

Relación de *Legionella* spp. con parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en aguas

Alejandra Serrano Suárez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**

**RELACIÓN DE *LEGIONELLA* SPP. CON PARÁMETROS
MICROBIOLÓGICOS Y FISCOQUÍMICOS EN AGUAS**



Departamento de Microbiología
Facultad de Biología Universidad de Barcelona

Memoria presentada por

Alejandra Serrano Suárez

para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología

Bienio: 2004-2006

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Rosa M^a Araujo Boira, en el
departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona.

VB de la directora,

La doctoranda,

Dra. Rosa M^a Araujo Boira

Alejandra Serrano Suárez

Barcelona, Julio 2009

A mi familia

Agradecimientos

Creo que es esencial agradecer primero a las personas del departamento de microbiología que han hecho posible este trabajo, en especial a la Dra. Rosa Araujo quien me ha hecho parte de su grupo de investigación, donde he recibido la oportunidad de adquirir una mayor formación profesional y he pasado una de las mejores etapas de mi vida. Gracias Rosa por ser una guía durante estos 4 años y medio en los que he vivido experiencias inolvidables.

También quiero agradecer a Javier Méndez por su ayuda en el proceso de la tesis y sobre todo haber sido fuente de confianza y de apoyo en todo momento. Esta tesis tampoco se habría podido realizar sin el trabajo de toma de muestras realizado por Jordi Dellundé, además de sus buenos consejos. Tengo que agradecer también al Dr. Humbert Salvadó, así como a Oriol Canals quien ha disfrutado el trabajo duro con las muestras y el microscopio, pero sobre todo tengo que agradecerle su amistad.

Ahora tengo la oportunidad de poder decirle a toda la gente que me ha acompañado en esta etapa lo importantes que han sido para mí. Comenzaré con el laboratorio más loco de todos el 8, el que tiene pegado en la puerta desde mi primer día, una cartel con la frase: “Cada vez que un becario se queda hasta tarde en el laboratorio, Dios mata un gatito, por favor piensa en ellos”, esto resume mucho el humor de la gente que me ha rodeado durante estos años (y me consta que se ha matado más de un gatito). Como no dedicarles unas palabras a los Rosinots compañeros de labo y más que eso, grupo de amigos: Ayalke eres todo un fenómeno “chiquito” y la sonrisa Etíope es maravillosa! Byron que no se te acabe nunca esa cara de papá que traes cada mañana, tu felicidad es envidiable, ah! y ahora podrás poner todo el aire acondicionado que quieras. Chus, eres la voz del laboratorio, aunque digas que no te gusta cantar, tu buena onda inunda el laboratorio y hace más leve el día a día. Sílvia Bofill, yo si te votaría! extrañaré las conversaciones durante la comida, me encanta escucharte hablar de tu Jana. Anna eres la persona que necesitaban los rosinots para ponerse a raya, no pierdas las ganas y menos aún la inspiración. Adri, llegaste como un aire fresco al labo, parece que te conociéramos desde siempre, eres una gran persona, seguro que iremos a verte a Brasil.

Como no nombrar también a los compañeros del labo 9, nuestro ya adoptado Arnau, cuantas comidas has compartido con nosotros, cuantas bromas y anécdotas, no pierdas esa sonrisa cómplice, nos tienes ganados a todos. Y las niñas lucenas, Maru y Miriam,

son una alegría andante, sabemos que las caras largas duran poco con ustedes. También quiero recordar a los que ya no están en el labo, Pili, Eli y Bonjoch, han sido y serán parte de este mundillo que hemos formado y de la amistad que hemos creado.

Y claro, mi grupo, las araujos: Sarah Rodríguez, mi compañera durante los 4 años, faltan palabras para describir todo lo que hemos vivido juntas, eres una persona maravillosa, me siento afortunada de haber compartido esta gran experiencia en tu compañía. Y nuestra ya no tan nueva integrante del grupo, Sílvia Cervero, eres una de las personas con más motivación en la vida que conozco, llegaras a donde tú quieras, te deseo toda la felicidad que te mereces, ya no serás más Padawan!, ahora pasas a ser la tesista veterana del laboratorio. Gracias también a Vicenç y su buena disposición siempre, gracias sobre todo por la faena que me has quitado de encima tantas veces, espero que la colaboración en el grupo te sirva para lo que decidas hacer, muchísima suerte en todo.

Tampoco puedo olvidar a los amigos de toda la vida y que a pesar de todo lo que hemos vivido juntos, distancias incluidas, siempre hemos estado cerca: Anita, Miguel, Leo, Lenny, Roco, Fabri, Maju, Sisi, Ramiro, Pepe, Barbara, Mariana, Andy. Y los compinches que he tenido la suerte de tener más cerca, Bobby (mi confidente), Adita (con mención especial por la gran carátula de tesis que me ha hecho), Chino y Gusi (compañeros de aventuras). No podían pasar sin ser mencionados en este pedazo de mi vida, han sido fuente de apoyo y ánimos en estos años y siempre serán parte de mi vida.

Y finalmente gracias a mi **familia**, a mi padre a quien llevo en mi corazón cada día de mi vida, gracias por enseñarme a creer en mis sueños y a luchar por lo que quiero, te hecho mucho de menos. Para mi madre, no me alcanzan las palabras por todo lo que has hecho por nosotros, pero valoro sobre todo tu sacrificio lejos de tus hijos durante estos años y a pesar de eso habernos acompañado en cada paso que hemos dado, todo lo que hemos logrado te lo debemos a ti. A mi hermano que ha estado en los buenos y malos momentos, a pesar de la distancia te tengo siempre conmigo. Quiero agradecer a la gente que ha comenzado a formar parte de mi vida, Maria, Manel y Montse que han estado a mi lado cuidándome y aconsejándome en todo momento. Y finalmente la persona que ha sido mi familia desde el primer día, Néstor, todo lo logrado no se hubiera conseguido sin ti a mi lado, me has sostenido en los malos momentos y has sido mis alas en los buenos, soy muy feliz a tu lado y sobre todo soy feliz por tenerte como compañero de vida.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
<hr/>	
1 Descripción del género <i>Legionella</i>	3
2 Historia de la Legionelosis	5
3 Técnicas de aislamiento e identificación de <i>Legionella</i>	7
3.1 Medios de cultivo	7
3.1.1 Método basado en ISO 11731:1998 “Detection and enumeration of <i>Legionella</i> ”	7
3.1.2 Método basado en ISO 11731-2:2004 “Water quality- Detection and enumeration of Legionella- Part 2 Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts”	8
3.1.3 Control de calidad y materiales de referencia	8
3.2 Métodos de detección e identificación molecular aplicados a <i>Legionella</i> spp.	10
3.2.1 Método de PCR	12
3.2.2 Método de tipado: Electroforesis de campo pulsado PFGE: “Pulse-field gel electrophoresis method”	13
4 Taxonomía del género <i>Legionella</i>	14
5 Epidemiología de la Legionelosis	18
5.1 Legionelosis asociada a viajes en Europa y España	21
6 Ecología de <i>Legionella</i>	22
6.1 Protozoos como reservorio de <i>Legionella</i>	23
6.2 Biofilms como reservorio de <i>Legionella</i>	27
7 Parámetros fisicoquímicos determinantes del hábitat de <i>Legionella</i>	29
7.1 Relación de la temperatura con la multiplicación de <i>Legionella</i>	29
7.2 Relación de pH con la multiplicación de <i>Legionella</i>	30
7.3 Metales (Fe, Cu, Zn) y Carbono Orgánico Total (COT) en relación a la multiplicación de <i>Legionella</i>	30

8 Instalaciones de riesgo	31
8.1 Agua sanitaria caliente como instalación de riesgo	32
8.2 Torre de refrigeración como instalación de riesgo	33
9 Normativas de prevención	35
9.1 Decretos y Ordenanzas	36
9.1.1 BOE- Real decreto 865/2003. Por el cual se establecen los criterios higiénicos sanitarios para la prevención y control de la legionelosis	36
9.1.2 Diario Oficial de la Generalitat de Catalunya (DOGC) DECRET 352-2004. Por el cual se establecen los criterios higiénicos sanitarios para la prevención y control de la legionelosis	37
9.1.3 Otras Normativas, Decretos y Ordenanzas de uso	38
OBJETIVOS	39
<hr/>	
MATERIALES Y MÉTODOS	43
<hr/>	
1 Muestras analizadas	45
1.1 Toma de muestras de agua sanitaria caliente	45
1.2 Toma de muestras de agua de torres de refrigeración	45
2 Caracterización microbiológica de las muestras	46
2.1 <i>Legionella</i>	46
2.2 Heterótrofos	46
2.3 <i>Pseudomonas</i> y <i>Aeromonas</i>	47
2.4 Protozoos	47
3 Análisis fisicoquímicos	47
3.1 Temperatura	47
3.2 Turbidez	48
3.3 pH	48
3.4 Carbono orgánico total (COT)	48
3.5 Metales (Fe, Cu, Zn)	48

4 Aislamiento y cultivo de Legionella spp.	49
4.1 Método basado en ISO 11731:1998 “Detection and enumeration of <i>Legionella</i> ”	49
4.2 Método basado en ISO 11731-2:2004 “Water quality- Detection and enumeration of Legionella- Part 2 Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts”	50
5 Cepas de referencia y ambientales	51
5.1 <i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> str. <i>Philadelphia</i> 1 ATCC 33152	51
5.2 <i>Legionella longbeachae</i> DSM 10572 ATCC 33462	51
5.3 <i>Legionella</i> serogrupo 2-14	51
6 Detección de microorganismos por PCR	52
6.1 Preparación del ADN bacteriano	52
6.2 Extracción de ADN de muestras con inhibidores de PCR	52
6.2.1 Qiamp DNA Mini Kit (Blood body fluid)	52
6.2.2 Resina comercial Molecular Biology Grade	53
6.2.3 Chelex 100 (Bath Method)	53
6.3 Descripción de la PCR de <i>Legionella</i>	54
6.4 Descripción de la PCR de protozoos	57
6.5 Visualización de los amplicones	58
7 Diseño de un control de inhibición de la PCR de Legionella	59
7.1 Amplificación y construcción del plásmido	59
7.2 Purificación	59
7.3 Ligación	59
7.4 Transformación	60
7.5 Midiprep	61
8 Cuantificación de genomas por espectrofotometría	62

9 Secuenciación de cepas puras de Legionella	63
9.1 Purificación del amplificado.	63
9.1.1 QIAquick PCR Purification Kit	63
9.1.2 Purificación por columna Montage PCR	63
9.2 Componentes de la PCR de secuenciación	64
9.3 Amplificación	64
9.4 Precipitación	64
10 Control de calidad del método de cultivo (Cartas Control)	65
11 Análisis estadístico de las muestras	66
12 Anexos de Materiales y Métodos	67
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
Capítulo I: Implementación de métodos para el aislamiento y detección de <i>Legionella</i> en agua.	75
1 Implementación de técnicas de aislamiento y detección de <i>Legionella</i>	77
1.1 Recuperación de células de <i>Legionella</i> aplicando el método de concentración por filtración	77
1.2 Control de calidad de los métodos de cultivo aplicando cartas de control para <i>L. pneumophila</i> ATCC 33152	79
1.2.1 Carta de control	79
2 Técnicas moleculares de detección de <i>Legionella</i> en muestras de agua	80
2.1 Límite de detección de la técnica de PCR	81

2.1.1 Límite de detección de la técnica de PCR diseñada por Jonas <i>et al.</i> 1995, con la cepa <i>Legionella pneumophila</i> ATCC33152	82
2.1.2 Límite de detección de la técnica de PCR semianidada con la cepa <i>L. pneumophila</i> ATCC33152	84
2.1.3 Límite de detección de la técnica de PCR semianidada con la cepa <i>Legionella pneumophila</i> de origen ambiental serogrupo 2-14	86
2.1.4 Límite de detección de la técnica de PCR semianidada con la cepa <i>L. longbeachea</i> ATCC 33462	88
2.2 Comparación de métodos de extracción de ADN de muestras con inhibidores de PCR	90
2.3 Diseño de un control de inhibición de PCR	93
Discusión	98
Conclusiones	102
Capítulo II: Estudio de la contaminación de un edificio público por <i>Legionella</i>	103
1 Antecedentes del problema	105
2 Diseño del muestreo	106
3 Puntos analizados	108
4 Muestreo de control	115
5 Alineamientos del primer muestreo	118
6 Alineamientos del segundo muestreo	119
Discusión	121
Conclusiones	130

Capítulo III: Estudio de <i>Legionella</i> en aguas sanitarias calientes y torres de refrigeración.	131
1 Agua sanitaria caliente (ASC)	133
1.1 Muestras “Mezcla”	134
1.1.1 Descripción de parámetros microbiológicos de muestras de agua sanitaria caliente (Mezcla)	134
1.1.2 Descripción de parámetros fisicoquímicos de muestras de agua sanitaria caliente (Mezcla)	136
1.1.3 Descripción estadística de los diferentes parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de muestras de agua sanitaria caliente (Mezcla)	138
1.1.4. Parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en relación a la presencia y ausencia de <i>Legionella</i> de muestras de agua sanitaria caliente (Mezcla)	141
1.1.5 Correlaciones entre los factores microbiológicos y fisicoquímicos de muestras de agua sanitaria caliente (Mezcla)	148
1.2 Muestras de “Agua Proximal”	150
1.2.1 Descripción de parámetros microbiológicos de muestras de agua sanitaria caliente (A. Proximal)	150
1.2.2 Descripción de parámetros fisicoquímicos de muestras de agua sanitaria caliente (A. Proximal)	152
1.2.3 Descripción estadística de los diferentes parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de muestras de agua sanitaria caliente (A. Proximal)	153
1.2.4 Parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en relación a la presencia y ausencia de <i>Legionella</i> de muestras de agua sanitaria caliente (Agua Proximal)	156
1.2.5 Correlaciones entre los factores microbiológicos y fisicoquímicos de muestras de agua sanitaria caliente (A. Proximal)	163
1.3 Muestras de “Agua Distal”	165
1.3.1 Descripción de parámetros microbiológicos de muestras de agua sanitaria caliente (Agua Distal)	165
1.3.2 Descripción de parámetros fisicoquímicos de muestras de agua sanitaria caliente (A. Distal)	166

1.3.3 Descripción estadística de los diferentes parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de muestras de agua sanitaria caliente (Agua Distal)	167
1.3.4. Parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en relación a la presencia y ausencia de <i>Legionella</i> de muestras de agua sanitaria caliente (Agua Distal)	170
1.3.5 Correlaciones entre los factores microbiológicos y fisicoquímicos de muestras de agua caliente sanitaria (Agua Distal)	177
1.4 Parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en relación a los resultados positivos obtenidos por cultivo de <i>Legionella</i> , en agua sanitaria caliente	179
1.5 Análisis discriminantes de los diferentes tipos de muestras de agua sanitaria caliente	181
2 Torres de refrigeración	184
2.1 Descripción de parámetros microbiológicos de muestras de agua de torres de refrigeración	184
2.2 Descripción de parámetros fisicoquímicos de agua de torres de refrigeración	186
2.3 Descripción estadística de los diferentes parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de las muestras de agua de torres de refrigeración	187
2.4 Correlaciones entre los factores microbiológicos y fisicoquímicos de muestras de agua de torres de refrigeración	191
3 Identificación de protozoos en agua sanitaria caliente y torres de refrigeración	193
3.1 Observación de amebas mediante microscopio electrónico de transmisión	198
Discusión	199
Conclusiones	211

CONCLUSIONES GENERALES	213
-------------------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA	217
---------------------	------------

ANEXOS	243
---------------	------------

Abreviaturas	273
---------------------	------------

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de *Legionella pneumophila* en 1976, el conocimiento sobre su biología y epidemiología ha avanzado mucho, lo que ha permitido desarrollar en la mayor parte de los países, incluida España, normativas para prevenir las infecciones pulmonares que causa este microorganismo, especialmente en lo que se refiere a su control en los sistemas de riesgo como las torres de refrigeración y el agua sanitaria caliente. Sin embargo aún se conoce poco sobre la relación de *Legionella* con los diferentes microorganismos y los parámetros fisicoquímicos de los diversos ambientes donde *Legionella* es capaz de multiplicarse.

1 DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO *LEGIONELLA*

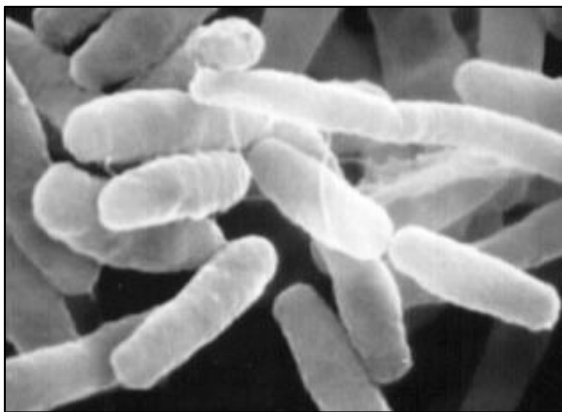


Fig. 1. Foto electrónica de *Legionella pneumophila*.

Legionella spp. es un bacilo gram negativo aerobio que pertenece al linaje de las γ -proteobacterias. La mayoría de las especies son móviles, su fuente de carbono y energía son los aminoácidos y requiere L-cisteína y hierro, en forma de pirofosfato férrico para crecer. La temperatura óptima de crecimiento es de 35°C aunque puede

crecer entre 20-45°C y sobrevivir a temperaturas más extremas (Araujo *et al.* 1992, Mauchline *et al.* 1992, Rogers *et al.* 1994). En el 2004 se publicó el genoma completo de la cepa Filadelfia de *L.pneumophila* sg1 (Chien *et al.* 2004).

En el laboratorio *Legionella* es un organismo de difícil crecimiento, pero en el medio ambiente se aísla de un rango de ambientes acuáticos, desde ríos y lagos hasta del suelo, con factores bióticos y fisicoquímicos muy diversos. Sin embargo, no se ha descrito que se hayan producido epidemias de legionelosis en ambientes naturales.

Introducción

La legionelosis se conoce a partir de la segunda mitad del siglo XX, se ha asociado la enfermedad a los sistemas de agua de edificios que tienen cambios en el caudal del agua y en la temperatura media, lo que permite la formación de un hábitat ventajoso para el desarrollo de *Legionella*, el biofilm. Estudios ambientales y de laboratorio demuestran que *Legionella* crece asociada a biofilms que se desarrollan en las tuberías, libremente asociada a otros microorganismos o parasitando protozoos (Kuiper *et al.* 2004, *Legionella* guidelines, 1998, Paszko-Kolva *et al.* 1991, Rogers *et al.* 1994, Wadowsky *et al.* 1983). La multiplicación de *Legionella* en los biofilms se ha relacionado también con el sustrato sobre el que se desarrolla el biofilm (Rogers *et al.* 1994).

Una de las características más importantes de la bacteria es su capacidad para sobrevivir y multiplicarse en el interior de fagosomas de muchas especies de protozoos y también de macrófagos gracias a su capacidad para evitar la fusión entre fagosomas y lisosomas (Chen *et al.* 2004). Yamamoto *et al.* 1992, consideran que la capacidad de proliferar dentro de los protozoos que tiene *Legionella* puede ser uno de los factores que estimulen su propagación como agente infeccioso.

Actualmente existen 46 especies descritas pero solo 20 se han asociado con enfermedad en humanos. *L. pneumophila* es la especie que más habitualmente se relaciona con los brotes epidémicos.

2 HISTORIA DE LA LEGIONELOSIS

Legionella es el agente causal de la legionelosis, una enfermedad respiratoria aguda, “la enfermedad de los legionarios”, que se describió por primera vez a raíz de un brote agudo de neumonía atípica que se produjo entre los asistentes al Congreso de la Legión Americana de Filadelfia en 1976, en el hotel Bellevue-Stratford (figura 2).



Fig. 2. Vista del Hotel Bellevue-Stratford en Filadelfia.

La enfermedad afectó a 182 personas, 29 de las cuales fallecieron (Fraser *et al.* 1977). El evento tuvo una gran difusión mediática, pero a pesar de la rápida intervención de los expertos del CDC (*Centers for Disease Control*), no fue hasta seis meses más tarde que consiguieron aislar el bacilo responsable de la enfermedad del legionario, inoculando extractos de pulmón de pacientes fallecidos en Filadelfia, en cobayas por vía peritoneal (Fraser *et al.* 1977, McDade *et al.* 1976). Las cobayas enfermaron entre los 3 y 5 días y finalmente murieron. En la autopsia se descubrió peritonitis e hipertrofia del bazo y del hígado y se encontraron bacilos en estos órganos que fueron inoculados a embriones de pollo de 5-6 días, por vía vitelina (saco de la yema), los embriones murieron entre los 4 y 10 días y se observó un importante desarrollo bacteriano. De esta manera se lograron aislar bacilos gram negativos. Posteriormente se usaron como antígenos para examinar los sueros de los pacientes sospechosos de tener la infección, mediante inmunofluorescencia indirecta.

William Cherry y Roger McKinney en 1978 usando muestras de pacientes fallecidos en el brote desarrollaron el primer antisuero marcado con fluoresceína para la visualización directa de la bacteria (inmunofluorescencia directa) (Cherry *et al.* 1978).

Introducción

Los primeros cultivos de *Legionella* se hicieron en el medio Mueller-Hinton agar, suplementado con hemoglobina e IsovitaleX, se vio que estos componentes eran esenciales para el crecimiento de la bacteria, la hemoglobina le proporcionaba una forma soluble de hierro y el Isovitalex le aportaba el aminoácido esencial L-cisteína (Feeley *et al.* 1978). En estados Unidos en 1979, James Feeley determinó que la L-cisteína clorhidrato y el pirofosfato férrico podrían sustituir el IsoVitaleX y la hemoglobina, respectivamente, y que el crecimiento de *L. pneumophila* se daba mejor en condiciones de pH a 6,9 y a 35°C, y en concentraciones inferiores de CO₂ de 2,5%. Incorporó la L-cisteína y el pirofosfato férrico en un nuevo medio, el agar Feeley-Gorman, que dio como resultado el desarrollo de un nuevo medio de crecimiento para *Legionella*, llamado *Buffer Charcoal Yeast Extract* (BCYE) (Feeley *et al.* 1979).

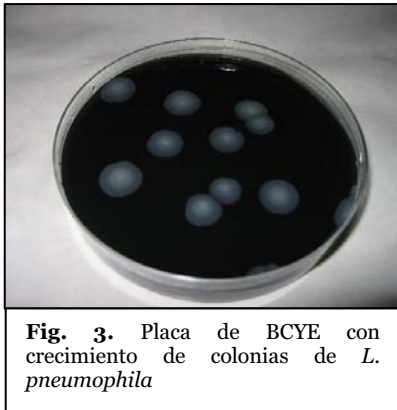
Aplicando técnicas de inmunofluorescencia indirecta, se identificó *Legionella* como la causa de un brote de infección respiratoria, sin neumonía ni fallecimientos que había ocurrido en 1968 en un edificio del *Oakland Country Health Department*, en Pontiac (Michigan). El brote afectó al 95% de las personas que trabajaban en el edificio (Fraser *et al.* 1977, Edelstein, 2006), más tarde se identificó como *L. micdadei*, una especie distinta a la causante del brote de Filadelfia, como el agente causal de la Fiebre de Pontiac.

Desde entonces se han descrito casos esporádicos y brotes comunitarios de legionelosis asociados al agua de los sistemas hídricos artificiales relacionados especialmente con torres de refrigeración y agua caliente. Residencias de la tercera edad, hospitales y hoteles, especialmente los de la costa mediterránea, se han asociado con mucha frecuencia a infecciones (Anónimo, Eur. J. Epidemiology, 1996) hasta el punto que se ha creado una comisión para el estudio de la legionelosis relacionada con los viajes, el *European Working Group for Legionella Infection* (EWGLI) (Hutchinson *et al.* 1996).

3 TÉCNICAS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *LEGIONELLA*

En este trabajo nos centramos en las técnicas de aislamiento e identificación de *Legionella* en agua de consumo humano. El aislamiento de *Legionella* puede ser dificultoso debido al sobrecrecimiento de otras bacterias acompañantes, lo que hace necesario tratamientos específicos de aislamiento e identificación de esta bacteria.

3.1 Medios de cultivo



Legionella es un microorganismo exigente para crecer en medios de cultivo. Actualmente el medio que se usa más habitualmente es el agar selectivo *Buffer Charcoal Yeast Extract* (BCYE) (Figura 3), que contiene suplementos para el desarrollo de la bacteria y antibióticos que inhiben el crecimiento de la biota acompañante.

Para incrementar la selectividad del medio las muestras también se pueden pre-tratar con un tampón ácido o con un choque térmico. En cualquier caso el aislamiento de *Legionella* es lento.

Cuantificar *L. pneumophila* de un medio acuático puede requerir de 1 a 3 semanas, para solucionar esto se han desarrollado técnicas moleculares para agilizar la búsqueda en muestras con abundante biota.

3.1.1 Método basado en ISO 11731:1998 “Detection and enumeration of *Legionella*”.

Actualmente, existe un método estandarizado que se aplica en la mayoría de los laboratorios acreditados, es la normativa ISO 11731-1998.

Este método se basa en la concentración de los microorganismos a través de la filtración por membrana o por centrifugación.

A estas muestras se les realizan 3 tipos de tratamientos: siembra directa, tratamiento térmico y un tratamiento ácido, para la eliminación de microorganismos acompañantes. La confirmación de las colonias presuntivas de *Legionella*, se realiza subcultivando placas en los medios selectivos de BCYE con cisteína y BCYE sin cisteína (materiales y métodos 4.1).

3.1.2 Método basado en ISO 11731-2:2004 “Water quality- Detection and enumeration of Legionella-Part 2 Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts”.

En el 2004 se publicó una segunda técnica estandarizada diseñada para recuperar *Legionella* a partir de muestras de agua con bajas concentraciones de otras bacterias, las muestras se concentran a través de la técnica de filtración por membrana, filtrando 1 litro de la muestra. Para reducir el número de microorganismos acompañantes las muestras se someten a un tratamiento con un tampón ácido en el embudo de las rampas de filtración (figura 4) y se colocan las membranas en placas del medio selectivo BCYE con cisteína (materiales y métodos 4.2).



Fig. 4. Rampas de filtración para muestras de agua.

3.1.3 Control de calidad y materiales de referencia.

El control de calidad asegura que el proceso realizado cumpla con todas las especificaciones exigidas por las normativas.

Para tener un control de calidad del proceso, se necesita un material de referencia que permita controlar la técnica usada.

Los materiales de referencia se consideraron de interés para la microbiología a partir de la década de los 80. Los primeros estudios se hicieron con bacterias aisladas de agua y de alimentos, como *Salmonella*, *Listeria*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli*, entre otras. Para poder desarrollar los materiales de referencia se realizaron estudios previos sobre la supervivencia de bacterias en crioviales con leche descremada como crioprotector (Méndez 2002).

En los años 90 se hicieron los primeros materiales de referencia en virología, concretamente con el fago MS2, como fago F-específico. Tiempo después se realizaron con los fagos de *Bacteroides fragilis* y los fagos somáticos de *E.coli*.

Actualmente existen casas comerciales que producen material de referencia para el análisis de *Legionella*. Pero también se puede trabajar con material propio controlado mediante cartas control.

Las “Cartas Control”, sirven para fijar los límites de variación permisibles en un cultivo de microorganismos estandarizado a partir de un lote de crioviales que contienen una densidad celular conocida. El recuento de varios crioviales de un mismo lote permite dibujar estas cartas de control en las que se establecen los límites de aviso y control a partir del valor medio y dos veces o tres veces la desviación estándar. Así las cartas de control proporcionan los límites de aceptabilidad o de tolerancia que pueden dar las posibles interferencias del procedimiento y permiten tomar acciones cuando el resultado está fuera del intervalo de medida definido.

De esta forma se asegura la obtención de resultados de acuerdo con los requisitos definidos de calidad para el protocolo o método que estemos realizando (Méndez 1999).

3.2 Métodos de detección e identificación molecular aplicados a *Legionella* spp.

El primer método molecular para la detección de *Legionella* fue diseñado por Grimont y colaboradores (Grimont *et al.* 1985). Consistía en una sonda de ADN específica para *L. pneumophila*. Para su construcción, el ADN de *L. pneumophila* fue digerido con la enzima de restricción BamHI y los fragmentos resultantes fueron separados por electroforesis en gel de agarosa o por centrifugación en gradiente de sacarosa. Los fragmentos de ADN codificador del ARNr fueron excluidos ya que estos genes están altamente conservados y reaccionan cruzadamente con el ADN de otras especies bacterianas. El resto de los fragmentos se usaron como sondas marcándolas radioactivamente con P³² y fueron testadas mediante “dot-blot” con el ADN de otras especies bacterianas de varias familias incluyendo Enterobacteriáceas, Pseudomonadáceas y Vibrionáceas. La especificidad de la sonda seleccionada fue adecuada y la sensibilidad de la detección fue de 10⁴ ufc de *L. pneumophila*. Cuando la sonda se probó en “colony-blots” se vio que la detección de *L. pneumophila* se podía producir con cultivos de dos días, mientras que no hubo detección con otras especies de bacterias, aunque hubiera gran crecimiento de éstas (Saunders *et al.* 1988).

En los últimos años se han publicado métodos de detección molecular muy sensibles, específicos y rápidos para *Legionella*, sin embargo, los resultados son difíciles de interpretar, la presencia de ADN de *Legionella* no indica necesariamente que existan células viables con capacidad de iniciar una infección.

El método más usado es la amplificación de ADN mediante la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Han sido desarrollados varios test de PCR para *Legionella* utilizando secuencias de ADN de fragmentos de los genes 5S ARNr, 16S ARNr, o del gen mip, entre otros (Fields *et al.* 2002). La técnica de PCR puede ser usada tanto en muestras clínicas como ambientales, en estas últimas

puede aplicarse directamente a muestras con poca carga microbiana y por tanto es aplicable en muestras de agua sanitaria. En muestras muy contaminadas como el agua residual o el agua de torres de refrigeración, la detección de *Legionella* necesita una filtración previa de la muestra a través de geles o resinas para eliminar los posibles inhibidores de la amplificación, tal y como explican Catalán *et al.* 1997.

Hay otros métodos rápidos de detección como aquellos basados en marcaje con fluorocromos o la detección de antígenos. Estos últimos están especialmente desarrollados para su uso en clínica. El más ampliamente aplicado es la detección del antígeno en orina. Kohler en 1984 relacionó la aparición de los primeros síntomas de legionelosis con la detección del antígeno en orina, que dio resultados positivos en un 90% de los pacientes, durante los primeros catorce días después de la aparición de los primeros síntomas. El porcentaje de detección del antígeno en orina, una vez pasado este período de tiempo, aumentó hasta un 100% de los pacientes (Fields *et al.* 2002).

El test de detección de antígeno en orina permite un diagnóstico rápido y por lo tanto permite comenzar un tratamiento de antibióticos apropiado. El antígeno es un componente del lipopolisacárido de la pared celular de la bacteria que puede ser detectado en la orina a partir de pocos días desde que comienza la infección y tiene una sensibilidad y especificidad cercana al 99%. Un inconveniente de este ensayo es que es específico para *L. pneumophila* serogrupo 1 y aunque la mayoría de los casos son debidos a este serogrupo, este ensayo no toma en cuenta un alto porcentaje de otros serogrupos y especies de *Legionella* que también podrían causar la enfermedad del legionario (Fields *et al.* 2002). La utilización de este test ha permitido que se produzca un incremento de los casos declarados por año, la disminución de los casos diagnosticados por cultivo y la disminución de la mortalidad de la enfermedad, probablemente debido a la aplicación temprana de antibióticos. (Pelaz y Baladrón, 2003).

También existen los métodos basados en hibridación. Se pueden mencionar los ensayos con sondas y la hibridación fluorescente *in situ* (FISH). En la técnica

Introducción

FISH, la fluorescencia es el resultado de la hibridación de una sonda de oligonucleótidos unida a un fluoróforo al ARN diana y se visualiza mediante microscopía. Este tipo de ensayos emplea sondas con oligonucleótidos con una longitud menor de 50 pares de bases con etiquetas quimioluminiscentes o fluorescentes. Forman una molécula doble si la secuencia a la que están dirigidas, la secuencia diana, está presente, por lo cual pueden ser detectadas. Permite la identificación de más del 95% de la mayoría de las bacterias.

En el campo del diagnóstico serológico se han desarrollado las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFA) (Edelstein *et al.* 1980), que fue utilizada para detectar anticuerpos en los pacientes del brote de Filadelfia, inmunoensayos enzimáticos (EIA) y microaglutinación (Farshy *et al.* 1978), que también son usados para detectar anticuerpos de la enfermedad del legionario. El kit de microaglutinación tiene algunas ventajas en comparación a los kits de inmunofluorescencia como son, una manipulación sencilla y resultados claros a simple vista. La especificidad de esta prueba cubre un rango entre el 97% y el 99% con una sensibilidad del 80% (Fields *et al.* 2002).

También se han desarrollado técnicas de tipado molecular, basadas en el polimorfismo genómico del ADN, como la electroforesis de campo pulsado (PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), la AP-PCR (*Arbitrary primer-PCR*) y la PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length*), para *Legionella*, con el fin de discriminar y caracterizar las cepas que causan la legionelosis y determinar el lugar de origen de la enfermedad (Tenover *et al.* 1995).

3.2.1 Método de PCR.

La PCR tiene muchas ventajas sobre las técnicas de cultivo, es más sensible y detecta todos los organismos independientemente de su estado fisiológico. Una vez un ensayo ha sido optimizado, es relativamente rápido y simple de obtener resultados en menos de 24 horas. La PCR también tiene algunas desventajas, detecta tanto los organismos infecciosos y viables como los no infecciosos y no viables, dejando abierta la cuestión de cuan patógena puede ser una muestra.

Esta técnica también es susceptible de inhibición por sustancias y metales presentes en las muestras ambientales (Marlowe *et al.* 2000).

En el caso de la PCR anidada o semianidada se realizan dos PCR consecutivas de 35 a 40 ciclos cada una. En la primera se utilizan un par de cebadores externos; en la segunda se usan otros dos cebadores, uno de ellos distinto a los de la primera PCR (cebadores internos), que flanquean una región central que es la que se desea amplificar. Los productos de la primera amplificación son un molde ideal para la segunda amplificación, mucho mejor que el ADN genómico original, debido a que existe más ADN para amplificar, de esta manera se logra optimizar la amplificación del fragmento esperado y mejorar la sensibilidad y especificidad del método (Schelenk *et al.* 1993).

3.2.2 Método de tipado: Electroforesis de campo pulsado PFGE: “*Pulse-field gel electrophoresis method*”.

Esta técnica se basa en el análisis del polimorfismo del ADN para discriminar entre cepas de *Legionella* y en el criterio de que se deben obtener un mínimo de 10 fragmentos distintos, ya que una detección de pocos fragmentos hace que la robustez y discriminación de la técnica sea reducida. La comparación de los patrones de restricción en parte, es un proceso subjetivo que no puede reducirse a algoritmos rígidos y que se hace más fácil y consistente con la experiencia. Sin embargo hoy en día se ve facilitada con programas informáticos basados en la imagen y el análisis de los fragmentos.

Muchos investigadores y sobre todo en investigación en clínica utilizan esta técnica para tipificar las cepas aisladas durante epidemias y de esta manera correlacionar los resultados (Tenover *et al.* 1995).

4 TAXONOMÍA DEL GÉNERO *LEGIONELLA*

El género *Legionella* fue inicialmente definido por Brenner *et al.* en 1979, que examinaron varios aislamientos del bacilo de la enfermedad del legionario y concluyeron que representaban una nueva familia, género y especie. Desde entonces el género se ha redefinido dos veces, para considerar el incremento de especies y subespecies.

La tipificación del 16S ARNr de *Legionella* ha demostrado que sus especies forman un grupo homogéneo en el cual sus miembros están estrechamente relacionado entre ellos. Fue clasificada dentro de la subdivisión y de las proteobacterias dentro la clase *Zymobacterias*.

La familia *Coxiellaceae* está incluida en el orden *Legionellales* e incluye a dos géneros que son parásitos intracelulares, *Coxiella* y *Rickettsia*. El principal miembro del grupo de las Legionelaceas es la familia *Legionellaceae*. Además del género *Legionella*, la familia *Legionellaceae* contiene bacterias simbióticas: *Amoeba proteus*, *Fluoribacter*, *Sarcobium*, *Tatlockia* y un largo número de bacterias patógenas de amebas, no clasificadas (Edelstein y Cianciotto 2006).

Han sido publicadas 46 especies del género *Legionella*, además de 20 nuevas especies que han sido documentadas y 10 más sin nombre que todavía no se han publicado. Veinte especies de *Legionella* han sido documentadas como causantes de neumonía en humanos y el resto han sido aisladas del medio acuático (*Legionella* guidelines, 1998). Todas las especies de *Legionella* que han sido aisladas de pacientes enfermos también han sido aisladas del medio ambiente, a excepción de *L. hackeliae* y *L. tucsonensis*.

Varias especies de *Legionella* se multiplican únicamente dentro de amebas, muchas de éstas hasta ahora no han podido ser cultivadas fuera de su huésped, dificultando su caracterización. Éstas incluyen *L. lytica* también llamada *L. lyticum* anteriormente conocida como *Sarcobium lyticum*, y un gran número de especies sin nombre conocidas genéricamente como “LLAP” (*Legionella*-like

amoeba pathogen) (Edelstein y Cianciotto, 2006).

La clasificación que utilizamos en este trabajo es la propuesta por *el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* del 2004. Según este manual, la familia *Legionellaceae* está dentro del orden *Legionellales* y presenta un solo género, *Legionella*, en este volumen el Orden *Legionellales* fue descrito sobre la base de análisis filogenéticos del 16S ARNr, este orden contiene a las familias *Legionellaceae* y *Coxiellaceae*.

Phylum: *Proteobacterias*

Subdivisión: *Gammaproteobacteria*

Clase: *Zygomobacterias*

Orden V: *Legionellales*

Familia I: *Legionellaceae*

Familia II: *Coxiellaceae*

Coxiella

Rickettsiella

Género: *Legionella*

Legionella pneumophila subsp. *pneumophila*

Legionella pneumophila subsp. *fraseri*

Legionella pneumophila subsp. *pascullei*

Legionella adelaidensis

Legionella anisa

Legionella beliardensis

†*Legionella bozemanii* → *Fluoribacter bozemaniae*

Legionella brunensis

Legionella busanensis

Legionella cherrii

Legionella cincinnatiensis

Legionella dumoffii

Legionella drozanskii

Legionella erythra

Legionella fairfieldensis

Legionella fallonii

Legionella feeleei

Legionella geestiana

†*Legionella gormanii* → *Fluoribacter gormanii*

Legionella gratiana

Legionella gresilensis

Legionella hackeleae

Legionella israelensis

Legionella jamestowninensis
Legionella jordanis
Legionella lansingensis
Legionella londiniensis
Legionella longbeachae
Legionella lytica
† *Legionella maceachernii* → *Tatlockia maceachernii*
† *Legionella micdadei* → *Tatlockia micdadei*
Legionella moravica
Legionella nautarum
Legionella oakridgensis
Legionella parisiensis
Legionella pittsburghensis
Legionella quateirensis
Legionella quinlivanii
Legionella rowbothamii
Legionella rubrilucens
Legionella sainthelensi
Legionella santicrucis
Legionella shakespearei
Legionella spiritensis
Legionella steigerwaltii
Legionella tauriensis
Legionella tucsonensis
Legionella wadsworthii
Legionella waltersii
Legionella worsleiensis

Las especies cuya nomenclatura ha cambiado se indican con el símbolo “†”. Con la flecha se indica el nombre con el que se conocen hasta su revisión en Mayo del 2004 en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

5 EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEGIONELOSIS

La mayor parte de los brotes epidémicos y muchos casos esporádicos de legionelosis están bien documentados, esto ha permitido conocer el origen y la vía de transmisión de la infección. Los sistemas hídricos de más riesgo, por el número de brotes que originan, son las torres de refrigeración de grandes edificios y el agua sanitaria caliente.

Entre 1990 y 2004 de los 118 brotes epidémicos comunitarios de legionelosis detectados en Cataluña, en 68 (57,6%) se pudo determinar su origen y de éstos 42 (61,8%) se debían a torres de refrigeración. Aunque se han encontrado muchos otros focos como: fuentes ornamentales, “spas”, aparatos de nebulización, excavaciones y grifos de agua sanitaria fría y caliente (Perez- Luz, 2002).

Legionella penetra en los sistemas hídricos artificiales y sobrevive de forma libre o parasitando protozoos en los biofilms que se producen en las tuberías. En 1954 se aislaron bacterias que infectaban a amebas de vida libre del suelo en Polonia (Drozanski, 1956). Posteriormente estos microorganismos fueron clasificados en 1996 como especies de *Legionella* (Hookey *et al.* 1995).

La transmisión de *Legionella* desde su reservorio acuático hasta el ser humano se produce principalmente a través de aerosoles, por inhalación de gotas con un diámetro inferior a 5µm, estas gotas pueden alcanzar los alvéolos pulmonares donde se inicia la infección (Hoge y Breiman 1991). Aunque en ocasiones se ha considerado la microaspiración de agua contaminada para explicar algunos casos de legionelosis nosocomial (Blatt *et al.* 1993), sin embargo no ha sido descrito el contagio persona/persona.

Legionella puede causar dos tipos de patologías, una neumonía atípica, la Legionelosis, y una enfermedad de tipo gripal, la Fiebre de Pontiac, ambas adquiridas al inhalar la bacteria. El que cause un tipo u otro de enfermedad

depende de los factores de virulencia de la cepa infecciosa. No todas las cepas de *Legionella* tienen el mismo grado de virulencia (Cameron *et al.* 1991).

La legionelosis a veces se pone de manifiesto en forma de casos esporádicos y otras como brotes epidémicos. Estos últimos son los que causan más alarma social.

En España la legionelosis es una enfermedad de declaración obligatoria desde 1996 y se han dado algunos brotes epidémicos muy importantes como el de Alcalá de Henares en 1996 con 249 casos y 12 muertos (Boletín Epidemiológico Semanal, 1997), o el de Murcia en el 2001 con 449 casos y 6 muertos, que fue el brote declarado más grande del mundo. En Cataluña también han habido brotes importantes como en el barrio de la Barceloneta en el 2000 con 47 casos y 3 muertos y en Mataró en el 2002 con 80 casos y 2 muertos.

Desde 1976 hasta 1995 solo se había utilizado el método del cultivo para la detección de *Legionella* tanto de muestras clínicas como ambientales. A partir de 1995 se empezó a utilizar la detección de antígeno en orina en los hospitales, en Europa la utilización de la detección de antígeno en orina ha alcanzado al 30-35% de los hospitales, mientras que en España es utilizado en el 90% de ellos. Paralelamente a la utilización de esta prueba fue aumentando la tasa de incidencia de la enfermedad, hasta un máximo en el año 2002 en Barcelona, de 7,6 casos por 100.000 habitantes (5,7 sin el brote de Mataró), lo que coincidió con la aplicación de la norma de prevención de infecciones BOE 865/2003, estabilizándose en los últimos años alrededor de 5,3 por 100.000 habitantes, posiblemente como consecuencia del uso del antígeno en orina y de la implementación de la normativa de prevención.

En el conjunto de España, la evolución de la tasa de incidencia ha sido más o menos paralela a la de Cataluña, pero inferior, alcanzando en el 2004 los 2,9 casos por 100.000 habitantes. En el conjunto de Europa se mantiene estable en 1 caso por 100.000 habitantes. Y en Estados Unidos se mantiene de manera permanente por debajo de 1 caso por 100.000 habitantes (Álvarez J., 2007). Sin

Introducción

embargo, hay que tener en cuenta que estudios prospectivos en Estados Unidos y estudios llevados a cabo en Francia estiman que las incidencias reales en estos países están en torno a los 5-6 casos por 100.000 habitantes. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2003 en 34 países de Europa (de una población de 468 millones), se declararon un total de 4.578 casos, un promedio de 0,98 por 100.000 habitantes. Basándose en investigaciones realizadas en Dinamarca, donde se desarrolla el mayor nivel de pruebas de *Legionella* en pacientes con neumonía, la incidencia real en estos países sería más alta y estaría cerca de los 10.000 casos anuales.

Del mismo modo hay que considerar que la bacteria no infecta por igual a todo tipo de personas sino que la enfermedad se relaciona con una serie de factores de riesgo. Es una enfermedad prácticamente inexistente por debajo de los 30 años y más frecuente conforme aumenta la edad, alcanzando una tasa de incidencia máxima en las personas con una edad igual o superior a los 70 años, con 4,9 casos por 100.000 habitantes en Cataluña entre los años 1992 y 2004. Es mucho más frecuente en hombres, afectando a 3,6 hombres por cada mujer, con una incidencia máxima de 8 hombres por mujer de 70 años o más. Otros factores de riesgo de la enfermedad son el hábito de fumar y las enfermedades o tratamientos que afectan a la inmunidad de las personas. Del total de casos de Cataluña, desde 1992 al 2004, el 47% eran fumadores, el 22% bronquíticos crónicos, el 16% diabéticos, el 10% tenía cáncer, el 8% recibía corticoterapia y una proporción menor tenía otros factores de riesgo.

La mortalidad media antes de 1992 estaba entre el 25-65%, desde 1992 a 2004 en Cataluña fue del 8,7% con un claro descenso en los últimos años, actualmente está en un 5%. La situación es muy diferente comparando los casos comunitarios con los nosocomiales, 6,8% versus 20,5% respectivamente. Esto se puede explicar por el hecho de que en los hospitales se realizan de forma obligatoria y rutinaria la prueba del antígeno en orina a todo paciente que presente síntomas de enfermedad respiratoria, esto conlleva que al ser una enfermedad de declaración obligatoria, la incidencia de casos nosocomiales de legionelosis sea más alto.

La legionelosis es una enfermedad que no se presenta de manera homogénea durante el año, sino que es más frecuente en verano y otoño. En Cataluña entre 1992 y 2004, de Julio a Noviembre, se detectó el 65% de todos los casos declarados y el 64% de todos los brotes epidémicos comunitarios.

El periodo desde 1995 a 2008 viene marcado por la evidencia de que la forma esporádica de la enfermedad es más frecuente que la asociada a brotes. Así por ejemplo, de 655 casos declarados a la *Direcció General de Salut Publica de la Generalitat de Catalunya* entre 1992 y 1999, el 79,9% correspondían a casos esporádicos y el 16% a brotes según la *Guia pel control i prevenció de la legionel·losi a Catalunya*, 2001.

5.1 Legionelosis asociada a viajes en Europa y España.

La legionelosis se considera una enfermedad asociada tradicionalmente a viajeros que realizaban sus vacaciones en la costa mediterránea y desarrollaban la enfermedad cuando llegaban a su país de origen (Borella *et al.* 2000, Fields *et al.* 2002). Por lo que se han formado grupos de vigilancia como *The Health Protection Agency Centre for Infections in London* o *The European Working Group for Legionella Infections (EWGLI)*. Que tienen por objeto detectar brotes de casos de legionelosis asociada a viajeros y de esta manera alertar a las autoridades, permitiendo una rápida respuesta por parte de la salud pública y la aplicación de medidas de control para evitar la aparición de más casos (Ricketts *et al.* 2006, Ricketts *et al.* (b) 2006, Joseph *et al.* 2009).

En España se han reportado hasta Octubre del 2008, 70 casos confirmados de legionelosis. Desde 1992 hasta el 2008 han sido reportados 383 casos asociados a viajeros (http://www.ewgli.org/data/monthly_reports/2008/mr_octo8.pdf).

En casos asociados a viajes reportados al *EWGLINET* hasta el 2006, 20 países informaron de 921 casos de legionelosis, 875 de estos fueron confirmados y 46

se registraron como presuntivos. Se reportaron 33 casos de fallecimiento, que representa una tasa de mortalidad de 3,6%.

Por otro lado se realizaron hasta el 2008 un total de 146 investigaciones, de acuerdo con los estándares de las guías de investigación del *EWGLINET*, en países con incidencia de legionelosis, 111 de estas investigaciones se han asociado a nuevos grupos de países con legionelosis, mientras que 35 se asociaron con grupos reincidentes (donde había constancia de la enfermedad y donde las medidas de control se habían llevado a cabo satisfactoriamente). En general, ha habido una tendencia al alza en el número de casos desde que se utiliza la guía de investigación del EWGLI, lo que trae como consecuencia que se exija una mayor vigilancia de las autoridades de salud pública en toda Europa. (http://www.ewgli.org/data/data_tables/year_onset_country_report.asp)

6 ECOLOGÍA DE *LEGIONELLA*

Legionella es una bacteria cosmopolita que se aísla en biofilms de sistemas acuáticos, asociada a la presencia de otros microorganismos (Fields *et al.* 2002).

Algunos autores afirman que la mayoría de los protozoos sirven como huésped de *Legionella* y que son indispensables para la multiplicación intracelular de *Legionella pneumophila* (Kuiper *et al.* 2004, Wadowsky *et al.* 1983, Chen *et al.* 2004, Drozanski 1956). Otros autores sugieren que la biota bacteriana del agua o de los biofilms provee los nutrientes necesarios para el crecimiento extracelular de *Legionella* (Rogers *et al.* 1994). Por ejemplo *L. pneumophila* persistió en ausencia o en presencia de la ameba *Hartmannella vermiformis* en un biofilm compuesto por *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Flavobacterium* spp., (Fields *et al.* 2002, Murga *et al.* 2001).

6.1 Protozoos como reservorio de *Legionella*.

Los protozoos son organismos eucariotas unicelulares, descubiertos por Leewenhoek en 1674. Habitan prácticamente todos los hábitats terrestres y acuáticos, actualmente tienen un papel importante en el tratamiento de aguas residuales en plantas depuradoras, como bioindicadores o en la mineralización de la materia orgánica.

Tradicionalmente los protozoos de vida libre se han clasificado en 3 grandes asociaciones morfológicas, que corresponden a los Ciliados, Flagelados y Rizópodos (amebas) (Levine *et al.* 1980).

Durante las últimas décadas, el estudio de las amebas de vida libre ha despertado el interés de la comunidad científica, debido a que algunas son



Fig.5. *Acanthamoeba castellanii* de muestra de agua sanitaria caliente.

patógenas del hombre y al papel que juegan como reservorio de algunas bacterias, como *Legionella*, considerada un colonizador intracelular perteneciente al grupo de las ARB (*Amoeba-Resistant Bacteria*), que puede ser fagocitada por protozoos y multiplicarse en su interior (Marciano-Cabral *et al.* 2003) debido a

que resiste el efecto microbicida de las amebas. Se cree que este mecanismo es también el usado durante las infecciones para resistir la destrucción por parte de macrófagos (Rowbotham *et al.* 1980, Newsome *et al.* 1998.).

Las amebas de vida libre viven en cualquier tipo de ambiente, se pueden encontrar en ríos, lagos, piscinas, suelos, etc. (Wellings *et al.* 1979). Una de sus características principales es la capacidad que tienen de enquistarse como mecanismo de resistencia ante condiciones adversas del medio, como cambios de pH, presión osmótica, ausencia de oxígeno, temperatura o falta de nutrientes (Rodríguez *et al.* 1994).

Introducción

Las amebas facilitan el crecimiento de *Legionella* proporcionándole los requisitos nutricionales y protegiéndola de las condiciones adversas del medio, particularmente de agentes usados en la desinfección de aguas, debido a que las amebas, cuando se encuentran enquistadas, resisten la mayoría de estos desinfectantes.

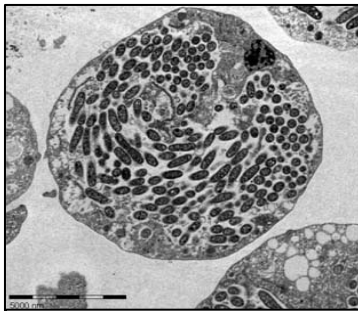


Fig.6.Colonización intracelular de ameba por *L. pneumophila*.

Legionella puede encontrarse intracelularmente en distintas especies de amebas, como *Acanthamoebae castellanii* (Jeffrey D. *et al.* 1994), *Hartmannella vermiformis*, *Naegleria* (Kuiper *et al.* 2004), *Vahlkampfia*, *Cochliopodium* (Paszko-Kolva *et al.* 1991) además de otros protozoos como el ciliado *Tetrahymena spp.* (Barbaree *et al.* 1986).

Según estudios realizados por Molofsky *et al.* 2004, cuando *Legionella* se comporta como colonizador intracelular su ciclo de vida se compone de dos fases: Replicativa y de Transmisión. Cuando las condiciones son favorables para la replicación los rasgos que promueven la transmisión son reprimidos y la bacteria se multiplica intracelularmente. Cuando los nutrientes en las vacuolas son limitados, la progenie se diferencia hacia la fase de transmisión reprimiendo la multiplicación y a la vez expresando un número de rasgos que facilitan que *Legionella* pueda escapar de la célula huésped agotada, para sobrevivir como célula libre y reestablecer el nicho replicativo en un nuevo fagocito (figura 7).

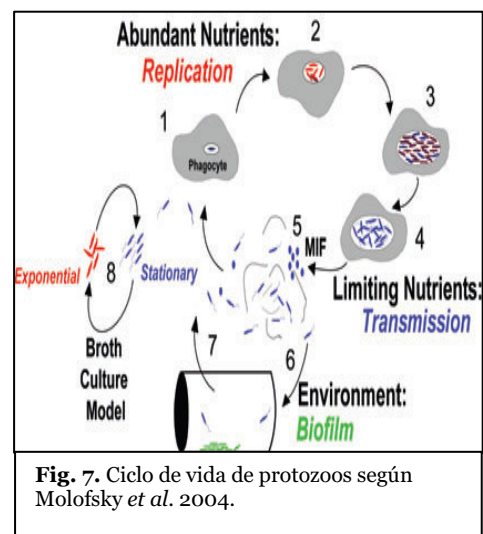


Fig. 7. Ciclo de vida de protozoos según Molofsky *et al.* 2004.

Molofsky y colaboradores realizaron los estudios de estas fases *in vitro*, en cultivos líquidos en fase exponencial (fase replicativa) y en fase estacionaria, en la cual los nutrientes eran limitados. Cuando los cultivos líquidos entraron en estado estacionario la bacteria expresó coordinadamente: 1) un inductor de la necrosis del fagocito 2) motilidad 3) resistencia al estrés provocado por la luz

ultravioleta, el calor, la presión osmótica y la limitación de nutrientes 4) los factores para evadir su fusión con los lisosomas del fagocito. Estas características se han definido como rasgos de la fase de transmisión, enfatizando el hecho de que ninguno de ellos es expresado por bacterias que se están replicando. Se cree que todos estos rasgos promueven la diseminación del patógeno de la vacuola de un huésped a otro. Después de instalarse en un nuevo nicho intracelular, *L. pneumophila* revierte a la forma replicativa para comenzar un nuevo ciclo (Molofsky *et al.* 2004).

Para que la bacteria sobreviva a la degradación cuando se encuentra dentro de un fagolisosoma, debe evitar la fusión de los lisosomas, por esto es importante la fase en la que se encuentra la bacteria en el momento que es fagocitada, si se encuentra en fase replicativa no podrá hacer frente a la degradación lisosómica.

Abu-Kwaik y colaboradores demuestran que las funciones génicas requeridas por *Legionella* para la infección de los protozoos también son requeridas para la infección de macrófagos y sugieren que el crecimiento intracelular puede ayudar a la bacteria en su adaptación en las células fagocíticas (Abu-Kwaik *et al.* 1998). Además ha sido descrito por autores como Cirillo *et al.* 1994, que cuando *Legionella* se multiplica dentro de las amebas, activa genes implicados con la virulencia de la bacteria.

Existen muchas similitudes en el proceso por el cual *Legionella* infecta a los protozoos y los macrófagos. La replicación intracelular de *L. pneumophila* en las células de los mamíferos, ocurre dentro de fagosomas recubiertos de ribosomas que no se fusionan con los lisosomas pero que se unen al retículo endoplasmático rugoso (Abu-Kwaik *et al.* 1998). El crecimiento intracelular de *L. pneumophila* produce una modulación en la expresión génica en respuesta al ambiente intracelular dentro de los fagosomas. Entre otros, se producen cambios en la pared y las membranas que hacen a la bacteria más resistente a los biocidas, les permite una mayor velocidad de multiplicación e incrementa la capacidad infectiva en los macrófagos (Barker *et al.* 1992).

Introducción

Microscópicamente los procesos de internalización de *Legionella* en macrófagos y amebas son visiblemente idénticos, pero existen diferencias notables en el mecanismo de entrada y salida de la célula huésped. El método de internalización de bacterias ha sido descrito como “*coiling phagocytosis*” tanto en macrófagos como en amebas, aunque también hay estudios que han determinado que *L. pneumophila* entra a la célula huésped por fagocitosis convencional (Cirillo *et al.* 1999, Bozue *et al.* 1996, Horwitz, 1984). La importancia de la “*coiling phagocytosis*” sigue siendo poco clara y esta forma de internalización se ha observado por microscopía electrónica de transmisión.

Legionella pneumophila ha desarrollado diferentes mecanismos para invadir protozoos mediante diferentes receptores en función de la célula huésped. Por ejemplo, en un estudio realizado con *Hartmannella vermiformis*, se observó que las células de *Legionella* se unían por contacto a los filopodios de la ameba (King *et al.* 1991, Fields *et al.* 2002).

Una de las similitudes del mecanismo de fagocitosis y replicación intracelular de *L. pneumophila* en amebas y macrófagos es que está gobernado por el sistema de secreción Dot/Icm tipo IV (*defective for organelle trafficking/intracellular multiplication*) (Vogel *et al.* 1998). Este sistema de secreción de tipo IV sigue siendo el factor de virulencia mejor caracterizado de *L. pneumophila* y por eso ha sido objetivo de considerables esfuerzos de investigación. En los *loci* del Dot/Icm se cree que se encuentra codificado el aparato que secreta los factores de virulencia que aíslan de la vía endocítica la vacuola que contiene el patógeno (Marra *et al.* 1992, Berger *et al.* 1993, Molofsky *et al.* 2004).

6.2 Biofilms como reservorio de *Legionella*.

Los biofilms están formados por comunidades de microorganismos encapsulados dentro de una matriz adherida a una superficie viva o inerte como son las tuberías de agua. *Legionella* prolifera muy bien en este tipo de ambiente, muchos autores consideran que los microorganismos del biofilm dan soporte para el crecimiento y desarrollo de esta bacteria (Murga *et al.* 2001).

El biofilm puede estar compuesto por microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium spp.*, amebas como *Hartmannella vermiformis*, algas, virus y muchos otros microorganismos heterótrofos (Fields *et al.* 2002).

Pseudomonas es uno de los género más estudiados que se multiplica en biofilms y ambientes húmedos (Costerton *et al.* 1999, Stover *et al.* 2000). Puede encontrarse también en sistemas de agua sanitaria y de agua de bebida (Schoenen *et al.* 1999, Codony *et al.* 2002, Banning y Toze 2003).

Se ha encontrado la bacteria en agua destilada o colonizando suplementos farmacéuticos, desinfectantes y hasta jabones. Se han aislado bacterias de este género tanto en suelos limpios como en suelos contaminados por productos biogénicos y xenobióticos.

Las especies del género *Pseudomonas* son organismos ubicuos, bacterias gram negativas que se encuentran dentro del grupo γ de las proteobacterias. Algunos sintetizan sideróforos fluorescentes de color amarillo-verdoso de gran valor para su clasificación. Generalmente son móviles gracias a los flagelos polares que poseen, algunas especies sintetizan una cápsula de exopolisacáridos que facilita la adhesión celular, la formación de biofilms y la protege de la fagocitosis o de los anticuerpos aumentando así su patogenicidad.

Pseudomonas produce infecciones crónicas muy graves que comprometen al huésped (Singh *et al.* 2000). Algunas especies como *Pseudomonas aeruginosa*

Introducción

y *P. cepacia* son reconocidas como especies patógenas para humanos, es la bacteria más común en las infecciones humanas oportunistas y es resistente a la mayoría de los antibióticos.

Este género es uno de los que tiene más alta capacidad de degradación de compuestos orgánicos, especialmente las cepas de la especie *Pseudomonas putida* (Van der Kooij 1977, Huguet y Ribas, 1991). Las cepas del género *Pseudomonas* son capaces de procesar y reaccionar a una amplia variedad de condiciones en el medio ambiente y muestran una alta capacidad de reacción a señales fisicoquímicas y biológicas. En ambientes acuosos este microorganismo se adhiere fácilmente a superficies inertes de diferentes materiales formando biofilms que facilitan su multiplicación (World Health Organization, 2004). Se han descrito cepas capaces de adquirir resistencia a metales pesados, disolventes orgánicos y detergentes, lo cual les permite explotar una amplia gama de fuentes de carbono como nutrientes, así como colonizar ambientes y nichos que difícilmente son colonizables por otros microorganismos.

Otro organismo ubicuo en ambientes acuáticos es *Aeromonas*, que está muy relacionada con el biofilm y ha sido encontrada en un amplio rango de ambientes desde lagos oligotróficos hasta en agua contaminada (Araujo *et al.* 1990).

El género *Aeromonas* está constituido por bacterias gram negativas aisladas frecuentemente de agua. La taxonomía de *Aeromonas* es compleja, el género consta de 15 especies difíciles de identificar con métodos bioquímicos. La correcta delimitación e identificación de las especies que integran el complejo fenotípico *A. hydrophila* (*A. hydrohila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. popoffii*) constituye uno de los problemas en la taxonomía del género.

Araujo *et al.* 1989, encontraron una correlación significativa entre el contenido de materia orgánica y la presencia de *Aeromonas*. Su crecimiento y multiplicación se ha visto directamente relacionado con la temperatura, y nutrientes como fosfatos y el carbono orgánico. Estos autores también

encontraron una correlación con organismos indicadores de contaminación fecal, en hábitats donde la materia orgánica provenía de origen fecal (Araujo *et al.* 1989). En algunos países como Holanda, se ha adoptado este género como un potencial indicador de contaminación de aguas (Ribas *et al.* 1999).

Aeromonas junto con otros microorganismos forma parte de la microbiota típica de biofilms, que pueden dar soporte para el crecimiento y desarrollo de *Legionella* (Wadowsky *et al.* 1988).

7 PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DETERMINANTES DEL HÁBITAT DE *LEGIONELLA*

7.1 Relación de la temperatura con la multiplicación de *Legionella*.

Legionella coloniza preferentemente sistemas de agua caliente y se multiplica generalmente en un rango de temperaturas entre 20°C y 40°C, a estas temperaturas las bacterias acompañantes se multiplican aceleradamente, sobre todo en los primeros días de incubación. A temperaturas entre 42°C y 45°C a las que *Legionella* no se multiplica, tampoco se observa crecimiento de las bacterias acompañantes.

Han sido descritos trabajos en los que *Legionella* ha logrado multiplicarse a 45°C en cultivos con Cyanobacterias bajo condiciones de iluminación y también se ha encontrado que se mantiene viable en asociación a microbiota acompañante por debajo de los 5°C (Tison *et al.* 1980, Wadowsky y Yee 1982, Leoni *et al.* 2004).

En el ambiente natural no están claros los parámetros físicoquímicos en los cuales se multiplica *Legionella* (Wadowsky *et al.* 1985). Sin embargo se ha

encontrado la bacteria en lagos con rangos que van de los 5,7°C a los 63°C (Fliermans *et al.* 1981).

Rogers y colaboradores estudiaron la supervivencia de *Legionella* en un circuito modelo de tuberías y encontraron que la bacteria sobrevivía entre 20-50°C pero que no se recuperaba a 60°C, se ha descrito esta temperatura como la adecuada para la eliminación de *Legionella* de los sistemas hídricos (Rogers *et al.* 1994).

7.2 Relación de pH con la multiplicación de *Legionella*.

El pH favorece la multiplicación de *Legionella* en muestras ambientales en asociación a otras bacterias cuando está entre 5,5 y 9,2. Sin embargo en muestras obtenidas de sistemas de tuberías de agua caliente se recuperó *Legionella* con un pH máximo de 7,6. En el laboratorio se ha comprobado que crecen en medio artificial con un pH de 6,5 y 7,5. (Fliermans *et al.* 1981).

En valores extremos de pH de 5,5 y 10,5 se ha observado el crecimiento de las bacterias acompañantes y no así de *Legionella*. Sin embargo *Legionella* también se ha logrado multiplicar a pH 5,5 en ausencia de bacterias acompañantes.

La multiplicación de *Legionella* en este amplio rango de pH puede ser el reflejo de los variados hábitats naturales de los ambientes acuáticos y de las distintas cepas de *Legionella* (Wadowsky *et al.* 1982).

7.3 Metales (Fe, Cu, Zn) y Carbono Orgánico Total (COT) en relación a la multiplicación de *Legionella*.

Los requerimientos del agua caliente para favorecer el crecimiento de *Legionella* son el carbón orgánico y los aminoácidos producidos por las bacterias heterótrofas que comparten el hábitat con *Legionella*. Otras investigaciones (Leoni *et al.* 2004, Borella *et al.* 2005) estudian la influencia de

elementos como el Hierro, el Cobre, el Zinc y el Magnesio en el crecimiento y multiplicación de esta bacteria.

Algunos autores (Rogers *et al.* 1994, Stout *et al.* 1998, Kustnetsov *et al.* 2001, Leoni *et al.* 2004) estudiaron estos parámetros fisicoquímicos y observaron que el pH afectaba en la solubilización del Cu el cual tenía un papel inhibitorio en el crecimiento de *Legionella* y mientras que el Carbono Orgánico Total (COT) tendía a favorecer el crecimiento de la bacteria. Sin embargo no se encontraron correlaciones claras entre elementos como el Zinc, Hierro y Magnesio con *Legionella* (Vickers *et al.* 1987, Stout *et al.* 1998, Marrie *et al.* 1994, States *et al.* 1997). Algunos autores encontraron correlaciones inversas entre *Legionella* con Cu, Mg y Ca, es decir que a niveles bajos de estos metales encontraron presencia de *Legionella*. Al igual que a niveles elevados de Zn, Fe y Mn no encontraron *Legionella*, mientras que obtuvieron correlaciones significativas con el Carbono Orgánico Total.

También explican que el pH del agua tiende a corroer las tuberías con concentraciones altas Zn, lo que podría ser un factor importante para la formación de biofilm en los sistemas de agua potable (Leoni *et al.* 2004, Borella *et al.* 2005).

8 INSTALACIONES DE RIESGO

Los sistemas hídricos de más riesgo, por el número de brotes que originan, son las torres de refrigeración de grandes edificios y el agua sanitaria caliente.

La multiplicación de una biota microbiana abundante en estas instalaciones, podría servir de soporte y permitir la supervivencia de *Legionella* en este tipo de sistemas, lo que puede verse favorecido por múltiples factores entre los que destacan, la variación en la concentración de biocida, la presencia de agua estancada, depósitos de materia orgánica o de trazas de metales.

Ambas instalaciones tienen en común que son un reservorio acuático, que pueden presentar biofilm favorable para la multiplicación de *Legionella*. Además, permiten la producción de aerosoles, la dispersión aérea de éstos y la consiguiente inhalación de la bacteria por personas susceptibles a la infección.

8.1 Agua sanitaria caliente como instalación de riesgo.

Legionella penetra en los sistemas hídricos artificiales y sobrevive en los biofilms que se producen en las tuberías de forma libre o parasitando protozoos (Perez-luz, 2002). En el primer brote descrito en Francia la contaminación procedía de conductos de agua caliente, se reveló que la presencia de la bacteria estaba muy generalizada en algunas habitaciones de hoteles y hospitales y la transmisión se debía a la inhalación de aerosoles cargados de partículas infecciosas (climatización, duchas, bañeras) y a la antigüedad del sistema de agua del edificio (Fleurette, 1979). Posiblemente la primera epidemia de legionelosis descrita en Filadelfia también fue debida a estas causas.

Muchos casos de epidemias por *Legionella* se han producido por la exposición al agua sanitaria caliente de hoteles (Joseph *et al.* 1996, Benin *et al.* 2002, Fields *et al.* 2002) donde el riesgo se incrementa por el uso intermitente del agua y su consecuente estancamiento que produce la formación de biofilm. Esta colonización depende muchas veces de la complejidad de la instalación de agua del hotel, que pueden presentar un sistema hídrico centralizado o independiente y el calentamiento del agua puede ser por gas o eléctrico. Depende también de factores como de la antigüedad de la instalación del sistema, de la capacidad del calentador, de la distancia desde el calentador a los puntos de salida y si la instalación presenta o no un sistema de retorno (Leoni *et al.* 2004).

Se han descrito resultados en los que en un mismo hotel se ha encontrado *Legionella* con concentraciones variables de más de 1 log en todas las muestras tomadas a diferentes distancias del calentador,

Algunos autores (Borella *et al.* 2005, Leoni *et al.* 2004), han encontrado una alta colonización de *Legionella* comparando diferentes tipos de edificios, sobre todo en el agua caliente de hospitales seguido muy de cerca por hoteles y departamentos privados con sistemas centralizados de agua caliente. El riesgo más bajo de colonización por *Legionella* fue encontrado en sistemas de agua independiente (Borella *et al.* 2005).

Los niveles elevados de *Legionella*, en sistemas centralizados, puede ser debido al estancamiento del agua en los tanques de acumulación, lo que produciría la formación de biofilm, en consecuencia la recirculación del agua tendería a promover una contaminación en todo el sistema. En los hoteles, el estancamiento se ve facilitado por el uso intermitente del agua caliente y también por la mayor complejidad de los sistemas, que a menudo han sufrido una reestructuración que a veces resulta en el cierre de algunas tuberías, creando de esta manera puntos muertos que permiten el estancamiento del agua y la formación de biofilms (Vickers *et al.* 1987, Sabria *et al.* 2001, Legnani *et al.* 2002, Ranieri *et al.* 2002, Borella *et al.* 2003).

8.2 Torres de refrigeración como instalación de riesgo

Muchos brotes epidémicos de legionelosis en Europa y Estados Unidos han sido relacionados con torres de refrigeración de hoteles y hospitales. Lo que permite la supervivencia y multiplicación de una microbiota abundante que puede contener *Legionella* es el agua estancada con depósitos de materias orgánicas y trazas de metales al fondo del depósito cuba de las torres.

El funcionamiento de una torre de refrigeración es muy sencillo; el agua caliente llega a la parte superior de la torre, es dispersada en pequeñas gotitas en forma de lluvia que pasan a través de un enrejado y caen al fondo de la cuba, enfriándose al chocar con el enrejado, esto es ayudado por el paso del aire impulsado por un ventilador, una vez establecido el contacto entre el agua y el aire, tiene lugar una transferencia de calor del agua hacia el aire. Ésta se

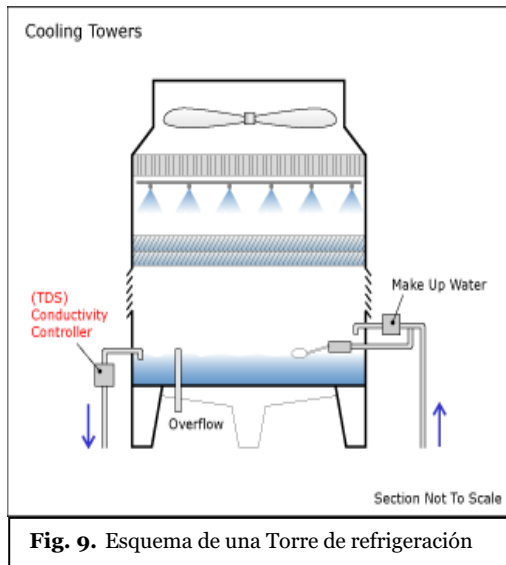


Fig. 9. Esquema de una Torre de refrigeración

produce debido a dos mecanismos: la transmisión de calor por convección y la transferencia de vapor desde el agua al aire, con el consiguiente enfriamiento del agua debido a la evaporación. En la transmisión de calor por convección, se produce un flujo de calor en dirección al aire que rodea el agua a causa de la diferencia de temperaturas entre ambos fluidos.

En el fondo de la cuba se forma un sedimento mineral y orgánico donde los organismos pueden desarrollarse. A pesar del dispositivo especial de antibruma, los aerosoles conteniendo *Legionella* pueden ser liberados al exterior y la torre se convierte en un foco de transmisión de la enfermedad (Fleurette *et al.* 1979) (figura 9).

Parrilla Valero *et al.* 2007 y Türetgen *et al.* 2007 estudiaron la relación de *Legionella* con los parámetros fisicoquímicos en torres de refrigeración y aseguran que la circulación, la evaporación a temperaturas relativamente altas y el pH facilitan la adhesión microbiana, y que la temperatura y la turbidez hacen favorables las condiciones para la multiplicación de *Legionella*. Así mismo, encontraron una asociación estadísticamente significativa entre los valores del cloro y la turbidez con la presencia de *Legionella* y afirman que variables como la temperatura, conductividad, turbidez y cloro se comportan como factores de riesgo de crecimiento de *Legionella* en este tipo de instalación.

9 NORMATIVAS DE PREVENCIÓN

El conocimiento del origen de las epidemias de legionelosis es lo que permite establecer una normativa de prevención.

Los países miembros de la CEN/CENELEC (*European Committee for standardization*) han implementado la normativa europea ISO 11731 para la detección y cuantificación de *Legionella*, entre estos países se encuentran: España, Austria, Bélgica, Bulgaria, Grecia, República Checa, Dinamarca, Estonia, Finlandia , Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Islandia, Irlanda, Italia, Letonia, Lituania, Luxemburgo, Malta, Holanda, Noruega, Polonia, Portugal, Rumania, Eslovaquia, Eslovenia, Suecia, Suiza y Reino Unido.

Otros países como Nueva Zelanda y Australia han desarrollado su propia normativa, la *Australian/New Zealand Standard (AS/NZS 3896:1998 Waters—Examination for legionellae including Legionella pneumophila)*, para la detección de *Legionella* en agua durante brotes epidémicos y para monitorizar la eficacia de las medidas adoptadas para prevenir la proliferación de la bacteria en el agua.

En Estados Unidos cabe señalar la guía del año 2000 “*Minimizing the risk of Legionellosis associated with Building System*” de la *American Society of Heating, Refrigerating and Air Conditioning Engineers (ASHRAE)*.

En el caso de España la norma que rige en todo el estado Español se publicó en el 2001, Real Decreto 909/2001, y se modificó en el año 2003 con el Real Decreto 865/2003, por el que se establecen los criterios higiénico sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. Esta normativa obliga a los titulares de las instalaciones de riesgo, en las que se incluyen las torres de refrigeración y los sistemas de agua sanitaria, a declarar el sistema, mantener la limpieza y la desinfección adecuada, y controlar regularmente los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos. Los parámetros microbiológicos incluyen el análisis de los aerobios totales mensualmente y de *Legionella* trimestralmente.

Sin embargo, en Cataluña, previamente a esta norma se había editado la *Guia per al control i prevenció de la legionel·losis a Catalunya* (Informe UNE 100030), la Guía apuesta claramente por la prevención primaria en los centros hospitalarios y socio-sanitarios, mientras que el Real Decreto no se pronuncia al respecto (*Guia per al control i prevenció de la legionel·losis a Catalunya*, 2001).

Muchas comunidades autónomas del estado Español tienen establecidas normativas propias, en concreto en Cataluña está vigente el *Decret de la Generalitat de Catalunya*, Decreto 352/2004 del 27 de Julio del 2004, a raíz del brote de la Barceloneta, que establece *Les condicions higienico-sanitàries per a la prevenció i el control de la legionel·losi*. Así también la Orden 1187/1998 de la Consejería de la Comunidad de Madrid, a raíz del brote de Alcalá de Henares, regula las condiciones higiénicas sanitarias que deben reunir los aparatos de transferencia de aire y humidificadores (Decret 417/2000, Orden 1187/1998).

Las recomendaciones de la Generalitat de Catalunya (1998) o del Ministerio de Sanidad (1999) son claros ejemplos de la preocupación de las autoridades sanitarias sobre este tema. Del mismo modo, algunos hospitales tienen implementado su propio sistema de prevención, cabe destacar al Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona.

(<http://www.gencat.cat/ics/germanstrias/cat/salut.htm>).

9.1 Decretos y Ordenanzas

9.1.1 BOE- Real decreto 865/2003. Por el cual se establecen los criterios higiénicos sanitarios para la prevención y control de la legionelosis.

Este decreto determina acciones para torres de refrigeración y dispositivos análogos en función de los análisis microbiológicos de *Legionella*.

El recuento de *Legionella* según el número detectado debe seguir ciertas acciones:

En recuentos entre >100 <1000 ufc/L: Se revisará el programa de mantenimiento y realizarán las correcciones oportunas y el remuestreo a los 15 días. Recuentos >1000 <10000 ufc/L: Se revisará el programa de mantenimiento a fin de establecer acciones correctoras que disminuyan la concentración de *Legionella*. Se debe realizar la limpieza y desinfección del sistema y se confirmará el recuento a los 15 días, si la muestra es menor a 100 ufc/L se debe tomar una nueva muestra al cabo de un mes, si el resultado es menor a 100 ufc/L se continuará con el mantenimiento previsto. Si una de las 2 muestras anteriores dan valores >100 ufc/L se debe revisar el programa de mantenimiento e introducir las reformas estructurales necesarias. Si supera las 1000 ufc/L se debe proceder a realizar una limpieza y desinfección y se debe realizar una nueva toma de muestra a los 15 días. Si fuera >1000 ufc/L se debe parar el funcionamiento de la instalación y vaciar el sistema. Se debe limpiar y realizar un tratamiento de choque antes de reiniciar el servicio y se deberá realizar una nueva toma de muestras a los 15 días.

9.1.2 Diario Oficial de la Generalitat de Catalunya (DOGC) DECRET 352- 2004. Por el cual se establecen los criterios higiénicos sanitarios para la prevención y control de la legionelosis.

Las modificaciones en las normativas van orientadas esencialmente a incrementar las medidas preventivas de prevención y de control de las instalaciones que llevan asociado un riesgo más elevado de provocar un brote de legionelosis. Estas se establecen con el fin de verificar la eficacia de las medidas de autocontrol a que están sujetas estas instalaciones, la frecuencia de muestreos para torres de refrigeración y los condensadores evaporativos y si se constata que las condiciones no son las deseables se exigen las actuaciones preventivas que los titulares están obligados a llevar a término. Si es necesario, se incrementa la periodicidad de la revisión obligatoria de las torres de refrigeración y los condensadores evaporativos. Otros aspectos son la

introducción de una mayor regulación de los requisitos de autorización de las entidades y servicios de revisión periódica para garantizar la competencia técnica y la revisión de los contenidos del programa del curso de formación del personal encargado de las instalaciones de riesgo ante *Legionella*.

Este decreto considera las instalaciones de alto riesgo las siguientes:

- Instalaciones que afecten el ambiente exterior (torres de refrigeración y condensadores evaporativos).
- Instalaciones que afecten al interior de edificios: centrales humidificadoras industriales que generen aerosoles.
- Sistemas de agua caliente sanitaria con acumuladores y sistemas de retorno.

9.1.3 Otras Normativas, Decretos y Ordenanzas de uso.

- **Real Decreto 2210/95, de 28 de diciembre**, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (BOE N° 21; p 2153)
- **Ordenanza Municipal de Actividades y de intervenciones integrales de la administración ambiental de Barcelona.**
Aprobada definitivamente el 29 de marzo de 2001 (BOP N° 113; 11-05-2001; p. 44)
- **Ordenanza General del Medio Ambiente Urbano.**
Aprobada definitivamente el 26 de marzo de 1999. (BOP N° 143, Annex I; 16-06-1999; p. 3)
- **Norma UNE 100-030-94.**
Recomendaciones para el diseño y mantenimiento de las instalaciones: de agua sanitaria (fría y caliente), aparatos de transferencia de masas de agua en corrientes de aire (torres de refrigeración y condensadores evaporativos), conductos para el transporte de aire, unidades de tratamiento de aire, unidades terminales, aparatos para el tratamiento de agua o conductos y piscinas de agua atemperada.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Caracterizar las aguas de instalaciones de riesgo de transmisión de legionelosis, con el fin de relacionar los factores bióticos y abióticos con la presencia de *Legionella* en estos sistemas.

1.1 Implementar métodos para el análisis y cuantificación de *Legionella* en muestras ambientales.

1.2 Determinar la presencia de *Legionella* en un edificio contaminado, identificando los puntos de muestreo representativos y aplicando el método de cultivo y la técnica de PCR semianidada.

1.3 Analizar agua sanitaria caliente y torres de refrigeración para determinar la presencia de *Legionella* y su relación con bacterias, protozoos y parámetros fisicoquímicos.

1.4 Estudiar los factores de riesgo que favorecen la colonización de *Legionella* en los sistemas sanitarios de agua caliente y torres de refrigeración.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1 MUESTRAS ANALIZADAS

Se analizaron diferentes tipos de muestras de instalaciones consideradas como instalaciones de riesgo para la transmisión de *Legionella*, agua sanitaria caliente y torres de refrigeración.

1.1 Toma de muestras de agua sanitaria caliente.



Se realizó el muestreo de sistemas con recirculación de agua caliente y acumuladores, de hoteles y residencias geriátricas. Se tomaron muestras de 2 litros de agua de las duchas y grifos de estos edificios, en botellas de plástico de 1L con tiosulfato de sodio al 2%, al mismo tiempo se midió la temperatura, el cloro y se separaron muestras para el análisis de los fisicoquímicos, COT y metales. Se transportaron en neveras portátiles y se analizaron en el lapso de 4 a 6 horas desde la recogida.

1.2 Toma de muestras de agua de torres de refrigeración.



La toma de muestras se realizó en un edificio público de la ciudad de Barcelona. Se realizó el muestreo de 3 torres de refrigeración mensualmente durante el estudio. Se recogieron 2L de muestra de los acumuladores de agua de estas torres y al mismo tiempo se midió la temperatura, el cloro y el pH. El muestreo se realizó con botellas previamente autoclavadas y la neutralización del cloro se realizó con tiosulfato de sodio al 2%.

2 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS MUESTRAS

A las muestras se les realizaron recuentos microbiológicos de *Legionella*, heterótrofos, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y protozoos.

2.1 Legionella.

El análisis de *Legionella* se realizó según el método ISO 11371-1998, utilizando los medios de cultivo CYE Agar Base (Oxoid, UK), con el suplemento de crecimiento *Legionella* BCYE (*Growth Supplement BCYE*, Oxoid, UK), o con el suplemento de crecimiento BCYE sin cisteína y antibióticos GVPC (Oxoid, UK) (anexos 1.1, 1.2, 1.3, 1.4). Estas placas de cultivo se incubaron a 37°C durante 7 a 10 días.

2.2 Heterótrofos.

Para el recuento en placa de aerobios nos basamos en la normativa ISO 6222 de 1999, “Water quality- Enumeration of culturable micro-organism-Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium”. Se utilizó el medio de cultivo *Plate Count Modified Agar* (Sharlab, España) (anexo 1.5 de materiales y métodos). Se realizaron dos diluciones y dos replicas 10^{-1} y 10^{-2} ufc/ml para cada muestra, las diluciones se sembraron a dos temperaturas: 20 ± 2 °C durante 72 horas y 37°C durante 48 horas.

2.3 Pseudomonas y Aeromonas.

Para el aislamiento de *Pseudomonas* y *Aeromonas* se utilizó el concentrado de la muestra, realizado con el protocolo de *Legionella* (ISO 11731), se utilizó 1ml del concentrado y se centrifugó durante 5 minutos a 14000 rpm, se resuspendió el pelet en 100µl y se sembró en el agar de medio sólido semiselectivo y diferencial *Glutamate Starch Pseudomonas* (Sharlab, España) (anexo 1.6). En el caso de *Pseudomonas* se añadió 100 mg/ml de penicilina al medio de cultivo y en el caso de *Aeromonas* 100 mg/ml de penicilina y 2mg/ml de ampicilina. Las placas en los dos casos se cultivaron a 30°C durante 48 horas.

2.4 Protozoos.

Para el cultivo de protozoos se utilizó un caldo de cultivo de trigo (anexo 1.7). Se utilizaron 5 ml de la muestra y se inocularon con 0,5 ml del caldo de trigo, se agitó y se guardó a temperatura ambiente y oscuridad durante 5 días, luego se observó al microscopio. También se realizaron observaciones al microscopio de la muestra concentrada y de la muestra sin concentrar antes de cultivar. (Muestra cultivada, Muestra directa sin cultivar).

3 ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS

Se realizaron diferentes análisis fisicoquímicos dependiendo de la calidad y tipo de agua con la que se trabajó, se realizó un análisis de los siguientes parámetros.

3.1 Temperatura.

Se realizaron las mediciones de temperatura con termómetro de mercurio, en el momento de la recogida de muestras.

3.2 Turbidez.

Se realizó la medición de la turbidez de 5 ml de la muestra, con un turbidímetro Ratio/xr (*Hach Lange France S.A.S, Francia*).

3.3 pH.

Se realizó la medición del pH con un pH-metro Micro pH 2000 (*Crison Instruments S.A, España*).

3.4 Carbono orgánico Total (COT).

Se analizaron 10 ml de muestra acidulada con HCL hasta un pH de 2-3, en frascos de vidrio previamente muflados a 350°C durante 3 horas y se analizaron con el método “*High Temperature Catalytic Oxidation*” (HTCO), este método tiene un límite de detección de 1 ppm. Este análisis se realizó en los Servicios Científico Técnicos de la Universidad de Barcelona.

3.5 Metales (Fe, Cu, Zn).

Los metales se analizaron en los Servicios Científico Técnicos de la Universidad de Barcelona, con el método “*Inductively coupled argon plasma spectroscopy*”, en un volumen de 10ml de muestra que previamente fue acidulada con HNO₃ hasta un pH2-3. Se analizaron los siguientes metales: Zn (Límite detección: 0,025ppm), Fe (Límite detección: 0,01ppm) y Cu (Límite detección: 0,01ppm).

4 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE *LEGIONELLA*

En nuestro estudio para el análisis y aislamiento de *Legionella* usamos la técnica basada en ISO 11731-1998 “*Water quality-Detection and enumeration of Legionella*”.

4.1 Método basado en ISO 11731:1998 “Detection and enumeration of *Legionella*”.

Esta normativa estándar se basa en el aislamiento por cultivo de la bacteria aplicando antibióticos y pretratamientos térmicos y ácidos a las muestras, para así reducir el crecimiento de otros microorganismos acompañantes. Según este protocolo cuando el número de *Legionella* en las muestras supera el 10^5 por litro puede sembrarse directamente, sin embargo como el número de *Legionella* en una muestra es desconocido es aconsejable realizar un método de concentración a través de filtración de membrana o de centrifugación.

En el método de filtración de membrana se utilizaron membranas de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ filtrando 1 Litro de la muestra y resuspendiendo la membrana en 10ml de un diluyente.

A estos concentrados se les realizaron 3 tipos de tratamientos:

- ❖ **SIEMBRA DIRECTA NO TRATADA:** Se siembran 0,5ml por duplicado de la muestra concentrada en placas de BCYE.
- ❖ **TRATAMIENTO TÉRMICO:** Se realiza un tratamiento a 50°C durante 30 min. a 1 ml de la muestra concentrada por duplicado y se siembra en placas de BCYE.
- ❖ **TRATAMIENTO ÁCIDO:** A 900 μl de la muestra concentrada se le añaden 100 μl del buffer ácido (anexo 2.2 de materiales y métodos), se deja a temperatura ambiente durante 5 minutos y se siembra por duplicado en placas de BCYE.

Las colonias que crecieron en estos medios con una morfología determinada se identificaron presuntivamente como *Legionella*, la confirmación se realizó subcultivando estas colonias en agar BCYE con cisteína y BCYE sin cisteína. *Legionella* solo crece en agar BCYE con cisteína.

A continuación se identificaron las colonias obtenidas con un test de serología por aglutinación que permite la identificación de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 y de los serogrupos 2-14, así como de otras 7 especies de *Legionella* (anexo 2.1 de materiales y métodos).

4.2 Método basado en ISO 11731-2:2004 “Water quality- Detection and enumeration of *Legionella*-Part 2 Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts”.

Este método está diseñado para recuperar *Legionella* a partir de muestras de agua, con bajas concentraciones de bacterias. Las muestras se concentran a través de la técnica de filtración por membrana, filtrando 1 litro de la muestra en membranas de nylon. Para reducir el número de microorganismos acompañantes, se someten las muestras a un tratamiento con un tampón ácido que se echa directamente en el embudo de filtración sobre la membrana durante 5 minutos, se elimina el buffer, se lava la membrana con 20 ±5 ml de la solución de Page y se coloca sobre una placa de agar BCYE con cisteína. A continuación la membrana se incuba a 36±2°C durante 10 días. Las colonias obtenidas en BCYE se confirman en BCYE sin cisteína incubando a 36±2°C durante 10 días. Los resultados se expresan en UFC de *Legionella spp.* en el volumen examinado y la ausencia de *Legionella* como “no detectada” en el volumen examinado.

5 CEPAS DE REFERENCIA Y AMBIENTALES

Las cepas de referencia utilizadas en este estudio provienen de la colección de cultivos tipo alemana DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganism und Zellkulturen*). Clasificadas dentro del Grupo 2 de riesgo microbiológico (clasificación alemana).

5.1 *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* str. Philadelphia 1 ATCC 33152.

Este serogrupo es el agente reconocido como el de mayor patogenicidad y el que causa mayores infecciones respiratorias en personas inmunodeprimidas.

5.2 *Legionella longbeachae* DSM 10572 ATCC 33462.

Esta cepa contiene dos serogrupos causantes de neumonía en humanos, fueron aislados de tejido de pulmón de pacientes fallecidos y de aspiraciones transtraqueales. La cadena tipo es ATCC33462 (CDC strain Long Beach 4) que fue aislada inicialmente de aspirado traqueal en 1980.

5.3 *Legionella* serogrupo 2-14.

Esta fue aislada de sistemas de agua sanitaria caliente (cod. 78385), que tenía una carga microbiana de $5,00 \times 10^2$ ufc/L, por serología comprobamos que pertenecía al serogrupo 2-14 de *Legionella*.

6 DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS POR PCR

6.1 Preparación del ADN bacteriano.

Se realizó la extracción del ADN de los concentrados de cada muestra según el protocolo descrito por Van Eys *et al.* 1989, que se basa en la lisis térmica de 1ml a 100°C durante 10 minutos, seguida de un choque térmico a -20°C durante 10 minutos y de una centrifugación a 14000 rpm durante 5 minutos, finalmente se recuperó 1ml del sobrenadante.

6.2 Extracción de ADN de muestras con inhibidores de PCR.

Para eliminar inhibidores de PCR se aplicaron distintos métodos para la extracción del ADN en función del tipo de muestra. Se utilizaron los siguientes métodos: *Qiamp DNA Mini Kit (Blood body fluid*, Qiagen, UK), Resina comercial *Molecular Biology Grade AG 501-X8* (Bio-Rad, UK), *Chelex 100 Bath Method* (Bio-rad, UK).

6.2.1 Qiamp DNA Mini Kit (Blood body fluid) (Qiagen)

- ❖ Se mezcla 200ml de muestra con 200µL del buffer AL, se agita durante 15 segundos.
- ❖ Se añade 20µL de proteinasa a la mezcla.
- ❖ Se incuba a 56°C durante 10 minutos para activar la proteinasa.
- ❖ Se realiza un pulso de centrifuga de 15 segundos para agitar la mezcla.
- ❖ Se agrega 200µL de etanol al 96%.
- ❖ Se agita con pulsos de 15 segundos durante 1 minuto.
- ❖ Se pasa la solución por una de las columnas de extracción del Kit.
- ❖ Se centrifuga la columna durante 1 minuto a 800rpm.
- ❖ Se cambia el colector de la columna y se agregan 500µL de buffer AW1.
- ❖ Se centrifuga nuevamente la columna durante 1 minuto a 800rpm.

- ❖ Se cambia nuevamente el colector de la columna y se agregan 500µL buffer AW2.
- ❖ Se centrifuga la columna durante 3 minutos a 14000 rpm.
- ❖ Se elimina el colector lleno y coloca la columna en un tubo eppendorf, se agregan 200µL del Buffer AE.
- ❖ Se dejan durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- ❖ Se centrifuga 1 minuto a 8000 rpm.
- ❖ Los 200µL obtenidos es el ADN de la muestra analizada.

6.2.2 Resina comercial Molecular Biology Grade ref: AG 501-X8 (Bio-Rad)

- ❖ Se utilizan 50µL de la muestra previamente concentrada.
- ❖ Se añaden 100µL del tampón de extracción BE.
- ❖ Se homogeniza durante 60 segundos con vortex.
- ❖ Se deja reposar 15 minutos a temperatura ambiente.
- ❖ Se realiza un choque térmico a 100 °C durante 10 minutos y luego a -20°C durante 2 minutos.
- ❖ Se agregan 0,015 gr de resina (AG 501-X8).
- ❖ Se agita con vortex durante 30 segundos.
- ❖ Se centrifuga durante 10 minutos a 13500 rpm.

Finalmente se recupera el sobrenadante que es el ADN de la muestra.

6.2.3 Chelex 100 (Bath Method) (Bio-Rad)

- ❖ Se agregan 5 gramos de resina por cada 100ml de muestra.
- ❖ Se agita durante 1 hora a temperatura ambiente.
- ❖ Se filtra o deja decantar la resina a temperatura ambiente.

El sobrenadante obtenido es el ADN de la muestra.

6.3 Descripción de la PCR de *Legionella*.

La PCR siguiente es un protocolo descrito por Jonas *et al.* 1995. Se usan dos cebadores que amplifican un fragmento del gen 16S ARNr del género *Legionella*.

- JFP Forward en la posición 451 a 470.
- JRP Reverse en la posición 836 a 817.

El fragmento amplificado es de **386pb**.

La especificidad de esta técnica fue descrita por Jonas *et al.* 1995 y se observa a continuación en la tabla (tabla 6.3.1).

Tabla 6.3.1 Especificidad de la técnica de PCR del 16S ARNr diseñada por Jonas *et al.* 1995

Serogrupo	Cepa^a	Detección PCR
<i>L. pneumophila</i> (1)	ATCC 33152 1 1 1	+
<i>L. pneumophila</i> (6)	Mz	+
<i>L. pneumophila</i> (7)	ATCC 33823 Chicago-8	+
<i>L. pneumophila</i> (8)	ATCC 35096 Concord-3	+
<i>L. pneumophila</i> (9)	ATCC 33289	+
<i>L. pneumophila</i> (10)	ATCC 43283 Leiden-1	+
<i>L. pneumophila</i> (11)	ATCC 43130 797/PA/H	+
<i>L. pneumophila</i> (12)	ATCC 43290 570-CO-H	+
<i>L. pneumophila</i> (13)	RIVM 82-A-3105	+
<i>L. pneumophila</i> (14)	ATCC 43703 1169-MN-H	+
<i>L. bozemanii</i> (1)	ATCC 33217	+
<i>L. bozemanii</i> (2)	ATCC 35545	+
<i>L. micdadei</i>	ATCC 33218	+
<i>L. longbeachae</i> (1)	ATCC 33462	+
<i>L. longbeachae</i> (2)	ATCC 33484	+
<i>L. feeleii</i> (2)	ATCC 35849	+
<i>P. acidovorum</i>	Mz	-
<i>P. aeruginosa</i>	Mz	-
<i>P. putida</i>	Mz	-
<i>P. cepacia</i>	Mz	-
<i>E. coli</i>	Mz	-
Human T cells	Mz	-

^a ATCC, American Type Culture Collection; RIVM, Rijkinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene; Mz, Institute for Medical Microbiology Mainz.

Se buscó mejorar la sensibilidad de la PCR por lo que se diseñó un cebador interno dentro del fragmento amplificado con los cebadores diseñados por Jonas *et al.* 1995, y se realizó una segunda amplificación mediante una PCR semianidada. El cebador diseñado fue llamado ASR Reverse y se encuentra en la posición 655 a 635.

El fragmento amplificado fue de **234pb**.

Tabla 6.3.2 Cebadores usados en la PCR directa (D) y en la PCR semianidada (SN), orientación de los cebadores, posición, secuencia y tamaño del amplicón

Cebador	Reacción de PCR ^a	Orientación	Posición	Secuencia	Amplicón
JRP	D	Rev.	836 - 817	5'-CCAACAGCTAGTTGACATCG-3'	386pb.
JFP	D, SN	Fwd.	451- 470	5'-AGGGTTGATAGGTTAAGAGC-3'	
ASR	SN	Rev.	655 - 635	5'-TTCCACTACCCTCTCCATA-3'	234pb

^a **D:** PCR directa, **SN:** PCR semianidada

En la primera PCR se añadieron 10µl de la extracción de ADN a la mezcla de reacción de la PCR. En la tabla 6.3.3 se indican los componentes y el volumen utilizado para conseguir 40µl de la mezcla. El volumen final de la reacción fue de 50µl.

Los reactivos utilizados para esta PCR se pueden observar en el anexo 2.5 de materiales y métodos.

Materiales y Métodos

Los componentes de la mezcla de reacción son:

Tabla 6.3.3 Volúmenes necesarios de los componentes de la reacción de PCR de acuerdo a sus concentraciones iniciales y las concentraciones finales esperadas, para 10 μ l de muestra.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μ L)
Agua doble desmineralizada			16.6
Tampón (500mM KCL, 100mM Tris HCl pH 8,8)	10X	1X	5
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	25 mM	1,5 mM	3
Mezcla dNTPs	2 mM	0,2 mM	5
Cebador JFP	10 μ M	1 μ M	5
Cebador JRP	10 μ M	1 μ M	5
Cebador ASR	10 μ M	1 μ M	5
Taq polimerasa	5 U/ μ L	2 U/ μ L	0,40
Muestra			10
Volumen total			50

La amplificación de ADN en la **PCR directa** se realiza en un termociclador con los siguientes ciclos:

❖ Desnaturalización inicial 95°C 5 minutos

40 ciclos de:

Desnaturalización 94° 1 minuto

Hibridación 57°C 1 minuto y 30 segundos

Extensión 72°C 1 minuto

❖ Extensión final 72°C 10 minutos

❖ Mantener amplicones a 4°C

La amplificación de la **PCR semianidada** tiene los siguientes ciclos:

❖ Desnaturalización inicial 95°C 5 minutos

35 ciclos de:

Desnaturalización 94° 1 minuto

Hibridación 57°C	1 minuto y 30 segundos
Extensión 72°C	1 minuto

❖ Extensión final 72°C 10 minutos

❖ Se pueden mantener los amplicones a 4°C.

6.4 Descripción de la PCR de protozoos.

También se realizó una **PCR para detectar el ADN de protozoos** diseñado por Thomas *et al.* 2006, el fragmento utilizado corresponde al 18S ARNr de eucariotas. La PCR diseñada por estos autores tiene 2 cebadores *Forwards* y uno *Revers*, como se observa en la tabla 6,4.1.

Se cambiaron los dos cebadores *Forwards* por un cebador *Forward* degenerado (Ami6 DEG), para evitar competencia entre cebadores y mejorar la amplificación de la PCR, como se observa en la tabla 6.4.1, donde **K** corresponde a los nucleótidos **T-G** y donde **Y** corresponde a los nucleótidos **C-T**. Los cebadores descritos fueron:

Tabla 6.4.1 Cebadores usados en la PCR de protozoos, orientación de los cebadores, secuencia y tamaño del amplicón

Cebador	Orientación	Secuencia	Amplicón
Ami 6 F1	Fwd.	5'-CCAGCTCCAATAGCGTATATT-3'	
Ami 6 F2	Fwd.	5'-CCAGCTCCAAGAGTGTATATT-3'	
Ami6DEG	Fwd.	5'-CCAGCTCCA K AG Y GTATATT-3'	618pb. <i>H. vermiformis</i>
Ami9 R	Rev.	5'-GTTGAGTCGAATTAAGCCGC-3'	850pb. <i>A. castellanii</i>

Se modificaron los cebadores Ami6F1 y Ami6F2 para conseguir un solo cebador degenerado, que llamamos **Ami6DEG**

Materiales y Métodos

Componentes de la PCR de protozoos:

Tabla 6.4.2 Volúmenes necesarios de los componentes de la reacción de PCR de acuerdo a sus concentraciones iniciales y las concentraciones finales esperadas, para 10 μ l de muestra

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μ L)
Agua doble desmineralizada			20,5
Tampón (500mM KCL, 100mM Tris HCl pH 8,8)	10X	1X	5
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	2,5mM	1,5mM	3
Mezcla dNTPs	2mM	0,2mM	5
Cebador Ami6DEG	10 μ M	0,5 μ M	2,5
Cebador Ami9R	10 μ M	0,5 μ M	2,5
Taq polimerasa	5 U/ μ L	2,5 U/ μ L	0,5
Muestra			10
Volumen total			50

La PCR de protozoos, se realizó en termociclador con los siguientes ciclos:

- ❖ Desnaturalización inicial 94°C, 5 minutos
- 40 ciclos de:**
 - Desnaturalización 94°C 1 min.
 - Hibridación 55°C 30 seg.
 - Extensión 72°C 2 min.
- ❖ Extensión final 72°C 10 min
- ❖ Se pueden mantener los amplicones a 4°C

6.5 Visualización de los amplicones.

Se realizó mediante una electroforesis horizontal en gel de agarosa (2%) en TBE 1X. Se cargaron 10 μ l de muestra con 3 μ l de tampón de carga en cada pocillo del gel y 13 μ l del marcador molecular. Se cargaron también un control positivo y otro negativo. Se aplicó un campo isoelectrico de 100V durante 1 hora y 15 minutos.

Se tiñó durante 20 minutos en Bromuro de etídio y la observación de bandas se hizo con un transiluminador de luz UV *Image Master VDS* (Pharmacia, Biotech).

7 DISEÑO DE UN CONTROL DE INHIBICIÓN DE LA PCR DE *LEGIONELLA*

7.1 Amplificación y construcción del plásmido.

Se diseñaron unos cebadores híbridos a partir de la región **f1** del vector pGEM[®]-T (vector de Promega). Unimos estas secuencias a la de los cebadores de *Legionella* JFP y JRP (Jonas *et al.* 1995), con lo que se obtuvo un fragmento híbrido de 579pb.

JFP híbrido: AGGGTTGATAGGTTAAGAGC**GGCCGAAATCGGCAAATC**

JRP híbrido: CCAACAGCTAGTTGACATCG**GCCGTCGTTTTACAACGTC**

7.2 Purificación.

A partir de un amplicón de PCR se hizo una purificación con el kit *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, UK) (apartado 9.1.1).

7.3 Ligación.

Los fragmentos de ADN obtenidos mediante digestión con la ligasa T4, se ligaron al plásmido pGEM-T easy. Como se muestra a continuación:

- ❖ 3 µl del ADN purificado
- ❖ 1 µl ligasa T4
- ❖ 5 µl buffer ligasa
- ❖ 1 µl vector
- ❖ Incubación 1 día a 4°C

7.4 Transformación.

Se introdujo el plásmido recombinante en células bacterianas. Para ello se utilizó una cepa de *Escherichia coli*, (bacterias competentes que pueden captar ADN por transformación). Como se describe a continuación:

1. Se centrifuga la ligación.
2. Se añade 2 µl de la ligación en un eppendorf en hielo.
3. Se añade 50 µl de células competentes el eppendorf con ligación, y 50 µl de células competentes al control positivo del kit.
4. Se mezcla suavemente y se deja 25 minutos en hielo.
5. Se deja incubar a 42°C durante 45 segundos.
6. Se vuelve a colocar en hielo durante 2 minutos.
7. Se agregan 950 µl de medio SOC al tubo con ligación y al control positivo.
8. Se deja 1 hora a 37°C con agitación a 225 rpm.
9. Se siembran dos placas de LB/ampicilina/IPTG/x-Gal con 100µl de la ligación y 1 placa con el Control positivo.
10. Se incuba *overnight* a 37°C

Se analizaron los resultados obtenidos comprobando el crecimiento de colonias blancas y azules. Las placas de cultivo llevaban ampicilina para seleccionar las bacterias que habían incorporado el plásmido (resistentes a ampicilina). Las colonias azules son bacterias que han incorporado el plásmido sin el inserto deseado, el color azul viene de la dinámica del gen lac-z que codifica para la (beta)-galactosidasa y degrada el sustrato cromogénico X-Gal con la intervención de la molécula inductora IPTG del medio de cultivo. Los colores sirven para diferenciar que bacterias han incorporado el plásmido con el inserto, colonias blancas, de aquellas que no lo han incorporado, colonias azules.

7.5 Midiprep.

Se realizó un último paso para conseguir una alícuota de 100 µl del plásmido con el inserto (colonias blancas) para lo que se utilizó un kit de *Midiprep* (Qiagen, UK).

- ❖ Se colocaron las colonias obtenidas en 3 tubos.
- ❖ Se centrifugó a 6000 g durante 15 minutos a 4°C.
- ❖ Se eliminó el sobrenadante.
- ❖ Con el *Pellet* obtenido se realizaron los siguientes pasos del Kit de *Midiprep*:

1. En una columna del kit se añadieron 4 ml de buffer P1.
2. Se añadieron 4ml de buffer P2, se mezcló por inversión y se dejó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Se añadieron 4 ml del buffer P3, se mezcló por inversión 4-6 veces y se colocó durante 20 minutos en hielo.
4. Se centrifugó a 20000 g durante 30 minutos, se pasó el sobrenadante a otro tubo.
5. Se centrifugó a 20000 g durante 15 minutos a 4°C, se pasó el sobrenadante a una columna del kit. Se colocaron 4ml de QBT y se dejó caer por gravedad.
6. Se colocó el sobrenadante en la columna y se dejó filtrar por gravedad (se desechó el filtrado).
7. Se realizaron 2 lavados con 10ml de buffer QC.
8. Elución: Se colocaron 5ml de buffer QF en la columna, se dejó filtrar y se recogió el filtrado.

- ❖ Precipitación de ADN:

1. Se añadieron 3,5ml de Isopropanol y se centrifugó a 5000 g durante 1 hora.
2. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Se añadió 2 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 5000 g durante 1 hora. Se

eliminó el sobrenadante, se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se resuspendió en 100µl de TE.

4. Se guardó a -80°C

8 CUANTIFICACIÓN DE GENOMAS DE LEGIONELLA POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Se determinó la concentración de ADN de legionella de las diferentes muestras analizadas, calculando los genomas de las diferentes cepas estudiadas, a una Absorbancia de 260nm en un espectrofotometro (*Genequant pro*, Amersham Biociencias y en el *Spectrophotometer ND-1000, NanoDrop^R*), se obtuvo también la relación ADN/ Proteína, de cada cepa para obtener el grado de pureza de las extracciones.

Calculando el peso molecular del genoma de *Legionella pneumophila* se pudo calcular los genomas/g ADN, y de este modo conocer el número de genomas/ml esperado para cada dilución analizada.

$$1 \text{ genoma de } Legionella \text{ pneumophila} = 3397754 \text{ pb}$$

$$1 \text{ pb} = 660 \text{ uma}$$

$$3397754 \text{ pb} \times 660 \text{ uma} = 2,24 \times 10^9 \text{ uma}$$

$$\frac{2,24 \times 10^9 \text{ uma}}{1 \text{ molécula } L. \text{ pneumophila}} \times \frac{1 \text{ g de ADN}}{\text{NA uma } (6,022 \times 10^{23})} = 3,72 \times 10^{-15} \text{ g ADN/genoma } L.pn$$

$$\frac{1 \text{ genoma } L. \text{ pneumophila}}{3,72 \times 10^{-15} \text{ g DNA}} \times X \text{ g/ml} = X \text{ genomas/ml}$$

$$3,72 \times 10^{-15} \text{ g DNA}$$

$$\mathbf{1 \text{ genoma de } L. \text{ pneumophila} = 3,72 \text{ fg.}}$$

9 SECUENCIACIÓN DE CEPAS PURAS DE *LEGIONELLA*

Se realizaron secuenciaciones de las distintas cepas de referencia para realizar una comparación con cepas descritas en la base de datos del *Genebank*.

9.1 Purificación del amplificado.

Se realizó previamente una PCR para obtener una amplificación del fragmento esperado. Posteriormente se realizó una purificación de los amplicones obtenidos con los kits de purificación que se describen a continuación.

9.1.1 QIAquick PCR Purification Kit ref: 28106(Qiagen).

- ❖ Se añade el buffer PB 5 veces la cantidad de muestra.
- ❖ Se centrifuga un minuto a 14000 rpm y se elimina el sobrenadante.
- ❖ Se lava el filtro con 750 µl del buffer PE.
- ❖ Se centrifuga durante un minuto a 14000 rpm.
- ❖ Se pasa el filtro a un tubo eppendorff nuevo.
- ❖ Se añaden 30 µl del buffer EB al filtro y se deja 2 minutos a temperatura ambiente.
- ❖ Se centrifuga un minuto a 14000 rpm.
- ❖ Los 30 µl recuperados en el tubo eppendorff es el purificado.

9.1.2 Purificación por columna Montage PCR ref:UFC7PC250 (Millipore).

- ❖ Se inserta el filtro en una columna de purificación del Kit.
- ❖ Se pipetea 360 µl de agua estéril o TE en el filtro.
- ❖ Se añaden 40 µl del amplificado de PCR.
- ❖ Se centrifuga a 4500 rpm durante 15 minutos.
- ❖ Se coloca el filtro en un nuevo tubo eppendorf y se añaden 20 µl de agua estéril o TE.

- ❖ Se invierte el filtro y se centrifuga a 4500 rpm durante 2 minutos.
- ❖ Finalmente se elimina el filtro y se recupera 20µl de ADN purificado.

9.2 Componentes de la PCR de secuenciación.

1µl Terminador (*BigDye terminator 3.1*)
0,5 µl del cebador (JFP) y (JRP) o (ASR) diluidos 1/10
1-3 µl del amplificado
5,5 µl agua bidestilada
Total 10 µl

9.3 Amplificación.

La PCR de secuenciación se realizó con los siguientes ciclos:

- ❖ Desnaturalización inicial 96°C 2 min.

25 ciclos de :

Desnaturalización 96°C	10min.
Hibridación 57°C	5 min.
Extensión 60°C	4 min.

- ❖ Se pueden mantener los amplicones a 4°C

9.4 Precipitación.

- ❖ Se coloca 64 µl de etanol absoluto en cada eppendorff.
- ❖ Se añade 26 µl de agua bidestilada a la muestra, se pasa todo a un eppendorff con 64 µl de etanol y agitar.
- ❖ Se deja 15 minutos a temperatura ambiente.
- ❖ Se centrifuga durante 20 minutos a 14000 rpm.
- ❖ Se elimina el sobrenadante.
- ❖ Se añaden 200 µl de etanol al 70%.
- ❖ Se centrifuga 5 minutos a 14000 rpm.

- ❖ Se repiten dos veces los últimos dos puntos.
- ❖ Se deja secar a temperatura ambiente.
- ❖ Se analiza el producto en un secuenciador, en los Servicios Científico técnicos de la UB.

10 CONTROL DE CALIDAD DEL MÉTODO DE CULTIVO (CARTAS CONTROL)

La estabilidad de los viales almacenados a $-80\pm 5^{\circ}\text{C}$ se controlan con Cartas de Control (*Control chart*).

Para realizar las cartas de control de cada uno de los lotes se cultivó la cepa de *Legionella pneumophila* durante 6 días en agar BCYE y a continuación se obtuvo una suspensión de la cepa en Ringer 1/40 , hasta obtener una densidad óptica de 0,7 a una Absorbancia de 450nm que equivale a una suspensión bacteriana aproximada de 10^8ufc/ml .

A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una concentración entre 20-100ufc/ml. Finalmente se repartió 850µl de la suspensión en crioviales estériles con 150 µl de glicerol y se almacenaron a una temperatura de $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Se preparó el material de referencia y se distribuyó en viales, se almacenaron a -80°C , se esperó la estabilización de los microorganismos aproximadamente dos semanas.

Estos resultados fueron transformados en logaritmos en base 10 y en ellos se calcularon los límites de la gráfica control:

- la media (\bar{x}) y su desviación estándar (s)
- El límite de aviso superior y el inferior $\bar{x}+2s$
- Los límites de acción superior e inferior $\bar{x}+3s$

Los resultados del lote de material de referencia que se usaron, se dibujó la

carta de control, que se usó cada vez que se realizaba un análisis donde se buscaba controlar la calidad del proceso de cuantificación de microorganismos de un vial del lote. Si los resultados de los viales se encuentran dentro de los límites establecidos se considera que el método se ha aplicado correctamente y que los materiales han funcionado bien.

11 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LAS MUESTRAS

En cada capítulo se han utilizado distintos programas estadísticos. De forma general se realizaron análisis de distribución, análisis de medias, análisis discriminantes, y correlaciones de Pearson y Spearman con los siguientes programas estadísticos:

- ❖ Statgraphics v. 5.1 y Centurion XV
- ❖ SPSS v11.1 *The Statistical Package for Social Science*.
- ❖ Microsoft Excel 2007.

12 ANEXOS DE MATERIALES Y MÉTODOS

1. Medios y Caldos de cultivo para microorganismos

1.1 *Legionella* CYE Agar Base ref :CM0655 (Oxoid):

Activated charcoal	2.0 g/L
Yeast extract	10.0 g/L
Agar	13.0 g/L

Añadir 12,5 g en 450ml de agua destilada y llevar suavemente a ebullición hasta disolver por completo.

1.2 *Legionella* BCYE suplemento de crecimiento ref: SRO110C (oxoid):

Contenido por vial:

ACES Buffer/potassium hydroxide	5.0g / 500ml
Ferric pyrophosphate	0.125g / 500ml
L-cysteina HCL	0.20g / 500ml
α-Cetoglutarate	0.50g / 500ml

Añadir asépticamente a un vial 50ml de agua destilada estéril a 50°C y mezclar suavemente hasta disolver. Añadir el contenido del vial a 450ml de *Legionella* CYE Agar base (CM655) estéril y enfriado a 50-55°C.

1.3 *Legionella* BCYE Suplemento de Crecimiento sin L-cisteina

ref: SR175A (oxoid):

ACES Buffer/potassium hydroxide	1.0g/ 90ml
Ferric pyrophosphate	0.025g/ 90ml
α-Cetoglutarate	0.10g/ 90ml

Añadir asépticamente a un vial 10ml de agua destilada estéril a 50°C y mezclar

suavemente hasta disolver. Añadir el contenido del vial a 90ml de *Legionella* CYE Agar base (CM655) estéril y enfriado a 50-55°C.

1.4 *Legionella* (GVPC) suplemento selectivo ref: SRO152E (Oxoid):

Contenido por vial:

Ammonia free glycine	1.5g / 500ml
Polymyxin B SO₄	40,000 IU
Vancomycin HCL	0.5mg / 500ml
Cycloheximide	40.0mg / 500ml

Añadir asepticamente a un vial 10ml de agua destilada estéril a 50°C y mezclar suavemente hasta disolver. Añadir el contenido del vial a 500ml de *Legionella* BCYE - α Medium agar base (CM0655+SRO110) estéril y enfriado a 50-55°C.

1.5 Plate Count Modified Agar ref: 01329 (Scharlau).

Agar modificado recomendado para el recuento en placa de aerobios.

Casein peptone	5,0 g/L
Yeast extract	2,5 g/L
Dextrose	1,0 g/L
Agar	9,0 g/L

Disolver 17,5g del polvo en 1 litro de agua destilada. Calentar hasta ebullición con agitación constante. Esterilizar al autoclave 15 min. a 121°C.

1.6 Glutamate Starch pseudomonas agar (GSP Agar) ref: 01092 (Scharlau)

Medio sólido semiselectivo y diferencial para el aislamiento de *Pseudomonas* y *Aeromonas*

Sodium L(+) Glutamate	10,00g/L
Soluble Starch	20,00g/L
Monopotassium phosphate	2,00 g/L
Magnesium sulfate	0,50 g/L
Phenol red	0,36 g/L
Agar	15,00 g/L

Se resuspende 48 gr de medio en 1 L de agua destilada y se lleva a ebullición. Se autoclava durante 15 minutos a 121°C se enfría a 50°C y se añade penicilina G sódica (100mg/ml) para *Pseudomonas* y para *Aeromonas* la misma concentración de penicilina y se añade 2mg/ml de ampicilina.

Las colonias de *Pseudomonas* son de forma ovalada con bordes bien definidos de color rosa fuerte y emiten fluorescencia con este medio.

Las colonias de *Aeromonas* son pequeñas de forma ovalada y de color amarillo pálido.

Las dos tipos de colonias crecen a las 48 horas a 30°C.

1.7 Medio de cultivo de trigo para Protozoos.

Trigo	50 gr
Na₂HPO₄·12H₂O	1,3 gr
Agua destilada	1L

Se hierven 50 gramos de trigo en 1L de agua destilada durante 15-20 minutos. Se filtra el medio con papel de filtro y nuevamente con un filtro de 0,45 µm. Se agrega agua destilada hasta enrasar a 1L. Finalmente se agrega 1,3 gramos de Na₂HPO₄·12H₂O. Se autoclava durante 15 minutos a 121°C.

1.8 Medio LB líquido

Peptona	10g/L
Extracto de levadura	5g/L
NaCl	5g/L

Ajustar el pH a 7

Autoclavar 15 minutos a 121°C.

1.9 Medio LB sólido con Ampicilina - X-gal e IPTG (sigma)

Se prepara 500 ml de medio LB sólido. Una vez autoclavado, se añade 500 ml de una solución de Ampicilina (50 mg/ml).

Una vez enfriadas las placas, se extiende sobre cada placa 40 ml de una solución de X-gal (20 mg/ml en dimetil-formamida) y 4 ml de la solución de IPTG (200 mg/ml en agua destilada estéril). Se deja en la estufa a 37°C durante 4-6 horas antes de usarlas para colocar el cultivo con células transformadas.

2. Test, buffers, reactivos y diluyentes utilizados para la identificación de *Legionella spp.*

2.1 Test de aglutinación (*Legionella latex test*) ref:DR 0800M (Oxoid)

La prueba de aglutinación de látex para la identificación de las especies más frecuentes de *Legionella* a partir de los cultivos en placa, permite la identificación de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 y de los serogrupos 2-14, así como la identificación de otras 7 especies de *Legionella* implicadas en infecciones humanas (*L. longbeachae*, *L. bozemanii* 1 y 2, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei*, *L. anisa*)

2.2 Buffer ácido (ISO 11731-2:2004. Detection and enumeration of *Legionella*)

Solución A: 0.2 mol/L HCl

Solución B: 0.2 mol/L KCl

Mezclar 3.9ml Solución A + 25ml de la Solución B, ajustar el pH a 2,2±0,2 (solución de KOH a 1M).

2.3 Diluyentes para el aislamiento de *Legionella*

❖ PBS

NaCl	8g/L
KCl	0,2g/L
Na ₂ HPO ₄	1,44g/L
KH ₂ PO ₄	0,24g/L
agua destilada	1L

Se ajusta a un pH 7,4 y se esteriliza con autoclave 20 minutos a 120 °C

❖ RINGER ¼

NaCl	2,250 g/L
KCl	0,105 g/L
CaCl	1,44g/L
NaHCO ₃	0,050 g/L
agua destilada	1L

Se esteriliza en autoclave 20 minutos a 120 °C

2.4 Reactivos para la PCR

❖ Polimerasa:

Se usa la Amplitaq DNA Polymerase con BufferII (500mM KCl, 100mM Tris-HCL, pH 8,3) de Applied Biosystems (Ref. N808-0161)

❖ Nucleótidos:

A una concentración inicial de 10mM de Applied Biosystems (Ref. N808-0007).

❖ Cebadores:

A una concentración de 100mM de la casa comercial Isogen.

❖ **Cloruro de magnesio:**

A una concentración de 25mM de Applied Biosystems (Ref. E 12850)

❖ **TBE 10X**

Tris Base	108g
EDTA	9,3g
ácido bórico	55g
agua bidestilada	1L

Se utiliza el TBE a 1X

❖ **TE (Tampón de Elución)**

10mM Tris

0,1 mM EDTA

❖ **Agarosa estándar media EEO** de Ecogen (Ref:AG-220)

❖ **Marcador de peso molecular y tampón de carga**

El marcador es el Ox174DNA/HaeIII de Promega. (Ref: G1761) y el cargador *Blue/Orange 6x Loading Dye* (Ref: G190A).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**CAPÍTULO I: IMPLEMENTACIÓN DE
MÉTODOS PARA EL AISLAMIENTO Y
DETECCIÓN DE *LEGIONELLA* EN AGUA**

RESULTADOS

1 IMPLEMENTACIÓN DE TÉCNICAS DE AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DE *LEGIONELLA*

En este capítulo se implementaron y pusieron a punto métodos de aislamiento e identificación de *Legionella*. Así como el control de calidad del material de trabajo para su aplicación en muestras ambientales.

1.1 Recuperación de células de *Legionella* aplicando el método de concentración por filtración.

El análisis de la presencia de *Legionella* spp. en los sistemas de agua caliente y en las torres de refrigeración se basa en la aplicación de la Norma ISO 11731, 1998 (materiales y métodos 4.1). La norma determina la concentración de las muestras de agua por filtración, pero no especifica la recuperación de células con este método. Con el fin de conocer cuál es la eficacia de recuperación de este proceso, se cuantificó el porcentaje de células recuperadas a partir de una concentración celular conocida, se doparon botellas que contenían 1 litro de agua mineral estéril con distintas concentraciones de *Legionella pneumophila* ATCC 33152, se agitaron durante 10 segundos, se dejaron reposar 30 segundos y se filtraron de acuerdo con el protocolo propuesto por la ISO 11731-1998.

Resultados

Tabla 1.1.1 Número de células inoculadas en muestras de agua y el porcentaje de recuperación de células de *Legionella* con el método de filtración recomendado por la ISO 11731-1998.

	Muestra	Nº células inoculadas ufc/L	Nº células recuperadas ufc/L	% Recuperación
Experimento 1	A	3,38 x10 ⁴	5,08 x 10 ³	15%
	A	3,38 x10 ⁴	4,29 x10 ³	13%
	B	3,38 x10 ³	5,50 x 10 ²	16%
	B	3,38 x10 ³	5,00 x 10 ²	16%
	C	3,38 x10 ²	1,30 x 10 ²	38%
	C	3,38 x10 ²	1,40 x 10 ²	41%
Experimento 2	A	1,50 x10 ⁴	1,37 x10 ³	9%
	B	1,50 x10 ³	2,90 x 10 ²	19%
	C	1,50 x10 ²	5,50 x 10 ¹	37%
Experimento 3	A	6,24 x10 ³	1,60 x 10 ³	22%
	B	6,24 x10 ²	1,40 x 10 ²	26%
Porcentaje de Recuperación				23%
Mediana				19%

En esta tabla se muestra la recuperación de células obtenidas por el método de filtración, las pruebas se realizaron con filtros de nylon de 0,45 µm (Millipore, UK).

Se realizaron 3 experimentos: el primero, fue realizado con una réplica y una lectura inicial de células de 3,38x10⁴ ufc/L, el segundo con una lectura inicial de 1,50x10⁴ ufc/L y el tercero con número inicial de células inoculadas de 6,24x10³ ufc/L, (tabla 1.1.1).

El porcentaje de recuperación entre todas las réplicas osciló entre el 9% y el 41%, obteniendo un valor medio del 23% con una desviación estándar de 11,08 y una mediana del 19%.

De acuerdo con estos datos se estimó el límite de recuperación aproximado de la técnica de filtración propuesta por la normativa ISO 11731-1998. Considerando que se analizó una décima parte de las células dopadas inicialmente y que la eficiencia de recuperación fue un 23%, el límite de recuperación de células viables es 44 ufc/L para una recuperación final de 1 célula/L de *L. pneumophila*.

1.2 Control de calidad de los métodos de cultivo aplicando cartas de control para *L. pneumophila* ATCC 33152.

Con el fin de controlar la calidad del método de detección y cuantificación de *Legionella* por cultivo, se desarrolló un material de referencia para asegurar la obtención de resultados de acuerdo con los requisitos definidos de calidad del método de aislamiento y cuantificación de *Legionella*. Para esto se sembraron 0,5 ml por duplicado de las diluciones realizadas con la cepa de referencia *Legionella pneumophila* ATCC 33152, en placas de BCYE, para obtener el número inicial de células esperado. Posteriormente, se realizó la cuantificación en agar BCYE de viales criopreservados a $(-80 \pm 5)^{\circ}\text{C}$ a lo largo del tiempo.

Para el control de este material de referencia se realizaron cartas de control, en las que se representaron la media de los resultados obtenidos y los límites internos de tolerancia ($x+2s$) y externos de acción correctora ($x+3s$).

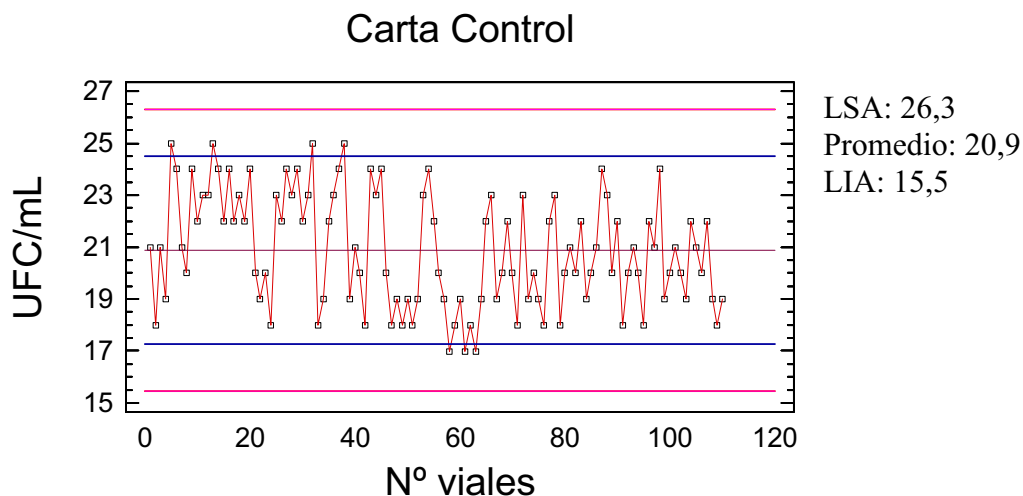
Un diagrama de control puede indicar una condición fuera de control cuando uno o más puntos se hallan fuera de los límites, o bien, cuando los puntos exhiben un patrón de comportamiento no aleatorio. Los límites de alerta avisan de un incremento de la desviación y que en medidas sucesivas el procedimiento podría alcanzar el límite de acción.

1.2.1 Carta de control

Se realizaron varias cartas de control con el programa estadístico *Statgraphics Centurion XV*, la carta de control que se utilizó a lo largo de todo el estudio se observa en la figura 1.2.1.1. Esta carta se realizó a partir de una suspensión de células de *L. pneumophila* congeladas a -80°C . Se congelaron 120 crioviales, se sembraron dos placas de BCYE con 0,5ml de cada vial antes de cada experimento o al realizar análisis ambientales, para el control de calidad del medio de cultivo utilizado (materiales y métodos apartado 10).

Resultados

Figura 1.2.1.1 Carta control de *L. pneumophila* ATCC 33152.



LSA: Límite Superior de Acción, LIA: Límite Inferior de Acción

En este tiempo se observó que los microorganismos preservados en los crioviales se mantuvieron estables, no alcanzaron en ningún caso el límite de acción correctora, la cuantificación de los microorganismos se fue estabilizando a lo largo del tiempo y no se vio comprometida la estabilidad del lote (figura 1.2.1.1).

2 TÉCNICAS MOLECULARES DE DETECCIÓN DE *LEGIONELLA* EN MUESTRAS DE AGUA

La detección de ADN en muestras de origen acuático se realizó mediante la técnica de la PCR.

2.1 Límite de detección de la técnica de PCR.

Se realizó una PCR directa basada en los cebadores diseñados por *Jonas et al.* 1995:

JFP (5'-AGGGTTGATAGGTTAAGAGC- 3')

JRP (5'-CCAACAGCTAGTTGACATCG-3')

amplifica un fragmento de 386 pb que codifica para una región del 16S ARNr.

Se diseñó un cebador interno ASR (5'-TTCCACTACCCTCTCCCATA-3'), que amplifica un fragmento de 234pb para una PCR semianidada (materiales y métodos 6.3).

Se determinó el límite de detección de ADN para distintas cepas de *Legionella* aplicando esta PCR semianidada. El límite de detección se calculó determinando el número de células y el número de genomas que se amplificaba en cada una de las reacciones. El número de células viables se obtuvo a partir de una suspensión del cultivo de la cepa de *L. pneumophila* ATCC 33152. Este proceso se realizó de acuerdo con lo expuesto en el apartado 8 de materiales y métodos.

Se realizó la cuantificación de genomas por espectrofotometría de las distintas diluciones. Con el análisis de las muestras a una Abs260nm (espectrofotómetro *Genequant pro, Amersham Biociencias*) se obtuvo la concentración de ADN y la relación ADN/Proteína de cada cepa.

A partir de estos datos y conociendo el peso molecular del genoma de *Legionella* (base de datos del Genbank) se pudo calcular el número de genomas por reacción (materiales y métodos apartado 8).

Resultados

2.1.1 Límite de detección de la técnica de PCR diseñada por Jonas *et al.* 1995, con la cepa *Legionella pneumophila* ATCC33152

Tal como se observa en la figura 2.1.1.1 se obtuvieron amplicones de *Legionella pneumophila* ATCC 33152 hasta la dilución 10^{-5} . En este caso la concentración de células inicial fue de $2,00 \times 10^7$ ufc/ml, por lo tanto se produjo amplificación hasta $2,00 \times 10^2$ ufc/ml que equivale teóricamente a 2 células viables por reacción, tomando en cuenta que cada reacción de PCR corresponde a una décima parte de la concentración inicial de células (tabla 2.1.1.1).

Realizando el cálculo por espectrofotometría a partir de la extracción de ADN de *L. pneumophila*, de la suspensión inicial de $2,00 \times 10^7$ ufc/ml se obtuvo una concentración de ADN de $0,032 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y una relación ADN/Proteína $260/280=1,808$ que indica la pureza de la extracción. Esta concentración de ADN equivale a $6,80 \times 10^9$ genomas de *Legionella* /ml, por lo que se calculó que se habían amplificado $7,40 \times 10^2$ genomas en la reacción de la dilución 10^{-5} (tabla 2.1.1.1).

Fig. 2.1.1.1 Foto de la PCR diseñada por Jonas *et al.* 1995, para *L. pneumophila* ATCC 3



Tabla 2.1.1.1: Cuantificación de *L. pneumophila* ATCC 33152 con la PCR diseñada por Jonas *et al.* 1995.

Dilución	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵
Cultivo ufc/ml	>1000	>1000	>1000	>1000	2,00 x10 ²
Células/Reacción PCR	20000	2000	200	20	2
Genomas/Reacción	8,60 x10 ⁶	8,60 x10 ⁵	8,60 x10 ⁴	8,60 x10 ³	8,60 x10 ²

Cultivo inicial: 2,0 x10⁷ ufc/ml, Genomas iniciales: 8,60 x10⁹ genomas/ml

En la primera fila de esta tabla se indica la cuantificación mediante el recuento de células viables por mililitro, comenzando con una concentración inicial de 2,0 x10⁷ ufc/ml. En la segunda fila el número de células por reacción de PCR y en la tercera fila el número de genomas *Legionella*/reacción, comenzando con una concentración inicial 8,60 x10⁹ genomas *Legionella* /ml, calculado a partir del resultado obtenido por espectrofotometría, (DU[®] 730 Life Science UV/VIS Spectrophotometer. Beckamn Coulter).

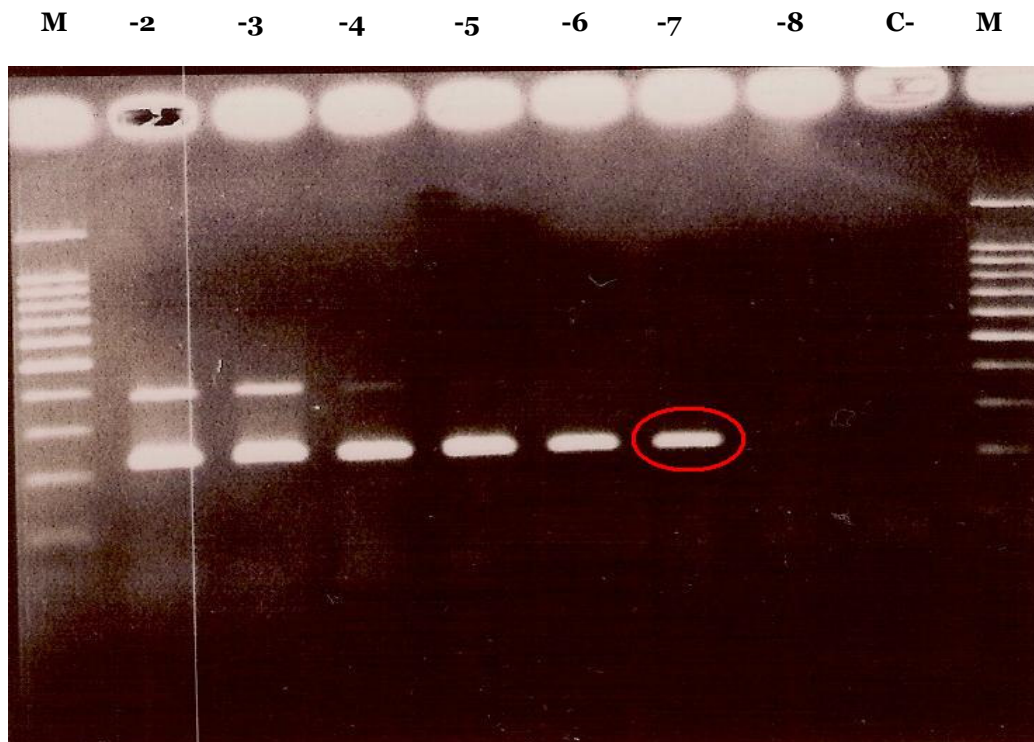
2.1.2 Límite de detección de la técnica de PCR semianidada con la cepa *L. pneumophila* ATCC33152

Con el fin de incrementar la detección de ADN de *Legionella* se puso a punto una PCR semianidada. Para ello se diseñó un cebador interno ASR de 234pb 5'-TTCCACTACCCTCTCCCATA-3', como se describe en el apartado 6.3 de materiales y métodos.

Con el mismo crecimiento de *Legionella pneumophila* ATCC33152 y las diluciones seriadas utilizadas en el apartado anterior, se realizó la extracción de ADN para una PCR semianidada.

En esta PCR semianidada se obtuvieron amplicones de *Legionella pneumophila* ATCC 33152 hasta la dilución 10^{-7} como se observa en la figura 2.1.2.1.

Fig. 2.1.2.1 Foto de la PCR semianidada de *L. pneumophila* ATCC 33152



Capítulo I: Implementación de métodos

Tabla 2.1.2.1 Cuantificación de *L. pneumophila* ATCC 33152 usando la PCR semianidada.

Dilución	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶	10⁻⁷
Cultivo ufc/ml	>1000	>1000	>1000	>1000	2,00x10 ²	4,5 x10 ¹	4,00 x10 ⁰
Células/Reacción PCR	40000	4000	400	40	4	0,4	0,04
Genoma/Reacción	8,60 x10 ⁶	8,60 x10 ⁵	8,60 x10 ⁴	8,60 x10 ³	8,60 x10 ²	8,60 x10 ¹	8,60 x10 ⁰

Cultivo inicial: 4,0 x10⁷ ufc/ml, Genomas iniciales: 8,60 x10⁹ genomas/ml

Como se observa en la tabla 2.1.2.1, el cultivo inicial de células tuvo un recuento de 4,0 x10⁷ ufc/ml, con este valor se calculó el límite de detección de la PCR semianidada. Se obtuvieron amplicones hasta la dilución 10⁻⁷, esto corresponde a 4,00x 10⁰ ufc/ml, lo que teóricamente equivale a una detección de 0,04 células viables por reacción.

Se realizó una medición con un espectrofotómetro, la concentración de ADN de la cepa que fue 0,032μg/μl y se calculó el número de genomas/ml de *Legionella* (hasta la dilución 10⁻⁷), por lo que se obtuvo un límite de detección de 8,60 x10⁰ genomas *Legionella*/reacción de esta PCR (tabla 2.1.2.1).

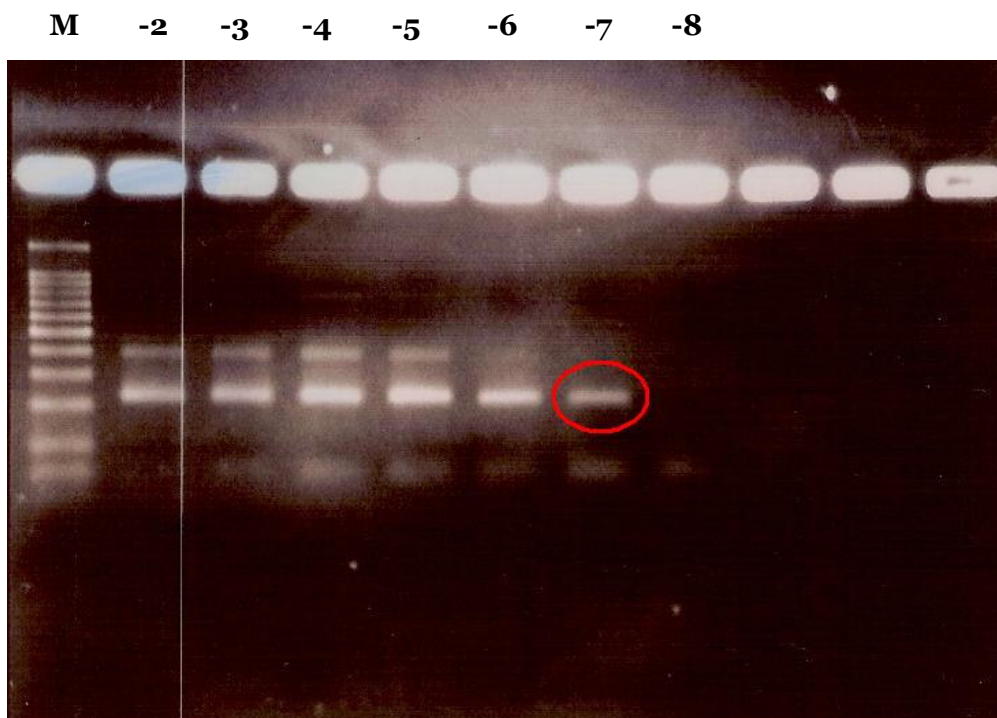
El límite de detección de la PCR semianidada de *L. pneumophila* ATCC33152 fue 100 veces superior a la PCR directa realizada para esta cepa.

2.1.3 Límite de detección de la técnica de PCR semianidada con la cepa *Legionella pneumophila* de origen ambiental serogrupo 2-14

A partir de una muestra ambiental de agua sanitaria, se aisló una cepa ambiental que correspondía a *L. pneumophila* serogrupo 2-14. A partir de una dilución seriada del cultivo en placa de esta cepa se buscó el límite de detección de la PCR semianidada.

Tal como se observa en la figura 2.1.3.1 se detectaron amplicones de *Legionella pneumophila* sg 2-14 en la PCR semianidada, hasta la dilución 10^{-7} .

Fig. 2.1.3.1 Foto de la PCR semianidada de *L. pneumophila* sg 2-14 de origen ambiental.



Capítulo I: Implementación de métodos

Tabla 2.1.3.1 Cuantificación de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 usando una PCR semianidada.

Dilución	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶	10⁻⁷
Cultivo inicial ufc/ml	>1000	>1000	1,40 x10 ³	1,21 x10 ²	1,40 x10 ¹	6,00 x10 ⁰
Células/Reacción PCR	6000	600	60	6	0,6	0,06
Genoma/Reacción	4,04 x10 ⁵	4,04x10 ⁴	4,04x10 ³	4,04x10 ²	4,04x10 ¹	4,04x10 ⁰

Cultivo inicial: 6,0 x10⁶ ufc/ml , Genomas iniciales: 4,04x10⁹ genomas/ml

La concentración de células inicial para esta cepa tuvo un recuento de 6,06 x 10⁶ ufc/ml, se detectó amplificación hasta la dilución 10⁻⁷, correspondiente a 6,00x 10⁰ ufc/ml de *L. pneumophila*, lo que equivale teóricamente a 0,06 células viables por reacción (tabla 2.1.3.1).

A partir de la extracción de ADN de *L. pneumophila*, aislada de agua sanitaria caliente, con una suspensión inicial de 6,00x10⁶ ufc/ml, se obtuvo por espectrofotometría una concentración de ADN de 0,015 µg/µl, lo que equivale a una concentración inicial de 4,04x10⁹ genomas *Legionella*/ml; por lo tanto en la PCR semianidada se detectó la amplificación de 4,04x10⁰ genomas *Legionella*/reacción en la reacción de la dilución 10⁻⁷.

Resultados

2.1.4 Límite de detección de la técnica de PCR semianidada con la cepa *L. longbeachea* ATCC 33462

Se trabajó con otra cepa de referencia, en este caso una cepa de *Legionella longbeachea* ATCC 33462.

Como se observa en la figura 2.1.4.1 se obtuvieron amplicones de ADN de *L. longbeachea* hasta la dilución 10^{-5} .

Fig. 2.1.4.1 Foto de la PCR semianidada de *L. longbeachea* ATCC 33462



Tabla 2.1.4.1 Cuantificación de *L. longbeachea* ATCC 33462, con una PCR semianidada.

Dilución	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵
Cultivo inicial ufc/ml	>1000	>1000	>1000	4,50 x10 ²	4,00 x10 ¹
Células/Reacción PCR	4000	400	40	4	0,4
Genoma/Reacción	8,08 x10 ⁶	8,08 x10 ⁵	8,08 x10 ⁴	8,08 x10 ³	8,08 x10 ²

Cultivo inicial: 4,0 x10⁶ ufc/ml , Genomas iniciales: 8,08 x10⁹ genomas/ml,

La concentración inicial del cultivo en placa de este microorganismo tuvo un recuento de 4,0x10⁶ ufc/ml, a partir de esta concentración se calculó el límite de detección de la PCR semianidada. Se calculó que usando esta PCR se detectaban hasta 4,00x10¹ ufc/ml en la dilución 10⁻⁵, o lo que equivale teóricamente 0,4 células viables por reacción, tabla 2.1.4.1.

La concentración de ADN obtenida para esta cepa por espectrofotometría fue de 0,030 µg/ µl, que equivale a 8,08 x10⁹ genomas *Legionella*/ml, por lo que el límite de detección fue 8,00x10² genomas *Legionella*/reacción (tabla 2.1.4.1).

2.2 Comparación de métodos de extracción de ADN de muestras con inhibidores de PCR.

La técnica de PCR es muy sensible y muchos productos pueden inhibir su funcionamiento.

Con el fin de eliminar los inhibidores de la PCR semianidada (SN-PCR), presentes en muestras ambientales se comparó la eficacia de tres métodos de purificación y extracción de ADN.

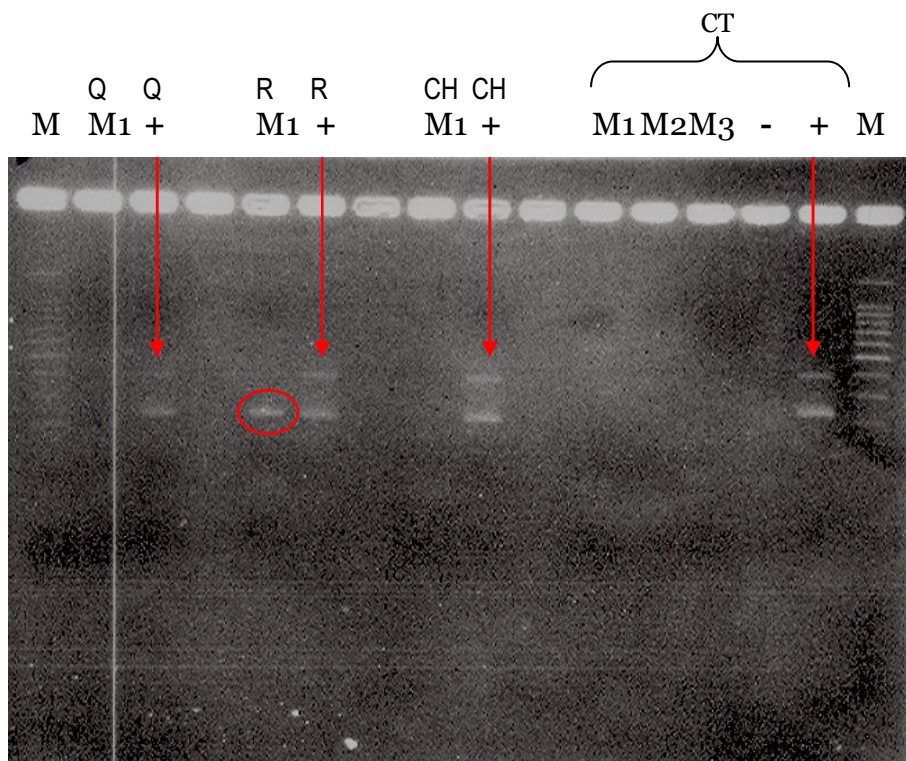
El primer método *Chelex 100 Bath Method* de Bio-Rad (materiales y métodos 6.2.3), es usado comúnmente para la ultrapurificación de muestras con presencia de metales. Esta resina se utilizó para eliminar los posibles inhibidores de las muestras y posteriormente se realizó la extracción del ADN basada en el protocolo de Van Eys *et al.* 1989. (materiales y métodos 6.1)

El segundo método de purificación y extracción de ADN que se usó fue la resina *Molecular Biology Grade AG501-X8* de Bio-Rad (materiales y métodos 6.2.2), que se usa comúnmente para la desionización de muestras de agua. Este método permite además de la purificación de la muestra la extracción del ADN. Finalmente, el último método probado para este experimento fue el *Qiap DNA Mini Kit* de Qiagen (materiales y métodos 6.2.1), que se utiliza para muestras líquidas muy contaminadas, ya que permite eliminar los contaminantes o inhibidores de la muestra y se utiliza la purificación y extracción del ADN.

Para realizar las pruebas se usó como muestra control la cepa de referencia *Legionella pneumophila* serogrupo 1 ATCC 33152, además de varias muestras ambientales de agua sanitaria, que fueron recogidas de distintos sistemas de agua de edificios. Estas muestras dieron resultados positivos por cultivo de células viables de *Legionella pneumophila* que fueron confirmadas con agar BCYE sin cisteína y por serología. Los recuentos de viables obtenidos estuvieron entre 10^4 - 10^5 ufc/L, pero en cambio no dieron resultados positivos por SN-PCR.

Tanto las muestras ambientales como los controles positivos se amplificaron mediante la SN-PCR de género, después de ser tratadas utilizando los tres métodos de purificación y extracción de ADN. Los resultados se observan en la figura 2.2.1.

Fig. 2.2.1 Resultados de muestras ambientales con la PCR semianidada, utilizando métodos de extracción y purificación de muestra con inhibidores.



M1, M2, M3: muestras ambientales 1, 2 y 3 **Q:** *Qiamp DNA Mini Kit*, **R:** *Resina AG501-X8*, **CH:** *Chelex 100*, **CT:** Extracción de choque térmico (Van Eys *et al.* 1989).

En esta figura se pueden observar las muestras ambientales M1, M2 y M3 a las que se realizó una extracción térmica basada en el protocolo de Van Eys *et al.* 1989, dieron resultados negativos, mientras que el control con la cepa de referencia fue positivo. Se puede observar también los resultados obtenidos de la muestra ambiental M1 tratada con cada uno de los métodos de purificación y extracción de ADN.

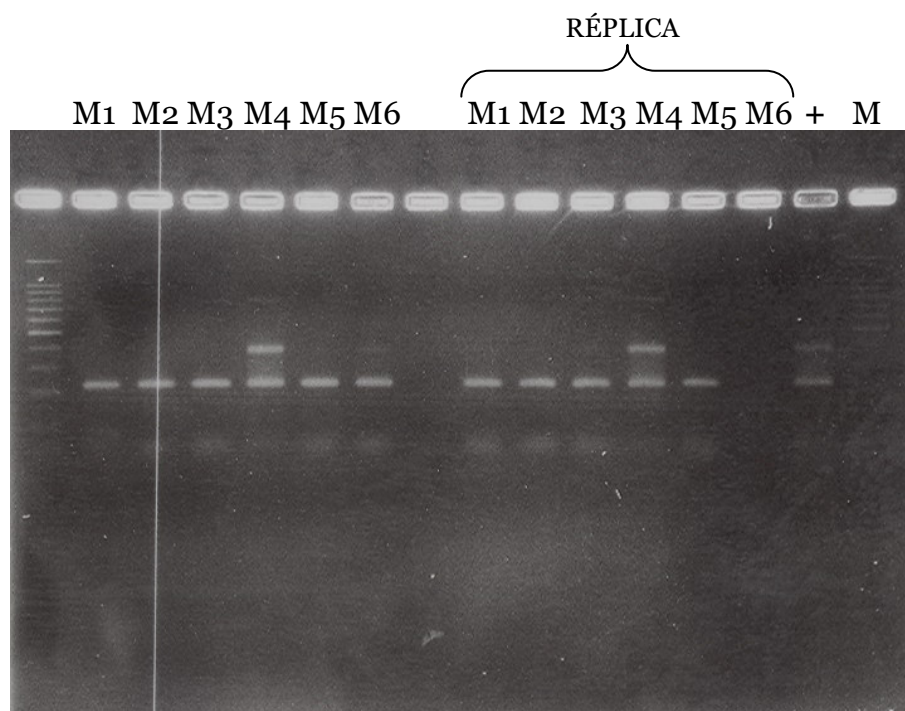
En todos los casos los controles positivos fueron correctos, mientras que la muestra ambiental solo fue positiva al ser tratada con la *Resina AG501-X8* de

Resultados

Bio-rad. Esta prueba se realizó con 6 cepas ambientales y en todos los casos el método de resina fue el que dio resultados positivos de amplificación.

Se realizó una última PCR semianidada de las 6 cepas ambientales que fueron positivas por cultivo y negativas por PCR. En la figura 2.2.2 se pueden observar los resultados obtenidos de cada muestra ambiental y una réplica, después de haber sido tratadas con el método de purificación con la *Resina AG501-X8*.

Fig. 2.2.2 Resultados de muestras ambientales con la PCR semianidada, utilizando métodos de extracción y purificación de muestra con inhibidores.



M1, M2, M3, M4, M5, M6: Muestras ambientales del 1-6, tratadas con la *Resina AG501-X8*

Los resultados indican que la amplificación de las muestras ambientales que eran positivas por cultivo y negativas por PCR, al utilizar el método de purificación de la muestra con la *Resina AG501-X8*, dieron resultados positivos por SN-PCR. Esta resina fue la que funcionó mejor para la eliminación de inhibidores en este tipo de agua.

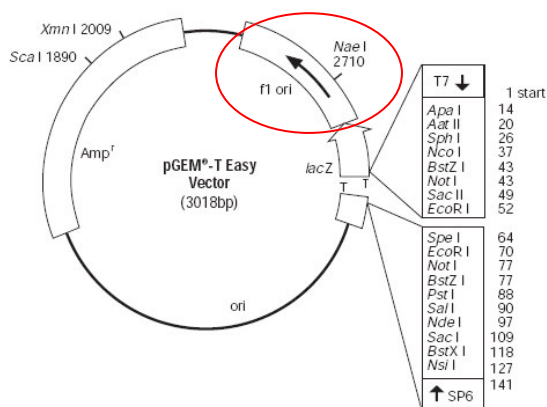
2.3 Diseño de un control de inhibición de PCR.

Un control de inhibición (CI), consiste en un constructo quimérico de ADN, que se amplifica bajo las mismas condiciones y con los mismos cebadores que el ADN diana del organismo que se quiere detectar y a la vez tiene un tamaño suficientemente diferente para que se pueda identificar su banda en un gel de agarosa. Este oligonucleótido añadido a las reacciones de PCR junto con la muestra, permite discernir entre un resultado negativo debido a la ausencia del ADN diana, de un resultado negativo debido a la presencia de inhibidores en la reacción.

Para construir el control interno se usó la región f1 del vector pGEM®-T (Promega, UK). Se diseñaron unos cebadores híbridos uniendo cebadores específicos de la región f1 del vector a los cebadores de *Legionella* del gen 16S ARNr, JFP y JRP, (Jonas *et al.* 1995).

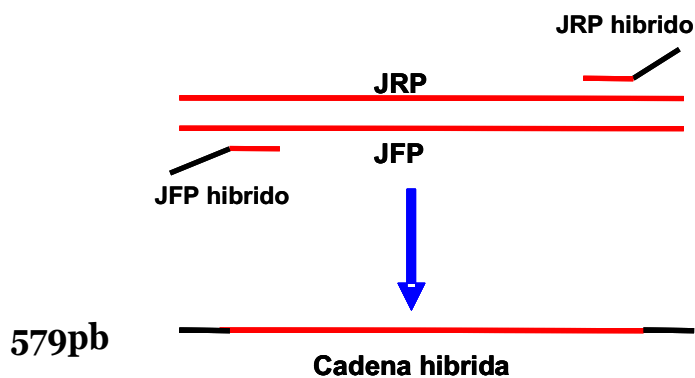
Posteriormente, mediante estos cebadores híbridos se realizó una PCR usando de molde el vector pGEM®-T, dando como resultado un fragmento de 579 pb, flanqueado por regiones complementarias a los cebadores de *Legionella* (fig 2.3.1).

Figura 2.3.1 Diagrama de la formación de cadenas híbridas



JFP híbrido: AGGGTTGATAGGTTAAGAGCGGCCGAAATCGGCAAAATC

JRP híbrido: CCAACAGCTAGTTGACATCGGCCGTCGTTTTACAACGTC



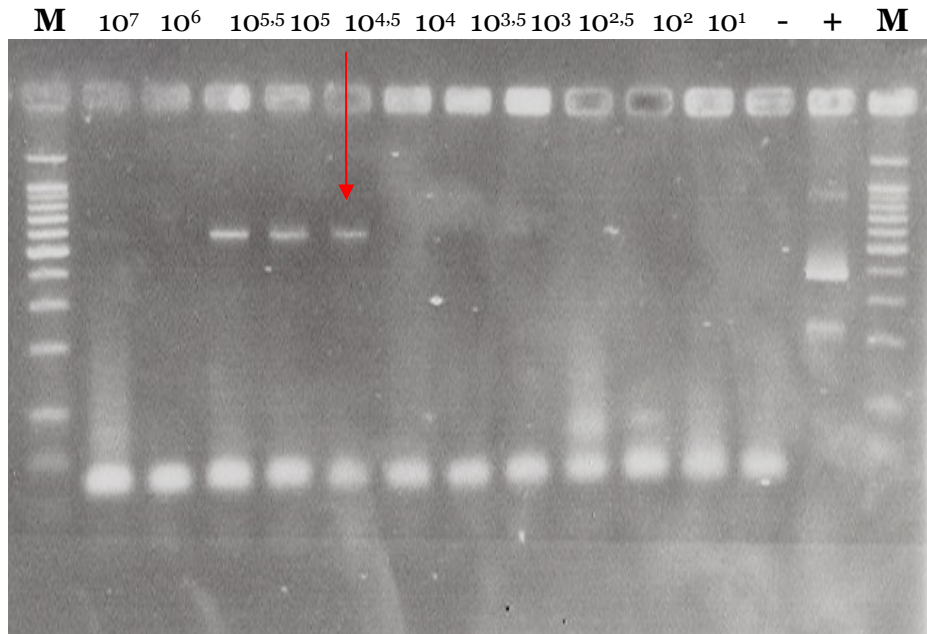
Este amplicón se purificó usando la resina comercial Molecular Biology Grade (Bio-Rad, UK) (materiales y métodos 6.2.2) y posteriormente se introdujo en el vector pGEM®-T easy, mediante ligación con ligasa T4 tal como se explica en materiales y métodos 7.3.

Para producir mayor cantidad de constructo génico, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5-α, con el plásmido obtenido.

Las colonias transformadas (blancas) se seleccionaron según lo descrito en el apartado 7.4 de materiales y métodos. Con el objetivo de obtener un purificado del plásmido se realizó una Midiprep, con el kit de *Midiprep* (Qiagen, UK), materiales y métodos 7.5.

Se realizaron pruebas del límite de detección del CI con la PCR, realizando diluciones seriadas desde una concentración conocida de 10^7 hasta la dilución 10^1 , como se observa en la figura 2.3.2.

Fig. 2.3.2 Resultados del límite de detección del CI



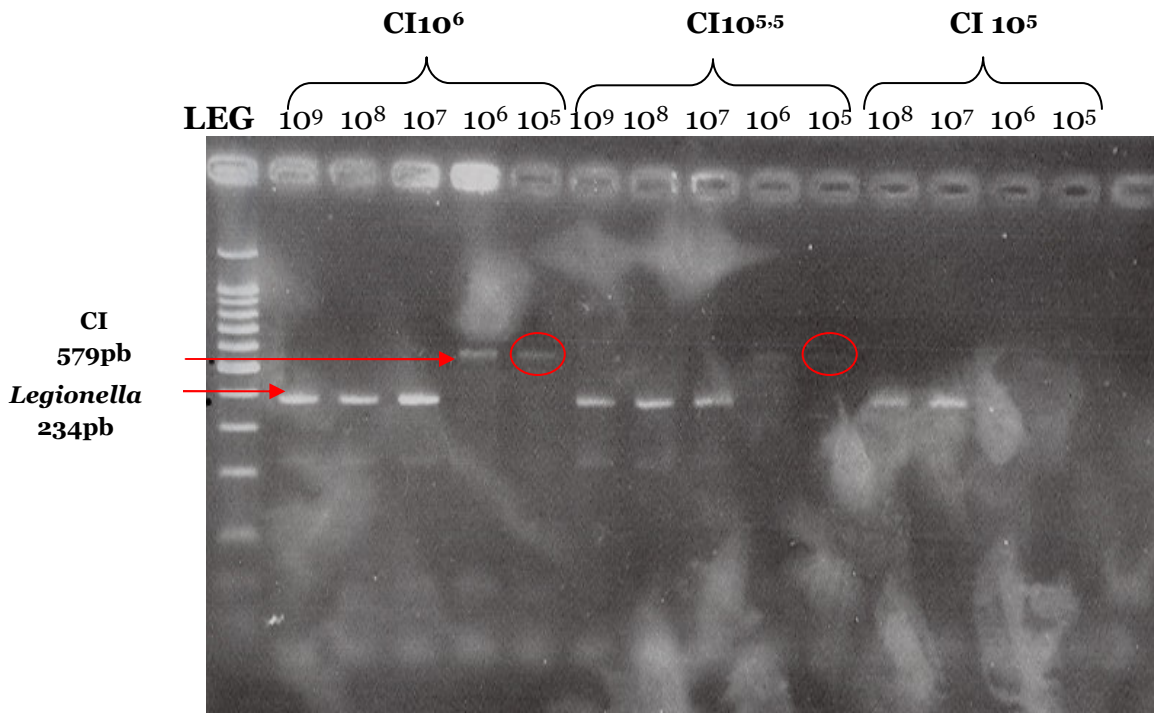
Se encontró que la concentración máxima detectable por la PCR era $10^{4.5}$ copias genómicas/reacción de CI.

El fragmento amplificado del control de inhibición es de 579 pb, a una concentración de 10^5 copias genómicas/reacción, fue añadido a todas las reacciones de PCR de *Legionella* en las que la extracción con el método de purificación por resinas (AG-X8), no eliminaba la inhibición de la amplificación.

Se realizaron pruebas con la cepa de *Legionella* y el CI, utilizando diferentes diluciones, como se puede ver en la figura 2.3.3, a continuación:

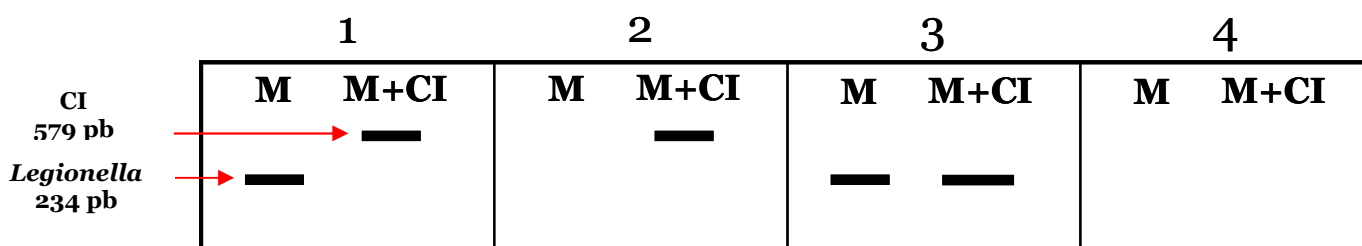
Resultados

Fig. 2.3.3 Resultados de la PCR con una muestra ambiental y un control de PCR.



En la figura 2.3.3, se observa que a concentraciones de 10^6 , $10^{5.5}$ y 10^5 del Control de inhibición y de diluciones de 10^6 y 10^7 de *Legionella*, existe una fuerte competencia entre el CI y el ADN diana en las reacciones. A causa de ello este control se utilizó de forma externa, es decir, para cada muestra se realizaron dos amplificaciones, una directa (solo muestra) y a la otra se añadía el CI (muestra + CI) (fig. 2.3.4). En el caso que el resultado sea negativo para la muestra y positivo para el CI se considera que no hay inhibición de la amplificación.

Fig. 2.3.4 Resultados posibles de la PCR con una muestra ambiental y un control de PCR.



M: Muestra ambiental; CI: Control de Inhibición

Los posibles resultados de la PCR con control de inhibición son los siguientes:

1. La muestra es positiva, en el tubo control ha habido competencia entre las dos dianas y solo se observa la banda del control, lo que indica que hay poco ADN muestra.
2. La muestra es negativa y no ha habido inhibición ya que se detecta la banda del CI.
3. La muestra es positiva, en el tubo control ha habido competencia entre las dos dianas y solo se observa la banda de la muestra en los dos tubos, lo que indica que hay mucha cantidad de ADN muestra.
4. En el tubo control no se detecta banda por lo que ha habido inhibición de la PCR y por lo tanto no se puede concluir si la muestra es positiva o negativa.

DISCUSIÓN

Muchos autores han recomendado diferentes métodos con enfoques muy distintos para la monitorización de *Legionella* en el ambiente (Reinthalder *et al.* 1983, Vickers *et al.* 1987, CDC, 1992). En este estudio se aplicó la técnica de cultivo en placa y la técnica molecular de PCR para la determinación de *Legionella* en las muestras de agua. Los métodos de cultivo son especialmente importantes debido a que proporcionan las bases para tomar decisiones sobre la desinfección de sistemas de agua (Shelton *et al.* 1993).

La utilización de los distintos métodos de cultivo propuestos para muestras ambientales, dan lugar a discrepancias en la interpretación de los resultados, debido por ejemplo a factores como la estandarización de la toma de muestras y los puntos representativos del sistema (TA *et al.* 1995). En este estudio la normativa utilizada fue la ISO 11731-1998, *Water quality-detection and enumeration of Legionella*, que fue concebida para el aislamiento y cuantificación de *Legionella* de muestras ambientales incluyendo agua potable, industrial y natural. Está pensada para muestras concentradas por filtración de membrana o centrifugación, y contempla que se deben realizar tratamientos ácidos, térmicos y una siembra directa en placas de BCYE. También indica que si la muestra tiene sedimentos, depósitos o limos se debe diluir y sembrar directamente. Sin embargo, a pesar de que todas estas medidas se encuentran bien definidas en la normativa tanto como la toma de muestra, el transporte y la conservación, no se indica el límite de recuperación de las técnicas de concentración, que posiblemente dependen del tipo de matriz, de filtro y de la presión de filtración.

Considerando que este trabajo se iba a centrar en muestras de agua con baja turbidez, se realizaron varias pruebas de recuperación de *Legionella*, con el método de filtración con membranas de nylon de 0,45 µm, se doparon diversas muestras de agua mineral, con concentraciones de 10⁴ ufc/ml hasta 10² ufc/ml y se obtuvieron porcentajes de recuperación entre el 9% y el 41%. Finalmente la estimación de la eficiencia de recuperación de este método fue un 23% (44ufc/L). Estos datos están de acuerdo con trabajos publicados por otros

autores como Boulanger *et al.* 1995, que realizaron estudios sobre la eficiencia de recuperación del método de filtración, utilizando filtros de membrana de policarbonato de 0,22µm con jeringas. Con una concentración inicial de *Legionella* de 10³ y 10⁶ ufc/ml, tuvieron una eficiencia de recuperación del 52%. Sin embargo, describen que encontraron una gran variabilidad en la recuperación (entre 15% y 91%) y que a pesar de que este método es más eficiente que la centrifugación, es considerablemente impreciso para la estimación de la concentración de *Legionella*. Brindle *et al.* 1985 describieron resultados similares en su estudio, en lo que se refiere a la falta de precisión de los métodos de concentración de *Legionella*, a su vez describen que el resultado obtenido por el método de filtración, un 43%, fue parecido al obtenido por centrifugación. Otros autores como Voss *et al.* 1984 encontraron eficiencias de recuperación por filtración y centrifugación muy bajas entre un 10% y 20%. Payment *et al.* 1989, utilizaron filtros de cartuchos electronegativos y tuvieron resultados similares, con una recuperación entre el 14% y el 55% dependiendo del volumen filtrado. Estos autores concluyen que los métodos de concentración son imprecisos, tienen una baja sensibilidad y se podrían evitar parte de los errores del método con concentraciones iniciales de la bacteria mayores a 10³ ufc/ml.

Por otra parte en este capítulo se implementaron materiales de referencia con el fin de obtener un control de calidad del proceso de cultivo, a través de las cartas control, ya que su uso viene ligado a los procesos de control de calidad y calibración.

La utilización de los programas de calibración en los laboratorios garantiza que las medidas sean trazables a los materiales de referencia certificados (Méndez, 1997). De esta forma el laboratorio garantiza la obtención de resultados de acuerdo con los requisitos de calidad definidos. En este estudio el control de viales de *Legionella*, criopreservados durante un periodo largo de tiempo, mediante una carta control fue exitoso, se logró mantener estable el *stock* durante el tiempo de los estudios ambientales realizados, asegurando así un buen uso del material de cultivo.

Discusión

Así también se realizó el análisis molecular de los límites de detección mediante una PCR semianidada, diseñada para el gen 16S ARNr del género *Legionella*, con la cepa de referencia *Legionella pneumophila* sg 1 ATCC33152, la cepa de referencia de *Legionella longbeachea* ATCC 33462 y las cepas ambientales obtenidas de muestras de agua sanitaria. En la bibliografía existen otros protocolos de PCR con límites de detección variable. Autores como Miyamoto *et al.* 1997, describen 1 fg como el límite de detección de la PCR semianidada del 16S ARNr de su estudio, sin embargo, no explican la correspondencia entre fentogramos y el número de copias genómicas. Otros autores como Fiume *et al.* 2005, tampoco son precisos en su cálculo del límite de detección; en sus estudios utilizan una PCR anidada del gen mip, considerando que 1 fg corresponde aproximadamente a 1 o 2 genomas, y determinan que su límite de detección son 5 fentogramos. En el caso de Bram *et al.* 2007 para una PCR del 16S ARNr, su límite de detección es de 10 fg y se basan en que anteriormente fue descrito por Wellinghausen *et al.* 2001, quienes determinan que 1 genoma de *Legionella* equivale aproximadamente a 4,3 fg. Autores como Catalán *et al.* 1994 y Nintasen *et al.* 2007, que realizaron una PCR anidada para el gen mip, se basan en esta misma equivalencia y afirman que el límite de detección de las PCR que describen es de 4,3 fg.

Según lo expuesto en el apartado 8 de materiales y métodos de este trabajo, 1 genoma de *L. pneumophila* ATCC33152 corresponde a 3,72 fg, por lo que el límite de detección para las diferentes cepas de *Legionella* estudiadas en este capítulo difiere de lo expuesto por los autores citados anteriormente. En el caso de la PCR semianidada de *L. pneumophila* sg 1 el límite de detección de este trabajo son 8 genomas/reacción, en el caso de la cepa ambiental el límite de la PCR semianidada son 4 genomas/reacción y en el caso de *L. longbeacheae* son $8,00 \times 10^2$ genomas/reacción.

Se realizó también una valoración de varios métodos de eliminación de inhibidores de PCR en muestras ambientales. Se demostró que la purificación con resinas, *Molecular Biology Grade AG501-X8* de Bio-Rad, fue el método que mejor funcionó para el tipo de muestras de este estudio. Autores como Walsh *et*

*al.*1991, Singer-Sam *et al.* 1989, Higuchi, R. 1989, han estudiado métodos de eliminación de inhibidores y la preparación de ADN de diferentes tipos de muestras. Afirman que en el caso de la extracción térmica de ADN, un tratamiento previo con resinas podría proteger el ADN de los efectos del calor, siendo un método ventajoso cuando se trata de una muestra con un número bajo de células. Estos autores ven beneficiosos los procedimientos que permiten una rápida extracción de ADN, disminuyendo la manipulación de la muestra.

CONCLUSIONES

1. Se calculó una eficiencia de un 23% de recuperación de *Legionella* en agua mineral dopada, con método de filtración propuesto por la normativa ISO 11371-1998.
2. Se realizó un control de calidad del medio de cultivo, utilizando una carta control para monitorizar la estabilidad del crioviales de *Legionella pneumophila* a lo largo del tiempo.
3. Se obtuvo el límite de detección de 8,6 genomas/reacción con la PCR semianidada para *L. pneumophila* ATCC33152, 4,04 genomas/reacción para *L. pneumophila* sg 2-14 y $8,08 \times 10^2$ genomas/reacción para *L. longbeachea* respectivamente.
4. Se compararon métodos para la eliminación de inhibidores de PCR y se obtuvo que la resina *Molecular Biology Grade AG501-X8* de Bio-Rad, fue el método que funcionó mejor para el tipo de muestras del estudio.
5. Se diseñó un control de inhibición de PCR, que se utilizó como un control externo del funcionamiento de la PCR para un fragmento del 16S ARNr de *Legionella*.

**CAPÍTULO II: ESTUDIO DE LA
CONTAMINACIÓN DE UN EDIFICIO PÚBLICO
POR *LEGIONELLA***

RESULTADOS

1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Al realizar el control microbiológico anual en el sistema de distribución de agua de un edificio público de Barcelona, para prevenir y controlar la legionelosis, se identificó la presencia de *Legionella*.

De acuerdo con la normativa de prevención de la legionelosis en el estado español, BOE Real decreto 865/2003, se realizó la desinfección anual del sistema hídrico del edificio con una solución de hipoclorito de sodio al 15%, hasta conseguir entre 20 y 30 mg de cloro por cada litro de agua una vez pasadas dos horas, a una temperatura inferior a 30°C y un pH entre 7 y 8. Al cabo de este tiempo se dejó correr el agua durante cinco minutos en todos los grifos del edificio y se detectó 6 partes por millón (ppm) de cloro, en todos los puntos de salida de agua, incluidos grifos y duchas. Finalmente se neutralizó el cloro presente en el agua del circuito con tiosulfato de sodio. Cuando se hizo este tipo de desinfección se tuvo en cuenta el doble circuito de agua fría y caliente.

Veinte días más tarde se realizó el análisis de *Legionella* de acuerdo con la normativa vigente en seis puntos representativos del sistema de agua. Todas las muestras resultaron ser negativas a excepción de una, recogida de uno de los circuitos de agua caliente, con una temperatura de 28°C y con una concentración de cloro de 0 ppm, en la que se detectaron 150 ufc/L de *Legionella*.

De acuerdo con la normativa se repitió el muestreo pasadas dos semanas, para ello se tomaron muestras de los grifos del circuito de agua sanitaria caliente donde se había encontrado un resultado positivo anteriormente. En dos de los puntos del circuito de agua se encontraron 5,00x10⁴ ufc/L de *Legionella pneumophila* sg 1 (temperatura del agua 39,6°C y 0,35 ppm de cloro) y 3,00x10⁴ ufc/L de *Legionella pneumophila* sg 2-14 (temperatura del agua

Resultados

42,0°C y 0,19 ppm de cloro) respectivamente.

Con el fin de solucionar el problema se procedió al cierre de las duchas y grifos alimentados con el agua sanitaria caliente del circuito y se subió la temperatura de los acumuladores al máximo, que en este caso resultó ser de 58°C. La normativa del Ministerio de Sanidad recomienda 70°C en los acumuladores y 55°C-60°C en el agua de retorno, sin embargo el Ministerio de Industria recomienda acumuladores de 60°C en los edificios (BOE Real decreto 865/2003).

A continuación se realizó una segunda hipercloración del sistema de agua caliente contaminado con *Legionella*, siguiendo el procedimiento ya explicado, el cloro se añadió en la zona de purga del acumulador, aunque esta vez el agua se dejó correr durante 10 minutos en lugar de 5.

Dos semanas más tarde se realizó un nuevo análisis del agua de la zona. Los resultados mostraron que las muestras de los dos puntos nuevamente tenían una concentración superior a $5,00 \times 10^4$ ufc/L de *L. pneumophila* serogrupo 1.

Se concluyó que la desinfección no había sido la adecuada y se procedió a vaciar el circuito de agua caliente incluido el calentador de la zona conflictiva y a cerrar todo el sistema de agua caliente de la zona.

2 DISEÑO DEL MUESTREO

Nuestro trabajo se inició en este punto, se estudiaron los datos previos, así como la estructura y sistema de distribución de agua de todo el edificio.

Este edificio es una construcción independiente situada en el centro de Barcelona. Consta de tres alas: Norte, Sur y Centro con una entrada común de agua de distribución de la ciudad y no existe

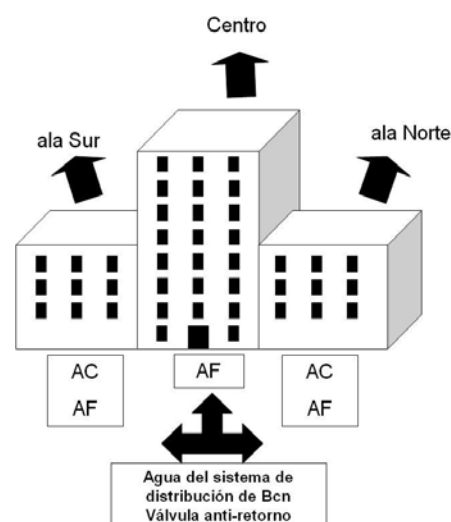


Fig. 2.1. Esquema del edificio en estudio. AC: Agua caliente, AF: Agua Fría.

ninguna torre de refrigeración en el edificio.

Para evitar el retorno de agua del edificio hacia la red de distribución de la ciudad, el edificio dispone de una válvula antiretorno, tal y como exige la normativa. La tubería de entrada de agua en el edificio se divide en tres ramales, uno para cada sección. Dos de las secciones tienen agua caliente, el ala Norte y el ala Sur, calentadas con acumuladores independientes, siendo ambos circuitos cerrados e independientes.

Como el análisis de mantenimiento se había centrado en el sistema de agua caliente del ala Norte, el primer objetivo fue conocer el grado de contaminación del edificio, analizando puntos y números representativos de muestras de los circuitos de agua sanitaria caliente y fría de cada una de las tres alas del edificio. Se consideraron puntos representativos aquellos que correspondían a cada uno de los distintos circuitos de agua, caliente y fría, según el número de pisos y los distintos niveles del edificio. El muestreo se realizó en forma de Z, para saber si la contaminación se encontraba localizada en una zona o se había extendido por todo el sistema de agua del edificio.

Se tomaron muestras de agua de los tres circuitos funcionales de agua fría de las tres alas y del circuito de agua caliente funcional del ala Sur. Del ala Norte se recogieron muestras de los remanentes del circuito de agua caliente, aunque este circuito estaba cerrado.

Las muestras de agua se analizaron mediante cultivo en placa de acuerdo con la normativa vigente (ISO 11731), y mediante la detección de ADN de *Legionella* aplicando la PCR semianidada que amplifica un fragmento del gen que codifica para el 16S ARNr común a todas las especies del género *Legionella*, descrita en el apartado 6.3 de materiales y métodos.

3 PUNTOS ANALIZADOS

La determinación de la presencia de ADN de *Legionella* y el recuento de células viables del agua sanitaria del edificio se realizó con un muestreo representativo de los circuitos de agua caliente y fría de las tres secciones del edificio. En cada una de las muestras se realizaron los siguientes análisis:

1. Un análisis cuantitativo para determinar el número de células viables y cultivables de acuerdo con la normativa ISO 11731: 1998 “Detection and enumeration of *Legionella*”.
2. Se identificaron por serología las especies de las colonias aisladas, con el *kit Legionella látex test* (Oxoid, UK), que identifica los principales serogrupos de *Legionella* y otras especies patógenas.
3. Un análisis cualitativo que determina la presencia o ausencia de ADN de *Legionella spp.* mediante la PCR semianidada.
4. Se identificaron por secuenciación los fragmentos amplificados por PCR y se realizó una comparación con otras secuencias en la base de datos del *Genebank*, usando el programa informático *BLAST*. Se realizaron alineamientos entre todas las secuencias encontradas para compararlas.

El diseño del edificio consta de 6 niveles o pisos con 5 departamentos en cada nivel. Se realizó el análisis de puntos representativos del sistema hídrico de todo el edificio:

- 14 correspondían a grifos de agua fría ubicados en los distintos pisos y distintos bajantes del ala Norte.
- 2 correspondían al remanente de agua caliente del acumulador del ala Norte.

Capítulo II: Contaminación por *Legionella* de un edificio público

- 6 correspondían a grifos de agua fría y 5 a grifos de agua caliente de los distintos pisos y bajantes del ala Sur.
- 4 correspondían a la zona Centro.

El sistema de tuberías de las distintas secciones, pisos y bajantes del edificio tuvieron resultados variables en cultivo en placa y en PCR semianidada, estos resultados se pueden observar a continuación en la tabla 3.1:

Resultados

Tabla 3.1 Muestras analizadas de las diferentes alas del edificio del sistema de agua fría y caliente respectivamente.

ALA Edificio	NIVEL	Tipo de agua ^a	CULTIVO <i>Legionella</i> UFC/L	Serología	PCR <i>Legionella</i>	% POSITIVOS	
SUR	N1	C	ND ^b	/	+	100% PCR	
	N2	C	ND	/	+		
	N3	C	ND	/	+		
	N4	C	ND	/	+		
	N5	C	ND	/	+		
	N0	F	ND	/	+	50% PCR	
	N1	F	ND	/	+		
	N2	F	ND	/	+		
	N3	F	ND	/	-		
	N4	F	ND	/	-		
	N5	F	ND	/	-		
	NORTE	N1	C	2,95x10⁴	SG1	+	100% cultivo
		N1	C	4,02x10³	SG1	+	100% PCR
		N0	F	ND	/	+	6% cultivo 57% PCR
		N0	F	ND	/	+	
N0		F	ND	/	+		
N1		F	ND	/	+		
N1		F	ND	/	-		
N2		F	ND	/	+		
N2		F	ND	/	-		
N3		F	7,70x10²	SG1	+		
N3		F	ND	/	-		
N4		F	ND	/	-		
N4		F	ND	/	-		
N5		F	ND	/	-		
N6		F	ND	/	+		
N6		F	ND	/	+		
CENTRO		N0	F	2,0x10¹	SG1	+	25% cultivo
	N1	F	ND	/	+		
	N6	F	ND	/	+	100% PCR	
	N8	F	ND	/	+		

^a C: caliente, F: fría.

^b ND: no detectado

Los resultados en placa de los cultivos de las 31 muestras analizadas en todo el estudio se obtuvieron entre 5 y 15 días más tarde.

❖ **Los análisis realizados mediante cultivo indican los siguientes resultados:**

- **En el ala Sur** las 5 muestras de agua caliente y las 6 muestras de agua fría resultaron negativas por cultivo.
- **En el ala Norte** las 2 muestras de agua caliente fueron positivas por cultivo, estas pertenecían al mismo piso y mismo bajante y de las catorce muestras de agua fría 1 fue positiva por cultivo.
- **En la zona Central** de las cuatro muestras 1 fue positiva por cultivo.

En cuatro de las 31 muestras se obtuvieron colonias de *Legionella*. Los recuentos del agua caliente del ala Norte fueron $2,95 \times 10^4$ ufc/L en una muestra y $4,02 \times 10^3$ ufc/L en la otra. En el agua fría del ala Norte se obtuvieron $7,70 \times 10^2$ ufc/L y en el agua fría del Centro se encontraron $2,00 \times 10^1$ ufc/L. En todos los casos las colonias que se aislaron correspondieron a *Legionella pneumophila* serogrupo 1.

❖ **Los análisis realizados mediante PCR indicaron de forma rápida, en menos de 24h, los siguientes resultados:**

- En el ala Sur las 5 muestras de agua caliente fueron positivas por PCR. En el caso del agua fría 3 de las 6 muestras resultaron positivas.
- En el ala Norte las 2 muestras de agua caliente analizadas fueron positivas. De las 14 muestras de agua fría 8 fueron positivas por PCR.
- Las 4 muestras de la zona central fueron positivas por PCR.

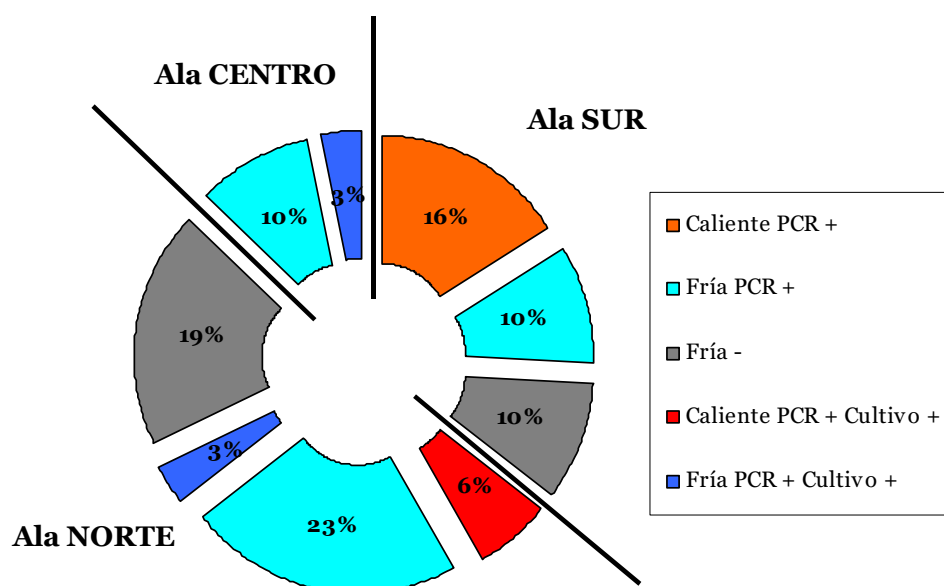
Resultados

Los análisis por PCR de las muestras demostraron que la contaminación por *Legionella* se extendía por todo el edificio. Se detectó ADN en las tres alas y los dos tipos de agua. En el ala Norte se confirmó la presencia de *Legionella* en el 100% de las muestras de agua caliente y en el 57% de las muestras de agua fría analizadas.

En el ala Sur se detectó por PCR el ADN de esta bacteria en el 50% de las muestras de agua fría analizadas y en el 100% de las muestras de agua caliente. En la zona Centro el 100% de las muestras analizadas fueron positivas para el ADN de *Legionella*.

Fig. 2.1 Gráfica de anillos de la detección por PCR de *Legionella* en las muestras analizadas.

Gráfica de anillos de las muestras analizadas de las diferentes alas del edificio



De la totalidad de las muestras analizadas del edificio, un 13% de las muestras fueron positivas por cultivo en placa y un 71% de las muestras fueron positivas por PCR semianidada. Todas las muestras con células cultivables habían dado previamente resultado positivo por PCR. El porcentaje detectado por PCR semianidada correspondiente a las muestras negativas en cultivo fue de un 58%. El porcentaje no determinado por PCR ni por cultivo un 29%.

Con el fin de solucionar el problema de contaminación se tomaron una serie de medidas:

1º Se decidió separar físicamente el sistema de agua caliente y fría, para lo cual se cerraron todas las válvulas de conexión de los sistemas de agua caliente, tanto del ala Norte como del ala Sur, se desconectaron todas las tuberías del agua caliente de los grifos y duchas del sistema sanitario y finalmente se eliminaron los dos acumuladores.

2º Se realizó una hipercloración del sistema hídrico del edificio y los grifos se desmontaron y se dejaron en cloro durante 30 minutos, de acuerdo con la normativa vigente.

Los grifos del edificio eran de tipo “monomando”, por lo que la contaminación pudo haberse extendido del sistema de agua caliente al sistema de agua fría, a través de la comunicación que puede producirse entre los dos sistemas, cuando este tipo de grifos están desgastados.

Finalmente, pasadas dos semanas se realizó un nuevo muestreo para conocer si la desinfección había sido efectiva. Para ello se tomaron 15 muestras de agua fría distribuidas por los diferentes pisos y diferentes bajantes de todo el edificio.

Se analizaron 7 muestras en nuestro laboratorio y las ocho muestras restantes se analizaron en un laboratorio privado acreditado. En esta ocasión se realizaron los cultivos en placa para la detección de *Legionella* (como recomienda la normativa) y se analizaron heterótrofos como microorganismos acompañantes y parámetros fisicoquímicos (temperatura y cloro), además se realizó la PCR semianidada para detectar *Legionella*, los resultados se pueden observar en la tabla 3.2.

Resultados

Tabla 3.2 Muestras analizadas de las diferentes alas del edificio del sistema de agua fría.

ALA	Nivel	Tipo agua ^a	CULTIVO <i>Legionella</i> UFC/L	Serol.	PCR <i>Legionella</i>	Heterótrofos 22°C UFC/100ml	T (°C)	Cl (ppm)
	N5.1		7,00x10¹	SG1	+	ND ^b	17,2	0,6
NORTE	N5.2	F	ND	/	-	ND	16,6	0,8
	No		ND	/	-	ND	18,2	0,5
	No		ND	/	+	7,20x10 ⁷	20	0
CENTRO	N1	F	ND	/	+	ND	18,6	0,6
	N8		6,80x10²	SG1	+	2,00x10 ⁵	20,8	0,1
SUR	N5	F	ND	/	-	ND	17,9	0,6

^aF: fría

^bND: no detectado

En esta tabla se puede observar que la temperatura osciló entre 16 °C y 20°C y el cloro entre 0 y 0,8 ppm. En los distintos puntos de muestreo solo dos de las siete muestras presentaron heterótrofos con una concentración de 7,20x10⁷ ufc/100ml y 2,00x10⁵ ufc/100ml que correspondían a muestras con concentraciones de 0,1 ppm y 0 ppm de cloro respectivamente.

En 2 de las 7 muestras se aisló *L. pneumophila*. La que pertenecía al agua fría del ala Norte, presentó 7,00 x10¹ ufc/L y la otra muestra procedía del agua fría de la zona Centro, con un recuento de *Legionella* de 6,80x10² ufc/L. Se localizaron los puntos de muestreo para conocer mejor el problema. El único grifo que no se había desinfectado debido a que no era una pieza desmontable y se usaba para llenar cubos de agua para la limpieza del edificio, fue la muestra positiva de la zona Centro.

En el caso del ala Norte y la zona Centro donde se obtuvieron resultados positivos se cambiaron los grifos y se realizaron nuevos análisis de *Legionella*, el resultado obtenido al analizar nuevamente estos puntos, fue negativo tanto por PCR como por cultivo para las 2 muestras.

Otra de las muestras de la zona Centro que correspondía al nivel 0, procedía de un grifo de riego ubicado en un jardín, del que se obtuvo un recuento elevado de heterótrofos y no se detectó cloro, pero a pesar de estas condiciones favorables tampoco se encontró *Legionella* en la muestra.

Con el fin de evitar posibles recontaminaciones se optó por poner una válvula antiretorno en el inicio de la bifurcación de la tubería principal.

Los resultados de estos análisis se compararon con los realizados por el laboratorio privado. Las ocho muestras analizadas en el laboratorio acreditado fueron negativas por cultivo.

Después de estos análisis se consideró que el edificio no presentaba riesgo de transmisión de *Legionella*.

4 MUESTREO DE CONTROL

Un año después se realizó un nuevo análisis de control en el edificio para determinar si todavía se encontraba alguna contaminación por *Legionella*. Se realizó un análisis para detectar la presencia de ADN de *Legionella* y el recuento de células viables en el agua sanitaria del sistema.

En el momento del análisis se habían realizado unas reformas de las instalaciones, se había eliminado el acumulador del ala Norte y todavía no se había reemplazado por uno nuevo, por lo que en el ala Norte no había agua caliente en el momento de la realización del muestreo, mientras que el acumulador del ala Sur sí se había cambiado. Se realizó una toma de muestras de los puntos representativos del ala Norte, Sur y Centro, tomando en cuenta las zonas conflictivas donde se encontró *Legionella* anteriormente.

En el ala Norte se realizó un muestreo de los diferentes niveles, como se puede observar en la tabla 4.1.

Resultados

Tabla 4.1 Muestras analizadas del Ala norte del edificio.

ALA Edificio	Tipo Agua ^a	Nivel	CULTIVO <i>Legionella</i> UFC/L	PCR <i>Legionella</i>	Heterótrofos 22°C UFC/100ml	Temp. °C	Cl (ppm)
NORTE	F ^a	No	ND ^b	+	1,00x10 ³	19,8	0,34
		N1	ND	-	ND	19,1	0,35
		N2	ND	+	ND	19,6	0,36
		N3	ND	+	3,00x10 ³	18,7	0,4
		N4	ND	+	1,00x10 ³	19,6	0,29
		N5	ND	-	ND	19	0,54

^a F: fría

^b ND: no detectado

Se obtuvieron resultados negativos para el cultivo en placa de *Legionella* en todas las muestras del ala Norte, sin embargo, fueron detectados 4 resultados positivos por PCR semianidada en varios niveles del ala. En el recuento de heterótrofos se encontraron concentraciones entre 1,00x10³ ufc/100ml y 3,00x10³ ufc/100ml. En todos los casos se puede observar que la temperatura correspondía a lo esperado en este tipo de agua y el cloro se encontraba en concentraciones elevadas.

En el Centro se tomaron muestras de los puntos donde se encontró *Legionella* la primera vez, como se observa en la tabla 4.2.

Tabla 4.2 Muestras analizadas de la zona Centro del edificio.

ALA Edificio	Tipo Agua ^a	Nivel	Cultivo <i>Legionella</i> UFC/L	PCR <i>Legionella</i>	Heterótrofos 22°C UFC/100ml	Temp. °C	Cl (ppm)
CENTRO	F ^a	No	ND ^b	+	8,00x10 ³	18,6	0,74
		N8.1	ND	-	2,00x10 ⁴	19,4	0,62
		N8.2	ND	+	1,00x10 ³	19,6	0,59

^a F: fría

^b ND: no detectado

En la zona central no se obtuvieron muestras positivas por cultivo. Sin embargo, por PCR se obtuvieron dos resultados positivos. Los heterótrofos alcanzaron concentraciones máximas de 2,00x10⁴ ufc/100ml a pesar de que las concentraciones de cloro en esta zona fueron elevadas.

En el ala Sur el sistema tenía agua caliente y agua fría por lo que se tomó una

Capítulo II: Contaminación por *Legionella* de un edificio público

muestra de cada punto representativo de los dos tipos de agua, caliente y fría, como se observa a continuación en la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Muestras analizadas del Ala Sur del edificio.

ALA Edificio	Tipo agua ^a	Nivel	<i>Legionella</i> UFC/L	PCR <i>Legionella</i>	Heterótrofos 22°C UFC/100ml	Temp. °C	Cl (ppm)
SUR	F	No.1	ND ^b	-	6,00x10 ³	18,3	0,53
		No.2	ND	+	1,00x10 ³	19,8	0,32
		N1	ND	-	ND	20,3	0,35
		N2	ND	-	1,00x10 ³	20,2	0,52
		N3	ND	-	1,00x10 ³	19,2	0,37
	C	N5	ND	+	1,00x10 ³	20,4	0,31
		No.2	ND	+	1,00x10 ³	61,1	0
		N1	ND	-	ND	63,2	0
		N2	ND	-	ND	62,2	0
		N5	ND	+	1,00x10 ³	65,7	0

^a F: fría, C: caliente

^b ND: no detectado

En las muestras del ala Sur no se encontraron células viables por cultivo, pero se detectaron 4 resultados positivos para el ADN de *Legionella* con la PCR semianidada, 2 en el agua caliente y 2 en el agua fría. Los heterótrofos alcanzaron recuentos de 6,00x10³ ufc/100ml como máximo. En el agua fría las concentraciones de cloro fueron elevadas, mientras que en el agua caliente a temperaturas tan elevadas el cloro se evaporó.

En total, de todas las muestras realizadas en el edificio un 63% fueron positivas para *Legionella* por PCR semianidada. Se realizó una desinfección preventiva anual con una hipercloración del sistema, pero al no obtener células viables, según normativa no se necesita tomar acciones de control. Sin embargo el encontrar ADN de *Legionella* puede indicar que el sistema ha estado colonizado por la bacteria hace muy poco tiempo y se debe controlar que no vuelva a ser recolonizado por células viables, siguiendo un protocolo de prevención e incrementando la periodicidad en la revisión de control.

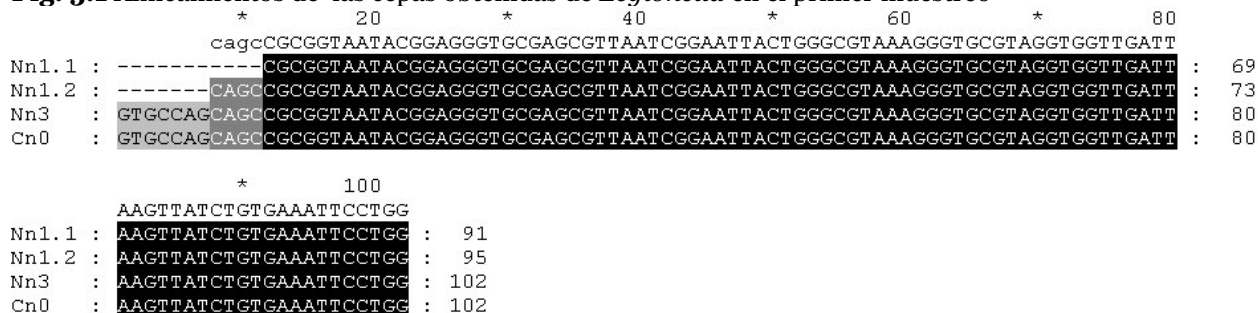
5 ALINEAMIENTOS DEL PRIMER MUESTREO

Para determinar si la contaminación del sistema de agua del edificio correspondía a la misma cepa de *Legionella*, se compararon las distintas secuencias de las colonias aisladas. Inicialmente se realizaron cultivos puros de las colonias obtenidas en el primer muestreo de este estudio, se cultivaron aislamientos puros de las tres muestras del ala Norte: las muestras Nn1.1, Nn1.2 pertenecían al remanente del agua caliente y la muestra Nn3 pertenecía al agua fría. Estas muestras tuvieron concentraciones de *Legionella* de $2,95 \times 10^4$ ufc/L, $4,02 \times 10^3$ ufc/L y $7,70 \times 10^2$ ufc/L de *Legionella* respectivamente.

También se consiguió un cultivo puro de la muestra positiva de la zona Centro que pertenecía al nivel o (Cno), en la que se detectó una carga microbiana inicial de $2,00 \times 10^1$ ufc/L.

Se realizó una secuenciación de los productos de amplificación obtenidos por PCR semianidada, se realizó el alineamiento de las secuencias como se observa en la figura 5.1. Este alineamiento demostró que las secuencias encontradas eran idénticas. La secuencia consensus se comparó con otras secuencias en la base de datos del *Genebank* mediante el programa BLAST y se encontró un 100% de homología con *Legionella pneumophila* serogrupo 1.

Fig. 5.1 Alineamientos de las cepas obtenidas de *Legionella* en el primer muestreo



N: Ala Norte, C: Zona Centro, n: nivel

6 ALINEAMIENTOS DEL SEGUNDO MUESTREO

Se realizó del mismo modo una secuenciación de los productos de PCR obtenidos en el muestreo de control, al año de la contaminación con *Legionella* del edificio.

No se aislaron células viables de *Legionella* en este muestreo, sin embargo se obtuvieron productos de amplificación por PCR semianidada, por lo que se realizaron los alineamientos con las secuencias obtenidas pertenecientes al nivel o del ala Norte, a los circuitos de agua caliente y fría del nivel o del ala Sur y del nivel o de la zona Centro (Fig 6.1).

Fig. 6.1 Alineamientos de productos de PCR obtenidos en el segundo muestreo del

```

                *           20           *           40           *           60           *           80
                caCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGG
Nn0 : GAAGCA CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGG : 80
Sn0.2 : GAAGCA CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGG : 80
Sno : ----CA CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGG : 76
Cn0 : -----CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGG : 74

                *           100          *           120          *
                GTGCGTAGGTGGTTGATTAAGTTATCTGTGAAAttcct
Nn0 : GTGCGTAGGTGGTTGATTAAGTTATCTGTGAAATTCCTGGGCTTAACCTGGGACGG : 136
Sn0.2 : GTGCGTAGGTGGTTGATTAAGTTATCTGTGAAATTCCTGGGCTTAACCTGGGACGG : 136
Sno : GTGCGTAGGTGGTTGATTAAGTTATCTGTGAAATTCCT----- : 114
Cn0 : GTGCGTAGGTGGTTGATTAAGTTATCTGTGAAA----- : 107

```

N: Ala Norte, C: Zona Centro, n: nivel

El alineamiento mostró identidad entre todas las secuencias. Al introducirlas en el programa BLAST se obtuvo un 100% de similitud con *Legionella pneumophila* serogrupo 1.

Resultados

Finalmente, se realizó un alineamiento de todas las secuencias obtenidas del primer y segundo muestreo demostrando que se trataba de la misma cepa de *Legionella pneumophila*, como se observa en la figura 6.2.

Fig. 6.2 Alineamientos de productos de PCR obtenidos en el estudio.

```

                *      20      *      40      *      60      *      80
                gtgccagcagcCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGTGC
Nn1.1 : ----- : 55
Nn1.2 : ----- : 59
Cn02  : ----- : 66
Nn3   : ----- : 66
Nn0   : ----- : 80
Sn0.2 : ----- : 80
Sno   : ----- : 80
Cn0   : ----- : 78

                *      100      *
                GTAGGTGGTTGATTAAGTTATCTGTGAAAAttcctgg
Nn1.1 : ----- : 91
Nn1.2 : ----- : 95
Cn02  : ----- : 102
Nn3   : ----- : 102
Nn0   : ----- : 116
Sn0.2 : ----- : 116
Sno   : ----- : 114
Cn0   : ----- : 107

```

N: Ala Norte, S: Ala Sur, C: Zona Centro, n: nivel

Se puede concluir que el ADN encontrado en el segundo muestreo es igual al encontrado en el primero, esto se puede explicar por una posible recolonización de la misma cepa de *Legionella pneumophila* en el sistema de distribución de agua del edificio un año después.

DISCUSIÓN

La normativa de prevención de la legionelosis en los edificios públicos se basa en el buen mantenimiento de los sistemas de distribución de agua sanitaria de los edificios y un control regular de determinados parámetros. La normativa incluye “los sistemas de agua caliente sanitaria con acumulador y circuito de retorno” en el primer grupo de instalaciones con mayor probabilidad de proliferación y dispersión de *Legionella* y “los sistemas de instalación interior de agua fría de consumo humano, tuberías, depósitos, cisternas o depósitos móviles y agua caliente sanitaria sin circuito de retorno” en el segundo grupo de riesgo (BOE, Real Decreto 865/2003). Esto implica que en sistemas de agua caliente y en sistemas de agua fría la revisión del estado de conservación y limpieza se debe realizar trimestralmente en los acumuladores y mensualmente en los puntos representativos de la red, de forma rotatoria a lo largo del año y es necesario controlar la presencia de *Legionella* como mínimo una vez al año.

La normativa establece que se debe desinfectar la instalación por medio de una hipercloración con una concentración de 20-30 ppm y se debe hacer llegar a los puntos terminales de la red entre 1-2 ppm durante al menos 2 horas. En el caso de la desinfección térmica, se debe elevar la temperatura a 70°C y dejar que alcance una temperatura de 60°C en los puntos terminales de la red, manteniendo esta temperatura durante 2 horas. En cualquier caso la normativa determina que se debe analizar la presencia de *Legionella* en muestras de puntos representativos de la instalación de riesgo, este análisis se basa en el cultivo de muestras concentradas por filtración (ISO 11731-1998).

Como describen Moore *et al.* 2005, el riesgo de colonización de los edificios está asociado a diferentes factores, como el grado de complejidad del sistema de agua de la instalación, el tipo de calentador o la antigüedad del edificio, pero también están otros factores como el mantenimiento y control que se haga del sistema de agua del edificio.

Discusión

Este estudio se inició a raíz del mantenimiento anual que recibe un edificio de uso público. De acuerdo con la normativa, el sistema de distribución del agua sanitaria se desinfectó con hipoclorito de sodio. El problema surgió cuando a pesar de los distintos procesos de mantenimiento, limpieza y desinfección, *Legionella* no solo no desapareció del sistema sino que su número se fue incrementando. Este hecho enmascaró otros dos muy importantes, el análisis de las muestras se fue centrando en una única zona del sistema donde se detectó *Legionella* por primera vez y en segundo lugar, el proceso se estaba alargando en el tiempo, lo que implicaba un riesgo de salud debido a que este edificio en particular es de uso público y que en un periodo corto de tiempo se preveía una gran concentración de personas en sus instalaciones. En el proceso de mantenimiento de la instalación de agua del edificio, previo al estudio en nuestro laboratorio, el sistema se había intentado desinfectar aplicando dos métodos: la hipercloración y el incremento de la temperatura en los circuitos de agua caliente. Como mínimo se realizaron dos desinfecciones con cloro, pero en ambos casos, posiblemente por la alta complejidad del sistema de agua, la desinfección del sistema no funcionó.

El sistema del edificio estudiado era muy complejo, con 3 alas de distinta altura, todas ellas con agua sanitaria fría y dos de ella, además, con acumuladores y agua sanitaria caliente con retorno. Todo el sistema constaba de más de 50 grifos, pero no todos se usaban con regularidad.

El agua procedente de la red pública mantiene la concentración de cloro en los circuitos de agua fría, pero no en los de agua caliente, debido a que se evapora rápidamente. A pesar de la complejidad del sistema, la compañía que realizaba el mantenimiento y desinfección recogió inicialmente solo 6 muestras representativas de todo el edificio.

La primera parte de este estudio se basó en el reconocimiento lo más rápido y exacto posible del estado de contaminación por *Legionella* del edificio. Por ello el primer paso fue conocer el diseño del sistema de distribución de agua fría y caliente. A partir de esto, se escogieron puntos representativos donde hacer el

muestreo. Se analizaron 2 muestras del remanente de agua caliente del ala Norte, 5 muestras de agua caliente de diferentes niveles del ala Sur y 24 muestras de agua fría de todos los niveles y alas del edificio.

En segundo lugar se realizó el análisis de las muestras aplicando dos técnicas que proporcionan una información complementaria: una técnica molecular basada en la PCR que aunque no es reconocida como un método de referencia a nivel europeo (Morio *et al.* 2007), permite determinar rápidamente la presencia de ADN de *Legionella* en el agua y otra técnica basada en cultivo que permite conocer el número de células viables y potencialmente infecciosas (ISO 11731-1998), que es la que la legislación reconoce. El método de cultivo es un método estándar para la detección de *L. pneumophila*, sin embargo existe el riesgo de subestimar el número de células detectadas con este método.

Los resultados obtenidos aplicando la técnica molecular y la de cultivo fueron distintos, se determinó que los porcentajes de contaminación estuvieron entre un 15% por cultivo y un 72% por PCR y en todos los casos donde se aislaron células viables de la bacteria se trataba de *Legionella pneumophila* serogrupo 1.

En un estudio realizado por Yáñez *et al.* 2007, en muestras ambientales, encontraron diferencias en los resultados obtenidos de *L. pneumophila* por cultivo y por PCR. Obtuvieron 6 de 13 muestras negativas por cultivo, pero en todos los casos eran positivas por PCR. En otros estudios Yáñez *et al.* 2005 demostraron que los resultados de un cultivo puro de *Legionella*, analizado por PCR y por cultivo, eran coincidentes, debido a que la mayoría de células se encontraban en estado viable y cultivable; esto no siempre es así cuando se analizan muestras ambientales, ya que con esta técnica el fragmento de ADN que es amplificado, incluye bacterias muertas, restos de ADN, células no viables y las células viables pero no cultivables. Además la eficiencia de recuperación de células viables a partir de muestras ambientales por cultivo es normalmente muy baja, debido al crecimiento o sobrecrecimiento de otras bacterias acompañantes y/o debido a los tratamientos ácidos o térmicos que están estipulados para eliminar las bacterias acompañantes y que pueden afectar la

viabilidad de *Legionella*. Por todas estas razones es esperable que el número de muestras ambientales positivas por PCR sea en general mayor al obtenido por cultivo (Steinert *et al.* 2002).

Los resultados por cultivo y por PCR demostraron que el circuito de agua fría del ala Norte estaba parcialmente contaminado y el circuito del agua caliente del ala Sur estaba totalmente contaminado, sin embargo el agua fría presentó niveles menores de contaminación. Del mismo modo se encontró presencia de *Legionella* en la zona Centro, donde el sistema solo es de agua fría.

Han sido descritos muchos métodos de PCR para la detección de *Legionella* en muestras clínicas y ambientales (Ballard *et al.* 2000, Catalán *et al.* 1994, Hayden *et al.* 2001, Fiume *et al.* 2005, Yáñez *et al.* 2007, Jonas *et al.* 1994). Según Yáñez *et al.* 2007, está ampliamente demostrada la alta especificidad y sensibilidad de esta técnica, por lo que puede ser una buena alternativa al método estándar de aislamiento por cultivo, especialmente cuando se necesitan resultados en un corto plazo y cuando las muestras en estudio contienen abundante microbiota. Sin embargo, la PCR convencional es un ensayo cualitativo que solo revela la presencia o ausencia del microorganismo en estudio y no determina la viabilidad celular.

En el presente estudio, la aplicación de la PCR permitió conocer en menos de 24 horas el nivel de contaminación del sistema hídrico de todo el edificio. El análisis demostró que más del 50% de las muestras que fueron negativas por cultivo contenían ADN de *Legionella*. Si se considera la detección por zonas, la información obtenida aún fue más precisa.

En bibliografía hay muchos casos descritos de contaminación de edificios públicos por *Legionella*, detectada por el método de cultivo. Autores como Borella *et al.* 2004 y Leoni *et al.* 2001, realizaron un estudio de diferentes sistemas de distribución de agua en edificios por la alta complejidad del funcionamiento de éstos, estudiaron sistemas independientes con calentadores de gas y calentadores eléctricos, sistemas centralizados y sistemas con

recirculación de agua. Encontraron que la colonización de *Legionella* en este tipo de sistemas era muy diferente, en los sistemas eléctricos no encontraron presencia de *Legionella*, en los sistemas de agua independiente con calentadores de gas encontraron una contaminación moderada y en los sistemas centralizados encontraron con más frecuencia contaminación por *Legionella pneumophila* que correspondía al sg 2-14.

Estudios realizados por Maiwald *et al.* 1995, que analizaron 78 muestras de un sistema de agua, obtuvieron el 73% de los resultados positivos para *Legionella* por el método de cultivo y por PCR. Solo por PCR fueron positivas 9 muestras (11,5%), otras 9 fueron positivas solo por cultivo y negativas por PCR (11,5%) y tres fueron negativas por ambas técnicas (3,8%). Autores como Miyamoto *et al.* 1997 estudiaron 42 muestras de agua, de las cuales el 91,8% fueron positivas por PCR y el 79,5% por cultivo.

En este estudio, los resultados encontrados de la presencia de *Legionella*, aplicando la PCR semianidada, el cultivo en placa y la comparación de secuencias de las diferentes cepas aisladas de circuitos distintos, indican que el origen de la contaminación posiblemente fue el circuito del agua caliente del Ala Norte y esta contaminación se fue extendiendo por todo el edificio. Por tal razón y con el fin de solucionar el problema se separaron físicamente el sistema de agua caliente y fría, para lo cual se cerraron todas las válvulas de conexión de los sistemas de agua caliente, se desconectaron todas las tuberías del agua caliente de los grifos y duchas del sistema sanitario y se eliminaron los dos acumuladores. Se realizó una hipercloración del sistema hídrico del edificio y los grifos se desmontaron y desinfectaron con cloro a una concentración de 20ppm durante 30 minutos.

Autores como Mouchtoury y Hadjichristodoulou 2007 y Borella *et al.* 2000 sugieren, según sus estudios, que la desinfección térmica parece no ser eficiente para la eliminación de concentraciones altas de *Legionella* y que podría mejorarse incrementando el tiempo de desinfección térmica, además de una combinación con la desinfección con cloro. El EWGLI, 2008 (*European*

Working Group for Legionella Infections), recomienda además, una temperatura constante entre 55°C y 60°C en las aguas calientes sanitarias. Estos autores describen que en los grifos y duchas la temperatura del agua varía a causa del estancamiento producido en las tuberías, lo que permite la supervivencia y el crecimiento de *Legionella*. Así mismo Mouchtoury y Hadjichristodoulou 2007 explican que los puntos distales de las instalaciones de agua pueden ser lugares donde *Legionella* se protege de las altas temperaturas para luego recolonizar el sistema pocas semanas después del tratamiento de desinfección y en el caso del tratamiento térmico afirman que la recomendación de las normativas de dejar correr el agua durante 5 minutos a una temperatura de salida de 60°C podría no ser suficiente para eliminar *Legionella* de los grifos.

Estos autores recomiendan el desmantelamiento, limpieza y reemplazo de duchas y grifos cuando se produce la colonización de *Legionella* en el sistema y sugieren que la desinfección térmica podría mejorarse aumentando la duración del tratamiento de los 5 minutos recomendados hasta 10 minutos o más, como explican Stout *et al.* 1997. Esto es confirmado por autores como Chang *et al.*, 2006 que han demostrado que se produce la eliminación de células cultivables de *Legionella* a temperaturas de más de 60°C entre los 5 y 30 minutos.

Anteriormente esto fue comprobado por Steinert *et al.* 1998, que observaron que se producía la eliminación de *Legionella* a 60°C durante 10 minutos. Así mismo, otros autores como Stout *et al.* 1986, reportaron una reducción de la viabilidad de *Legionella* de 8 logaritmos entre 60°C y 80°C en 25 minutos después de un tratamiento y Miyamoto *et al.* 2000, reportaron una reducción de *Legionella* entre 5 y 6 logaritmos a temperaturas entre 60°C o 70°C durante 30 minutos.

En el presente estudio, tras comprobar que la temperatura del agua en los acumuladores no alcanzaba los 60°C, se decidió instalar nuevos acumuladores con capacidad para calentar el agua a 70°C que es la temperatura necesaria para actuar como biocida frente a *Legionella*. La desinfección térmica ha sido estudiada por autores como Mouchtoury y Hadjichristodoulou 2007, que han

visto que la eliminación de *Legionella* no es totalmente efectiva con este tipo de tratamiento y aunque se considera más efectiva que otras estrategias consideran que su eficacia no es duradera. Estos autores también observaron que los sistemas de agua caliente alcanzaron en los grifos temperaturas de 65°C, una temperatura más que adecuada para la destrucción de *Legionella* según las normativas, sin embargo, encontraron que *Legionella* no era totalmente eliminada a estas temperaturas. Por lo que sugieren que estas células tienen mecanismos de protección que facilitan la recolonización de los sistemas de tuberías. Estos mecanismos pueden estar asociados al biofilm por su capacidad de recrecer rápidamente y porque no pueden ser totalmente destruidos, sirviendo así de soporte a *Legionella* y a otros microorganismos. Por lo que el biofilm puede limitar la efectividad de los métodos de desinfección y favorecer a la colonización de *Legionella* en los sistemas de distribución de agua. Por otra parte, autores como Moore *et al.* 2005 encontraron asociación entre la colonización de *Legionella* con la presencia de amebas en el tratamiento de desinfección con cloro. Autores como Breinnan *et al.* 1990 y Donlan *et al.* 2005 sugieren que las amebas albergan *Legionella* durante la desinfección de los sistemas de agua con cloro y que la susceptibilidad de la bacteria a los desinfectantes se reduce cuando se encuentra asociada a éstas en biofilms.

En este estudio se realizó un segundo muestreo de control un año después de la colonización por *Legionella*, se escogieron puntos representativos de las 3 alas y sobre todo considerando las zonas conflictivas que fueron positivas para *Legionella* en el primer muestreo. En estas muestras no se encontraron resultados positivos por cultivo en ninguna de ellas, sin embargo por PCR semianidada se obtuvieron resultados positivos en 10 puntos de muestreo de diferentes alas del edificio, 4 pertenecían al ala Norte, 2 al Centro y 4 al ala Sur. A pesar de que esto indicaba la presencia de *Legionella* en el sistema, por normativa (BOE, Real Decreto 865/2003), al no estar reconocido el método de la PCR para la identificación de una contaminación por *Legionella* en las instalaciones de riesgo, no se exige realizar ninguna acción correctiva en el sistema. En este segundo análisis, se observó que las concentraciones de cloro se mantuvieron elevadas en los diferentes niveles y alas del edificio, entre 0,29 y

0,71 ppm, sin embargo el que se encontrara ADN de *Legionella* en las distintas muestras del sistema hídrico, indica que en algún punto del sistema existe la presencia de células viables de *Legionella* y que el nivel de biocida no es suficientemente elevado o no se mantiene con niveles altos, por lo que es muy probable que en futuros controles se encuentren resultados positivos por cultivo. Esto está corroborado por autores como Chang *et al.* 2006, que reportaron que con la desinfección por cloración en concentraciones de 0,5 ppm y 2 ppm se obtuvo una pérdida completa de la viabilidad de *Legionella*. Esta pérdida de viabilidad fue también consistente con los resultados obtenidos por Kuchta *et al.* 1993, a concentraciones de cloro de 0,5 ppm o según autores como Miyamoto *et al.* 2000 y Skaliy *et al.* 1980 a concentraciones de 2 ppm y 3,3 ppm, respectivamente. Así también Chang *et al.* 2006, afirman que los tratamientos de desinfección con cloro y la desinfección térmica inhiben la viabilidad de *Legionella* en sistemas de agua caliente oligotrófica.

Los sistemas de agua de grandes edificios pueden tener una alta complejidad tal y como se refleja en este estudio y a pesar de que se trataba de un mismo edificio se obtuvieron resultados muy distintos en los diferentes tramos de los niveles y departamentos, además se encontraron diferencias según el tipo de agua, caliente o fría. Según autores como Borella *et al.* 2004, las diferentes especies de *Legionella* y los distintos serogrupos se encuentran distribuidos en relación al tipo de agua, a la temperatura y al cloro libre, lo que sugiere que *Legionella* tiene diferente grado de sensibilidad y resistencia a distintos factores ambientales y nichos ecológicos. Así mismo, la formación de biofilms en este tipo de sistemas está influenciada por factores como el tipo de material del que está formado el sistema de tuberías de agua, la concentración y calidad de los nutrientes, desinfectantes y la temperatura (Zacheus y Martikainen, 1996).

Según los resultados obtenidos en el presente estudio, para el análisis de la presencia de *Legionella* en sistemas de agua sanitaria de edificios, posiblemente el sistema de control actual es el más barato y es suficiente para controlar los sistemas de agua sanitaria, especialmente si está controlada en cuanto a lo que se refiere a la concentración de heterótrofos, cloro y temperatura del agua. Pero

tendría que vigilarse con mayor atención la temperatura máxima de los calentadores y el tiempo de exposición de temperatura y la concentración de cloro, al que se debe someter el sistema hídrico. Además, la técnica de la PCR permite hacer un cribado (*screening*) rápido del grado de contaminación de un circuito de agua sanitaria en un edificio y es un análisis molecular complementario a la técnica de cultivo, que puede proporcionar una mayor información del grado de contaminación de una instalación de riesgo, tomar las medidas necesarias con mayor rapidez. Además, consideramos que las normativas actualmente utilizadas deberían tener una definición más precisa de lo que son los puntos críticos representativos y lo que es un buen diseño del sistema hídrico. Se deberían realizar estudios para determinar con precisión el porcentaje de muestras a analizar (muestras representativas) y el porcentaje de resultados positivos a partir del cual se debería de considerar que el uso del agua lleva asociado un riesgo de infección por *Legionella*.

CONCLUSIONES

1. Se identificaron los puntos de muestreo representativos del sistema hídrico de un edificio público, considerando el diseño de las tuberías de los circuitos de agua caliente y fría.
2. Se determinó la contaminación de *Legionella* aplicando la normativa ISO 11731-1998, que se basa en el cultivo en placa de la bacteria y por una técnica molecular, la PCR semianidada. La aplicación de la técnica molecular detectó la presencia de la bacteria en el 71% de las muestras del sistema de agua del edificio en 24 horas.
3. Los resultados indicaron que todo el sistema hídrico estaba contaminado, aunque no de forma homogénea, los valores de células viables cultivables más importantes se encontraron en el circuito de agua caliente de la zona Norte. El alineamiento de las secuencias de las bacterias aisladas indicó que posiblemente todo el circuito estaba contaminado por la misma cepa.
4. El conocimiento de la extensión de la contaminación y del diseño y funcionamiento del sistema hídrico, determinaron las medidas a aplicar para controlar la presencia de *Legionella* en el sistema.
5. El análisis del sistema de agua del edificio un año más tarde indicó la presencia de ADN de *Legionella* y la ausencia de células viables cultivables, posiblemente por el mantenimiento de un elevado nivel del biocida en el sistema, que sin embargo se ve reducido por el grado de complejidad del edificio.

**CAPÍTULO III: ESTUDIO DE *LEGIONELLA*
EN AGUAS SANITARIAS CALIENTES Y
TORRES DE REFRIGERACIÓN**

RESULTADOS

Se realizó un estudio de aguas sanitarias calientes de dos tipos de edificios públicos: hoteles y residencias geriátricas. Durante el mismo periodo de tiempo se realizaron muestreos de aguas de torres de refrigeración de un edificio público. Por el grado de complejidad en el diseño y funcionamiento de estos sistemas, dividimos este estudio en dos grupos: Aguas Sanitarias Calientes y Torres de refrigeración.

En todas las muestras se realizaron análisis microbiológicos con el fin de determinar la presencia de *Legionella* y microorganismos acompañantes como heterótrofos a 37°C, heterótrofos a 22°C, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* y protozoos. Todos ellos forman parte de la biota de los circuitos de agua y pueden formar biofilms en los sistemas de tuberías o en el fondo y las paredes de los tanques de agua. También se analizaron parámetros fisicoquímicos como temperatura, pH, turbidez, concentración de carbono orgánico, Fe, Cu, Zn y cloro como biocida.

1 AGUA SANITARIA CALIENTE (ASC)

Se analizaron 231 muestras de agua sanitaria caliente (ASC). El muestreo de las primeras 107 muestras se realizó siguiendo el protocolo descrito por el BOE, Real Decreto 865/2003, por el que se establecen los criterios higiénicos sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis. Este protocolo consiste en la mezcla de 100ml de agua al abrir el grifo (AGUA PROXIMAL) y cuando el agua alcanza su máxima temperatura, hasta una muestra final de 1L, (AGUA DISTAL). Con este tipo de muestreo se busca obtener una muestra representativa de todo el sistema de agua.

1.1 Muestras “Mezcla”.

1.1.1 Descripción de parámetros microbiológicos de muestras de agua sanitaria caliente (Mezcla)

Dado que el método de muestreo se realizó según lo establecido por el Real Decreto BOE 865/2003, a este tipo de muestra se denominó MEZCLA. Se realizó el aislamiento e identificación de *Legionella spp.*, Heterótrofos a 22°C, Heterótrofos a 37°C, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y protozoos, los métodos de aislamiento en cada caso se encuentran descritos en materiales y métodos apartados 2.1,2.2,2.3,2.4.

Los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla 1.1.1.1 a continuación y están expresados en medias geométricas, valores máximos y mínimos y porcentajes de casos positivos de cada parámetro microbiológico.

Tabla 1.1.1.1 Parámetros microbiológicos de las muestras de agua sanitaria caliente (Mezcla), porcentaje de los datos positivos de cada caso, media geométrica, máximos y mínimos.

	% Positivos Cultivo	% positivos PCR	Media geométrica ufc/100ml	Máximo ufc/100ml	Mínimo ufc/100ml
<i>Legionella</i>	26% (28/107)	35% (38/107)	3,53x10 ⁰	2,95x10 ³	ND ^b
Het 22°C	82% (88/107)	NA ^a	7,94x10 ⁴	8,80x10 ⁷	<5,00x10 ²
Het 37°C	86% (92/107)	NA	1,50x10 ⁵	8,00x10 ⁷	<5,00x10 ²
<i>Pseudomonas</i>	44% (47/107)	NA	6,76x10 ⁰	2,00x10 ⁴	<1,00x10 ⁰
<i>Aeromonas</i>	ND	NA	<1,00x10 ⁰	<1,00x10 ⁰	<1,00x10 ⁰
Protozoos	25% (27/107)	22% (24/107)	NA	NA	NA

^a NA: no analizado

^b ND: no detectado

Het: Heterótrofos

Con el fin de detectar y cuantificar la posible presencia de *Legionella* en las muestras de agua sanitaria caliente, antes de ser analizadas se concentraron por el método de filtración de acuerdo con la normativa ISO 11731-1998, expuesta en el apartado 4.1 de material y métodos.

Para el aislamiento de *Legionella* el concentrado de cada muestra se analizó mediante dos técnicas: una técnica de cultivo en placa de agar BCYE y una técnica de PCR semianidada que amplifica un fragmento de 234 pb del ADN que codifica para el 16S ARNr común a todas las especies del género *Legionella*.

Al analizar *Legionella* por el método de cultivo se obtuvieron 28 muestras positivas de un total de 107 (tabla 1.1.1.1), con una media geométrica de $3,53 \times 10^0$ ufc/100ml y un valor máximo de $2,95 \times 10^3$ ufc/100ml. Mediante la PCR diseñada por Jonas *et al.* 1995 obtuvimos 30 muestras positivas para ADN de *Legionella* spp. (anexo 2.1).

Sin embargo se obtuvieron algunas muestras con células cultivables y negativas por PCR, lo que nos hizo sospechar de la presencia de inhibidores. Con el fin de eliminarlos se realizó el proceso de extracción del ADN a partir de los concentrados de las muestras utilizando el método de resinas AG501-X8 de Bio-Rad para la purificación de ADN. Además, se realizó una modificación de la PCR de Jonas *et al.* 1995 y se diseñó una PCR semianidada. La aplicación del proceso de purificación a las muestras analizadas, permitió detectar amplicones en todas las muestras con crecimiento en placa, por lo que los resultados positivos para ADN de *Legionella* spp. aumentaron a 38 (tabla 1.1.1.1). Finalmente, en este tipo de muestras se detectó la presencia de *Legionella* en un 26% por cultivo y un 35% por PCR (tabla 1.1.1.1). La identificación de las colonias crecidas aplicando el kit de *Legionella Latex Test* (anexo 2.1 de materiales y métodos) indicó la presencia de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 en 14 de las muestras, *L. pneumophila* serogrupo 2-14 en 13 de las muestras y

Resultados

Legionella spp. en la muestra restante.

Cuando se realizó el análisis de los otros parámetros microbiológicos estudiados, se obtuvieron los siguientes resultados: los heterótrofos a 22°C fueron positivos en el 82% de las muestras de agua caliente sanitaria, con una media geométrica de $7,94 \times 10^4$ ufc/100ml y un valor máximo de $8,80 \times 10^7$ ufc/100ml. Se detectaron resultados positivos de heterótrofos a 37°C, en el 86% de las muestras, con una media geométrica de $1,50 \times 10^5$ ufc/100ml y con un valor máximo de $8,00 \times 10^7$ ufc/100ml (tabla 1.1.1.1). Cuando se analizó *Pseudomonas* mediante cultivo, se detectaron casos positivos en el 44% de las muestras con una media geométrica de $6,76 \times 10^0$ ufc/100ml y un valor máximo de $2,00 \times 10^4$ ufc/100ml (tabla 1.1.1.1). Se realizó también el análisis de *Aeromonas* mediante la técnica de cultivo, sin embargo, no se obtuvo en ninguna muestra resultados positivos para esta bacteria (tabla 1.1.1.1). Se determinó la presencia de protozoos en las muestras de agua sanitaria caliente mediante observación directa de la muestra sedimentada y por una técnica cualitativa de cultivo (materiales y métodos 2.4). Además se realizó una PCR del 18S ARNr de eucariotas para detectar protozoos, basada en el protocolo de Thomas *et al.* 2006 (materiales y métodos 6.4), modificando los cebadores para evitar la competencia entre ellos y mejorar la especificidad de la técnica. Del total de las muestras analizadas se detectó la presencia de protozoos por observación en el 25% y por PCR se detectó un 22% de muestras positivas.

1.1.2 Descripción de parámetros fisicoquímicos de agua sanitaria caliente (Mezcla)

En este estudio se analizaron factores fisicoquímicos como la temperatura, el pH, el Cl y la turbidez, metales como Fe, Zn y Cu y el carbono orgánico total (COT). Los resultados de las medias, máximos y mínimos de las 107 muestras se pueden observar a continuación.

Capítulo III: *Legionella* en ASC y torres de refrigeración

Tabla 1.1.2.1 Parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua sanitaria caliente, medias, máximos y mínimos (Mezcla).

	Media	D. Standard	Máximo	Mínimo
Temp (°C)	48,34	11,35	71,70	18,00
Turbidez (NTU)	0,73	0,43	2,02	0,16
pH	7,60	0,47	8,63	6,00
Fe (ppm)	0,03	0,06	0,42	<0,01
Zn (ppm)	0,18	0,18	0,90	<0,02
Cu (ppm)	0,35	0,46	2,10	<0,01
COT (ppm)	2,73	4,70	29,60	0,42
Cl (ppm)	0,04	0,20	2,00	0,00

Temp: temperatura , Fe: Hierro, Zn: Cinc, Cu: Cobre, COT: carbono orgánico total (ppm), Cl: Cloro (ppm)

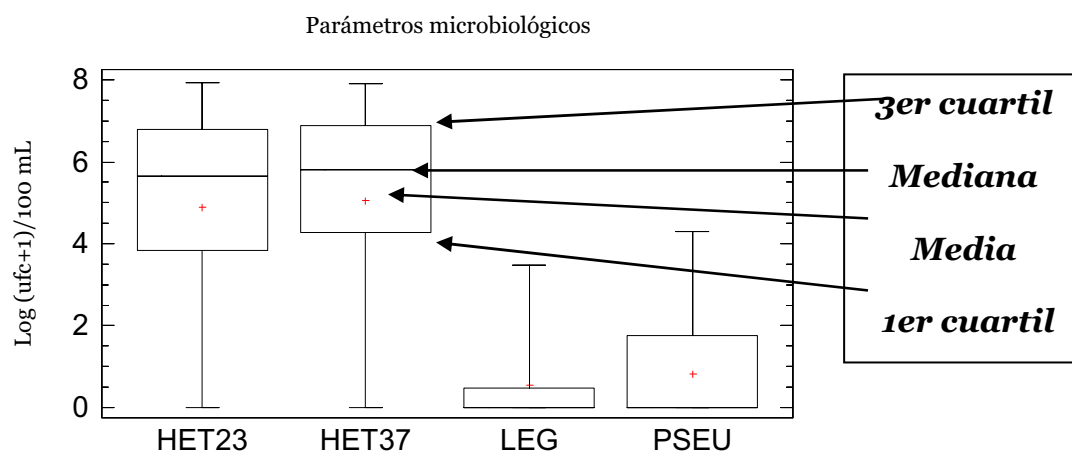
Las muestras tuvieron una temperatura media de 48°C y estos valores oscilaron entre 71°C y 18°C. En el caso de la turbidez se obtuvo un valor medio de 0,73 NTU oscilando entre 2 NTU y 0,16 NTU. El pH de todas las muestras tuvo una media de 7,60 con un máximo de 8,63 y un mínimo de 6. En el caso de los metales analizados, obtuvimos una concentración media para el Fe de 0,03 ppm con un máximo de 0,42 ppm, el Zn tuvo una concentración media de 0,18 ppm con un máximo de 0,90 ppm y el Cu tuvo una concentración de 0,35 ppm con una concentración máxima de 2,10 ppm. Al analizar el carbono orgánico total (COT) de las 107 muestras se obtuvo una concentración media de 2,73 ppm con un mínimo de 0,42 ppm y una concentración máxima de 29,60 ppm (tabla 1.1.2.1). En este tipo de aguas el biocida que se utilizaba para la desinfección fue el cloro, sin embargo, en el agua caliente el cloro se evapora rápidamente, detectándose cloro en el 12% de las 107 muestras analizadas, con un valor medio de 0,04 ppm y con un máximo de 2 ppm.

Resultados

1.1.3 Descripción estadística de los diferentes parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de muestras de agua sanitaria caliente (Mezcla)

Con cada uno de los parámetros bacteriológicos de las 107 muestras de agua sanitaria caliente, se realizaron análisis estadísticos. En las figuras 1.1.3.1, 1.1.3.2 y 1.1.3.3, se puede observar la distribución de los resultados cuantitativos de las bacterias analizadas, *Legionella*, *Pseudomonas*, Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 37°C.

Fig. 1.1.3.1 Diagrama de cajas de la distribución de datos de los parámetros microbiológicos, provenientes del agua sanitaria caliente (Mezcla).



Leg: *Legionella*, Het 22: heterótrofos a 22°C, Het 37: heterótrofos a 37°C, PSEU: *Pseudomonas*. Los datos están expresados en $\log(\text{ufc}+1)/100\text{mL}$.

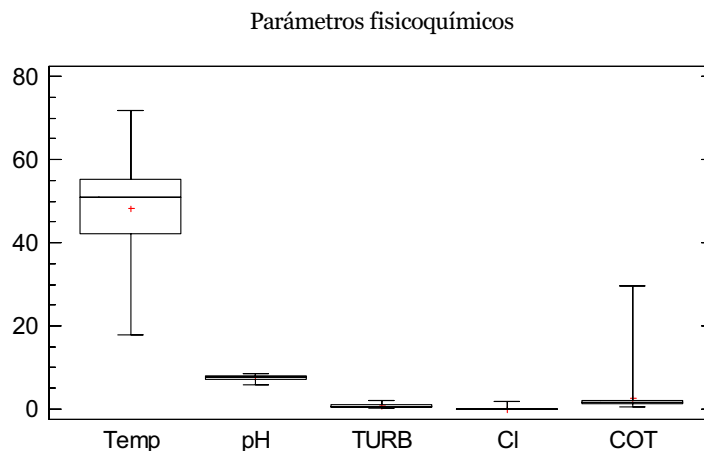
Se puede observar en la figura 1.1.3.1 la representación de la distribución de datos en diagrama de cajas de cada parámetro microbiológico.

En el caso de Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 37°C, se observa que tienen una distribución de datos, una media y una mediana muy similar entre sí y no existe ninguna diferencia significativa entre ellos, mientras que comparando las medias de sus datos con las medias obtenidas de los resultados de *Legionella* y *Pseudomonas* se observa que sí existe una diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

La prueba de múltiples rangos (datos no mostrados), realizada con el programa *Statgraphics Centurion XV*, aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, permitiendo agrupar aquellos parámetros que forman un grupo homogéneo (medias que no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí), y separa aquellos grupos con medias significativamente diferentes.

Así, al comparar las medias de los resultados obtenidos, los Heterótrofos a 22°C y a 37°C, forman un grupo homogéneo de medias por lo que no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sus valores. Mientras que con *Legionella* y *Pseudomonas* no están agrupados, y tampoco los valores de estos dos últimos microorganismos forman un grupo homogéneo, por lo tanto existen diferencias estadísticas entre ellos.

Fig. 1.1.3.2 Diagrama de cajas de la distribución de los datos de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua sanitaria caliente (Mezcla).

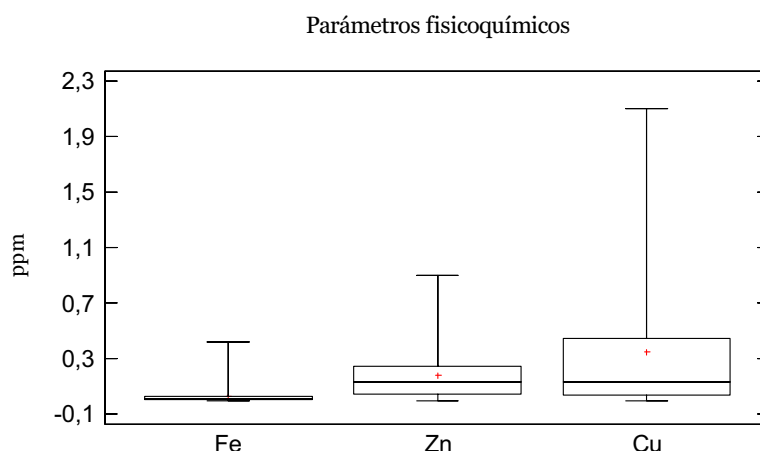


Temp: Temperatura (°C), TURB: Turbidez (NTU), Cl: Cloro (ppm), COT: Carbono Orgánico Total (ppm)

En la figura 1.1.3.2 se pueden observar la distribución de los datos de los parámetros fisicoquímicos, con una clara diferencia entre la dispersión de datos de la temperatura con el resto de los parámetros. Según la prueba de múltiples rangos a un nivel del 95% de confianza, existen diferencias significativas entre todos los parámetros fisicoquímicos estudiados.

Resultados

Fig. 1.1.3.3 Diagrama de cajas de la distribución de datos de los metales, en las muestras de agua sanitaria caliente (Mezcla).



Fe: Hierro, Zn: Cinc, Cu: Cobre.

En la figura 1.1.3.3 se puede observar la distribución de datos de los metales analizados en este tipo de muestras. El cobre presenta una mayor dispersión de datos. Según la prueba de múltiples rangos se encuentran diferencias significativas a un 95% de confianza entre Cu-Fe y Cu-Zn. Sin embargo, el Fe y el Zn pertenecen a un mismo grupo de medias, es decir que no existen diferencias estadísticamente significativas entre sus valores.

En resumen, se puede observar que la distribución de datos de las variables analizadas en este tipo de muestras presentan diferencias significativas en el caso de los parámetros microbiológicos, así las medias de los Heterótrofos a 22°C y a 37°C presentan diferencias estadísticamente significativas al 95% de confianza con parámetros como Pseudomonas y Legionella, así como entre estos parámetros también se encontraron diferencias significativas.

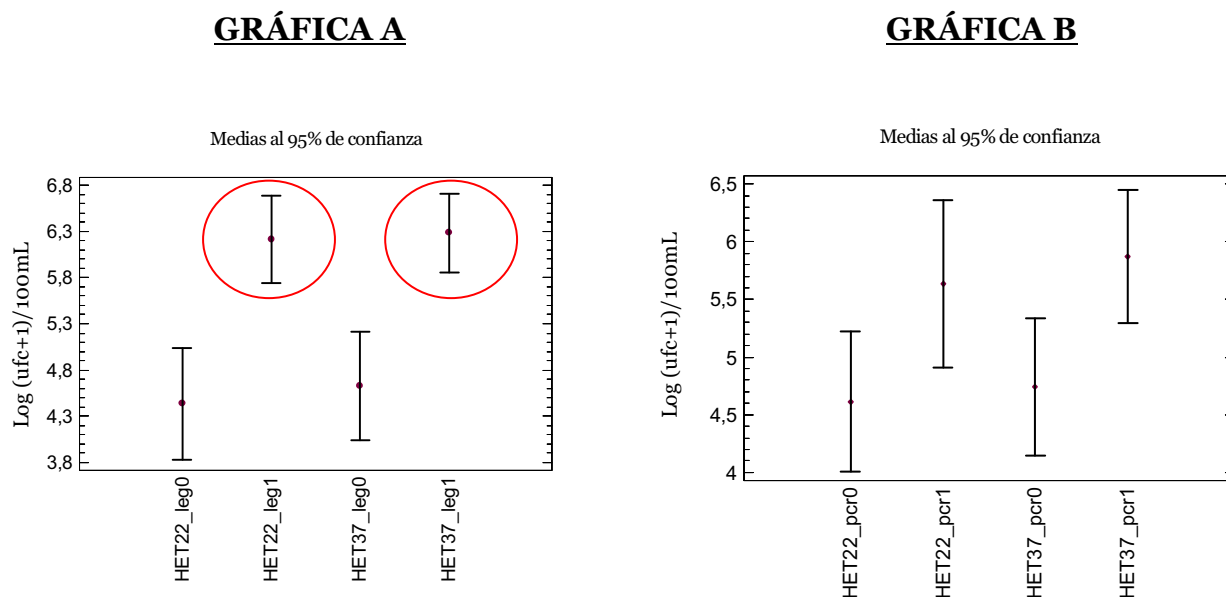
En el caso de los parámetros fisicoquímicos se obtuvo que, los valores de la temperatura tuvieron una distribución más amplia de sus datos que el resto de los parámetros fisicoquímicos. Así la temperatura, pH, turbidez, cloro y COT presentaron diferencias estadísticamente significativas. En el

caso de los metales, se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de Cu-Zn y entre Cu-Fe. Mientras que el Fe y el Zn no presentaron diferencias significativas.

1.1.4. Parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* de muestras de agua sanitaria caliente (Mezcla)

Se realizó un análisis estadístico de los diferentes parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en relación a los resultados de presencia y ausencia de *Legionella* obtenida mediante la técnica de cultivo (gráfica A) y obtenida por el método de la PCR semianidada (gráfica B).

Fig. 1.1.4.1 Medias con intervalos al 95% de confianza, de Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 37°C en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* (Mezcla).



Het: heterótrofos, Leg 0: Ausencia de *Legionella* por cultivo, Leg 1: Presencia de *Legionella* por cultivo,pcr0: Ausencia de *Legionella* por PCR,pcr1: Presencia de *Legionella* por PCR.

Estos análisis estadísticos representan las medias de los parámetros analizados con intervalos de confianza al 95%, que sirven para determinar que medias son significativamente diferentes de otras.

Se puede observar en la gráfica A, que al comparar los resultados de

Resultados

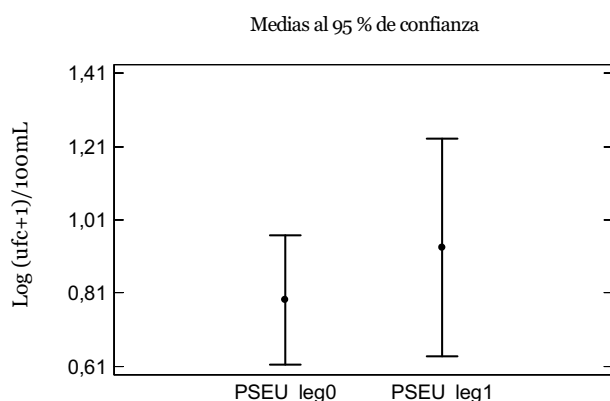
heterótrofos en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo, los intervalos de Heterótrofos a 22°C y a 37°C en ausencia y presencia de *Legionella* son significativamente diferentes. Es decir, existe mayor probabilidad de encontrar presencia de *Legionella* cuando los parámetros de Heterótrofos a 22°C y a 37°C están por encima de $5,8\log(\text{ufc}+1)/100\text{ml}$ (gráfica A). Esto se comprobó mediante la prueba de múltiples rangos a un 95% de confianza (datos no mostrados).

Así, los resultados obtenidos con *Legionella* muestran que hay presencia, fueron positivos cuando los valores de heterótrofos a 22°C son superiores a $8,64 \times 10^7$ ufc/100ml, o los valores de heterótrofos a 37°C son mayores a $2,80 \times 10^7$ ufc/100ml.

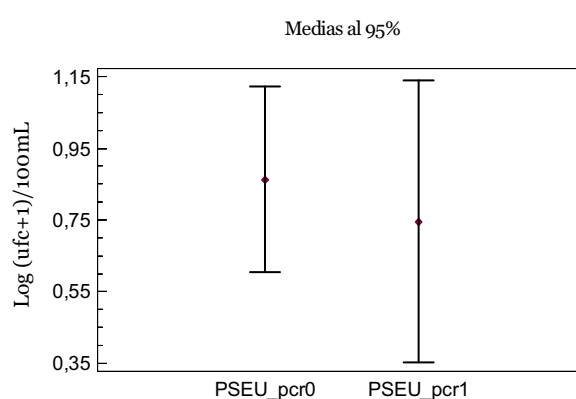
En la gráfica B cuando se comparan los valores de los resultados de Heterótrofos a 22°C y a 37°C en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por PCR, según la prueba de múltiples rangos a un nivel del 95% de confianza, no existen diferencias significativas entre las medias. Sin embargo, se observa que la presencia de ADN de *Legionella* se asocia a valores elevados de Heterótrofos a 22°C y de Heterótrofos a 37°C.

Fig. 1.1.4.2 Medias con intervalos al 95% de confianza de *Pseudomonas* en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo y por PCR (Mezcla).

GRÁFICA A



GRÁFICA B



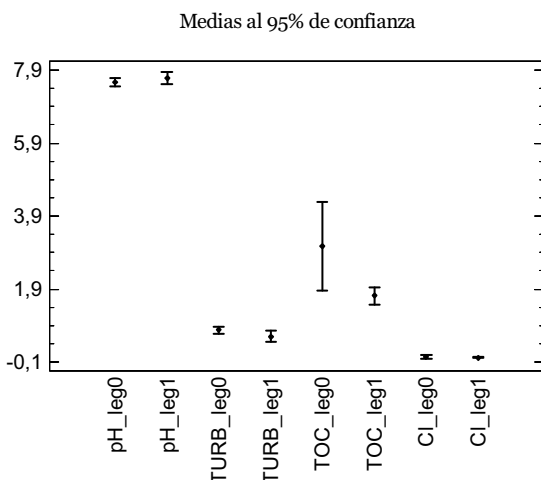
PSEU: *Pseudomonas*, Leg 0: Ausencia de *Legionella* por cultivo, Leg 1: Presencia de *Legionella* por cultivo, pcr0: Ausencia de *Legionella* por PCR, pcr 1: Presencia de *Legionella* por PCR

Capítulo III: *Legionella* en ASC y torres de refrigeración

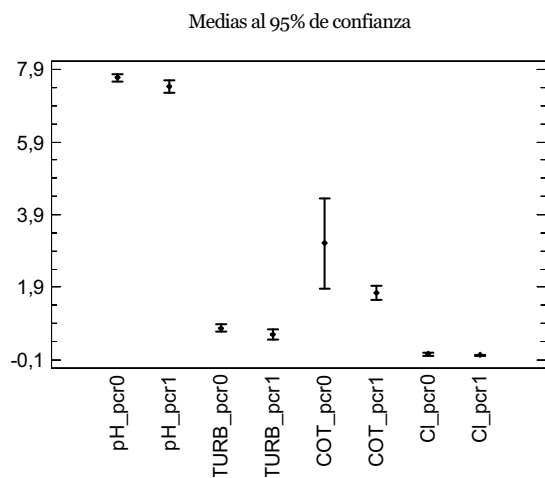
Se puede observar en la figura 1.1.4.2 que no existen diferencias significativas entre la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo y por PCR con los valores de *Pseudomonas* en este tipo de agua. Esto fue confirmado con la prueba de múltiples rangos.

Fig. 1.1.4.3 Medias con intervalos al 95% de confianza de los parámetros fisicoquímicos en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo y por PCR (Mezcla).

GRÁFICA A



GRÁFICA B



TURB: Turbidez (NTU), Cl: Cloro (ppm), COT: Carbono Orgánico Total (ppm), Leg 0: Ausencia de *Legionella* por cultivo, Leg1: Presencia de *Legionella* por cultivo, pcr0: Ausencia de *Legionella* por PCR, pcr1: Presencia de *Legionella* por PCR.

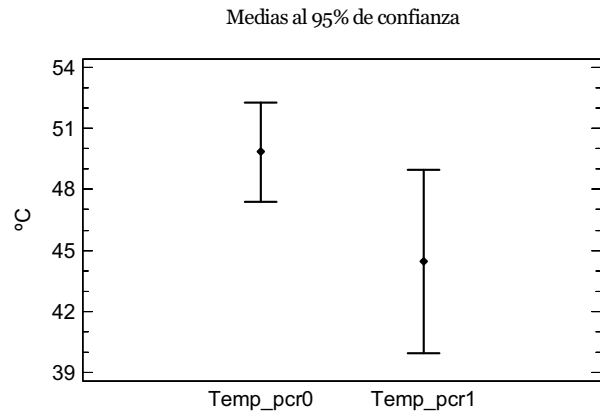
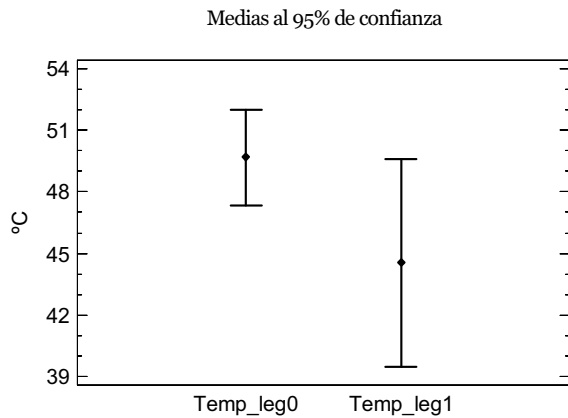
No se encuentran diferencias significativas entre los parámetros fisicoquímicos y la presencia o ausencia de *Legionella* obtenida mediante cultivo (gráfica A) y obtenida por PCR (gráfica B).

Resultados

Fig. 1.1.4.4 Medias con intervalos al 95% de confianza, de la temperatura en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo y por PCR (Mezcla).

GRÁFICA A

GRÁFICA B



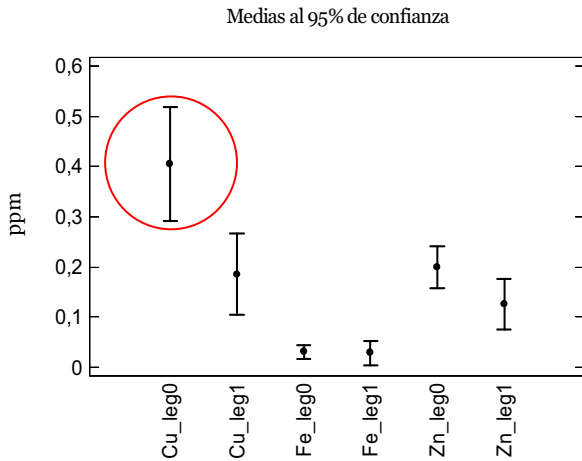
Temp: Temperatura (°C), Leg 0: Ausencia de *Legionella* por cultivo, Leg1: Presencia de *Legionella* por cultivo, pcr0: Ausencia de *Legionella* por PCR, pcr1: Presencia de *Legionella* por PCR.

En ambas gráficas se observa que no existen diferencias significativas entre la presencia y ausencia de *Legionella* y la temperatura. Sin embargo, se puede ver que existe mayor tendencia a la asociación de *Legionella* con temperaturas no mayores a 50°C.

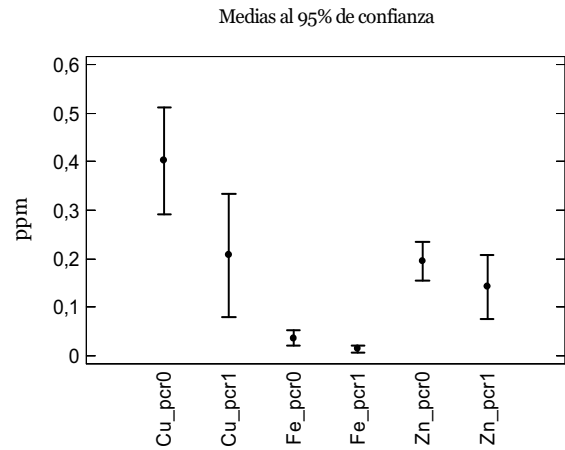
Capítulo III: *Legionella* en ASC y torres de refrigeración

Fig. 1.1.4.5 Medias con intervalos al 95% de confianza de los metales en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo y por PCR (Mezcla).

GRÁFICA A



GRÁFICA B



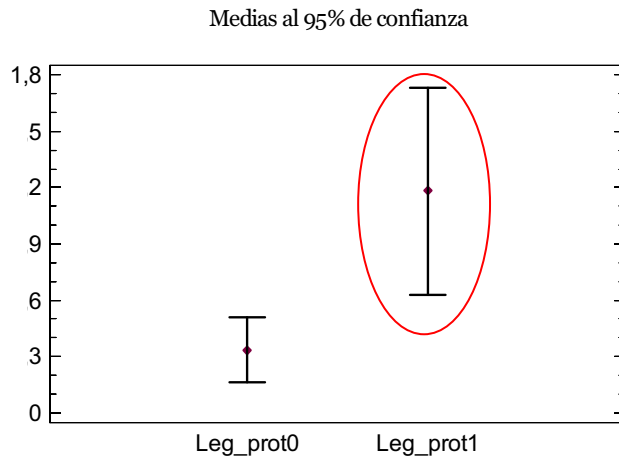
Cu: Cobre, Fe: Hierro, Zn: Zinc, Leg 0: Ausencia de *Legionella* por cultivo, Leg1: Presencia de *Legionella* por cultivo, pcr0: Ausencia de *Legionella* por PCR, pcr1: Presencia de *Legionella* por PCR.

En la figura 1.1.4.5 se relaciona la presencia y ausencia de *Legionella* con los metales analizados en este tipo de agua. Se puede observar en la gráfica A que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias del Cu con la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo. Es decir, que a mayor concentración de Cu, menos probable es encontrar *Legionella* en este tipo de agua.

En la gráfica B, sin embargo no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias, pero se observa que las concentraciones elevadas de Cu y Zn tienen tendencia a asociarse a la ausencia de *Legionella*.

Resultados

Fig. 1.1.4.6 Medias con intervalos al 95% de confianza de la presencia de *Legionella* obtenida por cultivo en relación a los resultados del cultivo de protozoos (Mezcla).

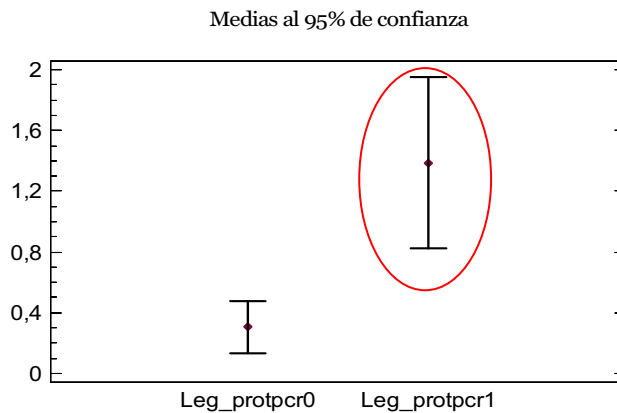


Leg: Presencia de *Legionella* por cultivo, Prot 0: Ausencia de protozoos por cultivo, Prot 1: Presencia de protozoos por cultivo.

En el caso del análisis de protozoos este estudio fue cualitativo. En la figura 1.1.4.6 se ha invertido la relación presencia-ausencia de *Legionella* en relación a los valores obtenidos de Protozoos. Por lo que en este caso la gráfica nos muestra unas medias de los valores de *Legionella* obtenida por cultivo, en relación a la presencia y ausencia de Protozoos.

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al 95% de confianza entre los valores estudiados. Es decir, a una mayor concentración de *Legionella* en este tipo de muestras, se encuentra mayor presencia de protozoos.

Fig. 1.1.4.7 Medias con intervalos al 95% de confianza de la presencia de *Legionella* obtenida por cultivo en relación a los resultados de PCR de protozoos (Mezcla).



Leg: Presencia de *Legionella* por cultivo, protpcr 0: Ausencia de protozoos por pcr, protpcr 1: Presencia de protozoos por pcr.

Se puede observar en la figura 1.1.4.7 que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las células viables de *Legionella* en relación a la presencia y ausencia de Protozoos obtenidos mediante la técnica de PCR.

Es decir, que a mayor presencia de *Legionella* se puede encontrar una mayor presencia de ADN de Protozoos en este tipo de muestra.

En resumen según estos análisis estadísticos que representan las medias con intervalos al 95% de confianza de los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en relación a la presencia y ausencia de Legionella obtenida por el método de cultivo y de PCR, se encontró que la presencia de Legionella se ve favorecida a mayor concentración de Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 37°C. Y se observó una mayor presencia de Protozoos en el agua cuando los valores de Legionella son elevados.

Así también la ausencia de Legionella encontrada por cultivo y por PCR se asoció a concentraciones elevadas de Cu y de Zn.

Resultados

1.1.5 Correlaciones entre los factores microbiológicos y fisicoquímicos de muestras de agua sanitaria caliente (Mezcla)

Se pueden observar en la tabla 1.1.5.1, las correlaciones de Spearman para los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos del agua sanitaria caliente. Este análisis estadístico se utiliza la estimación de correlaciones de datos que no siguen una distribución normal y al calcularse a partir de los rangos de los valores de cada parámetro es menos sensible a los valores atípicos.

Tabla 1.1.5.1 Matriz de correlación entre los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de las muestras de agua sanitaria caliente (Mezcla). Se usó el coeficiente de correlación de Spearman.

	Leg	Het22	Het37	Pseud	Temp	pH	Turb	Cl	COT	Fe	Zn	Cu
Leg		0,31 p-0,001	0,30 p-0,001	0,052 p-0,587	-0,17 p-0,065	0,06 p-0,475	-0,21 p-0,027	-0,02 p-0,819	-0,03 p-0,734	-0,08 p-0,366	-0,21 p-0,024	-0,17 p-0,072
Het 22	0,31 p-0,0016		0,93 p-0,000	0,40 p-0,000	-0,19 p-0,041	-0,09 p-0,343	-0,22 p-0,021	-0,22 p-0,018	-0,34 p-0,000	-0,06 p-0,512	-0,25 p-0,009	-0,30 p-0,002
Het 37	0,30 p-0,0019	0,93 p-0,000		0,34 p-0,000	-0,21 p-0,029	-0,09 p-0,31	-0,20 p-0,034	-0,25 p-0,010	-0,44 p-0,000	-0,044 p-0,64	-0,26 p-0,005	-0,35 p-0,000
Pseud	0,052 p-0,587	0,40 p-0,000	0,34 p-0,000		0,0091 p-0,925	-0,04 p-0,63	-0,09 p-0,340	-0,31 p-0,001	-0,19 p-0,041	-0,05 p-0,560	-0,08 p-0,359	-0,14 p-0,143
Temp	-0,17 p-0,065	-0,19 p-0,041	-0,21 p-0,029	0,0091 p-0,925		-0,12 p-0,0191	0,05 p-0,566	0,028 p-0,768	0,16 p-0,083	0,31 p-0,001	0,17 p-0,034	0,32 p-0,000
pH	0,06 p-0,475	-0,09 p-0,343	-0,09 p-0,31	-0,04 p-0,63	-0,12 p-0,0191		0,15 p-0,116	0,09 p-0,337	0,07 p-0,456	0,002 p-0,977	0,14 p-0,147	-0,016 p-0,98
Turb	-0,21 p-0,027	-0,22 p-0,021	-0,20 p-0,034	-0,09 p-0,340	0,05 p-0,566	0,15 p-0,116		0,012 p-0,895	0,12 p-0,206	0,34 p-0,000	0,24 p-0,106	0,13 p-0,156
Cl	-0,02 p-0,819	-0,22 p-0,018	-0,25 p-0,010	-0,31 p-0,001	0,028 p-0,768	0,09 p-0,337	0,012 p-0,895		0,21 p-0,030	0,14 p-0,130	0,21 p-0,029	0,47 p-0,000
COT	-0,03 p-0,734	-0,34 p-0,000	-0,44 p-0,000	-0,19 p-0,041	0,16 p-0,083	0,07 p-0,456	0,12 p-0,206	0,21 p-0,030		0,13 p-0,173	0,21 p-0,029	0,47 p-0,000
Fe	-0,08 p-0,366	-0,06 p-0,512	-0,044 p-0,64	-0,05 p-0,560	0,31 p-0,001	0,002 p-0,977	0,34 p-0,000	0,14 p-0,130	0,13 p-0,173		0,30 p-0,017	0,24 p-0,010
Zn	-0,21 p-0,024	-0,25 p-0,009	-0,26 p-0,005	-0,08 p-0,359	0,17 p-0,034	0,14 p-0,147	0,24 p-0,106	0,21 p-0,029	0,21 p-0,029	0,30 p-0,017		0,43 p-0,000
Cu	-0,17 p-0,072	-0,30 p-0,002	-0,35 p-0,000	-0,14 p-0,143	0,32 p-0,000	-0,016 p-0,98	0,13 p-0,156	0,47 p-0,000	0,47 p-0,000	0,24 p-0,010	0,43 p-0,000	

En cada celda, superior: Coeficiente de Spearman; inferior: P-valor < 0,05 significativo al 95%, P-valor < 0,1 significativo al 90%

En la tabla 1.1.5.1 el primer valor corresponde al coeficiente de Spearman, es decir, el porcentaje de correlación entre los valores, el segundo valor es el p-valor que comprueba la importancia estadística de las correlaciones estimadas, este valor por debajo de 0,05 indica importancia estadística para un nivel de confianza del 95% y por debajo de 0,1 al 90% de confianza.

En la tabla 1.1.5.1 los datos en negrita son los que presentan una correlación significativa por debajo de un p-valor de 90% y 95%.

Se pueden destacar las correlaciones encontradas entre los Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 37°C y correlaciones débiles pero significativas con parámetros como *Legionella* y *Pseudomonas* respectivamente. También existen correlaciones estadísticamente significativas entre Het. a 22°C y Het. a 37°C con parámetros fisicoquímicos como temperatura, turbidez, COT, Zn, Cu y cloro.

Finalmente, se pueden destacar las correlaciones negativas aunque débiles, entre *Legionella* con parámetros como, temperatura, turbidez, Cu y Zn, es decir, a valores mayores de estos parámetros menor es la presencia de *Legionella*.

Muestreo de agua sanitaria caliente cambiando la forma del muestreo.

Debido a la variedad de resultados obtenidos y sobre todo a la complejidad de los sistemas de agua caliente de los edificios en estudio, se decidió hacer un cambio en la forma del muestreo. Se realizó un muestreo por separado de 1 litro del Agua Proximal del sistema, es decir el agua apenas es abierto el grifo y 1 litro del Agua Distal después de dejar correr el agua aproximadamente 2 minutos, cuando ha alcanzado su temperatura máxima.

1.2 Muestras de “Agua proximal”

1.2.1 Descripción de parámetros microbiológicos de muestras de agua sanitaria caliente (A. proximal)

Se realizó el análisis de 62 muestras del Agua Proximal, tal y como se explicó en el apartado anterior, analizándose las muestras por PCR semianidada y mediante cultivo en placa.

Tabla 1.2.1.1 Parámetros microbiológicos de las muestras de agua sanitaria caliente, porcentaje de los datos positivos de cada caso, media geométrica, máximos y mínimos.

	% Positivos Cultivo	% positivos PCR	Media geométrica ufc/100ml	Máximo ufc/100ml	Mínimo ufc/100ml
<i>Legionella</i>	37% (22/62)	58% (36/62)	7,44x10 ⁰	2,00x10 ³	ND ^b
Het 22°C	92% (57/62)	NA ^a	2,14x10 ⁵	1,31x10 ⁷	<5,00x10 ²
Het 37°C	92% (57/62)	NA	2,24x10 ⁵	1,20x10 ⁷	<5,00x10 ²
<i>Pseudomonas</i>	60% (37/62)	NA	1,91x10 ¹	1,20x10 ³	<1,00x10 ⁰
<i>Aeromonas</i>	ND	NA	<1,00x10 ⁰	<1,00x10 ⁰	<1,00x10 ⁰
Protozoos	43% (27/62)	32% (20/62)	NA	NA	NA

^a NA: no analizado

^b ND: no detectado

Het: heterótrofos

Los resultados que obtuvimos, tabla 1.2.1.1, nos muestran 36 resultados positivos de *Legionella* por PCR es decir un 58% de las muestras y 22 por cultivo en placa que representan el 37% de las muestras. La identificación de las colonias aplicando el kit de serología nos indicó la presencia de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 en todos los casos a excepción de una muestra que se trataba de la cepa *Legionella pneumophila* serogrupo 1. Las muestras positivas por cultivo también lo fueron por PCR. En las muestras positivas por cultivo se obtuvo una media geométrica de $7,44 \times 10^0$ ufc/100ml y el número máximo de colonias fue $2,00 \times 10^3$ ufc/L.

La presencia de Heterótrofos a 22°C se pudo determinar en el 92% de las muestras, con una media geométrica de $2,14 \times 10^5$ ufc/100ml y un máximo de $1,31 \times 10^7$ ufc/100ml. Los Heterótrofos a 37°C también se detectaron en un 92% con una media geométrica de $2,24 \times 10^5$ ufc/100ml y un valor máximo de $1,20 \times 10^7$ ufc/100ml. *Pseudomonas* fue detectada en un 60% de las muestras con una media geométrica de $1,91 \times 10^1$ ufc/100ml y un máximo de $1,20 \times 10^3$ ufc/100ml.

La presencia de protozoos en el total de las muestras analizadas fue de 43% por observación y de un 32% por PCR.

No se detectó *Aeromonas* en las muestras analizadas en este estudio.

Resultados

1.2.2 Descripción de parámetros fisicoquímicos de agua sanitaria caliente (A. proximal)

Los factores fisicoquímicos de las 62 muestras de este tipo de aguas se pueden observar en la tabla 1.2.2.1. a continuación.

Tabla 1.2.2.1 Parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua sanitaria caliente, medias, máximos y mínimos (A. proximal).

	Media	D. Standard	Máximo	Mínimo
Temp (°C)	27	5,56	37	16
Turbidez (NTU)	0,75	0,70	5,00	0,12
pH	7,43	0,48	8,69	6,36
Fe (ppm)	0,03	0,05	0,20	0,00
Zn (ppm)	0,26	0,25	1,30	0,03
Cu (ppm)	0,17	0,33	1,54	0,00
COT (ppm)	2,09	1,73	9,55	0,00
Cl (ppm)	0,03	0,10	0,52	0,00

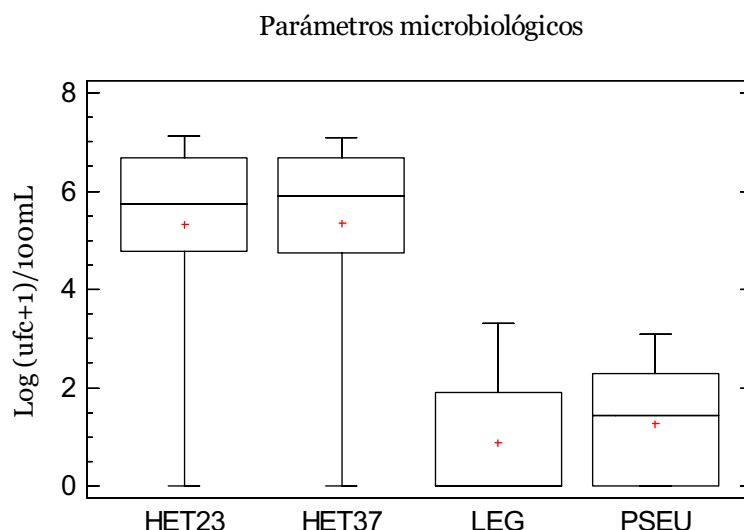
Temp: temperatura , Fe: Hierro, Zn: Cinc, Cu: Cobre, COT: Carbono Orgánico Total (ppm), Cl: Cloro (ppm)

Las muestras tuvieron una temperatura media de 27°C y estos valores oscilaron entre los 16°C y 37°C. Se obtuvo un promedio de 0,75 NTU, en el caso de la turbidez, oscilando entre 5,00 NTU y 0,12 NTU. El pH tuvo un promedio de 7,43 con un máximo de 8,69 y un mínimo de 6,36. La concentración de cloro tuvo una media de 0,03 ppm, con un máximo de 0,52 ppm. En el caso del Fe se obtuvo una concentración media de 0,03 ppm con un máximo de 0,20 ppm. El Zn tuvo una concentración media de 0,26 ppm con un máximo de 1,30 ppm y un mínimo de 0,03 ppm y en el caso del Cu se encontró una concentración media de 0,17 ppm con un máximo de 1,54 ppm. En el Carbono Orgánico Total, la media obtenida fue de 2,09 ppm con un máximo de 9,55 ppm (tabla 1.2.2.1).

1.2.3 Descripción estadística de los diferentes parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de muestras de agua sanitaria caliente (A. proximal)

Con los resultados de los parámetros bacteriológicos de las 62 muestras de agua sanitaria caliente, se realizaron análisis estadísticos. Se pueden observar a continuación (figura 1.2.3.1), en diagramas de caja, la distribución de los resultados de *Legionella*, *Pseudomonas*, Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 37°C.

Fig. 1.2.3.1 Diagrama de cajas de la distribución de datos de los parámetros microbiológicos, provenientes del agua sanitaria caliente (A. proximal).



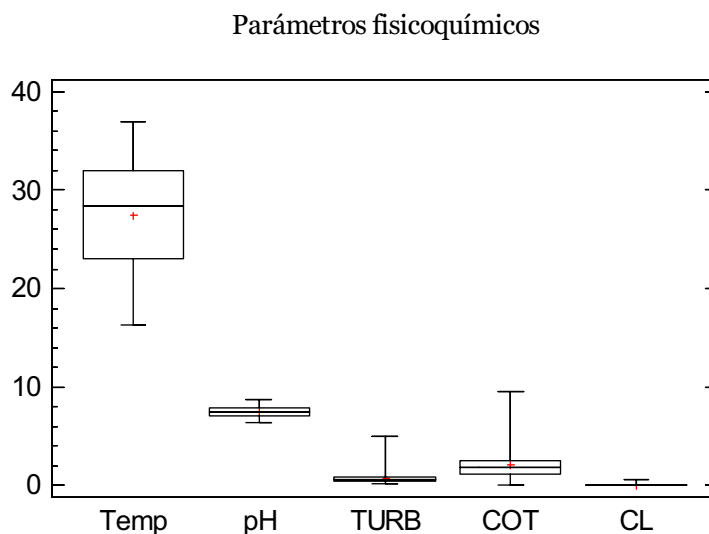
Het 22: heterótrofos a 22°C, Het 37: heterótrofos a 37°C, Leg: *Legionella*, PSEU: *Pseudomonas*

La figura 1.2.3.1 muestra la distribución de datos en diagramas de cajas de cada parámetro microbiológico, de esta forma se observa la dispersión de resultados en este tipo de agua. En el caso de Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 37°C, se observa que tienen una distribución de datos, una media y una mediana muy similar entre si y según la prueba de múltiples rangos, datos no mostrados, no existen diferencias significativas al 95% de confianza entre ellos. Comparando la media de los resultados de los Heterótrofos a 22°C y 37°C, con los resultados obtenidos de *Legionella* y *Pseudomonas*, se encontró una diferencia estadísticamente significativa

Resultados

entre sus valores. Así mismo, al comparar la distribución de los datos y las medias de *Legionella* y *Pseudomonas* se obtuvo que forman un grupo homogéneo de medias, por lo que no presentan diferencia estadísticamente significativa entre sus valores.

Fig. 1.2.3.2 Diagrama de cajas de la distribución de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua sanitaria caliente (A. proximal).

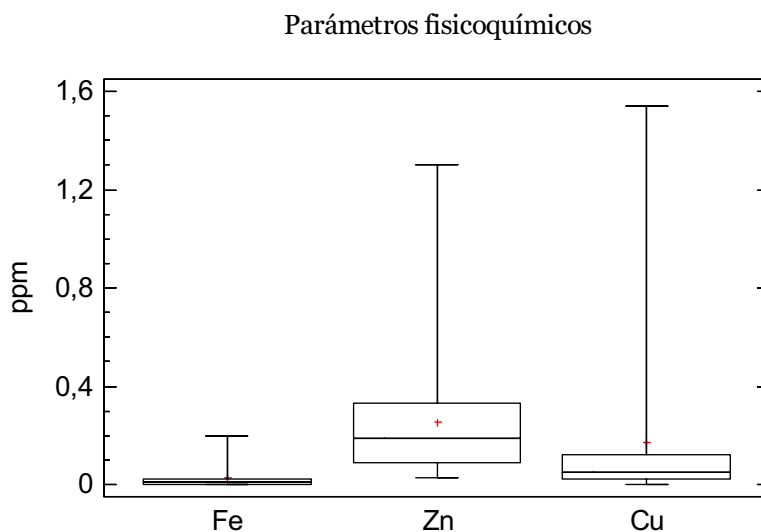


Temp: Temperatura (°C), TURB: Turbidez (UNF), Cl: Cloro (ppm), COT: Carbono Orgánico Total (ppm)

Se pueden observar en la figura 1.2.3.2, la distribución de los resultados de los parámetros fisicoquímicos: temperatura, pH, turbidez, COT y cloro, representados en diagramas de cajas. En el caso de la temperatura se observa una distribución de datos con una dispersión más amplia que el resto de parámetros fisicoquímicos.

Según la prueba de múltiples rangos a un nivel del 95% de confianza (datos no mostrados), se obtuvieron diferencias significativas entre todos los parámetros a excepción del cloro y la turbidez que forman un grupo homogéneo de medias entre las que no existen diferencias estadísticamente significativas.

Fig. 1.2.3.3 Diagrama de cajas de la distribución de datos de metales, en las muestras de agua sanitaria caliente (A. proximal).



Fe: Hierro, Zn: Cinc, Cu: Cobre.

En la figura 1.2.3.3 se puede observar la distribución de datos de los metales analizados en estas aguas, con una mayor dispersión de datos del Zn.

Según la prueba de múltiples rangos a un nivel del 95% de confianza, existen diferencias significativas entre los resultados del Fe, Zn y Cu.

En resumen, la distribución de datos de las variables analizadas en este tipo de muestras (Agua Proximal), en el caso de los parámetros microbiológicos, los Heterótrofos a 22°C y a 37°C presentaron diferencias significativas al 95% de confianza con parámetros como Pseudomonas y Legionella.

En el caso de los parámetros fisicoquímicos se observó que, los valores de la temperatura tuvieron una distribución más amplia de sus datos en comparación a los otros parámetros fisicoquímicos. El pH, la turbidez, el cloro y el COT fueron significativamente diferentes entre ellos, sin embargo el cloro y

Resultados

la turbidez no presentaron diferencias significativas entre sus valores. En el caso de los metales se observó que en este tipo de muestras, los valores del Cu, Zn y Fe presentan diferencias estadísticamente significativas.

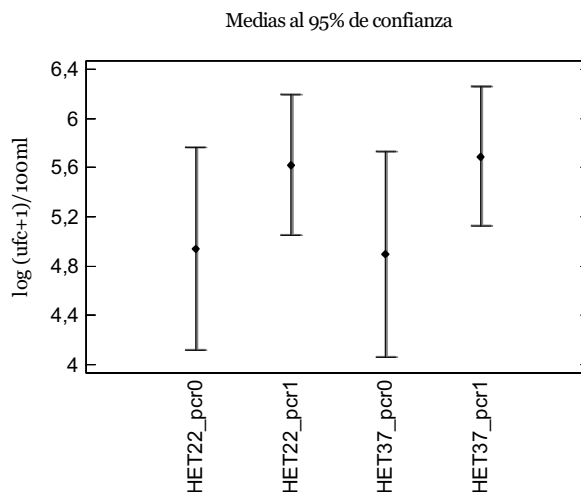
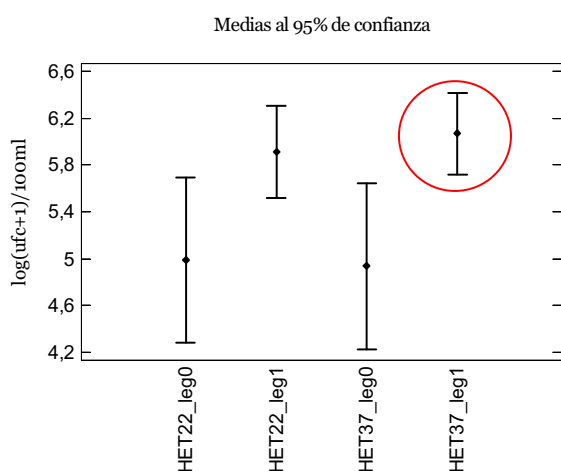
1.2.4 Parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* de muestras de agua sanitaria caliente (Agua Proximal)

Se realizó un análisis estadístico de los diferentes parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en relación a los resultados obtenidos por cultivo (gráfica A) y por PCR (gráfica B) para *Legionella*, tomando en cuenta la presencia y ausencia de la bacteria con el resto de los parámetros.

Fig. 1.2.4.1 Medias con intervalos al 95% de confianza de Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 37°C en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* (A. proximal).

GRÁFICA A

GRÁFICA B



Het: heterótrofos, leg0: Ausencia de *Legionella* por PCR, leg1: Presencia de *Legionella* por PCR, pcr0: Ausencia de *Legionella* por PCR, pcr1: Presencia de *Legionella* por PCR.

En la gráfica A, al comparar los resultados de las medias con intervalos de confianza al 95%, de los Heterótrofos a 22°C y a 37°C en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo, se obtuvo que existen diferencias significativas entre la presencia y ausencia de *Legionella*

en relación a Heterótrofos a 37°C. Es decir que, en este tipo de agua (Proximal), existe mayor posibilidad de encontrar presencia de *Legionella* cuando los parámetros de Heterótrofos a 37°C son más elevados. En el caso de los Heterótrofos a 22°C, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas, se observa mayor presencia de *Legionella* en relación a valores elevados de Heterótrofos a 22°C.

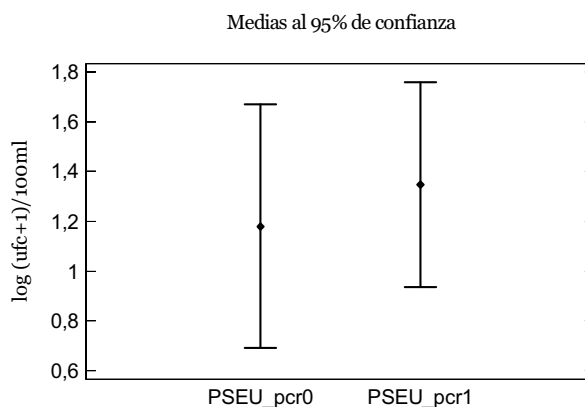
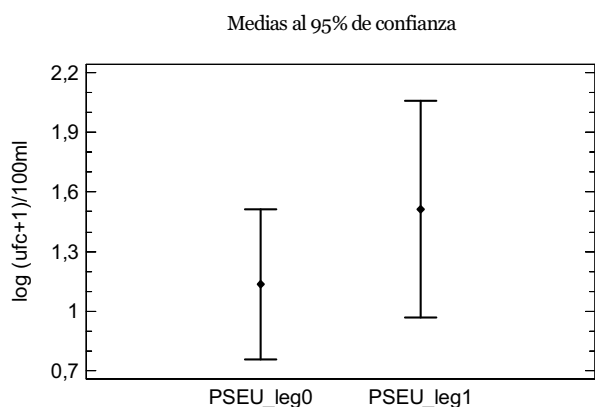
Los resultados positivos de *Legionella* se encontraron sobre valores reales de Heterótrofos a 22°C de $1,10 \times 10^7$ ufc/100ml y de valores de Heterótrofos a 37°C de $9,60 \times 10^6$ ufc/100ml.

En la gráfica B encontramos que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por PCR con los valores de Heterótrofos a 37°C y a 22°C. Pero se observa una tendencia a la asociación entre los valores elevados de Heterótrofos a 22°C y 37°C con la presencia de ADN de *Legionella*

Fig. 1.2.4.2 Medias con intervalos al 95% de confianza de *Pseudomonas* en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* (A. proximal).

GRÁFICA A

GRÁFICA B



PSEU: *Pseudomonas*, Leg 0: Ausencia de *Legionella* por cultivo, Leg 1: Presencia de *Legionella* por cultivo, pcr0: Ausencia de *Legionella* por PCR, pcr1: Presencia de *Legionella* por PCR.

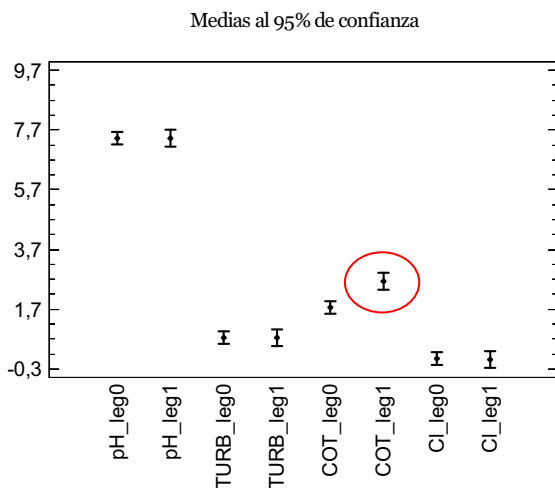
En la figura 1.2.4.2 según las medias con intervalos al 95% de confianza, no existen diferencias significativas entre la presencia o ausencia de *Legionella*

Resultados

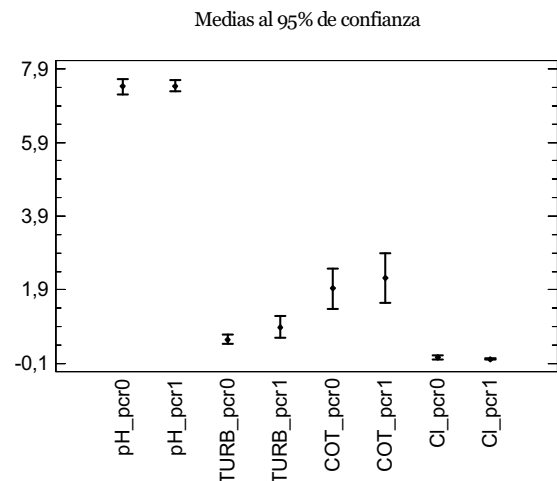
obtenida por cultivo (gráfica A) y obtenida por PCR (gráfica B) en relación a los valores de *Pseudomonas*.

Fig. 1.2.4.3 Medias al 95% de confianza de los parámetros fisicoquímicos en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo y por PCR (A. proximal).

GRÁFICA A



GRÁFICA B

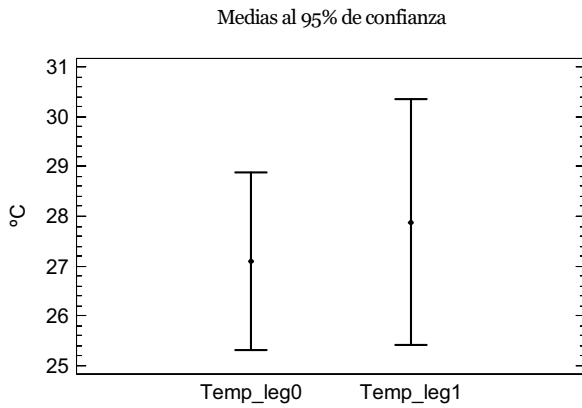


TURB: Turbidez (UNF), COT: Carbono Orgánico Total (ppm), Cl: Cloro (ppm), Leg 0: Ausencia de *Legionella* por cultivo Leg1: Presencia de *Legionella* por cultivo, pcr0: Ausencia de *Legionella* por PCR, pcr1: Presencia de *Legionella* por PCR.

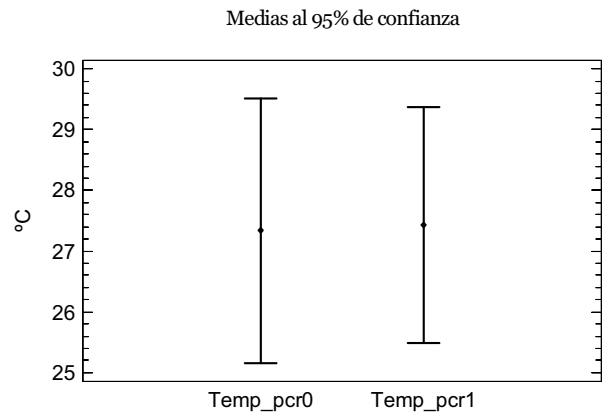
Según el test de medias y la prueba de rangos múltiples, no existen diferencias significativas entre los parámetros fisicoquímicos y la presencia o ausencia de *Legionella* obtenida mediante cultivo y por PCR, esto se puede observar en las gráficas A y B. Sin embargo, se ve una cierta asociación del recuento de células de *Legionella* con una concentración más elevada de COT.

Fig. 1.2.4.3 Medias al 95% de confianza de la temperatura en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo y por PCR (A. proximal).

GRÁFICA A



GRÁFICA B



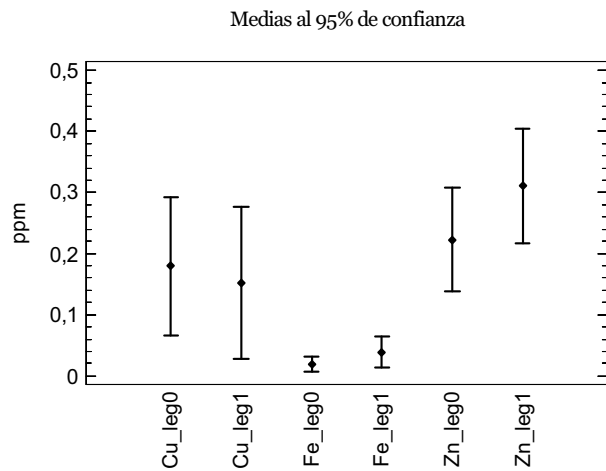
Temp: Temperatura (°C), Leg 0: Ausencia de *Legionella* por cultivo Leg1: Presencia de *Legionella* por cultivo, pcr0: Ausencia de *Legionella* por PCR, pcr1: Presencia de *Legionella* por PCR.

Según el test de medias con intervalos al 95% de confianza, no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos de la temperatura y la presencia o ausencia de *Legionella* en este tipo de muestras.

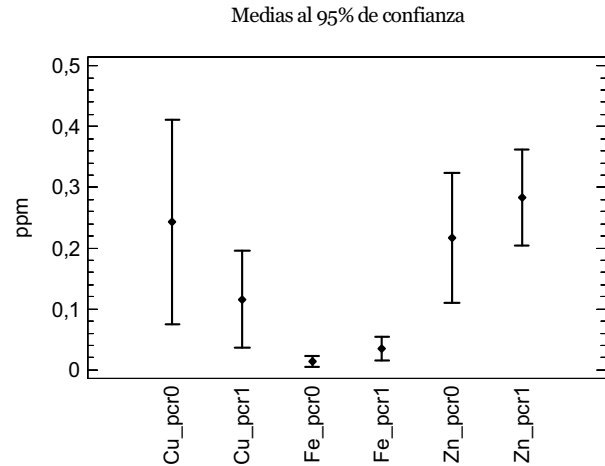
Resultados

Fig. 1.2.4.4 Medias con intervalos al 95% de confianza de los metales, en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo y por PCR (A. proximal).

GRÁFICA A



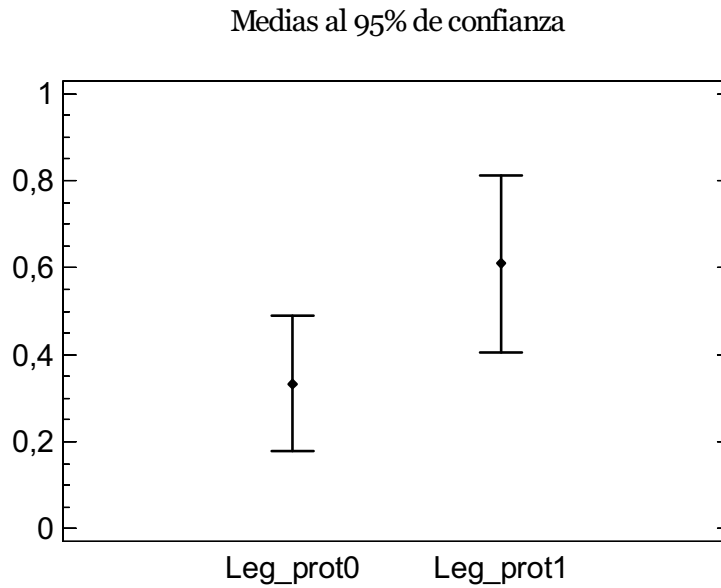
GRÁFICA B



Cu: Cobre (ppm), Fe: Hierro (ppm), Zn: Cinc ppm), Leg 0: Ausencia de *Legionella* por cultivo, Leg1: Presencia de *Legionella* por cultivo, pcr0: Ausencia de *Legionella* por PCR, pcr1: Presencia de *Legionella* por PCR.

En esta agua, los metales forman grupos homogéneos de medias por lo que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Esto se puede observar en la gráfica A, sin embargo se podría asociar la presencia de *Legionella* obtenida mediante cultivo a una mayor concentración de Fe. En la gráfica B, también se observa una tendencia a la asociación entre la presencia de ADN de *Legionella* y concentraciones elevadas de Fe.

Fig. 1.2.4.5 Medias con intervalos al 95% de confianza de la presencia de *Legionella* obtenida por cultivo, en relación a los resultados del cultivo de protozoos (A. proximal).

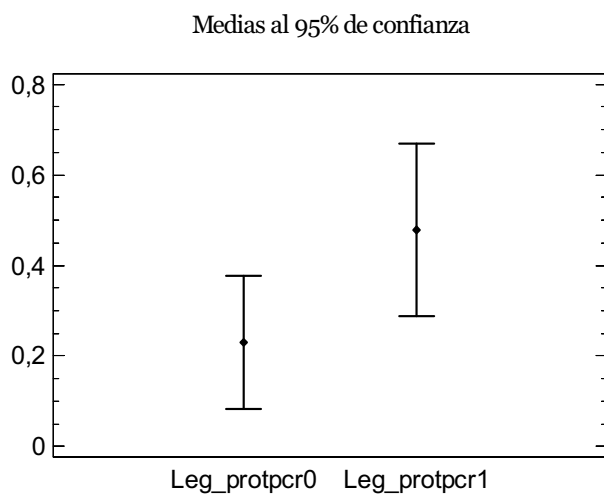


Leg: Presencia de *Legionella* por cultivo, prot 0: Ausencia de protozoos por cultivo, prot 1: Presencia de protozoos por cultivo.

El test de medias y la prueba de rangos múltiples, no mostraron diferencias significativas al 95% de confianza entre la presencia y ausencia de protozoos y los valores de *Legionella* obtenidos mediante cultivo. Sin embargo se observa una asociación entre la presencia de protozoos con valores más elevados de *Legionella*.

Resultados

Fig. 1.2.4.6 Medias con intervalos al 95% de confianza de la presencia de *Legionella* obtenida por cultivo, en relación a los resultados de PCR de protozoos (A. proximal).



Leg: Presencia de *Legionella* por cultivo, protpcr 0: Ausencia de protozoos por per, protper 1: Presencia de protozoos por per.

Se puede observar en la figura 1.2.4.6 que no existen diferencias significativas entre la presencia y ausencia de protozoos obtenidos mediante la técnica de PCR y los valores de células viables de *Legionella*. Pero se observa una cierta asociación entre los valores de *Legionella* y la presencia de protozoos. Es decir que, a valores elevados de *Legionella* se puede encontrar mayor presencia de ADN de protozoos en este tipo de muestra.

En resumen, en el Agua Proximal según los análisis estadísticos de las medias de los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en relación a la presencia y ausencia de Legionella obtenida con el método de cultivo y con PCR, se obtuvo que la presencia de Legionella obtenida por cultivo se ve favorecida a mayor concentración de Heterótrofos a 37°C y se encontró una asociación entre la presencia de protozoos y los valores elevados de Legionella. Así mismo, se encontró que existe una cierta asociación entre valores altos de COT, Fe y Zn con Legionella.

1.2.5 Correlaciones entre los factores microbiológicos y fisicoquímicos de muestras de agua sanitaria caliente (A. proximal)

Se puede observar a continuación la tabla 1.2.5.1 de correlaciones de Spearman para los resultados de los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos del agua sanitaria caliente.

Tabla 1.2.5.1 Matriz de correlación entre los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de las muestras de agua sanitaria caliente (Agua proximal). Se usó el coeficiente de correlación de Spearman.

	Leg	Het22	Het37	Pseud	Temp	pH	Turb	Cl	COT	Fe	Zn	Cu
Leg		0,20 p-0,10	0,24 p-0,05	0,22 p-0,08	0,13 p-0,28	0,028 p-0,82	0,03 p-0,76	-0,17 p-0,16	0,19 p-0,13	0,07 p-0,54	0,36 p-0,004	0,04 p-0,73
Het 22	0,20 p-0,10		0,92 p-0,00	0,24 p-0,05	0,19 p-0,12	0,12 p-0,33	0,08 p-0,48	-0,29 p-0,02	0,13 p-0,28	-0,013 p-0,91	0,41 p-0,004	0,19 p-0,73
Het 37	0,24 p-0,05	0,92 p-0,00		0,21 p-0,10	0,24 p-0,05	0,10 p-0,41	0,10 p-0,40	-0,22 p-0,07	0,13 p-0,28	-0,001 0,98	0,39 p-0,002	0,21 p-0,09
Pseud	0,22 p-0,08	0,24 p-0,05	0,21 p-0,10		-0,12 p-0,31	0,11 p-0,82	-0,04 p-0,74	-0,35 p-0,006	0,06 p-0,59	-0,36 p-0,004	0,34 p-0,006	0,19 p-0,12
Temp	0,13 p-0,28	0,19 p-0,12	0,24 p-0,05	-0,12 p-0,31		0,08 p-0,51	-0,09 0,45	-0,30 p-0,018	0,32 p-0,01	0,06 p-0,58	-0,09 0,46	0,07 p-0,53
pH	0,028 p-0,82	0,12 p-0,33	0,10 p-0,41	0,11 p-0,82	0,08 p-0,51		0,11 p-0,37	-0,25 p-0,04	-0,13 p-0,28	-0,21 p-0,08	0,05 p-0,67	0,13 p-0,30
Turb	0,03 p-0,76	0,08 p-0,48	0,10 p-0,40	-0,04 p-0,74	-0,09 0,45	0,11 p-0,37		-0,15 p-0,23	-0,06 p-0,59	0,06 p-0,62	0,05 p-0,27	-0,04 p-0,73
Cl	-0,17 p-0,16	-0,29 p-0,02	-0,22 p-0,07	-0,35 p-0,006	-0,30 p-0,018	-0,25 p-0,04	-0,15 p-0,23		-0,29 p-0,02	0,09 p-0,43	-0,18 p-0,15	-0,13 p0,28
COT	0,19 p-0,13	0,13 p-0,28	0,13 p-0,28	0,06 p-0,59	0,32 p-0,01	-0,13 p-0,28	-0,06 p-0,59	-0,29 p-0,02		-0,09 p-0,47	0,21 p-0,08	0,24 p-0,05
Fe	0,07 p-0,54	-0,013 p-0,91	-0,001 0,98	-0,36 p-0,004	0,06 p-0,58	-0,21 p-0,08	0,06 p-0,62	0,09 p-0,43	-0,09 p-0,47		0,006 p-0,96	-0,10 p-0,43
Zn	0,36 p-0,004	0,41 p-0,004	0,39 p-0,002	0,34 p-0,006	-0,09 0,46	0,05 p-0,67	0,05 p-0,27	-0,18 p-0,15	0,21 p-0,08	0,006 p-0,96		0,25 p-0,04
Cu	0,04 p-0,73	0,19 p-0,73	0,21 p-0,09	0,19 p-0,12	0,07 p-0,53	0,13 p-0,30	-0,04 p-0,73	-0,13 p0,28	0,24 p-0,05	-0,10 p-0,43	0,25 p-0,04	

En cada celda, superior: Coeficiente de Spearman; inferior: P-valor < 0,05 significativo al 95%, P-valor < 0,1 significativo al 90%

Resultados

En la tabla 1.2.5.1 se observan las correlaciones por rangos de Spearman de las muestras de agua sanitaria caliente Proximal, los datos en negrita son los que presentan una correlación significativa por debajo de un p-valor del 95% o del 90%.

Se pueden destacar las correlaciones encontradas entre Heterótrofos a 22°C con Heterótrofos a 37°C y correlaciones estadísticamente significativas de Heterótrofos a 22°C con cloro y Zn.

En el caso de *Pseudomonas* sus datos tuvieron correlaciones significativas pero débiles de *Legionella* con parámetros fisicoquímicos como cloro, Fe y Zn.

Los parámetros fisicoquímicos como la temperatura tuvieron correlaciones débiles con *Legionella*, cloro y COT. Metales como el Zn presentaron correlaciones significativas con parámetros microbiológicos como *Legionella*, Het. 22°C y 37°C y *Pseudomonas*.

1.3 Muestras de “Agua Distal”

1.3.1 Descripción de parámetros microbiológicos de muestras de agua sanitaria caliente (Agua Distal)

Se realizó el análisis de 62 muestras de la zona distal de los sistemas de agua sanitaria caliente de edificios. Las muestras se analizaron por PCR semianidada y mediante cultivo en placa. Los resultados de los parámetros microbiológicos se pueden observar en la tabla 1.3.1.1.

Tabla 1.3.1.1 Parámetros microbiológicos de las muestras de agua caliente sanitaria, porcentaje de los datos positivos de cada caso, media geométrica, máximos y mínimos.

	% Positivos Cultivo	% positivos PCR	Media geométrica ufc/100ml	Máximo ufc/100ml	Mínimo ufc/100ml
<i>Legionella</i>	21% (13/62)	48% (30/62)	2,22x10 ²	5,30x10 ³	ND ^b
Het 22°C	77% (48/62)	NA ^a	8,32x10 ³	2,80x10 ⁷	<5,00x10 ²
Het 37°C	76% (47/62)	NA	1,05x10 ⁴	3,00x10 ⁷	<5,00x10 ²
<i>Pseudomonas</i>	31% (19/62)	NA	4,87x10 ⁰	1,20x10 ³	<1,00x10 ⁰
<i>Aeromonas</i>	ND	NA	<0,00x10 ⁰	<0,00x10 ⁰	<1,00x10 ⁰
Protozoos	24% (15/62)	19% (12/62)	NA	NA	NA

^a NA: no analizado

^b ND: no detectado

Het: heterótrofos

Se obtuvieron 30 (48%) resultados positivos de ADN de *Legionella* por PCR y 13 (21%) resultados positivos por cultivo en placa. Las colonias aisladas, fueron identificadas como *L. pneumophila* serogrupo 2-14 en todos los casos. Las muestras positivas por cultivo también lo fueron por PCR. La media geométrica de las colonias de *Legionella* obtenidas en estas muestras fue 2,22x10² ufc/100ml y el valor máximo encontrado fue 5,30x10³ ufc/100ml. Se determinó la presencia de Heterótrofos a 22 °C en el 76% de las muestras, con una media geométrica de 8,32x10³ ufc/100ml y

Resultados

un máximo de $2,80 \times 10^7$ ufc/100ml, (tabla 1.3.1.1). Los heterótrofos a 37°C se detectaron en el 77% de las muestras, con una media geométrica de $1,05 \times 10^4$ ufc/100ml y un valor máximo de $3,00 \times 10^7$ ufc/100ml. *Pseudomonas* se detectó en 31% de las muestras, con una media geométrica de $4,87 \times 10^0$ ufc/100ml y un máximo de $1,20 \times 10^3$ ufc/100ml. No se aisló *Aeromonas* en las muestras analizadas.

Se determinó la presencia de protozoos en las muestras por observación directa de la muestra sedimentada y por una técnica cualitativa de cultivo, posteriormente se realizó una PCR para detectar protozoos. Del total de las muestras analizadas detectamos presencia de protozoos por observación en el 24% de las muestras y por PCR detectamos un 19% de positivos.

1.3.2 Descripción de parámetros fisicoquímicos de agua sanitaria caliente (A. Distal)

Los factores fisicoquímicos de las 62 muestras de agua caliente distal se pueden observar en la tabla 1.3.2.1.

Tabla 1.3.2.1 Parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua caliente sanitaria, medias, máximos y mínimos (A. Distal).

	Media	D. Standard	Máximo	Mínimo
Temp ($^\circ\text{C}$)	53	6,19	67	37
Turbidez (NTU)	0,66	0,41	2,00	0,12
pH	7,47	0,49	8,76	6,58
Fe (ppm)	0,04	0,08	0,45	<0,01
Zn (ppm)	0,26	0,73	4,01	0,01
Cu (ppm)	0,15	0,26	1,25	<0,01
COT (ppm)	2,53	3,05	20,25	<0,01
Cl (ppm)	0,00	0,00	0,00	0,00

Temp: temperatura, Fe: Hierro, Zn: Cinc, Cu: Cobre, COT: Carbono Orgánico Total (ppm), Cl: Cloro (ppm)

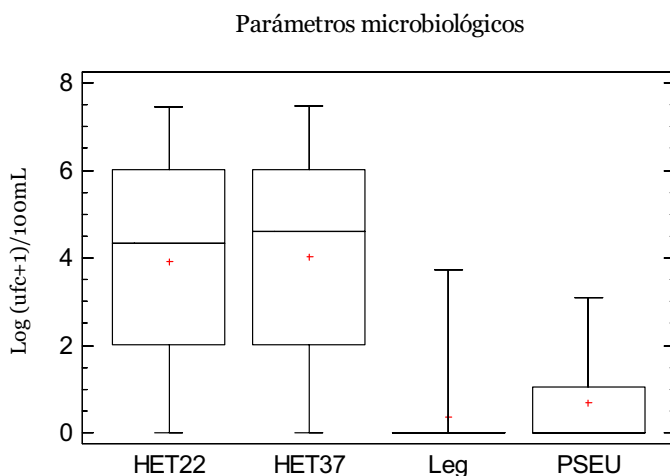
La temperatura media del agua distal fue 53°C con un valor máximo de 67°C y 37°C como mínimo. La turbidez tuvo valores medios de 0,66 NTU

oscilando entre un máximo de 2 NTU y un mínimo de 0,12 NTU. El pH de todas las muestras dio un valor medio de 7,47 con un máximo de 8,76 y un mínimo de 6,58. En el caso del Fe se obtuvo una concentración media de 0,04 ppm con un valor máximo de 0,45 ppm, la concentración media del Zn fue 0,26 ppm con un máximo de 4,01 ppm y finalmente el Cu tuvo una concentración de 0,15 ppm con un máximo de 1,25 ppm. Se obtuvo una concentración media de 2,53 ppm para el Carbono Orgánico Total con un valor máximo de 20,25 ppm (tabla 1.3.2.1.). El cloro en este tipo de agua se evapora rápidamente debido a las altas temperaturas, por lo que no se detectó cloro en ninguna de las muestras.

1.3.3 Descripción estadística de los diferentes parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de muestras de agua sanitaria caliente (Agua Distal)

Con cada uno de los parámetros bacteriológicos de las 62 muestras de agua sanitaria caliente distal, se realizaron análisis estadísticos de distribución de datos, representados en diagramas de cajas. Los resultados de *Legionella*, *Pseudomonas*, Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 37°C se pueden observar en la figura 1.3.3.1.

Fig. 1.3.3.1 Diagrama de cajas de la distribución de datos de los parámetros microbiológicos del agua sanitaria caliente (Agua Distal).



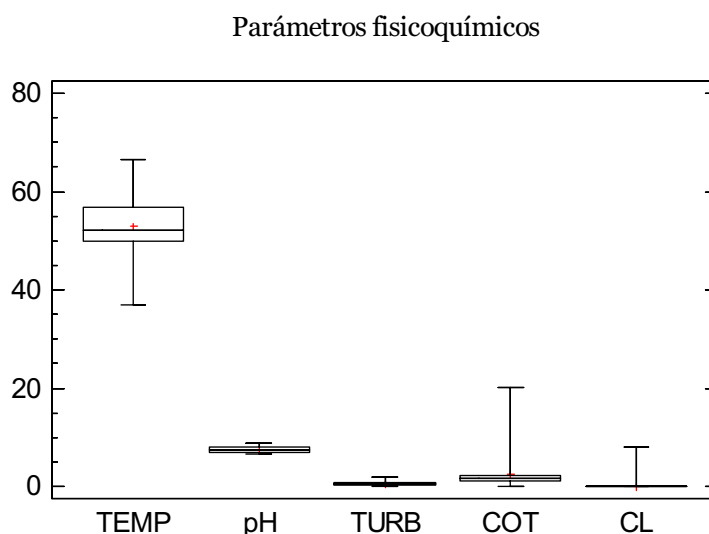
Het 22: heterótrofos a 22°C, Het 37: heterótrofos a 37°C, Leg: *Legionella*, PSEU: *Pseudomonas*

Resultados

El diagrama de cajas de la figura 1.3.3.1. muestra que, en el caso de Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 37°C, estos parámetros tienen una distribución de datos muy similar entre si y según el test de medias realizado con estos valores (datos no mostrados), no existen diferencias significativas al 95% de confianza entre ellos, mientras que comparando las medias de sus datos con los resultados obtenidos de *Legionella* y *Pseudomonas* si se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados de *Legionella* y *Pseudomonas* según análisis estadísticos forman un grupo homogéneo de medias por lo que no presentan diferencias significativas entre sus valores.

Fig 1.3.3.2 Diagrama de cajas de la distribución de datos de los parámetros fisicoquímicos del agua sanitaria caliente (A. Distal).

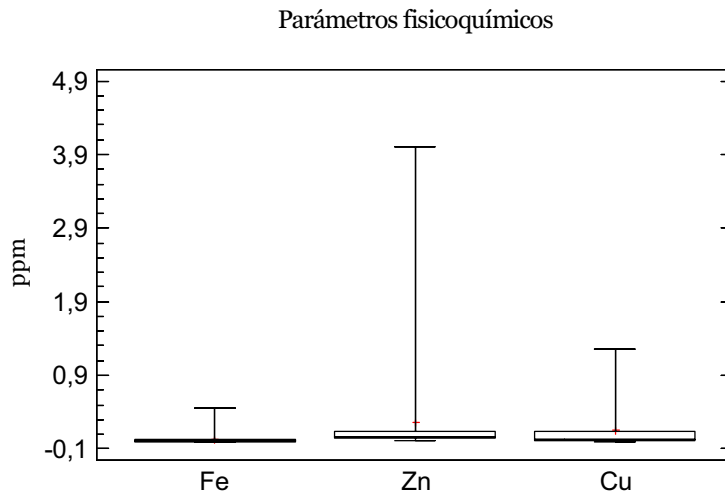


Temp: Temperatura (°C), TURB: Turbidez (UNF), COT: Carbono Orgánico Total (ppm), Cl: Cloro (ppm).

En la figura 1.3.3.2 se puede observar la distribución de los resultados en diagramas de cajas de los parámetros fisicoquímicos. Se puede observar que la dispersión de datos obtenidos de la temperatura es muchos más amplia que el resto de parámetros. La prueba de múltiples rangos a un nivel del 95% de confianza, datos no mostrados, reveló que existían diferencias significativas entre estos parámetros, a excepción del cloro y la

turbidez que forman un grupo homogéneo de medias por lo que no presentan diferencias significativas entre sus datos.

Fig. 1.3.3.3 Diagrama de cajas de la distribución de datos de los metales, de las muestras de agua sanitaria caliente (A. Distal).



Fe: Hierro, Zn: Cinc, Cu: Cobre.

En los diagramas de cajas representados en la figura 1.3.3.3, se puede observar que las distribuciones de datos de los metales son muy similares entre sí. Sin embargo, estadísticamente según la prueba de múltiples rangos, se obtuvo que solo existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los valores de Fe-Zn, con un nivel de confianza del 95%.

En resumen, la distribución de datos de las variables analizadas en este tipo de muestras (A. Distal), presentan diferencias significativas al 95% de confianza en el caso de los Heterótrofos a 22°C y a 37°C con parámetros como Pseudomonas y Legionella. Mientras que entre Pseudomonas y Legionella no existen diferencias estadísticamente significativas.

En el caso de los parámetros fisicoquímicos, los valores de la

Resultados

temperatura tuvieron una distribución más amplia que el resto de los parámetros fisicoquímicos y existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos, sin embargo el cloro y la turbidez no presentaron diferencias.

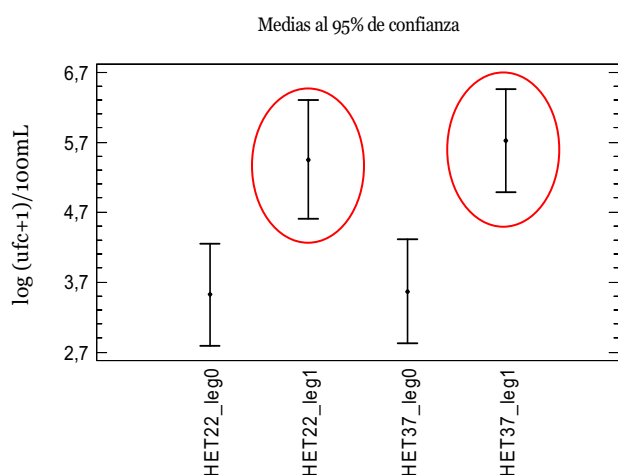
En el caso de los metales se observó que en este tipo de muestras, solo los valores de Fe y Zn presentan diferencias significativas entre sí.

1.3.4. Parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* de muestras de agua sanitaria caliente (Agua Distal)

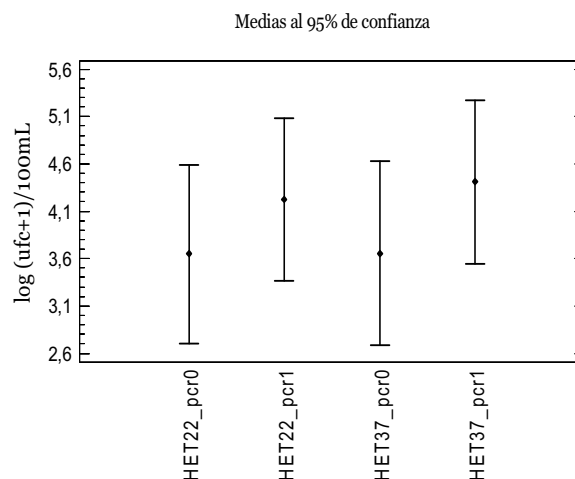
En el figura 1.3.4.1., se observan los análisis estadísticos de los resultados de presencia y ausencia de *Legionella*, obtenidos por cultivo (gráfica A) y por PCR (gráfica B), en relación a los valores de los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos encontrados en este tipo de muestras.

Fig. 1.3.4.1 Medias con intervalos al 95% de confianza, de Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 37°C en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* (A. Distal).

GRÁFICA A



GRÁFICA B



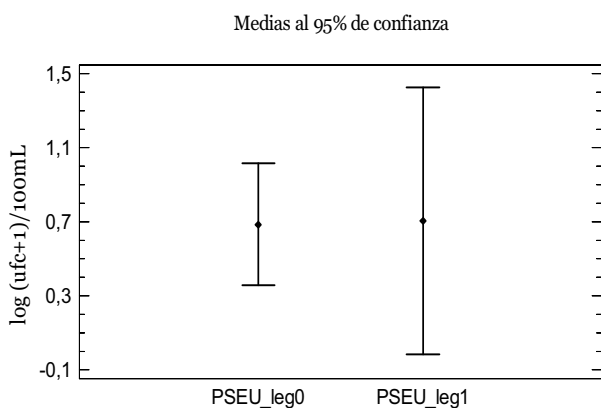
Het: heterótrofos, leg 0: Ausencia de *Legionella* por cultivo, leg1: Presencia de *Legionella* por cultivo, pcr0: Ausencia de *Legionella* por PCR, pcr1: Presencia de *Legionella* por PCR

Se puede observar en la gráfica A las medias con intervalos de confianza al 95% de los parámetros analizados. Al comparar los resultados de Heterótrofos a 22°C y a 37°C con los valores de ausencia y presencia de *Legionella* se obtuvo que existen diferencias significativas entre sus medias. Lo que significa que cuando los valores de Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 37°C son más elevados, existe mayor probabilidad de encontrar la presencia de *Legionella*. Los resultados positivos de *Legionella* se obtuvieron sobre valores reales de Heterótrofos a 22°C de $2,80 \times 10^7$ ufc/100ml y de valores de Heterótrofos a 37°C de $3,00 \times 10^7$ ufc/100ml.

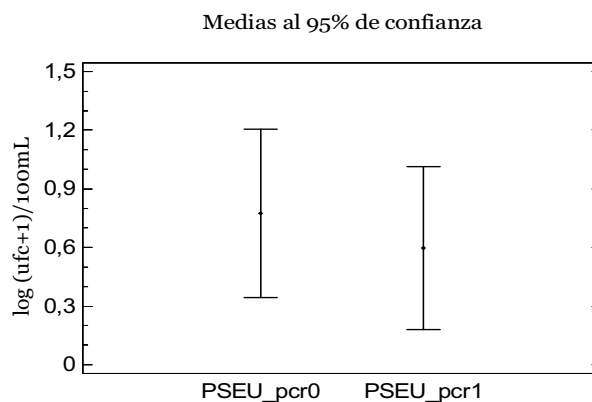
En la gráfica B se puede observar una tendencia a la presencia de ADN de *Legionella* cuando los parámetros de Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 37°C son elevados.

Fig 1.3.4.2 Medias con intervalos al 95% de confianza de *Pseudomonas* en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo y por PCR (A. Distal).

GRÁFICA A



GRÁFICA B



PSEU: *Pseudomonas*, Leg 0: Ausencia de *Legionella* por cultivo, Leg 1: Presencia de *Legionella* por cultivo
 PCRO: Ausencia de *Legionella* por PCR, PCR1: Presencia de *Legionella* por PCR

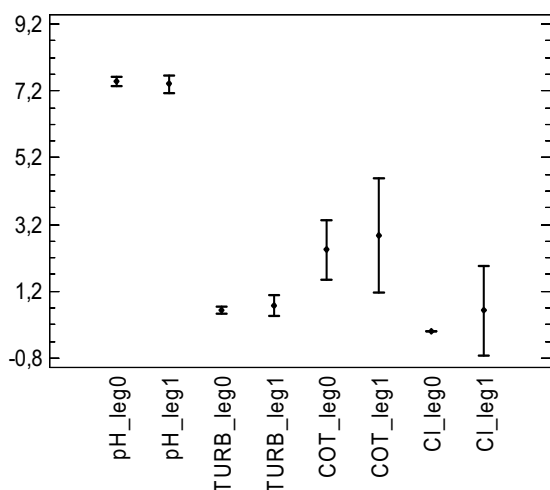
En las gráficas A y B se obtuvo que no existen diferencias significativas entre la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo y por PCR en relación a los resultados de *Pseudomonas* en las muestras de Agua Distal.

Resultados

Fig. 1.3.4.3 Medias con intervalos al 95% de confianza de los parámetros fisicoquímicos en relación a los resultados de presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo y por PCR (A. Distal).

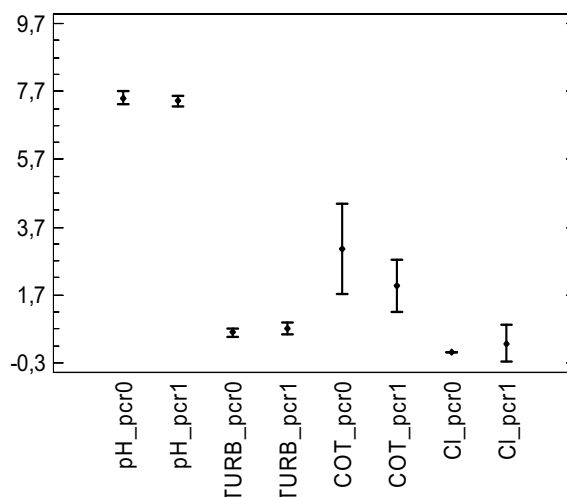
GRÁFICA A

Medias al 95% de confianza



GRÁFICA B

Medias al 95% de confianza

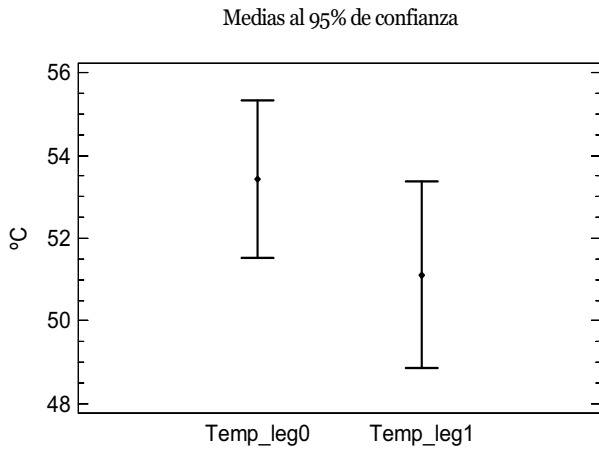


Temp: Temperatura (°C), TURB: Turbidez (UNF), Cl: Cloro (ppm), COT: Carbono Orgánico Total (ppm), Leg 0: Ausencia de *Legionella* por cultivo, Leg 1: Presencia de *Legionella* por cultivo, pcr0: Ausencia de *Legionella* por PCR, pcr1: Presencia de *Legionella* por PCR

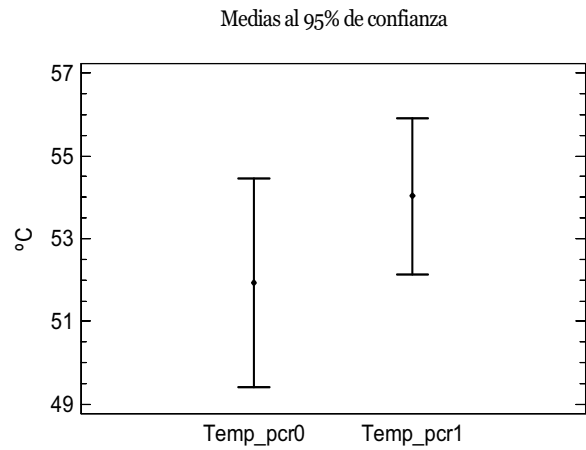
Según el análisis estadístico no existen diferencias significativas entre los parámetros fisicoquímicos y la presencia o ausencia de *Legionella* obtenida mediante cultivo (gráfica A) y obtenida por PCR (gráfica B). En este tipo de muestras sin embargo podemos observar en la gráfica A, una cierta asociación entre la presencia de células viables de *Legionella* a concentraciones elevadas de COT.

Fig. 1.3.4.4 Medias con intervalos al 95% de confianza de la temperatura en relación a los resultados de presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo y por PCR (A. distal).

GRÁFICA A



GRÁFICA B



Temp: Temperatura (°C), Lego: Ausencia de *Legionella* por cultivo, Leg 1: Presencia de *Legionella* por cultivo, pcr0: Ausencia de *Legionella* por PCR, pcr1: Presencia de *Legionella* por PCR

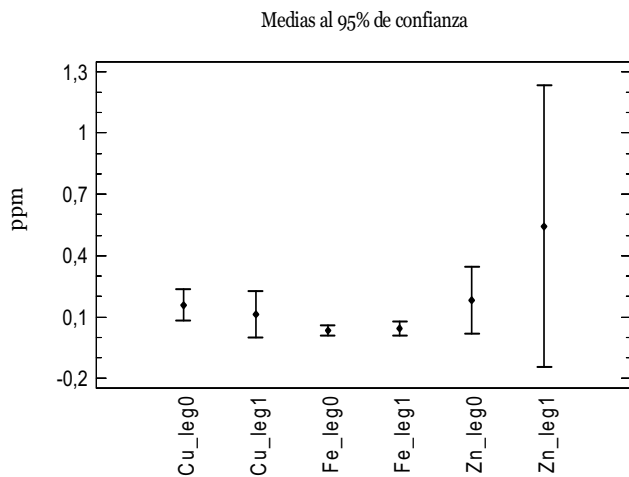
Se puede observar en estas gráficas (A y B) que no existen diferencias significativas entre la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo y por PCR en relación a los resultados de la temperatura en las muestras de Agua Distal.

Sin embargo, podemos observar en la gráfica A una cierta asociación entre la presencia de células viables de *Legionella* y temperaturas más bajas.

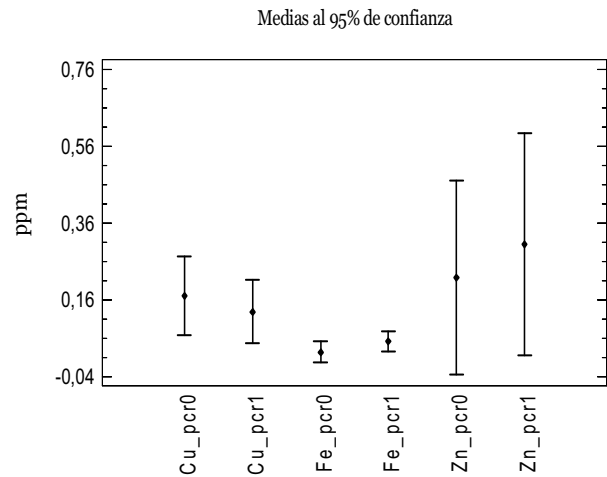
Resultados

Fig. 1.3.4.5 Medias con intervalos al 95% de confianza de los metales en relación a los resultados de presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo y por PCR (A. Distal).

GRÁFICA A



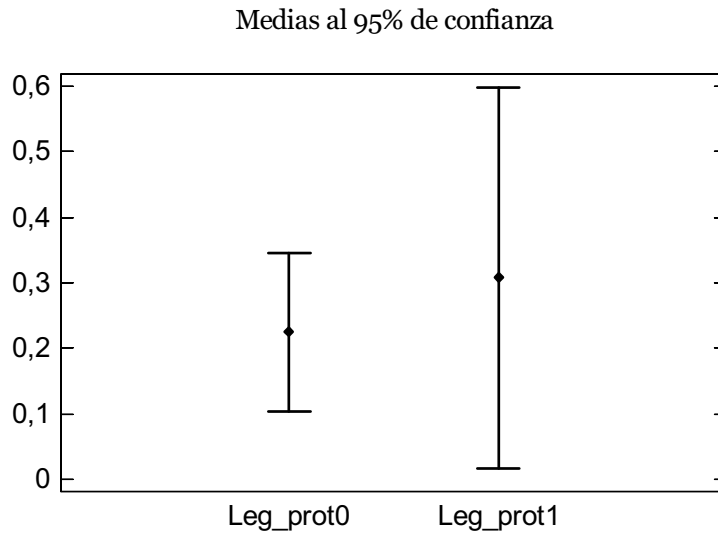
GRÁFICA B



Cu: Cobre (ppm), Fe: Hierro (ppm), Zn: Cinc (ppm), Leg0: Ausencia de *Legionella* por cultivo, Leg1: Presencia de *Legionella* por cultivo, pcr0: Ausencia de *Legionella* por PCR, pcr1: Presencia de *Legionella* por PCR

Se puede observar en la figura 1.3.4.5 que no existe relación estadísticamente significativa al 95% de confianza, entre las medias de las concentraciones de metales con la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida mediante cultivo (gráfica A) y obtenida por PCR (gráfica B).

Fig. 1.3.4.6 Medias con intervalos al 95% de confianza de la presencia de *Legionella* obtenida por cultivo, en relación a los resultados del cultivo de protozoos (A. Distal).

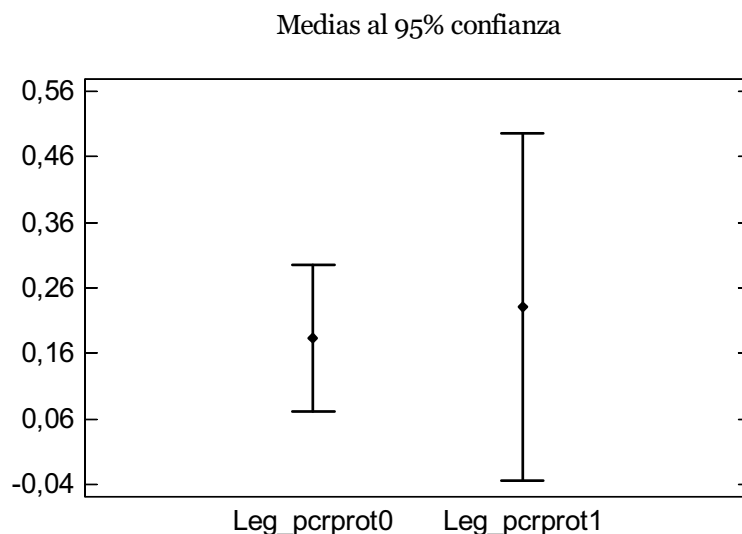


Prot: Presencia de protozoos por observación, Lego: Ausencia de *Legionella* por cultivo, Leg1: Presencia de *Legionella* por cultivo

En la figura 1.3.4.6 se observa que no existen diferencias significativas al 95% de confianza, entre los valores de *Legionella* obtenida mediante cultivo, en relación a la presencia o ausencia de protozoos, en este tipo de agua.

Resultados

Fig. 1.3.4.7 Medias con intervalos al 95% de confianza de la presencia de *Legionella* obtenida por cultivo, en relación a los resultados de PCR de protozoos (A. distal).



Leg0: Ausencia de *Legionella* por cultivo, Leg1: Presencia de *Legionella* por cultivo, pcrprot 0: Ausencia de protozoos por PCR, pcrprot 1: Presencia de protozoos por PCR.

No existe diferencia significativa al 95% de confianza, entre las medias de los valores de *Legionella* obtenidos por cultivo, en relación a la presencia o ausencia de protozoos obtenidos por PCR.

En resumen, en las 62 muestras de agua distal analizadas, los análisis estadísticos que comparan las medias con intervalos de confianza al 95% de confianza, de los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en relación a la presencia y ausencia de Legionella, obtenida con el método de cultivo y por PCR, se obtuvo que la presencia de Legionella se ve favorecida a mayor concentración de Heterótrofos a 22°C y a 37°C y se observó una tendencia a la asociación entre la presencia de células viables de Legionella y temperaturas más bajas.

1.3.5 Correlaciones entre los factores microbiológicos y fisicoquímicos de muestras de agua sanitaria caliente (Agua Distal)

Se puede observar a continuación la tabla 1.3.5.1 de correlaciones de Spearman, para los resultados de los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos para el agua distal.

Tabla 1.3.5.1 Matriz de correlación entre los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de las muestras de agua sanitaria caliente (A. Distal). Se usó el coeficiente de correlación de Spearman.

	Leg	Het22	Het37	Pseud	Temp	pH	Turb	Cl	COT	Fe	Zn	Cu
Leg		0,32 p-0,01	0,36 p-0,01	0,04 p-0,72	-0,18 p-0,15	-0,017 p-0,92	0,04 p-0,73	0,20 p-0,10	0,13 p-0,30	0,23 p-0,06	0,10 p-0,39	0,090 p-0,47
Het 22	0,32 p-0,01		0,97 p-0,00	0,30 p-0,01	-0,50 p-0,00	0,19 p-0,12	0,014 p-0,90	0,06 p-0,59	0,04 p-0,72	0,13 p-0,28	0,26 p-0,03	0,27 p-0,029
Het 37	0,36 p-0,01	0,97 p-0,00		0,31 p-0,01	-0,51 p-0,00	0,18 p-0,15	-0,02 p-0,85	0,09 p-0,44	0,04 p-0,72	0,13 p-0,28	0,26 p-0,037	0,29 p-0,02
Pseud	0,04 p-0,72	0,30 p-0,01	0,31 p-0,01		-0,44 p-0,00	0,11 p-0,38	-0,16 p-0,20	-0,08 p-0,51	0,05 p-0,68	-0,17 p-0,18	0,06 p-0,58	0,16 p-0,20
Temp	-0,18 p-0,15	-0,50 p-0,00	-0,51 p-0,00	-0,44 p-0,00		-0,04 p-0,74	-0,07 p-0,54	-0,10 p-0,41	-0,11 p-0,38	0,01 p-0,92	-0,15 p-0,22	-0,34 p-0,007
pH	-0,017 p-0,92	0,19 p-0,12	0,18 p-0,15	0,11 p-0,38	-0,04 p-0,74		0,018 p-0,88	-0,14 p-0,26	0,02 p-0,87	-0,23 p-0,07	0,13 p-0,29	0,26 p-0,03
Turb	0,04 p-0,73	0,014 p-0,90	-0,02 p-0,85	-0,16 p-0,20	-0,07 p-0,54	0,018 p-0,88		-0,04 p-0,73	0,06 p-0,62	0,03 p-0,78	-0,008 p-0,94	-0,10 p-0,41
Cl	0,20 p-0,10	0,06 p-0,59	0,09 p-0,44	-0,08 p-0,51	-0,10 p-0,41	-0,14 p-0,26	-0,04 p-0,73		-0,20 p-0,11	-0,13 p-0,29	0,21 p-0,08	0,16 p-0,19
COT	0,13 p-0,30	0,04 p-0,72	0,04 p-0,72	0,05 p-0,68	-0,11 p-0,38	0,02 p-0,87	0,06 p-0,62	-0,20 p-0,11		-0,007 p-0,95	-0,02 p-0,85	-0,05 p-0,69
Fe	0,23 p-0,06	0,13 p-0,28	0,13 p-0,28	-0,17 p-0,18	0,01 p-0,92	-0,23 p-0,07	0,03 p-0,78	-0,13 p-0,29	-0,007 p-0,95		0,15 p-0,22	0,04 p-0,73
Zn	0,10 p-0,39	0,26 p-0,03	0,26 p-0,037	0,06 p-0,58	-0,15 p-0,22	0,13 p-0,29	-0,008 p-0,94	0,21 p-0,08	-0,02 p-0,85	0,15 p-0,22		0,35 p-0,005
Cu	0,090 p-0,47	0,27 p-0,029	0,29 p-0,02	0,16 p-0,20	-0,34 p-0,007	0,26 p-0,03	-0,10 p-0,41	0,16 p-0,19	-0,05 p-0,69	0,04 p-0,73	0,35 p-0,005	

En cada celda, superior: Coeficiente de Spearman; inferior: P-valor < 0,05 significativo al 95%, P-valor < 0,1 significativo al 90%

La tabla 1.2.5.1 muestra las correlaciones por rangos de Spearman de las muestras de agua sanitaria caliente Distal, los datos en negrita son los que presentan una correlación significativa de 90% y 95%.

Resultados

Se pueden destacar las correlaciones encontradas entre Heterótrofos a 22°C con Heterótrofos a 37°C y correlaciones débiles pero significativas de estos dos parámetros con *Pseudomonas*. En el caso de los parámetros fisicoquímicos se encontraron correlaciones estadísticamente significativas de Heterótrofos con la temperatura, el Zn y el Cu. Los resultados de Cu tuvieron correlaciones con la temperatura, el pH y el Zn.

Finalmente se encontraron correlaciones significativas entre *Legionella* y Fe.

1.4 Parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en relación a los resultados positivos obtenidos por cultivo de *Legionella*, en agua sanitaria caliente

A fin de comparar las características bióticas y abióticas de los sistemas de agua caliente se realizó una comparación de los diferentes parámetros en relación a los resultados positivos de *Legionella*. A continuación en la tabla 1.4.1 y 1.4.2 se observan los resultados obtenidos de los distintos tipos de muestreo (Mezcla, A. Proximal y A. Distal).

Tabla 1.4.1 Datos de parámetros microbiológicos en relación los resultados positivos de *Legionella* por cultivo.

		<i>Legionella</i> ufc/100 ml	Het 22°C ufc/100 ml	Het 37°C ufc/100 ml	<i>Pseudomonas</i> ufc/100 ml	Protozoos
Mezcla (31%)	M. geom.	1,26x10²	1,62x10⁶	1,95x10⁶	8,59x10⁰	/
	Min.	2,00x10⁰	4,00x10³	2,00x10³	<1,00x10⁰	/
	Máx.	2,95x10³	8,64x10⁷	2,80x10⁷	1,84x10³	/
	%		100%	100%	46%	46%
A. Proximal (37%)	M. geom.	2,24x10²	8,13x10⁵	1,17x10⁶	3,31 x10¹	/
	Min.	1,80x10¹	8,00x10³	1,10x10⁴	<1,00x10⁰	/
	Máx.	2,00x10³	1,10x10⁷	9,60x10⁶	1,20x10³	/
	%		100%	100%	65%	61%
A. Distal (21%)	M. geom.	4,47x10¹	2,82 x10⁵	4,90 x10⁵	1,45 x10¹	/
	Min.	3,00x10⁰	1,10x10³	5,00x10³	<1,00x10⁰	/
	Máx.	5,30x10³	2,80x10⁷	3,00x10⁷	1,00x10³	/
	%		100%	100%	38%	31%

Los resultados indicaron dos ecosistemas, diferenciados principalmente por la temperatura del agua. La tabla 1.4.1 muestra los valores de las medias geométricas, máximos y mínimos de las muestras positivas de

Resultados

Legionella de los tres tipos de muestras. La bacteria se aisló inicialmente en el 31% de las muestras Mezcla, en el 37% de las muestras del Agua Proximal y en el 21% del Agua Distal.

La comparación de estos tipos de muestra demostró que el agua proximal tiene una mayor carga microbiana de *Legionella*, *Pseudomonas* y protozoos.

Los valores máximos y mínimos de los otros parámetros microbiológicos, en los tres tipos de agua son muy similares.

Se puede observar en la tabla 1.4.2, la media y los valores máximos y mínimos de los parámetros fisicoquímicos en relación a los valores positivos de *Legionella*.

Tabla 1.4.2 Datos de parámetros fisicoquímicos en relación a los resultados positivos de *Legionella* por cultivo.

		Temp. °C	pH	Turbidez NTU	COT ppm	Fe ppm	Zn ppm	Cu ppm
	M. geom.	44,58	7,68	0,60	1,72	0,03	0,13	0,19
Mezcla	Min.	25	7,00	0,18	0,55	0,00	0,00	0,00
	Máx.	65	8,31	1,50	2,79	0,25	0,52	0,75
	M. geom.	27,88	7,43	0,73	2,64	0,04	0,31	0,15
A. proximal	Min.	16	6,88	0,12	1,00	0,00	0,07	0,01
	Máx.	36	8,07	2,50	9,50	0,20	1,09	1,25
	M. geom.	51	7,42	0,77	2,87	0,05	0,54	0,1
A. distal	Min.	45	6,93	0,20	1,00	0,00	0,03	0,01
	Máx.	60	8,04	2,00	9,75	0,20	1,79	0,69

En el caso de los parámetros fisicoquímicos no se pueden distinguir claramente diferencias entre los resultados de los tres tipos de agua. A excepción de la temperatura, donde se aisló *Legionella*, en la muestra

mezcla, a temperaturas mínimas de 25°C y máximas de 65°C, en el A. proximal se encontraron células viables en temperaturas mínimas de 16 °C y máximas de 37 °C en el caso del agua distal, a temperaturas mínimas de 37 °C y a un máximo de 60 °C.

1.5 Análisis discriminantes de los diferentes tipos de muestras de agua sanitaria caliente

Se utilizó el análisis estadístico de las funciones discriminantes para clasificar los resultados obtenidos. Este análisis se realiza para predecir la aparición de uno de los parámetros en estudio, en el caso de este trabajo se buscó predecir la posible presencia de *Legionella*, en el agua sanitaria caliente.

En los diferentes tipos de muestra (Mezcla, A. Proximal, A. Distal), el análisis discriminante que se realizó con todos los parámetros analizados y se consideraron aquellos con lo que se obtenían mejores resultados, en la función resultante intervinieron simultáneamente:

PCR de *Legionella*, heterótrofos a 37°C, Fe, Zn y Cu, y en agua distal también se considero la **temperatura**, en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* obtenida por cultivo.

La siguiente ecuación de la función discriminante, muestra como el programa utilizó las variables independientes para discriminar entre los distintos grupos.

$$0,906281*PCRLeg + 0,273676*Fe - 0,238966*Zn + 0,0136291*Cu + 0,393782*LogHET37$$

A continuación en la tabla 1.5.1 se pueden observar los resultados del análisis discriminante para la muestra mezcla:

Resultados

Tabla 1.5.1 Clasificación de la Mezcla

<i>Presencia/ausencia Legionella</i>	<i>Tamaño de Grupo</i>	<i>Predicción</i>	
		<i>0</i>	<i>1</i>
0	79	68 (86,08%)	11 (13,92%)
1	28	7 (25,00%)	21 (75,00%)

Porcentaje de casos correctamente clasificados: **83,18%**

Este modelo indicó que en el agua mezcla, tomando en cuenta estos parámetros, se puede predecir la presencia de *Legionella* con un porcentaje de aciertos de un 83%.

La tabla 1.5.2 muestra los resultados del análisis discriminante para la muestra del Agua Proximal:

Tabla 1.5.2 Clasificación del A. Proximal

<i>Presencia/ausencia Legionella</i>	<i>Tamaño de Grupo</i>	<i>Predicción</i>	
		<i>0</i>	<i>1</i>
0	39	27 (69,23%)	12 (30,77%)
1	18	0 (0,00%)	18 (100,00%)

Porcentaje de casos de entrenamiento correctamente clasificados: **78,95%**

Con este análisis discriminante fueron clasificados correctamente el 78% de los casos, por lo que se puede predecir la presencia de *Legionella* en este porcentaje de los casos, si se analiza simultáneamente los parámetros antes explicados.

La función discriminante estandarizada que mejor funciona en este caso está dada por la ecuación siguiente:

$$0,927821*PCRLeg + 0,274648*LogHET37 + 0,151024*Fe + 0,0587712*Zn + 0,189482*Cu$$

Se puede observar en la tabla 1.5.3 los resultados del análisis discriminante para el Agua Distal.

Tabla 1.5.3. Clasificación del A. Distal

<i>Presencia/ausencia Legionella</i>	<i>Tamaño de Grupo</i>	<i>Predicción</i>	
		<i>0</i>	<i>1</i>
0	49	47 (95,92%)	2 (4,08%)
1	9	6 (66,67%)	3 (33,33%)

Porcentaje de casos de entrenamiento correctamente clasificados: **86,21%**

Este análisis discriminante indicó que en el Agua Distal se puede predecir la presencia de *Legionella* con un porcentaje de aciertos de un 86%.

La función discriminante está dada por la ecuación siguiente:

$$0,858531*PCRLeg + 0,345906*LogHET37 - 0,340992*Temp - 0,0158277*Fe + 0,408556*Zn - 0,209284*Cu$$

2 TORRES DE REFRIGERACIÓN

Se estudió la presencia de *Legionella* en muestras de torres de refrigeración de un edificio público, mensualmente durante 3 años y paralelamente se determinaron parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y el biocida utilizado regularmente.

2.1 Descripción de parámetros microbiológicos de muestras de agua de torres de refrigeración

Se analizó la presencia y se cuantificó *Legionella*, Heterótrofos a 22°C y a 37°C, *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., protozoos y se analizaron parámetros fisicoquímicos como temperatura, pH, turbidez, concentración de carbono orgánico, Fe, Cu, Zn, concentración y tipo de biocida.

En la tabla 2.1.1 se presentan los resultados de los parámetros microbiológicos obtenidos en cada una de las muestras, están expresados en medias geométricas, valores máximos y mínimos y porcentajes de casos positivos de cada parámetro microbiológico.

Capítulo III: *Legionella* en ASC y torres de refrigeración

Tabla 2.1.1 Parámetros microbiológicos de las muestras de torres de refrigeración, porcentaje de los datos positivos de cada caso, media geométrica, máximos y mínimos (Torres).

	% Positivos Cultivo	% positivos PCR	Media geométrica ufc/100ml	Máximo ufc/100ml	Mínimo ufc/100ml
<i>Legionella</i>	4% (2/54)	4% (2/54)	1,16x10 ⁰	1,00x10 ²	ND ^b
Het 22°C	48% (26/54)	NA ^a	8,51x10 ¹	1,90x10 ⁷	<5,00x10 ²
Het 37°C	48% (26/54)	NA	8,13x10 ¹	1,07x10 ⁷	<5,00x10 ²
<i>Pseudomonas</i>	22% (12/54)	NA	3,05x10 ⁰	1,00x10 ³	<1,00x10 ⁰
<i>Aeromonas</i>	ND	NA	<0,00x10 ⁰	<0,00x10 ⁰	<1,00x10 ⁰
Protozoos	39% (21/54)	31% (16/54)	NA	NA	NA

^a NA: no analizado

^b ND: no detectado

Het: heterótrofos

Las muestras de torres se concentraron por el método de filtración de acuerdo con la normativa ISO 11731-1998, expuesta en el apartado 4.1 de materiales y métodos, para aislar y cuantificar *Legionella*. Obtuvimos 2 muestras positivas del análisis de 54 muestras de agua de torres (tabla 2.1.1), con un valor de 3,20x10¹ ufc/100ml y 1,00x10² ufc/100ml, respectivamente. Mediante la PCR diseñada por Jonas *et al.* 1995, y modificada para una PCR semianidada, obtuvimos que todas las muestras positivas para *Legionella* por cultivo también lo fueron por PCR (tabla 2.1.1).

La identificación de las colonias crecidas aplicando el kit de *Legionella Latex Test* nos indicó la presencia de *L. pneumophila* serogrupo 2-14 en una de las muestras y *Legionella* serogrupo 1 en la otra muestra positiva por cultivo.

Cuando realizamos el análisis de los otros parámetros microbiológicos estudiados, obtuvimos que los Heterótrofos a 22°C fueron positivos en el

Resultados

48% de las muestras de agua sanitaria caliente, con una media geométrica de $8,51 \times 10^1$ ufc/100ml y un valor máximo de $1,90 \times 10^7$ ufc/100ml. En el caso de los heterótrofos a 37°C también fueron positivos en el 48% de las muestras, con una media geométrica de $8,13 \times 10^1$ ufc/100ml y con un valor máximo de $1,07 \times 10^7$ ufc/100ml (tabla 2.1.1).

Cuando analizamos *Pseudomonas* mediante cultivo en placa, se detectaron casos positivos en el 22% de las muestras con una media geométrica de $3,05 \times 10^0$ ufc/100ml y un valor máximo de $1,00 \times 10^3$ ufc/100ml. Realizamos también el análisis de *Aeromonas*, sin embargo no obtuvimos en ninguna muestra resultados positivos para esta bacteria.

Se determinó la presencia de protozoos en las muestras de torres, obtuvimos un 39% de protozoos por observación y por PCR detectamos un 31% de muestras positivas (tabla 2.1.1).

2.2 Descripción de parámetros fisicoquímicos de agua de torres de refrigeración

Los resultados del análisis de factores fisicoquímicos de las 54 muestras estudiadas se pueden observar en la tabla 2.2.1.

Tabla 2.2.1 Parámetros fisicoquímicos de las muestras de torres de refrigeración, medias, máximos y mínimos. (Torres)

	Media	D. Standard	Máximo	Mínimo
Temp (°C)	24	3,94	31	10,00
Turbidez (NTU)	1,47	1,51	8,60	0,30
pH	7,94	0,82	8,84	6,00
Fe (ppm)	0,03	0,09	0,57	<0,01
Zn (ppm)	0,16	0,26	1,43	<0,02
Cu (ppm)	0,12	0,46	3,40	<0,01
COT (ppm)	9,63	15,48	39	0,47
Cl (ppm)	5,15	3,68	8,00	0,00

Temp: temperatura , Fe: Hierro, Zn: Cinc, Cu: Cobre, COT: Carbono Orgánico Total (ppm), Cl: Cloro (ppm)

Las muestras de torres de este estudio, tuvieron una temperatura media de 24°C y estos valores oscilaron entre los 31°C como máximo y 10°C como mínimo. En el caso de la turbidez se obtuvo una media de 1,47 NTU oscilando entre 8,60 NTU y 0,30 NTU. El pH de todas las muestras tuvo un valor medio de 7,94 con un máximo de 8,84 y un mínimo de 6. En el caso de los metales analizados, obtuvimos una concentración media para el Fe de 0,03 ppm con un máximo de 0,57 ppm, el Zn tuvo una concentración media de 0,16 ppm con un máximo de 1,43 ppm y el Cu una concentración de 0,12 ppm con una concentración máxima de 3,40 ppm. Al analizar el Carbono Orgánico Total (COT) de las 54 muestras, obtuvimos una concentración media de 9,63 ppm con un mínimo de 0,47 ppm y una concentración máxima de 39 ppm (tabla 2.2.1).

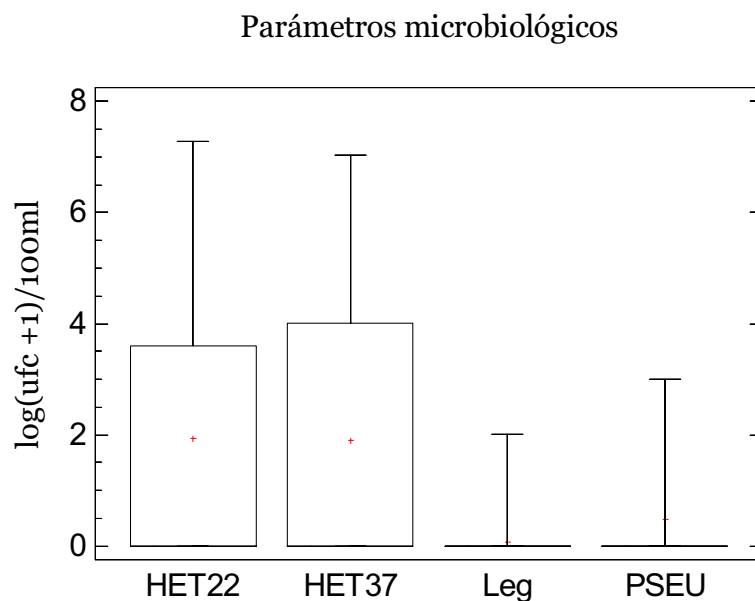
El biocida utilizado en estas torres fue el hipoclorito de sodio, mediante un dispensador de cloro que añadía periódicamente una concentración elevada de cloro, por lo que este tipo de muestras tuvieron una concentración media de 5,15 ppm y un máximo de 8 ppm.

2.3 Descripción estadística de los diferentes parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de las muestras de agua de torres de refrigeración.

Se realizaron diagramas de cajas de los parámetros bacteriológicos y fisicoquímicos de las 54 muestras de agua de torres. El análisis de medias de los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* no se pudo realizar, debido a que solo se aislaron cepas de *Legionella* en 2 muestras, por lo que un estudio estadístico no es considerado significativo con tan pocos datos.

Resultados

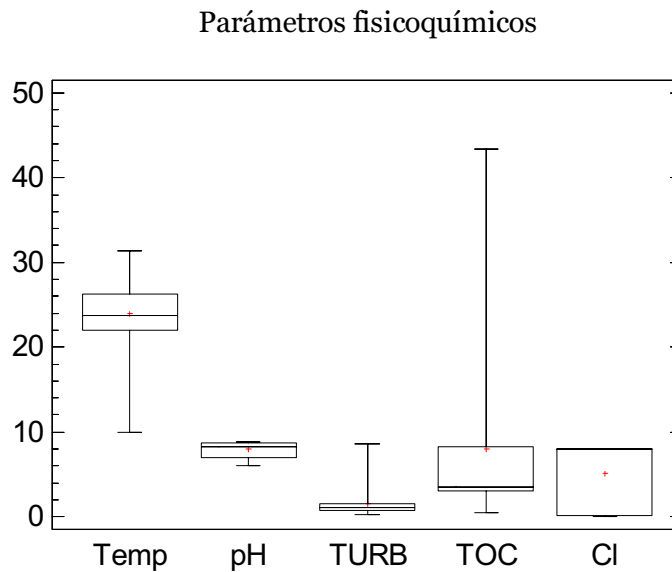
Fig. 2.3.1 Diagrama de cajas de la distribución de los datos de los parámetros microbiológicos de las muestras de torres de refrigeración.



Leg: *Legionella*, Het22: heterótrofos a 22°C, Het37: heterótrofos a 37°C, PSEU: *Pseudomonas*

Se puede observar en la figura 2.3.1 la representación de la distribución de datos de cada parámetro microbiológico en diagramas de cajas. En el caso de los Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 37°C, se observa que tienen una distribución de datos muy similar entre si, según la prueba de rangos múltiples forman un grupo homogéneo de medias por lo que no existen diferencias significativa al 95% de confianza entre ellos, mientras que comparando la distribución de sus datos con los resultados de *Legionella* y *Pseudomonas* se observa que sí existen diferencias significativas entre ellos. Al comparar la distribución de los datos entre *Legionella* y *Pseudomonas* se encontró que sus datos forman un grupo homogéneo y no existen diferencias estadísticamente significativas entre sus valores.

Fig. 2.3.2 Diagrama de cajas de la distribución de los datos de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de torres de refrigeración.

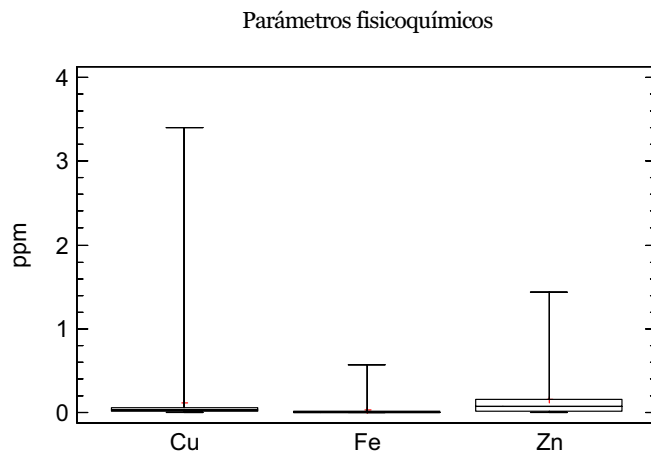


Temp: Temperatura (°C), TURB: Turbidez (UNF), Cl: Cloro (ppm), COT: Carbono Orgánico Total (ppm)

En la figura 2.3.2 se pueden observar diferencias significativas a un 95% de confianza entre los parámetros fisicoquímicos como temperatura, pH, turbidez, COT y cloro. Según el test de medias el pH y COT forman un grupo homogéneo de medias, al igual que el pH y el cloro, por lo que no existen diferencias significativas entre estos valores.

Resultados

Fig. 2.3.3 Diagrama de cajas de la distribución de los datos de metales, en las muestras de torres de refrigeración.



Fe: Hierro, Zn: Cinc, Cu: Cobre.

En la figura 2.3.3 se puede observar la distribución de datos del Cu, Fe y Zn. En este tipo de agua todos los metales analizados forman grupos homogéneos de medias, entre los que no existen diferencias estadísticamente significativas.

En resumen, se puede observar que la distribución de datos de las variables analizadas en las torres de refrigeración presentan diferencias estadísticamente significativas entre los Heterótrofos a 22°C y a 37°C con parámetros como Pseudomonas y Legionella, mientras que éstos no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí.

En el caso de los parámetros fisicoquímicos los valores mostraron una distribución y dispersión de datos muy diferentes y según la prueba de rangos múltiples, el pH no presentó diferencias significativas con el COT. En el caso de los metales (Cu, Fe y Zn), se obtuvo que en este tipo de muestras, no existen diferencias estadísticamente significativas entre sus valores.

2.4 Correlaciones entre los factores microbiológicos y fisicoquímicos de muestras de agua de torres de refrigeración.

Se puede observar a continuación la tabla 2.4.1 las correlaciones de Spearman para los resultados de los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos para el agua sanitaria caliente.

Tabla 2.4.1 Matriz de correlación entre los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos de las muestras de torres de refrigeración. Se usó el coeficiente de correlación de Spearman.

	Leg	Het22	Het37	Pseud	Temp	pH	Turb	Cl	COT	Fe	Zn	Cu
Leg		0,31 p-0,02	0,32 p-0,01	0,40 p-0,003	-0,011 p-0,93	-0,17 p-0,19	0,12 p-0,35	-0,29 p-0,03	-0,05 p-0,71	0,03 p-0,80	-0,16 p-0,22	0,11 p-0,41
Het 22	0,31 p-0,02		0,90 p-0,000	0,71 p-0,000	0,08 p-0,53	-0,18 p-0,18	0,018 p-0,89	-0,49 p-0,00	-0,14 p-0,27	0,12 p-0,35	-0,07 p-0,58	0,29 p-0,03
Het 37	0,32 p-0,01	0,90 p-0,000		0,70 p-0,00	0,04 p-0,74	-0,16 p-0,23	0,04 p-0,73	-0,47 p-0,00	-0,24 p-0,07	0,03 p-0,79	-0,02 p-0,84	0,29 p-0,03
Pseud	0,40 p-0,003	0,71 p-0,000	0,70 p-0,00		-0,12 p-0,37	-0,17 p-0,19	0,06 p-0,65	-0,64 p-0,000	-0,11 p-0,38	-0,03 p-0,82	-0,21 p-0,11	0,20 p-0,13
Temp	-0,011 p-0,93	0,08 p-0,53	0,04 p-0,74	-0,12 p-0,37		0,33 p-0,01	-0,33 p-0,01	0,23 p-0,08	0,16 p-0,23	-0,08 p-0,52	-0,012 p-0,92	-0,20 p-0,12
pH	-0,17 p-0,19	-0,18 p-0,18	-0,16 p-0,23	-0,17 p-0,19	0,33 p-0,01		-0,16 p-0,23	0,38 p-0,005	0,21 p-0,12	0,14 p-0,28	0,18 p-0,16	-0,15 p-0,25
Turb	0,12 p-0,35	0,018 p-0,89	0,04 p-0,73	0,06 p-0,65	-0,33 p-0,01	-0,16 p-0,23		-0,16 p-0,23	-0,25 p-0,06	0,22 p-0,09	-0,27 p-0,04	0,22 p-0,10
Cl	-0,29 p-0,03	-0,49 p-0,00	-0,47 p-0,00	-0,64 p-0,000	0,23 p-0,08	0,38 p-0,005	-0,16 p-0,23		0,04 p-0,75	-0,006 p-0,96	0,27 p-0,04	-0,20 p-0,14
COT	-0,05 p-0,71	-0,14 p-0,27	-0,24 p-0,07	-0,11 p-0,38	0,16 p-0,23	0,21 p-0,12	-0,25 p-0,06	0,04 p-0,75		0,22 p-0,09	0,20 p-0,13	-0,012 p-0,92
Fe	0,03 p-0,80	0,12 p-0,35	0,03 p-0,79	-0,03 p-0,82	-0,08 p-0,52	0,14 p-0,28	0,22 p-0,09	-0,006 p-0,96	0,22 p-0,09		0,33 p-0,014	0,27 p-0,04
Zn	-0,16 p-0,22	-0,07 p-0,58	-0,02 p-0,84	-0,21 p-0,11	-0,012 p-0,92	0,18 p-0,16	-0,27 p-0,04	0,27 p-0,04	0,20 p-0,13	0,33 p-0,014		0,34 p-0,01
Cu	0,11 p-0,41	0,29 p-0,03	0,29 p-0,03	0,20 p-0,13	-0,20 p-0,12	-0,15 p-0,25	0,22 p-0,10	-0,20 p-0,14	-0,012 p-0,92	0,27 p-0,04	0,34 p-0,01	

En cada celda, superior: Coeficiente de Spearman; inferior: P-valor < 0,05 significativo al 95%, P-valor < 0,1 significativo al 90%

La tabla 2.4.1 muestra las correlaciones por rangos de Spearman de las muestras de torres de refrigeración, los datos en negrita son los que presentan correlaciones significativas del 90% y 95%.

Resultados

Las correlaciones que se pueden destacar, son las encontradas entre heterótrofos a 22°C con heterótrofos a 37°C y correlaciones significativas de estos dos parámetros con *Pseudomonas* y con parámetros fisicoquímicos como Cu y cloro.

También se encontraron correlaciones débiles pero significativas entre *Legionella* con heterótrofos a 22°C y a 37°C, *Pseudomonas* y cloro. Sin embargo se debe tomar en cuenta que estas correlaciones fueron realizadas con 2 datos positivos para *Legionella*, con lo cual el análisis no es estadísticamente correcto.

3 IDENTIFICACIÓN DE PROTOZOOS EN AGUA SANITARIA CALIENTE Y TORRES DE REFRIGERACIÓN

Se realizó la identificación de protozoos de las muestras de ASC, por observación directa y por cultivo, en el departamento de Biología Animal de la Facultad de Biología, esta identificación es parte del trabajo realizado por Oriol Canals con la tutoría del Dr. Humbert Salvadó, para el máster en Biología experimental titulado “Metodologies per l’estudi dels protozous en sistemes hídrics artificials”.

Los resultados obtenidos en este trabajo, se dividieron en los diferentes tipos de muestra que utilizamos en este trabajo (Mezcla, Agua Proximal, Agua Distal).

- ❖ En el A. sanitaria Mezcla, se realizó el cultivo de la muestra directa con medio de trigo (anexos de materiales y métodos apartado 1.7).

En 16 muestras de las 63 analizadas en este trabajo crecieron protozoos de vida libre (amebas, flagelados y ciliados). La identificación morfológica indicó que se trataba de :

- **Amebas (75%):** *Vahlkamphia enterica*, otras especies de la familia Vahlkamphidae, *Vanella* spp., morfologías parecidas a *Hartmannella* spp. y amebas de la clase Lobosea (imag. 3.1a).
- **Flagelados (56%):** Bodónidos y otras especies. (imag. 3.1b)
- **Ciliados (6%):** *Glaucoma scintillans* y *Colpoda steinii* (imag. 3.2).



Imag.3.1 (40x, contraste de fases)

a) *Vanella* spp.

b) Flagelado bodónido



Imag. 3.2 (40x, contraste de fases)

Glaucoma scintillans

❖ En el A. proximal en 14 de 40 muestras analizadas se observaron:

- **Amebas (100%):** *Acanthamoeba* spp., morfología parecida a *Korotnella* spp. (familia Paramoebidae), individuos de la familia Vahlkamphidae y amebas pertenecientes a la clase Lobosea (imag. 3.3, 3.4)
- **Flagelados (21%):** Bodónidos y otras especies (imag. 3.1 b).



Imag.3.3 (40x, contraste de fases)
***Acanthamoeba* spp**



Imag.3.4 (40x contraste de fases)
Valhkamphidae



Imag.3.5 (40x contraste de fases)
**Ameba no identificada
con estructura uropodial**



Imag.3.6(40x contraste de fases)
Paramoebidae

Resultados

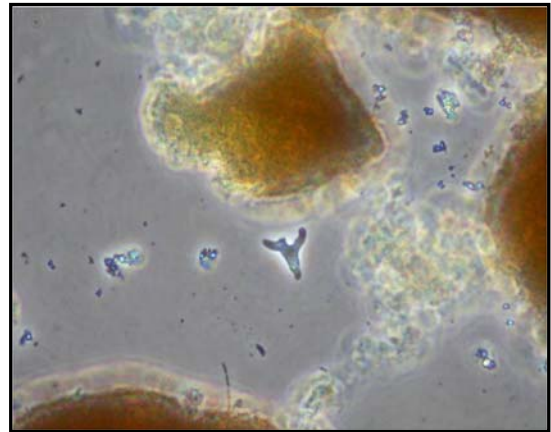
❖ En el A. distal se obtuvieron 7 muestras positivas por cultivo de 40 analizadas, los resultados se muestran a continuación:

- **Amebas (100%):** Individuos de la clase Lobosea e individuos con morfología parecida a *Hartmannella* spp. (imag. 3.8).
- **Flagelados (12%):** No Identificados.



Imag.3.7 (40x contraste de fases)

**Ameba con morfología monopodial
parecida a *Hartmannella***



Imag.3.8 (10x contraste de fases)

**Ameba con morfología parecida
a *Hartmannella***

❖ En las torres de refrigeración se analizaron 32 muestras por cultivo de las cuales 7 fueron positivas para protozoos, en las que se obtuvieron:

- **Amebas (100% de las muestras):** Morfologías parecidas al género *Acanthamoeba* y a la familia Paramoebidae (imag. 3.9)
- **Flagelados (42%):** Bodónidos y otras especies.
- **Ciliados (28%):** *Colpoda steinii*.



Imag.3.9 (40x)

**Ciste posiblemente de
Acanthamoeba spp.**



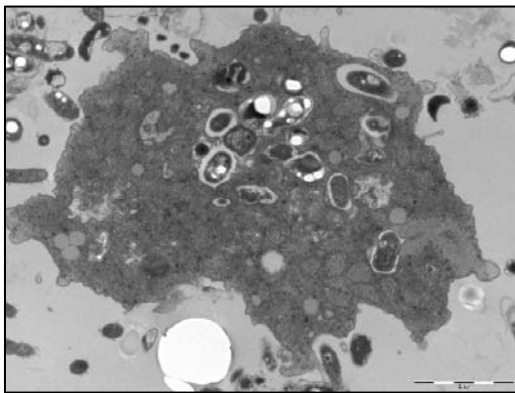
Imag.3.10 (40x contraste de fases)

Trofozoito en forma de flotación

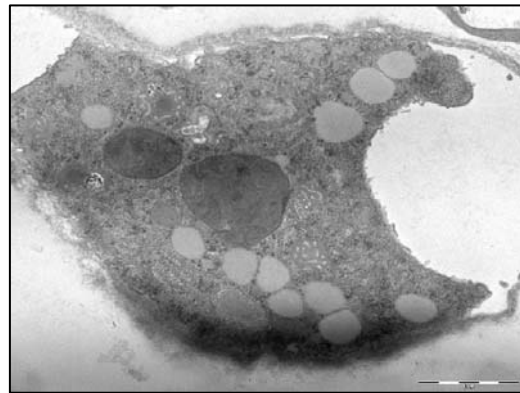
3.1 Observación de amebas mediante microscopio electrónico de transmisión.

Se realizaron observaciones del concentrado de una muestra de ASC (Cod. 29), las preparaciones se realizaron en los Servicios Científico Técnico del Parc Científic de Barcelona.

Los cortes pertenecían a *amebas* con posibles fagosomas con bacterias ARB no digeridas (imag. 3.11, 3.14), sin embargo no se lograron identificar las bacterias en cuestión.



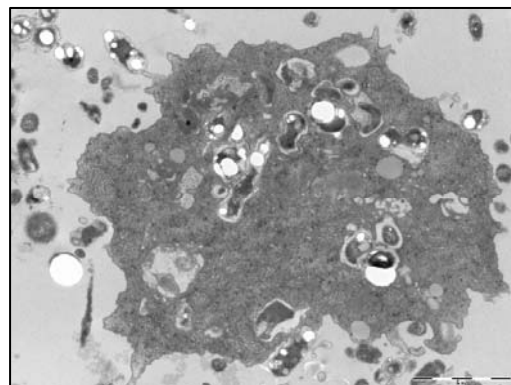
Imag. 3.11 *Acanthamoeba* spp con fagosomas de bacterias no digeridas (80Kv)



Imag. 3.12 *Acanthamoeba* spp encistada con vacuolas lipídicas (80Kv)



Imag. 3.13 Posible ARB (100Kv)



Imag. 3.14 *Acanthamoeba* spp con posibles ARB (80Kv)

DISCUSIÓN

Legionella en el medio ambiente se aísla de un rango muy amplio de ambientes acuáticos con factores bióticos y fisicoquímicos muy diversos (Kuiper M.W. *et al.* 2004, Paszco-Kolva *et al.* 1991, Wadowsky y Yee, 1983). En este trabajo buscamos la presencia de *Legionella* y los factores bióticos y abióticos que la acompañan en instalaciones de riesgo: aguas calientes sanitarias y torres de refrigeración. Citadas así porque la mayoría de los casos esporádicos y brotes comunitarios de legionelosis se han asociado al agua de estos sistemas hídricos artificiales (*Eur. J. Epidemiology*, 1996). Sin embargo existen pocos trabajos publicados sobre la ecología de esta bacteria en estos hábitats (Leoni *et al.* 2004).

A pesar de que muchos trabajos afirman que *Legionella* es un organismo de difícil crecimiento en el laboratorio (Kuiper M.W. *et al.* 2004, Rogers J. *et al.* 1994, Wadowsky y Yee, 1983), en este estudio se logró aislar *Legionella* por cultivo en placa siguiendo el protocolo establecido por la ISO 11731-1998 y se detectó por medio de la técnica de PCR semianidada.

Legionella se aísla principalmente de biofilms y se asocia a la presencia de otros microorganismos como bacterias aerobias, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y especialmente se la asocia a protozoos (Chen *et al.*, 2004, Drozanski, 1956). Por esta razón, decidimos estudiar también la presencia y la relación de estos microorganismos con *Legionella*. Algunos autores que realizaron estudios *in vitro* en biofilms, afirman que la presencia de protozoos es necesaria para la multiplicación de *L. pneumophila* y que los biofilms contienen altas concentraciones de bacterias heterótrofas (Kuiper *et al.* 2004 y Wadowsky *et al.* 1988). Otros autores cuestionan el hecho de que los protozoos sean necesarios como hospedadores de *Legionella*. Así por ejemplo Surman *et al.* 2002, detectaron crecimiento extracelular de *Legionella* en un medio con un inhibidor de crecimiento de protozoos y Rogers *et al.* 1994 sugieren que el conjunto bacteriano de un biofilm provee los nutrientes necesarios para el crecimiento extracelular de *Legionella*.

Discusión

Autores como Mouchtoury y Hadjichristodoulou 2007, describen que los grifos y difusores de los sistemas de agua se ven altamente colonizados por *Legionella* y Joseph *et al.* 1996, afirman que muchos casos de epidemias comunitarias de legionelosis se han producido por la exposición a los aerosoles de sistemas de agua de hoteles, donde el riesgo aumenta debido su uso intermitente y el consiguiente estancamiento, produciendo la formación de biofilms en las tuberías (Joseph *et al.* 1996, Benin *et al.* 2002, Fields *et al.* 2002).

Este trabajo se enfocó en un estudio ambiental para detectar *Legionella* en aguas sanitarias calientes, donde pueden encontrarse restos de biofilm que se forman en las tuberías de sistemas de distribución de agua, estos sistemas en su mayoría eran sistemas recirculantes con calentadores de agua o depósitos.

Los resultados obtenidos de las muestras de ASC para el aislamiento de *Legionella*, en el caso las muestras mezcla (n= 107) fue un 26% y su detección por PCR semianidada fue un 35%, en las muestras de Agua Proximal (n= 62) se obtuvo un 37% y un 58% respectivamente y en el Agua Distal (n= 62) se logró aislar un 21% por cultivo y se detectó un 48% por PCR semianidada.

Borella *et al.* 2004 y Leoni *et al.* 2001, realizaron un estudio de diferentes sistemas de distribución de agua en edificios, estudiando sistemas independientes con calentadores de gas y calentadores eléctricos, sistemas centralizados y sistemas con recirculación de agua. Encontraron que la colonización de *Legionella* en este tipo de sistemas era muy diferente entre sí, en los sistemas de distribución eléctricos no encontraron presencia de *Legionella*, en los sistemas de agua independientes con calentadores de gas encontraron una contaminación moderada entre un 10% a un 16% y en los sistema centralizados encontraron contaminación entre un 53% y un 67% debida a *Legionella pneumophila* serogrupo 2-14. Estos resultados positivos, fueron encontrados en muestras tomadas a diferentes distancias

del calentador y las concentraciones de *Legionella* fueron variables hasta en 1 log en diferentes puntos del sistema. Sin embargo estadísticamente no encontraron correlaciones significativas entre los diferentes niveles y distancias desde el calentador. Los altos recuentos de *Legionella* en sistemas centralizados pueden ser explicados por el estancamiento del agua acumulada en las tuberías, lo que favorece la formación de biofilms y la recirculación de agua que en este tipo de sistemas promueve una contaminación que puede extenderse por todo el edificio. El estancamiento del agua en estos sistemas, se produce por su uso intermitente y sobre todo por la alta complejidad de estos sistemas, en los que muchas veces se producen cierres de tuberías y la formación de puntos muertos.

Autores como Leoni *et al.* 2001, al analizar muestras de duchas de agua caliente, encontraron porcentajes positivos de recuento de *L. pneumophila* en un 63,6%. Devos *et al.* 2005, analizaron un total de 46 muestras de agua (duchas, agua de grifo) de 17 localidades de Bélgica, donde estudiaron la presencia de *Legionella* spp. y *L. pneumophila*. La técnica convencional de cultivo en placa puso de manifiesto que el 41% de estas muestras fueron positivas para *Legionella* spp., ésto se correspondía con el 53% de las 17 localidades. Las colonias que obtuvieron, confirmadas con una prueba de aglutinación de látex, reveló que las colonias positivas pertenecían a *L. pneumophila* en un 58%. Obtuvieron concentraciones de células de *L. pneumophila* entre $5,0 \times 10^1 \times 10^4$ ufc/L y $8,00 \times 10^4$ ufc/L.

Otros autores como Levi *et al.* 2003 estudiaron 32 muestras de agua potable, obtuvieron 20 muestras positivas por cultivo de las cuales el 70% fueron positivas por PCR, las muestras negativas por PCR (30%), contenían un número más bajo de células viables que el límite de detección de la PCR que utilizaron. En contraste 60% de las muestras positivas por PCR con un número menor al del límite de detección, indicaron la presencia de números significativos de células no viables de *Legionella*.

Morio *et al.* 2008 en un estudio de sistemas de agua de edificios en Francia, encontraron que solo un 3% de las muestras que estudiaron dieron resultados positivos por cultivo y negativos por PCR cuantitativa. Así Morio *et al.* 2008 y Maiwald *et al.* 1995 afirman que la sensibilidad, la simplicidad y la reproducibilidad de una PCR, hace de éste un método imprescindible para detectar y cuantificar *Legionella* en muestras ambientales, especialmente en el caso de epidemias donde es un método rápido para identificar el foco de contaminación y evaluar los puntos críticos en los sistemas de distribución de aguas. Además, se requiere menos tiempo para obtener resultados comparado con el necesario para el cultivo en placa, sin embargo los cultivos son necesarios para una comparación epidemiológica entre cepas clínicas o ambientales y para confirmar la cepa causante de la epidemia con un genotipado.

Al observar los diferentes resultados obtenidos por diversos autores, se debe considerar que la PCR no distingue entre organismos viables y no viables. En el caso de la técnica de cultivo los problemas se pueden presentar en el caso de que en la muestra existan células viables pero no cultivables de *Legionella*, o en el caso de los diferentes procesos para la identificación de la bacteria que describe la ISO 11731-1998, por ejemplo la recuperación de las células en el proceso de filtración no es del 100%.

En este estudio también se cuantificaron la presencia de otros microorganismos como los Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 37°C aislados de las muestras de agua sanitaria caliente. Las concentraciones medias de Heterótrofos a 22°C y a 37°C en los diferentes tipos de ASC, estuvieron entre 10^6 y 10^7 ufc/100ml. Se realizaron análisis estadísticos y se obtuvieron que las correlaciones entre Heterótrofos a 22°C y *Legionella* fueron del 30% en la Mezcla, 20% en el A. Proximal y 32% en el A. Distal y con Heterótrofos a 37°C fueron un 30%, 24% y 36% respectivamente. Cuando se realizó el análisis estadístico de medias, entre los valores obtenidos de los Heterótrofos a 22°C y a 37°C en relación a la presencia y ausencia de *Legionella* en las muestras de agua con distintos tipos de

muestreo, se encontró que existía una relación estadísticamente significativa con Heterótrofos a 22°C y a 37°C en el caso de las muestras mezcla, agua distal, y agua proximal aunque esta última tiene mayor relación entre la presencia de *Legionella* y heterótrofos a 37°C. Al contrario, autores como Leoni *et al.* 2004 al igual que Alary y Joly, 1991 no encontraron correlaciones significativas entre Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 36°C con *Legionella*.

Otros parámetros bióticos analizados fueron *Pseudomonas* y *Aeromonas*, la importancia de estos microorganismos es su papel ambiental, se consideran indicadores de recrecimiento microbiológico en aguas de distribución de algunos países (Araujo *et al.* 1989, Ribas *et al.* 1999). Otros autores aseguran que *Pseudomonas* y *Aeromonas* pertenece al grupo que junto con heterótrofos y *Flavobacterium* pueden servir de soporte para el crecimiento de *Legionella* en sistemas de distribución de agua (Wadowsky *et al.* 1988). *Pseudomonas* se puede encontrar en biofilms, suelos y diferentes hábitats acuáticos como lagos, ríos y sistemas de agua potable y no potable (Pazko-Kolva *et al.* 1991). En este trabajo se aisló *Pseudomonas* en las aguas sanitarias calientes (Mezcla, Agua Proximal y Agua Distal) en el 44%, 60% y 31% de las muestras respectivamente. Sin embargo, no conseguimos una relación estadísticamente significativa entre la presencia de *Legionella* y *Pseudomonas* en ninguno de los tipos de muestreo. Esto también fue observado por Leoni *et al.* 2004, que analizaron muestras de sistemas de aguas calientes de hoteles y no encontraron correlación significativa entre *Legionella* y *Pseudomonas*, además aseguran en su estudio que las temperaturas bajas favorecieron el crecimiento de *Pseudomonas*.

La correlación encontrada en este estudio entre *Pseudomonas* y la temperatura en el Agua Distal (sobre 37°C) fue negativa (-0,45), lo que confirmaría la capacidad de *Pseudomonas* de crecer a temperaturas más bajas.

Discusión

También se encontró una correlación positiva de los distintos tipos de muestreo entre *Pseudomonas* y Heterótrofos a 22°C entre 30% y 40% (coeficiente de Spearman con un 95% de confianza) y de *Pseudomonas* con Heterótrofos a 37°C entre un 31% y 34%. Leoni *et al.* 2004 obtuvieron al igual que en este trabajo, una correlación positiva y significativa entre Heterótrofos a 22°C y Heterótrofos a 36°C con *Pseudomonas* y aislaron *Pseudomonas* en el 57,1% de las muestras de sistemas de agua independientes y del 45,2% de sistemas centralizados. Otros autores como Zietz *et al.* 2006, también encontraron una correlación significativa del 95% entre *Pseudomonas* y Heterótrofos a 22°C y con Heterótrofos a 37°C del 99%.

Otro parámetro biótico que se estudio en el ASC, fue la presencia de protozoos y la relación con *Legionella*. En este estudio se encontraron protozoos en el 25% de las 107 de las muestras Mezcla, en el 43% del Agua Proximal y en el 24% del Agua Distal. Según el análisis estadístico de medias con intervalos al 95% de confianza se demostró que existía una relación entre los resultados obtenidos de *Legionella* y la presencia de protozoos en las aguas que correspondían a las muestras mezcla. En estas muestras los protozoos observados fueron amebas, flagelados y ciliados. Las amebas fueron observadas con mayor frecuencia en un 52% de las muestras positivas.

Rodríguez *et al.* 1994, afirman que las amebas son los mayores predadores de las bacterias en el ambiente, controlando así su población en el suelo, en sedimentos y partículas suspendidas en columnas de agua. Algunas publicaciones (Herrera *et al.* 2002, Newsome *et al.* 1998) consideran que *Legionella* es un colonizador intracelular y es considerada una bacteria resistente a amebas (ARB) debido a que resiste su efecto microbicida. Según estos autores, cuando *Legionella* se multiplica en protozoos desarrolla mecanismos para resistir su destrucción por los macrófagos lo que la hace aún más virulenta cuando infecta los alveolos pulmonares de pacientes susceptibles a la enfermedad. Hay quienes afirman que *Legionella* puede protegerse de condiciones adversas del medio dentro de

las amebas, particularmente de agentes usados para la desinfección de aguas.

Existen muy pocos estudios que han conseguido aislar *Legionella* dentro de hospederos en el ambiente, pero por ejemplo Harf *et al.* 1997, identificaron *L. pneumophila* en cultivos de amebas lisadas que originalmente provenían de aguas de ríos y Newsome *et al.* 1998, realizaron un estudio para describir el aislamiento y la identificación de *Legionella* que se encontraban dentro de amebas en muestras de suelo.

En este trabajo también se estudiaron factores fisicoquímicos entre los que están el Fe, el Cu, el Zn y el carbono orgánico total (COT). Según bibliografía *Legionella* necesita una fuente de carbono, L-Cisteína y hierro para su multiplicación (McDade 2002, Fields *et al.* 2002).

En este estudio encontramos valores máximos de hierro entre 0,03 ppm y 0,04 ppm en los distintos tipos de muestreo (Mezcla, A. Proximal, A. Distal), el cobre tuvo concentraciones de 0,35 ppm, 0,26 ppm y 0,15 ppm respectivamente, se encontraron concentraciones de zinc entre 0,18 ppm y 0,26 ppm y el carbono orgánico total tuvo concentraciones de 2,73 ppm, 2,25 ppm y 2,53 ppm. En un estudio realizado por Leoni *et al.* 2004 encontraron que el Cu tenía un papel inhibitorio en el crecimiento de *Legionella* mientras que el COT tendía a favorecer el crecimiento de la bacteria, en el caso de zinc, hierro y manganeso no encontraron correlación significativa con *Legionella*.

Parrilla Valero *et al.* 2007 y Türetgen *et al.* 2007, afirman que metales como el Fe y el Zn pueden corroer el material del que están hechos muchos sistemas hídricos y pueden formar una capa fina de óxido, sin embargo en pruebas *in vitro* que realizaron Türetgen *et al.* 2007, no encontraron diferencias entre los resultados obtenidos del crecimiento de *Legionella* en superficies de cobre, en superficies con microbiota acompañante y en superficies limpias. Esto autores relacionan la eficacia del efecto inhibitorio

Discusión

del Cu con los valores de pH, esto es reafirmado por Leoni *et al.* 2004, Rogers *et al.* 1994, Stout *et al.* 1998, Kusnetsov *et al.* 2003, que aseguran que el pH tiene un papel directamente proporcional al crecimiento de *Legionella*, debido a que actúa en la solubilización del Cu.

Según los análisis estadísticos realizados en este estudio, al comparar los resultados de las medias de los metales pesados en relación a la presencia y ausencia de *Legionella*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la presencia y ausencia de *Legionella* y los valores de Cu, en las muestras Mezcla, es decir que a concentraciones elevadas de Cu la presencia de *Legionella* fue menor en este tipo de agua.

También se estudiaron otros parámetros como la temperatura, el pH y la turbidez. Autores como Rogers *et al.* 1994 y Mauchline *et al.* 1992 reportan que la temperatura óptima de crecimiento de *Legionella* es 35°C y también podría crecer entre 20-45°C y aseguran que puede sobrevivir a temperaturas más extremas, Wadowsky *et al.* 1985 explican que este rango de temperaturas, en el que es posible encontrar la bacteria, depende de la cepa de *Legionella* y del número y diversidad de microorganismos acompañantes presentes en los diferentes sistemas de aguas. Leoni *et al.* 2004 afirman que la temperatura es uno de los factores asociados a la presencia de *Legionella* en sistemas de agua y que se han encontrado células viables a temperaturas altas llegando hasta los 60°C, pero no encontraron correlaciones significativas entre *Legionella* y temperatura. En este estudio obtuvimos células viables de *Legionella* en muestras de ASC en temperaturas de 16°C como mínimo y 65°C como máximo, no encontramos correlaciones significativas, pero observamos una tendencia a la presencia de *Legionella* a temperaturas más bajas.

En el caso de uno de los biocidas (cloro), encontrado en las muestras de ASC, se obtuvieron concentraciones entre 0,5 y 2 ppm como máximo, la turbidez tuvo valores máximos de 2,08 y 5,00 NTU y el pH no superó valores de 8,76. Los análisis estadísticos realizados mostraron correlación

negativa entre *Legionella* y turbidez (-0,21) en el caso de la muestra mezcla.

Parrilla Valero *et al.* 2007, Ordoñez *et al.* 2006, encontraron una asociación estadísticamente significativa entre los valores de turbidez y cloro con la presencia de *Legionella*. Leoni *et al.* 2004, también encontraron una correlación inversa entre *Legionella* con el pH y el COT. Estos autores afirman que variables como la temperatura, conductividad, turbidez y cloro se comportan como factores de riesgo de crecimiento de *Legionella*.

El hecho de no encontrar relaciones altamente significativas entre los factores abióticos y *Legionella* nos indica que el crecimiento de esta bacteria no depende exclusivamente de los compuestos solubilizados en el agua sanitaria, sino que posiblemente *Legionella* obtiene los nutrientes de otros microorganismos o de la asociación de éstos en biofilms que le otorgan el medio óptimo para su crecimiento.

En este trabajo también se realizó el estudio de torres de refrigeración y la relación de parámetros microbiológicos y fisicoquímicos con el crecimiento de *Legionella* en este tipo de instalaciones. Se han realizado muchos estudios sobre la colonización de *Legionella* en este tipo de sistemas, debido a que producen gran cantidad de aerosoles y son consideradas como las instalaciones que provocan mayores brotes comunitarios de legionelosis (Barrufet-Barquet *et al.* 2006).

En este trabajo se analizaron 54 muestras pero solo obtuvimos dos resultados positivos para *Legionella*. Las razones para dichos resultados en comparación a los datos encontrados de ASC, son que analizamos muchas más muestras de agua sanitaria caliente que de agua de torres y que el ASC procedía de edificios muy diversos y en un estado de mantenimiento en muchas ocasiones deficiente, mientras que las torres de refrigeración pertenecían a un solo edificio con un mantenimiento óptimo de las instalaciones.

Autores como Miyamoto *et al.* 1997, obtuvieron un 78% de resultados positivos por cultivo en 49 muestras de torres de refrigeración y 92% por PCR semianidada. Otros autores también han encontrado resultados positivos de *Legionella* en torres de refrigeración, por ejemplo Romeu *et al.* 2003, en un estudio de un total de 1512 muestras, 27 resultaron positivas para *Legionella* por cultivo. Mientras que otros como Yaradou *et al.* 2007, compararon los resultados obtenidos por cultivo y por PCR, analizaron 46 muestras de las cuales 28 (60,9%) fueron positivas por PCR y 20 (43,5%) por cultivo. Joly *et al.* 2006, detectaron *Legionella* en un 94% por PCR y en un 87% por cultivo.

En las muestras de este trabajo también se estudiaron Heterótrofos a 22°C y a 37°C, se encontró una media geométrica de $1,46 \times 10^6$ ufc/100ml y $1,43 \times 10^6$ ufc/100ml respectivamente. Valero *et al.* 2007, encontraron que en torres de refrigeración los números elevados de heterótrofos ($>10^6$ ufc/100ml), favorecían las condiciones de vida para *Legionella*. En este trabajo se encontraron correlaciones significativas entre Heterótrofos a 22°C y a 37°C con las muestras positivas de *Legionella* y de *Pseudomonas* y se encontró una correlación negativa con el cloro de -0,47 y -0,49, respectivamente. Al contrario de autores como Devos *et al.* 2005, que no encontraron relación entre el número de heterótrofos con la presencia o ausencia de *Legionella* en muestras de torres de refrigeración. En contraste Kusnetsov *et al.* 1993, obtuvieron valores más bajos de heterótrofos cuando existía presencia de *Legionella* en las torres.

Se analizó la presencia de *Pseudomonas* en este tipo de instalaciones y obtuvimos un 22% de resultados positivos, los cuales tuvieron una correlación estadísticamente significativa con Heterótrofos a 22°C y a 37°C.

Se encontraron protozoos en el 39% de las muestras por observación directa del cultivo y un 31% correspondía a la detección por PCR. Romeu *et al.* 2003, estudiaron 1512 muestras de las que obtuvieron 341 positivos para

la presencia de protozoos y 27 muestras positivas de *Legionella*. La coincidencia de ambos microorganismos en una misma torre fue inferior al 50%, ya que de los 27 aislamientos de *Legionella* solo 12 lo fueron también para protozoos (44%).

Parrilla Valero *et al.* 2007 y Türetgen *et al.* 2007 estudiaron parámetros fisicoquímicos en torres de refrigeración y aseguran que el calor, la evaporación del agua a temperaturas relativamente altas y el pH evitan la adhesión microbiana.

Los parámetros fisicoquímicos analizados en este estudio dieron valores medios de 24°C en el caso de la temperatura, la turbidez tuvo una media de 1,47NTU y el pH de 7,94. Se encontraron correlaciones entre la temperatura, el pH y la turbidez.

Wadowsky *et al.* 1985, afirman que la temperatura óptima para el crecimiento de *Legionella* está entre 20°C y 50°C, el pH óptimo entre 5,5 a 9,2 y que en el ambiente se han aislado *Legionella* en pH desde 5,4 a 8,1. Otros autores como Parrilla Valero *et al.* 2007, encontraron que en torres de refrigeración las condiciones que hacen favorables la multiplicación de *Legionella*, están en el caso del pH entre 8,2 y 8,5 y la turbidez entre 11,3 NTU y 20 NTU.

En este trabajo obtuvimos valores de hierro de 0,03 ppm, de cobre 0,12 ppm, de zinc 0,16 ppm y carbono orgánico total de 9,63 ppm, en las torres de refrigeración.

Parrilla Valero *et al.* 2007, encontraron casos positivos de *Legionella* en torres que se caracterizaban por tener niveles elevados de conductividad, aerobios totales, dureza cálcica, sólidos totales en disolución, temperatura y turbidez, además de concentraciones deficientes de cloro (<2ppm), que incumplían el programa de revisión y limpieza de los elementos internos de las torres, y no realizaban las desinfecciones periódicas y la limpieza de

depósitos.

En este estudio el conjunto de las de torres de refrigeración se mantuvieron controladas y sometidas a tratamientos de mantenimiento especificados por la normativa española BOE. Los niveles de concentración de cloro, se mantuvieron elevados como parte del programa de vigilancia y control para una desinfección periódica y efectiva.

Romeu *et al.* 2003, también mantuvieron las torres de refrigeración de su estudio sometidas a tratamientos preventivos y por tanto afirman que la reincidencia de *Legionella* que encontraron en las torres se debió a una revitalización y multiplicación de las existentes en nichos ecológicos protegidos, debido a condiciones ambientales favorables o a una nueva contaminación externa.

CONCLUSIONES

1. Se determinó la presencia de *Legionella* y se cuantificaron parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en 285 muestras procedentes de dos sistemas de riesgo de transmisión de legionelosis: sistemas de agua sanitaria caliente con acumulador y con circuito de retorno, y torres de refrigeración. Las características fisicoquímicas y microbiológicas mostraron dos ecosistemas distintos.

2. Se determinó la presencia de *Legionella* mediante PCR en el 46% de las muestras y por cultivo en el 23%. La detección aplicando la PCR fue más rápida y más sensible especialmente en las muestras con características más extremas. Sin embargo, con el cultivo se obtuvieron células viables y cultivables, que se cuantificaron e identificaron en el 99,6% de las muestras como *L. pneumophila*, de éstas un 56% correspondieron a *L. pneumophila* serogrupo 1.

3. En el ASC se aisló *Legionella* en el 27% de las muestras. Su presencia se relacionó estadísticamente con los parámetros microbiológicos obtenidos en los tres tipos de muestras estudiadas: Mezcla, Agua Distal y Agua Proximal. La concentración de *Legionella* se correlacionó significativamente con la de Heterótrofos aislados tanto a 22°C como a 37°C y solo se aisló la bacteria cuando la concentración de éstos fue superior a 3 log por 100 ml. La presencia de *Pseudomonas* no mostró relación estadística con *Legionella*. En el caso de los protozoos su presencia fue mayor cuando los valores de *Legionella* fueron elevados.

4. El cloro y la temperatura actúan como biocidas en el ASC. Sin embargo, en el 44% de las muestras no se detectó cloro y en el 71% la temperatura estuvo por debajo de los 60°C, lo que favoreció la colonización de los sistemas.

Conclusiones

5. Los valores fisicoquímicos encontrados en el ASC como pH, turbidez, COT, Fe y Zn no fueron determinantes para aislar *Legionella*. A excepción de la temperatura, fueron muy semejantes en los tres tipos de muestra. Sin embargo, concentraciones elevadas de Cu tendieron a reducir su presencia.

6. En las torres de refrigeración analizadas, el recuento de los microorganismos encontrados fue menor al de las ASC, debido a que la concentración de cloro se mantuvo elevada en estas instalaciones. Sin embargo, la concentración de protozoos fue mayor que en las ASC. El bajo número de muestras positivas de *Legionella* (2/54), impidió hacer un análisis estadístico comparativo con el resto de parámetros analizados.

7. Se desarrollaron modelos predictivos en relación a la presencia y ausencia de células cultivables de *Legionella*, con un análisis de las funciones discriminantes en las que intervinieron: **PCR de *Legionella*, Heterótrofos a 37°C, Fe, Zn y Cu**. En las muestras Mezcla se pudo predecir la presencia de *Legionella* con un porcentaje de aciertos de un 83%, en el Agua Proximal en un 78% de los casos y en el Agua Distal añadiendo a la función la temperatura, se encontró un porcentaje más alto de un 86%.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

1. Se realizó una estandarización de métodos, para el análisis y cuantificación de *Legionella*, como son la eficiencia de recuperación del método de filtración, control de calidad por medio de cartas control del medio de cultivo, la determinación del límite de detección de la PCR semianidada para *L. pneumophila* sg 1 ATCC33152, *L. pneumophila* sg 2-14 y *L. longbeachea*. Se realizó la comparación de métodos para la eliminación de inhibidores de PCR y el diseño de un control de inhibición de PCR.

2. Se analizaron muestras de un edificio público con contaminación por *Legionella*, identificando los puntos de muestreo representativos y aplicando el método de cultivo y la técnica de PCR semianidada, que demostró en menos de 24 horas que todo el sistema hídrico estaba contaminado, aunque no de forma homogénea. El análisis del sistema de agua un año más tarde, reveló la presencia de ADN de *Legionella* y la ausencia de células viables cultivables. El alineamiento de las bacterias aisladas indicó que el circuito estaba contaminado por la misma cepa.

3. Se realizaron muestreos de agua sanitaria caliente y torres de refrigeración para determinar la presencia de *Legionella* y su relación con heterótrofos a 22°C, heterótrofos a 37°C, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y protozoos. El ASC procedía de hoteles de la costa mediterránea y de residencias geriátricas, las cuales tenían un alto grado de complejidad en el diseño y funcionamiento del sistema de agua, por lo que se cambió el tipo de muestreo a Mezcla, Agua proximal y Agua distal.

4. Se determinó la presencia de *Legionella* aplicando la técnica de cultivo y la PCR semianidada. Por cultivo se obtuvo *Legionella* en un 26% de las muestras mezcla, un 37% en el A. proximal y 21% en el A. distal. Por PCR se detectó ADN de *Legionella* en un 35%, 58% y 48% respectivamente.

Conclusiones Generales

5. El análisis estadístico de las muestras Mezcla, A. distal y A. proximal revelaron diferencias significativas entre heterótrofos a 22°C y heterótrofos a 37°C y de éstos con *Pseudomonas* y *Legionella*.

Las medias con intervalos al 95% de confianza de los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos en relación a la presencia y ausencia de *Legionella*, mostraron que la presencia de *Legionella* se veía favorecida en estos 3 tipos de agua, a una mayor concentración de heterótrofos a 22°C y de heterótrofos a 37°C y se encontró mayor presencia de protozoos en el agua cuando los valores de *Legionella* son elevados. La ausencia de *Legionella* por cultivo y por PCR se asoció a concentraciones elevadas de Cu. Finalmente se observó una tendencia a la asociación entre la presencia de células viables de *Legionella* y temperaturas más bajas.

6. Las torres presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los heterótrofos a 22°C y a 37°C con *Pseudomonas* y *Legionella*. El test de medias dio como resultado que todos los parámetros fisicoquímicos presentaban diferencias significativas entre sí, mientras que en el caso de los metales no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre sus valores.

7. El análisis estadístico en el que se utilizó una función donde intervinieron simultáneamente la **PCR de *Legionella*, heterótrofos a 37°C, Fe, Zn y Cu**, en relación a la presencia y ausencia de *Legionella*, se obtuvo en la Mezcla una predicción de un 83% de aciertos para la presencia de *Legionella*, en el A. proximal un 78% y en el A. distal un 86%.

8. Se detectaron e identificaron protozoos de vida libre en las muestras de ASC y torres de refrigeración. Se encontró mayor abundancia en las muestras del Agua proximal, donde la temperatura era más baja y existía una alta carga microbiana acompañante.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA**A**

Abu Kwaik Y, Gao LY, Stone BJ, Venkataraman C, Harb OS. Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, **1998**; 64(9):3127-33.

Alary M, Joly JR. Risk factors for contamination of domestic hot water systems by legionellae. *Applied and Environmental Microbiology*, **1991**; 57(8): 2360-7.

Álvarez J. Epidemiología descriptiva de la legionelosis en Cataluña. Departamento de Salud, Generalitat de Catalunya. Conferencia II Congreso Egarenc. *Legionella* y la Calidad del aire: el reto de hoy. **2007**.

Anónimo. An international investigation of an outbreak of legionnaires' disease among UK and french tourists. *European Journal of Epidemiology*, **1996**; 12: 215-219.

Araujo R, Arribas R, Lucena F. Distribution of mesophilic Aeromonads in temperate aquatic habitats-relationships with faecal indicators. *Water Science and Technology*, **1989**; 21: 247-250.

Araujo R, Arribas R, Lucena F. Relation between *Aeromonas* and faecal coliforms in fresh waters. *Journal of Applied Bacteriology*, **1989**; 67, 213-217.

Araujo R, Pares R, Lucena F. The effect of terrestrial effluents on the incidence of *Aeromonas spp.* in coastal waters. *Journal of Applied Bacteriology*, **1990**; 69, 439-444.

B

Ballard AL, Fry NK, Chan L, Surman SB, Lee JV, Harrison TG, Towner KJ. Detection of *Legionella pneumophila* using a real-time PCR hybridization assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **2000**; 38(11): 4215–4218.

Banning N, Toze S, Mee BJ. Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system. *Microbiology*, **2003**; 149(Pt 1): 47–55.

Barbaree JM, Fields BS, Feeley JC, Gorman GW, Martin WT. Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1986**; 51(2): 422–4.

Barker J, Brown MR, Collier PJ, Farrell I, Gilbert P. Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Applied and Environmental Microbiology*, **1992** Aug; 58(8): 2420–5. Erratum in: *Applied and Environmental Microbiology*, **1992**; 58(12): 4089.

Benin AL, Benson RF, Arnold KE, Fiore AE, Cook PG, Williams LK, Fields B, Besser RE. An outbreak of travel-associated Legionnaires disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. *Journal of Infectious Diseases*, **2002**; 185(2): 237–43.

Berger KH, Isberg RR. Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology*, **1993**; 7(1):7-19.

Blatt SP, Parkinson MD, Pace E, Hoffman P, Dolan D, Lauderdale P, Zajac RA, Melcher GP. Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition. *American Journal of Medicine*, **1993**; 95(1): 16-22.

Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Annals of International Medicine*, **1979**; 90:656-658.

Borella P, Bargellini A, Pergolizzi S, Aggazzotti G, Curti C, Nizzero P, Stancanelli G, Vaiani R, Gesù G, Mazzuconi R. Prevention and control of *Legionella* infection in the hospital environment. *Annali di Igiene*. **2000**; 12(4):287-96.

Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V, Stampi S, Stancanelli G, Triassi M, Neglia R, Marchesi I, Fantuzzi G, Tatò D, Napoli C, Quaranta G, Laurenti P, Leoni E, De Luca G, Ossi C, Moro M, Ribera D'Alcalà G. *Legionella* infection risk from domestic hot water. *Emerging Infectious Diseases*, **2004**; 10(3):457-64.

Borella P, Montagna MT, Stampi S, Stancanelli G, Romano-Spica V, Triassi M, Marchesi I, Bargellini A, Tatò D, Napoli C, Zanetti F, Leoni E, Moro M, Scaltriti S, Ribera D'Alcalà G, Santarpia R, Boccia S. *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. *Applied and Environmental Microbiology*, **2005**; 71(10): 5805-13.

Boulanger CA, Edelstein PH. Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation. *Applied and Environmental Microbiology*, **1995**; 61(5):1805-9.

Bozue JA, Johnson W. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infection and Immunity*, **1996**; 64(2):668-73.

Brindle RJ, Stannett PJ, Cunliffe RN. *Legionella pneumophila*: comparison of isolation from water specimens by centrifugation and filtration. *Epidemiology and Infection*, **1987**; 99: 241–247.

C

Cameron S, Walker C, Roder D, Feldheim J. Epidemiological characteristics of *Legionella* infection in South Australia: Implications for disease control. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, **1991**; 21: 65-70.

Canals O. Metodologies per l'estudi dels protozous de vida lliure en sistemes hídrics artificials. Màster en Biologia Experimental. Universitat de Barcelona. **2008**.

Catalan V, Garcia F, Moreno C, Vila MJ, Apraiz D. Detection of *Legionella pneumophila* in wastewater by nested polymerase chain reaction. *Research in microbiology*, **1997**; 148: 71-78.

Chang C-W, Hwang Y-H, Cheng W-Y, Chang C-P. Effects of chlorination and heat disinfection on long-term starved *Legionella pneumophila* in warm water. *Journal of Applied Microbiology*, **2007**; 102(6): 1636-44.

Chen J, Suwwam de Felipe K, Clarke M, Lu H, Anderson OR, Segal G, Shuman HA. *Legionella* effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science*. **2004**; 303: 1358-1360.

Chen YS, Liu YC, Lee SS, Tsai HC, Wann SR, Kao CH, Chang CL, Huang WK, Huang TS, Chao HL, Li CH, Ke CM, Lin YS. Abbreviated duration of superheat-and-flush and disinfection of taps for *Legionella* disinfection: lessons learned from failure. *American Journal of Infections Control*. **2005**; 33(10):606-10.

Cherry WB, McKinney RM. *Legionella*, mycobacteria, and Freund's adjuvant. *New England Journal of Medicine*. **1979**; 301(22): 1242.

Chien M, Morozova I, Shi S, Sheng H, Chen J, Gomez SM, Asamani G, Hill K, Nuara J, Feder M, Rineer J, Greenberg JJ, Steshenko V, Park SH, Zhao B, Teplitskaya E, Edwards JR, Pampou S, Georghiou A, Chou IC, Iannuccilli W, Ulz ME, Kim DH, Geringer-Sameth A, Goldsberry C, Morozov P, Fischer SG, Segal G, Qu X, Rzhetsky A, Zhang P, Cayanis E, De Jong PJ, Ju J, Kalachikov S, Shuman HA, Russo JJ. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **2004**; 305(5692): 1966-8.

Circulaire n° DGS/VS4/98/771 du 31 desembre **1998**. Ministère de l'emploi et de la solidarite. France. Prevention de la contamination par *Legionella* dans les établissements de santé.
<http://www.sante.gouv.fr/index.htm>

Cirillo JD, Cirillo SL, Yan L, Bermudez LE, Falkow S, Tompkins LS. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection Immunology*, **1999**; 67(9):4427-34.

Costerton J, Stewart P, Greenberg E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **1999**; 284(5418): 1318-22.

D

Decret 417/2000 de 27 de desembre pel qual s'estableixen amb caràcter d'urgència les condicions tecnicosanitàries aplicables als aparells i equips de transferència de massa d'aigua en corrent d'aire amb producció d'aerosols per a la prevenció de la legionel·losi. Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya 12.01.2001 (nº 3304).

Dellundé J, Esgleas, Altimir. Prevalència de Legionel·la en els hotels de la costa catalana. Congrés egarense, **2003**, pp 1-9.

Departament de Sanitat i Seguretat Social. Protocol d'investigació i control de la legionel·losi. Barcelona: Generalitat de Catalunya, **1999**.

Devos L, Clymans K, Boon N, Verstraete W. Evaluation of nested PCR assays for the detection of *Legionella pneumophila* in a wide range of aquatic samples. *Journal of Applied Microbiology*, **2005**; 99(4): 916-25.

Dominguez JA, Galí N, Pedroso P, Fargas A, Padilla E, Manterola JM, Matas L. Comparison of the Binax *Legionella* Urin Antigen EIA for Detection of *Legionella* Antigen in both Concentrated and Nonconcentrated Urine Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36(9):2718-2722.

Donlan RM, Forster T, Murga R, Brown E, Lucas C, Carpenter J, Fields B. *Legionella pneumophila* associated with the protozoan *Hartmannella vermiformis* in a model multi-species biofilm has reduced susceptibility to disinfectants. *Biofouling*, **2005**; 21(1): 1-7.

Draft guideline for environmental infection control in healthcare facilities
2001. Centres for disease control and prevention. Healthcare infection
control practices advisory committee (HICPAC).
<http://www.heaton.org/CDCDraft.pdf>

Drozanski W. Fatal bacterial infection in soil amoebae. *Acta Microbiol.*
Pol. **1956**; 5 (3-4):315-7.

E

**Edelstein PH, McKinney RM, Meyer RD, Edelstein MA, Krause
CJ, Finegold SM.** Immunologic diagnosis of Legionnaires' disease: cross-
reactions with anaerobic and microaerophilic organisms and infections
caused by them. *Journal of Infectious Diseases*, **1980**; 141(5): 652-5.

Edelstein PH, Cianciotto N. Legionella Species and Legionnaires
Disease. *Prokariotes*, **2006**; 6: 988-1033.

F

**Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK,
Mackel DC,** et al. Charcoal yeast extract agar: primary isolation medium
for *Legionella pneumophila* . *Journal of Clinical Microbiology*, **1979**;
10:437-441.

Fields B.S. The molecular ecology of legionellae. *Trends in Microbiology*,
1996; 4(7): 286-290.

Fields B S, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaire's Disease: 25 Years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews.* **2002**; 15(3): 506-526.

Fiume L, Bucca MA, Poda G. Detection of *Legionella pneumophila* in water samples by species-specific real-time and nested PCR assays. *Letters of Applied Microbiology,* **2005**; 41(6):470-5.

Fleurette J. La enfermedad del legionario. *Mundo científico,* **1979**; (24) 3: 384-394.

Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope DH. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology,* **1981**; 41(1): 9-16.

G

Greave PW. New methods for the isolation of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Pathology,* **1980**; 33(6): 581-4.

Gregg MB, Berman B, Mallison W, Rhodes WW, Kassinoff I. An epidemic of unknown etiology in a health department. I. Clinical and epidemiologic aspects. *American Journal of Epidemiology,* **1978**; 107: 149-160

Grimont PA, Grimont F, Desplaces N, Tchen P. DNA probe specific for *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology,* **1985**; 21(3): 431-7.

Guia pel control i prevenció de la legionel·losi a Catalunya. Direcció General de Salut Pública, **2001**.

H

Harb OS, Gao LY, Kwaik YA. From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environmental Microbiology*, **2000**; 2(3): 251-265.

Harf C, Goffinet S, Meunier O, Monteil H, Colin DA. Flow cytometric determination of endocytosis of viable labelled *Legionella pneumophila* by *Acanthamoeba palestinensis*. *Cytometry*, **1997**; 27(3): 269-74.

Herrera M, Cruz A. Uribe A. Identificación y aislamiento de posible *Legionella spp*, como bacterias endosimbiontes de amebas de vida libre. Universidad autónoma de Mexico. **1998**.

Hoge CW, Breiman RF. Advances in the epidemiology and control of *Legionella* infections. *Epidemiology Reviews*, **1991**; 13: 329-40.

Hookey JW, Birtles RJ, Saunders NA. Intergenic 16S rRNA gene (rDNA) - 23S rDNA sequence length polymorphisms in members of the family *Legionellaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, **1995**; 33(9): 2377-81.

Horwitz MA. Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell*, **1984**; 36(1): 27-33.

Huguet JM, Ribas F. SGAP-10C agar for the isolation and quantification of *Aeromonas* from water. *Journal of Applied Bacteriology*, **1991**; 70(1): 81-88.

Hutchinson EJ, Joseph C, Bartlett CL. EWGLI: a European surveillance scheme for travel associated legionnaires disease. *European Surveillance*, **1996**; 1(5): 37-39.

I

Informe del brote de neumonía por *Legionella* de Alcalá de Henares, Madrid, Abril de 1997. *Boletín Epidemiológico Semanal* **1997**; 5(14): 133-44.

J

Jonas D, Rosenbaum A, Weyrich S and Bhakdi S. Enzyme-linked Immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of legionellae in bronchoalveolar fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, **1995**; 33:1247-1252.

Joseph C, Morgan D, Birtles R, Pelaz C, Martín-Bourgón C, Black M, Garcia-Sanchez I, Griffin M, Bornstein N, Bartlett C. An international investigation of an outbreak of Legionnaires disease among UK and French tourists. *European Journal of Epidemiology*, **1996**; 12(3): 215-9.

Joseph CA, Yadav R, Ricketts KD. European Working Group for Legionella Infections. Travel-associated Legionnaires disease in Europe in 2007. *European Surveillance*, **2009**; 14(18): 19196.

K

Kohler RB, Winn WC, Wheat LJ. Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires disease. *Journal of Clinical Microbiology*, **1984**; 20(4): 605-7.

Krieg, Noel R. and Holt, John G. (Eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 9th Edition. Bergey's Manual Trust, **2004**.

Kuchta JM, States SJ, McNamara AM, Wadowsky RM, Yee RB. Susceptibility of *Legionella pneumophila* to chlorine in tap water. *Applied and Environmental Microbiology*, **1983**; 46(5): 1134-9.

Kuchta JM, Navratil JS, Shepherd ME, Wadowsky RM, Dowling JN, States SJ, Yee RB. Impact of Chlorine and Heat on the Survival of *Hartmannella vermiformis* and Subsequent Growth of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1993**; 59(12): 4096-4100.

Kuiper MW, Wullings BA, Akkermans ADL, Beumer R and Van der Kooij D. Intracellular Proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic Biofilms Grown on Plasticized Polyvinyl Chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, **2004**; 70(11): 6826-6833.

Kusnetsov J, Torvinen E, Perola O, Nousianen T, Katila ML. Colonization of hospital water systems by legionellae, mycobacteria and other heterotrophic bacteria potentially hazardous to risk group patients. *APMIS*, **2003**; 111(5):546-56.

L

Legionella guidelines. Statens Serum Institut. The National Centre of Hospital Hygiene. Copenhagen. Denmark, **1998**.

Leoni E, De luca G, Legnani PP, Sacchetti R, Stampi S, Zanetti F. Legionella waterline colonization: detection of Legionella species in domestic, hotel and hospital hot water systems. Journal of Applied Microbiology, **2004**; 98(2): 373-9.

Levi K, Smedley J, Towner KJ. Evaluation of a real-time PCR hybridization assay for rapid detection of *Legionella pneumophila* in hospital and environmental water samples. Clinical Microbiological Infections, **2003**; 9(7): 754-8.

Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR 3rd, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG. A newly revised classification of the protozoa. Journal of Protozoology, **1980**; 27(1): 37-58.

M

Madigan M, Martinko J, Parker J. Biología de los microorganismos. **2003**; Décima edición, 468-624.

Maiwald M, Schill M, Stockinger C, Helbig JH, Lück PC, Witzleb W, Sonntag HG. Detection of Legionella DNA in human and guinea pig urine samples by the polymerase chain reaction. European Journal of Clinical Microbiological Infectious Diseases, **1995**; 14(1): 25-33.

Mampel J, Spirig T, Webwer A, Janus A, Haagensen J, Molin S, Hilbi H. Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **2006**; 72 (4): 2885-2895.

Mauchline WS, Araujo R, Wait R, Barry A, Dennis P, Keevil C. Physiology and morphology of *Legionella pneumophila* in continuous culture at low oxygen concentration. *Journal of General Microbiology*, **1992**; 138: 2371-2380.

Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*, **2003**; 16(2): 273-307.

Marra A, Blander SJ, Horwitz MA, Shuman HA. Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **1992**; 89(20): 9607-11.

Marrie T, Green P, Burbridge S, Bezanson G, Neale S, Hoffman PS, Haldane D. Legionellaceae in the potable water of Nova Scotia hospitals and Halifax residences. *Epidemiology Infections*, **1994**; 112(1): 143-50.

McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR. Legionnaire's disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *New England Journal of Medicine*, **1977**; 297: 1197-1203.

McDade JE. Legionnaires' disease 25 years later: lessons learned. En *Legionella*, Marre R, Kwaik YA, Bartlett C, Cianciotto N, Fields BS, Frosh M, Hacker J, Lück PC eds. ASM Press Washington DC **2002**: 1-10.

Bibliografía

Méndez J. Validación de un método de concentración aplicado a aguas de bebida, de colifagos somáticos, bacteriófagos F-específicos ARN, bacteriófagos de *Bacteroides fragilis* HSP40 y de bacteroides fragilis RYC2056. Según la normativa ISO/WD 10705-3:1996. Máster experimental, **1999**.

Méndez J. Utilidad de los bacteriofagos de bacterias entéricas como microorganismos modelo en aguas de bebida. Tesis doctoral, **2002**; 239-244.

Miyamoto H, Yamamoto H, Arima K, Fujii J, Maruta K, Izu K, Shiomori T, Yoshida S. Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of legionellae in hospital cooling tower water. *Applied and Environmental Microbiology*, **1997**; 63(7): 2489-94.

Molofsky AB, Swanson MS. Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Molecular Microbiology*. **2004**; 53(1): 29-40.

Moore MR, Pryor M, Fields B, Lucas C, Phelan M, Besser RE. Introduction of monochloramine into a municipal water system: impact on colonization of buildings by *Legionella* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, **2006**; 72(1): 378-83.

Morio F, Corvec S, Caroff N, Le Gallou F, Drugeon H, Reynaud A. Real-time PCR assay for the detection and quantification of *Legionella pneumophila* in environmental water samples: utility for daily practice. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **2008**; 211(3-4): 403-11.

Mouchtouri V, Velonakis E, Hadjichristodoulou C. Thermal disinfection of hotels, hospitals, and athletic venues hot water distribution systems contaminated by *Legionella* species. *American Journal of Infection Control*. **2007**; 35(9):v623-7.

Mouchtouri V, Velonakis E, Tsakalof A, Kapoula C, Goutziana G, Vatopoulos A, Kremastinou J, Hadjichristodoulou C. Risk factors for contamination of hotel water distribution systems by *Legionella* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **2007**; 73(5): 1489-92.

Murga R, Forster TS, Brown E, Pruckler JM, Fields BS, Donlan RM. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology*, **2001**. 147: 3121-3126.

N

Newsome A, Scout T, Benson R, Fields B. Isolation of an amoeba naturally harboring a distinctive *Legionella* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **1998**; 64(5): 1688-1693.

Nintasen R, Utrarachkij F, Siripanichgon K, Bhumiratana A, Susuki Y, Suthienkul O. Enhancement of *Legionella pneumophila* culture isolation from microenvironments by macrophage infectivity potentiator (mip) gene-specific nested polymerase chain reaction. *Microbiology and Immunology*, **2007**; 51(8):777-85.

O

Orden 1187/1998 de 11 de Junio, de la Consejería de Sanidad y Servicios Sociales de la Comunidad de Madrid, por la que se regulan los criterios higiénicos- sanitarios que deben reunir los aparatos de transferencia de masa de agua en corriente de aire y aparatos de humectación para la prevención de la Legionelosis. Boletín Oficial Comunidad Autónoma de Madrid 19/6/1998 (nº: 144)

Ordóñez-Iriarte JM, Ferrer-Simó JB, Pelaz-Antolín C, García-Comas L. Comisión del Programa de Prevención y Control de Legionelosis. Prevalence of *Legionella* in cooling towers in the Community of Madrid. *Medicina Clínica*, **2006**; 126(5): 189-95.

P

Parrilla Valero F, Chacón Villanueva S, Pérez A. Estudio de las torres de refrigeración asociadas a brotes comunitarios de legionelosis. *Gaceta Sanitaria*, **2007**; 21(4): 357-360.

Paszko-Kolva C, Yamamoto H, Shahamat M, Sawyer TK, Morris G, Colwell R. Isolation of Amoebae and *Pseudomonas* and *Legionella* spp. from Eyewash Stations. *Applied and Environmental Microbiology*, **1991**; 57: 163-167.

Payment P, Bërübë A, Perreault D, Armon R, Trudel M. Concentration of *Giardia lamblia* cysts, *Legionella pneumophila*, *Clostridium perfringens*, human enteric viruses, and coliphages from large volumes of drinking water, using a single filtration. *Canadian Journal of Microbiology*, **1989**; 35: 932–935.

Pelaz C, Baladron B. La legionelosis es hoy una enfermedad conocida. *Acta Científica y Tecnológica*, **2003**; 6: 35-40.

Perez-luz S, Fernandez J, Rodriguez-valera F, Pascual L , Moreno C , Amo A, Apraiz D, Catalan V. Sequence diversity of the internal transcribed spacer (ITS) region of the rRNA operons among different serogroups of legionella pneumophila isolates. *Systematic and Applied Microbiology*, **2002**; 25(2): 212-219.

R

REAL DECRETO 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénicosanitarios para la prevención y control de la legionelosis. *Boletín Oficial del Estado* núm. 171 18 julio **2003**.

Recomendaciones para la prevención y control de la Legionelosis. Ministerio de Sanidad y Consumo. **1999**.

Reinthal FF, Sattler J, Schaffler-Dullnig K, Weinmayr B, Marth E. Comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella pneumophila* from tap water in hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*, **1993**; 31(5): 1213-6.

Ribas F, Araujo R, Frias J, Huguet JM, Ribas FR, Lucena F. Comparison of different media for the identification and quantification of *Aeromonas* spp. in water. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **1991**; 59(4): 225-8.

Ribas F, Perramon J, Terradillos A, Frías J, Lucena F. The *Pseudomonas* group as an indicator of potential regrowth in water distribution systems. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, **1999**; 88: 704-710.

Ricketts KD, Joseph CA. European Working Group for Legionella Infections. The impact of new guidelines in Europe for the control and prevention of travel-associated Legionnaires' disease. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **2006**; 209(6): 547-52.

Ricketts KD, McNaught B, Joseph CA. European Working Group for Legionella Infections. Travel-associated legionnaires' disease in Europe: 2004. *European Surveillance*, **2006**; 11(4): 107-10.

Rodríguez-Zaragoza S. Ecology of free-living amoebae. *Crit Reviews on Microbiology*, **1994**; 20(3): 225-41.

Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV Keevil CW. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Applied and Environmental Microbiology*, **1994**; 60(5): 1585-1592.

Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal Clinical Pathology*, **1980**; 33: 1179-1183.

Rowbotham TJ. *Legionella*-like amoebal pathogens. In J.M. Barbaree, R.F. Breiman, and A.P. Dufour (ed.) *Legionella: current status and emerging perspectives*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. **2003**. p. 137-140.

S

Sabria M. Legionel·losis. Pasado, presente y futuro. **2001**. "GELeg": www.legionella-online.org

Saunders NA, Harrison TG, Kachwalla N, Taylor AG. Identification of species of the genus *Legionella* using a cloned rRNA gene from *Legionella pneumophila*. *Journal of General Microbiology*, **1988**; 134(8):2363-74.

Skaliy P, Thompson TA, Gorman GW, Morris GK, McEachern HV, Mackel DC. Laboratory studies of disinfectants against *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1980**; 40(4): 697-700.

Schlenk R, Wildfeuer A, Haferkamp O. Identification of *Legionella pneumophila* in various specimens by the polymerase chain reaction. *Arzneimittelforschung*, **1993**; 43(11): 1249-52.

Schoenen D, Hienzsch S, Emmel B. Decontamination of drinking water taps colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*, **1986**; 182(5 6):551-7.

Shelton, BG, Morris GK, Gorman GW. Reducing risks associated with *Legionella* bacteria in building water systems. p. 279–281. *In* J. M. Barbaree, R. F. Breiman, and A. P. Dufour (ed.), *Legionella: current status and emerging perspectives*, **1993**. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Standard ASHRAE. Minimizing the risk of Legionellosis associated with building water systems. Atlanta: Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers, Inc. Guideline 12; **2000**.

State of Maryland. Department of Health and Mental Hygiene. Report of the Maryland Scientific Working Group to Study *Legionella* in Water Systems in Healthcare Institutions. June 14, 2000.

<http://www.dhmh.state.md.us/html/legionella.htm>.

Steinert M, Ockert G, Lück C, Hacker J. Regrowth of *Legionella pneumophila* in a heat-disinfected plumbing system. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, **1998**; 288(3): 331-42.

Stout JE, Yu VL. Legionellosis. New England Journal of Medicine, **1997**; 337(10): 682-7.

Stout JE, Yu VL. Eradicating Legionella from hospital water. JAMA, **1997**; 278(17): 1404-5.

Stout J, Lin Y, Goetz A, Muder S. Controlling Legionella in hospital water systems: experience with the superheat-and-flush method and copper-silver ionization. Infection Control and Hospital Epidemiology, **1998**; 19(12):911-4.

Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. Nature, **2000**; 406(6799): 959-64.

Surman S, Morton B, Kevil R, Fitzgeorge RB. *Legionella pneumophila* proliferation is not dependent on intracellular replication. ASM Press. **2002**; p. 86-89.

T

Ta AC, Stout JE, Yu VL, Wagener MM. Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. *Journal of Clinical Microbiology*, **1995**; 33(8): 2118-23.

Tatlock HA. Rickettsia-like organism recovered from guinea pigs. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, **1944**; 57: 95-99.

Tison DL, Pope DH, Cherry WB, Fliermans CB. Growth on *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (cyanobacteria) *Applied and Environmental Microbiology*, **1980**; 39: 456-459.

Thomas V, Herrera-Rimann K, Blanc D, Greub G. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a hospital water network. *Applied and Environmental Microbiology*, **2006**; 72(4): 2428-2438.

Türetgen. Monitoring of biofilm-associated *Legionella pneumophila* on different substrata in model cooling tower system. *Environmental Monitorization Assessment*, **2007**; 125: 271-279.

V

Van der Kooij. The occurrence of *Pseudomonas* spp. in surface water and in tap water as determined on citrate media. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **1977**; 43(2):187-97.

Van Eys GJ, Gravekamp C, Gerritsen MJ, Quint W, Cornelissen MT, Schegget JT, Terpstra WJ. Detection of leptospire in urine by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, **1989**; 27(10): 2258-62.

Vickers RM, Stout JE, Yu VL, Rihs JD. Manual of culture methodology for *Legionella*. *Seminaries of Respiratory Infections*, **1987**; 2(4): 274-9.

Vogel JP, Andrews HL, Wong SK, Isberg RR. Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science*, **1998**; 279(5352): 873-6.

Voss L, Button KS, Rheins MS, Tuovinen OH. Sampling methodology for enumeration of *Legionella* spp. in water distribution systems, 2nd International Symposium. **1984**; p. 292–294. *En C. Thornsberry, A. Balows, J. C. Feeley, and W. Jakubowski (ed.), Legionella—proceedings of the 2nd International Symposium.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.

W

Wadowsky RM, Yee RB. Multiplication of *Legionella pneumophila* in unsterilized tap water. *Applied and Environmental Microbiology*, **1982**. 43(6): 1330-4.

Wadowsky RM, Yee RB. Satellite growth of *Legionella pneumophila* with an environmental isolate of *Flavobacterium breve*. *Applied and Environmental Microbiology*, **1983**; 46: 1447- 9.

Wadowsky R, Wolford R, Mcnamara M, Yee R. Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, **1985**; 49(5): 1197-205.

Wadowsky RM, Butler L, Cook M, Verma SM, Paul MA, Fields BS, Keleti G, Sykora JL, Yee RB. The *Pseudomonas* group as an indicator of potential regrowth in water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **1988**; 46: 1447- 9.

Walker JT, Bradshaw DJ, Finney M, Fulford MR, Frandsen E, ØStergaard E, Ten Cate JM, Moorer WR, Schel AJ, Mavridou A, Kamma JJ, Mandilara G, Stösser L, Kneist S, Araujo R, Contreras N, Goroncy-Bermes P, O'Mullane D, Burke F, Forde A, O'Sullivan M, Marsh PD. Microbiological evaluation of dental unit water systems in general dental practice in Europe. *European Journal of Oral Science*, **2004**; 112(5): 412-8.

Walsh JJ, Kelley J. Plasma cell pneumonia induced by *Legionella pneumophila*. *Chest*, **1991**; 100(4):1170-2.

Walsh, Metzger, Higuchi. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Research reports on Biotechniques*, **1991**; Vol 10, n^o4.

Wellinghausen N, Frost C, Marre R. Detection of Legionellae in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **2001**; 67 (9): 3985-3993.

Wellings FM, Amuso PT, Chang SL, Lewis AL. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, **1977**; 34(6): 661-7.

Y

Yamamoto H, Sugiura M, Kusunoki S, Esaki T, Ikedo M and Yabuuchi E. Factors Stimulating Propagation of *Legionellae* in Cooling Tower Water. *Applied and Environmental Microbiology*, **1992**; 58(4): 1394-1397.

Yáñez MA, Carrasco-Serrano C, Barberá VM, Catalán V. Quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of the dotA gene. *Applied and Environmental Microbiology*, **2005**; 71(7): 3433-41.

Yáñez MA, Barberá VM, Catalán V. Validation of a new seminested PCR-based detection method for *Legionella pneumophila*. *Journal of Microbiological Methods*, **2007**; 70(1): 214-7.

Z

Zietz BP, Dunkelberg J, Ebert J, Narbe M. Isolation and characterization of *Legionella spp.* and *Pseudomonas spp.* from greenhouse misting systems. *Journal of Applied Microbiology*, **2006**; 100(6):1239-50.

Zacheus OM, Martikainen PJ. Occurrence of legionellae in hot water distribution systems of Finnish apartment buildings. *Canadian Journal of Microbiology*, **1994**; 40(12): 993-9.

ANEXOS

ANEXOS

1. COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS BACTERIOLÓGICOS DE LOS DISTINTOS TIPOS DE AGUA.

Tabla 1.1 Resultados Bacteriológicos de las muestras de agua.

	TIPO DE MUESTRA	Media ufc/100ml	Máximo ufc/100ml	Mínimo ufc/100ml
<i>Legionella</i>	MEZCLA	1,38x10 ²	2,95x10 ³	0,00x10 ⁰
	AGUA I	2,65x10 ²	2,00x10 ³	0,00x10 ⁰
	AGUA II	2,29x10 ²	5,30x10 ³	0,00x10 ⁰
		Media ufc/100ml	Máximo ufc/100ml	Mínimo ufc/100ml
Het 22°C	MEZCLA	7,47x10 ⁶	8,80x10 ⁷	0,00x10 ⁰
	AGUA I	2,50x10 ⁶	1,31x10 ⁷	0,00x10 ⁰
	AGUA II	2,30x10 ⁶	2,80x10 ⁷	0,00x10 ⁰
		Media ufc/100ml	Máximo ufc/100ml	Mínimo ufc/100ml
Het 37°C	MEZCLA	6,70x10 ⁶	8,00x10 ⁷	0,00x10 ⁰
	AGUA I	2,49x10 ⁶	1,20x10 ⁷	0,00x10 ⁰
	AGUA II	2,22x10 ⁶	3,00x10 ⁷	0,00x10 ⁰
		Media ufc/100ml	Máximo ufc/100ml	Mínimo ufc/100ml
<i>Pseudomonas</i>	MEZCLA	3,26x10 ²	2,00x10 ⁴	0,00x10 ⁰
	AGUA I	2,52x10 ²	1,20x10 ³	0,00x10 ⁰
	AGUA II	1,98x10 ²	1,20x10 ³	0,00x10 ⁰

2. TABLAS CON LOS DATOS ORIGINALES DEL AGUA SANITARIA CALIENTE

Tabla 2.1. Resultados de Legionella en el agua sanitaria caliente (MEZCLA).

Muestra	LEGIONELLA ufc/100ml	Serogrupo	PCR
1	ND		0
2	ND		0
3	8	2 -14	1
4	7	2 -14	1
5	23	2 -14	1
6	ND		0
7	50	2 -14	1
8	51	2 -14	1
9	ND		0
10	ND		0
11	2	2 -14	1
12	ND		0
13	ND		0
14	ND		0
15	ND		0
16	ND		0
17	ND		0
18	220	2 -14	1
19	76	2 -14	1
20	ND		0
21	ND		0
22	ND		0
23	ND		0
24	ND		0
25	ND		0
26	ND		0
27	ND		0
28	ND		0
29	1000	2 -14	1
30	ND		0
31	ND		0
32	ND		0
33	7	spp	1
34	422	2 -14	1
35	ND		0
36	ND		0
37	ND		0
38	ND		0
39	ND		0

Muestra	LEGIONELLA ufc/100ml	Serogrupo	PCR
40	9	1	1
41	ND		0
42	ND		0
43	ND		0
44	ND		0
45	ND		0
46	ND		0
47	174	2 -14	1
48	ND		0
49	ND		0
50	604	2 -14	1
51	ND		0
52	13	2 -14	1
53	ND		0
54	ND		0
55	ND		0
56	83	1	1
57	ND		0
58	ND		0
59	ND		0
60	ND		0
61	892	1	1
62	ND	1	1
63	ND	1	1
64	ND	1	1
65	ND	1	1
66	ND	1	1
67	ND		0
68	ND		0
69	ND		0
70	402	1	1
71	2948	1	1
72	1856	1	1
73	1292	1	1
74	2360	1	1
75	2	1	1
76	ND		1
77	ND		1
78	ND		0
79	ND		0
80	ND		0
81	ND		1
82	800	2 -14	1
83	ND		0
84	ND		0

Anexos

Muestra	LEGIONELLA ufc/100ml	Serogrupo	PCR
85	450	2 -14	1
86	ND		0
87	ND		0
88	ND		0
89	ND		0
90	ND		0
91	ND		0
92	ND		0
93	ND		0
94	ND		0
95	ND		0
96	ND		0
97	ND		0
98	ND		0
99	ND		1
100	ND		1
101	ND		0
102	ND		0
103	ND		0
104	ND		0
105	188	1	1
106	811	1	1
107	53	1	1
MEDIA	1,38E+02		
DESV. STAN.	4,50E+02		
% positivos	26%		35%
MAX	2,95E+03		
MIN	ND		

ND: No Detectado **1:** PCR positiva, **0:** PCR negativa, **serogrupos: 1, 2-14, spp.**

Tabla 2.2. Resultados de los parámetros microbiológicos del agua sanitaria caliente (Mezcla).

Muestra	HET22°C ufc /100 ml	HET37°C ufc/100 ml	Pseud. ufc/100ml	Protozoos Cultivo	protozoos PCR
1	3,96E+06	7,30E+07	ND	0	0
2	5,50E+05	6,25E+05	ND	0	0
3	3,10E+06	2,36E+07	ND	0	0
4	1,00E+04	7,75E+06	ND	0	0
5	8,44E+06	3,96E+06	1,84E+03	0	1
6	4,96E+05	2,90E+05	5,00E+01	0	0
7	8,00E+07	2,80E+07	1,65E+03	0	1
8	8,00E+06	1,55E+07	5,50E+02	0	1
9	6,30E+05	6,40E+05	ND	0	0
10	2,70E+06	2,88E+06	3,83E+02	0	0
11	1,60E+05	1,90E+04	2,50E+01	0	0
12	3,40E+05	1,20E+06	ND	0	0
13	6,80E+06	1,67E+06	ND	0	0
14	2,80E+06	2,50E+06	ND	0	1
15	4,00E+07	5,40E+07	1,20E+02	0	0
16	2,00E+07	2,20E+07	1,00E+03	1	1
17	ND	1,00E+03	2,00E+01	0	0
18	1,00E+07	1,10E+07	1,15E+02	0	0
19	6,00E+03	2,00E+03	2,40E+01	1	0
20	2,26E+06	1,84E+06	2,00E+00	0	0
21	3,00E+06	3,40E+06	7,00E+01	0	0
22	1,50E+07	1,60E+07	3,50E+01	0	0
23	2,80E+06	2,96E+06	3,00E+00	0	0
24	2,84E+07	2,60E+07	1,70E+01	1	1
25	2,55E+07	1,82E+07	3,00E+03	0	0
26	7,20E+06	5,20E+07	ND	0	0
27	3,90E+05	4,00E+04	ND	1	0
28	2,80E+07	7,60E+06	6,00E+01	0	0
29	5,88E+07	1,00E+07	ND	0	1
30	ND	ND	ND	0	0
31	4,00E+03	3,90E+04	ND	0	0
32	1,94E+05	1,76E+05	ND	0	0
33	1,10E+05	1,38E+05	1,00E+00	0	1
34	7,84E+07	4,00E+06	ND	0	0
35	4,40E+05	3,00E+05	9,10E+01	0	0
36	7,00E+04	9,00E+04	1,00E+00	0	0
37	ND	ND	ND	0	0
38	1,50E+06	3,10E+06	5,00E+01	0	0
39	1,20E+05	2,40E+05	2,10E+01	0	0
40	9,40E+05	2,50E+07	ND	1	1
41	7,00E+05	9,00E+05	ND	0	1

Anexos

Muestra	HET22°C ufc /100 ml	HET37°C ufc/100 ml	Pseud. ufc/100ml	Protozoos Cultivo	protozoos PCR
42	5,00E+05	2,00E+05	2,00E+04	0	0
43	3,50E+07	1,39E+07	6,00E+02	0	1
44	ND	ND	ND	0	0
45	6,34E+06	2,94E+07	ND	0	0
46	3,10E+06	9,60E+06	ND	0	0
47	8,64E+07	1,54E+07	ND	0	1
48	9,88E+06	9,20E+06	2,00E+01	0	0
49	1,23E+05	1,42E+05	1,80E+02	0	0
50	1,50E+07	2,20E+07	1,00E+02	0	1
51	1,16E+06	1,27E+06	2,90E+01	0	0
52	6,00E+06	1,31E+07	ND	0	0
53	2,80E+07	2,03E+07	6,00E+00	0	0
54	4,20E+06	3,90E+06	ND	0	0
55	1,58E+06	1,08E+06	1,00E+02	0	0
56	4,00E+06	8,44E+06	1,50E+02	1	0
57	7,20E+06	7,20E+06	1,00E+01	0	0
58	6,40E+06	3,72E+06	ND	0	0
59	ND	ND	ND	1	0
60	6,00E+03	9,00E+03	ND	0	0
61	1,38E+05	9,40E+04	ND	1	0
62	ND	1,50E+04	ND	1	1
63	5,00E+03	8,00E+03	5,60E+01	0	0
64	7,60E+06	4,60E+06	ND	0	0
65	1,88E+06	7,84E+06	1,00E+02	1	0
66	2,80E+06	5,20E+06	1,00E+03	0	0
67	8,80E+07	8,00E+07	1,00E+03	0	0
68	ND	ND	1,00E+00	0	0
69	3,30E+05	5,20E+05	ND	0	0
70	1,70E+05	3,70E+05	ND	1	1
71	4,00E+03	2,90E+04	ND	1	1
72	1,00E+07	1,00E+07	ND	1	1
73	1,00E+07	6,80E+06	7,00E+00	1	1
74	1,00E+07	7,68E+06	7,00E+01	1	1
75	3,00E+05	2,00E+05	ND	1	1
76	4,00E+04	2,92E+05	ND	0	0
77	1,40E+04	1,70E+04	ND	0	0
78	2,90E+04	1,00E+03	ND	0	0
79	ND	1,90E+04	ND	0	0
80	ND	ND	ND	0	0
81	6,00E+03	9,00E+03	6,00E+01	1	0
82	5,00E+06	5,40E+06	1,00E+03	1	0
83	8,40E+05	1,20E+06	ND	0	0
84	6,00E+04	4,70E+04	1,00E+03	1	0

Muestra	HET22°C ufc /100 ml	HET37°C ufc/100 ml	Pseud. ufc/100ml	Protozoos Cultivo	protozoos PCR
85	2,50E+06	2,03E+06	6,40E+01	1	0
86	2,00E+03	2,00E+03	ND	0	0
87	ND	ND	ND	0	0
88	ND	ND	ND	0	0
89	ND	ND	ND	0	0
90	8,80E+04	1,26E+05	1,64E+02	0	0
91	ND	ND	ND	0	0
92	ND	ND	ND	1	0
93	1,61E+05	2,50E+05	ND	1	1
94	7,00E+03	3,00E+03	2,80E+01	1	1
95	ND	ND	ND	0	0
96	4,00E+04	5,40E+04	ND	1	0
97	1,80E+04	2,80E+04	ND	0	1
98	1,81E+05	3,87E+05	ND	0	0
99	3,60E+05	2,26E+06	ND	0	0
100	ND	ND	ND	0	0
101	7,20E+04	3,30E+04	ND	0	0
102	ND	ND	ND	1	0
103	ND	ND	ND	0	0
104	ND	ND	1,00E+01	1	0
105	3,04E+05	3,87E+05	ND	1	1
106	4,20E+05	5,00E+05	ND	0	0
107	6,80E+05	7,00E+05	ND	0	0
MEDIA	7,47E+06	6,70E+06	3,26E+02		
DESV. STAN.	1,77E+07	1,37E+07	1,97E+03		
% positivos	82%	86%	44%	25%	22%
MAX	8,80E+07	8,00E+07	2,00E+04		
MIN	ND	ND	ND		

ND: No Detectado, **1**: protozoos positiva, **0**: protozoos negativa

Tabla 2.3. Resultados de los parámetros fisicoquímicos del agua sanitaria caliente (Mezcla).

Muestra	Temp	pH	TURB	CL	COT	Fe	Zn	Cu
1	50	7,65	0,3	0	1,50	0,02	0,16	0,02
2	18	7,81	0,7	0,3	1,20	0,03	0,14	0,19
3	49	7,76	0,4	0	1,90	0,02	0,03	0,01
4	49	8,01	0,6	0	0,55	0,25	0,15	0,12
5	53	7,53	0,5	0	2,71	0,01	0,05	0,38
6	64	7,69	1,3	0	2,51	0,01	0,05	0,39
7	65	8,31	0,8	0	1,90	0,01	0,52	0,67
8	43	8,11	1,5	0	1,64	0,01	0,10	0,04
9	66	7,9	0,9	0	1,54	0,01	0,25	0,71
10	54	7,89	1,6	0	1,60	0,04	0,90	0,07
11	53	7,87	1,2	0	1,50	0,05	0,14	0,12
12	61,3	7,51	0,8	0	1,52	0,04	0,10	0,00
13	20,8	7,81	0,5	2	1,90	0,00	0,11	0,02
14	51	7,8	1,45	0,01	1,20	0,02	0,03	0,12
15	48	7,8	0,45	0	0,82	0,03	0,03	0,11
16	58	7,9	0,49	0	0,71	0,03	0,03	0,14
17	60,1	7,8	0,5	0	2,65	0,02	0,05	0,44
18	41	7,79	0,6	0	2,54	0,01	0,04	0,24
19	59,5	7,7	1,47	0	1,17	0,22	0,11	0,15
20	52	7	0,62	0	1,30	0,29	0,14	0,16
21	51	7	0,54	0	0,73	0,18	0,13	0,15
22	51,2	7	0,5	0	0,65	0,01	0,02	0,10
23	50,3	6	1,3	0	1,07	0,02	0,04	0,10
24	54	7	0,4	0	0,42	0,01	0,06	0,10
25	60,1	7	0,3	0	1,66	0,01	0,03	0,10
26	59,8	6	0,34	0	0,97	0,02	0,02	0,10
27	55	7,79	0,5	0	2,60	0,02	0,12	0,58
28	53,1	7,48	0,58	0	29,60	0,03	0,03	0,43
29	54	7	0,9	0	2,79	0,03	0,03	0,44
30	61,4	7,91	1,45	0	2,93	0,42	0,53	2,10
31	46	7,78	1,3	0	23,96	0,02	0,33	1,55
32	60,5	8	0,9	0	7,45	0,04	0,22	0,76
33	59	7,64	1	0	2,14	0,00	0,03	0,45
34	58,2	8	0,18	0	1,97	0,00	0,25	0,26
35	43,8	7,51	0,3	0	1,75	0,00	0,03	0,43
36	52,1	7,64	0,69	0	1,57	0,00	0,04	0,02
37	56	7,76	1,5	0	3,66	0,15	0,15	0,17
38	51,6	7,59	0,8	0	1,27	0,04	0,33	0,02
39	50	7,61	0,9	0	1,07	0,00	0,14	0,01
40	52,3	7,64	0,6	0	1,10	0,02	0,39	0,08
41	37	7,51	0,6	0	1,05	0,00	0,10	0,02
42	34,8	7,55	1,1	0	1,60	0,07	0,49	0,09
43	31	8,17	1,4	0	26,54	0,03	0,12	0,07

Muestra	Temp	pH	TURB	CL	COT	Fe	Zn	Cu
44	30	8,63	0,7	0	8,26	0,02	0,11	0,06
45	30	8,01	2,02	0	1,39	0,00	0,02	0,20
46	30	7,75	1,02	0	1,42	0,00	0,07	0,23
47	30	8,04	0,46	0	1,80	0,03	0,08	0,12
48	53	8	0,16	0	1,72	0,00	0,46	0,62
49	54	8	0,18	0	1,73	0,00	0,03	0,13
50	57,1	7,67	0,31	0	0,86	0,03	0,13	0,03
51	55	7,98	0,5	0	1,01	0,08	0,39	0,02
52	50	7,62	0,34	0	1,05	0,00	0,02	0,11
53	52,9	7,91	0,18	0	1,04	0,00	0,10	0,03
54	38	7,68	0,35	0	1,60	0,01	0,37	0,15
55	41,9	7,54	0,41	0	1,65	0,00	0,38	0,12
56	40,8	7,97	0,9	0	1,70	0,00	0,30	0,10
57	42,3	7,84	0,55	0	1,02	0,00	0,12	0,10
58	37,3	7,72	1,21	0	1,58	0,01	0,21	0,06
59	66	8,12	0,65	0,2	1,70	0,02	0,23	0,05
60	41,4	7,86	0,58	0	1,84	0,02	0,27	0,02
61	51,1	7,67	1	0	2,18	0,01	0,29	0,08
62	50,6	7,44	0,55	0	2,16	0,00	0,07	0,01
63	49,4	7,44	0,71	0	2,14	0,00	0,08	0,02
64	47,6	6,48	1,67	0	1,98	0,01	0,21	0,04
65	51,1	7,05	1,56	0	1,82	0,01	0,06	0,03
66	48,7	7,15	0,87	0	1,05	0,01	0,06	0,03
67	50	7,57	0,34	0	1,00	0,00	0,24	0,02
68	53	7,69	0,26	0	1,22	0,00	0,07	0,01
69	50	8,14	1,08	0	1,50	0,00	0,00	0,03
70	25	8,31	0,59	0	1,55	0,00	0,00	0,00
71	25	8,25	0,42	0	1,40	0,00	0,00	0,00
72	25	7,8	0,5	0	1,33	0,00	0,00	0,00
73	25	7,9	0,3	0	1,28	0,00	0,00	0,00
74	25	7,5	0,22	0	1,33	0,00	0,00	0,00
75	25	7,1	0,48	0	1,40	0,00	0,00	0,00
76	46	7	0,3	0	1,55	0,00	0,02	0,11
77	53	7	0,5	0	1,69	0,01	0,01	0,01
78	55,1	7,64	0,2	0	4,56	0,00	0,34	0,43
79	47	7,8	0,5	0,2	2,21	0,00	0,15	0,13
80	62	7,86	0,6	0,2	2,40	0,00	0,12	0,04
81	58	7,06	0,5	0	1,50	0,00	0,16	0,16
82	30	7,14	0,2	0	1,55	0,00	0,17	0,16
83	57	7,37	0,3	0	1,62	0,00	0,10	0,16
84	49	7,46	0,6	0	1,20	0,00	0,19	0,29
85	42	7,69	0,5	0	1,10	0,00	0,17	0,18
86	55,6	7,8	1	0,2	1,40	0,06	0,18	0,46
87	50	7,82	0,9	0,2	2,97	0,04	0,18	1,13
88	65,2	7,93	1,9	0,2	3,04	0,12	0,26	0,69

Anexos

Muestra	Temp	pH	TURB	CL	COT	Fe	Zn	Cu
89	48,5	8,12	0,35	0	1,81	0,01	0,22	1,53
90	47	7,94	0,55	0	22,81	0,04	0,30	0,97
91	59,1	8,19	0,55	0	2,19	0,02	0,24	0,62
92	22,5	8,21	0,59	0,2	2,51	0,01	0,20	1,08
93	39	8,4	1,9	0	1,00	0,01	0,67	0,21
94	41,5	8,3	0,51	0	2,00	0,01	0,21	1,31
95	71,7	8,2	1,44	0	1,50	0,00	0,28	1,08
96	41	7,2	1,08	0	1,58	0,01	0,67	0,21
97	42,5	7,1	0,95	0	2,01	0,01	0,21	1,31
98	45	7	0,6	0	1,76	0,00	0,28	1,08
99	59,2	7	1,12	0	2,37	0,10	0,87	1,48
100	54	7,11	1	0	1,55	0,04	0,30	1,07
101	58,7	7,2	1,05	0	1,66	0,09	0,64	1,00
102	56	7	0,5	0	2,21	0,01	0,17	1,53
103	53	7	0,4	0	2,50	0,01	0,13	1,49
104	55	7	0,6	0	2,23	0,00	0,13	1,18
105	53,2	7	0,2	0,2	2,60	0,02	0,20	0,48
106	52,7	7	0,41	0,2	2,57	0,02	0,13	0,24
107	54,2	7	0,23	0,2	2,42	0,06	0,19	0,75
MEDIA	48,34	7,60	0,73	0,04	2,73	0,03	0,18	0,35
DESV. STAN.	11,35	0,47	0,43	0,20	4,70	0,06	0,18	0,46
MAX	71,70	8,63	2,02	2,00	29,60	0,42	0,90	2,10
MIN	18,00	6,00	0,16	0,00	0,42	0,00	0,00	0,00

Temperatura: °C, Turbidez NTU, Cloro: ppm, Fe, Cu, Zn:ppm

Tabla 2.4. Resultados de *Legionella* en el agua sanitaria caliente (Agua Proximal).

Muestra	LEGIONELLA ufc/100ml	Serogrupo	PCR
1	ND		1
2	116	2 -14	1
3	520	2 -14	1
4	ND		1
5	ND		1
6	ND		1
7	237	2 -14	1
8	ND		1
9	ND		1
10	1000	2 -14	1
11	ND		0
12	ND		0
13	ND		0
14	ND		1
15	1435	2 -14	1
16	240	2 -14	1
17	77	2 -14	1
18	ND		1
19	ND		1
20	ND		0
21	28	2 -14	1
22	ND		0
23	ND		0
24	27	2 -14	1
25	ND		0
26	ND		0
27	ND		0
28	ND		0
29	50	2 -14	1
30	ND		0
31	ND		0
32	ND		0
33	ND		0
34	ND		0
35	ND		0
36	ND		0
37	1420	2 -14	1
38	135	2 -14	1
39	ND		1
40	ND		1

Anexos

Muestra	LEGIONELLA ufc/100ml	Serogrupo	PCR
41	ND		1
42	488	2 -14	1
43	ND		0
44	ND		0
45	1740	2 -14	1
46	956	2 -14	1
47	196	2 -14	1
48	39	2 -14	1
49	ND		0
50	20	2 -14	1
51	ND		0
52	ND		0
53	2000	2 -14	1
54	2000	2 -14	1
55	728	2 -14	1
56	48	2 -14	1
57	ND		0
58	18	1	1
59	ND		0
60	ND		0
61	ND		0
62	ND		1
MEDIA	2,18E+02		
DESV. STAN.	5,01E+02		
% Positivos	37%		58%
MAX	2,00E+03		
MIN	ND		

ND: No Detectado 1: PCR positiva, 0: PCR negativa, serogrupos: 1, 2-14

Tabla 2.5. Resultados de los parámetros microbiológicos del agua sanitaria caliente (Agua proximal)

Muestra	HET23°C ufc /100 ml	Het37°C ufc/100 ml	Pseud ufc/100ml	Protozoos Cultivo	protozoos PCR
1	ND	ND	1,20E+01	0	0
2	8,00E+04	8,80E+05	1,20E+03	0	1
3	4,80E+06	4,40E+06	1,50E+02	1	1
4	5,20E+06	3,20E+06	9,70E+01	1	0
5	6,40E+06	1,00E+06	2,70E+01	0	0
6	7,20E+06	9,20E+06	ND	0	0
7	1,60E+06	4,20E+06	8,80E+01	0	0
8	6,24E+06	5,00E+06	5,00E+02	0	0
9	9,20E+06	8,00E+06	7,70E+01	0	0
10	4,48E+05	2,40E+05	1,00E+03	0	0
11	3,68E+05	6,80E+05	2,88E+02	0	0
12	2,50E+04	1,40E+04	5,20E+02	0	0
13	1,10E+05	1,50E+05	2,20E+01	1	1
14	4,00E+06	4,90E+06	1,00E+03	0	0
15	2,20E+05	6,80E+05	9,00E+01	1	0
16	6,00E+06	9,00E+06	6,00E+01	1	0
17	1,10E+07	9,60E+06	2,00E+01	0	0
18	3,40E+04	3,40E+04	3,00E+01	0	0
19	1,10E+04	5,00E+03	ND	0	0
20	6,30E+04	1,00E+03	5,40E+01	0	0
21	2,40E+04	1,50E+04	ND	0	0
22	5,80E+04	5,50E+04	ND	0	0
23	2,80E+04	1,80E+04	ND	0	0
24	4,80E+06	4,90E+06	ND	0	0
25	ND	ND	2,80E+01	0	0
26	5,40E+05	4,60E+05	1,90E+02	1	1
27	1,60E+06	1,31E+06	1,00E+03	0	1
28	1,00E+05	1,00E+05	1,50E+02	1	1
29	8,00E+06	8,60E+06	1,00E+03	1	1
30	2,28E+06	1,42E+06	ND	1	1
31	4,64E+06	4,56E+06	5,00E+01	1	0
32	ND	ND	ND	0	0
33	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+03	0	0
34	1,12E+05	1,00E+05	2,00E+00	1	0
35	1,05E+07	9,06E+06	4,80E+01	0	0
36	1,31E+07	9,60E+06	3,00E+00	0	0
37	4,60E+06	5,60E+06	3,50E+01	1	1
38	8,00E+03	1,10E+04	2,40E+01	1	1
39	1,70E+06	2,00E+06	ND	1	1

Anexos

Muestra	HET23°C ufc /100 ml	Het37°C ufc/100 ml	Pseud ufc/100ml	Protozoos Cultivo	protozoos PCR
40	ND	ND	ND	0	0
41	5,92E+06	7,80E+06	ND	1	1
42	6,36E+06	1,00E+06	ND	1	1
43	5,00E+04	1,20E+05	1,00E+03	0	0
44	7,36E+06	7,20E+06	ND	1	1
45	1,52E+06	2,16E+06	1,10E+03	0	0
46	1,15E+06	2,90E+06	ND	1	1
47	8,50E+04	3,04E+05	3,70E+01	1	1
48	3,70E+05	4,24E+05	ND	1	0
49	5,30E+05	5,32E+05	ND	0	0
50	4,80E+05	7,20E+05	1,00E+03	1	1
51	3,03E+06	2,63E+06	1,00E+03	1	1
52	5,60E+05	6,20E+05	ND	1	0
53	8,80E+06	6,40E+06	1,00E+03	1	1
54	8,80E+06	1,70E+06	1,00E+03	0	0
55	2,00E+05	5,00E+05	ND	0	0
56	1,00E+05	4,80E+06	ND	1	1
57	4,60E+06	1,20E+07	ND	1	0
58	2,80E+05	2,80E+05	ND	1	0
59	1,00E+04	1,00E+04	ND	0	0
60	ND	ND	ND	0	0
61	1,00E+04	4,00E+04	ND	0	0
62	1,00E+04	1,00E+04	ND	0	0
MEDIA	2,68E+06	2,62E+06	2,40E+02		
DESV. STAN.	3,48E+06	3,33E+06	4,01E+02		
% Positivos	92%	92%	60%	43%	32%
MAX	1,31E+07	1,20E+07	1,20E+03		
MIN	ND	ND	ND		

ND: No Detectado 1: protozoos positivo, 0: protozoos negativo.

Tabla 2.6 Resultados de los parámetros fisicoquímicos del agua sanitaria caliente (Agua proximal).

Muestra	Temp.	pH	TURB	CL	COT	Fe	Zn	Cu
1	26,6	7,46	1,2	0	1,50	0,01	0,11	0,00
2	21,4	7,38	0,8	0	2,78	0,00	0,15	0,13
3	17,6	7,84	2,5	0	1,49	0,00	0,10	0,03
4	17	7,52	5	0	1,33	0,20	1,00	0,12
5	17	7,87	1,5	0	0,90	0,00	0,38	0,12
6	27	8,16	1	0	0,84	0,01	0,13	0,07
7	27,6	7	0,12	0	1,00	0,20	0,33	0,08
8	30	6,36	0,3	0	1,10	0,01	0,32	0,08
9	30	6,92	0,3	0	4,12	0,00	0,18	0,03
10	30	7,07	0,25	0	9,55	0,00	0,21	0,10
11	31	7,98	0,4	0	1,02	0,00	0,03	0,21
12	29	7,56	0,4	0	1,10	0,01	0,08	0,44
13	29	7,49	0,5	0	0,67	0,00	0,06	0,65
14	37	8	0,9	0	0,92	0,00	0,06	0,13
15	28	7,74	0,8	0	1,82	0,00	0,46	0,11
16	26	8,06	0,8	0	1,59	0,01	0,40	0,31
17	34	7,99	0,7	0	3,34	0,01	0,12	0,12
18	25	6,63	1,5	0	0,25	0,02	0,07	0,01
19	23,2	7,23	0,9	0	1,89	0,01	0,06	0,00
20	32	7,25	0,9	0	2,59	0,00	0,32	0,37
21	16,3	7,45	0,4	0	1,93	0,00	0,07	0,76
22	24	6,42	0,6	0	1,36	0,01	0,05	0,01
23	26,1	6,68	0,5	0	1,43	0,02	0,05	0,01
24	22	6,88	1,9	0	1,61	0,07	1,09	0,05
25	20	8,46	0,5	0	2,19	0,01	0,13	0,05
26	20	7,41	0,3	0	2,39	0,00	0,26	0,04
27	33,3	7,65	0,35	0	1,69	0,00	0,16	0,02
28	20	7,62	0,66	0	2,09	0,01	1,30	0,01
29	25,7	7,84	0,35	0	1,32	0,00	0,28	0,01
30	29,1	7,87	0,24	0	2,27	0,02	0,30	0,05
31	20	8,69	0,32	0	0,96	0,00	0,29	0,11
32	35,8	7,96	0,33	0	1,98	0,03	0,04	0,16
33	26	7,73	0,4	0	2,29	0,00	0,70	1,46
34	34	7,77	0,28	0	1,75	0,01	0,19	0,02
35	32,1	7,85	1,5	0	2,24	0,09	0,05	0,01
36	32	7	0,66	0	2,46	0,00	0,12	0,03
37	33,4	7,94	0,58	0	1,25	0,00	0,62	0,01
38	28,7	8,07	0,65	0	2,01	0,00	0,19	0,02
39	31	8,32	1,02	0	2,22	0,00	0,43	0,02
40	32	7,53	0,54	0	2,44	0,08	0,10	0,05

Anexos

Muestra	Temp.	pH	TURB	CL	COT	Fe	Zn	Cu
41	30	7,53	0,7	0	1,50	0,03	0,14	0,05
42	35	7,56	0,68	0	1,78	0,13	0,25	0,07
43	23	7	1,1	0	2,16	0,00	0,21	0,62
44	33	7,1	1	0	7,10	0,00	0,23	0,30
45	33	7,2	0,7	0	8,87	0,00	0,42	0,05
46	36	7,55	0,8	0	1,09	0,01	0,36	0,03
47	32,5	7	0,5	0	1,85	0,01	0,11	0,01
48	32	7,3	0,5	0	2,71	0,01	0,16	0,02
49	32	7	0,4	0	2,24	0,05	0,09	0,04
50	22	7,2	1,5	0	1,34	0,07	0,33	0,03
51	27	7	0,5	0	3,48	0,00	0,26	0,11
52	32	7,2	0,4	0	2,44	0,00	0,18	0,04
53	25	7,2	0,23	0	3,18	0,01	0,45	0,07
54	25	7,4	0,5	0	1,15	0,11	0,34	0,04
55	34	7	0,51	0	2,56	0,16	0,24	0,10
56	33	7,2	0,52	0	4,10	0,05	0,18	0,07
57	30	7	0,4	0,2	2,16	0,06	0,37	1,54
58	23	7,11	0,6	0,2	2,49	0,04	0,30	1,25
59	19,8	7	0,7	0,32	0,00	0,01	0,07	0,01
60	20,3	7,2	0,4	0,35	0,00	0,00	0,06	0,00
61	20,2	7,2	0,5	0,52	0,00	0,01	0,05	0,01
62	20,4	7,1	0,22	0,31	0,00	0,01	0,07	0,01
MEDIA	27,39	7,43	0,75	0,03	2,09	0,03	0,26	0,17
DESV. STAN.	5,56	0,48	0,70	0,10	1,73	0,05	0,25	0,33
MAX	37,00	8,69	5,00	0,52	9,55	0,20	1,30	1,54
MIN	16,30	6,36	0,12	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00

Temperatura: °C, Turbidez NTU, Cloro: ppm, Fe, Cu, Zn: ppm

Tabla 2.7 Resultados de Legionella del agua sanitaria caliente (Agua distal).

Muestra	LEGIONELLA ufc/100ml	Serogrupo	PCR
1	ND		1
2	ND		1
3	ND		1
4	ND		1
5	ND		1
6	3	2-14	1
7	ND		1
8	ND		1
9	ND		1
10	ND		0
11	ND		0
12	ND		0
13	ND		1
14	1470	2-14	1
15	52	2-14	1
16	48	2-14	1
17	ND		0
18	ND		1
19	ND		0
20	ND		0
21	ND		0
22	ND		0
23	4	2-14	1
24	ND		0
25	ND		0
26	ND		0
27	ND		0
28	ND		1
29	ND		0
30	ND		0
31	ND		0
32	ND		0
33	ND		0
34	ND		0
35	ND		0
36	ND		0
37	ND		1
38	ND		0
39	ND		1
40	ND		1

Anexos

Muestra	LEGIONELLA ufc/100ml	Serogrupo	PCR
41	68	2-14	1
42	ND		0
43	ND		0
44	5296	2-14	1
45	4	2-14	1
46	49	2-14	1
47	10	2-14	1
48	ND		0
49	ND		0
50	ND		0
51	ND		0
52	ND		0
53	388	2-14	1
54	ND		0
55	20	2-14	1
56	ND		0
57	ND		0
58	ND		1
59	ND		1
60	ND		0
61	ND		1
62	4	1	1
MEDIA	1,20E+02		
DESV. STAN.	6,95E+02		
% positivos	21%		48%
MAX	5,30E+03		
MIN	ND		

ND: No Detectado, 1: PCR positiva, 0: PCR negativa, serogrupos: 1, 2-14.

Tabla 2.8 Resultados de los parámetros microbiológicos del agua sanitaria caliente (Agua distal)

Muestra	HET23°C ufc/100 ml	HET37°C ufc/100ml	Pseud. ufc/100ml	Protozoos Cultivo	protozoos PCR
1	ND	ND	ND	0	0
2	7,00E+03	1,90E+04	ND	0	0
3	5,20E+06	5,60E+06	1,00E+02	0	1
4	4,60E+06	3,60E+06	ND	1	1
5	1,00E+04	1,00E+04	ND	0	0
6	1,40E+06	3,10E+06	ND	0	0
7	1,73E+05	2,62E+05	ND	0	0
8	2,10E+04	7,60E+04	ND	0	0
9	1,00E+02	2,00E+02	1,00E+03	0	0
10	1,30E+04	3,00E+04	1,60E+02	0	0
11	2,00E+03	1,00E+02	ND	0	0
12	1,00E+04	3,00E+04	4,00E+00	1	0
13	1,00E+06	1,00E+06	1,20E+03	0	0
14	3,92E+06	5,20E+06	9,00E+00	1	0
15	9,04E+06	8,00E+06	ND	0	0
16	2,20E+04	1,30E+04	ND	0	0
17	2,00E+03	ND	ND	0	0
18	ND	ND	ND	0	0
19	ND	ND	ND	0	0
20	ND	ND	ND	0	0
21	ND	ND	ND	0	0
22	8,00E+03	1,50E+04	ND	0	0
23	3,00E+03	5,00E+03	ND	0	0
24	ND	ND	1,00E+01	0	0
25	ND	ND	ND	0	0
26	ND	ND	ND	0	1
27	3,70E+04	7,70E+04	1,00E+02	0	0
28	ND	ND	ND	0	0
29	5,00E+05	3,80E+05	ND	0	1
30	2,04E+06	2,96E+06	1,80E+01	1	1
31	ND	ND	ND	1	0
32	5,00E+05	3,10E+05	3,36E+02	1	0
33	ND	ND	ND	1	0
34	7,20E+06	2,80E+06	ND	0	0
35	4,00E+04	2,00E+05	ND	0	0
36	1,00E+06	1,00E+06	1,00E+03	0	0
37	2,60E+04	4,20E+04	4,00E+00	0	0
38	4,60E+06	6,80E+06	ND	1	1
39	ND	ND	ND	0	0

Anexos

Muestra	HET23°C ufc/100 ml	HET37°C ufc/100ml	Pseud. ufc/100ml	Protozoos Cultivo	protozoos PCR
40	4,00E+04	3,00E+04	ND	0	0
41	2,80E+07	3,00E+07	ND	0	0
42	1,00E+03	2,00E+03	1,00E+03	0	0
43	1,00E+04	1,50E+04	ND	0	0
44	8,80E+05	2,20E+06	1,00E+03	1	1
45	1,10E+03	2,50E+04	ND	1	1
46	3,30E+05	5,15E+05	1,34E+02	0	0
47	1,01E+05	1,36E+05	ND	0	0
48	1,48E+05	6,80E+05	ND	1	1
49	4,80E+05	5,68E+05	1,00E+03	1	0
50	1,35E+06	1,03E+06	ND	0	0
51	4,63E+05	6,34E+05	1,00E+03	0	0
52	3,68E+06	1,50E+06	1,00E+03	0	0
53	6,80E+06	6,28E+06	1,00E+03	0	0
54	1,00E+02	3,00E+04	ND	0	0
55	9,00E+03	4,00E+04	ND	0	0
56	2,68E+07	2,00E+07	ND	1	1
57	1,10E+06	1,00E+06	ND	1	1
58	1,00E+04	1,00E+04	ND	0	0
59	ND	ND	ND	0	0
60	ND	ND	ND	0	0
61	1,00E+04	4,00E+04	ND	0	0
62	3,80E+05	9,10E+05	ND	1	1
MEDIA	1,81E+06	1,73E+06	1,63E+02		
DESV. STAN.	5,11E+06	4,75E+06	3,62E+02		
% positivos	77%	76%	31%	24%	19%
MAX	2,80E+07	3,00E+07	1,20E+03		
MIN	ND	ND	ND		

ND: No Detectado **1**: protozoos positivos, **0**: protozoos os

Tabla 2.9 Resultados de los parámetros fisicoquímicos en el agua sanitaria caliente (Agua distal).

Muestra	Temp.	pH	TURB	Cl	COT	Fe	Zn	Cu
1	57,2	7,47	0,5	0	1,55	0,01	0,12	0,00
2	60	7,5	0,7	0	2,78	0,01	0,11	0,09
3	50	7,52	1,7	0	0,79	0,24	0,70	0,79
4	50	7,87	1,5	0	0,90	0,23	0,01	0,75
5	61	7	0,2	0	1,20	0,21	0,36	0,09
6	52	8	1,67	0	1,10	0,20	0,35	0,09
7	54	6,78	0,7	0	1,38	0,00	0,03	0,01
8	54	7,01	0,45	0	1,79	0,00	0,18	0,03
9	56	7,08	0,25	0	1,51	0,00	0,02	0,10
10	50	7,9	0,18	0	0,93	0,01	0,06	0,16
11	54	7,54	0,45	0	20,25	0,01	0,07	0,45
12	47	7,46	0,3	0	1,14	0,00	0,01	0,64
13	49	8,03	0,95	0	1,08	0,00	0,01	0,10
14	45	8,04	0,55	0	1,17	0,00	0,03	0,09
15	51	8,02	0,6	0	2,25	0,01	0,06	0,08
16	50	7,89	1,2	0	3,16	0,00	1,79	0,69
17	64,4	6,89	1,05	0	1,85	0,01	0,06	0,00
18	56,9	7,4	0,67	0	1,95	0,00	0,05	0,00
19	53,1	7,63	0,75	0	1,71	0,00	0,05	0,14
20	53,2	7,47	0,81	0	6,47	0,00	0,07	0,80
21	51	6,58	0,74	0	1,26	0,01	0,02	0,00
22	42	6,77	0,68	0	1,02	0,02	0,03	0,00
23	55	6,93	2	0	1,49	0,07	0,13	0,01
24	50	8,09	0,4	0	1,45	0,00	0,13	0,06
25	60	7,27	1,22	0	2,84	0,00	0,08	0,03
26	66,6	7,92	0,3	0	1,54	0,00	0,06	0,01
27	66	7,72	0,34	0	1,68	0,00	0,15	0,01
28	56	7,91	0,25	0	1,43	0,00	0,09	0,01
29	53	8,27	0,34	0	2,44	0,01	0,12	0,02
30	50	8,45	0,35	0	0,96	0,00	0,24	0,16
31	57	7,98	0,34	0	1,39	0,04	0,02	0,18
32	52	7,93	0,34	0	2,03	0,01	0,10	0,11
33	50	7,73	0,45	0	1,89	0,01	0,07	0,02
34	55,4	8,15	0,94	0	2,16	0,00	0,02	0,00
35	60,2	8,21	0,56	0	2,30	0,00	0,07	0,03
36	48	8,76	0,65	0	1,25	0,00	0,05	0,29
37	58,8	7,77	0,75	0	1,59	0,00	0,02	0,28
38	44,7	7,98	1	0	2,03	0,00	0,07	0,01
39	52	7,55	0,88	0	2,31	0,12	0,08	0,04
40	51,4	8,13	0,72	0	1,42	0,05	0,07	0,04

Anexos

Muestra	Temp.	pH	TURB	Cl	COT	Fe	Zn	Cu
41	50,5	7,63	0,85	0	2,01	0,08	0,09	0,04
42	44	7	1	0	2,10	0,01	0,04	0,60
43	52	7	1	0	8,71	0,01	0,02	0,00
44	46	7,3	0,6	0	7,84	0,01	0,15	0,03
45	60	7,2	0,6	0	1,00	0,01	0,16	0,03
46	50,4	7	0,2	0	1,75	0,03	0,06	0,01
47	50,6	7,2	0,7	0	2,12	0,05	0,06	0,02
48	51,2	7	0,5	0	2,08	0,05	0,06	0,03
49	37	7	1,5	0	6,03	0,01	0,12	0,01
50	43	7,2	0,52	0	3,82	0,00	0,18	0,04
51	43	7	0,51	0	3,43	0,00	0,06	0,03
52	50	7,2	0,23	0	6,03	0,01	0,09	0,02
53	51	7,1	0,29	0	9,75	0,07	0,16	0,02
54	52	7,22	0,4	0	5,15	0,04	0,07	0,04
55	53	7,1	0,22	0	3,69	0,06	0,04	0,07
56	50	7	0,12	0	1,70	0,45	0,73	1,25
57	50	7	0,25	0	0,00	0,00	4,00	0,28
58	61,1	7	0,5	0	0,00	0,04	0,05	0,02
59	63,2	7	0,6	0	0,00	0,00	0,05	0,00
60	62,4	7,1	1	0	0,00	0,02	0,04	0,01
61	65,7	7,1	0,3	0	0,00	0,02	0,06	0,02
62	50	7	0,5	8	0,00	0,00	4,01	0,28
MEDIA	52,95	7,47	0,66		2,53	0,04	0,26	0,15
DESV. STAN.	6,19	0,49	0,41		3,05	0,08	0,73	0,26
MAX	66,60	8,76	2,00		20,25	0,45	4,01	1,25
MIN	37,00	6,58	0,12		0,00	0,00	0,01	0,00

Temperatura: °C, Turbides NTU, Cloro: ppm, Fe, Cu, Zn:ppm

Tabla 2.10 Resultados de *Legionella* de las muestras de torres de refrigeración.

Muestra	LEGIONELLA ufc/100ml	Serogrupo	PCR
1	ND		0
2	ND		0
3	ND		0
4	ND		0
5	ND		0
6	ND		0
7	ND		0
8	ND		0
9	ND		0
10	ND		0
11	ND		0
12	ND		0
13	ND		0
14	ND		0
15	ND		0
16	ND		0
17	ND		0
18	ND		0
19	ND		0
20	ND		0
21	ND		0
22	ND		0
23	ND		0
24	ND		0
25	ND		0
26	ND		0
27	ND		0
28	ND		0
29	ND		0
30	ND		0
31	32	2 -14	1
32	ND		0
33	ND		0
34	ND		0
35	ND		0
36	ND		0
37	ND		0
38	ND		0
39	ND		0
40	ND		0

Anexos

Muestra	LEGIONELLA ufc/100ml	Serogrupo	PCR
41	ND		0
42	100	1	1
43	ND		0
44	ND		0
45	ND		0
46	ND		0
47	ND		0
48	ND		0
49	ND		0
50	ND		0
51	ND		0
52	ND		0
53	ND		0
54	ND		0
MEDIA	2,44E+00		
DESV. STAN.	14,20957247		
% positivos	4%		4%
MAX	1,00E+02		
MIN	ND		

ND: No Detectado **1:** PCR positiva, **0:** PCR negativa , **Serogrupos:** 1, 2-14

Tabla 2.11 Resultados de los parámetros microbiológicos de las aguas de torres de refrigeración.

Muestra	HET23°C ufc/ 100ml	HET37°C ufc/ 100ml	Pseud ufc/100ml	Protozoos Cultivo	protozoos PCR
1	ND	ND	ND	1	1
2	ND	ND	ND	1	1
3	2,00E+03	1,00E+03	ND	1	1
4	ND	ND	ND	1	1
5	ND	ND	ND	0	0
6	ND	ND	ND	0	0
7	2,00E+04	ND	ND	0	0
8	1,00E+05	2,44E+06	ND	0	0
9	2,10E+04	4,10E+04	ND	0	0
10	1,90E+07	1,07E+07	7,70E+01	1	0
11	ND	ND	ND	0	0
12	ND	ND	ND	0	0
13	3,00E+03	1,00E+04	ND	0	0
14	ND	ND	ND	1	0
15	3,10E+04	3,90E+04	7,10E+01	1	1
16	3,00E+03	1,00E+04	1,60E+01	1	1
17	1,00E+03	6,00E+03	ND	0	0
18	ND	7,00E+03	ND	0	0
19	2,00E+03	1,00E+03	ND	0	0
20	ND	ND	ND	0	0
21	ND	ND	ND	1	1
22	ND	ND	ND	1	0
23	ND	ND	ND	1	0
24	ND	ND	ND	0	0
25	ND	ND	ND	0	0
26	ND	ND	ND	0	0
27	3,60E+06	1,00E+06	4,00E+00	1	1
28	4,00E+03	ND	ND	1	0
29	ND	ND	ND	0	0
30	ND	ND	ND	0	0
31	6,16E+06	7,68E+06	1,00E+03	0	0
32	ND	ND	ND	0	0
33	ND	ND	ND	1	0
34	ND	ND	ND	0	0
35	1,00E+05	1,00E+05	1,00E+03	1	0
36	ND	ND	ND	0	0
37	6,00E+05	1,00E+06	3,60E+02	1	1
38	2,00E+03	3,00E+03	ND	0	0
39	ND	ND	ND	0	0

Anexos

Muestra	HET23°C ufc / 100ml	HET37°C ufc/ 100ml	Pseud ufc/100ml	Protozoos Cultivo	protozoos PCR
40	ND	ND	ND	0	0
41	1,00E+03	3,00E+03	ND	0	0
42	4,72E+05	3,52E+05	3,60E+02	1	1
43	5,00E+06	5,84E+06	1,00E+03	1	0
44	ND	ND	5,10E+01	0	0
45	ND	ND	ND	0	0
46	4,80E+06	1,18E+06	1,00E+03	1	1
47	1,00E+03	3,00E+04	ND	1	1
48	ND	ND	ND	0	1
49	1,20E+06	1,00E+05	4,40E+01	0	1
50	ND	ND	ND	0	1
51	ND	ND	ND	0	1
52	ND	ND	ND	0	1
53	ND	ND	ND	0	0
54	ND	ND	ND	1	0
MEDIA	7,62E+05	5,66E+05	9,23E+01		
DESV. STAN.	2850599,233	1941584,894	268,298582		
% positivos	48%	48%	22%	39%	31%
MAX	1,90E+07	1,07E+07	1,00E+03		
MIN	ND	ND	ND		

ND: No Detectado, 1: protozoos positivos, 0: protozoos os

Tabla 2.12 Resultados de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de torres de refrigeración.

Muestra	Temp.	pH	TURB	Cl	COT	Fe	Zn	Cu
1	28,7	8,84	1,25	8	3,15	0,01	0,02	0,07
2	27,4	8,69	8,6	8	3,2	0,00	0,01	0,02
3	19,4	8,77	7,5	8	2,32	0,01	0,02	0,06
4	31,4	8,67	0,9	6	14,85	0,00	0,03	0,02
5	25,9	8,84	2,5	8	19,42	0,16	0,58	0,08
6	23	8,76	2,4	8	7,88	0,00	0,12	0,03
7	26,3	7	1,01	3	4,5	0,02	0,08	0,00
8	23,7	8	1,02	8	5,18	0,25	1,13	0,08
9	25,7	7	3,16	0	5	0,15	0,62	3,40
10	27,4	8,55	1,89	0,2	3,3	0,02	0,03	0,07
11	22,4	8,64	0,39	8	4,18	0,00	0,19	0,00
12	23,4	8,67	0,59	8	3,32	0,00	0,18	0,20
13	28	8,68	0,65	8	3,45	0,03	0,16	0,05
14	26,1	8,66	1,49	8	3,32	0,02	0,20	0,02
15	21,4	7,96	1,58	0,2	3,38	0,05	0,07	0,07
16	25,8	8,66	0,82	8	3,3	0,00	0,03	0,03
17	23,8	8,15	1,08	8	3,2	0,00	0,17	0,03
18	26,5	8,36	0,8	8	3	0,00	0,34	0,43
19	26,5	7	0,3	8	0,47	0,00	0,40	0,02
20	21,7	8,58	0,72	8	3	0,00	0,17	0,04
21	25,7	8	1,28	8	2,9	0,06	0,11	0,05
22	20	7,9	1,03	0	15,2	0,00	0,00	0,00
23	28,3	8,1	0,7	8	18,6	0,00	0,00	0,00
24	26,1	7,94	0,75	8	3,98	0,01	0,14	0,06
25	25,1	8,78	0,55	8	17,76	0,00	0,16	0,03
26	30,5	8,79	0,45	8	21,91	0,01	0,07	0,03
27	30,3	8,2	0,53	0	14,17	0,00	0,01	0,21
28	28	8,65	0,63	8	18,01	0,04	0,07	0,03
29	23	8,47	0,77	8	5,24	0,01	0,15	0,02
30	22	8,72	2,7	8	39,41	0,04	0,15	0,09
31	30	7,5	1	0	5,75	0,02	0,01	0,03
32	23	8,27	0,52	8	6,31	0,06	0,08	0,02
33	27	8,41	0,68	8	10,81	0,06	0,08	0,02
34	22	8,32	1,12	5	6,42	0,57	1,43	0,13
35	21,6	8,33	0,56	0	31,37	0,02	0,37	0,31
36	22	8,35	0,67	5	4,43	0,00	0,15	0,03
37	23,9	7,83	0,51	0	3,33	0,00	0,18	0,04
38	23	8,3	1,24	8	3,5	0,01	0,03	0,02
39	14,1	6	1,7	8	3	0,01	0,02	0,02

Anexos

Muestra	Temp.	pH	TURB	Cl	COT	Fe	Zn	Cu
40	10	7	1,2	0,2	3	0,01	0,03	0,02
41	22,1	7	1,1	8	3	0,01	0,03	0,02
42	16,8	7	3,3	0	3	0,01	0,03	0,02
43	21,3	7	3,65	0	2,6	0,02	0,02	0,01
44	19	7	2,5	0	2,74	0,01	0,06	0,33
45	18,3	7	2,03	0	10	0,02	0,14	0,02
46	21,5	8,54	0,9	0	3,61	0,01	0,03	0,02
47	25	8,19	1,15	0	2,49	0,01	0,07	0,02
48	25	8,7	1	2,5	3	0,01	0,01	0,01
49	26	7	1,12	0	3,2	0,01	0,02	0,03
50	23,3	6	1,1	0,1	3,3	0,01	0,02	0,02
51	23,4	7	0,9	8	3	0,01	0,01	0,01
52	24,2	7	1,2	8	3,58	0	0,02	0
53	23,6	6	1,23	8	8,28	0,01	0,08	0,03
54	21,7	7	1,1	8	43,44	0,01	0,08	0,02
MEDIA	23,91	7,94	1,47	5,15	9,63	0,03	0,16	0,12
DESV. STAN.	3,94	0,82	1,51	3,68	15,48	0,09	0,26	0,46
MAX	31,40	8,84	8,60	8,00	39,00	0,57	1,43	3,40
MIN	10,00	6,00	0,30	0,00	0,47	0,00	0,00	0,00

Temperatura: °C, Turbides NTU, Cloro: ppm, Fe, Cu, Zn:ppm

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
AP-PCR	Arbitrary Primer-PCR
ARB	Amoeba-Resistant Bacteria
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ASC	Aguas Sanitarias Calientes
ASHRAE	American Society of Heating, Refrigerating and Air Conditioning Engineers
AS/NZS	Australian-New Zealand Standard
ATCC	American Type Culture Collection
BCYE	Buffer Charcoal Yeast Extract
BOE	Boletín Oficial del Estado
BOP	Boletín Oficial de la Provincia
CDC	Centers for Disease Control
CEN	European Committee for Standardization
CI	Control de Inhibición
COT	Carbono Orgánico Total
CYE	Charcoal Yeast Extract
dNTP	desoxiribonucleótidos
DO	Densidad Óptica
DOGC	Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya
Dot/Icm	Defective for organelle trafficking/intracellular multiplication
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganism und Zellkulturen
EIA	Enzymatic Immunoassay (Ensayo Inmunoenzimático)
EWGLI	European Working Group for <i>Legionella</i> Infection
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization (Hibridación Fluorescente <i>In Situ</i>)
Fwd.	Forward

Abreviaturas

GSP	Glutamate Starch Pseudomonas
GVPC	Gentamicina, Vancomicina, Polimixina, Cicloheximida
HTCO	High Temperature Catalytic Oxidation
IFA	Indirect Fluorescent Antibody
ISO	International Organization for Standardization
LB	Lysogeny Broth
LLAP	<i>Legionella</i> -like amoeba pathogen
NTU	Nephelometric Turbidity Unit
pb	Par de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Plate Count Modified Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis (Electroforésis en Campo Pulsante)
ppm	Partes por millón
Rev.	Reverse
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorfisms
RITE	Reglamento de Instalaciones Térmicas en los Edificios
SG	Serogrupo
SN-PCR	Semi Nested PCR (PCR semianidada)
TBE	Tris Borate EDTA
TE	Tris-EDTA
ufc	Unidades formadoras de colonia
UK	United Kingdom (Reino Unido)
uma	Unidad de masa atómica
UNE	Una Norma Española
USA/EUA	United States of America
WHO/OMS	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)