

Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

MCC P/A	COSMETIKIT®	DRY PLATES®	MUGPLUS
CRIOTECA®	CHROMOSALM	DESINFECTEST®	CCCNT
PLAQUIS®	KITPRO-PLUS	CROMOKIT®	MBS
M-IDENT®	SEILAGUA®	SALMOQUICK	AIRESANO
NEOGRAM	ENVIROCOUNT		

MICROKIT® P/A-LEGIONELLA (Caldo GVPC ó BCYE Modificados). Para detección o revitalización en 1000 ml de agua.



Legionella pneumophila causa la legionelosis o enfermedad del legionario y la fiebre de Pontiac, males tristemente extendidos POR TODO nuestro país a causa de torres de refrigeración y sistemas de acondicionamiento mal mantenidos. Afectan a personas inmunodeprimidas y al turismo, sobre todo, llegando a producir varios muertos cada año. Un país donde la principal riqueza es el turismo no puede permitirse esta fama por causa de la Legionella.

El método Presencia/Ausencia (P/A) ha demostrado ser más fiable que el de Filtración de Membrana (MF) a causa del exceso de falsos negativos de este último método (Jacobs & Co, 1986, App.Env.Microbiol.Vol.51, 5). Además es mucho más cómodo cuando no se requiere recuento, sino absoluta ausencia, como es el caso de *Legionella pneumophila* en muchos países del mundo.

MICROKIT diseñó desde Noviembre de 1997 un kit Presencia/Ausencia para enriquecimiento selectivo de *Legionella* en 500 ml de agua. El medio era una modificación en caldo del BCYE+GVPC ISO 11731. La ausencia de Agar permitía su utilización como Caldo de Enriquecimiento Selectivo Directo sin necesidad de filtración, ahorrando la manipulación y el riesgo de generación de aerosoles propios de la filtración de membrana. Su concentración, permitía su uso en 1000 ml de agua. **Tras el imperativo legal R.D. 865/2003, que exigió efectuar recuentos de *Legionella pneumophila*, (aunque disparatadamente diferentes en USA, NZ o UE), el kit se readaptó para ser usado como caldo revitalizante;** para evitar multiplicación celular, se comprobó que aplicándolo durante 24 horas a 25°C y siguiendo después el método ISO 11731, no había multiplicación celular pero sí detección incluso para recuentos con lenticulas de 40 ± 10 ufc/l. Incubaciones a temperaturas mayores o menos prolongadas no dan buenos resultados.

Ref: RPL330 Caja 20 test (tubos + swabs) o bien TPL016 (sólo tubos) o bien TPL017 (tubos de sólo BCYE broth para aguas con poca flora acompañante)

MODO DE EMPLEO:

Atemperar a 37°C y agitar vigorosamente el tubo para homogeneizar (puede estar sólido o cristalizado por su elevada concentración, y con el carbón granulado precipitado). Añadir todo su contenido a un recipiente estéril con Tiosulfato (DCPJCN) donde se hayan recolectado 1000 ml del agua de muestra.

Si pidió el kit completo con torundas, raspar fuertemente con una de las torundas estériles incluidas en el kit (se pueden pedir aparte como VSN251), el biofilm y las costras calcificadas u oxidadas de las paredes del depósito, la alcachofa de la ducha o de los conductos donde el agua se estanca. Se debe agitar la torunda con limos dentro del agua de muestra, de modo que parte de dichos limos pase de la torunda al líquido, ya que *L.pneumophila* es bentónica y su presencia en el plancton es sólo su forma de dispersión. Este paso es fundamental para evitar un gran número de resultados falsamente negativos. Guardar la torunda en su tubo, transportarla a temperatura ambiente, y guardarla a 4-8°C para posteriores envíos que eventualmente puedan realizarse a laboratorios de referencia y/o para siembra directa de los limos diluidos en placa, según Norma ISO 11731.

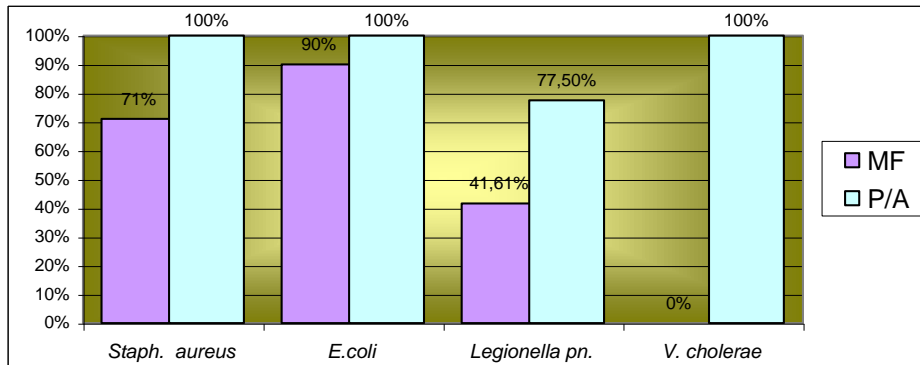
Si se desea analizar una muestra mayor de agua, pueden filtrarse los litros deseados por membranas estériles de 0,2µm (VAC022) y añadir éstas a los 1000ml del agua en los que se realizará el test.

Agitar el conjunto, aplicarle un shock térmico de 30 minutos a 60 °C (y/o bien acidificar la muestra 5 minutos a pH 2,2, aunque no recomendamos esta última práctica por ser el mayor punto crítico de eliminación de *Legionella pneumophila* además de la flora acompañante) a fin eliminar la flora competitiva (falsos positivos, demostrados sobre todo si la turbidez se da antes de 72 h), e incubar a (>25)-36-(<45) °C, **1-5**-(14) días. El carbón granulado se depositará después de la inoculación, en el fondo del frasco, absorbiendo metabolitos, residuos de biocidas y otros inhibidores de *Legionella pneumophila*. No volver a agitar.

Este Kit resulta incluso aún más útil que como P/A, como **preenriquecimiento revitalizador y selectivo** de muestras de agua: Incubar el contenido de un tubo en 1 litro de agua de muestra a 25°C durante 24 horas y

seguir la técnica ISO 11731 (o bien, si no se desea recuento, sino enriquecimiento selectivo, incubar 5 días a 37°C y luego sembrar en estría una gota del fondo con carbón, en GVPC Agar, por agotamiento, a fin de evitar el solapamiento de colonias). Los servicios intercompartmentos SEILAGUA demostraron hace ya décadas que este método, seguido de siembra en BCYE +GVPC Agar recupera contundentemente más Legionella que el método ISO 11731 por filtración de membrana sin revitalizar las células subletales (no vivificables): **77,50% de sensibilidad frente al 41,61% del método ISO estricto (sin este paso previo de revitalización)**. El límite de detección en los laboratorios acreditados con el método ISO 11731, de cerca de hasta incluso 800 ufc/l, mejora a, incluso, **40 ± 10 ufc/l si intercalamos el caldo Legionella MICROKIT durante 24 horas a 25°C**.

SENSIBILIDAD (escasez falsos-) por métodos según SEILAGUA 2002 (el P/A MICROKIT Legionella se usaba como enriquecimiento selectivo 5-14 días)



Servicio +	MF ISO 11731 <i>strictu sensu</i>			P/A MICROKIT 24h previo a ISO 11731		
	Correcto	Incorrecto	Sensibilidad	Correcto	Incorrecto	Sensibilidad
Enero 03	0	19	0 %	13	3	81%
Abril 03	0	26	0 %	10	2	83 %
Abril 04 *	0	16	0 %	8	0	100 %
Julio 04	0	9	0 %	3	1	75 %
TOTAL	0	70	0 %	34	6	85 %

* Destacamos que el inóculo en ese servicio era de sólo 30-50 ufc/litro, cuando en los demás servicios fue siempre de $10^3 - 10^6$ ufc/litro.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

En el método P/A, toda muestra turbia se considera presuntamente positiva. Las muestras sin turbidez se consideran negativas, por lo que este kit actúa como screening negativo, ahorrando la metódica clásica en todas las muestras sin Legionella. Legionella crece sin flóculos en el fondo y los falsos positivos, con el fondo floculado.

En caso de presunto positivo, lleve la muestra incubada a un laboratorio especializado, o bien:

Si incubó 5-14 días, sembrar 0,1 ml de la zona profunda con carbón, donde se concentra la Legionella, también por ser microaerófila (ahorrando así falsos positivos de las Pseudomonas, Micrococos y Bacillus acompañantes capaces de crecer en GVPC), sobre sendas placas de Legionella GVPC Selective Agar, por extensión con asa de Digrafsky (VRR154) o por agotamiento en estría. Incubar en las mismas condiciones que el kit, en atmósfera húmeda (un vaso de agua dentro de la estufa, al menos). Las colonias de Legionella son, tras 2-15 días de incubación, pequeñas (1-2 mm), de color blanco-gris-azulado, brillantes, cristalinas, circulares, lisas, suavemente elevadas y con los bordes enteros. Como control positivo puede utilizarse una cepa certificada de *Legionella pneumophila* (Ej: lenticulas MKTN 12821).

Confirmar las colonias Oxidasa + (lento) (MICROKIT KOT050), Catalasa + (MICROKIT KMT299) (y, si se puede esperar, sin crecimiento en Agar Sangre u otro medio general: TSA, PCA, YEA, Nutrient Agar...), con látex M-Legionella (KMB301) serogr.1-15 o mucho mejor, con el inmunocromatograma Virapid MICROKIT VR002).

Si incubó 24 horas a 25°C aprox., pase el litro de agua revitalizada, decantando el carbón, y calentando justo antes de filtrar, al método ISO 11731.

PRECAUCIONES: Legionella no es patógeno de alto riesgo (=clase III), pero evite la inhalación de aerosoles durante su incubación, sobre todo por parte de personas inmunodeprimidas. Esterilice el material y los kits utilizados, añadiéndoles abundantes carbón activo (MICROKIT SMT975) y pastillas desinfectantes (SMT978).

El usuario es el único responsable de la eliminación de los microorganismos según la legislación medioambiental vigente. Autoclavar antes de desechar a la basura.