Identificación de condiciones favorables para la multiplicación de *Legionella* de una instalación de interés económico.

García Montero Majela[1*];
González Sosa Nibaldo[1];
Franco Villavicencio Humberto[1].

(1) Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil. Laboratorio de *Legionella*. Mayabeque. Cuba, majelagm@infomed.sld.cu

Legionella pneumophila **es el agente causal de la Enfermedad de los Legionarios, infección respiratoria con alto índice de mortalidad. Esta bacteria es ubicua en ambientes acuáticos, pero constituye un riesgo al colonizar redes hidráulicas y sistemas de clima. Este estudio se trazó como objetivo comprobar las vulnerabilidades para la presencia de dicha bacteria en una instalación de interés económico. Se realizó la identificación de los sitios de riesgos para la multiplicación y diseminación de *Legionella* mediante la revisión *in situ* de todos los componentes del sistema hidráulico y de climatización de la instalación. Se procesó un total de 9 muestras de agua por el método de concentración por filtración y siembra en medio BCYE. La identificación se realizó por la técnica de aglutinación con látex para diferentes serogrupos y especies. El estudio arrojó 6 puntos críticos de riesgo, de los cuales, el depósito de agua caliente, el tanque de compensación del agua a temperatura ambiente y los jacuzzis presentaron potencialidades significativas como nichos de este género. Se comprobó la presencia de *L. pneumophila*, serogrupo 1 en dos sitios de riesgos de la instalación así como la existencia de condiciones propicias para la multiplicación de *Legionella*. El estudio posibilitó alertar a autoridades competentes para tomar acciones de control oportunamente para la prevención de la ocurrencia de casos de la enfermedad.**

Palabras clave: Legionella pneumophila**, sitios de riesgos, condiciones favorables, serogrupos.**

I. INTRODUCCIÓN

La familia Legionellaceae incluye un único género, *Legionella*, que agrupa cerca de 50 especies diferentes y un total de unos 70 serogrupos distintos. De todas las especies se destaca por su mayor patogenicidad *Legionella pneumophila*, agente causal de la Legionelosis con dos manifestaciones clínicas bien distinguidas: forma neumónica, conocida como Enfermedad de los Legionarios y un cuadro gripal denominado Fiebre de Pontiac (1, 2 y 3). Otras especies importantes del género *Legionella* son: *Legionella micdadei, Legionella bonzemanii, Legionella longbeache o Legionella dumoffii* (4).

Las especies bacterianas de este género son ubicuas en diferentes nichos naturales, principalmente acuáticos (lagos, ríos, aguas termales, entre otros). Sin embargo, la mayor parte de los casos de Legionelosis se asocian a ambientes acuáticos creados o manipulados por el hombre (industrias, hospitales, centros recreativos), dado a que desde estos reservorios naturales la bacteria pasa a colonizar diversos sistemas de agua artificiales donde se reúnen diversos factores que favorecen su multiplicación pudiendo alcanzar concentraciones infectantes (1).

A partir de estos lugares la bacteria pueden alcanzar otros puntos del sistema en los que, si existe un mecanismo productor de aerosoles, esta puede dispersarse en esta forma. Las gotas de agua conteniendo la bacteria o vesículas con bacterias (provenientes de los protozoos) pueden permanecer suspendidas en el aire y penetrar en las vías respiratorias alcanzando los pulmones. Se han descrito como principales fuentes de infección los sistemas de clima (torres de enfriamientos), sistema hidráulico especialmente de agua caliente (tanques acumuladores, grifos y duchas), jacuzzis y bañeras de hidromasajes, entre otros (5, 6, 7 y 8).

El estudio realizado se trazó como objetivo comprobar las vulnerabilidades que presenta una instalación de interés económico, edificada antes del triunfo de la Revolución que conserva casi en su totalidad de su red hidráulica original, para la presencia de bacterias del género *Legionella*.

II. MÉTODO

Se realizó la identificación de los sitios de riesgos para la multiplicación y diseminación de *Legionella*, mediante una revisión *in situ* de todos los componentes del sistema hidráulico y de climatización de la instalación. Para ello se midieron parámetros físico-químicos del agua que pudieran aportar condiciones favorables para su multiplicación como temperatura, pH y cloro residual. Además se evaluaron las condiciones de limpieza de estos elementos.

Se tomaron un total de seis (6) muestras de agua, tres (3) de agua caliente y tres (3) de agua a temperatura ambiente (A.T.A), además de tres hisopados para estudio microbiológico. Las muestras de agua fueron concentradas por filtración (filtros NALGENE de nitrocelulosa, 0.45µm), después de sembrar una alícuota de forma directa. Los filtros fueron cortados asépticamente, agitados vigorosamente y sometidas finalmente a un tratamiento ácido en una solución 1:9 HCl / KCl pH 2.2 por 5 min. Para el caso del hisopado, luego de sembrar una alícuota de forma directa, fue sometido a tratamiento térmico a 50 ^{0}C por 30 min. La siembra se realizó por espátula de Drigalsky mediante la inoculación de 100 µL en medio BCYE con suplemento GVPC, utilizando duplicados por cada método (siembra directa, siembra de los productos concentrados y de los productos concentrados tratados). Los cultivos se incubaron a 37 ^{0}C y se observaron durante 14 días (9).

Aquellas colonias crecidas después de las 48 h que presentaran características culturales descritas para el género *Legionella* (4) fueron aisladas y sembradas en medio libre de L-cisteína (Agar Nutriente).

La identificación se realizó por la técnica de aglutinación en látex del estuche comercial dry SPOT (OXOID) para *L. pneumophila*, serogrupo 1, serogrupos 2-14 y *Legionella spp*.

III. RESULTADOS

A. Sitios de riesgos

Se identificaron cuatro (4) sitios de riesgos que componen tanto el sistema hidráulico como el de clima de la instalación. Los componentes de la red de agua caliente, de la red de agua fría, filtros de los grifos y cabezas de duchas y fan coils. El sistema de clima fue evaluado satisfactoriamente durante la inspección. Se verificó la protección con biocida y la limpieza de las bandeja. En la tabla 1 se relacionan los mismos y los valores obtenidos de las mediciones de los parámetros físico-químicos de las muestras de agua colectadas.

Tabla 1. Sitios de riesgos. Parámetros físico-químicos de las muestras colectadas.

Sitios de Riesgos	**Muestras**	**Tipo de agua**	**Temperatura (^{0}C)**	**pH**	**Cloro (ppm)**
Grifos y Duchas	Habitación 212	Agua caliente	45,4	7,6	0,3
	Habitación 207	Agua caliente	45,3	7,6	0,3
Red de agua caliente	Tanque de sala de máquina	Agua caliente	48,0	7,7	0,3
Red de agua fría	Tanque de azotea.	A.T.A	28,0	7,8	0,7
	Tanque compensación azotea (reserva)	**A.T.A**	**28,0**	**8,2**	**0**
	Cisterna	A.T.A	28,0	7,7	0,7

En el depósito de agua caliente de la sala de máquina se observó una temperatura inferior a los 55 ^{0}C. Además de obstrucción de la válvula de drenaje inferior, mal estado, falta de mantenimiento, así como largos períodos sin realizar limpieza y desinfección al mismo. Estas condiciones de estancamiento del agua y acumulación de sedimientos y temperaturas óptimas de crecimiento para la bacteria contribuyen a la multiplicación de la misma y constituyen importantes factores de riesgos (10, 11).

Hacemos notar que la mayoría del sistema hidráulico del hotel data del pasado siglo y no ha sufrido renovaciones ni acciones de limpieza, desincrustación y desinfección, por lo que existe una abundante acumulación de sedimentos de origen orgánico y mineral, fuentes de nutrientes para la multiplicación de microorganismos, ente ellos del género *Legionella*. Evidencias observadas durante la inspección a los filtros de los grifos de lavamanos, cabezas de duchas y un jacuzzi donde se apreciaron numerosas incrustaciones, por lo que se colectaron tres hisopados para análisis en el laboratorio.

B. Estudio microbiológico

Se obtuvo un total de siete (7) aislamientos con características culturales sugestivas al género *Legionella* (colonias blancas, bordes regulares y rosados, aspecto de vidrio cortado), de los cuales solo tres no crecieron en Agar Nutriente (medio libre de L-cisteína). Estos tres aislamientos resultaron positivos a la aglutinación por látex del test empleado, identificándose como *Legionella pneumophila* serogrupo 1. Los aislamientos positivos representan un 22,2 % de positividad (Fig.1) y provienen, uno de ellos del

tanque de compensación ubicado en la azotea y dos al hisopado de los grifos de chorros del jacuzzi de una habitación, resultando finalmente estos dos sitios positivos a la presencia de dicho microorganismo (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del estudio microbiológico de las muestras.

Nº	Origen	Característica	Resultado
1	Habitación 212	Agua caliente	Negativo
2	Habitación 207	Agua caliente	Negativo
3	Tanque de sala de máquina	Agua caliente	Negativo
4	Tanque de azotea.	A.T.A	Negativo
5	Tanque compensación azotea (reserva)	A.T.A	**Positivo**
6	Cisterna	A.T.A	Negativo
7	Habitación 412	Hisopado	Negativo
8	Jacuzzi Habitación 316	Hisopado	**Positivo**
9	Habitación 316	Hisopado	Negativo

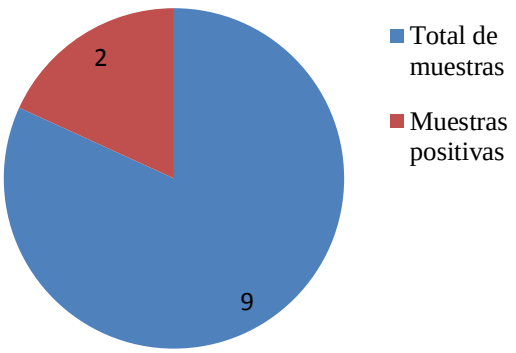

Fig. 1 Número de muestras positivas del estudio microbiológico.

La presencia de *Legionella pneumophila*, en el tanque de compensación es una consecuencia de las condiciones de almacenamiento en las que se encontraba el agua en el mismo. Como se mostró anteriormente en la tabla 1, se observó un valor nulo de cloro y pH alcalino en el agua, parámetros químicos cuyos valores favorecen el crecimiento de *Legionella spp*.

Las concentraciones oscilaron entre las 30 UFC/cm^2 para el caso del hisopado en el jacuzzi y 200 UFC/L en el tanque. Aunque las concentraciones apreciadas en ambos casos son bajas según, la presencia de la bacteria en ambos sitios de riesgo es un indicador de la existencia de condiciones favorables para su multiplicación y puede representar un riesgo para la colonización de las redes de la instalación.

De no tomarse acciones inmediatas de control estas concentraciones pueden continuar aumentando hasta alcanzar cifras infectantes.

Cuando se hallan problemas en el mantenimiento del sistema hidráulico, así como pobre control de la temperatura del agua, estancamiento de la misma por largos períodos, concentraciones por debajo de lo indicado (0,3 ppm) de cloro residual u otro desinfectante, en conjunto con al menos una sola muestra positiva a *Legionella spp* a bajas concentraciones ≤ 1000 UFC/L, se plantea como posible evidencia y fuente de contaminación dicho lugar de un brote de la enfermedad (12).

IV. CONCLUSIONES

Se comprobó la presencia de *L. pneumophila*, serogrupo 1 en dos sitios de riesgos de la instalación demostrándose la existencia de condiciones propicias para la multiplicación de *Legionella* en depósitos de agua, componentes de redes de agua y sus elementos terminales.

El estudio realizado posibilitó alertar a las autoridades competentes para la toma oportuna de acciones de control para la prevención de la ocurrencia de casos de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. 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. Appl Environ Microbiol. 1998; 64(9):3127–3133.

2. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(3):506–526.

3. Hilbi H, Jarraud S, Hartland E, Buchrieser C. Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control. Mol Microbiol. 2010; 76(1):1–11.

4. Pérez Monrás M. F. Legionelas. En: Valdés-Dapena M, Llop A., Zuazo J. L. Microbiología y parasitología médicas. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2004. Tomo I. p.325-332.

5. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2011—reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC, 2011.

6. Stanca, V., Johnston, R., Iqbal, Z., Rehman, Y., Knapper, E., Robinson, S., *et al*. An outbreak of Legionnaires' disease associated with a display spa pool in retail premises, Stoke-on-Trent, United Kingdom, July 2012. Euro Surveill. 2012; 17 (37).

7. Ulleryd, P., Hugosson, A., Allestam, G., Bernander, S., Claesson, B. E., Eilertz, I., *et al*. Legionnaires' disease from a cooling tower in a community outbreak in Lidkoping, Sweden- epidemiological, environmental and microbiological investigation supported by meteorological modelling. BMC Infectious Diseases. 2012; 12, 313.

8. Borella P., Montagna M.T., Stampi S., Stancanelli G., Romano-Spica V., Triassi M., *et al*. Legionella contamination in hot water of Italian hotels. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(10):5805–5813.

9. ISO 11731–2: Water quality—Detection and enumeration of Legionella —Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts criteria.

10. Ryu S., Yang K., Chun B.C. Community-acquired Legionnaires' Disease in a Newly Constructed Apartment Building. 2017. Prev Med Public Health. 2017; 50(4):274-277.

11. Sepin Özen N., Tuğlu Ataman, Emek M. Exploring the Legionella pneumophila positivity rate in hotel water samples from Antalya, Turkey. 2017; Environ Sci Pollut Res Int. 2017; 24(13):12238-12242.

12. CDSC. Commun Dis Rep CDR Wkly 1996; 6:65.