



## Validación de un método de aislamiento para *Legionella pneumophila* por medio de membrana de filtración

Validation of an isolation method for *Legionella pneumophila* by means of membrane filtration

Alejandra Lara<sup>1</sup> , Cristian Cufiño<sup>2</sup> , Marcela Gómez-Garzón<sup>3</sup> , Diana Ortiz<sup>4</sup> , Adriana Jiménez<sup>5</sup>

### Resumen

El aislamiento y detección de *Legionella pneumophila* en agua potable puede ser un proceso difícil, debido a que algunas de las técnicas existentes no recuperan la cantidad establecida por normas internacionales, y al ser un microorganismo exigente, se requiere de medios especiales para su recuperación y crecimiento. El objetivo del estudio fue validar un método de concentración por medio de la implementación del equipo Celltrazone<sup>®</sup> para lograr la recuperación en agar BCYE, utilizando muestras de agua potable con diferentes concentraciones de la bacteria. Para lograr este objetivo, se ensayaron tres tipos de tratamiento para el filtro obtenido después de la filtración por el equipo Celltrazone<sup>®</sup>, vortex, sonicación y agitación; sin embargo, al no aplicar ningún procedimiento al filtro y realizar su siembra directa se obtuvieron los mejores resultados. El análisis estadístico demostró que con el método seleccionado se puede concentrar hasta  $1 \times 10^2$  UFC, se alcanzó una sensibilidad del 100%, una especificidad del 80% y un valor de exactitud del 87,5%. El método de filtración de membrana utilizando el equipo Celltrazone<sup>®</sup> permitió aumentar la concentración de *L. pneumophila* en agua potable, cumpliendo con los intervalos normalizados por ISO y la OMS, por lo tanto, el método es apto para su aplicación asegurando resultados confiables.

**Palabras Clave:** *Legionella pneumophila*, Celltrazone<sup>®</sup>, filtración por membrana, validación.

<sup>1</sup> Bacteriólogo y Laboratorista Clínico, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Semillero de Investigación en Microbiología SIMIC, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, Bogotá, Colombia. [malejandralara@unicolmayor.edu.co](mailto:malejandralara@unicolmayor.edu.co)

<sup>2</sup> Bacteriólogo y Laboratorista Clínico, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Semillero de Investigación en Microbiología SIMIC, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, Bogotá, Colombia. [ccufino@unicolmayor.edu.co](mailto:ccufino@unicolmayor.edu.co)

<sup>3</sup> Integrante Grupo de Ciencias Básicas, Coordinadora Semillero de Investigación en Microbiología SIMIC, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, Bogotá, Colombia. [dcortiz@fucsalud.edu.co](mailto:dcortiz@fucsalud.edu.co)

<sup>4</sup> Grupo de Ciencias Básicas, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, Bogotá, Colombia.

<sup>5</sup> Grupo MEDINE, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud, Bogotá, Colombia. [amjimenez@fucsalud.edu.co](mailto:amjimenez@fucsalud.edu.co)

Recepción: 28/01/2023. Aceptación: 08/04/2023

**Cómo citar este artículo:** o: Lara A., Cufiño C., Gómez-Garzón M., Ortiz D., Jiménez A. Validación de un método de aislamiento para *Legionella pneumophila* por medio de membrana de filtración. Hechos Microbiol. 2023;14(1). DOI: 10.17533/udea.hm.v14n1a02

## Abstract

The isolation and detection of *Legionella pneumophila* in drinking water can be a difficult process due to the fact that some of the existing techniques do not recover the amount established by international standards and, as it is a demanding microorganism, special media are required for its isolation and growth. The objective of this study was to validate a concentration method through the implementation of the Celltrazone® equipment to achieve recovery in BCYE agar, using drinking water samples with different concentrations of the bacteria. To achieve this objective, three types of treatment were tested for the filter obtained after filtration by the Celltrazone® equipment, vortex, sonication and agitation; however, better results were obtained without applying any procedure to the filter and performing direct seeding. Statistical analysis showed that up to  $1 \times 10^2$  CFU can be concentrated with the selected method, a sensitivity of 100%, a specificity of 80% and an accuracy value of 87.5% were achieved. The membrane filtration method using the Celltrazone® equipment allowed to increase the concentration of *L. pneumophila* in drinking water, complying with the normalized intervals by ISO and WHO; therefore, the method is suitable for its application, ensuring reliable results.

**Keywords:** *Legionella pneumophila*, Celltrazone®, membrane filtration, validation.

## INTRODUCCIÓN

*Legionella pneumophila* es un bacilo Gram negativo que se encuentra en ambientes acuáticos naturales. El microorganismo coloniza la red de tuberías de agua potable de edificaciones antiguas y las malas condiciones de la infraestructura de los sistemas de calderas permiten al patógeno su establecimiento mediante la formación de biopelículas y su constante proliferación en un amplio rango de temperaturas, permitiendo en los hospitales, que llegue a infectar pacientes susceptibles al desarrollo de una neumonía asociada a la atención en salud por el contacto con agua contaminada (1).

En Colombia, la Guía Técnica Colombiana GTC 257:2015 expone los criterios y las acciones que se deben llevar a cabo para controlar y prevenir la aparición

y multiplicación del microorganismo en instalaciones y equipos de diferentes sistemas de agua potable (2). Sin embargo, la Guía no propone una metodología para el aislamiento y detección del patógeno en agua potable, por lo tanto, no hay un protocolo establecido para buscar la presencia *L. pneumophila* en la red de abastecimiento de agua en edificaciones, como las instituciones hospitalarias. Aunque, el cultivo es el principal método de diagnóstico, *L. pneumophila* es un patógeno exigente nutricionalmente lo que implica el uso de medios especiales y la aplicación de técnicas que permitan concentrar las muestras de agua para lograr su recuperación, dos factores que se suman al problema de salud pública.

En el país no existen notificaciones de brotes causados por este microorganismo. Patiño-Barbosa y col., realizaron un estudio observacional y retrospectivo de datos recolectados en el Registro Individual de Prestación de Servicios (RIPS) entre 2009-2013, y concluyeron que la enfermedad está presente en Colombia, basados en la notificación de 206 casos con un promedio de 41,2 casos por año, y que existe un subregistro de casos en la población de mayor edad, donde habitualmente la infección de vías respiratorias no incluye *Legionella* spp. como diagnóstico diferencial (3).

En España, la legionelosis es una de las enfermedades objeto de notificación obligatoria y de acuerdo al Real Decreto 487/2022 se establecieron los requisitos sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis. El Real Decreto tiene como objeto la protección de la salud de la población a través de la prevención y control de la legionelosis mediante la adopción de medidas sanitarias en aquellas instalaciones que utilicen agua en las que *Legionella* es capaz de proliferar y diseminarse a través de aerosoles y la exposición de las personas a los mismos (4).

De acuerdo al Ministerio de Salud de Colombia (Decreto 1575 y resolución 2115 del año 2007), en el análisis microbiológico de las aguas no se buscan microorganismos patógenos específicos, es decir, no se aísla o identifican los microorganismos patógenos del agua, solo se determina la presencia o ausencia de contaminación de origen fecal. En el artículo 11 se propone la aplicación de la técnica del número más probable, la técnica enzimática de sustrato definido o la técnica de filtración por membrana para determinación de coliformes totales y de *Escherichia coli* (5).

Aunque las pruebas microbiológicas son recomendadas en los programas de monitoreo general, existen otros métodos disponibles para detectar *Legionella* en los sistemas de agua. La técnica de PCR es sensible, específica, proporciona resultados en menos de 24 h y determina la presencia/ausencia de *Legionella* spp. o ADN de este microorganismo. Sin embargo, su ejecución requiere de personal laboratorios especializados, y aunque ahora existen opciones de PCR en el país, los estudios no muestran un acuerdo entre la comparación de las unidades del genoma con las unidades formadoras de colonias (UFC) y los límites de detección. Los ensayos de separación inmuno-magnética son independientes del cultivo, detectan múltiples especies de *Legionella*, y los resultados están disponibles en 24 h, con opciones de procesamiento automatizado. Los dispositivos de flujo lateral para usarse en campo permiten determinar la presencia/ausencia de *L. pneumophila* del serogrupo 1 cuando hay alta carga bacteriana, pero las pruebas en aguas potables no han dado resultados confiables (6).

El semillero SIMIC viene trabajando en la implementación del equipo Celltrazone® para filtración de aguas y recuperación de *Legionella pneumophila*, por lo cual el proceso de validación de este método es el paso inicial para su uso en laboratorios de microbiología. Por tanto, el objetivo del presente estudio es el de validar un método que mejore el aislamiento de *Legionella pneumophila* en agua potable, por medio del equipo Celltrazone®.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo experimental. El trabajo fue financiado por Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud por Convocatoria Fortalecimiento de Semilleros 2021 (DI-I0126-21) y aprobado por el Comité de Ética.

Como muestra para la validación se utilizó agua potable y la cepa de *Legionella pneumophila* subsp. *fraseri* ATCC 33156. Además, cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2783, en diluciones  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^4$ , se utilizaron para determinar la selectividad del medio BCYE (charcoal-yeast extract agar) de la marca Liofilchem® (Roseto degli Abruzzi, Italy) (7).

La siembra se llevó a cabo por el método de Kass y la lectura se realizó a las 48 horas de incubación a 37°C.

Se preparó *L. pneumophila* subsp. *fraseri* a una concentración de  $1,5 \times 10^8$  por espectrofotometría y diluciones seriadas desde  $1 \times 10^7$  hasta  $1 \times 10^3$ , utilizando agua potable que fue recolectada de un grifo para recrear las condiciones ambientales de la bacteria. Las diferentes diluciones de muestras fueron procesadas por duplicado en el equipo Celltrazone® con el programa Huro Paths, siguiendo las especificaciones del fabricante y la membrana del filtro fue recuperada bajo condiciones estériles (8).

### PROCESOS Y TRATAMIENTOS DE LA MEMBRANA DEL FILTRO

Las membranas del filtro se llevaron a cuatro procedimientos de la siguiente forma:

- i) **Sonicación:** Cada membrana obtenida se introdujo en una placa de Petri de 50 mm de diámetro con 2 mL de agua estéril y se utilizó el sonicador Elmasonic Easy 30H, durante 10 minutos con una frecuencia de 60 Hz.
- ii) **Agitación:** En placas ThermoFisher Scientific de 6 pozos se colocaron las membranas obtenidas y se agregó 2 mL de agua estéril, la placa se colocó en agitación en el equipo ThermoFisher durante 5 minutos a 1250 rpm.
- iii) **Vortex:** Cada membrana se colocó en 2 mL de agua estéril en tubo falcón de 10 mL y se agitó durante 15 minutos en Vortex V-1 plus.

En todos los procedimientos se realizó la siembra del líquido en medio BCYE empleando el método de Kass con asa calibrada de 10  $\mu$ L y se incubó a  $36 \pm 2$  °C durante 48 horas en atmósfera de 2,5% de CO<sub>2</sub>.

- iv) **No se aplicó ninguna técnica:** La membrana recuperada del equipo y la cual no fue sometida a ningún procedimiento, se colocó directamente sobre el agar BCYE durante 30 segundos y se retiró la membrana. La caja fue incubada a  $36 \pm 2$  °C durante 48 horas en atmósfera de 2,5% de CO<sub>2</sub>.

### VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para realizar la validación se escogió como método de referencia la siembra directa de las diluciones seriadas de *Legionella pneumophila* desde  $1 \times 10^7$  hasta  $1 \times 10^3$  y como método alterno “sin aplicar ninguna técnica” a la membrana de filtración obtenidas de las diluciones seriadas desde  $1 \times 10^7$  hasta  $1 \times 10^3$ . Se realizaron 12 réplicas de cada ensayo.

Basado en el documento Validación de Métodos Microbiológicos del Invima (7), para obtener los resultados estadísticos se efectuó el conteo de UFC (unidades formadoras de colonias), donde (+) significa desarrollo de colonias en el medio de cultivo y (-) ausencia de crecimiento. Para evaluar estadísticamente el método escogido se calcularon los parámetros de límite de detección, sensibilidad, especificidad, falsos positivos, falsos negativos, exactitud relativa, sensibilidad relativa, especificidad relativa y exactitud. Se calcularon las variables con las fórmulas presentadas en la tabla 1.

**Tabla 1:** Fórmulas para verificar del método

Medida	Fórmula	Referencia
Límite de detección	$P(+)=1-e^{-m}$	(6)
Sensibilidad	$Sensibilidad=\frac{a}{a+b} \times 100$	(8,9)
Especificidad	$Especificidad=\frac{d}{c+d} \times 100$	(7,9)
Falsos positivos	$Falsos(+)=\frac{c}{a+c} \times 100$	(7,9)
Falsos negativos	$Falsos(-)=\frac{d}{b+d} \times 100$	(8,9)
Exactitud relativa	$Exactitud\ relativa=\frac{a+d}{N} \times 100$	(8,9)
Sensibilidad relativa	$SR=\frac{a}{N+} \times 100$	(8,9)
Especificidad relativa	$ER=\frac{d}{N-} \times 100$	(8,9)
Selectividad	$Selectividad=\text{Log}\left(\frac{a+c}{N}\right)$	(8,9)

e: Es la base de logaritmo natural; m: Es el número promedio de UFC por porción analítica; a: Son los acuerdos positivos; b: Es la desviación positiva; c: Es la desviación negativa; d: Son los acuerdos negativos

**TRATAMIENTO DE DATOS**

Se realizó análisis univariado con determinación de medias, desviaciones estándar (DS) y se realizó una ANOVA para determinar un factor entre los recuentos de UFC que se realizaron.

**RESULTADOS**

La selectividad de un medio de cultivo se define como la capacidad para inhibir el desarrollo de microorganismos no específicos. En el medio BCYE se inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* a las diluciones  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ . Al no obtener crecimiento de estos microorganismos en ninguna de las diluciones, se reportó el factor de selectividad como inhibición total.

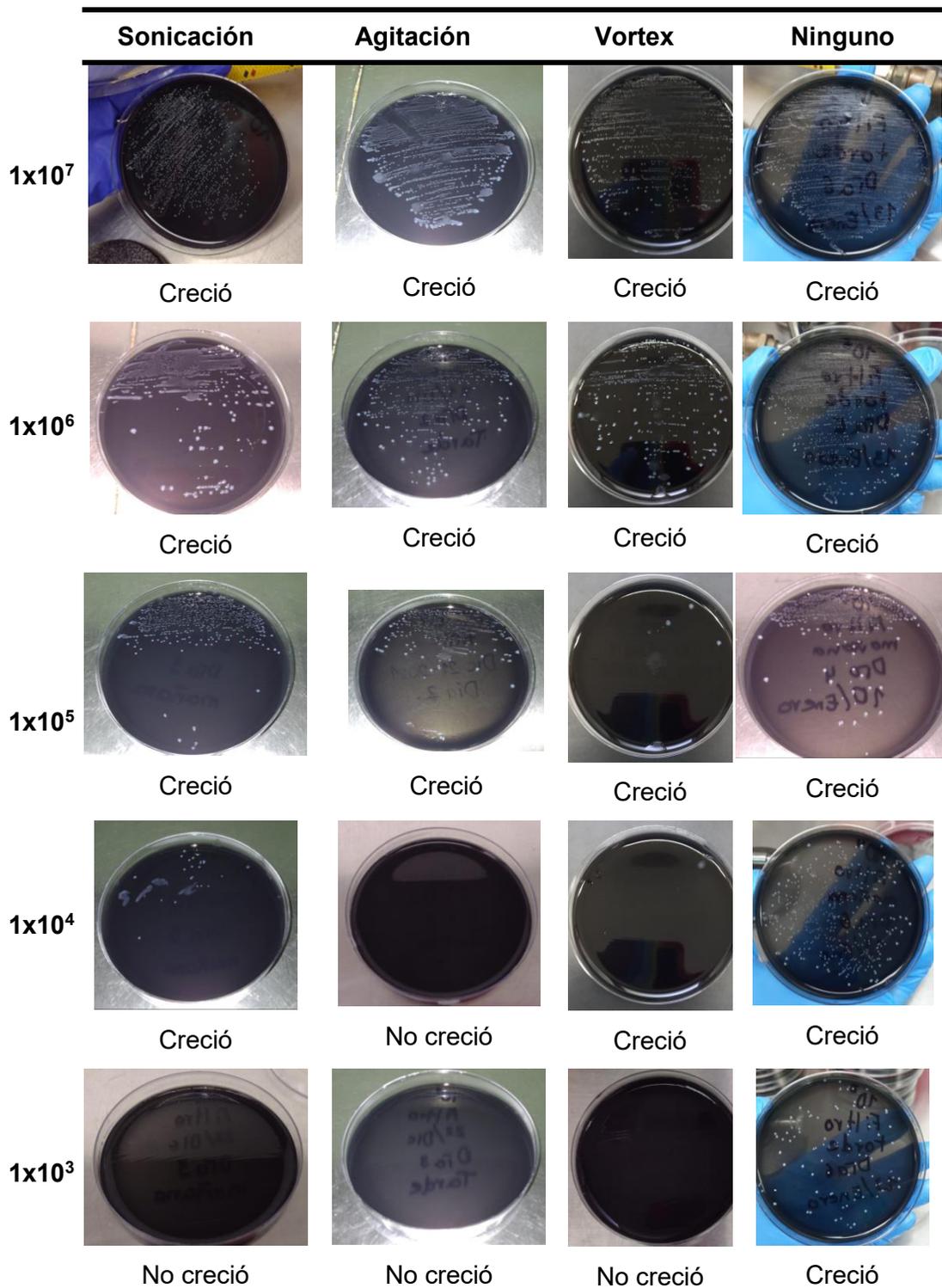
Los cultivos de *L. pneumophila*, en BCYE, de los cuatro procedimientos aplicados en las membranas del filtro y del método de referencia (la siembra directa de las diluciones seriadas de *Legionella*) se muestran en la figura 1.

Basados en los resultados de crecimiento de *L. pneumophila* en las diluciones  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^3$  (tabla 2), se seleccionó “no aplicar ninguna técnica” en el procesamiento de la membrana del filtro antes de realizar el cultivo.

Los resultados de crecimiento de *L. pneumophila* en agar BCYE para la validación del método de filtración con equipo Celltrazone® se presentan en la tabla 2.

**Tabla 2:** Réplicas de crecimiento de *L. pneumophila* en agar BCYE. (+): creció, (-): no creció. MR: Método de Referencia y MA: Método Alternativo.

Replica	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
Nivel	MR	MA																						
$1 \times 10^3$	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
$1 \times 10^4$	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
$1 \times 10^5$	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
$1 \times 10^6$	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
$1 \times 10^7$	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)



**Figura 1:** Crecimiento de *Legionella pneumophila* en agar BCYE utilizando los tratamientos de la membrana del filtro y el método de referencia.

Adicionalmente, se determinaron los parámetros estadísticos que permitieron validar el proceso microbiológico cualitativo del estudio. A continuación, en la tabla 3, se presentan los resultados de cada variable.

**Tabla 3:** Valores estadísticos representativos de la validación para la recuperación de *Legionella pneumophila*.

Parámetro estadístico	Resultados
Límite de detección	1x10 <sup>2</sup>
Sensibilidad	100 %
Especificidad	80 %
Falsos positivos	20%
Falsos negativos	0 %
Exactitud relativa	87,5%
Sensibilidad relativa	75%
Especificidad relativa	100%
Selectividad	-0.30

La determinación del límite de detección del método alternativo “no aplicar ninguna técnica” en el procesamiento de la membrana del filtro se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4:** Estimación del límite de detección del método por filtración de membrana en el Celltrazone®.

Dilución	Recuento promedio de UFC	<i>Legionella pneumophila</i> $P(+) = 1 - e^{-m}$
1x10 <sup>5</sup>	327	1
1x10 <sup>4</sup>	101	1
1x10 <sup>3</sup>	33	1
1x10 <sup>2</sup>	3	0,88
1x10 <sup>1</sup>	0	0

## DISCUSIÓN

*Legionella pneumophila* es un microorganismo que habita en el agua y su capacidad para contaminar sistemas de aguas de hoteles, hospitales y spas, entre otros, ha llevado al desarrollo de programas de vigilancia para evitar su propagación mediante su pronta detección, eliminación y control, especialmente en países de la Unión Europea. En el caso de Colombia, la normativa no estipula la metodología que debe utilizarse para la detección del patógeno y no establece los límites de referencia que deben cumplir las muestras de agua procedentes de los entornos hospitalarios.

Para recuperar la bacteria se utilizó el medio de cultivo BCYE que contiene componentes nutricionales necesarios para *Legionella* y la comunidad microbiana acompañante no debería crecer. En el inserto del medio de Liofilchem® se menciona que *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* pueden crecer en el medio BCYE suplementado (11,12); sin embargo, no mencionan las concentraciones de desarrollo. El agar BCYE de la casa comercial Neogen®, en el ítem de “Control de Calidad” proporciona las concentraciones a las cuales *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* son inhibidas (10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup>) (13). Y en el Manual de Microbiología de Merck (66), se menciona que con un inóculo de 5000 UFC *E. coli* y 50-500 UFC de *P. aeruginosa* no hay recuperación (7). Nuestros ensayos de selectividad demostraron que *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* son inhibidas en el medio de cultivo BCYE, asegurando la no interferencia de estos microorganismos en el proceso de validación.

El equipo Celltrazone® utiliza métodos de filtración y precipitación a través de membrana dual; la primera membrana del filtro retiene los residuos innecesarios y la segunda membrana toma sólo las células requeridas para la impresión de la lámina después de drenar el líquido innecesario, logrando una excelente concentración de muestras (8). Por esta razón logramos en nuestros ensayos una alta recuperación de *L. pneumophila*. En algunos protocolos de pre-validación se mostró que los filtros debían ser sometidos a diferentes procedimientos para mejorar la detección de microorganismos que pueden proliferar en suministros de agua potable (14), por esta razón evaluamos los cuatro protocolos descritos. Bartie y col. evaluaron sonicación y vortex de los filtros de detección de especies de *Legionella*, sus resultados indicaron que la concentración por filtración de membrana utilizando filtros de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm, seguida de sonicación durante 10 minutos, sería el método de concentración y resuspensión más apropiado para las muestras (15). De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, el uso de vortex o sonicación es insuficiente para lograr separar las bacterias que permanecen retenidas en los poros de la membrana, y evidenciamos que al colocar el filtro directamente sobre el medio y realizar la estría se logra el crecimiento del microorganismo. Una ventaja de este protocolo es que al evitar manipular la membrana se pierden menos microorganismos.

Basados en los resultados estadísticos, se determinó que el método aplicado es útil para recuperar el microorganismo en el agua, incluso en bajas concentraciones que se consideran potencialmente peligrosas para la salud. Teniendo en cuenta los parámetros de validación determinamos que se tiene como mínima cantidad de colonias obtenidas, una concentración de  $1 \times 10^2$  UFC, cumpliendo así con lo notificado en la norma ISO 11731:2017 donde la filtración por membrana y posterior cultivo debe cumplir un límite de detección mínimo de  $1 \times 10^4$  UFC, y también, con el establecido por la OMS con un intervalo de  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^3$  UFC (15). En el trabajo realizado por Ezerrano y col. (16) se menciona que los inmunosensores basados en filtración tienen apenas un límite de detección entre  $1 \times 10^8$  hasta  $1 \times 10^6$  y para alcanzar una concentración de  $1 \times 10^4$  se necesitaba aplicar un paso de preconcentración y, aun así, no lograron alcanzar los estándares establecidos para la vigilancia de *Legionella* spp. según la OMS.

Según la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, en su documento de Validación y verificación analítica de métodos microbiológicos, recomiendan que los valores de sensibilidad y especificidad deben ser superiores al 90% (17), el método realizado en este estudio presentó una sensibilidad del 100%, es decir, que identificó todas las muestras que contenían el microorganismo y responden positivamente al método. Pita-Fernández y col. afirman que pruebas con porcentaje de especificidad menor del 50% deben ser rechazadas (18), la especificidad del método aplicado fue del 80%, la cual se considera buena y permite dar validez a los resultados obtenidos. Al ser una evaluación cualitativa se indica que la elección y las fuentes de las muestras de agua deben ser revisadas para distinguir *Legionella* de microorganismos acompañantes.

De igual manera se puede analizar otros valores como falsos positivos y negativos, estos son determinados porque se pretende demostrar que la microbiota acompañante no influencia el resultado del ensayo, lo ideal es que fuera 0%, como se observa en el caso de los falsos negativos; sin embargo, para el caso de los falsos positivos al ser del 20% es un valor que corresponde a muestras que arrojaron resultado positivo cuando la correcta caracterización indica que es nega-

tivo. Al analizar estos valores se llega a pensar que el método es bueno, pero puede ser mejorado.

La exactitud del método muestra la relación entre los resultados obtenidos del nuevo método y el de referencia, este puede ser evaluado al determinar la recuperación de cantidades conocidas de un microorganismo que se ha adicionado a una muestra. Sandle T., establece que al comparar entre dos métodos, a veces se establece un valor del 70% (19), en el caso de nuestro ensayo se obtuvo un valor de 87,5%, por lo tanto, lo consideramos como aceptable.

La selectividad es una medida que determina si existen sustancias que interfieren en la determinación de *L. pneumophila* de acuerdo con un procedimiento dado. Según esto, nuestro método es muy selectivo con un valor de -0,30, que se considera incluso mejor que el valor guía de -1 sugerido por ISO/TR 13843 (20) para métodos de recuento de colonias.

De acuerdo a todos los resultados obtenidos se logró validar el método de filtración por membrana con el equipo Celltrazone®, obteniendo la mayor recuperación de *L. pneumophila* y concentraciones que concuerdan a las mencionadas por las normas internacionales de recuperación en muestras de agua potable.

## CONCLUSIONES

Utilizando el equipo Celltrazone se logró validar el método por filtración de membrana para el aislamiento de *Legionella pneumophila*. Los resultados demostraron que al no realizar un tratamiento previo de los filtros, permitió recuentos mayores en las placas de agar donde se probaron concentraciones de  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^4$  a diferencia de la siembra directa que no obtuvo recuentos en estas dos diluciones.

Los parámetros de validación estadísticos para evaluar la viabilidad del nuevo método, como sensibilidad de 100%, especificidad de 80% y exactitud de 87,5%, entre otros, evidencian la capacidad de que el método puede pasar a la etapa de implementación, utilizando muestras en los diferentes servicios de hospitales.

**Financiación Total:** Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud por Convocatoria Fortalecimiento de Semilleros 2021 (DI-I0126-21)

**Conflicto de intereses.** Los autores manifiestan no tener conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

1. **Ortí Lucas RM.** Vigilancia epidemiológica, prevención y control de la Legionella en el hospital. Rev Salud Ambient. 2015; 21(15),(0 SE-Ponencias):37–41. Disponible en: <https://ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/view/738>
2. **INCONTEC.** Guía Técnica Colombiana GTC 257:2015 “Guía para la Prevención y Control de la Proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones.” 2015.
3. **Patiño-Barbosa AM, Gil-Restrepo AF, Restrepo-Montoya V, Villamil-Gomez WE, Cardona-Ospina JA, Rodríguez-Morales AJ.** Is Legionellosis Present and Important in Colombia? An Analyses of Cases from 2009 to 2013. Cureus. 2017;9(3):e1123. DOI: 10.7759/cureus.1123.
4. **Estado BO del. Real Decreto 487/2022 [Internet].** España; 2022 p. 86158–212. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2022/06/22/pdfs/BOE-A-2022-10297.pdf>
5. **Ministerio de la Protección Social y de Ambiente V y DT.** Resolución 2115 [Internet]. Colombia; 2007; 1–23. Disponible en: [https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/Resolución\\_2115\\_de\\_2007.pdf](https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/Resolución_2115_de_2007.pdf)
6. **Walker JT, McDermott PJ.** Confirming the Presence of Legionella pneumophila in Your Water System: A Review of Current Legionella Testing Methods. J AOAC Int. 2021;104(4):1135-1147. DOI: 10.1093/jaoacint/qsab003
7. **Merck. Microbiology Manual** [Internet]. 2007. 689 p. Available from: [http://www.laboquimia.es/pdf\\_catalogo/MERCK\\_Manual\\_de\\_microbiologia\\_12a\\_edicion.pdf](http://www.laboquimia.es/pdf_catalogo/MERCK_Manual_de_microbiologia_12a_edicion.pdf)
8. **CelltraZone. Huro Pah S. Slide Sample Processor.** User manual [Internet]. Korea; 2015. p. 37. Available from: [https://dmech.moh.gov.vn/documents/10182/8891204/u p l o a d \\_ 0 0 0 8 6 6 7 0 \\_ 1 5 4 2 8 8 2 2 9 1 2 6 2 . pdf?version=1.0&fileId=8898267](https://dmech.moh.gov.vn/documents/10182/8891204/u p l o a d _ 0 0 0 8 6 6 7 0 _ 1 5 4 2 8 8 2 2 9 1 2 6 2 . pdf?version=1.0&fileId=8898267)
9. **Invima.** Validación de Métodos Microbiológicos [Internet]. 2016. Disponible en: <https://www.invima.gov.co/documents/20143/1433420/Validación+cualitativa+Microbiología.pdf>
10. **Ruiz A, Gómez C.** Epidemiología Clínica Investigación Clínica. 2nd ed. Editorial Medica Panamericana, editor. Bogotá; 2015. 369 p.
11. **Liofilchem.** Legionella CYE Agar Base [Internet]. 2015. Available from: [http://www.liofilchem.net/login/pd/pi/81056\\_PI.pdf](http://www.liofilchem.net/login/pd/pi/81056_PI.pdf)
12. **Liofilchem.** Legionella BCYE Growth Supplement [Internet]. 2015. Available from: [http://www.liofilchem.net/login/pd/pi/81056\\_PI.pdf](http://www.liofilchem.net/login/pd/pi/81056_PI.pdf)
13. **Neogen.** Agar BCYE | Medio de aislamiento de Legionella [Internet]. 2021. Available from: <https://www.neogen.com/es/categories/microbiology/bcye-agar-legionella-isolation-medium/>
14. **Rodríguez-Martínez S, Blanky M, Friedler E, Halpern M.** Legionella spp. isolation and quantification from greywater. MethodsX. 2015;2:458-62. DOI: 10.1016/j.mex.2015.11.004.
15. **Bartie C, Venter S, Nel L.** Evaluation of detection methods for Legionella species using seeded samples. Water SA. 2001; 27(4):1;27. DOI: 10.4314/wsa.v27i4.4966
16. **Ezenarro JJ, Párraga-Niño N, Sabrià M, Del Campo FJ, Muñoz-Pascual F-X, Mas J, et al.** Rapid Detection of Legionella pneumophila in Drinking Water, Based on Filter Immunoassay and Chronoamperometric Measurement. Biosensors. 2020; 10(9):102. DOI: 10.3390/bios10090102
17. **Camaro Sala M, Catala V, Gimeno C, Martínez R, Olmos P.** Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. In: Procedimientos en Microbiología Clínica [Internet]. 2013. p. 35. Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia48.pdf>
18. **Pita-Fernandez S, Pértegas-Díaz S.** Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. Cad Aten Primaria. 2003;18:180–2. Available from: <https://www.studocu.com/ec/document/universidad-nacional-de-loja/probabilidad-y-estadistica/sensibilidad-y-especificidad/8731980>
19. **Sandle T.** Approaching Microbiological Method Validation. J GXP Compliance. 2015;19:1–15.
20. **UNE.** UNE-EN ISO 11731:2017. Calidad del agua. Recuento de Legionella. 2017.