

## Resumen

Ante un agente biológico que coloniza y prolifera fácilmente en las instalaciones, sin un patrón de uniformidad en su distribución, y con variaciones impredecibles en su concentración, un muestreo y análisis basado en unos pocos puntos y con una frecuencia baja proporciona una información poco relevante sobre el estado de salud de la instalación. Este es el perfil de *Legionella pneumophila*, y en este artículo se presenta un caso real con un enfoque multi-punto basado en un test rápido para, primero, mapear la presencia y nivel del patógeno y, segundo, para ajustar las acciones correctivas en tiempo oportuno.

## Palabras clave:

*Legionella*, autocontrol, test rápido, acciones correctivas.

## Abstract

*Selfcontrolling of a facility by a rapid and cost-effective test to detect Legionella*

With a biological agent which colonizes and proliferates easily facilities without a pattern of uniformity in its distribution, and unpredictable variations in their concentration, sampling and analysis based on a few points and with a low frequency provide little information about the health status of the facility. This is the profile of *Legionella pneumophila*, and this paper presents an actual with a multi-point approaching based on a rapid test, firstly, for mapping the presence and level of the pathogen and, secondly, to timely adjustment of the corrective actions.

## Keywords:

*Legionella*, selfcontrol, fast test, actions

# Autocontrol de una instalación mediante un test rápido y coste-efectivo para la detección de *Legionella*

Por: **Begoña Bedrina Broch**, jefa de Laboratorio<sup>1</sup>; **Guillermo Rodríguez Albalat**, director I+D+i<sup>1</sup>; **Inma Solís Andrés**, responsable del Laboratorio de Microbiología<sup>2</sup>; **Esther Renau Gimeno**, técnica del Departamento de Servicios<sup>3</sup>; **Cristina Ferrer Ferrer**, técnica del Departamento de Servicios<sup>3</sup>

<sup>1</sup> **Biótica, Bioquímica Analítica, S.L.**

Parque Científico Tecnológico y Empresarial de la Universidad Jaime I  
Campus Riu Sec - EspaiTec 2, Planta Baja, Laboratorio 2  
12071 Castellón de la Plana (Castellón)  
Tel.: 964 108 131 – www.biotica.es

<sup>2</sup> **Iproma, S.L.**

Cno. de la Raya, 46 - 12005 Castellón de la Plana (Castellón)  
Tel.: 964 251 272 - Fax: 964 210 476  
www.iproma.com

<sup>3</sup> **Sitra-Prodesa, Tratamiento y Depuración de Agua Industrial**

C/ Coral, s/n - 12530 Burriana (Castellón)  
Tel.: 964 571 855 - Fax: 964 571 856  
www.sitra-prodesa.com

## 1. Introducción

La *Legionella pneumophila* causa una enfermedad infecciosa sistémica llamada legionelosis, que afecta principalmente a los pulmones. Se trata de un tema muy candente en el campo de la salud pública, ya que la tasa de mortalidad promedio es de 12-15% y puede alcanzar fácilmente un 30-50% en pacientes con un sistema inmunológico comprometido o que no reciben antibióticos sin demora (Helbig *et al.*, 1997; Kool *et al.*, 1998; Thacker *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 2002). En el área de la protección de la salud pública, un objetivo clave es reducir las complicaciones, las discapacidades y la mortalidad en los afectados.

En este contexto, tanto el cumplimiento de la legislación, incluyendo los sistemas de gestión, como la investigación sobre posibles fuentes de *Legionella* son preocupa-

ciones importantes para las autoridades públicas, las cuales toman o solicitan muestras para identificar fuentes potenciales de *Legionella*, proporcionan asesoramiento sobre medidas correctivas para su control en los lugares afectados y aplican las sanciones que correspondan.

También es una cuestión crítica impedir que las personas se pongan en el riesgo de una exposición sostenida. Las empresas tienen un requisito legal para controlar los riesgos de *Legionella*. Sin embargo, las posibilidades reales para desarrollar estrategias de prevención eficaces por el propietario de las instalaciones de riesgo están altamente comprometidas. Sin duda, el estilo de vida de esta bacteria parece sugerir la necesidad de mejorar los esquemas de control convencionales, para asegurar que los sistemas de agua no presentan un riesgo para los trabajadores o para el público, y que

se minimiza el potencial de infección. Vigilar antes de la infección (Figura 1).

## 2. Un enfoque mejorado para el control de *Legionella*

### 2.1. Presencia espacio-temporal de *Legionella* en instalaciones de riesgo

Entre otros factores, se pueden apuntar algunos que limitan unas medidas de prevención más robustas. En primer lugar, la distribución de la *Legionella* a lo largo de los circuitos de agua no es uniforme. En segundo lugar, puede ocurrir una fluctuación del nivel de *Legionella* en instalaciones de riesgo colonizadas (Wéry *et al.*, 2008), porque los biofilms microbianos actúan como fuentes impredecibles de bacterias en el flujo del agua. En tercer lugar, las pruebas realizadas con baja frecuencia de muestreo y sobre un número reducido de puntos no serán necesariamente representativas del estado de salud de la instalación. En cuarto lugar, el coste y bajo rendimiento de los test basados en el cultivo en placa para el aislamiento de la bacteria en laboratorio, hace difícil la obtención de un mapa de riesgo de *Legionella* en las instalaciones, que debe estar sometido a actualización porque reflejará una realidad cambiante.

Las habilidades peculiares de *Legionella* para sobrevivir como parásito intracelular de protozoos de vida libre y para asociarse con biopelículas son responsables de la frecuente contaminación de sistemas artificiales de agua, así como de la dificultad para erradicar *Legionella* de sitios contaminados y de la escasa eficacia de biocidas (Cunliffe, 1990; Flannery *et al.*, 2006; Green y Pirrie, 1993; Kool *et al.*, 1999; Kuchta *et al.*, 1983; Muraca *et al.*, 1987). Factores estructurales en los sistemas de agua existentes, tales como la edad del edificio (hoteles, hospitales, industrias) y la centralización de los sistemas de distribución de agua



Figura 1. La prevención actúa sobre el agente causal, complementando la vigilancia epidemiológica que actúa sobre la enfermedad.

(viviendas), han contribuido a explicar la colonización de *Legionella*. En los sistemas nuevos de distribución de agua, las dimensiones, los materiales y las técnicas de construcción pueden tener un papel en la colonización. Debe destacarse que el agua que queda dentro de las instalaciones, desde su prueba hasta la ocupación de instalaciones, puede estar asociada con una contaminación inicial que favorece la colonización posterior.

En definitiva, parece imposible el riesgo cero. La presencia de *Legionella* en un punto de la instalación no puede representar el conjunto de la misma, y sus niveles pueden fluctuar con una frecuencia mayor que la frecuencia actual de muestreo y análisis, con pautas de difícil pronóstico.

### 2.2. Acciones oportunas a coste oportuno

El nivel de *Legionella* en un sistema de agua debe estimarse de forma oportuna, de modo que la acción derivada tenga una probabilidad alta de éxito. Por lo tanto, deben aplicarse medidas de control para prevenir niveles altos y sostenidos de la bacteria, minimizando la probabilidad de transmisión, así como decidir la acción correctiva y evaluar su eficacia.

Un sistema de agua incluye todas las plantas y equipos y componentes asociados con ese sistema, entre ellos todos los asociados con conducciones, bombas, tanques, válvulas, duchas, intercambiadores de calor, tanques de enfriamiento, de alimentación etc. Es importante que el sistema sea considerado como un todo y no, por ejemplo, una torre de enfriamiento solamente. Las zonas muertas y las partes del sistema utilizadas intermitentemente también deben ser incluidas como parte del sistema, ya que pueden crear problemas particulares con el crecimiento microbiano que pasa desapercibido. El muestreo multipunto de *Legionella* mediante una prueba fiable y rápida puede proporcionar una evidencia suficiente e información útil sobre los tipos de sistemas de agua que pueden contaminarse más fácilmente con *Legionella* y, por tanto, ser potencialmente peligrosos. Además, cada sistema de agua puede tener unas características específicas.

De acuerdo con ello, una fase exploratoria inicial más amplia permitiría obtener un mapa de *Legionella* en la instalación sobre el que identificar y considerar aquellos puntos más frecuentemente positivos. El mapa debería ser retroalimentado regularmente, un hecho que será

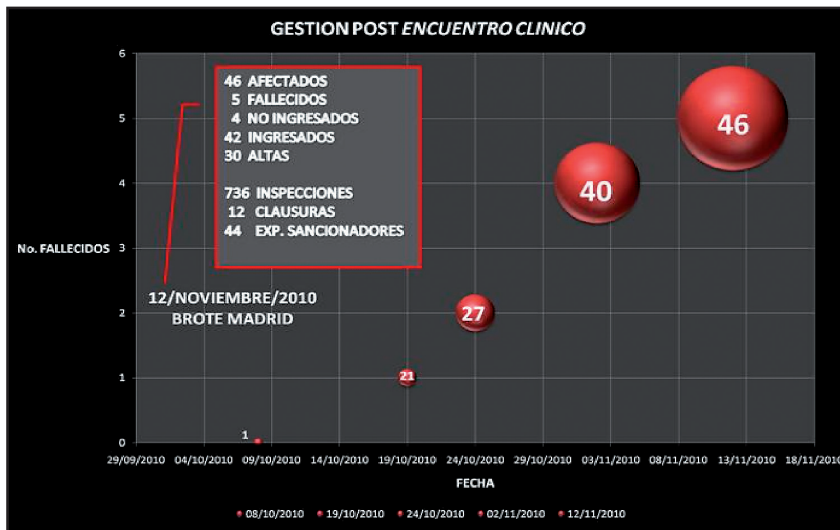


Figura 2. Impacto de un brote en la gestión posterior a la infección.

beneficioso en el ajuste de los planes de autocontrol (intensidad de muestreo, localización de puntos a controlar). Según lo visto, es evidente que prácticamente cualquier fuente de agua puede contaminarse con *Legionella* y, en caso de condiciones favorables para el crecimiento y diseminación, la exposición e infección pueden ocurrir. Así, ese mapa de *Legionella* podría revisarse regularmente por vigilancia y mediante los nuevos resultados de los tests.

El tipo y el volumen de muestreo que se requieren podrían ser dirigidos por la información analítica regularmente disponible desde el principio del plan de autocontrol, si este se revisa con regularidad de forma oportuna. En primer lugar, es esencial dar prioridad a la toma de muestras para vigilar los procesos o los equipos de alto riesgo, seguido por un muestreo de los procesos o equipos con menor riesgo. El número y el enfoque de la toma de muestras debe evaluarse continuamente y redirigirse a medida que se desarrolla el autocontrol, retroalimentándolo con información fresca disponible para localizar los puntos calientes de la instalación y reducir el riesgo de exposición y de infección.

Probablemente, no es un objetivo realista la erradicación de *Legionella*. Es más realista vigilar el nivel del organismo en el agua o el por-

centaje de puntos positivos, considerando la instalación como un todo, para tomar las acciones oportunas.

Hay que señalar que el compromiso de las empresas para desarrollar una prevención oportuna depende fuertemente del coste. La solvencia técnica del test utilizado y seleccionado según el propósito de uso, así como un análisis de costes y beneficios derivados de su impacto en las intervenciones preventivas, son cuestiones importantes y, a menudo, escasamente abordadas. En este contexto, el mapeo de *Legionella* basado en un test rápido con bajo coste por determinación puede ser útil para identificar los puntos preferenciales para el muestreo y ensayo, como base para el desarrollo y aplicación de indicadores del estado de salud de la instalación. Por ejemplo, es conocido el criterio recomendado de una proporción de positivos mayor del 30% o las concentraciones de corte para dirimir el alcance la actuación.

Las medidas adoptadas en el caso de un brote conllevan costes importantes mediante el cierre de instalaciones, sanciones económicas, los costes sanitarios, así como los costes de reputación y baja por enfermedad. Casos de hoteles, hospitales y residencias tienen un impacto mediático alto, que provoca pánico social y lleva a una pérdida de clien-

tes (en parte por algunos participantes activos en las redes sociales desde las que difunden corrientes de opinión negativas), e incluso el cierre de una instalación.

Así, a la vez que el despliegue de un dispositivo epidemiológico conlleva una carga económica importante, en la memoria del sector está el brote de Madrid en 2010, cuyos parámetros se exponen en la Figura 2, promover la cultura de la prevención en origen quiere decir poner a disposición del sector las herramientas necesarias para desarrollar un control eficiente de acuerdo con la realidad económica, operativa y social del problema.

### 2.3. Monitorización de *Legionella* mediante tests no basados en el crecimiento de la bacteria

Las principales técnicas utilizadas en el procesamiento de muestras ambientales son la concentración de la muestra, seguida del cultivo convencional en placas de agar con medios que son selectivos para las distintas especies de *Legionella*. La metodología convencional para la detección de *Legionella pneumophila* se basa en cultivo en medios selectivos (International Organization for Standardization, 1998 y 2004), y son necesarios no menos de 7 a 15 días para la obtención de resultados. Un tiempo muy elevado para abordar la prevención de una realidad cambiante. El cultivo también muestra otras debilidades, como la tasa de crecimiento lento de la bacteria, una baja sensibilidad, la pérdida de viabilidad de las bacterias después de la recolección de muestra, la dificultad para aislar *Legionella* en muestras contaminadas con otros microorganismos, etc. Recientemente, han sido reportados cambios en la detectabilidad del patógeno durante el transporte de la muestra y tiempo de procesado.

El uso previsto del test seleccionado es también una cuestión muy importante, porque todos los méto-

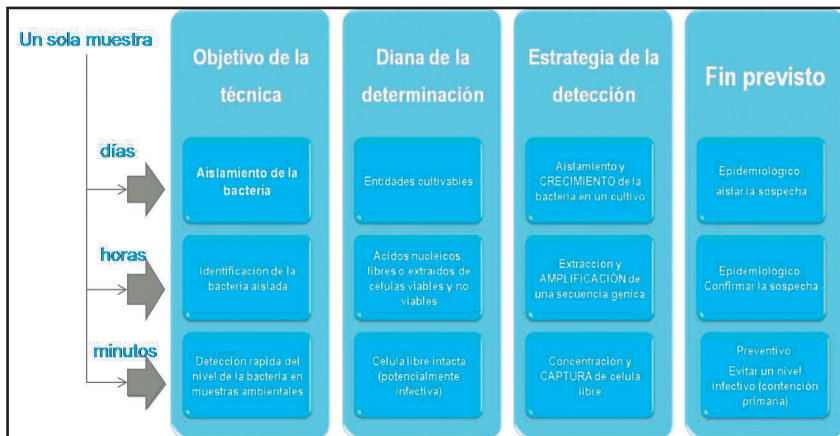


Figura 3. Todos los métodos tienen ventajas e inconvenientes según el fin previsto.

dos tienen ventajas y limitaciones y dependen claramente del objetivo del técnico. Por ejemplo, la secuencia del genoma, útil en epidemiología con fines de identificación, por sí misma no proporciona información sobre el estado metabólico actual de una célula individual. Es decir, fisiología y filogenia no están necesariamente relacionadas.

El laboratorio necesita estrategias coste-efectivas que le permitan explotar toda esta información (Figura 3) disponible en una sola muestra, según las necesidades.

Conocer la aparición frecuente de casos de legionelosis ha motivado a promover la incorporación de técnicas rápidas de detección de *Legionella*, sin ruptura del proceso estándar de

cultivo y con aprovechamiento máximo del concentrado de una única muestra. La idea es dotar al laboratorio de la capacidad y de la posibilidad de disponer de información rápida sin duplicar el coste de muestreo.

Esencialmente, los laboratorios tienen la posibilidad de detectar en 1 hora la bacteria diana mediante su captura con microsferas magnéticas, reservando las bacterias así capturadas (bio-pellet) al final del análisis rápido para otros estudios posteriores (cultivo, DNA, etc.), que no por requerir mayor tiempo son menos importantes, añadiendo ahora el valor de la anticipación para una prevención y actuación rápida sobre instalaciones sospechosas que resulten positivas.

La estrategia, llamada Libox (*Legionella Information Box*) se basa en el uso del único test hoy en el mundo certificado por AOAC para la detección rápida de *Legionella pneumophila*, Legipid, sin instrumentación adicional y acreditable como técnica (algunos laboratorios ya están acreditados) (Figura 4).

Libox tiene una orientación clara al laboratorio que tiene el test Legipid y la posibilidad de implementar con ello una estrategia que explota el máximo de información útil de una sola muestra, liberando información de forma gradual y en tiempo oportuno, para la prevención, control e identificación del problema, sin interrupción del proceso clásico de análisis por cultivo.

Por consiguiente, no requiere duplicar el coste de filtración y toda la información deriva de una sola muestra para favorecer una interpretación integrada de los resultados. Posibilita a los laboratorios ofrecer un servicio rápido y de alto rendimiento a bajo coste, sin menoscabo del análisis de cultivo y añadiendo el valor de una información anticipada (el test rápido) y una información a medio-largo plazo (PCR o incluso cultivo otra vez, sobre el bio-pellet resultante del análisis rápido).

Así, podría hacerse una PCR al final del test Legipid, utilizando su

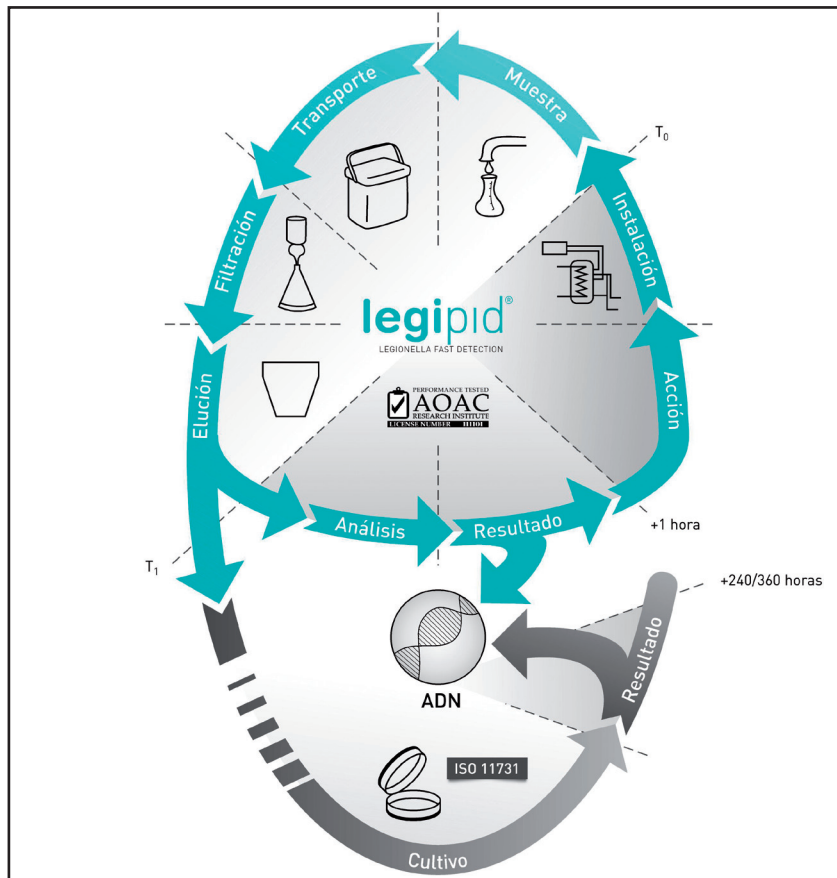
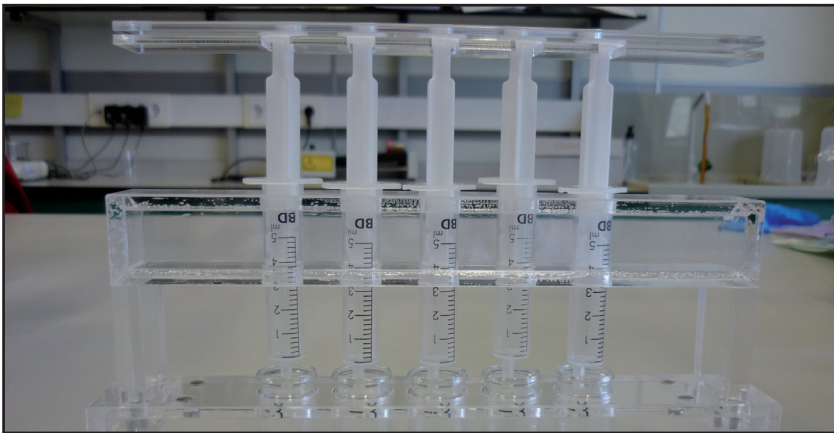


Figura 4. Aprovechamiento máximo de la información de la muestra sin ruptura del flujo convencional del análisis por cultivo.



**Figura 5.** Dispositivo para análisis de muestras por tandas de 5, hasta 50 ensayos.

bio-pellet (partículas magnéticas con las bacterias capturadas), sin necesidad de esperar la colonia aislada por el cultivo tradicional, que no obstante seguiría su curso. El bio-pellet puede ser lavado y guardado hasta el momento de usarlo, y por tanto representaría una muestra en que la presencia de interferentes de PCR podría ser nula o estaría minimizada (Reidt *et al.*, 2011). Por otro lado, sembrar para cultivo el bio-pellet podría asegurarnos un crecimiento libre de microflora interferente, la cual podría producir un resultado negativo en el cultivo convencional (Allegra *et al.*, 2011), o bien por la presencia de células viables no cultivables (VBNC) (Kirschner *et al.*, 2012).

En términos generales, es una estrategia que mejora el alcance y calidad de la información de una muestra. Hay un efecto integrador de las distintas técnicas citadas en la **Figura 3**. El laboratorio ofrece un servicio diferenciado y más completo. Es posible analizar, a la vez, un número de hasta 50 muestras mediante Legipid haciendo uso de un dispositivo sencillo sin conexión eléctrica, que trabaja con módulos de 5 ensayos (**Figura 5**).

### 2.3.1. Utilidad del significado del test

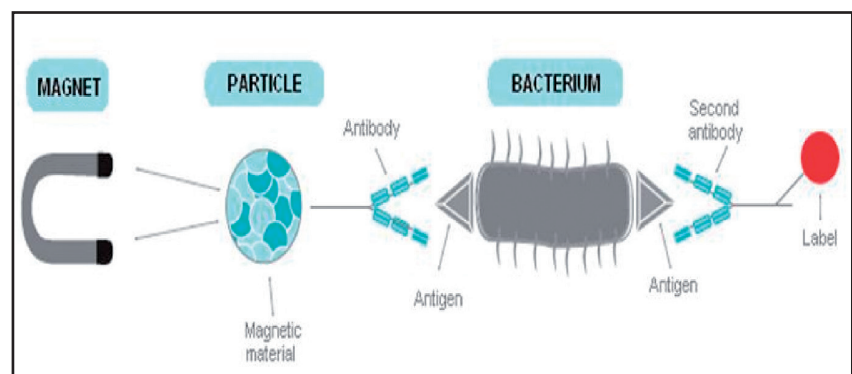
Probablemente, una de las simplificaciones más agresivas y erróneas que puede escuchar un microbiólogo es que se hable de la

envoltura celular como de una capa rígida e inerte que separa el contenido celular del exterior. Nada más lejos de la realidad. La envoltura de la célula bacteriana es la estructura principal a través de la cual *Legionella pneumophila* interactúa con los cambiantes entornos que puede encontrar a lo largo de su ciclo de vida. Las propiedades de virulencia están relacionadas con la plasticidad fenotípica de la envoltura celular bacteriana en *Legionella*. Aunque las propiedades potenciales de la envoltura celular bacteriana en última instancia son determinadas por la información almacenada dentro del genoma, hay una evidencia creciente de que las moléculas de la envoltura, su distribución espacial y las actividades bioquímicas de muchos componentes de la envoltura son altamente dinámicos y varían con las fases de crecimiento de *L. Pneumophila* y con el desarrollo de sus pro-

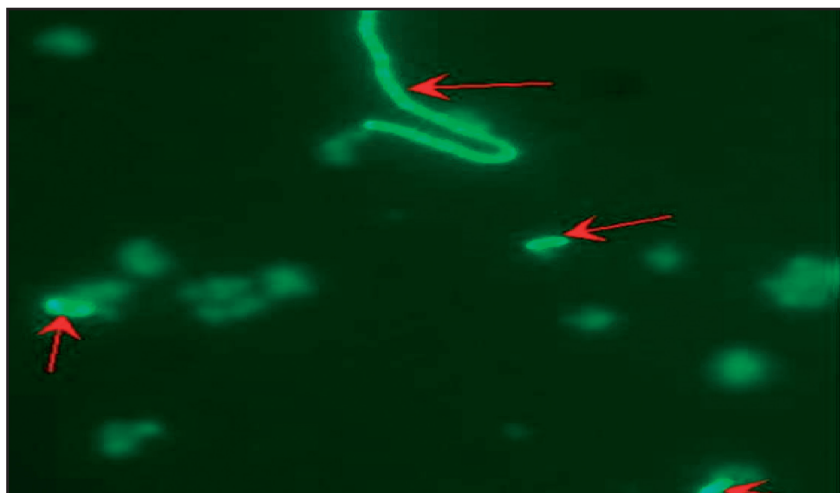
cesos de diferenciación, así como durante la interacción patógeno-huésped. Los avances en ciencias ‘-ómicas’, como la lipidómica y glicómica, han hecho tomar una conciencia profunda sobre que las moléculas de la envoltura sustentan la infectividad y estabilidad del patógeno. Esto hace de la envoltura celular un elemento de sensado interesante (Shevchuck *et al.* 2011; Zengler, 2009).

Así, un test basado en una interacción a nivel de la envoltura celular bacteriana podría considerarse una buena aproximación para un uso previsto en la prevención sobre la base de análisis rápidos de muestras ambientales. De esta manera, el hecho de la detección está centrado en la célula de *Legionella* como una entidad definida que interactúa con el medio ambiente. Puede pensarse que el aislamiento del microorganismo por cultivo podría perturbar estas interacciones porque se le hace crecer en condiciones artificiales, lo que significa que este tipo de información puede ser omitida durante el cultivo en el laboratorio.

En este trabajo, el cliente ha solicitado el uso de un test basado en la captura inmunomagnética de la bacteria (**Figura 6**) para efectuar un *screening* de la instalación e identificar positivos en su instalación. Se tomaron fotografías de las muestras en que se aprecia con claridad la formación de complejos entre las bacterias de *Legionella* y microesferas inmunomagnéticas, que luego



**Figura 6.** Principio de funcionamiento del test seleccionado: captura específica del patógeno, marcaje y revelado por lectura colorimétrica.



**Figura 7.** Complejos formados por partículas inmunoactivadas y bacterias de *Legionella* (puntos brillantes), de acuerdo con el esquema de captura inmunomagnética, y fotografiados al microscopio.

son revelados mediante una sencilla reacción colorimétrica (**Figura 7**). La señal es proporcional a la cantidad de bacteria capturada.

Es interesante destacar que la bacteria puede encontrarse en diferentes estados de agregación, observándose desde células sueltas hasta cadenas de algunas decenas o centenas. Y lo es porque cada una de estas estructuras, con independencia del número de células que contengan, podrían ser contadas como una única unidad formadora de colonia (UFC) en un test basado en el cultivo, subestimando así el nivel de la bacteria en la muestra.

### 2.3.2 Reconocimientos del test: validación contra el método de referencia ISO y certificación

Los métodos utilizados en los laboratorios se basan en la norma internacional de métodos para la detección de bacterias de *Legionella* (ISO, 1998). El cumplimiento de la norma ISO/IEC 17025 proporciona una base internacionalmente aceptada para la acreditación de laboratorios. El estándar especifica los requisitos técnicos y de gestión que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración, en su organización y su gestión de calidad.

En relación con el uso de otros métodos para la detección de *Legio-*

*nella*, la ISO/IEC 17025 describe la importancia de la validación del método y su aplicación en el laboratorio analítico. Este aspecto, el Documento EA-4/10 G: 2002, Accreditation for Microbiological Laboratories by European Co-operation for Accreditation, da orientaciones detalladas sobre la interpretación de la norma ISO 17025. Esta guía puede descargarse gratuitamente desde el sitio web de Eurachem.

Con respecto a la validación de métodos, este documento especifica que “los laboratorios conservarán los datos de validación de sistemas de ensayo comerciales (kits) utilizados en el laboratorio. Estos datos de validación pueden obtenerse a través de ensayos colaborativos y de datos de validación presentados por los fabricantes y sometido a evaluación de terceros (por ejemplo, AOAC)”.

Entonces, el uso de un método puede ser aceptable cuando el método ha sido: validado contra el método de referencia ISO/CEN que corresponda, según la norma ISO 16140, o cualquier otro protocolo similar internacional; certificado por un tercero (por ejemplo, AOAC, AFNOR, MicroVal, NordVal, etc.).

En este sentido, de acuerdo con la nota técnica 32 de ENAC, un laboratorio puede utilizar el test si ha demostrado su capacidad para obtener resultados fiables y reproducibles

en sus muestras. El test seleccionado en el caso que se presenta reporta tanto un resultado cualitativo, presencia/ausencia, como una estimación del orden de magnitud del nivel de la bacteria, dato que puede ser reportado en el apartado de observaciones en el boletín de análisis.

## 3. Valoración del riesgo de *Legionella* en una instalación basada en test rápido

### 3.1. Selección del test

El cliente seleccionó un test que puede ser aplicado *in situ* o en laboratorio, con un límite práctico de detección de 93 UFC/volumen examinado y que también permite una estimación cuantitativa del nivel de *Legionella pneumophila* en la muestra. Como la prueba puede aplicarse *in situ* o en laboratorio, dando el resultado en apenas 1 hora, se pueden tomar medidas correctivas evitando períodos sostenidos de niveles peligrosos en las instalaciones de riesgo. Esta prueba puede satisfacer los límites establecidos para tomar acciones correctivas, tanto si se basan en valores numéricos (por ejemplo 100, 1.000 o 10.000 UFC/l) como en porcentajes de resultados binarios (presencia/ausencia, detectado o no detectado, +/-). El test no requiere instrumentación específica y está diseñado para permitir un bajo coste promedio por análisis.

Como se ha dicho, la prueba se basa en la captura de la bacteria por una interacción que depende de la integridad de la envoltura celular, como reconocido elemento sensor que regula la infectividad de esta bacteria. La prueba o test ha sido validada contra la ISO 11731 y certificada por AOAC, un organismo de validación internacionalmente reconocido.

### 3.2. Mapeo de puntos críticos en instalaciones de riesgo

El motivo del muestreo fue un positivo por cultivo, y el cliente qui-

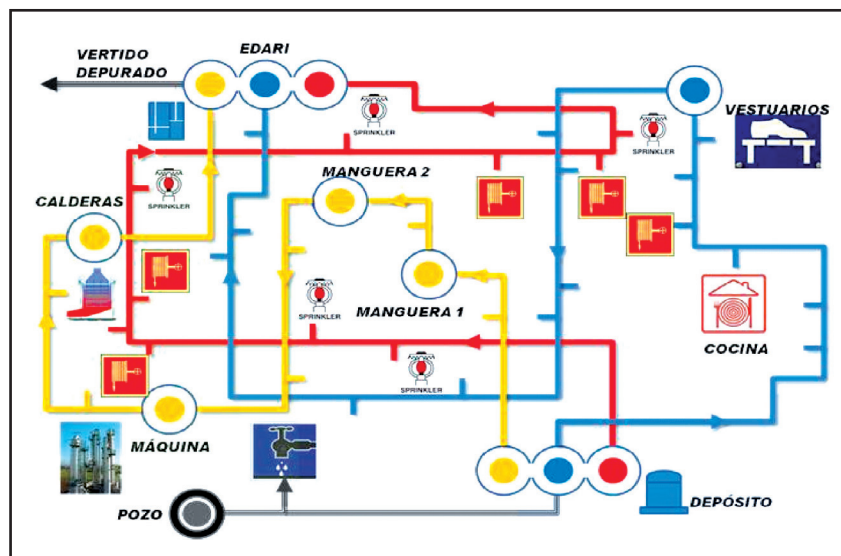


Figura 8. Esquema simplificado de los circuitos testados.

so evaluar el nivel de afección en la red. El cliente toma para su instalación agua de un pozo, que va a un depósito o tanque de almacenamiento, del que deriva el agua en tres usos: sanitario, contra incendios e industrial. Tras una primera exploración de los circuitos, nueve puntos fueron rápidamente analizados por el test, y de ellos se detectaron 5 positivos y 4 negativos. Las muestras positivas se encontraron en una manguera de la estación depuradora de aguas residuales industriales (EDARI), un *sprinkler*, un punto terminal en una sala de calderas (un grifo), un grifo en un punto de toma a la salida de un pozo, y una manguera (manguera 1). Las muestras negativas se encontraron en el depósito o tanque de almacenamiento de agua procedente de un pozo, una manguera (manguera 2), la zona de máquinas destiladoras y los vestuarios.

El punto de toma de agua del pozo (un grifo) dio positivo (1.100 UFC/L) en principio, pero se identificó un defecto estructural en el circuito, y es que el agua residente en la parte no enterrada de la toma se exponía a temperaturas altas, favoreciendo la proliferación de biofilms en ese tramo. Al corregir este defecto, eliminando el tramo e instalando una válvula, y retestar el

punto de toma, no se detectó la bacteria.

Para una mejor comprensión del caso se ha elaborado un esquema similar a un plano de metro, con los circuitos testados (Figura 8).

Generalmente se acepta que *Legionella* no puede erradicarse totalmente de sistemas de agua. Las normas vigentes promueven mantener un nivel <1.000 UFC/l en todo momento y apuntan a un umbral de control estable de < 100 UFC/l.

El test rápido permitió determinar que el nivel era  $\geq 1.000$  UFC/L en tres puntos encontrados positivos: un *sprinkler*, la manguera 1 y en una manguera ubicada en la EDARI. De acuerdo con el test positivo, en la

zona de calderas el nivel era <1.000 UFC/l, pero > 100 UFC/l.

Con estos resultados se tomaron las acciones correspondientes en un tiempo oportuno. Además se tomaron muestras para su análisis en paralelo por el método de cultivo, cuyos resultados estuvieron disponibles varios días después de haber tomado las acciones correctivas. Los resultados fueron coherentes con los resultados del test rápido (Tabla 1).

### 3.3. Acciones correctivas

Las acciones correctivas pudieron ejecutarse oportunamente sin esperar los resultados de cultivo, obtenidos varios días después de la toma de muestras. Entre ellas, se procedió a la instalación de un sistema de cloración para asegurar niveles cercanos a 1 ppm de cloro libre, se anuló un tramo de manguera en el punto detectado positivo y se estableció una purga semanal de la manguera de la EDARI.

### 4. Conclusiones

*Legionella pneumophila* es una bacteria que está regularmente presente en el agua, y puede alcanzar niveles infecciosos en 2-3 días. El test rápido utilizado permite al usuario obtener un resultado en apenas una hora, en lugar de 7-15 días, que es la duración del método tradicional (cultivo), permitiendo adoptar medidas correctivas en consonancia con el riesgo real que se presente, gracias

Muestra	Punto	Resultado por ISO 11731 (UFC/l)	Resultado por test rápido	
			Positivo/Negativo	Orden estimado (UFC/l)
1	Depósito	n.d.	Negativo	-
2	Calderas	500	Positivo	10 <sup>2</sup>
3	Sprinkler	1.000	Positivo	10 <sup>3</sup>
4	Grifo	n.d.	Negativo	-
5	Manguera 1	6.300	Positivo	10 <sup>4</sup>
6	Manguera 2	n.d.	Negativo	-
7	Destilador	n.d.	Negativo	-
8	EDARI	3.000	Positivo	10 <sup>3</sup>

Tabla 1. Comparación entre los resultados del test rápido y los obtenidos con el método de cultivo. Nota: n.d. = no disponible.

a la velocidad con la que se obtiene un resultado. Aquí está reportado el uso de un test rápido para *Legionella* para la identificación rápida de los puntos de riesgo. Además, las muestras de agua fueron procesadas al mismo tiempo, trabajar con lotes de hasta 15 pruebas en una hora.

*Legionella* no se distribuye uniformemente a través del circuito de agua y puede encontrarse en concentraciones muy diferentes dependiendo del punto muestreado. Con el test rápido, se aplicó un muestreo más representativo de toda la instalación, testando a la vez diferentes puntos e identificando los puntos críticos de control para ayudar a un mantenimiento preventivo eficaz.

El test tuvo bajos requerimientos en cuanto a equipamiento y capacitación del personal. Su precio competitivo y su certificación fueron elementos decisivos para su aplicación en la prevención en las instalaciones.

Basada en el test, la estrategia Libox supone una manera de obtener el máximo rendimiento de información de la muestra sin interrupción del proceso convencional de análisis por cultivo. Capacita al laboratorio para ofrecer un servicio muy completo a sus clientes, orientado a la prevención sin duplicar costes de muestreo ni filtración.

## 5. Bibliografía

- [1] Allegra, S.; Girardot, F.; Grattard, F.; Berthelot, P.; Helbig, J.H.; Pozzetto, B.; Riffard, S. (2011). 'Evaluation of an immunomagnetic separation assay in combination with cultivation to improve *Legionella pneumophila* serogroup 1 recovery from environmental samples'. *J. Appl. Microbiol.*, núm. 110, págs. 952-961.
- [2] Cunliffe, D.A. (1990). 'Inactivation of *Legionella pneumophila* by monochloramine'. *J. Appl. Bacteriol.*, núm. 68, págs. 453-459.
- [3] Flannery, B.; Gelling, L.B.; Vugia D.J.; Weintraub, J.M.; Salerno, J.J.; Conroy, M.J.; *et al.* (2006). 'Reducing *Legionella* colonization in water systems with monochloramine'. *Emerg. Infect. Dis.*, núm. 12, págs. 588-596.
- [4] Green, P.N.; Pirrie, R.S. (1993). 'A laboratory apparatus for the generation and biocide efficacy testing of *Legionella* biofilms'. *J. Appl. Bacteriol.*, núm. 74, págs. 388-393.
- [5] Helbig, J.H.; Kurtz, J.B.; Pastoris, M.C.; Pelaz, C.; Luck, P.C. (1997). 'Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups'. *J. Clin. Microbiol.*, núm. 35, págs. 2.841-2.845.
- [6] International Organization for Standardization (1998). 'ISO 11731:1998. Water quality detection and enumeration of *Legionella*'. International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- [7] International Organization for Standardization (2004). 'ISO 11731-2:2004. Water quality - Detection and enumeration of *Legionella* - Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts'. International Organization for Standardization, Ginebra, Suiza.
- [8] Kirschner, A.K.T.; Rameder, A.; Schramel, B.; Indra, A.; Farnleitner, A.H.; Sommer, R. (2012). 'Development of a new CARD-FISH protocol for quantification of *Legionella pneumophila* and its application in two hospital cooling towers'. *J. Appl. Microbiol.*, núm. 112, págs. 1.244-1.256.
- [9] Kool, J.L.; Carpenter, J.C.; Fields, B.S. (1999). 'Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease'. *Lancet*, núm. 353, págs. 272-277.
- [10] Kuchta, J.M.; States, S.J.; McNamara, A.M.; Wadowsky, R.M.; Yee, R.B. (1983). 'Susceptibility of *Legionella pneumophila* to chlorine in tap water'. *Appl. Environ. Microbiol.*, núm. 46, págs. 1.134-1.139.
- [11] Muraca, P.; Stout, J.É.; Yu, V.L. (1987). 'Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing *Legionella pneumophila* within a model plumbing system'. *Appl. Environ. Microbiol.*, núm. 53, págs. 447-453.
- [12] Reidt, U.; Geisberger, B.; Heller, C.; Friedberger, A. (2011). 'Automated immunomagnetic processing and separation of *Legionella pneumophila* with manual detection by sandwich ELISA and PCR amplification of the ompS Gene'. *J. Lab. Aut.*, núm. 16, págs. 157-164.
- [13] Shevchuk, O.; Jäger, J.; Steinert, M. (2011). 'Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope'. *Frontiers in Microbiology*, núm. 2, art. 74, págs. 1-12.
- [14] Wéry, N.; Bru-Adan, V.; Minervini, C.; Delgènes, J.P.; Garrelly, L.; Godon, J.J. (2008). 'Dynamics of *Legionella spp.* and bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in a cooling tower facility'. *Appl. Environ. Microbiol.*, núm. 74, págs. 3.030-3.037.
- [15] Yu, V.L.; Plouffe, J.F.; Pastoris, M.C.; Stout, J.E.; Schousboe, M.; Widmer, A.; *et al.* (2002). 'Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired pneumonia: an international collaborative survey'. *J. Infect. Dis.*, núm. 186, págs. 127-128.
- [16] Zengler, K. (2009). 'Central role of the cell in microbial ecology'. *Microbiol. and Mol. Biol. Reviews.*, núm. 73, págs. 712-729.