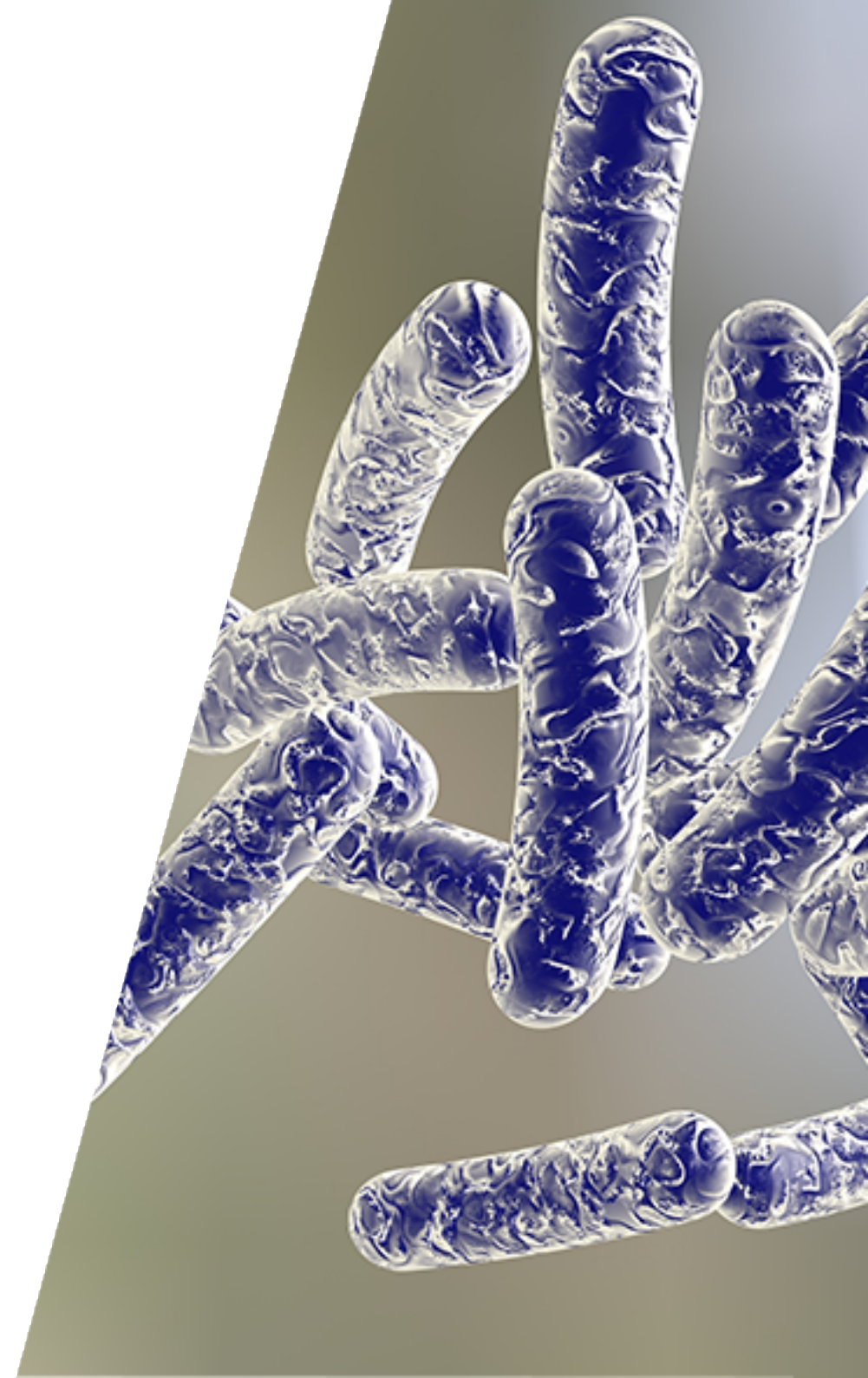




Condalab

Inspired by knowledge

**Microbiología Predictiva: métodos
convencionales y qPCR para el análisis de
*Legionella spp***

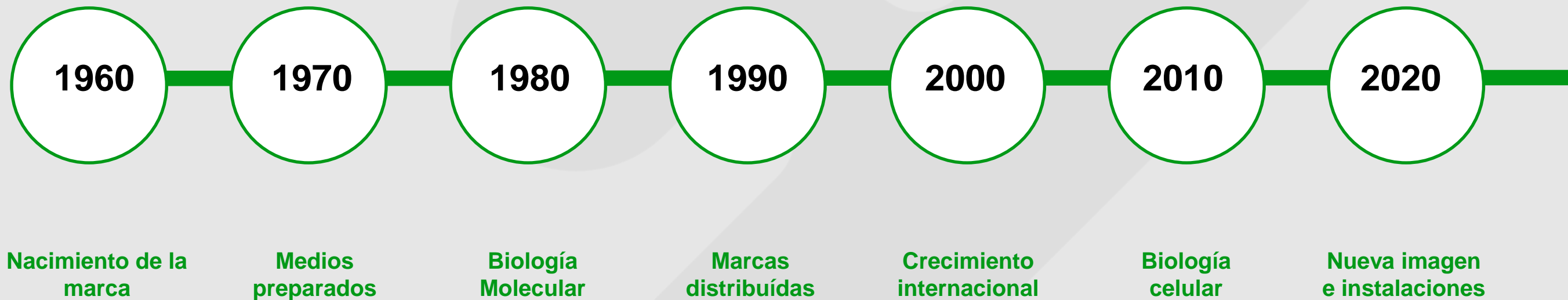




Nuestra historia. Trayectoria.

Dedicados a innovar.

Nuestra manera de ser nos impulsa a mejorar cada día a desarrollar nuevos retos, a evolucionar. Una esencia que se refleja en una trayectoria dinámica e innovadora, constantes desde nuestro nacimiento en 1960.





Para quién lo hacemos. Nuestro público.

Los productos Condalab están dirigidos a:



Análisis clínicos.

Hospitales, clínicas veterinarias, laboratorios de análisis clínico y alimentario.



Controles de calidad.

Industria alimentaria y de bebidas, cerveceras, Industria farmacéutica e industria cosmética.



Procesos productivos.

Fermentaciones, fabricación de vacunas, probióticos, fabricantes de medio preparado.



Investigación i+D.

Laboratorios y centros de investigación, universidades...



Nuestras instalaciones.

Espacio Condalab.

Con sede en Madrid, nuestra empresa privada cuenta con un total de 4.500 metros cuadrados de planta, así como un equipo humano de 65 profesionales altamente cualificados.



4.500m²
de planta





Microbiología Predictiva: métodos convencionales y qPCR para el análisis de *Legionella* spp



1. La bacteria y la enfermedad
2. Método ISO 11731:2017
3. Métodos alternativos
4. Perspectiva general
5. Q&A

XIX workshop
**MÉTODOS RÁPIDOS Y AUTOMATIZACIÓN
EN MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA**
–memorial *DYCFung*–



*There must be a better way
to do microbiology*
DYCFung

A microscopic view of several Legionella bacteria, which are rod-shaped and have a textured, filamentous surface. They are arranged in various orientations against a dark blue background. A white diagonal line separates this image from the rest of the slide.

01

Legionella spp. en análisis de aguas
LA BACTERIA Y LA ENFERMEDAD



Legionella spp.

- Aerobio, bacteria G(-)
- Predominante en entornos **acuáticos**
- Rango de crecimiento 20 – 55°C
- > 60 especies confirmadas, 70 serotipos distintos
- Familia *Legionellaceae*, único género *Legionella*

Legionella, Fluriobacter & Tatlockia

- **Biofilms**



Legionelosis

- ¿Enfermedad del legionario o fiebre de Pontiac?
- ¿Cómo discernir con otros tipos de neumonía?

Pruebas microbiológicas

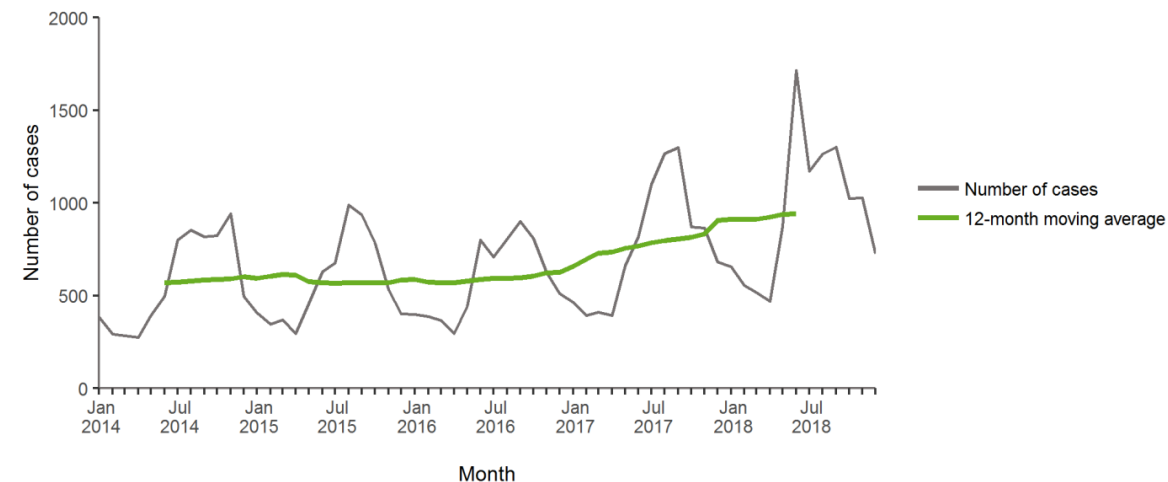
- *L. pneumophila* > **90% casos** en EEUU, serotipo 1
30 especies se reportan como patogénicas
- Transmisión vía **aerosoles**
- Grupo de riesgo: hombres mayores de 50
- UE-ECDC: **incremento de 23%** en todos los casos
4 países responsables por 71% de los casos notificados
- Brotes nosocomiales y prevención
Infecciones en hospitales 14-40%





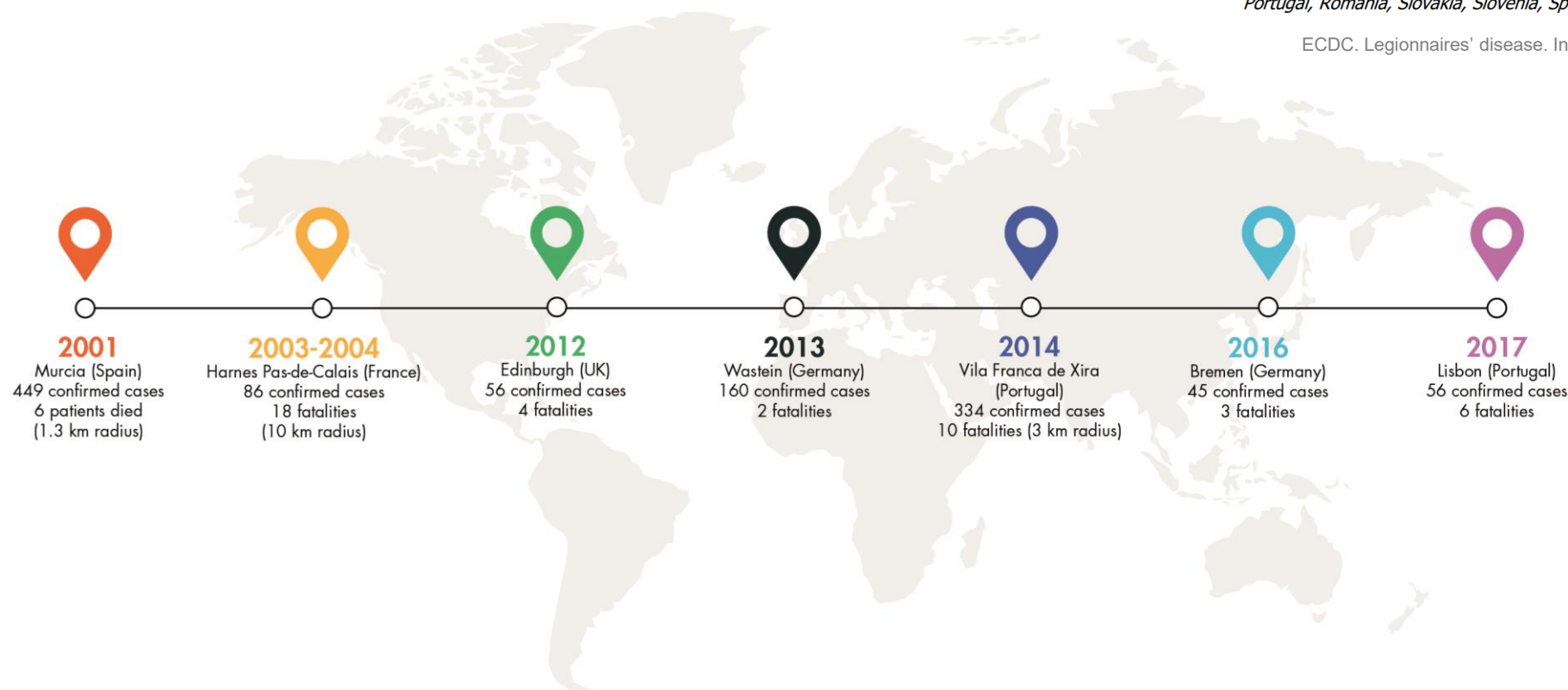
Brotos en Europa

Figure 2. Distribution of Legionnaires' disease cases by month, EU/EEA, 2014–2018



Source: Country reports from Austria, Belgium, Bulgaria, the Czech Republic, Cyprus, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, the Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden and the United Kingdom.

ECDC. Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2020.



02

Legionella spp. en análisis de aguas
MÉTODO ISO 11731:2017

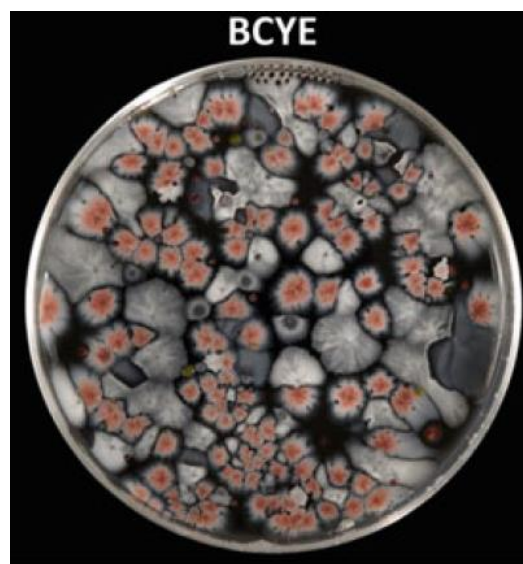


ISO 11731:2017 Calidad del agua – Recuento de *Legionella*

1. ↑ [] Legionella ↓ [] flora	<ul style="list-style-type: none">• Directamente en agar BCYE y agar BCYE + AB
2. ↓ [] Legionella ↓ [] flora	<ul style="list-style-type: none">• 1) PT opcional → FM: agar BCYE/ agar GVPC/ agar MWY• 2) PT → FM + elución: agar BCYE + agar BCYE+AB/agar GVPC/agar MWY
3. ↑↑ [] Flora	<ul style="list-style-type: none">• Sin concentrar, concentrada y diluida• Pre-tratamiento por submuestra: ácido, térmico y sin tratar• Agar GVPC/agar MWY
4. ↑↑↑↑ [] Flora	<ul style="list-style-type: none">• Pre-tratamiento combinado: térmico y ácido• Sin concentrar y diluida• Agar GVPC/agar MWY
Procedimiento común	<ul style="list-style-type: none">• Incubación: 36± 2°C → 7-10 días• Confirmación: agar BCYE y agar BCYE-cys → 2-5 días• Resultados: Crecimiento positivo en agar BCYE y negativo en agar BCYE-cys

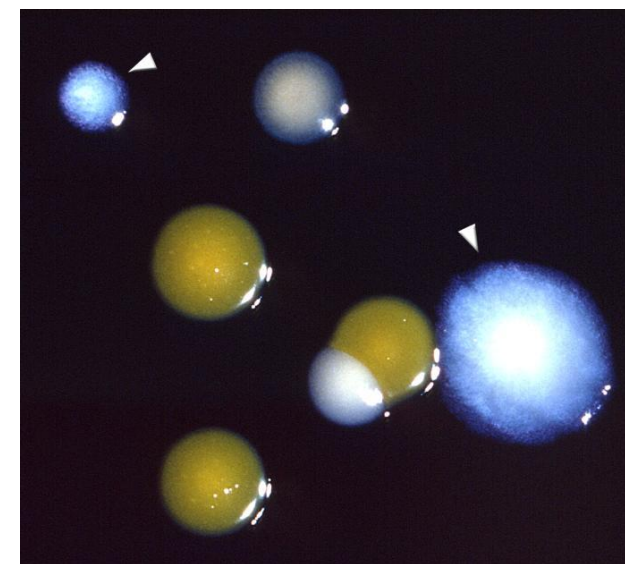


ISO 11731:2017 Resultados – Lectura de la placa



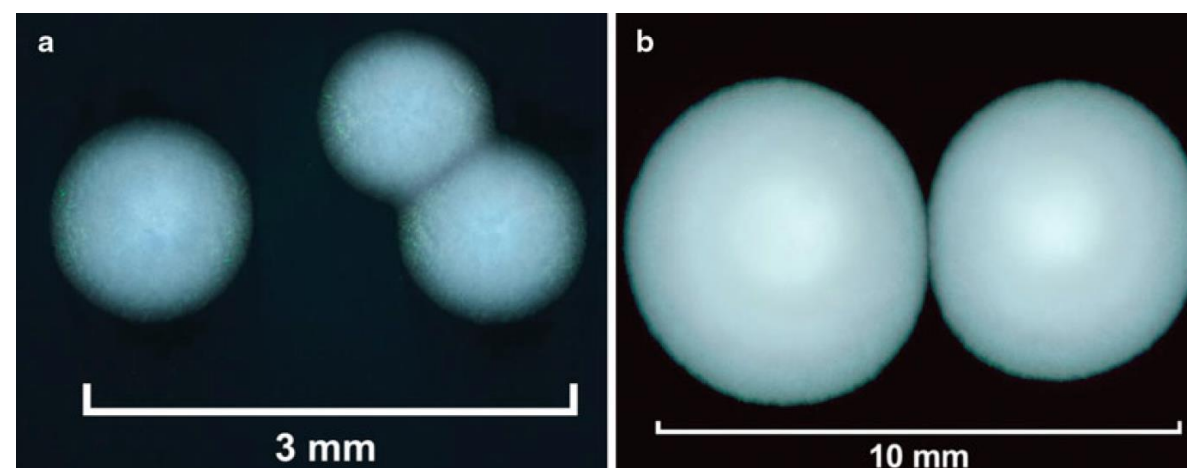
Crecimiento en BCYE con microorganismos no pertenecientes a *Legionella* spp.

Buchrieser, C., Hilbi, H., *Legionella: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. New York: Springer, 2013.



Colonias de *Legionella pneumophila* y otras bacterias en agar BCYE

Outbreak News Today. Legionnaire disease outbreak in Hopkins. CDC. 2016.



Colonias de *Legionella* después de 3 días (a) y 7 días (b)

Buchrieser, C., Hilbi, H., *Legionella: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. New York: Springer, 2013.



ISO 11731:2017 Cuellos de botella

Tiempo y trabajo de lab

- Muestra a resultados > 15 días
- Inspección de la placa (2^{do}, 3^{ro}, 5^{to} y último día)

Variabilidad

- Muestra origen y características
- Concentración y/o dilución
- Pre-tratamientos (ácido o térmico)
- Múltiples medios (preparación "compleja")

Inclusividad

Confirmación **obligatoria**

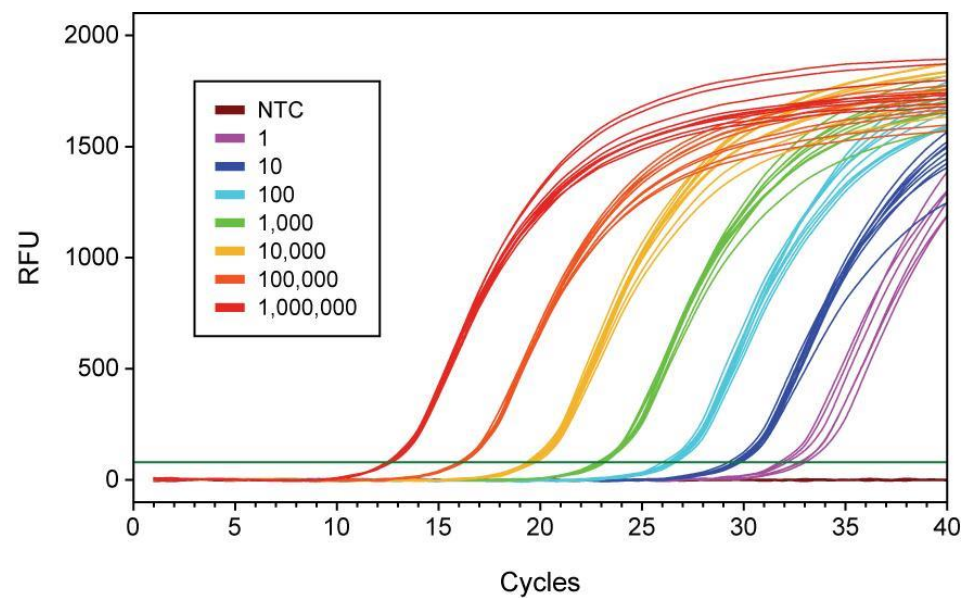
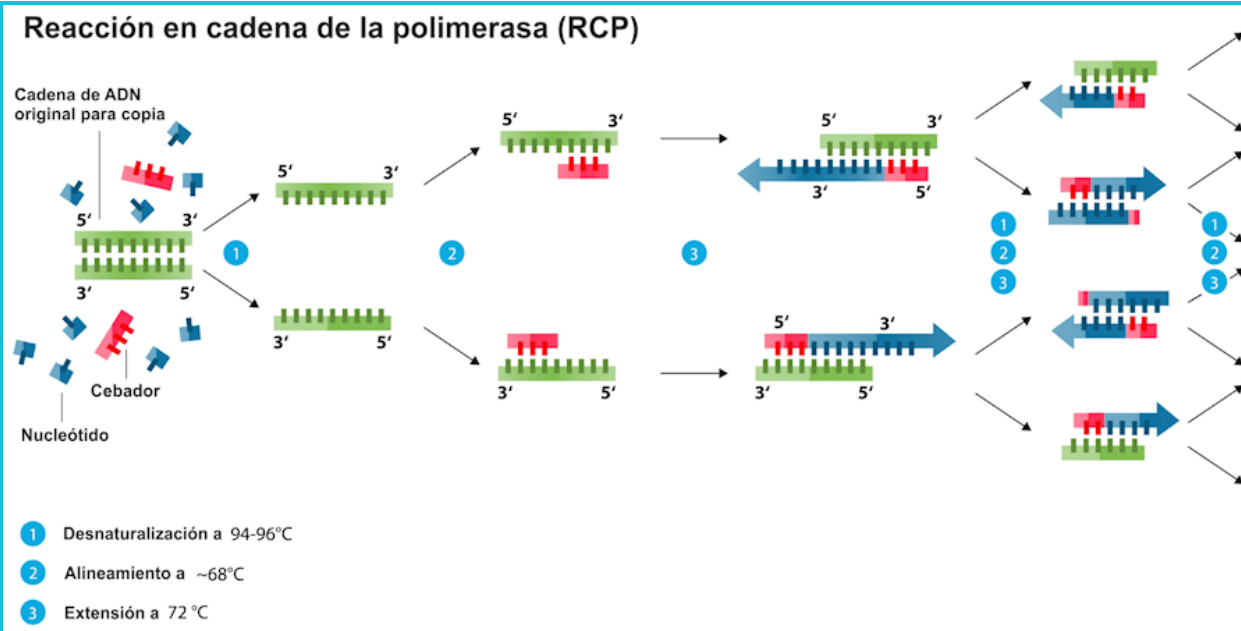


03

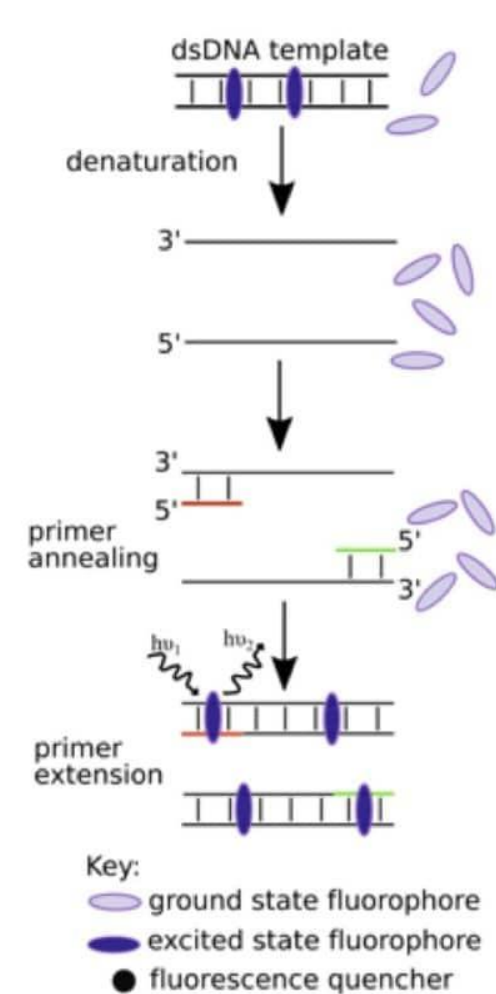
Legionella spp. en análisis de aguas
MÉTODOS ALTERNATIVOS



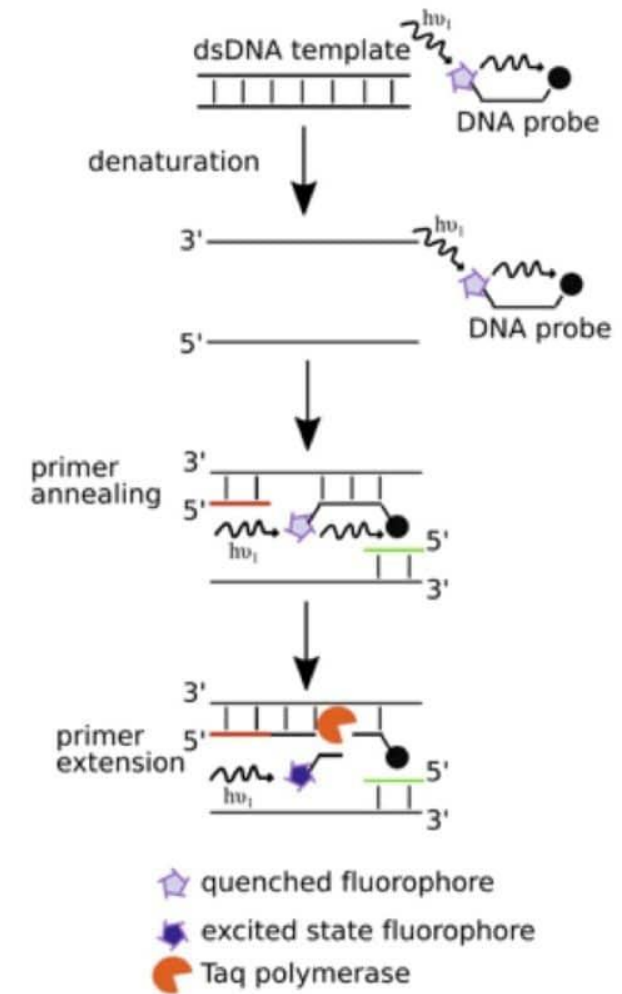
qPCR y sondas



Fluorescent dye-based real-time PCR



DNA probe-based real-time PCR





BIOTECON Diagnostics



Controles Internos

- ISO 12869:2012 PCR para la detección y cuantificación de *Legionella* spp. y/o *L. pneumophila*
- Requisitos generales y definiciones:
 - Control Interno de Proceso (IPC) -> protección frente a falsos negativos
 - Control **positivo**
 - Control **negativo**

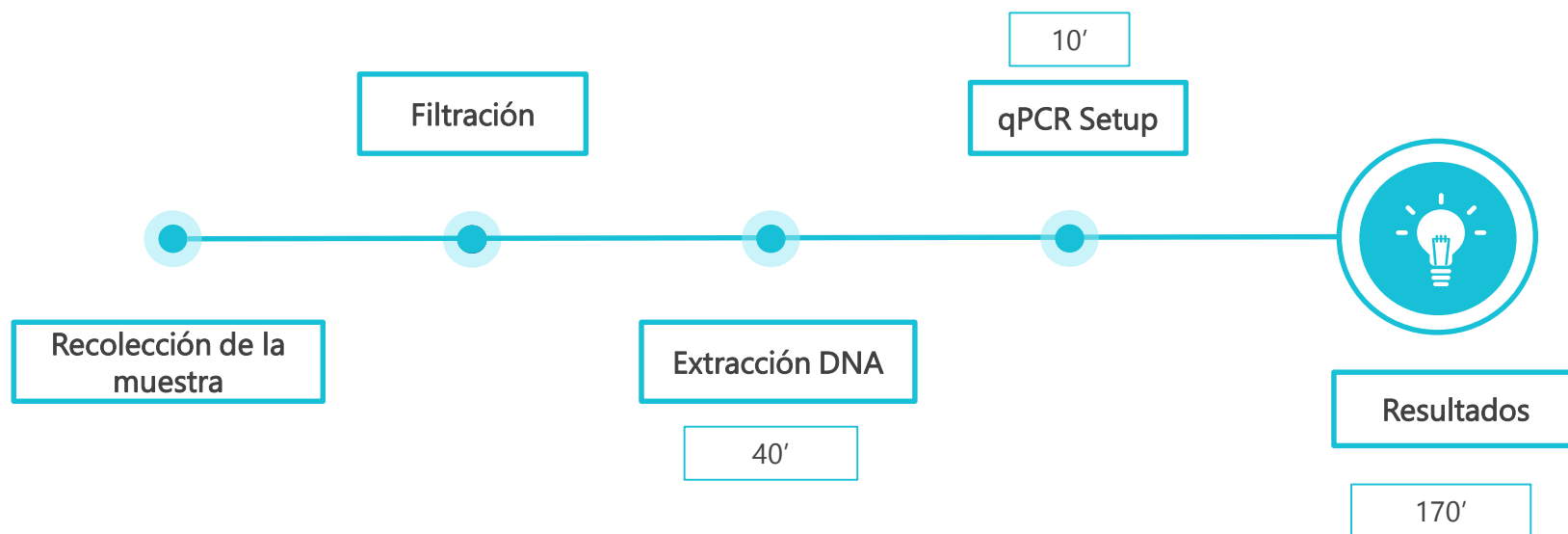
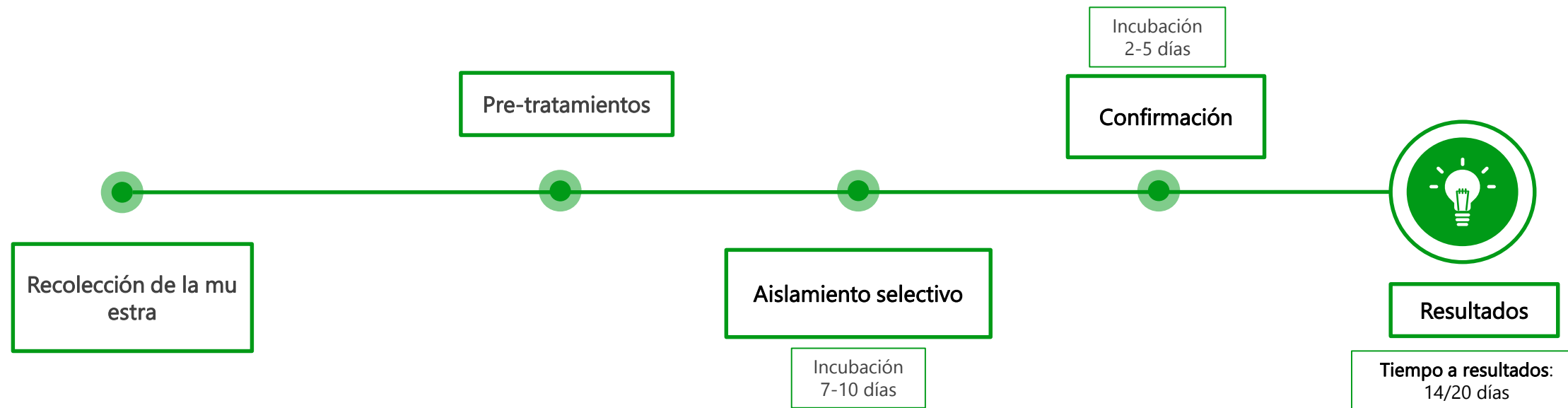
Controles Adicionales

- Para garantizar la idoneidad y la fiabilidad de los resultados:
 - **Control UNG** (Uracil – N – Glicosilasa) para eliminar restos de amplificaciones anteriores
 - **Reactivo D** que evita la amplificación del DNA libre





qPCR – Workflow



Método de referencia

VS
qPCR





BIOTECON Diagnostics



DNA Extraction Kit

- S 400 08 foodproof® StarPrep Two Kit
- A 500 02 Reagent D (for live/dead differentiation)
- A 500 18 Rinse Buffer (for filtered samples)

Legionella Quantification LyoKit

- R 602 45 microproof® Legionella Quantification LyoKit

Storage at 2 °C to 8 °C

96 Reactions with a final volume of 25 µl

Instrument Compatibility

- 5'Nuclease / TaqMan®
cycler, e.g. LightCycler
480, LC 96 AriaMx,
Mx3005P, ABI 7500 Fast,
PikoReal 24, CFX96

Best Specificity

100% Inclusivity

- 43 species/119 strains
successfully tested
- Full inclusivity for
genus *Legionella*

100% Exclusivity

- 42 species tested
 - Microorganisms of the same
environmental habitat
-

Sensitivity

- Limit of Quantification:
10 genomic units
- Limit of Detection:
3 genomic units



04

Legionella spp. en análisis de aguas

PERSPECTIVA GENERAL



Pros

ISO 11731

- Método de **referencia**
- Alta **fiabilidad** de resultados
- Confirmación **obligatoria**
- Protocolo de **rutina** (staff y equipo)

qPCR

- Alta **sensibilidad y especificidad**
- Resultados **rápidos**
- Protocolo **simple**
- “**Viability PCR**”

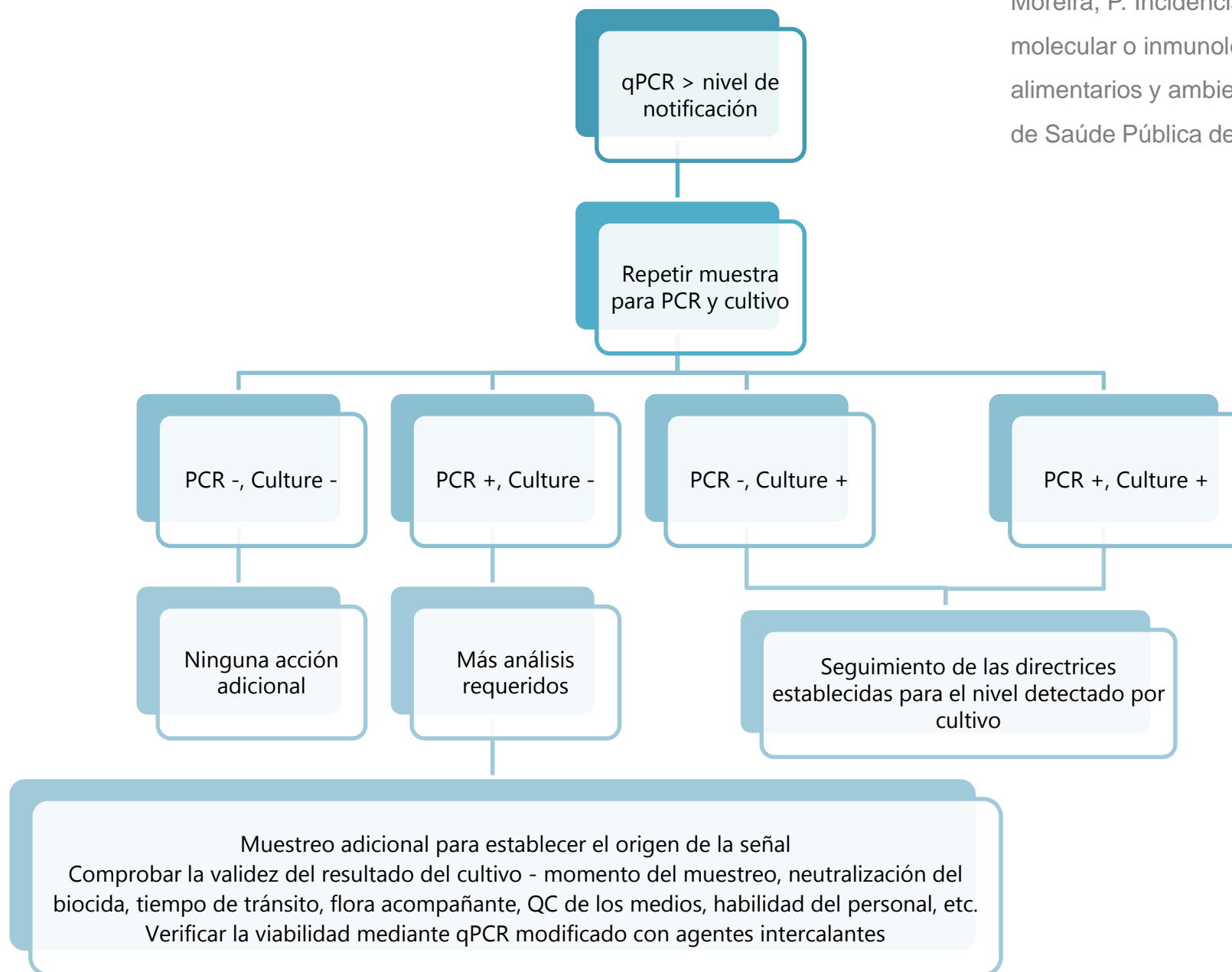
Moreira, P. Incidencia de la implantación del cribado molecular o inmunológico para investigar patógenos alimentarios y ambientales. Casos prácticos. Laboratorio de Saúde Pública de Galicia, Lugo. MRAMA: 2019





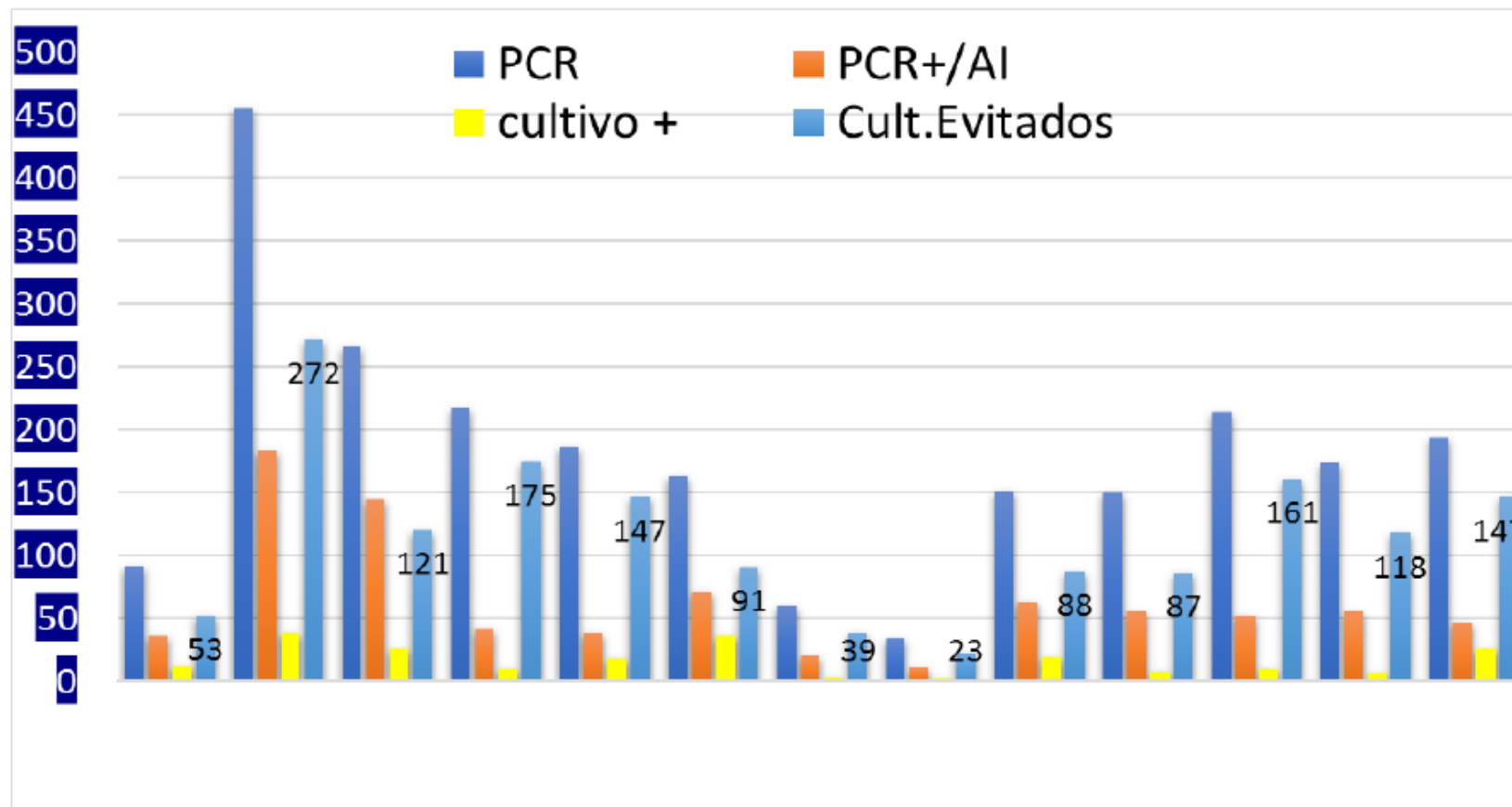
Estrategia combinada – Lo mejor de ambos mundos

Moreira, P. Incidencia de la implantación del cribado molecular o inmunológico para investigar patógenos alimentarios y ambientales. Casos prácticos. Laboratorio de Saúde Pública de Galicia, Lugo. MRAMA: 2019





Estrategia combinada – Resumen de resultados de RT_PCR en el periodo 2008-2018



Moreira, P. Incidencia de la implantación del cribado molecular o inmunológico para investigar patógenos alimentarios y ambientales. Casos prácticos. Laboratorio de Saúde Pública de Galicia, Lugo. MRAMA: 2019

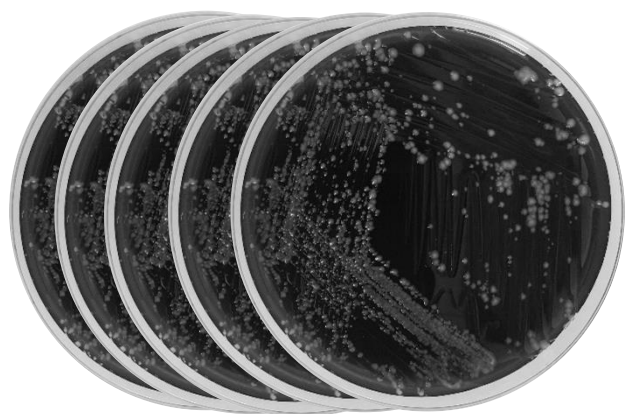


Productos disponibles

Cat. 1311 Base de Agar para Legionella BCYE ISO



Cat. 1557 Base de Agar Legionella + ACES + Alpha Ketoglutarico + Pirofosfato Férrico ISO



Cat. 828 Agar Legionella BCYE + AB ISO

Cat. 944 Agar Legionella CYE ISO

Cat. 978 Agar Legionella CYE sin Cisteína ISO

Cat. 985 Legionella Agar (CYE / GVPC) ISO



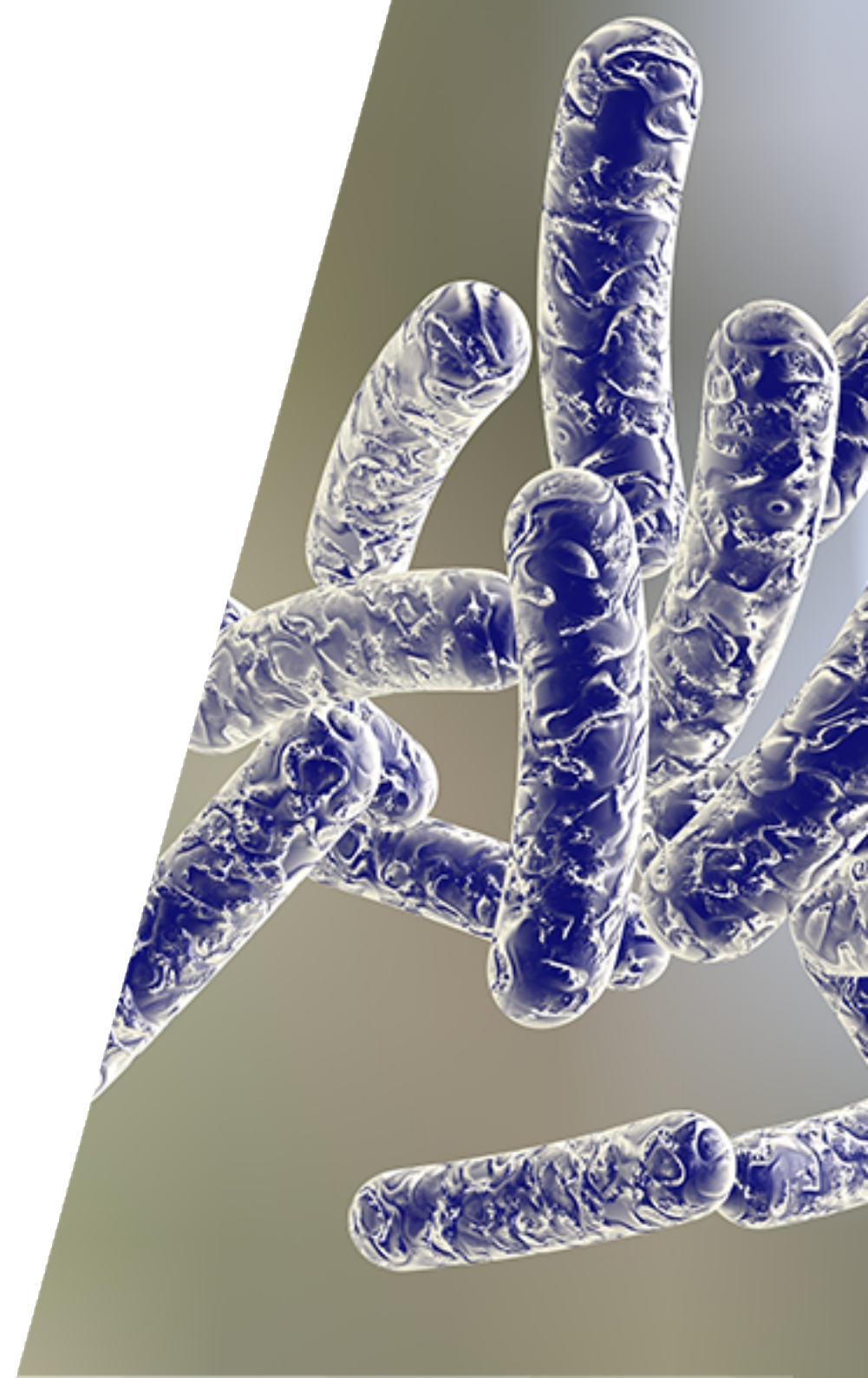
Cat. 6022 Suplemento para Legionella BCYE ISO

Cat. 6025 Suplemento para Legionella GVPC ISO

Cat. 6067 Suplemento Selectivo MWY para Legionella



Legionella spp. en análisis de aguas
Q&A





¡Muchas gracias por su asistencia!

Por favor contáctanos a través de micro@condalab.com

para cualquier duda o cuestión