

CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS Y DE MUESTREO ESTABLECIDOS EN LA LEGISLACIÓN VIGENTE PARA EL CONTROL DE *LEGIONELLA*

MICROBIOLOGICAL AND SAMPLING CRITERIA ESTABLISHED IN THE PRESENT SPANISH LEGISLATION FOR THE CONTROL OF LEGIONELLA

Isabel Inza Rojas, M^a José Figueras Salvat

Unidad de Microbiología, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad Rovira i Virgili.

Se ha investigado retrospectivamente la relación existente entre las bacterias aerobias totales (BAT) y la presencia de *Legionella* en un total de 576 muestras de agua procedentes de torres de refrigeración industriales. Los resultados revelan un menor porcentaje de muestras positivas para *Legionella* (19,8%) por encima del nivel de 10⁴ UFC/ml BAT establecido como límite de acción, que por debajo de este (80,2%), lo que indica que este límite no cumple su función en las instalaciones investigadas. Niveles de BAT superiores 100 y 1000 UFC/ml parecen ser más útiles para predecir la presencia de *Legionella*. Hemos observado una concentración de BAT significativamente más elevada en las muestras positivas para *Legionella* que en las negativas. Esto indica que las BAT son una buena herramienta para la validación de la eficacia del Plan de Autocontrol (PA) establecido en estas instalaciones. Estos resultados apoyan la importancia de seguir manteniendo el control de las BAT (a 36 ± 1 °C) como un indicador de riesgo de presencia de *Legionella* y evidencian la necesidad de introducir un límite de acción más bajo para las BAT. Por otra parte se discuten algunos aspectos vinculados a la toma de muestras y a su transporte, y algunos tópicos vinculados al periodo de incubación de la enfermedad y a los métodos de tipado epidemiológico.

PALABRAS CLAVE: bacterias aerobias totales, *Legionella*, APPCC, AFLP, PFGE, MLST

INTRODUCCIÓN

Desde la descripción del primer brote de neumonía por *Legionella* ocurrido en Filadelfia en 1976, este microorganismo ha seguido produciendo numerosos brotes en todo el mundo. Entre 1999 y 2004 se produjeron 4 brotes importantes (Holanda, España, Reino Unido y Australia), con un montante global de unos 1000 casos de Legionelosis, 40 de los cuales fueron fatales¹.

La Legionelosis es considerada en nuestro país un problema prioritario de salud pública especialmente después de que el mayor brote mundial de esta enfermedad se produjera en la ciudad de Murcia² en julio del año 2001. La legis-

We have retrospectively investigated the relationship between the presence of total aerobic bacteria (TAB) and the presence of *Legionella* sp. in 576 water samples from industrial cooling towers. A lower percentage of positive samples for *Legionella* sp. (19.8%) was encountered when the concentration of TAB was above 10⁴ CFU/ml than below this concentration (80.2%). The concentration of 10⁴ CFU/ml TAB is established in Spanish legislation as the action limit, above which a higher risk of *Legionella* positive samples is expected. Despite that, our results indicate that levels of TAB above 100 or 1000 CFU/ml seem more useful for predicting the presence of *Legionella* in the cooling towers investigated. We observed that the concentration of TAB was significantly higher in the positive samples for *Legionella* than in the negative ones, which seems to indicate that TAB is a good tool for evaluating the effectiveness of the Autocontrol Safety Measures of those cooling towers. Our results reinforce the need for controlling the levels of TAB (at 36 ± 1 °C) because it is a good indicator of the presence of *Legionella* spp. despite the fact that the standard established as the action limit should be lowered. Within the study we also reviewed the sampling procedures and provide new data on the incubation period of the disease and on the genotyping methods classically employed in epidemiological investigation.

KEY WORDS: total aerobic bacteria, *Legionella*, HACCP, AFLP, PFGE, MLST

lación actual española se rige por el Real Decreto 865/2003 que establece los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la Legionelosis y los controles microbiológicos que deben realizarse en torres de refrigeración y condensadores evaporativos para la validación de la eficacia de su Plan de Autocontrol (PA). Estos incluyen un control trimestral de *Legionella* sp., y uno mensual de bacterias aerobias totales (BAT). Cuando los niveles de este último parámetro sean superiores a 10⁴ UFC/ml, será necesario comprobar la eficacia de la dosis y el tipo de biocida utilizado y realizar un muestreo adicional de *Legionella*. Los pocos estudios que investigan la relación existente entre las BAT y la presencia de *Legionella* indican que no existe una correlación entre la concentración de ambos microorganismos³. Sin

Correspondencia: M^a José Figueras, Unitat de Biologia i Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 46201 Reus.

embargo, la Organización Mundial de la Salud⁴ considera que una concentración elevada de BAT en el agua revela la existencia de condiciones favorables para el crecimiento de *Legionella* y, por tanto, indica la necesidad de realizar las correcciones oportunas para minimizar el riesgo para la salud.

El objetivo principal de este estudio es establecer si los criterios microbiológicos requeridos por la legislación son suficientes para la prevención. Para ello se evaluará la validez o no del nivel de 10.000 ufc/ml BAT para predecir el riesgo de presencia de *Legionella*, a través del análisis retrospectivo de los resultados obtenidos en 576 muestras de agua procedentes de torres de refrigeración de instalaciones industriales. Dado que el estudio se ha realizado a lo largo de los últimos cuatro años, 2002-2005, y que en este periodo la nueva legislación entró en vigor, se investigará si la puesta en práctica de la misma ha significado una mejora en el control de *Legionella* en las torres de refrigeración estudiadas. Por otra parte se hará énfasis en algunos aspectos vinculados a la toma de muestras y a su transporte. Se discutirán algunos tópicos vinculados al periodo de incubación de la enfermedad y a los métodos de tipado epidemiológico.

Materiales y Métodos

Se han analizado las bacterias aerobias totales (BAT) a 36 ± 1 °C y *Legionella* en paralelo en un total de 576 muestras de agua procedentes de torres de refrigeración de instalaciones industriales. Los análisis se realizaron mensualmente a lo largo de 5 años (2002 a 2005) utilizando las metodologías (ISO 11731 y 6222) indicadas en el RD 865/2003, con la salvedad que para las BAT se utilizó la técnica de filtración de membrana. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v. 11.5. Se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney para el estudio comparativo de la significación de las diferencias entre las concentraciones de bacterias aerobias o *Legionella* y el test de Chi-cuadrado se utilizó para comparar los porcentajes de muestras positivas o negativas para la presencia de *Legionella*.

Resultados y Discusión

Nuestros resultados revelan que sólo en un 17,5% de las muestras estudiadas se detectó la presencia de *Legionella* spp. (Tabla 1). Éste porcentaje, al igual que las concentraciones de este último microorganismo y de BAT, han ido disminuyendo progresivamente a lo largo de los cinco años estudiados (Tablas 1-3). Estos resultados evidencian una mejora progresiva en el control de las instalaciones estudiadas y el impacto de la aplicación del RD (Tabla 3). Probablemente nuestros resultados pueden ser un ejemplo de lo ocurrido en otras instalaciones de este tipo, a escala nacional, y vincularse también a la progresiva disminución de los casos de Legionelosis notificados a lo largo de los años 2003 y 2004. Nos queda la duda de si la mejora observada en las instalaciones industriales se corresponde con una mejora comparable en los centros sanitarios de nuestro país, si se tiene en cuenta que los brotes recientes más importantes se han producido por torres de refrigeración de centros Sanitarios (Barcelona, 2004; Zaragoza, 2004).

También hemos observado una concentración de BAT significativamente más elevada en las muestras positivas para *Legionella* que en las negativas (Tabla 1), lo que indica

que las BAT son una buena herramienta para la validación de la eficacia del Plan de Autocontrol (PA) establecido en estas instalaciones. Sin embargo, el nivel establecido en el RD de BAT $>10^4$ UFC/ml como límite de acción, parecería no ser adecuado ya que el porcentaje de muestras positivas para *Legionella* por encima de esta concentración de BAT fue inferior (19,8%) al obtenido (80,2%) para niveles de BAT $<10^4$ UFC/ml (Tabla 2). Niveles de BAT superiores a 100 y 1000 UFC/ml parecen ser más útiles, tal y como se muestra en la Tabla 2, para predecir la presencia de *Legionella*. Estos resultados apoyan la importancia de seguir manteniendo el control de las BAT (a 36 ± 1 °C) como un indicador de riesgo de presencia de *Legionella* y evidencian la necesidad de introducir un límite de acción más bajo para las BAT. No obstante, sería importante corroborar nuestros resultados a escala más amplia en otras regiones geográficas de nuestro país. En aquellas instalaciones en las que mensualmente se están analizando simultáneamente ambos parámetros (BAT y *Legionella*), parece adecuado no obviar el análisis de BAT, ya que sus resultados aportan información complementaria sobre las deficiencias del tratamiento de desinfección y exceso de materia orgánica en el sistema. Todo esto indicaría la necesidad de realizar las correcciones oportunas, independientemente de que se aislara o no *Legionella*. Por otra parte podría considerarse que el análisis de *Legionella* realizado en paralelo ya sería el requerido por la norma en caso de superación de los límites de BAT de 10^4 UFC/ml.

Las mejoras observadas también indican que un seguimiento en continuo de validación del PA (mensual o trimestral) a través de los análisis microbiológicos conduce a una mejoría importante en las instalaciones. Sobre la base de este hecho y considerando que en microbiología unos análisis puntuales debe tomarse como resultados solo representativos de aquel momento concreto; pudiendo no ser representativos ni de la calidad global, ni del riesgo asociado a una instalación; debería reconsiderarse si tiene algún sentido realizar únicamente análisis anuales de *Legionella* en las instalaciones interiores de agua caliente sanitaria y agua fría de consumo humano tal y como exige la legislación vigente. A nuestro entender deberían establecerse la obligatoriedad de analizar los mismos parámetros microbiológicos (BAT y *Legionella*) y con la misma frecuencia que en las torres de refrigeración por lo menos en instalaciones de alto riesgo como es el caso de los centros sanitarios. Así mismo deberían establecerse al igual que en las torres de refrigeración las concentraciones en las deberían realizarse acciones correctivas.

Otro aspecto importante durante el muestreo es el referente a la recogida de materiales sedimentados, restos de suciedad e incrustaciones, tal y como establece el anexo 6 del RD. Cabe recordar que los análisis microbiológicos forman parte de la validación del PA de las instalaciones basado en el APPCC y que, por tanto, tienen que intentar reflejar la situación más desfavorable. En estas circunstancias, un resultado con concentraciones por encima de las establecidas en el RD para *Legionella* (>100 UFC/l) puede indicar un fallo en el programa de limpieza y desinfección vinculado al PA y, por tanto, permite corregirlo a tiempo antes de que el problema sea más grave.

Otro aspecto es el relacionado con la adición de neutralizante a los envases de recogida de muestras. La norma ISO 11731 para *Legionella* establece que cuando el biocida sea el cloro u otro producto oxidante deberá adicionarse tiosul-

fato sódico o potásico e indica que no existen datos sobre neutralizantes para otros biocidas. En la practica, muchas veces se están utilizando envases tratados con tiosulfato independientemente de que el biocida utilizado en la instalación sea de naturaleza no oxidante. Debería investigarse si esto tiene algún efecto sobre los resultados microbiológicos obtenidos.

La temperatura y tiempo transcurrido durante el transporte de las muestras y su análisis están también especificados en la norma ISO mencionada. Se indica una temperatura de transporte entre 18 °C y 6 °C y que el análisis deberá iniciarse a los 2 días, indicándose que nunca deberán excederse los 5 días. Esta claro que estas temperaturas no se ajustan a la realidad de muchas muestras que tienen temperaturas elevadas y que probablemente se irán enfriando en los contenedores isotérmicos de transporte. Tanto las condiciones del transporte como el tiempo transcurrido antes del análisis pueden a nuestro entender influir en la concentración final obtenida, lo cual requiere una investigación exhaustiva. Lo más conveniente, tal y como también recomienda la norma ISO, es que los tiempos se reduzcan al mínimo posible.

En el ámbito de los resultados microbiológicos, otro aspecto que probablemente requiere una revisión es el tiempo establecido (15 días) para evaluar la eficacia de los tratamientos de choque, ya que en muchos casos se obtienen muestras positivas con concentraciones elevadas de *Legionella*. Estas concentraciones no tienen porque estar siempre motivadas por un fallo en el tratamiento de choque, sino más bien ser una consecuencia de la liberación de incrustaciones y biopelículas. Si el objetivo es evaluar la eficacia del tratamiento debería esperarse más tiempo y establecer, sobre la base de la experiencia existente, el tiempo más adecuado para realizar esta validación. Probablemente las BAT podrían ser una herramienta útil de seguimiento post-tratamiento, especialmente si se tiene en cuenta la rapidez con la que se obtienen los resultados (48h) y su bajo coste, y su utilización podría permitir hacer un seguimiento de este fenómeno.

Por último, y a pesar de que no guardan una relación directa con este trabajo, comentaremos otros aspectos poco conocidos (sobre el periodo de incubación de la Legionelosis, las limitaciones de los métodos moleculares de tipado epidemiológico y el seguimiento de un brote) que consideramos que es muy importante que se tengan en cuenta.

Merece una mención especial el tiempo de incubación de la Legionelosis, ya que sobre él mismo se ha dogmatizado en exceso. Clásicamente se ha considerado que el periodo de incubación de la infección es de 2 a 10 días, y este límite es el considerado en la mayoría de brotes. No obstante existen datos que avalan periodos de incubación mucho más largos. La revisión de la publicación del primer brote ocurrido en Filadelfia en 1976 indica que 2 casos presentaron periodos de incubación de 16 y 26 días, mientras que en el brote ocurrido en una exhibición floral en Ámsterdam, en 1999, debido a un baño de burbujas en exhibición, el periodo osciló de 2 a 19 días, y en un 16% de los casos el periodo fue superior a 10 días⁵. Otro ejemplo corresponde al brote producido en Fredrikstad (Noruega), en 2005, debido a un equipo totalmente nuevo, un sistema no de refrigeración tipo torre o condensador evaporativo sino un purificador de aire de una fabrica de lignina. En este caso el periodo de incubación máximo fue de 20 días. Es importante por tanto que las autoridades sanita-

rias tengan en cuenta un límite superior de hasta 26 días en el seguimiento de un brote.

Otro aspecto importante es la eficacia de los métodos moleculares, (*Amplified Fragment Length Polymorphism* AFLP, *Pulse Field Gel Electrophoresis* PFGE) considerados de referencia, para caracterizar la cepa responsable de un brote y su origen. Se ha demostrado recientemente que algunos de los patrones de AFLP o PFGE están ampliamente distribuidos⁶. Por tanto, basándose en los resultados de estas técnicas, no se podría asegurar que si los aislamientos clínicos tienen el mismo patrón de AFLP o PFGE que los ambientales procedentes de una instalación concreta, ésta sea inequívocamente el foco de infección. Recientemente se ha propuesto como técnica alternativa y mucho más precisa y reproducible la secuenciación de varios genes (*Multilocus Sequence Typing*, MLST) para establecer estas relaciones epidemiológicas⁷.

Por último queremos comentar que cuando se produce un brote en una localidad concreta y empiezan a aparecer los primeros casos, alguna instalaciones inician tratamientos de choque antes de que se comience la inspección para la toma de muestras oficiales. No debe sorprender que, en estas circunstancias, muchas de estas muestras sean negativas para *Legionella*, tanto utilizando métodos de cultivo convencionales como moleculares. Este hecho puede enmascarar el foco real de un brote y la eficacia de la legislación vigente para prevenir la Legionelosis. Cabe recordar que en el brote de Murcia, la cepa a la que se asoció el brote se aisló después de un mes de haber estado parada la instalación y casi 4 meses después de haberse iniciado el brote².

En conclusión podemos decir que las investigaciones epidemiológicas deben prolongarse en el tiempo para poder establecer el foco definitivo de un brote y que aportan una información valiosísima que debe servir para actualizar los conocimientos sobre el control de la Legionelosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Joseph C. New outbreak of legionnaires' disease in the United Kingdom. *BMJ* 2002;325:347-348
2. Garcia-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, Garcia J, Gonzalez-Diego P, Jimenez-Birnales T, Lopez R, Pacheco F, Ruiz J, Segovia M, Balandron B, Pelaz C. Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9:915-2
3. Yamamoto H, Sugiura M, Kusunoki S, Ezaki T, Ikeda M, Yabuuchi E. Factors stimulating propagation of legionellae in cooling tower water. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58:1394-7.
4. WHO. Heterotrophic plate counts and drinking-water safety. J. Bartram, J. Cotruvo, M. Exner, C. Fricker and A. Glasmacher (eds). IWA Publishing, London. 2003.
5. Den Boer JW, Yzerman E PF, Schellekens J, Lettinga KD, Boshuizen HC, Van Steenberghe JE, Bosman A, Van den Hof S, Van Vliet HA, Peeters MF, Van Ketel RJ, Speelman P, Kool JL, Conyn-Van Spaendonck MAE. A Large Outbreak of Legionnaires' Disease at a Flower Show, the Netherlands, 1999. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:37-43.
6. Aurell H, Etienne J, Forey F, Reyrolle M, Girardo P, Farge P, Decludt B, Campese C, Vandenesch F, Jarraud S. *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain Paris: endemic distribution throughout France. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3320-2.
7. Gaia V, Fry NK, Afshar B, Luck PC, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R, Harrison TG. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 2005; 43:2047-52.