



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

## Comparación de medios de cultivo para la detección de *Legionella* spp. en muestras de agua sanitaria: adaptación a la norma ISO 11731:2017



Marta Jiménez Mayordomo<sup>a,b</sup>, Mari Carmen Bresó Vila<sup>a</sup>, Concepción Gimeno Cardona<sup>a,c</sup> y María Dolores Ocete Mochón<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, España

<sup>b</sup> Facultad de Medicina, Universidad Católica de Valencia, Valencia, España

<sup>c</sup> Facultad de Medicina, Universitat de València, Valencia, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 23 de noviembre de 2023

Aceptado el 21 de marzo de 2024

On-line el 19 de abril de 2024

Palabras clave:

*Legionella* spp.

ISO 11731

Medio BCYE

Medio GVPC

### R E S U M E N

**Introducción:** El cultivo de muestras de agua es el método de referencia para detectar *Legionella* spp. en instalaciones sanitarias. Hasta 2017, la UNE-EN ISO 11731 solo incluía el medio GVPC, capaz de inhibir microbiota interferente, aunque dificulta el crecimiento de *Legionella* spp. Para mejorar su recuperación la nueva norma incorpora el medio BCYE al protocolo de trabajo.

**Métodos:** Inoculamos en BCYE y GVPC 1.306 muestras de agua sanitaria según procedimiento interno acreditado. Comparamos el número de ufc/L de *Legionella* spp. detectados en ambos medios.

**Resultados:** La mediana en BCYE fue 2.000 ufc/L mayor que en GVPC ( $p = 0,000$ ). En presencia de elevada cantidad de microbiota interferente, ambos medios fueron similares. Con escasa microbiota interferente BCYE fue 4 veces más sensible que GVPC ( $p = 0,000$ ).

**Conclusión:** Incluir BCYE en el análisis de agua sanitaria mejora significativamente la recuperación de *Legionella* spp. en muestras poco contaminadas.

© 2024 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

## Comparison of culture media for the detection of *Legionella* spp. in sanitary water samples: Adaptation to ISO 11731:2017

### A B S T R A C T

Keywords:

*Legionella* spp.

ISO 11731

BCYE

GVPC

**Introduction:** Water sample culturing is the reference method to detect *Legionella* spp. in sanitary facilities. Until 2017, UNE-EN ISO 11731 only included the GVPC medium, which inhibits interfering microbiota but hinders the growth of *Legionella* spp. To improve its recovery, the new standard incorporates the BCYE medium into the working protocol.

**Methods:** We inoculated 1,306 sanitary water samples onto BCYE and GVPC according to an accredited internal procedure. We compared the number of cfu/L of *Legionella* spp. detected in both media.

**Results:** The median in BCYE was 2,000 cfu/L higher than in GVPC ( $p = 0.000$ ). In the presence of high amounts of interfering microbiota, both media were similar; in the absence or low interfering microbiota BCYE was four times more sensitive than GVPC ( $p = 0.000$ ).

**Conclusion:** Including BCYE in the analysis of sanitary water significantly improves the recovery of *Legionella* spp. in low contaminated samples.

© 2024 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ocete\_mar@gva.es (M.D. Ocete Mochón).

## Introducción

La legionelosis está causada principalmente por *Legionella pneumophila* serogrupo 1, aunque otras especies como *Legionella anisa* también pueden causar la enfermedad<sup>1,2</sup>. *Legionella* spp. coloniza los sistemas de abastecimiento de agua y sobrevive como parásito intracelular de amebas y asociada a biofilms<sup>2,3</sup>. El control microbiológico de la red de agua sanitaria es crucial para reducir el riesgo de infección<sup>4,5</sup>. El cultivo es el método de referencia, y hasta 2017, GVPC era el medio recomendado por la normativa vigente<sup>6</sup>. El Real Decreto 487/2022 establece requisitos sanitarios para la prevención de la legionelosis, incluyendo la acreditación de laboratorios de análisis de *Legionella* spp., la toma de muestras y su cultivo<sup>7</sup>. La UNE-EN ISO 11731:2017 establece diferentes procedimientos y medios de cultivo selectivos (GVPC, MWY y BCYE con cefazolina, polimixina B y piramicina (BCYE+AB)) y no selectivos (BCYE)<sup>8</sup>. La elección de los métodos de cultivo influye en los resultados del análisis y podría determinar el rango de concentraciones que condicionan las medidas de control de instalaciones<sup>9–11</sup>.

## Material y métodos

Realizamos un estudio comparativo de métodos de cultivo para detección y recuento de *Legionella* spp. en muestras de agua sanitaria, evaluando los resultados obtenidos en términos de sensibilidad y del medio utilizado con mayor frecuencia para informar los recuentos máximos de colonias. Durante 5 años cultivamos 1.304 muestras siguiendo un procedimiento interno acreditado (UNE-EN ISO 11731:2007) que incluía la siembra tras filtración y elución, sin pretratamiento (ST), con pretratamiento ácido (FA) y con calor (FC) en medios BCYE y GVPC (Becton Dickinson®). La detección se realizó con un límite de 100 ufc/L y las colonias confirmadas como *Legionella* spp. por inhibición en BCYE-cys fueron serotipadas mediante aglutinación con látex (*Legionella* látex test OXOID®). Realizamos controles de calidad de los medios de cultivo para

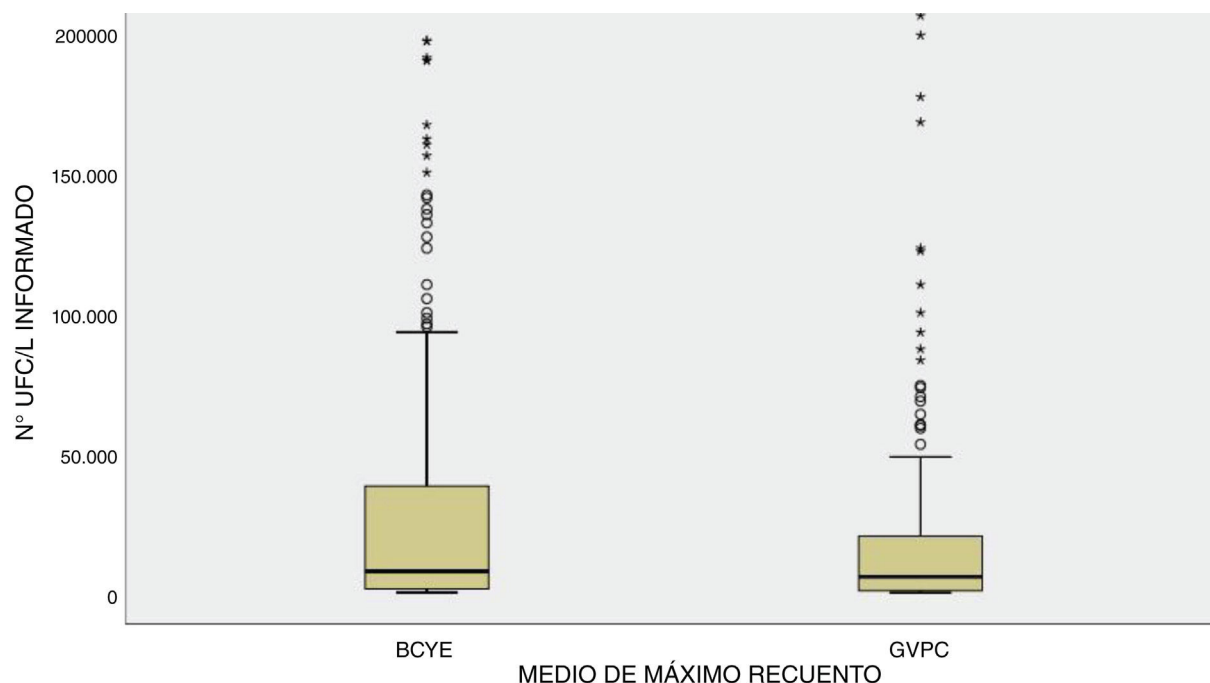
confirmar las condiciones de esterilidad, productividad y selectividad, según la norma ISO 11133, utilizando cepas de referencia (*Legionella pneumophila* CECT 7109, *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212, *Escherichia coli* ATCC® 25922, y *Legionella anisa* CECT 8177T), resultando siempre dentro del rango declarado. Utilizamos el análisis bivalente para comprobar las correlaciones entre parámetros, las pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov, la prueba de Mann-Whitney para dos muestras independientes, la prueba  $\chi^2$  de Pearson y la prueba exacta de Fisher para analizar los resultados obtenidos y establecer correlaciones entre los parámetros evaluados (medio de cultivo, método de pretratamiento, presencia de otros microorganismos, cloro libre, pH y temperatura).

## Resultados

El 69% (896) de las muestras fueron positivas. La especie mayoritaria fue *L. pneumophila* serogrupo 2-14 (83,8%).

El recuento medio fue de 47.185 ufc/L, con una mediana de 6.750 ufc/L. La sensibilidad aumentó utilizando el medio BCYE, informando mayores recuentos de colonias en 563 ocasiones con BCYE (63%) vs. 333 con GVPC (37%). BCYE es 1,7 veces más sensible que GVPC. Existen diferencias significativas en el número de colonias informadas según el medio utilizado, siendo la mediana en BCYE 2.000 unidades mayor que en GVPC ( $p=0,000$ ) (fig. 1 y tabla 1).

En presencia de elevada cantidad de microbiota interferente, ambos medios son similares; en ausencia o con escasa microbiota interferente, BCYE es 4 veces más sensible que GVPC ( $p=0,000$ ). No hay diferencias significativas en las distribuciones del número de colonias informadas según la microbiota acompañante ( $p>0,05$ ). La ausencia de preparamiento (FST) induce el mayor número de recuentos máximos de colonias en ambos medios (BCYE y GVPC) ( $p<0,000$ ), entre 40–44% respectivamente. No hay diferencias significativas según las características físico-químicas de las muestras (pH, cloro, temperatura).



**Figura 1.** Comparación de distribuciones del número de colonias para ambos medios de cultivo donde se observa que, para el medio BCYE, la amplitud de la caja y la mediana son mayores, lo que indica un mayor número de colonias informadas con el medio BCYE.

**Tabla 1**  
Comparación de la mediana del número de ufc/L informado en BCYE y GVPC

		Análisis comparativo recuento máximo promedio			
		Total	Recuento máximo medio en BCYE	Recuento máximo medio en GVPC	Prueba de Mann-Whitney
ufc/L informado	N válido	896	563	333	p = 0,000
	Media	47.185,38	60.391,58	24.857,80	
	Desviación estándar	243.474,54	300.026,21	81.448,35	
	Mediana	6.750,00	7.700,00	5.700,00	

Discusión

En nuestro estudio, observamos una mejora significativa en la recuperación de *Legionella* spp. al incluir BCYE en el análisis del agua. Varios autores han comparado la eficacia de los medios enriquecidos y selectivos para aislar *Legionella* spp. de muestras de agua. Tradicionalmente, se ha demostrado que los medios selectivos como GVPC, DGVP y MWY son más efectivos en el aislamiento de *L. pneumophila*, especialmente en muestras contaminadas<sup>9–11</sup>. Sin embargo, el medio GVPC contiene glicina que puede inhibir el crecimiento de otras especies de *Legionella*, proponiéndose el medio BCYE como mejora para su recuperación<sup>11</sup>. Solo Ditommaso et al.<sup>12</sup> y Scaturro et al.<sup>13</sup> analizaron los recuentos comparativos en medios no selectivos (BCYE) y selectivos (GVPC/MWY).

Ditommaso et al.<sup>12</sup> demostraron que el uso de BCYE para el recuento de *Legionella* spp. en muestras no contaminadas resultó en un mayor número de ufc/L informadas en el 93% de muestras positivas en comparación con el uso de MWY (p<0,001)<sup>12</sup>. Resultados corroborados por los mismos autores en 2022, encontrando una mayor frecuencia de muestras positivas con BCYE (94,8%) en cultivos que contenían solo *Legionella* spp. en comparación con MWY (85,1%)<sup>14</sup>. Scaturro et al.<sup>13</sup> encontraron mayor porcentaje de muestras positivas con GVPC y aunque las medianas de ufc/L en BCYE fueron superiores a las detectadas en GVPC (2.500 vs. 1.350) (p<0,0001) no superando un logaritmo, no lo consideraron relevante para la evaluación del riesgo de la instalación<sup>13</sup>. En nuestros datos, BCYE demostró ser 4 veces superior a GVPC en muestras contaminadas y la mediana en BCYE fue más de 3 logaritmos superior a la obtenida en GVPC (p=0,000). En el estudio indicado, el 63% de las muestras se informaron con el máximo recuento de colonias en BCYE, lo que representa casi el doble de informes en comparación con GVPC, lo que se consideró relevante para el control de la instalación. Los autores sugieren que la discordancia en los resultados podría estar relacionada con diferencias y/o errores metodológicos<sup>14</sup>.

Nuestros datos muestran que el rendimiento de BCYE en muestras contaminadas no fue significativamente diferente al de GVPC (p>0,05). Asimismo, otros estudios han demostrado que el uso de medios selectivos, como MWY, puede resultar beneficioso para el cultivo de muestras con microbiota interferente, ya que facilita la interpretación de los cultivos en comparación con BCYE<sup>12,14</sup>.

Nuestros resultados, al igual que los de Ditommaso et al.<sup>12</sup>, han demostrado la eficacia del uso de BCYE junto a medios selectivos para controlar la contaminación por *Legionella* spp. en instalaciones sanitarias. La norma UNE-EN ISO 11731:2017 ha validado esta práctica, al incluir el uso combinado de medios selectivos y no selectivos<sup>8</sup>. En la adaptación del análisis del agua de una red de agua sanitaria según la norma, si se realiza mediante siembra tras filtración y elución, debe emplearse un medio de cultivo no selectivo como BCYE junto con un medio selectivo como GVPC.

Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del HGUU.

Financiación

La presente investigación no ha recibido ayudas específicas provenientes de agencias del sector público, sector comercial o entidades sin ánimo de lucro.

Declaración de acceso a datos

Todos los datos relevantes están dentro del documento y sus archivos de información de apoyo.

Declaración de IA generativa y tecnologías asistidas por IA en el proceso de redacción

Durante la preparación de este trabajo, los autores utilizaron *Paperpal* para realizar la revisión del formato. Después de utilizar esta herramienta/servicio, los autores revisaron y editaron el contenido según fuese necesario y asumen total responsabilidad por el contenido de la publicación.

Conflicto de intereses

Los autores han declarado que no existen intereses contrapuestos.

Bibliografía

- Fenstersheib MD, Miller M, Diggins C, Liska S, Detwiler L, Werner SB, et al. Outbreak of Pontiac fever due to *Legionella anisa*. Lancet. 1990;336:35–7, [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91532-F](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(90)91532-F).
- Pelaz C, Ausina V, Catalán V, Cercenado E. 2005. 20. Diagnóstico microbiológico y control de la legionelosis. Pelaz C (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2005. ISBN: 84-609-9044-3. <https://www.seimc.org/contenidos/Zdocumentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento-microbiologia20.pdf>.
- Fields BS. The molecular ecology of legionellae. Trends Microbiol. 1996;4:286–90, [http://dx.doi.org/10.1016/0966-842X\(96\)10041-X](http://dx.doi.org/10.1016/0966-842X(96)10041-X).
- Laganà P, Facciola A, Palermo R, Delia S. Environmental surveillance of legionellosis within an Italian university hospital—results of 15 years of analysis. Int J Environ Res Public Health. 2019;16:1103, <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph16071103>.
- Decker BK, Palmore TN. Hospital water and opportunities for infection prevention. Curr Infect Dis Rep. 2014;16:432, <http://dx.doi.org/10.1007/s11908-014-0432-y>.
- International Organization for Standardization. ISO 11731: 2007 Water Quality—Enumeration of Legionella. 2007.
- Real Decreto 487/2022, de 21 de junio, por el que se establecen los requisitos sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis. Ministerio de Sanidad; 2022.
- International Organization for Standardization. ISO 11731:2017 Water quality — enumeration of Legionella. 2017.
- Leoni E, Legnani PP. Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of *Legionella* species from hot water systems. J Appl Microbiol. 2001;90:27–33, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01178.x>.
- Edelstein PH. Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. J Clin Microbiol. 1982;16:697–9, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.16.4.697-699.1982>.
- Ta AC, Stout JE, Yu VL, Wagener MM. Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. J Clin Microbiol. 1995;33:2118–23, <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.33.8.2118-2123.1995>.
- Ditommaso S, Gentile M, Giacomuzzi M, Zotti CM. Recovery of *Legionella* species from water samples using an internal method based on ISO 11731: Suggestions

- for revision and implementation. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70:200–6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.01.013>.
13. Scaturro M, Poznanski E, Mupo M, Blasior P, Seeber M, Prast AM, et al. Evaluation of GVPC and BCYE media for *Legionella* detection and enumeration in water samples by ISO 11731: does plating on BCYE medium really improve yield? *Pathogens*. 2020;9:1–6, <http://dx.doi.org/10.3390/PATHOGENS9090757>.
14. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Memoli G, Garlasco J, Zotti CM. The use of BCYE medium for the detection of *Legionella* in environmental water samples: an appropriate update to ISO 11731:2017 standard. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2022;102:115593, <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115593>.