

Necesidad, impulso y afianzamiento de nuevas técnicas de análisis de *Legionella* en la norma UNE100030:2017

Guillermo Rodríguez Albalat

Biótica, Bioquímica Analítica, S.L. Parque Científico de la Universidad Jaime I. Castellón
guiller@biotica.es

En un escenario de construcción de la salud, los planes de prevención y control de *Legionella* descritos en la norma UNE100030:2017, tienen que desplegar una función preventiva. En este desempeño, las técnicas nuevas de *Legionella* proporcionan una información (bio) química útil para tomar decisiones a tiempo, y anticiparse en lo posible a las situaciones que nos llevan a escenarios de quebranto de la salud. En este artículo se describe su necesidad y se proponen mecanismos para su impulso y su afianzamiento, en un marco colaborativo que invita a participar a todos los agentes del sector.

NECESIDAD

La necesidad de disponer de técnicas rápidas no debería justificarse en un escenario de quebranto de la salud, desde las cifras que detallan el impacto de la enfermedad, las cuáles, sin embargo, la avalan. Los casos notificados en Europa en 2017 aumentaron un 30 % con respecto al promedio del período 2013-2016¹. Por el contrario, estas técnicas se justifican desde el compromiso con un escenario de construcción de la salud, en el que el método estándar de cultivo no puede desplegar una función preventiva. Una función que sí deben desplegar los planes prevención y control de *Legionella* (PPCL), como los propuestos por el Comité Técnico de Normalización AENOR (CTN100 GT12) en la norma UNE100030:2017². La ley exige responsabilidad al titular de la instalación, quien puede aceptarla con naturalidad si asume el compromiso con la salud de la comunidad en que desarrolla su actividad, pero debe disponer de información oportuna sobre el desempeño del plan, para que cumpla su propósito.

La dificultad de añadir valor preventivo al plan con el método de cultivo es la demora entre la toma de muestra y la obtención del resultado (10-12 días), pero también la falta de garantía de recuento en todo el rango de detección. Aunque pudiésemos acortar el tiempo del ensayo, en las muestras ambientales, y especialmente en las menos limpias, concurren otros factores que interfieren con la capacidad de *Legionella* para crecer en un medio de cultivo sólido. Entre los más conocidos, los estados viables no cultivables (VBNC), o microbiota que enmascare o inhiba la formación de colonias de *Legionella*, subestimando su concentración, o la liberación impredecible, bien en la muestra concentrada bien en la placa, de células de *Legionella* por amebas infectadas, sobrestimando su concentración, sobre todo

si se pretendía referir la cuantificación a la *Legionella* presente en la fase acuosa. El ciclo de vida de *Legionella* se asocia a protozoos y biopelículas que liberan de forma impredecible células infectivas en el agua de la instalación, pero también pueden hacerlo en la muestra una vez ya tomada³⁻⁶.

Estos y otros fenómenos en la muestra ambiental tienen la oportunidad de desencadenarse en algún momento de un proceso analítico tan largo. Por ejemplo, la transición de *Legionella* a estados no detectables por cultivo en muestras con pocos nutrientes, el aumento de microbiota interferente si el biocida no ha sido correctamente inactivado, o la presencia de Fe(II) derivado de corrosión, como nutriente para *Legionella* y detractor del nivel de biocida. Además, los tratamientos químicos del agua pueden inducir estados no detectables de esta bacteria por el método de cultivo⁷. En suma, no nos damos cuenta de cosas que le están sucediendo a la instalación y que hubiéramos podido corregir a tiempo. Hay un riesgo intrínseco en la metodología de cultivo de que el resultado final no refleje la situación de riesgo en el momento en que se tomó la muestra, ni el estado en que se encontraba la muestra en el momento en que se tomó. El resultado es equivalente a una fotografía borrosa y en blanco y negro del objeto fotografiado.

La cuestión es si con nuevas técnicas, es posible desplegar esa función preventiva, es decir, si nos habilitan el acceso a una información oportuna, aunque no exenta de incertidumbre analítica, que el laboratorio debe acotar e interpretar, desde el conocimiento de la técnica, de la muestra y de la bacteria diana, y también el titular desde el conocimiento de su instalación. Si, como hemos razonado, disponer de esa información oportuna nos va a permitir decidir cuándo y cómo actuar en una instalación para minorar el riesgo de proliferación y diseminación de la bacteria, es obvio que las técnicas rápidas son necesarias. Es como una captura de pantalla del objeto enfocado al instante. Despliegan la función preventiva, sin oponerse al propósito original del método de cultivo, es decir, el aislamiento de una colonia que, en situación de brote, proporcione material para establecer una relación causa-efecto, aunque nunca llega a establecerse en más de la mitad de los brotes. Es decir, que el coste de la investigación ambiental, microbiológica y epidemiológica asociada a un brote no alcanza su objetivo en más de la mitad de las ocasiones, con un coste medio para la administración de entre

450 000-760 000 €, y un coste de parada por instalación que, según su tipología, varía entre 3750-15 000 €/hora. Desde una óptica ambiental, las técnicas nuevas asumen el reto de reducir la cantidad de residuo generado por el ensayo de *Legionella*. Un laboratorio que realice 5000 ensayos de cultivo de *Legionella* al año, generará como mínimo 1 638 000 gramos de residuo infectivo (más de tonelada y media), y asume un coste medio de 1,4-1,6 €/Kg de residuo.

El efecto sobre la “comunidad en que vivimos” nos parece relevante para valorar la necesidad de nuevas técnicas. Estamos experimentando una inversión de nuestras pirámides poblacionales. El calentamiento global y el envejecimiento de la población hacen prever un escenario dónde cada vez habrá más mayores que viven más tiempo, y que aumentan un segmento de población sensible a la *Legionella*. Asistimos a un aumento de gente mayor que vive en soledad, que decidirá vivir en los centros de día y residencias de personas mayores, espacios en los que los responsables deben extremar las medidas de control higiénico sanitarias (H-S). Se da también un aumento del turismo senior. Por todo ello, es necesario prevenir la legionelosis en todos los lugares con tránsito frecuente de público, como hoteles, centros de ocio, oficinas, restaurantes, residencias, etc. También en los hospitales, donde *Legionella* es fatal en un 20-25 % de los casos, con personas susceptibles debido a patologías (EPOC, tabaquismo, ancianos, enfermos de VIH, insuficiencia cardíaca, diabetes, etc), y aquellos con inmunodeficiencia o sometidos a tratamientos inmunosupresores. De 1250 infecciones por legionelosis, el 25 % se producen en el ámbito hospitalario. Ante el coste de las medidas H-S, identificar correctamente aquellas áreas especialmente “sensibles” y adoptar medidas costo-efectivas para controlar la bacteria y mantener el riesgo de infección lo más bajo posible, es crítico⁸.

Finalmente, los relatos experienciales de los enfermos, algunos mal diagnosticados, y sujetos a tratamientos equivocados, que les ocasionaron otras complicaciones, o aquellos que, aún con diagnóstico y tratamiento correctos, sufrieron un quebranto importante de salud, sin duda terminarían por definir la necesidad de una información analítica rápida y oportuna, como signo de compromiso con su salud por parte de aquellos que desarrollan actividades con riesgo de proliferar y diseminar el agente causal. Estos relatos pueden hacerse visible a través de plataformas de afectados y fundaciones.

IMPULSO

En España, la iniciativa del sector profesional, junto con las CCAA y el Ministerio, para la redacción de la norma UNE100030:2017 reconoce tanto el importante rol de las

técnicas nuevas de *Legionella* para contribuir a un plan de prevención y control de *Legionella* eficiente como la necesidad de mejorar estos planes, en un escenario en el que la legionelosis no ha dejado de crecer.

El reconocimiento del marco regulatorio ayuda a habilitar un escenario para dar recorrido y profundidad a las nuevas técnicas de *Legionella*. En UK, la agencia gubernamental HSE (*Health and Safety Executive*) - sirva de antecedente del fenómeno de adherencia a nuevas técnicas-, ya incorpora, entre otros, los métodos que también nos propone la norma UNE100030:2017, validados y certificados, como son la separación inmunomagnética (SIM) y la PCR⁹. Este organismo es responsable del fomento, regulación y aplicación de la salud, la seguridad y el bienestar en el lugar de trabajo, y de la investigación sobre riesgos laborales. Si hay un compromiso con la salud de la comunidad en que vivimos, si hay un consenso profesional explícito en la norma UNE100030:2017, si hay un desarrollo científico y técnico suficiente y contrastado, y si hay una previsión de la evolución demográfica de la población expuesta, el impulso definitivo es la adherencia de todo proyecto normativo y regulador a la incorporación de técnicas nuevas de *Legionella*. No obstante, no es el único. Las técnicas nuevas deben ser correctamente implementadas en un laboratorio acreditado. En consecuencia, son bienvenidos los esquemas de verificación que permitan una adecuada evaluación del desempeño de los analistas en la ejecución de estos ensayos. En un marco colaborativo, los laboratorios forman parte de un proceso de innovación, como también los organismos que los evalúan. Tanto unos como otros, están llamados a participar en un proceso de construcción y mejora de la prevención de *Legionella*. Y los desarrolladores de las técnicas deben estar dispuestos a brindar su *know-how*, en ese marco colaborativo, para la formación de evaluados y evaluadores. Las conclusiones científicas o técnicamente válidas mediante estas técnicas, no se alcanzan sino desde la combinación de los datos con el conocimiento de fondo de la técnica y, en lo posible, de la instalación. Ese es el principio del camino de su afianzamiento.

AFIANZAMIENTO

Los avances científicos y tecnológicos, que estas nuevas técnicas suponen, son hallazgos casi siempre en las interfases entre disciplinas científico técnicas, en las que se encuentran conocimientos y experiencias, en áreas de conocimiento mixto. Un ejemplo característico son los anticuerpos inmovilizados como fases de reconocimiento específico sobre nanosoportes, el desarrollo de la instrumentación científica, los desarrollos quimiométricos para el tratamiento de datos primarios, la implantación a escala de laboratorios de las técnicas, entre otros. La implicación de los laboratorios puede formar un caldo de cultivo que conduzca al afianzamiento

de las técnicas y su evolución. Es una fuerza motriz que retroalimenta el progreso científico. Aquí, el marco regulatorio puede tender puentes para procurar estas relaciones simbióticas.

Este afianzamiento nos exige racionalizar y enfatizar la importancia de una información (bio)química de calidad para tomar decisiones correctas y a tiempo. En una perspectiva de construcción y avance, estas técnicas no son excluyentes, pero tienen una aproximación distinta a la medición del analito (*Legionella*), siempre con la visión finalista de generar una información (bio)química útil sobre *Legionella*. El analista asume la responsabilidad del ensayo, para obtener una información (bio)química con la mejor calidad metroológica posible (máxima exactitud o mínima incertidumbre) y satisfacer la demanda informativa del cliente. Pero también necesita alcanzar objetivos como emplear menos material, tiempo, esfuerzo, coste y riesgo (objetivos operativos). Las técnicas, validadas y certificadas, facilitan un compromiso entre la calidad de la determinación y los objetivos operativos. En general, las nuevas técnicas son métodos más “verdes” o “limpios” de análisis. Las propiedades productivas (rapidez, bajos costes y riesgos) de los procesos analíticos son ahora compatibles con las propiedades analíticas (exactitud, representatividad) que se nos ofrecen, lo que supone un nuevo paradigma en el control y vigilancia de la legionelosis. En este proceso de afianzamiento, las técnicas son en principio asumidas con protocolos cerrados que resultan de su validación, pero que se enriquecen con la experiencia. De ahí, se pueden proponer nuevos compromisos con la calidad analítica, que podrán alcanzarse evolucionando los protocolos en un proceso iterativo con los usuarios. En particular, los laboratorios.

Las nuevas técnicas tienen, de forma destacada, una función informativa ya que su principal resultado (*output*) es la información de tipo (bio)químico sobre *Legionella* en sistemas naturales. Cuando esta información se contextualiza en la secuencia datos-información-conocimiento-respuesta, es signo de nuestra responsabilidad social. Es decir, cuando se interpretan para el fin con el que se van a emplear, la prevención. Por ejemplo, una lectura óptica tras la aplicación del método inmunomagnético es un dato primario caracterizado como un componente informativo de *Legionella*, por cuanto refleja la interacción antígeno-anticuerpo que ha sido posible por la integridad de la envoltura externa de la célula detectada en su ambiente natural¹⁰. Su introducción en una ecuación surgida de una validación del método proporciona una información (UFCeq) que supone una descripción de lo detectado, como resultado analítico. Mediante la interpretación en contexto de esta información se alcanza el conocimiento, que tiene dos consecuencias: la comprensión del resultado obtenido y la toma de decisiones fundamentadas y a tiempo. La información (bio)química nos describirá

Legionella en su sistema natural. En el caso del método inmunomagnético, aquella *Legionella* libre, intacta y accesible en la fase acuosa en el instante de la interacción con los anticuerpos inmovilizados en soportes móviles (partículas magnéticas). Sabiendo qué medimos y cómo, comprendemos procesos y mecanismos, en el contexto de la muestra y la instalación, para apoyar, en definitiva, la toma de decisiones adecuadas en ámbitos técnicos, con repercusión económica y social.

La responsabilidad social que disfrutamos en el uso de estas técnicas está relacionada directamente con el impacto que la información (bio)química generada en los laboratorios de rutina, o en sistemas *in situ*, tenga en la comunidad en que vivimos. Surge de aportar información necesaria y fiable para tomar decisiones fundamentadas y a tiempo en la diversidad de instalaciones de riesgo, lo que confiere una responsabilidad transversal, por la propia transversalidad de la diseminación de *Legionella*. Es muy relevante aquí el desarrollo correcto de los procesos de laboratorio y del empleo de herramientas analíticas (instrumentos, aparatos, reactivos, materiales de referencia, etc.) de la mayor calidad posible.

Con nuevas técnicas validadas y certificadas, se enriquecen las posibilidades de buscar puntos de unión entre la metrología y la resolución de problemas, dentro del ámbito de la ISO17025 para la acreditación de laboratorios, armonizando el “servicio al cliente” con la “validación de métodos”.

Por supuesto los resultados analíticos no son suficientes, porque el control de *Legionella* no empieza en las puertas del laboratorio ni puede terminar en un boletín de resultados. La toma de muestras, la variabilidad de las matrices ambientales, y el ciclo de vida de *Legionella*, asociado a protozoos y *biofilms*, con una amplia variedad de estados, hace conveniente contextualizar el resultado para generar conocimiento sobre su control (interpretación de los resultados); cada técnica se dirige a una propiedad distinta en el mismo microorganismo, por lo que tener una actitud permeable y buscar los puntos de enriquecimiento mutuo entre técnicas y sus informaciones, más que enfatizar las que son aparentemente divergentes, será fundamental para el progreso científico y técnico de la instrumentación analítica en este sector.

La información (bio)química a suministrar sobre *Legionella* en sus sistemas naturales no puede centrarse exclusivamente en el proceso analítico, sino que debe enmarcarse primero en la resolución de problemas de demanda de información (bio)química. Esto implica tanto considerar el muestreo, y también generar un conocimiento a partir de los resultados que tenga un planteamiento multidisciplinar.

Otra tendencia a la que el marco regulatorio no podrá mostrarse opaco, y que se está imponiendo, es el denominado análisis *onsite* con sistemas autoanalizadores que generen los datos que acumulan, y los envíen a un centro de control. En el ámbito de las instalaciones de riesgo, los sensores tienen un gran porvenir, no porque suministren datos, sino porque estos pueden tener mejor correspondencia con la realidad. Algún sensor de este tipo automatiza la medida del método inmunomagnético contemplado en la UNE100030:2017¹¹. Los resultados obtenidos sobre la misma muestra combinando distintas técnicas permiten abordar la generación de índices que combinan distintos tipos de información (bio)química, y que pueden tener interés en determinados ámbitos. Los resultados analíticos pueden combinarse considerando su naturaleza cuantitativa o cualitativa, y definir criterios para la toma de decisiones. Los sistemas *in situ* fuera de laboratorio, de creciente desarrollo, pueden utilizar estas técnicas por ofrecer mayor viabilidad de su automatización. Estos sistemas proporcionarán una información rutinaria, en el mismo lenguaje analítico que la generada por los laboratorios de rutina. Con las nuevas tecnologías, estos sistemas construyen la información requerida a partir de la rutinaria, es decir, aquella que precisa el destinatario de la información para tomar decisiones fundamentadas y a tiempo. El registro histórico, el análisis de tendencias, y la relación con otros parámetros físicos, químicos o microbiológicos, lleva esta información a un plano en el cual el destinatario percibe la satisfacción añadida de poder tomar decisiones más fundamentadas en el ámbito de la sanidad ambiental, y libres de la intervención humana.

CONCLUSIONES

Con respecto a técnicas de cultivo, la información (bio) química de rutina de las nuevas técnicas se caracteriza, de forma más relevante, en los siguientes aspectos. En primer lugar, una información más simplificada y útil, ya que la generada habitualmente por el cultivo en parte no se usa. Esta tendencia es de gran significación práctica, ya que aproximadamente un 12-20 % de la información generada por los laboratorios de rutina a través del cultivo no se emplea, debido a que los resultados no son concluyentes (microbiota interferente, etc). En segundo lugar, obtienen una información útil más rápidamente, ayudando a tomar decisiones a tiempo, respecto de la información clásica. En tercer lugar, proporcionan una información más ajustada al estado de la bacteria en la instalación, y menos interferida por efectos que pueden desencadenarse de forma impredecible durante el proceso analítico clásico. En cuarto lugar, mejoran el equilibrio entre propiedades analíticas y propiedades productivas. En general, tienen menor incertidumbre analítica, mejor recuperación, y menor tasa de resultados no concluyentes.

Con el reconocimiento en el marco regulatorio de las nuevas técnicas, se reconocerá explícitamente una mayor flexibilidad para abordar metrológicamente las medidas (bio)químicas de *Legionella*, introduciendo aproximaciones adecuadas a una actuación preventiva eficiente. Ayudará a reunir un conjunto de experiencias, saberes, valores, información en contexto, percepción e ideas que derivarán del uso de estas técnicas, para nuestra tarea de reflexión sobre el control de *Legionella*. Y de esta reflexión surgirán nuevas ideas, saberes y experiencias. Se estimulará el desarrollo con el tiempo de índices y parámetros definidos por estos nuevos métodos, además de los resultados cuantitativos que de por sí proporcionan.

REFERENCIAS

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019.
2. UNE 100030:2017 Prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones. CTN 100 – CLIMATIZACIÓN.
3. Robertson P, Abdelhady H, Garduño RA. The many forms of a pleomorphic bacterial pathogen-the developmental network of *Legionella pneumophila*. *Front Microbiol*. 2014; 5:670.
4. Molofsky, Ari B, Michele S. Swanson. Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Molecular microbiology*. 2004; 53(1):29-40.
5. Rodgers FG. Ultrastructure of *Legionella pneumophila*. *Journal of clinical pathology*. 1979; 32(12):1195-202.
6. Boulanger CA, Edelstein PH. Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation. *Appl Environ Microbiol*. 1995; 61(5):1805-9.
7. Pùle D. Conventional and alternative disinfection methods of *Legionella* in water distribution systems – Review. *Construction Science*. 2016; 19(1):21-6. doi: <https://doi.org/10.1515/cons-2016-0007>.
8. Almeida D, Cristovam E, Caldeira D, et al. Are there effective interventions to prevent hospital-acquired Legionnaires' disease or to reduce environmental reservoirs of *Legionella* in hospitals? A systematic review. *American journal of infection control*. 2016; 44(11):e183-8.
9. WMSoc Factsheets – Rapid Microbiology Industry Liaison Group. 2019. Disponible en: <https://www.waterlinepublication.org.uk/articles/wmsoc-factsheets-rapid-microbiology-industry-liaison-group/>.
10. Albalat GR, Broch BB, Bono MJ. Method modification of the Legipid® *Legionella* fast detection test kit. *Journal of AOAC International*. 2014; 97(5):1403-9.
11. Rodríguez G, Solís I, Jiménez M, et al. Automatic Early Warning System to Detect and Quantify *Legionella* Species in Cooling Towers. *J Bacteriol Mycol*. 2018; 5(3):1071.