* hasta concentraciones infectantes para el ser humano. Si en la instalación existe un mecanismo productor de aerosoles, la bacteria puede dispersarse al aire. Las gotas de agua que contienen la bacteria pueden permanecer suspendidas en el aire. La vía de infección más frecuente es la inhalación de aerosoles que contiene bacterias.²⁻⁵



L. pneumophila es el principal patógeno transmitido por el agua que produce el 90% de los casos de legionelosis que afecta particularmente a personas con el sistema inmune debilitado y de la cual se reconocen dos formas clínicas diferenciadas: la infección pulmonar o “Enfermedad del legionario” y la forma no neumónica conocida como “Fiebre de Pontiac”.²⁻⁴

Las infecciones por este microorganismo son un importante problema de salud pública en Europa, registrándose un aumento de casos en los últimos años y dando origen a importantes brotes de legionelosis, tanto en la comunidad como brotes asociados a hospitales y hoteles.⁶⁻⁷

Se desconoce la incidencia de legionelosis en Latinoamérica y son pocos los trabajos e información existente en nuestro país, situación posiblemente atribuible a la presentación en forma de casos esporádicos y no de brotes, reportándose una incidencia de aproximadamente el 2% de todas las neumonías.⁸⁻⁹

Si bien el agua destinada al consumo humano debe cumplir con los requisitos de aptitud microbiológica, el análisis de *Escherichia coli* (uno de los indicadores establecidos por el Código Alimentario Argentino) o bien de coliformes termotolerantes no son indicadores adecuados de la presencia o ausencia de este microorganismo. Su detección tampoco está considerada en los parámetros de calidad de agua ambiente de la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Argentina. De allí a que la vigilancia de este patógeno sea necesaria para prevenir y controlar la legionelosis, para lo cual se requiere implementar normativa internacional. El método de cultivo es la técnica de referencia para la detección y cuantificación de células viables de este microorganismo a partir de muestras ambientales.¹⁻²⁻¹⁰

El objetivo del presente trabajo fue realizar la puesta a punto de la técnica por cultivo para la vigilancia de *L. pneumophila* en depósitos domiciliarios de agua potable acorde con la normativa internacional.

La detección de *Legionella* en las muestras de agua se realizó por cultivo según lo establecido en la norma ISO 11731:1998. Se analizó el agua procedente de los depósitos domiciliarios de cinco viviendas de la ciudad de Resistencia. En cada vivienda se seleccionó el grifo conectado directamente al tanque de almacenamiento que no hubiera sido utilizado por 12-24 hs previas al muestreo. En cada punto se tomó un litro de agua en recipiente estéril. Las muestras se concentraron por filtración, usando membranas de 0,45 µm. Posteriormente, las membranas se transfirieron a 10 ml de buffer Ringer 1/40 y se agitaron por vortex. Alícuotas de 0,5 ml se sembraron en placas de agar BCYE (Oxoid), agar de carbón tamponado y extracto de levadura, suplementadas con cisteína y antibióticos (suplementos SR0110 y SR0152 Oxoid). Paralelamente, otra alícuota de 0,5 ml se sometió a tratamiento térmico (50°C durante 30 minutos) y se sembró en el mismo medio. Se utilizó como control positivo una muestra de agua inoculada con la cepa ATCC® 33152™ de *L. pneumophila*. Las placas se incubaron durante 7 días. En aquellos casos en los que se evidenció desarrollo bacteriano se seleccionaron colonias características que fueron subcultivadas en agar BCYE con y sin cisteína. Simultáneamente al procedimiento previamente descripto, se tomó otra muestra de 250 ml para realizar el recuento de bacterias mesófilas y la investigación de *Pseudomonas aeruginosa* en 100 ml por filtración de membrana.¹¹

En las muestras de agua analizadas de las viviendas no se obtuvo desarrollo de *Legionella pneumophila*. Tampoco se detectó la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* y el recuento bacterias mesófilas fue menor de 500 ufc/ml.



En tanto que la cepa utilizada como control positivo desarrolló en agar BCYE con cisteína y no en la que carecía de este compuesto lo que permitió constatar la aptitud de los medios utilizados para la detección de este patógeno en las muestras de agua.

L. pneumophila es agente causal de infecciones respiratorias, sin embargo el diagnóstico de legionelosis es dificultoso dado que los signos y síntomas no son específicos. Se desconoce la prevalencia de *L. pneumophila* como agente etiológico de infecciones respiratorias en nuestro país.

A diferencia de otros microorganismos, la transmisión de *L. pneumophila* es aérea y la vía de ingreso al organismo humano es por el sistema respiratorio mediante la inhalación de aerosoles generados por sistemas de agua contaminados con el patógeno. Tampoco existen datos sobre la presencia/ausencia de este microorganismo en los sistemas de distribución y almacenamiento de agua potable.

La implementación de una técnica de cultivo para la vigilancia de este patógeno en el agua de consumo humano representa el primer paso en pos de revertir esta situación y abordar el control de su diseminación hacia huéspedes susceptibles. Además, permitirá alertar a los profesionales infectólogos de la presencia de este microorganismo en el ámbito doméstico como así también sobre la necesidad de mantener la integridad e higiene de los tanques de almacenamiento de agua.

Agradecimientos:

“Investigación financiada por el Programa de Becas Carrillo-Oñativia, Comisión Nacional Salud Investiga, Ministerio de Salud de la Nación”

Conflicto de intereses: “Los autores no declaran conflictos de intereses”

Bibliografía

1. Buse HY, Schoen ME, Ashbolt NJ. Legionellae in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure. *Water Res.* 2012;46(4):921–33.
2. World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality. 2008. p.32-35, 191-240.
3. Serrano-Suárez A, Dellundé J, Salvadó H, Cervero-Aragó S, Méndez J, Canals O, et al. Microbial and physicochemical parameters associated with Legionella contamination in hot water recirculation systems. *Environ Sci Pollut Res.* 2013;20(8):5534–44.
4. Ausina V, Vicente C, Cercenado E, Antolín CP. Diagnóstico microbiológico y control de Legionelosis. Cercenado Emilia CR, editor. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2005. Report No.: 20.
5. 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.
6. Bonetta S, Bonetta S, Ferretti E, Balocco F, Carraro E. Evaluation of Legionella pneumophila contamination in Italian hotel water systems by quantitative real-time PCR and culture methods. *J Appl Microbiol.* 2010;108(5):1576–83.
7. Delgado-Viscogliosi P, Solignac L, Delattre JM. Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable Legionella pneumophila cells in environmental water samples. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(11):3502–12.
8. Lopardo G, Sturba E, Martínez M, Roel J, Gamba A, Biondi H, et al. Detección de infección aguda por Legionella pneumophila en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad en la ciudad de Buenos Aires. *Med (Buenos Aires).* 2002;62:145–8.



9. Luna C, Brea Folco J, Aruj P, Rebora K, Balsebre C, Absi R, et al. Neumonía por Legionella pneumophila. Experiencia en un hospital universitario de Buenos Aires. *Med (Buenos Aires)*. 2004;64:97–102.
10. Administración Nacional de Medicamentos A y TM. Capítulo XII. Buenos Aires; 2007. (Online): http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XII.pdf
11. International Organization for Standardization. Water quality detection and enumeration of Legionella. ISO 11731:1998. 1998.

Datos de autor

Carátula

Implementación de técnica de cultivo para la investigación de Legionella pneumophila en depósitos domiciliarios de agua potable en Resistencia, Chaco.

Autores

Liliana S. Lösch* 1,2,

Luis A. Merino 1,2

1. Área de Bacteriología, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste. Av. Las Heras 727- CP 3500. Resistencia, Chaco, Argentina
2. Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste. Sargento Cabral 2001. CP. 3400. Corrientes, Argentina

*silvinalosch@gmail.com

Investigación de Legionella en depósitos de agua potable.