



Cuba Salud

IV Convención
Internacional de Salud
17-21 de octubre, 2022

ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE LEGIONELLA EN INSTALACIONES

Nibaldo Luis González Sosa¹, Reinier Gómez Hernández¹

Gretel Susana Pérez Bartutis¹

Glenda Rodríguez Otaño¹

¹ Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil, Mayabeque, Cuba, reiniergh1998@gmail.com; madeniba@infomed.sld.cu

Resumen: La inhalación de aerosoles contaminados con *Legionella pneumophila*, producto de la colonización de redes hidráulicas y sistemas que utilizan agua, representa un peligro para la salud de los individuos expuestos y suelen tener un impacto negativo económico social, para las instalaciones involucradas. El principal objetivo fue determinar la presencia de Legionella en posibles reservorios ambientales y demostrar la existencia de factores de riesgo para su multiplicación en ecosistemas acuáticos construidos por el hombre. Para ello se estudiaron 73 muestras de sitios de riesgo en 5 instalaciones en el periodo 2019 -2020, las mismas fueron tomadas del agua caliente de redes de distribución e hisopadas de grifos y duchas. Los especímenes fueron procesados por cultivos microbiológicos, observados durante 14 días y las colonias sugestivas se identificaron por aglutinación en látex. De esta forma se demostró presencia de la bacteria en el 16,4 % de las muestras, con predominio de la especie *L. pneumophila*. En 3 de las muestras estudiadas se identificaron otras especies de Legionella diferentes a *L. pneumophila*. Los grifos y duchas predominaron entre los reservorios de riesgo, precedidos de los depósitos de agua caliente. En los cultivos se contabilizaron concentraciones microbianas desde 102 hasta 105 UFC/L. Se identificaron como factores de riesgo predisponentes a la contaminación, elementos físico químicos como la temperatura y bajas concentraciones de cloro en el agua, así como factores nutricionales caracterizados por la presencia de biopelículas. El estudio microbiológico de las muestras ambientales y la identificación oportuna de potenciales reservorios en las instalaciones posibilitó la detección oportuna de la bacteria, la aplicación de medidas para el control de la contaminación y la prevención de brotes de la Enfermedad de los Legionarios.

Palabras clave: Legionella pneumophila, reservorios, biopelículas, agua con legionella.

I. INTRODUCCIÓN

En 1977 se produjo el aislamiento de una bacteria no descrita ni relacionada genéticamente con ningún otro patógeno conocido hasta el momento, asociada al grave y explosivo brote de enfermedad respiratoria aguda, sobrevenido en 1976 durante la celebración de la Convención por el 58 Aniversario de la Legión Americana en Philadelphia⁽¹⁾. La bacteria que provocó el brote se denominó *Legionella pneumophila* y se llamó “Enfermedad de los Legionarios” (EL) a la entidad nosológica⁽²⁾. Este hecho constituyó un indicio, de que aún hoy a pesar de los indiscutibles avances científicos y del conocimiento acumulado, en la lucha contra las enfermedades infecciosas, la humanidad se expone a nuevos peligros que provienen del invisible ejército de los microorganismos.

Legionella pneumophila actualmente se ubica entre los principales responsables de neumonías nosocomiales y entre los tres primeros agentes que causan neumonía adquirida en la comunidad^(3,4).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que en 1998 hubo 1 442 casos de infección por *Legionella* en residentes europeos⁽⁵⁾. Estudios realizados sobre la incidencia del patógeno en Europa y América del Norte sugieren que es responsable del 2 al 15 % de las hospitalizaciones por neumonías adquiridas en la comunidad.^(6, 7) En EE.UU se estima que el número de casos de legionelosis al año oscila entre 25 000 y 50 000, con más de 50 brotes independientes⁽⁸⁾.

La incidencia de la enfermedad en los países de América Latina y el Caribe es imprecisa y los pocos casos de infección por *Legionella* registrados se deben a turistas o naturales diagnosticados en Europa⁽⁵⁾, a pesar de ser una bacteria muy ubicua que tiene como reservorio natural predominante al agua y como reservorio desde el punto de vista epidemiológico los sistemas de agua caliente⁽⁸⁾, lo cual evidencia un subregistro de la incidencia de legionelosis en estos países.

En la actualidad la aplicación de estudios de microbiología clínica y ambiental, combinados con aspectos de la ingeniería sanitaria permiten conocer con mayor claridad la interrelación que existe entre los factores ambientales y patogénicos de la enfermedad, así como reconocer las causas principales de la proliferación y diseminación de la bacteria, que intervienen en la cadena de transmisión y sobre los que el hombre puede actuar para prevenir la enfermedad o controlar su incidencia.

II. MÉTODO

Se realizó un estudio prospectivo longitudinal en 5 instalaciones de uso recreativo, inspeccionadas por el Grupo de Trabajo de *Legionella* de DAVIHLAB en el 2019 y 2020. Para determinar la presencia de microorganismos del género *Legionella* se tomaron 73 muestras de diferentes sitios previamente identificados como reservorios potenciales para este patógeno, según lo planteado por la OMS y lo estipulado por el Ministerio de Salud Pública de Cuba, para la prevención de *Legionella* en instalaciones. Se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos para cada muestra:

- Sitio de origen (por ejemplo: grifos, duchas, depósitos de agua caliente, etc.)
- Tipo de muestra, clasificadas como agua caliente (AC), agua a temperatura ambiente (ATA) e hisopado (H)
- Parámetros físico-químicos del agua (temperatura, pH, cloro libre, presencia de lodos o residuos de óxido, etc.)

Los elementos antes descritos se correlacionaron posteriormente con los resultados de los hallazgos microbiológicos de especies y serogrupos identificados de *Legionella*

pneumophila (serogrupo 1 o serogrupos 2-14) y *Legionella* spp., así como con la concentración del microorganismo.

Las muestras fueron procesadas según lo establecido en la ISO 11731:2017 ⁽⁹⁾. Se seleccionaron como potenciales sitios de riesgo para el estudio: grifos y duchas terminales de redes hidráulicas 44, depósitos de agua caliente 25, fuentes ornamentales 1, piscinas 1, jacuzzis 2. El procesamiento de las muestras se realizó por tres métodos diferentes (siembra directa, muestra concentrada con tratamiento ácido y muestra concentrada sin tratamiento). Los cultivos se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda y se observaron durante 14 días. Finalmente se contaron las colonias sugestivas y se identificaron.

1.1. Recolección de las muestras.

Las muestras fueron recolectadas en frascos estériles, secos, con cierre hermético y embalajes adecuados para evitar rotura en el traslado. El mismo se efectuó a temperatura ambiente. El procesamiento se realizó entre 24 - 48 h de tomadas las muestras. Se garantizó el almacenamiento entre 6 y 8 °C.

1.1.1. Concentración Por Filtración.

Las muestras de agua se concentraron por filtración (filtros de 0,45 µm de acetato de celulosa, NALGENE). Las membranas de filtración se extrajeron de los portafiltros, se seccionaron en condiciones asépticas y se resuspendieron en un volumen de 10 mL de agua de la misma muestra en estudio. Se agitaron a 2500 rpm durante 1 minuto ⁽⁹⁾.

1.1.2. Tratamiento Ácido.

Se realizó una mezcla de 1 mL del concentrado de la muestra (descrito en el acápite 3.4.1) con 1 mL de una solución previamente preparada a 10X de HCl (Merck)/ KCl (Merck) pH 2,2 durante 5 minutos ⁽⁹⁾.

4.2.3 Inoculación de medios de cultivo.

Se realizó la siembra de medios BCYE suplementado con GVPC mediante la inoculación de 0,1 mL de la muestra de forma directa, del concentrado tratado (C/Tto) y sin tratar (CSTto), por triplicado. La siembra se realizó mediante espátula de Drigalsky ⁽⁹⁾. Las placas inoculadas se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda durante 14 días. Se realizó control de esterilidad de los medios utilizados, mediante la incubación a 37 °C por 24 horas del 1 % del total de placas de cada lote.

4.2.4. Identificación.

Para la identificación se seleccionaron tres colonias, en cada una de las placas, crecidas después de 48 h con características culturales similares a las descritas para el género. Las colonias se aislaron en agar BCYE y en agar nutriente (medio sin L-cisteína), se incubaron por 72 h y posteriormente se procedió a la lectura e interpretación de los resultados ⁽¹⁰⁾. La identificación se llevó a cabo por aglutinación en látex con el diagnóstico DR0200M DrySpot *Legionella pneumophila*1, DR0210M DrySpot *Legionella pneumophila* 2-14 y DR0200M DrySpot *Legionella pneumophila* species (OXOID) ⁽⁹⁾.

III. RESULTADOS

Del total de 73 muestras analizadas resultaron positivas 12 (16,43 %). Resaltando los sitios de riesgo correspondientes a los grifos y duchas del sistema de agua caliente con

mayor positividad (75 %) seguidos por los depósitos de agua caliente (25%). En las muestras procedentes de fuentes ornamentales, así como de agua recreativa de piscina y jacuzzis, no se detectó presencia de Legionella. Con relación al tipo de muestra se constató mayor presencia de la bacteria en el agua caliente (91,7%) seguido de los hisopados realizados a los grifos y cabezas de duchas, donde se apreció una sola muestra positiva (8,3%), mientras que en el agua a temperatura ambiente no se observó Legionella. (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras positivas por sitios de riesgo y tipo de muestras. Años 2019-2020.

Variable	Procedencia	Número de positivas
Sitios de Riesgos	Grifos y duchas de habitaciones	9 (75%)
	Depósitos de agua (AC)	3(25%)
	Fuentes ornamentales	0
	Piscina	0
	Jacuzzi	0
Tipo de muestra	Agua caliente	11 (91,7%)
	Agua a temperatura ambiente (ATA)	0
	Hisopado	1(8,3%)

En los sitios de riesgo de las instalaciones estudiadas se observaron condiciones favorables para la multiplicación de la bacteria (Tabla 2), principalmente temperaturas del agua caliente en la red de distribución con valores por debajo de 50 °C en la mayoría de las determinaciones, con un promedio de temperatura inferior a las descritas para prevenir Legionella en todas las instalaciones estudiadas, con excepción de la A, similar comportamiento se apreció con las temperaturas del agua caliente en los depósitos de almacenamiento, con un promedio de temperatura inferior a 60 °C. Las instalaciones D y E mostraron los valores más bajos del agua caliente en los depósitos de almacenamiento. Las concentraciones de cloro se observaron deficientes, por debajo de 0,3 mg/L llegando solo en algunos casos a ese valor mínimo del biocida. A diferencia de los anteriores parámetros los valores de pH se apreciaron entre 7,0 y 7,8 en el 80 % de las mediciones. En un solo caso se observó un valor alto de pH (8,4) correspondiendo a una fuente ornamental.

Tabla 2. Parámetros físico químicos de las muestras positivas de las instalaciones estudiadas (2019-2020).

Instalaciones	Sitio de muestra	Muestras colectadas	Muestras positivas	Intervalos de Temperatura/Promedio	pH	Cloro (mg/L)
A	Depósitos de agua caliente	2	0	61,5-61,8 °C / 61,6 °C	7,7	0
	Grifos y ducha	5	1	39-51,8 °C/49,6 °C	7,2-7,4	0
	Fuentes ornamentales	1	0	28,2 °C	8,4	0
	Piscinas	1	0	39 °C	7.0	2,7
B	Depósitos de agua caliente	6	0	51-52°C/45,16 °C	7,3	0
	Grifos y ducha	8	1	30-49,2 °C/42,6 °C	7,2-7,8	0-0,3
C	Depósitos de agua caliente	1	0	55 °C	7.0	0
	Grifos y ducha	14	3	32,6-50 °C/43,27°C	6,8-7,4	0-0,3
	Jacuzzis	2	0	ND	8.4	0.3
D	Depósitos de agua caliente	10	2	29.8-43°C/38.3 °C	6,8-7,8	0,2-3
	Grifos y ducha	11	3	28,4-54,8 °C/ 42,7°C	6,8-7,5	0,1-0,3
E	Depósitos de agua caliente	6	0	31- 42,2 °C/ 37,5 °C	7,1-7,3	0,1-0,3
	Grifos y ducha	6	2	26-50 °C/ 39,1 °C	7,1-7,7	0,1-0,3

Los hallazgos de la presencia de diferentes especies de *Legionella* y distintos serogrupos de *Legionella pneumophila* se muestran en las Tablas 3 y 4 correspondientes a los períodos analizados. Como se puede apreciar los porcentos de positividad observados en los años 2019 y 2020 fueron similares (16,3 % y 16,6% respectivamente), a pesar de haber un mayor número de muestras positivas en el año 2019 pero en un universo mayor de estudio.

Tabla 3. Resultados del estudio de la presencia de Legionella spp. en los sitios de riesgo 2019.

Instalaciones	Muestras estudiadas	Tipo de muestras	Positivas / %	Especie y concentración (UFC/L)	Sitios positivos
A	8	AC -5 (1+) ATA-1 H-2	1 (12,5)	<i>L. pneumophila</i> Serogupo 1 (200 UFC/L)	Grifos y duchas
B	8	AC-5 ATA-1 H-2 (1+)	1 (12,5)	<i>L. pneumophila</i> Serogupo 2-14 (10000 UFC/L)	Grifos y duchas
C	9	AC-5 (1+) H- 4	2 (22,2)	<i>Legionella spp.</i> (50 000 UFC/L) <i>Legionella spp.</i> (550 000 UFC/L)	Grifos y duchas Grifos y duchas
D	12	AC-11 (2+) ATA-1	2 (16,6)	<i>L. pneumophila</i> Serogupo 1 (100 UFC/L) <i>L. pneumophila</i> Serogupo 2-14 (100 UFC/L)	Grifos y duchas Depósitos de agua caliente
E	6	AC-6 (1+)	1 (16,6)	<i>L. pneumophila</i> Serogupo 2-14 (10 000UFC/L)	Grifos y duchas
Total	43		7 (16,3)		

Nota: En la columna de tipo de muestra se marcó con el signo + y un número, en correspondencia de la positividad y las especies identificadas.

Tabla 4. Resultados del estudio de la presencia de Legionella spp. en los sitios de riesgo 2020

Instalaciones	Muestras	Tipo de muestra	Positivas / %	Especie y concentración (UFC/L)	Sitio de Riesgo
A	1	AC-1	0	-	-
B	6	AC-5 ATA-1	0	-	-
C	8	AC-6 (+) H-2	1 (12,5)	<i>L. pneumophila</i> Serogruppo 1 (200 UFC/L)	Grifos y duchas
D	9	AC-7 (3+) ATA-1 H-1	3 (33,3)	<i>Legionella spp.</i> (20 000UFC) <i>L. pneumophila</i> Serogruppo 2-14 (10 000UFC) <i>L.pneumophila</i> Serogruppo 2-14 (10 000UFC)	Depósitos de agua caliente Depósitos de agua caliente Grifos y duchas
E	6	AC-6 (+)	1(16,6)	<i>L.pneumophila</i> Serogruppo 1 (800 UFC/L)	Depósitos de agua caliente
Total	30		5 (16,6)		

La instalación correspondiente a la letra C fue en la que se observó un mayor número de positividad en el 2019, además de demostrarse la concentración mayor de bacterias en una muestra (550 000 UFC/L de *Legionella* spp), sin embargo en el 2020 y de manera general en todo el periodo estudiado, la que mostró una mayor presencia de la bacteria fue la instalación representada con la letra D, con 2 muestras positivas en el 2019 (16.6%) y 3 muestras positivas en el 2020 (33.3%) además de observarse concentraciones consideradas de riesgo, con 10 000 UFC/L así como una mayor diversidad de cepas de *Legionella* cohabitando en los sitios de riesgo. En el agua caliente de los depósitos de almacenamiento de la instalación D se identificó *Legionella* spp y *L. pneumophila* S2-14 mientras que en el agua caliente tomada de los grifos y duchas se identificaron aislamientos como *L. pneumophila* S2-14 y *L. pneumophila* S1. En la instalación D se apreciaron además factores físico químicos del agua favorables para la multiplicación de *Legionella*, tales como temperaturas del agua caliente de la red de distribución de la instalación, por debajo de 50 °C (excepto 1 habitación) y en los depósitos de almacenamiento muestreados donde las temperaturas del agua estaban muy por debajo de 60 °C. También se pudo observar que las concentraciones de cloro determinadas en las muestras tenían valores inferiores o en el límite mínimo establecido para prevenir la colonización con la bacteria. Ver Tabla 2.

En las Tablas 5 y 6 se muestran los resultados del recobrado microbiológico y la identificación de los aislamientos de cada muestra por método de tratamiento previo a la siembra. En las mismas se especifica con un (+) el método en el cual fueron detectadas las colonias sospechosas y obtenidos los aislamientos. Como se puede observar el procedimiento de concentrado más tratamiento ácido de las muestras posibilitó un mejor recobrado de la bacteria con relación al procedimiento que no involucró el tratamiento ácido.

Tabla 5. Recobrado e identificación de colonias según método de tratamiento en las muestras trabajadas en el 2019

Instalaciones	Identificaciones positivas	Positividad según métodos de cultivo y tratamiento			Clasificación
		Directo	C/Tto	S/Tto	
A	8	+	+	-	<i>L.pneumophila</i> S1
B	6	-	+	-	<i>L.pneumophila</i> S2-14
C	1	-	+	-	<i>Legionella</i> spp.
	4	+	-	-	<i>Legionella</i> spp.
D	2	-	+	-	<i>L.pneumophila</i> S1
	3	+	-	-	<i>L.pneumophila</i> S2-14
E	1	+	+	-	<i>L.pneumophila</i> S2-14

Tabla 6. Recobrado e identificación de colonias según método de tratamiento en las muestras trabajadas en el 2020.

Instalaciones	Identificaciones positivas	Positividad según métodos de cultivo y tratamiento			Clasificación
		Directo	C/Tto	S/Tto	
C	3	-	+	-	<i>L.pneumophila</i> S1
	2	+	-	-	<i>Legionella</i> spp.
D	3	-	+	-	<i>L.pneumophila</i> S2-14
	5	-	-	+	<i>L.pneumophila</i> S2-14
E	1	+	-	-	<i>L.pneumophila</i> S2-14

En la Figura 1 se representa la relación de serogrupos de *L. pneumophila* y de otras especies no pertenecientes a *L. pneumophila* en las muestras positivas. Se observó predominio de los aislamientos de cepas correspondientes a los serogrupos del 2 al 14 de *L. pneumophila* en un 42 %, seguidos del serogrupo 1 de esa especie (33 %) y en un menor por ciento (25%) *Legionella* spp. diferente a *L. pneumophila*.

25%

Figura 1: Relación de especies y serogrupos de *Legionella* identificados en los aislamientos de muestras positivas. Años 2019-2020.

En la Tabla 7 se enumeran las concentraciones observadas en las muestras positivas, los conteos de colonias oscilaron entre 100 UFC/L y 550 000 UFC/L. En el 50 % de las muestras positivas se contabilizaron concentraciones altas de la bacteria ($\geq 10\ 000$ UFC/L).

Tabla 7. Concentraciones de *Legionella* observadas en las muestras positivas procedentes de los sitios de riesgo. Años 2019 -2020.

Concentración de <i>Legionella</i>	1000 < 10 000 UFC/L	4(33,3%)
	$\geq 10\ 000$ UFC/L	6 (50 %)
	100 < 1000 UFC/L	5(41,7%)

IV. CONCLUSIONES

1. Se comprobó la presencia de *Legionella* en reservorios ambientales de las instalaciones estudiadas.
2. Predominó en los aislamientos identificados *Legionella pneumophila*, en particular los serogrupos 2-14. Otras especies de *Legionella* fueron identificadas.
3. Se demostró existencia de factores de riesgo, que permiten la supervivencia, multiplicación y colonización de *Legionella*. El incumplimiento de la temperatura del agua caliente fue el principal factor de riesgo encontrado y predominaron los grifos y duchas como los reservorios con mayor presencia del microorganismo.
4. La detección temprana de los factores de riesgo y de la presencia de la bacteria permitió adoptar medidas de control en las instalaciones para prevenir la ocurrencia de casos de Legionelosis.

V. REFERENCIAS

1. Fraser DW, Tsai T, Orensterin W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharar RG, Harris J, et al. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. N. Eng. J. Med. 1977; 297:1189-97.
2. McDade JE. Legionnaires' disease 25 years later: lessons learned. En: Marre R, Kwaik YA, Bartlett C, Cianciotto N, Fields BS, Frosh M, Hacker J, Lück PC, editors. Legionella. Washington DC: ASM Press; 2001. p. 1-10.
3. Stout JE, Yu VL, LEGIONELLOSIS. N. Eng. J. Med. 1997; 337 (10): 682-87.
4. Fiore AE. (CDC). Epidemic Legionnaires' disease two decades later: old sources, new diagnostic methods. Clin Infect Dis. 1998; 26 (2): 426-33
5. WHO (World Health Organization). Epidemiology, prevention and control of legionellosis. Memorandums from a WHO meeting. 1990. Bulletin of the WHO, 68 (2): 155-164.
6. Muder RR, Yu VI, Fang GD. Community acquired Legionnaires' disease. Semi Respir Infect. 1989; 4: 32-9
7. Marston BJ, Plouffe JF, Breiman RF. Preliminary findings of a community based pneumonia incidence study. In Barbaree JM, Breinman RF, Doufor AP, eds. Legionella: current status and emerging perspectives. Washington, DC.: American Society of Microbiology. 1993: 36-7.
8. Benenson A.S. Manual para el control de las enfermedades transmisibles. OPS. Publicación Científica. Decimosexta edición. 1997; 564: 283-85.
9. International Standards Organization, ISO. Water quality- Detection and enumeration of Legionella. Norma ISO 11731. 2017.
10. Haluk Erdogan, and Hande Arslan , Colonization of Legionella Species in Hotel Water Systems in Turkey . Journal of Travel Medicine, Volume 14, Issue 6, 2007, 369-373.