



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Tesis doctoral

**Efectividad a largo término de la temperatura
como método de control de *Legionella*
en agua caliente sanitaria**

Laura Gavaldà Mestre

Director y tutor de la tesis:
Dr. Miquel Sabrià Leal

Programa de Doctorado en Medicina
Facultad de Medicina
Departamento de Medicina

Barcelona, 2016



Universitat Autònoma de Barcelona

El **Dr. Miquel Sabrià Leal**, Catedrático de la Universitat Autònoma de Barcelona y Consultor senior de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

HACE CONSTAR

Que el trabajo y la redacción de la memoria de tesis titulada

Efectividad a largo término de la temperatura como método de control de *Legionella* en agua caliente sanitaria

Ha sido realizada por Laura Gavalda Mestre y considera que es apta para el trámite de lectura y defensa pública delante de un tribunal para optar al grado de Doctora por la Universitat Autònoma Barcelona.

Y para que quede constancia, firma este documento en Badalona, el 8 de noviembre de 2016.

Dr. Miquel Sabrià Leal

A Teresa i Jaume,
els meus pares.

*¿Puede haber una mayor contradicción que una enfermedad adquirida en un hospital?
¡Una enfermedad contraída en el lugar donde se espera acabar con lo que se tiene!
Y, sin embargo, esta es la consecuencia de los grandes hospitales.*

Johann Peter Frank
Padre de la higiene moderna
(1745-1821)

After all, tomorrow is another day!

Vivien Leigh as Scarlett O'Hara

Gone with the wind (1939)

Agradecimientos

Extrañamente, una médica que conoce de tuberías y montantes, de aljibes y acumuladores, de acometidas, impulsiones y retornos... y de la diversidad de vida que en todos ellos se esconde. Quizás es ahora un buen momento para recordar que, cuando terminé la carrera de medicina, ni en mis mejores fantasías imaginé que algún día podría dedicar tantas horas a estos lances. Y sin embargo, así ha sido. En este atípico recorrido profesional y vital fueron cristalizando dos bellas oportunidades. Primero, el poder plasmar conocimiento y experiencia en forma de tesis doctoral. Y segundo, pero no menos importante, el compartir vivencias con personas de una calidad humana y unas competencias profesionales excepcionales. Va por vosotros.

Mi más especial agradecimiento al Dr. Miquel Sabrià, mi director de tesis. Dicen que el alumno encuentra a su maestro cuando está preparado, y creo que, en mi caso, así fue. Son muchas las cosas que guardo en mente y corazón, pero me quedo sobretodo con la sensación de ligereza y sana energía con la que salía de tu despacho y la confianza en que todo iba a salir bien. Sólo los hombres sabios pueden transmitir ese bienestar.

Al Dr. Guillermo Bardají, Director de Servicios Generales y la Dra. Berta Ortiga, Subgerente del Hospital Universitari de Bellvitge. Quiero agradeceros vuestro soporte institucional para la elaboración y divulgación de los resultados de esta tesis y la confianza que siempre habéis mostrado en mi quehacer profesional.

A Mercè de Simon, M. Rosa Jané, M. Dolors Ferrer y Teresa Pellicer, del Servicio de Microbiología del Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona. Años de trajín de muestras y resultados, de poyata, de incubaciones y de criopreservaciones. Gracias a vuestro buen hacer, esta tesis ha podido tomar forma con las máximas garantías de calidad.

Muchos han sido mis compañeros de fatigas en el Hospital Universitari de Bellvitge, pero me siento en la obligación de nombrar primero a Carlos Pérez, maestro industrial y maestro de la vida, la persona que me ha enseñado las "tripas" de una instalación de agua. A pesar de mis preguntas simples y probablemente torpes, nunca pusiste cara de *¿qué hace una chica como tú en un lugar como éste?*, y, pacientemente, me obsequiabas con multitud de croquis a punta de lápiz sin perder la sonrisa y las ganas de explicar.

A los amigos de la Dirección de Servicios Generales del Hospital Universitari de Bellvitge: Josep Vadri, Kima Estévez y Lupe López Valero. Vuestra confianza en mi criterio profesional, vuestra paciencia con mis demandas de papeles y registros y vuestros obsequiosos cafelitos, me han hecho sentir que, con vosotros, me siento como en casa.

A Eloi Crespo y Juan Diego López, de Sahicasa-Higienal. Escobillón en ristre, han sido cientos las muestras de agua y los resultados que han pasado por vuestras manos, siempre con puntualidad y prontitud. Sin vuestro rigor y vuestra profesionalidad, esta tesis no se hubiera llegado a materializar.

A mis amigas de corazón y compañeras de esa rara especialidad llamada Medicina Preventiva y Salud Pública, Montserrat Olona, Irene Barrabeig y Carme Micheo. Montse e Irene: sabéis que fuisteis mi empujón para comenzar y mi hombro amigo para no abandonar. Carme: gracias por las complicidades compartidas. Gracias, sobretodo, por vuestro acompañamiento en los malos momentos y vuestra sincera alegría en los buenos.

A Ramon y a Pol. A mi familia. A mis amigas y amigos. No sabéis cómo os agradezco vuestra paciencia durante mis períodos de ausencia -salpicada de enfurruñamiento- mientras duraba todo esto. Sois lo más importante y os quiero (por si acaso se me había olvidado decíroslo últimamente).

Finalmente, mi último agradecimiento es para vosotros: pacientes sin cara y con múltiples nombres posibles. A lo largo de estos años he intentado no olvidar que, tras cada analítica, tras cada instalación y tras cada decisión, estabais ahí. Sin saberlo, me habéis confiado lo más valioso que toda persona posee: la salud. Gracias.

Índice

Lista de figuras	I
Lista de tablas	III
Lista de abreviaturas y símbolos	V
Uno. Justificación y propósito	1
Dos. Estado actual del tema	5
1. <i>Legionella</i> : el microorganismo	7
1.1. Descubrimiento del género <i>Legionella</i>	7
1.2. Taxonomía	8
1.3. Características morfológicas y fisiológicas	9
1.4. Ciclo de vida y factores de virulencia	11
2. Legionelosis: aspectos clínicos	13
2.1. Mecanismos de transmisión	13
2.2. Formas clínicas y factores de riesgo	15
2.3. Diagnóstico y tratamiento	17
2.3.1. Diagnóstico clínico	17
2.3.2. Diagnóstico de laboratorio	18
2.3.3. Tratamiento	19
3. La legionelosis como problema de salud pública	20
3.1. Epidemiología de la legionelosis	20
3.2. Brotes de legionelosis nosocomial: características e implicaciones	24
3.3. Aportación de la tipificación molecular de <i>Legionella</i>	27
3.3.1. MAb	27
3.3.2. PFGE	27
3.3.3. SBT	28
3.3.4. AFLP	28
4. Ecología de <i>Legionella</i> y su papel en el control ambiental	30
4.1. Fuentes naturales de <i>Legionella</i>	30
4.2. El biofilm y <i>Legionella</i>	30
4.3. Influencia de la temperatura	34
4.4. Influencia de otros factores físico-químicos	36
4.5. Bases microbiológicas de la resistencia de <i>Legionella</i> a los métodos de desinfección	38
5. Las instalaciones de agua sanitaria y <i>Legionella</i>	41
5.1. Características de las instalaciones de agua sanitaria	41
5.2. Normativa de aplicación en instalaciones hospitalarias	45
5.3. Controversias en las medidas de prevención de legionelosis relacionadas con las instalaciones	50
5.4. Colonización y persistencia de <i>Legionella</i> en agua sanitaria	54
6. Vigilancia microbiológica de <i>Legionella</i> en el agua de hospitales	56
6.1. Métodos de detección ambiental de <i>Legionella</i>	56
6.2. Papel de la vigilancia microbiológica ambiental en los planes de autocontrol de <i>Legionella</i> en hospitales	57
6.3. Controversias en la metodología de la vigilancia microbiológica de <i>Legionella</i> en el agua de hospitales	58
6.3.1. Principales legislaciones y recomendaciones	58
6.3.2. Criterios de muestreo	60
6.3.3. Número de muestras	60
6.3.4. Método de la toma de muestras	61
6.3.5. Valoración de los resultados	62

7. Métodos de desinfección del agua sanitaria	64
7.1. Clasificación de los métodos de desinfección del agua sanitaria y criterios para evaluar su efectividad	64
7.2. Métodos de desinfección sistémicos en continuo	65
7.2.1. Temperatura del agua caliente sanitaria	65
7.2.2. Otros métodos aplicados al agua caliente sanitaria	68
7.2.3. Cloración del agua fría en hospitales	71
7.3. Métodos de desinfección de choque	72
7.3.1. Choque térmico	72
7.3.2. Choque de cloro	73
7.4. Métodos de desinfección focales o terminales	73
7.4.1. Luz ultravioleta	74
7.4.2. Filtros bacterianos	74
7.5. Tolerancia de las instalaciones a los métodos de desinfección	75
Tres. Hipótesis y objetivos	77
1. Hipótesis	79
2. Objetivos	80
Cuatro. Material y métodos	81
1. Ámbito del estudio	83
2. Diseño del estudio	84
3. Descripción del lugar del estudio	85
3.1. Descripción arquitectónica y de servicios	85
3.2. Descripción de la instalaciones de agua sanitaria	88
3.2.1. Antecedentes: de las instalaciones originales al inicio del estudio	88
3.2.2. Descripción de los circuitos de agua sanitaria durante el estudio	88
3.2.3. Modificaciones de los materiales de las instalaciones durante el estudio	96
3.2.4. Descripción del sistema de pasteurización en continuo	96
3.3. Plan de autocontrol de <i>Legionella</i> durante el estudio	99
4. Intervención del estudio	100
5. Metodología del análisis microbiológico	101
5.1. Muestreo del agua caliente sanitaria	101
5.2. Procedimiento de la toma de muestras	102
5.3. Procesamiento de las muestras para el análisis de <i>Legionella</i>	102
5.3.1. Aislamiento de <i>Legionella</i> por cultivo	103
5.3.2. Confirmación de las colonias sospechosas	103
5.3.3. Determinación del serogrupo	104
5.3.4. Recuento	104
5.3.5. Criopreservación	104
5.4. Tipificación molecular de los aislados de <i>Legionella</i> por electroforesis de campo pulsante (PFGE)	105
6. Variables de estudio y recogida de datos	106
6.1. Variables de estudio	106
6.1.1. Variables del primer objetivo general	106
6.1.2. Variables del segundo objetivo general	106
6.2. Recogida de datos	107
7. Métodos estadísticos	108
7.1. Análisis descriptivo general	108
7.2. Análisis estadístico aplicado a los objetivos específicos 1 a 4	108
7.3. Análisis estadístico aplicado a los objetivos específicos 5 y 6	109

Cinco. Resultados	111
1. Efectividad de mantener temperaturas elevadas en el agua caliente sanitaria sobre la colonización por <i>Legionella</i>	113
1.1. Descripción general de los puntos de muestreo	114
1.2. Descripción de la temperatura de las muestras	116
1.3. Impacto del aumento de temperatura en instalaciones bien dimensionadas y con recirculaciones adecuadas	119
1.4. Impacto del aumento de temperatura en instalaciones con recirculaciones y/o dimensionamiento no adecuados	121
1.5. Asociación entre gradientes de temperatura y <i>Legionella</i>	123
1.6. Papel de las características de la instalación sobre la colonización por <i>Legionella</i> ..	129
2. Variabilidad genotípica de <i>Legionella</i> en agua caliente sanitaria	134
2.1. Resultados generales	135
2.2. Variabilidad genotípica de <i>Legionella</i> según la instalación	136
2.3. Variabilidad genotípica de <i>Legionella</i> según la temperatura	139
Seis. Discusión	141
1. Consideraciones generales	143
2. Resultados principales de esta tesis	144
2.1. Efectividad de mantener temperaturas elevadas en el agua caliente sanitaria sobre la colonización por <i>Legionella</i>	144
2.2. Variabilidad genotípica de <i>Legionella</i> en agua caliente sanitaria	147
3. Relación de los resultados obtenidos con la evidencia existente	149
3.1. Efectividad de mantener temperaturas elevadas en el agua caliente sanitaria sobre la colonización por <i>Legionella</i>	149
3.2. Variabilidad genotípica de <i>Legionella</i> en agua caliente sanitaria	153
4. Limitaciones	156
5. Implicaciones de los resultados obtenidos	158
6. Futuras líneas de investigación	160
Siete. Conclusiones	161
Bibliografía	165

Lista de figuras

		Página
Figura 1	Fotografía actual del hotel Bellevue Stratford en Filadelfia y cubierta del programa de la convención de veteranos de la Legión Americana celebrada en 1976 en el hotel.	8
Figura 2	Fotografía pseudocoloreada con microscopio electrónico de una forma flagelada de <i>L. pneumophila</i> y tinción de Gram de <i>L. pneumophila</i> de muestra de esputo.	10
Figura 3	Colonias de <i>Legionella</i> después de 3 días (a) y 7 días (b) de incubación en medio BCYE, vistas a través de de microscopio de disección.	10
Figura 4	Representación del ciclo intracelular de <i>Legionella</i> en un macrófago.	12
Figura 5	Representación gráfica de la ruta de diseminación de <i>Legionella</i> desde las fuentes naturales hasta el huésped humano.	14
Figura 6	Evolución de las tasas de legionelosis (casos por millón de habitantes) en la Unión Europea por año de notificación.	22
Figura 7	Evolución anual del número de brotes de legionelosis en la Unión Europea y de la media de casos por brote, 2008 – 2012.	22
Figura 8	Evolución de la incidencia de legionelosis en España. Tasas por 100.000 habitantes, 1997-2011.	23
Figura 9	Representación de las fases del ciclo de vida de un biofilm tipo.	31
Figura 10	Fotografía con microscopía electrónica de un espécimen de <i>Hartmannella vermiformis</i> con <i>L. pneumophila</i> en su interior.	34
Figura 11	Niveles de temperatura y comportamiento de <i>Legionella</i> .	35
Figura 12	Tiempo de reducción decimal (D) en minutos de <i>L. pneumophila</i> a diferentes temperaturas.	36
Figura 13	Modelo de los canales de agua según Costerton <i>et al.</i>	39
Figura 14	Esquema genérico del circuito de agua sanitaria.	42
Figura 15	Recorrido y dirección del sistema de distribución de agua caliente sanitaria en una planta de hospitalización tipo.	43
Figura 16	Esquema de grifo de accionamiento automático.	53
Figura 17	Fotografía aérea del recinto del Hospital Universitari de Bellvitge.	85
Figura 18	Fotografía del edificio principal del Hospital Universitari de Bellvitge.	86
Figura 19	Representación sin escala real del edificio principal del Hospital Universitari de Bellvitge con identificación de zonas según criterio arquitectónico.	87
Figura 20	Representación sin escala real del edificio principal del Hospital Universitari de Bellvitge con identificación de zonas según criterio de instalación del agua sanitaria.	89
Figura 21	Diagrama de flujo de de la instalación de agua sanitaria del edificio principal del Hospital Universitari de Bellvitge.	90
Figura 22	Esquema hidráulico de la instalación de agua caliente sanitaria del edificio principal del Hospital Universitari de Bellvitge.	91
Figura 23	Equipo de pasteurizadores de agua caliente sanitaria instalados en el Hospital Universitari de Bellvitge.	98
Figura 24	Esquema de funcionamiento de dos pasteurizadores Pastormaster® (Physis Development, S.L.) simultáneos.	98

Figura 25	Zonas verticales. Temperaturas medias de las muestras y desviaciones estándar para cada semestre de estudio, en el período 1 y el período 2.	118
Figura 26	Zonas horizontales. Temperaturas medias de las muestras y desviaciones estándar para cada semestre de estudio, en el período 1 y el período 2.	118
Figura 27	Zonas verticales. Evolución semestral del porcentaje de muestras positivas para <i>Legionella</i> y del porcentaje de muestras con inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.	120
Figura 28	Zonas horizontales. Evolución semestral del porcentaje de muestras positivas para <i>Legionella</i> y del porcentaje de muestras con inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.	122
Figura 29	Zonas verticales. Curvas ROC entre la temperatura de agua caliente sanitaria en puntos terminales y la ausencia de <i>Legionella</i> .	125
Figura 30	Zonas verticales. Curvas ROC entre la temperatura de agua caliente sanitaria en puntos terminales y la ausencia de inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.	125
Figura 31	Zonas horizontales. Curvas ROC entre la temperatura de agua caliente sanitaria en puntos terminales y la ausencia de <i>Legionella</i> .	126
Figura 32	Zonas horizontales. Curvas ROC entre la temperatura de agua caliente sanitaria en puntos terminales y la ausencia de inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.	126
Figura 33	Distribución de los patrones de <i>L. pneumophila</i> obtenidos por PFGE.	135
Figura 34	Patrones de restricción detectados por PFGE de los aislamientos de <i>L. pneumophila</i> .	135
Figura 35	Distribución de los patrones de restricción detectados por análisis PFGE de los aislamientos de <i>L. pneumophila</i> en zonas altas y zonas bajas.	137
Figura 36	Distribución de los niveles de temperatura en los patrones de restricción detectados por análisis PFGE de los aislamientos de <i>L. pneumophila</i> .	139
Figura 37	Distribución numérica de los dos patrones de restricción detectados por análisis PFGE de los aislamientos de <i>L. pneumophila</i> en relación a la escala de temperatura.	141

Lista de tablas

	Página
Tabla 1	Familia <i>Legionellaceae</i> : especies, serogrupos y patología asociada. 9
Tabla 2	Datos poblacionales de la legionelosis en países con sistemas de vigilancia. 20
Tabla 3	Criterios diagnósticos de legionelosis del European Centre for Disease Prevention and Control (2012). 21
Tabla 4	Criterios diagnósticos de legionelosis del Centro Nacional de Epidemiología (2013). 21
Tabla 5	Brotos de legionelosis comunitarios y nosocomiales. Evolución temporal, casos y fallecidos, 1999-2011. 24
Tabla 6	Clasificación y características de las griferías utilizadas en instalaciones hospitalarias. 44
Tabla 7	Ventajas e inconvenientes de los materiales utilizados en los sistemas de distribución del agua en edificios hospitalarios. 45
Tabla 8	Principales actuaciones preventivas en los sistemas de agua sanitaria y su periodicidad, de acuerdo con el RD 865/2003. 47
Tabla 9	Principales guías y documentos técnicos de prevención de legionelosis en instalaciones de riesgo en países europeos y en EEUU. 48
Tabla 10	Requerimientos en los niveles de temperatura y acciones para minimizar el estancamiento de agua en las principales guías técnicas europeas específicas para el control de legionelosis. 49
Tabla 11	Requerimientos de temperatura en las instalaciones de agua caliente sanitaria indicados por organismos de EEUU, los CDC y la OMS. 50
Tabla 12	Guías técnicas y legislaciones que incluyen recomendaciones específicas sobre vigilancia microbiológica de <i>Legionella</i> en las aguas de hospitales. 59
Tabla 13	Comparación de los criterios de la vigilancia microbiológica ambiental en hospitales. 59
Tabla 14	Indicadores de la actividad asistencial en el área de hospitalización del Hospital Unversitari de Bellvitge. Período 2005 – 2014. 83
Tabla 15	Descripción de la distribución de los circuitos de agua caliente sanitaria y agua fría y sus áreas de alimentación. 90
Tabla 16	Descripción de los circuitos de agua caliente sanitaria y áreas de alimentación en zonas horizontales. 95
Tabla 17	Descripción de los criterios de muestreo durante el período de estudio. 101
Tabla 18	Descripción de los puntos periféricos de toma de las muestras analizadas durante el período de estudio. 114
Tabla 19	Zonas verticales. Comparación de las características de los puntos de muestreo según el período de estudio. 115
Tabla 20	Zonas horizontales. Comparación de las características de los puntos de muestreo según el período de estudio. 116
Tabla 21	Zonas verticales. Temperaturas de las muestras analizadas según el período de estudio. 117
Tabla 22	Zonas horizontales. Temperaturas de las muestras analizadas según el período de estudio. 117

Tabla 23	Zonas verticales. Resultados de las muestras analizadas según el período de estudio.	119
Tabla 24	Zonas verticales. Parámetros del análisis de regresión lineal segmentada del impacto de aumentar la temperatura mínima a 55°C sobre el porcentaje semestral de muestras positivas.	121
Tabla 25	Zonas horizontales. Resultados de las muestras analizadas según el período de estudio.	122
Tabla 26	Zonas horizontales. Parámetros del análisis de regresión lineal segmentada del impacto de aumentar la temperatura mínima a 55°C sobre el porcentaje semestral de muestras positivas.	123
Tabla 27	Zonas verticales. Resultados de las muestras según los niveles de temperatura.	124
Tabla 28	Zonas horizontales. Resultados de las muestras según los niveles de temperatura.	124
Tabla 29	Parámetros de la curva ROC en zonas verticales y zonas horizontales entre temperatura y la ausencia de <i>Legionella</i> y de inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.	127
Tabla 30	Zonas verticales. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos del punto de corte $< 55^\circ\text{C}$ para muestras positivas de <i>Legionella</i> y para inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.	128
Tabla 31	Zonas horizontales. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos del punto de corte $< 55^\circ\text{C}$ para muestras positivas de <i>Legionella</i> y para inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.	128
Tabla 32	Resultados de los modelos de regresión logística para describir la relación entre el aislamiento de <i>Legionella</i> y la temperatura como variable continua.	129
Tabla 33	Zonas verticales. Descripción de las temperaturas de las muestras según los factores relacionados con la instalación.	130
Tabla 34	Zonas horizontales. Descripción de las temperaturas de las muestras según los factores relacionados con la instalación.	130
Tabla 35	Zonas verticales. Resultados de las muestras según los factores relacionados con la instalación.	131
Tabla 36	Zonas horizontales. Resultados de las muestras según los factores relacionados con la instalación.	132
Tabla 37	Zonas horizontales. Análisis de regresión logística para describir la relación entre el aislamiento de <i>Legionella</i> , nivel de temperatura y factores de la instalación de ACS.	133
Tabla 38	Zonas horizontales. Análisis de regresión logística para describir la relación entre inóculos de <i>Legionella</i> $\geq 10^3$ UFC/L, nivel de temperatura y factores de la instalación de ACS.	133
Tabla 39	Descripción de los aislamientos obtenidos en ZV-ZA: año de obtención y temperatura de la muestra, serogrupo de <i>L. pneumophila</i> y patrón obtenido por PFGE.	136
Tabla 40	Descripción de los aislamientos obtenidos en ZV-ZB: año de obtención y temperatura de la muestra, serogrupo de <i>L. pneumophila</i> y patrón obtenido por PFGE.	137
Tabla 41	Descripción de los aislamientos obtenidos en ZH-ZB: año de obtención y temperatura de la muestra, serogrupo de <i>L. pneumophila</i> y patrón obtenido por PFGE.	138
Tabla 42	Descripción de la temperatura de las muestras según los patrones de restricción de <i>L. pneumophila</i> A+a y B obtenidos por PFGE.	139

Lista de abreviaturas y símbolos

ACS	Agua caliente sanitaria
AF	Agua fría
AFCH	Agua fría de consumo humano
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
APIC	Association for Professionals in Infection Control
ASHE	American Society for Healthcare Engineering
ASHRAE	American Society of Heating, Refrigerating, Air-Conditioning Engineers
ATS	American Thoracic Society
AWT	Association of Water Technologies
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
BHI	Brain Heart Infusion Broth
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cm ²	Centímetro cuadrado
D	Tiempo de reducción decimal
DE	Desviación estándar
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EEUU	Estados Unidos de América
EIA	Enzimoimmunoanálisis
<i>et al.</i>	y colaboradores
EWGLI	European Working Group for <i>Legionella</i> Infections
FLA	Formas libres de ameba
HUB	Hospital Universitari de Bellvitge
IC 95%	Intervalo de confianza al 95%
ICT	Inmuncromatografía
IDSA	Infectious Diseases Society of America
L	Litro
<i>L. longbeacheae</i>	<i>Legionella longbeacheae</i>
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
Log	Logaritmo
MAB	Anticuerpo monoclonal
mg	Milígramo
mL	Mililitro
m ³	Metro cúbico
µL	Micro litro
µm	Micrómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds Ratio
OSHA	Occupational Safety and Health Administration

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en campo pulsante
ppm	Partes por millón
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RD	Real Decreto
Re	Número de Reynolds
RENAVE	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
RFLPs	Restriction fragment length polymorphisms
ROC	Característica Operativa del Receptor
SBT	Sequence-based typing
ST	Sequence type
T9	Torre 9
T13	Torre 13
T19	Torre 19
UCI	Unidad de curas intensivas
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
ZA	Zonas altas
ZB	Zonas bajas
ZH	Zonas horizontales
ZV	Zonas verticales
°C	Grados centígrados
>	Mayor
≥	Mayor o igual
<	Menor
≤	Menor o igual

Uno

Justificación y propósito

Prejudice obscures the truth.

Henry Fonda as Juror #8

12 angry men (1957)

La legionelosis es una enfermedad con importantes implicaciones en salud pública por cuanto es prevenible, esencialmente, a través de medidas aplicadas en instalaciones. Una población con elevado riesgo para la adquisición de legionelosis es la de los pacientes ingresados en hospitales, debido en parte a sus propias enfermedades de base y también al hecho que las instalaciones de agua en los edificios hospitalarios pueden estar colonizadas por *Legionella* en mayor o menor grado. El impacto de la enfermedad en este grupo de riesgo es considerable, puesto que la mortalidad asociada es mucho mayor que la de los casos adquiridos en la comunidad.

Es universalmente aceptado que una de las medidas básicas para minimizar la colonización por *Legionella* de las instalaciones de agua caliente sanitaria (ACS) es mantener la temperatura a unos niveles mínimos de seguridad por encima de los cuales el microorganismo no es viable o, como mínimo, no prolifera. Sin embargo, no existe consenso sobre cuál es el dintel ideal que permita un buen control ambiental y que suponga también un mínimo riesgo de quemadura para los usuarios. La legislación española indica que el ACS debe mantenerse a temperaturas superiores a 50°C, pero en otros países este límite inferior se considera en los 55°C. Por otro lado, en los hospitales raramente se utiliza la temperatura como el único medio de desinfección de la instalación, ya que debido al riesgo de los pacientes suelen tratarse las aguas con otros métodos en continuo añadidos.

Otro aspecto controvertido es el papel que juegan las características y usos de la instalación de ACS en la proliferación de *Legionella*. Es conocido que *Legionella* prolifera fácilmente en aguas estancadas en las que se favorece el crecimiento del biofilm. Este hecho, derivado de estudios *in vitro* y de estudios en instalaciones simuladas, ha conllevado que en la mayoría de recomendaciones para la prevención de la legionelosis en edificios se inste a minimizar este fenómeno aplicando medidas como la obertura periódica de grifos de bajo uso. La efectividad de este tipo de medidas, que requieren recursos no menospreciables en el día a día hospitalario, no se han comprobado en instalaciones hospitalarias reales.

Actualmente la mayoría de hospitales tienen instalados uno o más sistemas de desinfección en continuo en sus instalaciones de ACS. Ahora bien, no se conoce el impacto que pueden tener dichos sistemas utilizados durante años sobre la selección de *Legionella* y si favorecen la endemidad por cepas que han desarrollado resistencia a un método de desinfección en cuestión. El análisis molecular de una serie histórica de cepas aisladas en un mismo edificio podría ayudar a responder esta cuestión.

Finalmente, y no menos importante, son muy escasos los estudios que han abordado con una perspectiva integradora los aspectos microbiológicos de *Legionella* con un conocimiento en profundidad de ingeniería de las instalaciones. Sin embargo, la comprensión de ambos aspectos en su conjunto es imprescindible para poder aplicar medidas preventivas basadas en la mayor evidencia científica posible.

Todas estas cuestiones han llevado a plantearnos como pregunta genérica de nuestra investigación si el mantenimiento del ACS por encima de un determinado dintel puede ser considerado como un sistema efectivo de desinfección en continuo para *Legionella*. Esta pregunta genérica implica las siguientes preguntas de investigación concretas:

1. ¿Cuál es la temperatura mínima del ACS que permite un óptimo control de *Legionella* en las instalaciones?
2. ¿El mantenimiento de una temperatura mínima del ACS es igualmente eficaz en instalaciones bien diseñadas y dimensionadas que en instalaciones con deficiencias?
3. ¿Cuál es el papel relativo respecto a la temperatura del diseño y la utilización de las instalaciones de ACS sobre la colonización por *Legionella*?
4. ¿El mantenimiento de temperaturas elevadas del ACS durante períodos largos de tiempo se asocia a la presencia de cepas de *Legionella* más termorresistentes?

Con la presente tesis pretendemos dar respuesta a estas preguntas exponiendo una investigación con un período de observación de casi nueve años de duración.

Dos

Estado actual del tema

*I am putting myself to the fullest possible use,
which is all I think that any conscious entity
can ever hope to do.*

Hal 9000

2001: a space odyssey (1968)

1. *Legionella*: el microorganismo

1.1. Descubrimiento del género *Legionella*

La primera epidemia conocida de la enfermedad del legionario ocurrió en Austin, Minnesota (EEUU), en el verano de 1957. Setenta y ocho habitantes de esta ciudad de aproximadamente 30.000 personas desarrollaron neumonía entre junio y agosto, sin hallarse ningún origen ni etiología. El misterio de esta epidemia se resolvió 22 años más tarde, cuando el análisis de las personas que habían sobrevivido mostró que presentaban niveles elevados de anticuerpos frente a *L. pneumophila* en comparación a controles emparejados (Osterholm *et al.*, 1983). El segundo brote conocido afectó a residentes del St. Elizabeth's Hospital, un hospital psiquiátrico en Washington DC (EEUU) (Thacker *et al.*, 1978). Entre julio y agosto de 1965, 81 internos desarrollaron neumonía, de los que 14 murieron. Años más tarde, en 1977, el análisis de los especímenes almacenados demostró que 19 de 26 pacientes analizados habían seroconvertido a *L. pneumophila* serogrupo 1. En julio de 1968, un total de 144 personas visitantes y empleados del Oakland County Health Department de Pontiac, Michigan (EEUU), desarrollaron una enfermedad febril autolimitada relativamente suave que fue llamada fiebre de Pontiac (Glick *et al.*, 1978). Los conejillos de indias que las autoridades de los CDC colocaron en el edificio durante el brote desarrollaron nódulos pulmonares no filiados. Años más tarde, se aisló *L. pneumophila* serogrupo 1 del tejido pulmonar de estos conejillos que se había preservado hasta entonces (Kaufmann *et al.*, 1981). En España varias epidemias no reconocidas de neumonía habían estado ocurriendo entre 1973 y 1980 en el Hotel Río Park, en Benidorm (Bartlett, 1984; Grist, Reid, y Najera, 1979) afectando al menos a 150 turistas británicos. Las pruebas de serológicas en muestras congeladas mostraron posteriormente que se trataba también de la enfermedad del legionario.

Como es bien sabido, el estudio de la legionelosis debutó en 1976, con la aparición de un brote de neumonía en el hotel Bellevue Stratford en Filadelfia (figura 1) durante una convención de veteranos de la Legión Americana en los meses de julio y agosto, por la celebración del bicentenario de la independencia de los EEUU (Fraser *et al.*, 1977). Este brote afectó a 182 personas, de las que 29 fallecieron, y tuvo un alto impacto mediático en el momento. Los primeros estudios microbiológicos utilizaron hasta 14 medios de cultivo bacteriológicos y micológicos diferentes, y también pruebas serológicas frente a 77 agentes infecciosos, pero sin éxito (McDade, 2002). Unos 6 meses más tarde, Joseph McDade y Charles Shepard, consiguieron aislar bacilos gramnegativos en muestras de tejido pulmonar de cuatro pacientes fallecidos mediante su inoculación intraperitoneal en cobayas utilizando protocolos de aislamiento de rickettsias. Al examinar el bazo e hígado de las cobayas infectadas aplicando la tinción de Giménez se consiguió observar por primera vez al microorganismo responsable. Mediante inmunofluorescencia indirecta se demostró, asimismo, que el 90% de los pacientes del brote de Filadelfia habían desarrollado anticuerpos frente a este microorganismo. En 1979 se difundió el uso de un medio de crecimiento óptimo para estas bacterias, el "Buffered Charcoal Yeast Extract" (BCYE)

(Feeley *et al.*, 1979), cuya base sigue siendo utilizada actualmente. Como dato de interés, cabe destacar que en septiembre de 1974 había ocurrido en el mismo hotel otro brote de neumonía que afectó a 20 participantes de la convención anual de Odd Fellows, cuyo agente causal fue identificado con posterioridad como *L. pneumophila* serogrupo 1 (Terranova, Cohen, y Fraser, 1978).

Todo esto supuso el descubrimiento de una nueva especie bacteriana que, en honor a los pacientes afectados y al tropismo de este microorganismo por el pulmón (*pneumophila*: “amante del pulmón”), recibió el nombre de *Legionella pneumophila*. Esta denominación y la creación de una nueva familia bacteriana fueron propuestas en el Primer Simposium Internacional sobre Enfermedad del Legionario que tuvo lugar en Atlanta a finales de 1978 (Brenner, Steigerwalt, y McDade, 1979).



Figura 1. Fotografía actual del hotel Bellevue Stratford en Filadelfia y cubierta del programa de la convención de veteranos de la Legión Americana celebrada en 1976 en el hotel.

Fuentes: Mark Klinchin, accedido el 1 de julio de 2015 desde <http://www.panoramio.com/photo/108486672> y Heiner, K. y Swanson, M. (Eds) (2008). *Legionella: molecular microbiology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.

1.2. Taxonomía

La familia *Legionellaceae* está formada por el único género *Legionella*, que comprende más de 50 especies (Euzéby, 2013) (tabla 1). Las diferencias antigénicas entre aislados de una misma especie han llevado a su subclasificación en serogrupos, conociéndose hasta el momento más de 70. Sin embargo,

no todas las especies de este género se han podido relacionar con infecciones en humanos. *L. pneumophila* causa la mayoría de casos de legionelosis y aunque se han identificado 16 serogrupos distintos dentro de esta especie, en el 80% de los casos de legionelosis está implicado el serogrupo 1 (Stout y Yu, 1997).

Tabla 1. Familia *Legionellaceae*: especies, serogrupos y patología asociada.

Especie	Serogrupos	Patología	Especie	Serogrupos	Patología
<i>L. adelaidensis</i>	1	Desconocida	<i>L. lytica</i>	1	Desconocida
<i>L. anisa</i>	1	Sí	<i>L. maceachernii</i>	1	Sí
<i>L. bellardensis</i>	1	Desconocida	<i>L. massiliensis</i>	1	Desconocida
<i>L. birminghamensis</i>	1	Sí	<i>L. micdadei</i>	1	Sí
<i>L. bozemanæ</i>	2	Sí	<i>L. moravica</i>	1	Desconocida
<i>L. brunensis</i>	1	Desconocida	<i>L. nagasakiensis</i>	1	Sí
<i>L. busanensis</i>	1	Desconocida	<i>L. nautarum</i>	1	Desconocida
<i>L. cardiaca</i>	1	Sí	<i>L. norrlandica</i>	1	Desconocida
<i>L. cherrii</i>	1	Desconocida	<i>L. oakridgensis</i>	1	Sí
<i>L. cincinnatiensis</i>	1	Sí	<i>L. parisiensis</i>	1	Sí
<i>L. drancourtii</i>	1	Desconocida	<i>L. pittsburghensis</i>	1	Desconocida
<i>L. dresdenensis</i>	1	Desconocida	<i>L. pneumophila</i>	16	Sí
<i>L. drozanskii</i>	1	Desconocida	<i>L. quateirensis</i>	1	Desconocida
<i>L. dumoffii</i>	1	Sí	<i>L. quinlivanii</i>	2	Desconocida
<i>L. erythra</i>	2	Sí	<i>L. rowbothamii</i>	1	Desconocida
<i>L. fairfieldensis</i>	1	Desconocida	<i>L. rubrilucens</i>	1	Desconocida
<i>L. fallonii</i>	1	Desconocida	<i>L. sainthelensi</i>	2	Sí
<i>L. feeleii</i>	2	Sí	<i>L. santicrucis</i>	1	Desconocida
<i>L. geestiana</i>	1	Desconocida	<i>L. shakespearei</i>	1	Desconocida
<i>L. gormanii</i>	1	Sí	<i>L. spiritensis</i>	2	Desconocida
<i>L. gratiana</i>	1	Desconocida	<i>L. steelei</i>	1	Sí
<i>L. gresilensis</i>	1	Desconocida	<i>L. steigerwaltii</i>	1	Desconocida
<i>L. hackeliae</i>	2	Sí	<i>L. taurinensis</i>	1	Desconocida
<i>L. impletisoli</i>	1	Desconocida	<i>L. tusconensis</i>	1	Sí
<i>L. israelensis</i>	1	Desconocida	<i>L. tuniciensis</i>	1	Desconocida
<i>L. jamestowniensis</i>	1	Desconocida	<i>L. wadsworthii</i>	1	Sí
<i>L. jordanis</i>	1	Sí	<i>L. waltersii</i>	1	Desconocida
<i>L. lansingensis</i>	1	Sí	<i>L. worsleiensis</i>	1	Desconocida
<i>L. londiniensis</i>	2	Desconocida	<i>L. yabuuchiae</i>	1	Desconocida
<i>L. longbeachae</i>	2	Sí			

1.3. Características morfológicas y fisiológicas

Los miembros de la familia *Legionellaceae* son bacilos gramnegativos no esporulados y carentes de cápsula. Casi todas las especies son móviles y están dotadas de uno o más flagelos polares o subpolares (figura 2). Su forma y tamaño varía según la fuente y las condiciones de desarrollo. En tejidos y secreciones se presentan en forma de pequeños bacilos o cocobacilos con un tamaño aproximado 0,5 micrómetros de anchura y 1,5 micrómetros de longitud. En cultivos pueden presentarse como pequeños

bacilos uniformes en forma y tamaño, de 0,5 por 2 micrómetros, o bien como bacilos filamentosos pleomórficos de hasta 100 micrómetros de longitud (figura 2).

Las especies de *Legionella* son aerobias estrictas, poco sacarolíticas y, en general, metabólicamente poco activas. Son catalasa y oxidasa positivas, presentan un requerimiento absoluto de hierro y utilizan los aminoácidos para producir energía en lugar de carbohidratos. Los aminoácidos esenciales utilizados por *Legionella* incluyen arginina, cisteína, metionina, serina, treonina y valina. Todos estos requerimientos hacen que para su aislamiento sean necesarios medios de agar enriquecidos y suplementados con L-cisteína y sales férricas. El medio utilizado para el cultivo de esta bacteria es BCYE (figura 3).

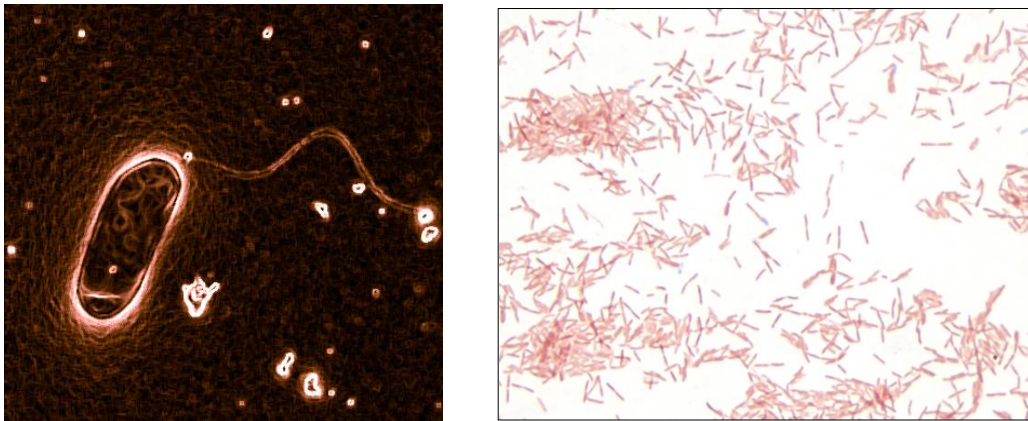


Figura 2. Fotografía pseudocoloreada con microscopio electrónico de una forma flagelada de *L. pneumophila* y tinción de Gram de *L. pneumophila* de muestra de esputo.

Fuentes: Russell Vance, Howard Hughes Medical Institute, accedido el 1 de julio de 2015 desde <http://www.hhmi.org/research/innate-detection-bacterial-infections-immune-system> y eMicrobes Digital Library, accedido el 1 de julio de 2015 desde www.idimages.org.

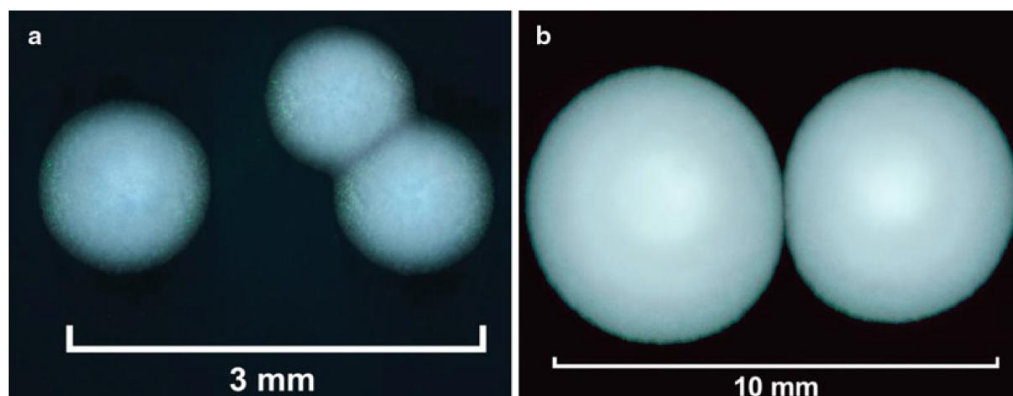


Figura 3. Colonias de *Legionella* después de 3 días (a) y 7 días (b) de incubación en medio BCYE, vistas a través de de microscopio de disección.

Fotos: James Gathany

1.4. Ciclo de vida y factores de virulencia

Legionella se multiplica en el interior de protozoos de vida libre en el hábitat acuático y en el interior de macrófagos alveolares cuando infecta a humanos. Esta capacidad de multiplicación intracelular es uno de los caracteres principales de la patogénesis del género *Legionellaceae*. A lo largo de su ciclo intracelular, *L. pneumophila* presenta al menos dos fenotipos bien diferenciados: en la fase replicativa, la bacteria no es virulenta y no presenta flagelo, mientras que en la fase transmisiva, es virulenta y flagelada.

El proceso por el que *L. pneumophila* infecta a la célula huésped tiene varias etapas: endocitosis, vacuolización, multiplicación y liberación (figura 4). Tras el contacto con receptores específicos de la membrana de la célula huésped, la bacteria es internalizada por endocitosis. Una vez en el interior, permanece en el fagosoma, donde segrega un conjunto de proteínas que impiden la fusión del fagosoma con los lisosomas y su acción bactericida. Sin embargo, solamente las cepas virulentas pueden inhibir esta fusión y transformar el fagosoma en un nicho para su replicación (Cianciotto, 2001; Swanson y Hammer, 2000). A los pocos minutos de la internalización, el fagosoma se fusiona con el retículo endoplasmático formando una vacuola protegida, dentro de la cual empieza a replicarse. El período de replicación puede prolongarse durante varias horas.

El paso de fase replicativa a fase de transmisiva parece estar regulado por las condiciones ambientales, especialmente por la limitación de aminoácidos y/o ácidos grasos (Gomez-Valero *et al.*, 2009; Hammer y Swanson, 1999). Cuando las condiciones son favorables para la replicación, los caracteres que promueven la transmisión son reprimidos y la bacteria se multiplica. Cuando los nutrientes en la vacuola se agotan, la progenie se diferencia de fase replicativa a fase transmisiva reprimiendo la replicación y expresando una serie de caracteres como la resistencia a los ácidos, la expresión de flagelos o la citotoxicidad, lo que conduce a la muerte del macrófago y a la liberación de un gran número de bacterias desde la célula a través de la formación transitoria de un poro (Molmeret y Abu Kwaik, 2002). Las bacterias liberadas pueden infectar otros macrófagos, de manera que se amplifica la concentración de bacterias en el pulmón.

Se cree que la interacción de *L. pneumophila* con protozoos de vida libre ha generado a lo largo de la evolución una serie de caracteres de virulencia que la han dotado de capacidad para infectar células humanas. Las estructuras de superficie de membrana juegan un papel importante en la patogenicidad de *Legionella* (Cianciotto, 2001). La adherencia, seguida de la entrada de la bacteria en la célula huésped es un paso crucial en el ciclo de infección. Ciertas proteínas de superficie de membrana junto con el lipopolisacárido, el flagelo y el pili tipo IV, están involucradas en la adherencia y entrada de *Legionella* en macrófagos alveolares y protozoos. Otro aspecto importante en la virulencia de *Legionella* es la capacidad de secretar citotoxinas y proteasas destructoras de tejido al medio extracelular (Aragon, Kurtz, Flieger, Neumeister, y Cianciotto, 2000). El mecanismo que impide la degradación lisosomal del

fagosoma una vez que *Legionella* ya ha entrado en el macrófago es otro factor importante. Este proceso parece estar relacionado con los sistemas de secreción tipo IV, que actúa durante la fagocitosis para prevenir la fusión fagosoma-lisosoma y establecer la vacuola de replicación (Bruggemann, Cazalet, y Buchrieser, 2006).

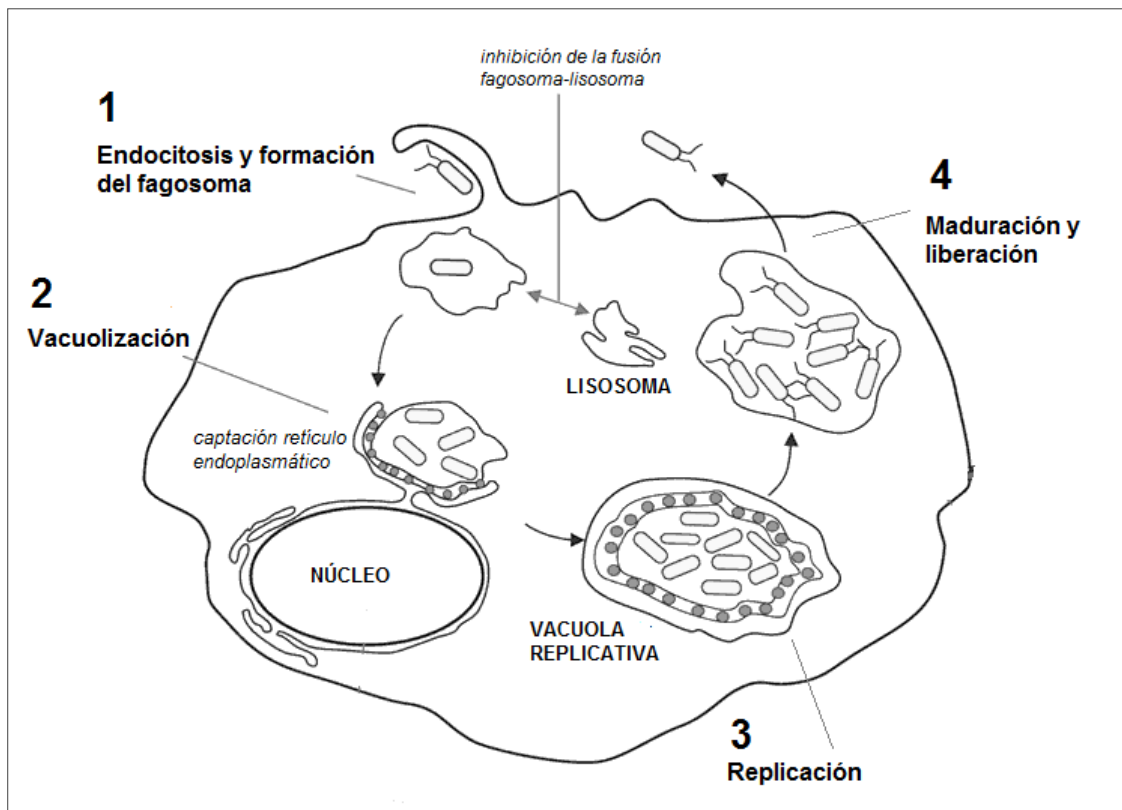


Figura 4. Representación del ciclo intracelular de *Legionella* en un macrófago. Adaptado de Cazalet, C., Rusniok, C., Brüggemann, H., Zidane, N., Magnier, A., Ma, L y Buchrieser, C. (2004). Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nature genetics*,36(11), 1165-1173.

2. Legionelosis: aspectos clínicos

2.1. Mecanismos de transmisión

El reservorio primario o hábitat natural de *Legionella* es el entorno acuático: ríos, corrientes de agua, estanques o pozos. Desde estos reservorios naturales, *Legionella* puede colonizar los sistemas de abastecimiento de agua de consumo humano e incorporarse a instalaciones de edificios u otras instalaciones que requieran agua para su funcionamiento. Estas instalaciones son la fuente de infección en humanos. En la figura 5 se esquematizan estos conceptos.

Las instalaciones que generan aerosoles y que se colonizan fácilmente con *Legionella* son las fuentes que generan la mayoría de casos comunitarios. Destacan, por su importancia, las torres de refrigeración y los condensadores evaporativos, pero también cabe mencionar, por su riesgo, piscinas, bañeras de hidromasaje, humidificadores, fuentes ornamentales y sistemas de riego por aspersión. Los aerosoles emitidos por duchas en edificios con circuitos de retorno, como hoteles, suponen también instalaciones de riesgo. El mecanismo de transmisión de *Legionella* a partir de estas fuentes es la inhalación de aerosoles. El agua sanitaria, fría y caliente, es la fuente hospitalaria más importante. En este caso, a pesar de que existe un riesgo de transmisión a través de aerosoles de duchas u otras fuentes, se cree que el principal mecanismo es la microaspiración de agua contaminada. No existe evidencia de transmisión de *Legionella* directamente de persona a persona. La excepción en la adquisición a partir de reservorio acuático es *L. longbeachae*, que se ha asociado a trabajos de jardinería o a actividades en contacto con la tierra (Amodeo, Murdoch, y Pithie, 2010; Lindsay *et al.*, 2012).

El tracto respiratorio es la vía primaria de entrada del microorganismo en los humanos. La inhalación de aerosoles o gotículas respirables con *Legionella* (de menos de 1 μm a 5 μm) permite la llegada de la bacteria a los alveolos pulmonares, donde queda retenida. Los aerosoles emitidos por las torres de refrigeración pueden transmitirse a un área limitada de unos 200 metros; sin embargo, en determinadas condiciones de viento, los aerosoles pueden llegar hasta más de 3 kilómetros de distancia de la fuente de infección (Addiss *et al.*, 1989). Las gotículas de agua respirables se pueden formar siempre que se rompe o fragmenta un flujo de agua cuando impacta sobre superficies duras, como por ejemplo, durante la ducha. Estudios de simulación han mostrado que a partir de duchas contaminadas en los cabezales, la cantidad de *Legionella* emitida al ambiente es relativamente baja, y sólo llega a cortas distancias (Schoen y Ashbolt, 2011). La transmisión de *Legionella* a largas distancias mediante núcleos goticulares desecados no se ha demostrado.

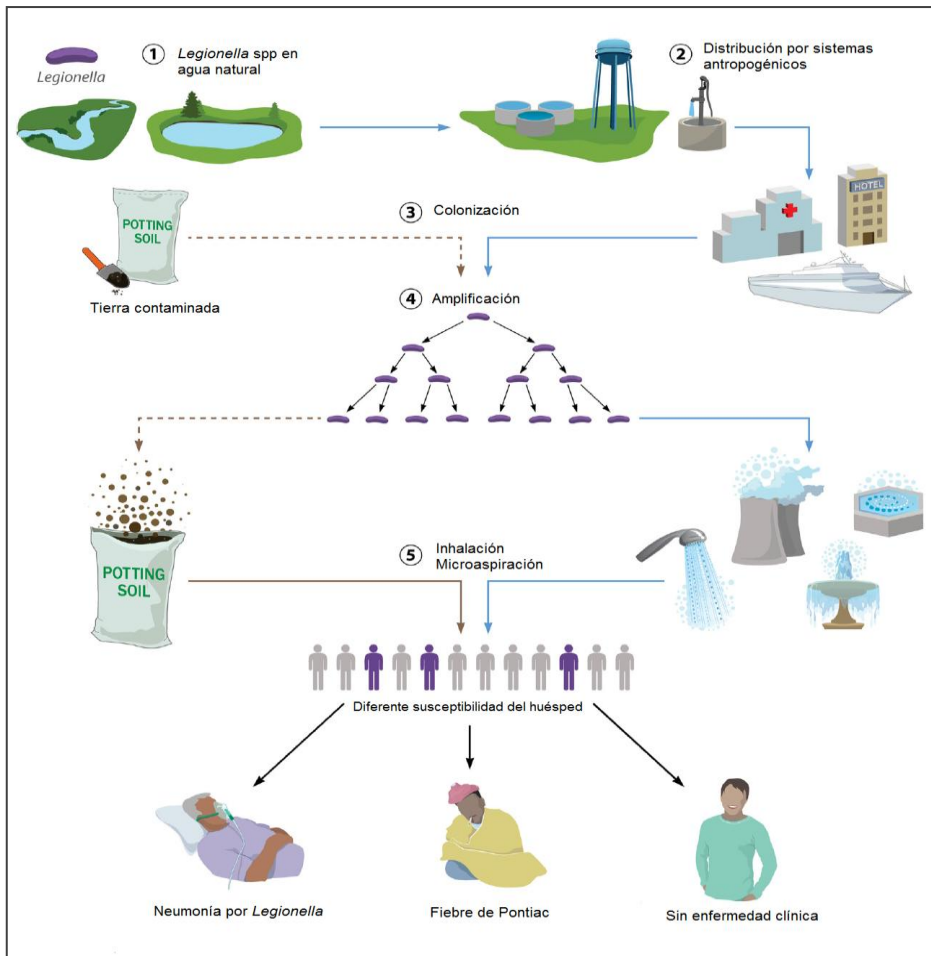


Figura 5. Representación gráfica de la ruta de diseminación de *Legionella* desde las fuentes naturales hasta el huésped humano.

Adaptado de Mercante, J. W., y Winchell, J. M. (2015). Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 95–133.

Hasta ahora, las evidencias a favor de la transmisión por microaspiración de agua contaminada son únicamente clínicas. Yu (1993) postuló esta hipótesis en la década de los 90 a partir de observaciones de casos de adquisición nosocomial en los que no siempre se había producido exposición a duchas (Blatt *et al.*, 1993; Marrie *et al.*, 1991; Venezia, Agresta, Hanley, Urquhart, y Schoonmaker, 1994). Desde entonces, más autores han apoyado esta hipótesis (Sabria y Yu, 2002), basándose en el hecho de que los pacientes hospitalizados tienen mayor riesgo de microaspirar ya sea por su patología o por determinadas instrumentalizaciones, como la intubación (Kool *et al.*, 1998). Se ha constatado, por ejemplo, que en pacientes que desarrollaron neumonía por aspiración tras cirugía de cabeza y cuello, el 30% de los casos la etiología fue *Legionella* (Johnson *et al.*, 1985). La constatación de que la hidratación con agua del grifo a través de las sondas nasogástricas es un factor de riesgo sería otro dato que apoyaría este mecanismo (Blatt *et al.*, 1993; Marrie *et al.*, 1991; Venezia *et al.*, 1994). A pesar de estas evidencias indirectas, la colonización orofaríngea por *Legionella* no se ha demostrado (Pedro-Botet *et al.*,

2002). El papel de las duchas como fuente de infección relevante en el medio hospitalario no ha sido del todo demostrado, incluso se ha descrito que pacientes hospitalizados que realizan la higiene con ducha presentan menor riesgo de adquirir neumonía por *Legionella* (Blatt *et al.*, 1993; Helms *et al.*, 1988). Ello se explicaría porque los pacientes que deambulan tienen una menor probabilidad de aspirar en comparación con los pacientes encamados. En el medio hospitalario, otra vía de inhalación de aerosoles puede ser la exposición a nebulizadores o equipos de terapia respiratoria tratados con agua del grifo. Como se verá más adelante, la diversidad de usos que se hace del agua en un centro hospitalario justifica la necesidad de disponer de políticas de seguridad con procedimientos que regulen el uso del agua de la red de distribución.

Aparte de los ya mencionados, *Legionella* vive y se multiplica en múltiples reservorios húmedos que también se han asociado a la aparición de casos clínicos. En una reciente revisión, se mencionan, entre otros, las máquinas de hielo, las máquinas refrigeradoras de vapor, las líneas dentales, los depósitos de líquido limpiaparabrisas, y la propia agua de lluvia (van Heijnsbergen *et al.*, 2015). Esta diversidad dificulta el ya de por sí complejo abordaje del origen de la adquisición de la enfermedad, en especial en los casos esporádicos.

2.2. Formas clínicas y factores de riesgo

La enfermedad por *Legionella* puede presentar un espectro clínico muy variable, desde formas leves hasta una enfermedad grave con insuficiencia respiratoria y fracaso multiorgánico (Sabria y Yu, 2012; Cunha, Burillo y Bouza, 2015). Clásicamente se diferencian dos formas de afectación respiratoria: la fiebre de Pontiac y la neumonía por *Legionella*. La enfermedad extrapulmonar es rara, pero se han descrito casos de celulitis, pancreatitis, peritonitis y pielonefritis atribuidos a la diseminación hematológica durante la neumonía por *Legionella*. Hay otras formas extrapulmonares que no se asocian a neumonía, secundarios a la inoculación directa de la bacteria en las heridas y que se han descrito en contextos hospitalarios (Lowry, Blankenship, Gridley, Troup, y Tompkins, 1991).

La fiebre de Pontiac es una enfermedad leve y cursa sin neumonía. En la mayor parte de casos no se llega al diagnóstico etiológico debido a su carácter autolimitado y de poca gravedad. El período de incubación habitualmente es corto, de entre 24 a 48 horas. Las manifestaciones clínicas más habituales son fiebre, escalofríos y mialgias localizadas.

La neumonía por *Legionella*, o enfermedad del legionario, se presenta con un espectro clínico variable: puede cursar como una neumonía atípica, con manifestaciones fundamentalmente extrapulmonares, o bien de forma similar a una neumonía neumocócica. Tras un período de incubación de 2 a 10 días aparecen fiebre, escalofríos, cefaleas, mialgia y malestar general, así como tos seca que puede volverse productiva con el tiempo. Se desarrollan infiltrados que afectan a los lóbulos inferiores. En ocasiones

pueden aparecer diarrea, hiponatremia y alteración del estado mental como confusión o letargia. En inmunodeprimidos, la enfermedad se presenta de una forma más grave, ya que puede tener forma cavitada en la radiografía de tórax y afectación extrapulmonar (Jacobson, Miceli, Tarrand, y Kontoyiannis, 2008).

Los factores de riesgo que de forma más consistente se han asociado a la neumonía por *Legionella* son la edad avanzada, el sexo masculino, el tabaquismo, la enfermedad respiratoria crónica y la inmunosupresión. Los pacientes inmunosuprimidos, ya sea por la administración de corticoides, fármacos inmunosupresores u otras terapias, suponen una población de especial riesgo. La corticoterapia por sí sola es un factor frecuentemente asociado en las series de pacientes con neumonía por *Legionella* (Carratala *et al.*, 1994; Kool *et al.*, 1998; Lepine *et al.*, 1998). En una reciente revisión de pacientes con legionelosis y cancer, se constató que el 41% estaban recibiendo corticoterapia y el 63% quimioterapia (Jacobson *et al.*, 2008). Los receptores de trasplantes de órgano sólido son otra población de especial riesgo reconocida desde hace años (Chow y Yu, 1998; Mathys, Deng, Meyer, y Junge-Mathys, 1999). En un estudio retrospectivo, se describieron 14 casos de legionelosis entre un total de 2946 pacientes trasplantados (Gudiol *et al.*, 2009). Los pacientes en tratamiento con factor de necrosis tumoral alfa pueden presentar un riesgo de hasta 20 veces superior en comparación con la población sana (Lanternier *et al.*, 2013; Tubach *et al.*, 2006). El uso cada vez más extendido de terapias biológicas puede suponer un factor de riesgo añadido para muchos enfermos: en una reciente revisión de 105 casos publicados se constató una mortalidad global del 19% (Bodro, Carratala, y Paterson, 2014).

Estos factores de riesgo clásicos, observados en series clínicas, se deben interpretar con precaución cuando se considera la perspectiva poblacional. Las series más actuales de legionelosis adquirida en la comunidad, en las que se incluyen pacientes menos graves diagnosticados mayoritariamente por antigenuria, muestran que esta infección suele presentarse también en individuos jóvenes y sin enfermedad de base, aún cuando en la mayoría de los casos suele estar presente el hábito tabáquico (de Olalla *et al.*, 2008; von Baum *et al.*, 2008). Asimismo, la neumonía por *Legionella* es infrecuente en niños, aunque no inexistente. En una revisión de la literatura publicada hasta el momento se identificaron 76 casos publicados de legionelosis infantil, la mayoría en niños con comorbilidades de base (Greenberg, Chiou, Famigilleti, Lee y Yu, 2006). La adquisición fue comunitaria en el 46% de los casos y nosocomial en el resto.

Recientemente está adquiriendo interés el estudio de los factores genéticos asociados a una mayor susceptibilidad a las infecciones. Se sabe que los denominados receptores toll-like juegan un papel fundamental en la inmunidad innata por su papel en el reconocimiento de patógenos bacterianos, entre ellos, *L. pneumophila*. Misch *et al.* (2013) han descrito que un determinado polimorfismo de los receptores toll-like se ha asociado de manera independiente a la infección por *L. pneumophila*, con una odds ratio mayor de 4. Este riesgo estaba más aumentado en fumadores. Estos datos sugieren que,

aparte de factores ambientales, la susceptibilidad individual de base genética podría jugar un papel importante, aunque poco conocido hasta el momento.

Los pacientes que contraen legionelosis nosocomial presentan muchos de los factores de riesgo intrínsecos o extrínsecos anteriormente citados, pero además deben tenerse en cuenta otras apreciaciones. Tal y como se ha apuntado anteriormente, la subyacente hipótesis de la colonización orofaríngea por *Legionella* implica que muchos de los factores de riesgo de la legionelosis nosocomial serían los mismos que los de la neumonía por aspiración. Así, la cirugía previa, la intubación endotraqueal, la utilización de sondas nasogástricas y los estados clínicos que predisponen a la microaspiración son condiciones que se dan casi exclusivamente en pacientes hospitalizados. Su importancia estriba en que con una correcta aplicación de los procedimientos asistenciales basada en criterios de seguridad del agua, serían factores de riesgo evitables en la mayor parte de casos.

El pronóstico de la neumonía por *Legionella* está relacionado con la enfermedad de base del paciente, la forma clínica de presentación y el retraso en el inicio del tratamiento adecuado. La principal complicación y causa de muerte es la insuficiencia respiratoria. La letalidad se sitúa entre el 5% y el 30%. Esta letalidad viene determinada por las características del inóculo, la especie y el serogrupo del microorganismo, la patología y los tratamientos de base del paciente y la adecuación del tratamiento (Chidiac *et al.*, 2012; Mykietiuk *et al.*, 2005; Pedro-Botet *et al.*, 1998; Prodinge *et al.*, 1994).

Pocos estudios de series de casos clínicos han analizado si existen diferencias en la presentación clínica y en el pronóstico en la neumonía por *Legionella* según si la adquisición ha sido comunitaria o nosocomial. Helms *et al.* (1984) describieron una mayor mortalidad en pacientes con legionelosis nosocomial, con un 25% de fallecimientos. Por el contrario, Pedro-Botet *et al.* (1995), no encontraron diferencias significativas en las características clínicas ni en la mortalidad. En un trabajo más reciente, Jespersen *et al.* (2010) describen que las formas nosocomiales presentan menos signos y síntomas típicos de neumonía y un mayor retraso en solicitar pruebas específicas de investigación de *Legionella*, siendo la mortalidad a 30 días tres veces mayor.

2.3. Diagnóstico y tratamiento

2.3.1. Diagnóstico clínico

No es posible distinguir la legionelosis de otras formas de neumonía por su presentación clínica. Sin embargo, hay una serie de datos que pueden llevar a la sospecha diagnóstica (Sabria y Yu, 2012). La fiebre suele ser elevada y se puede observar una bradicardia relativa. También pueden aparecer cefaleas, confusión o alteración del nivel de conciencia. La expectoración escasa con esputo poco purulento se ha considerado característica de la neumonía por *Legionella*. En un 20-40% de los casos aparecen manifestaciones gastrointestinales. El tratamiento previo con betalactámicos sin obtención de

respuesta también es un dato importante. En la analítica, la hiponatremia se presenta con más frecuencia en la neumonía por *Legionella* que en otros tipos de neumonía. Además, puede observarse un aumento de la creatinina, que es poco frecuente en otras etiologías. En cuanto a la presentación radiológica, la afección pulmonar unilateral es la más frecuente. La progresión radiológica que se observa en un 50-80% de los casos. Esta progresión, que se produce entre el segundo y el sexto día, se puede observar incluso en aquellos pacientes que están recibiendo un tratamiento antibiótico adecuado.

2.3.2. Diagnóstico de laboratorio

El aislamiento en cultivo se considera la técnica “gold standard” para el diagnóstico y aislamiento de *Legionella*, que permite detectar cualquiera de las especies y serogrupos. Además, es necesario para la realización de estudios epidemiológicos y moleculares. El aislamiento en cultivo tiene una especificidad del 100% y una sensibilidad de entre el 50% y el 80% cuando la sospecha clínica es elevada (Mentasti *et al.*, 2012). La sensibilidad parece ser mayor en pacientes hospitalizados con formas más severas de la enfermedad, debido a la mayor carga microbiana en las muestras respiratorias (Blyth, Adams, y Chen, 2009). Las colonias de *Legionella* se reconocen por su crecimiento lento y su morfología. Necesitan dos días de incubación a 37°C y atmósfera humidificada con 5% de CO₂ para formar microcolonias de unos 0,5 mm y tres días para formar macrocolonias de 1 a 2 mm. La necesidad de disponer de resultados con mayor rapidez fue la clave para desarrollar otras técnicas de detección rápida de *Legionella*.

La detección de antígeno en orina es, actualmente, la prueba diagnóstica más utilizada en la práctica clínica. Se estima que, actualmente, entre el 80% y el 90% de los casos de legionelosis de Europa y EEUU se diagnostican exclusivamente por antigenuria (Mercante y Winchell, 2015). Se trata de una prueba sencilla que presenta una gran sensibilidad y especificidad. El antígeno de *L. pneumophila* en orina puede detectarse desde el inicio de los síntomas y persiste durante meses. Desde hace varios años existen en el mercado kits comerciales para la detección del antígeno en orina basados en radioinmunoanálisis y enzoinmunoanálisis (EIA). En los últimos años también se han desarrollado ensayos inmunocromatográficos (ICT) que presentan sensibilidad y especificidad parecidas a las de EIA (de Ory y Minguito, 2009). Los kits basados en EIA (Binax, Bartels) y en ICT (BinaxNOW, SAS, Uni-Gold) forman parte de las pruebas diagnósticas rutinarias en la práctica clínica actualmente. Los kits basados en la técnica ICT permiten obtener resultados muy rápidos y no requieren ningún equipamiento específico, resultando más sencillos que los de EIA. Sin embargo, cabe destacar la baja sensibilidad de estas técnicas para la detección de *L. pneumophila* que no sea del serogrupo 1: mientras que la sensibilidad en los casos de neumonía por *L. pneumophila* serogrupo 1 es del 80%-90%, en los otros serogrupos de *L. pneumophila* es menor al 50% (Helbig *et al.*, 2003; Svarrer, Luck, Elverdal, y Uldum, 2012).

La detección por técnicas moleculares se basa en la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite la amplificación de pequeños fragmentos de ADN de *Legionella*. Esta técnica puede

realizarse tanto en muestras respiratorias como en orina y en suero, por lo que resulta particularmente interesante en pacientes que no producen esputo. Una variante de esta técnica, la PCR a tiempo real, que analiza el producto amplificado mediante fluorescencia, ha permitido reducir aún más el tiempo de análisis. La PCR a tiempo real para el gen *mip* de *L. pneumophila* presenta mayor sensibilidad que el cultivo (Blyth *et al.*, 2009; Mentasti *et al.*, 2012). Sin embargo, la obtención de falsos positivos y la presencia de inhibidores como la hemoglobina o la urea que, por el contrario, pueden dar falsos negativos, hacen que la PCR no forme parte de la rutina de los laboratorios diagnósticos. Datos recientes sugieren que el ADN de *L. pneumophila* se puede detectar en orina con una sensibilidad superior al 80% (Lindsay *et al.*, 2004). En suero, la sensibilidad sería de entre el 30%-50% (Diederer *et al.*, 2007; Mentasti *et al.*, 2012).

2.3.4. Tratamiento

El tratamiento de la neumonía por *Legionella* comprende la antibioterapia específica y el manejo de las complicaciones y comorbilidades. Uno de los factores que condiciona el pronóstico de la enfermedad es la instauración del tratamiento antibiótico adecuado precozmente (Chidiac *et al.*, 2012; Levy, Le Jeune, Woodhead, Macfarlaned y Lim, 2010). Debido a que *L. pneumophila* es un patógeno intracelular, se deben utilizar antibióticos que garanticen concentraciones terapéuticas intracelulares en los macrófagos, como los macrólidos, las quinolonas o las tetraciclinas.

Actualmente, los antibióticos de elección para el tratamiento de la neumonía por *Legionella* son la azitromicina o el levofloxacino, puesto que ofrecen mayor actividad in-vitro y menos efectos secundarios que la eritromicina (File *et al.*, 1997; Pedro-Botet y Yu, 2006; Vergis *et al.*, 2000). Las quinolonas han sido recomendadas en pacientes trasplantados ya que estas, a diferencia de macrólidos, no producen interferencias en el metabolismo de los fármacos inmunosupresores. Además, en casos severos de la enfermedad tratados con quinolonas se ha observado una reducción del tiempo de hospitalización y han presentado menos complicaciones que los tratados con macrólidos (Sabria *et al.*, 2005). La terapia combinada se ha sugerido para el tratamiento de los casos severos; sin embargo, no existe evidencia de superioridad respecto a la monoterapia (Mandell *et al.*, 2007). En un reciente metaanálisis (Burdet *et al.*, 2014) la odds ratio combinada de mortalidad fue de 0,5 de las quinolonas en relación a los macrólidos, y la estancia media fue también menor, con un promedio de tres días menos.

La duración del tratamiento se debe evaluar en base a la respuesta clínica y los marcadores biológicos. Las guía de la IDSA/ATS (Mandell *et al.*, 2007) recomienda una duración mínima de 5-14 días, llegando hasta 21 días en pacientes inmunocomprometidos

3. La legionelosis como problema de salud pública

3.1. Epidemiología de la legionelosis

La legionelosis es una enfermedad de declaración obligatoria en la mayor parte de países con sistemas de vigilancia epidemiológica estructurados. Sin embargo, es probable que la magnitud de la legionelosis esté infravalorada a nivel mundial debido a una insuficiente accesibilidad a pruebas diagnósticas y la poca exhaustividad de los sistemas de vigilancia, cuando los hay. La incidencia global de la legionelosis es, por tanto, difícil de cuantificar. En países con sistemas de vigilancia bien establecidos, las tasas de incidencia por millón de habitantes pueden variar considerablemente, así como su letalidad (tabla 2). Globalmente, las distribuciones por edad y sexo son similares entre los países notificantes. La enfermedad es más frecuente en hombres y afecta mayormente a personas de más de 50 años. En países de clima templado sigue un patrón estacional bastante claro, con picos a finales de verano y principios de otoño.

Tabla 2. Datos poblacionales de la legionelosis en países con sistemas de vigilancia.

	Tasa por millón de habitantes	≥50 años (%)	Ratio hombre:mujer	Letalidad (%)
Europa	9,2	77,0%	2,8:1	10,3%
EEUU	10,8	74,0%	1,8:1	8,0%
Canadá	4,0	75,0%	1,6:1	---
Nueva Zelanda	14,0	---	1,7:1	5,1%
Japón	7,0	90,8%	4,3:1	---
Singapur	6,5	76,1%	1,4:1	2,2%
Australia	13,0	87,0%	1,9:1	---

Nota. Adaptado de Phin, N., Parry-Ford, F., Harrison, T., Stagg, H. R., Zhang, N., Kumar, K., y Abubakar, I. (2014). Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *The Lancet infectious diseases*, 14(10), 1011-1021.

En Europa, los datos de vigilancia epidemiológica de la legionelosis de cada estado miembro se reportan a los ECDC. Sin embargo, existen algunas diferencias en los criterios diagnósticos de legionelosis entre los ECDC y el Centro Nacional de Epidemiología (España). Quizás la más relevante es que éste último incluye la fiebre de Pontiac, mientras que los ECDC sólo admiten casos de neumonía. Las tablas 3 y 4 exponen estos criterios.

Tabla 3. Criterios diagnósticos de legionelosis del ECDC (2012).

Criterio clínico:

Cualquier persona con neumonía.

Criterio de laboratorio para caso confirmado:

Al menos uno de los siguientes:

- Aislamiento de *Legionella* en secreciones respiratorias o cualquier otra muestra estéril.
- Detección de antígeno *L. pneumophila* en orina.
- Aumento específico del nivel de anticuerpos frente a *L. pneumophila* serogrupo 1 en dos muestras.

Criterio de laboratorio para caso probable:

Al menos uno de los siguientes:

- Detección de antígeno de *L. pneumophila* en secreciones respiratorias o tejido pulmonar por inmunofluorescencia directa usando reactivos monoclonales.
- Detección de ácido nucleico de *Legionella* spp. en secreciones respiratorias, tejido pulmonar u otras muestras normalmente estériles.
- Aumento significativo del nivel de anticuerpos frente a *L. pneumophila* diferente al serogrupo 1 u otra *Legionella* spp. en dos muestras.
- Título único de anticuerpos elevados frente a *L. pneumophila* serogrupo 1.

Clasificación de los casos:

Caso probable: cualquier persona con criterio clínico y al menos una prueba de laboratorio de caso probable.

Caso confirmado: cualquier persona con criterio clínico y con criterio de laboratorio de caso confirmado.

Tabla 4. Criterios diagnósticos de legionelosis del Centro Nacional de Epidemiología (2013)

Criterio clínico:

- **Legionelosis:** enfermedad respiratoria aguda con signos focales e imágenes radiológicas compatibles con neumonía. Otros síntomas y signos son cefalea, mialgias, diarrea y vómitos, la mitad de los pacientes pueden presentar confusión mental y delirio.
- **Fiebre de Pontiac:** síndrome febril agudo autolimitado sin neumonía.

Criterio de laboratorio:

Caso confirmado

- Aislamiento de cualquier especie o serogrupo de *Legionella* a partir de secreciones respiratorias, tejido pulmonar o sangre.
- Detección de antígeno de *L. pneumophila* en orina por inmunocromatografía o ELISA.
- Seroconversión (aumento del título de anticuerpos en cuatro veces o más) con un segundo título mínimo de 128 frente a *L. pneumophila* serogrupo 1 por inmunofluorescencia indirecta, en sueros tomados en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad.

Caso probable

- Detección de antígeno específico de *L. pneumophila* en secreciones respiratorias o tejido pulmonar, por inmunofluorescencia directa usando reactivos monoclonales frente a cualquier especie o serogrupo de *Legionella*, incluido el serogrupo 1.
- Detección de ácido nucleico de *Legionella* spp. en secreciones respiratorias, tejido pulmonar u otras muestras normalmente estériles.
- Seroconversión (aumento del título de anticuerpos en cuatro veces o más) con un segundo título mínimo de 128 frente a cualquier especie o serogrupo de *Legionella* distinto de *L. pneumophila* serogrupo 1, por inmunofluorescencia indirecta, en sueros tomados en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad.
- Título único de anticuerpos elevado (≥ 256) frente a *L. pneumophila* serogrupo 1.

A efectos de vigilancia epidemiológica, los casos de legionelosis se clasifican como esporádicos o asociados a brotes. A su vez, y atendiendo al ámbito en el que se ha adquirido la enfermedad, en cada país notificante los casos se clasifican en comunitarios, nosocomiales, relacionados con viajes nacionales y relacionados con viajes al extranjero. Las figuras 6 y 7 muestran la evolución temporal de las tasas de incidencia y de los brotes de legionelosis en Europa.

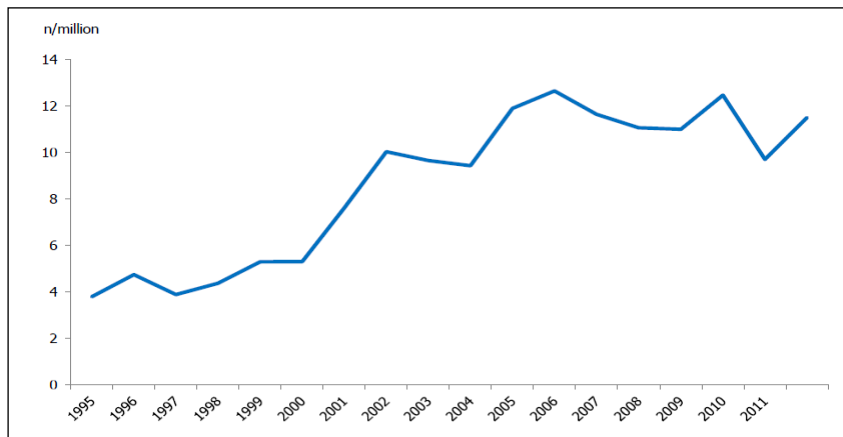


Figura 6. Evolución de las tasas de legionelosis (casos por millón de habitantes) en la Unión Europea por año de notificación, 1995 – 2012.
Fuente: European Centre for Disease Prevention and Control (2014). Legionnaire’s disease surveillance in Europe, 2012. Stockholm: ECDC.

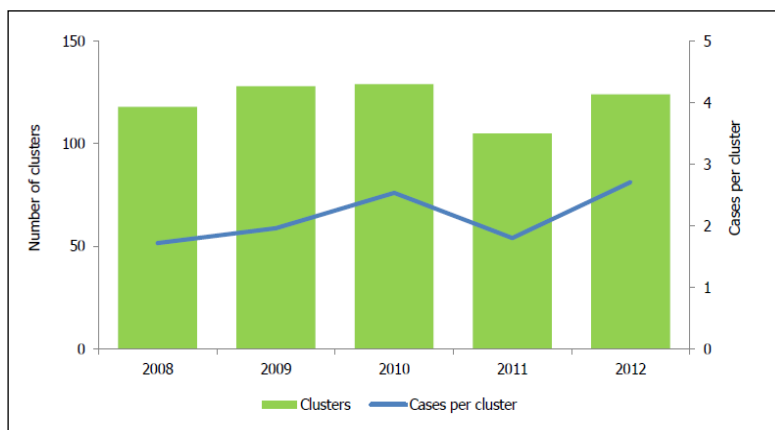


Figura 7. Evolución anual del número de brotes de legionelosis en la Unión Europea y de la media de casos por brote, 2008 – 2012.
Fuente: European Centre for Disease Prevention and Control (2014). Legionnaire’s disease surveillance in Europe, 2012. Stockholm: ECDC.

En España la legionelosis se incluyó en 1996 entre las enfermedades de declaración obligatoria y sus datos globales son agregados a través de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), que recibe las notificaciones de las distintas comunidades autónomas. En el período 1997-2011 se

declararon una media anual de 1.263 casos de legionelosis (tasa anual media de 2,9 casos por 100.000 habitantes). La tendencia, aunque con ligeras oscilaciones, se ha mantenido estable en los últimos años, con un descenso en el año 2011 (figura 8). El incremento en el periodo de 1997 a 2000 se atribuye a la introducción de la detección de antígeno en orina.

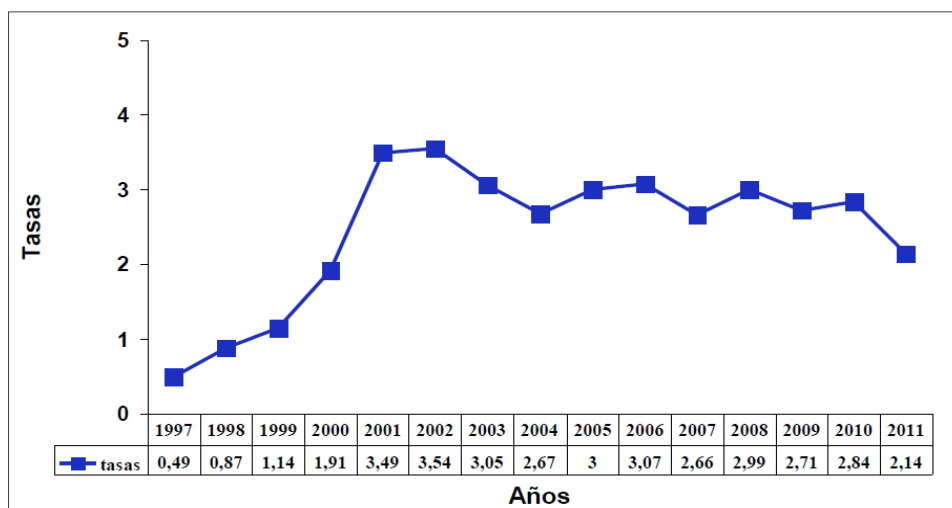


Figura 8. Evolución de la incidencia de legionelosis en España. Tasas por 100.000 habitantes, 1997-2011.

Fuente: Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III (2012). Brotes de legionelosis notificados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Años 1999 a 2011.

Durante el periodo 1999-2011 se declararon 597 brotes de legionelosis que afectaron a un total de 3.785 personas, de las que el 83% requirieron hospitalización. La mayoría de brotes, 408 en total, se produjeron en el ámbito comunitario, 36 fueron nosocomiales y 153 se asociaron a viajes. Los brotes de adquisición nosocomial afectaron a un total de 164 pacientes, de los que fallecieron 37, lo que supuso una letalidad del 22,6%. En cambio, la letalidad global en los brotes comunitarios fue mucho menor, del 3% (tabla 5).

En cuanto a la identificación de la fuente de infección, la RENAVE reporta que la investigación ha sido aportada en menos del 50% de los brotes comunitarios, aún menor en los brotes de adquisición nosocomial. Esta limitación se constata en la mayoría de países europeos: de los 4.523 casos de legionelosis declarados en Europa el año 2012, se hizo una investigación ambiental exhaustiva en 768 (16%) (European Centre for Disease Prevention and Control, 2014). Una de las principales limitaciones en el estudio del origen de los brotes es el bajo número de muestras clínicas que se pueden obtener de los pacientes, por la propia idiosincrasia de la enfermedad. Como se expondrá a continuación, la comparación de las cepas aisladas a partir de las muestras clínicas de los enfermos con las cepas ambientales es la base no sólo para el control de los brotes sino también para un mejor conocimiento de las fuentes de infección y los mecanismos de transmisión de *Legionella*.

Tabla 5. Brotes de legionelosis comunitarios y nosocomiales en España. Evolución temporal, casos y fallecidos, 1999-2011.

Brotes comunitarios					Brotes nosocomiales				
Año	Nº brotes	Nº casos	Media casos	Letalidad	Año	Nº brotes	Nº casos	Media casos	Letalidad
1999	8	78	9,8	7,7	1999	2	8	4,0	50,0
2000	12	243	20,3	4,9	2000	5	28	5,6	28,6
2001	19	716	37,7	1,0	2001	6	41	6,8	31,7
2002	34	329	9,7	2,4	2002	6	29	4,8	17,2
2003	39	212	5,4	2,4	2003	2	10	5,0	20,0
2004	36	187	5,2	5,9	2004	2	8	4,0	12,5
2005	57	367	6,4	3,3	2005	1	9	9,0	11,0
2006	34	257	7,6	1,6	2006	3	6	2,0	1,0
2007	27	110	4,1	4,5	2007	2	7	3,5	0,0
2008	46	189	4,1	2,6	2008	3	7	2,3	14,3
2009	27	126	4,7	5,6	2009	0	0	0,0	14,3
2010	40	207	5,2	5,3	2010	1	2	2,0	0,0
2011	29	107	3,7	0,0	2011	3	9	3,0	11,1

Nota. Adaptado de Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III (2012). Brotes de legionelosis notificados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Años 1999 a 2011.

3.2. Brotes de legionelosis nosocomial: características e implicaciones

Los brotes de legionelosis nosocomial tienen como origen común el agua sanitaria. Si bien se ha reportado algún brote de legionelosis nosocomial asociado a las propias torres de refrigeración por entrada de aerosoles contaminados al interior de las habitaciones, son los diversos usos clínicos del agua las fuentes de exposición más importantes de *Legionella* en los pacientes ingresados. La inhalación de aerosoles contaminados puede ser debida a la exposición al agua de duchas o grifos aerosolizada. Pero la llegada del microorganismo al pulmón también puede producirse por microaspiraciones previa colonización orofaríngea. *Legionella* podría colonizar la orofaringe por uso directo del paciente (deglución de agua) o por la utilización de agua del grifo para usos clínicos diversos.

Debido a estos múltiples mecanismos de adquisición de *Legionella* en los hospitales, el término “brote” no sería apropiado para describir las diferentes realidades que pueden producirse en un hospital. A pesar de que se han producido claras situaciones de brote en su término clásico (elevado número de casos en un corto espacio de tiempo), la legionelosis nosocomial no siempre se presenta siguiendo este patrón. Se ha propuesto que es más adecuado el uso de los términos “caso esporádico”, “casos endémicos” o “casos hiperendémicos” (Sabria y Yu, 2002). Dado que el diagnóstico está frecuentemente infraestimado, estos términos estarían más relacionados con la intensidad de la vigilancia activa de la legionelosis que con la incidencia real de casos. En la actualidad, la detección de un solo caso de

legionelosis nosocomial se trata como un evento centinela que requiere investigación y medidas de control inmediatas.

La revisión de la literatura sobre legionelosis nosocomial permite un doble enfoque. Por un lado, existen los reportes de situaciones de endemia o hiperendemia hospitalarias en los que se relacionan los casos clínicos con la presencia de *Legionella* en el agua, y que habitualmente se publican tras la instauración de medidas de control, generalmente la desinfección del sistema. Estos trabajos se analizarán en apartados posteriores; como se verá, las legislaciones y guías técnicas vigentes en la actualidad están dirigidas mayoritariamente al control de *Legionella* en las instalaciones. Por otro lado, otros trabajos, que son los que se expondrán a continuación, han investigado el mecanismo de adquisición desde un punto de vista clínico, partiendo de la base de que *Legionella* ya estaba presente en el agua de la red de distribución.

Los casos de adquisición nosocomial de *Legionella* secundarios al uso de agua contaminada para cuidados clínicos se empezaron a publicar a partir de los años 80 y principios de los 90. Los equipos de terapia respiratoria, con nebulización de medicamentos o humidificadores de oxígeno, fueron de los primeros descritos (Arnou, Chou, Weil, Shapiro, y Kretzschmar, 1982; Mastro *et al.*, 1991; Woo, Goetz, y Yu, 1992). La utilización del agua del grifo para la hidratación a través de sonda nasogástrica también fue descrita hace años como causa de legionelosis (Blatt *et al.*, 1993; Venezia *et al.*, 1994). Estas evidencias conllevaron la sustitución progresiva del agua del grifo por agua estéril para este tipo de maniobras, y hoy en día ya se considera una práctica de seguridad universal en hospitales. Algunas legislaciones sobre *Legionella*, como la de Cataluña, especifica que estas prácticas deben aplicarse obligatoriamente en todos los centros sanitarios (Decreto 352/2004).

Con posterioridad, han aparecido publicaciones describiendo otro tipo de exposiciones que han conllevado la adquisición de *Legionella* en pacientes. La utilización de una bañera contaminada ocasionó casos mortales de legionelosis en una unidad de hematología (Brulet *et al.*, 2008). En este sentido, las piscinas utilizadas para los partos en hospitales pueden ser un nuevo reservorio de la bacteria (Teare y Millership, 2012). Otros mecanismos descritos menos frecuentemente son los relacionados con la práctica de aclarar utillaje sanitario semicrítico con agua del grifo. Levy *et al.* (2003) relacionaron el uso de un ecógrafo transesofágico que se aclaraba con agua del grifo con diversos casos de legionelosis. Las unidades de neonatos son áreas en las que la legionelosis es un riesgo conocido desde hace años (Greenberg, Chiou, Famigilletti, Lee, y Yu, 2006; Luck *et al.*, 1994; Womack, Liang, Ilagan, Weyhing, y Planas, 1992). Recientemente, se ha publicado el primer brote de legionelosis debido al uso de un humidificador por ultrasonidos en una unidad de neonatos a término (Yiallourous *et al.*, 2013). En Taiwan se produjeron dos casos de legionelosis asociados a la aspiración de nutrición enteral infantil que se había preparado con agua del grifo (Wei *et al.*, 2014): se constató que los perfiles de *L. pneumophila* obtenidos por PFGE del agua y de las muestras clínicas fueron idénticos. Otro caso recientemente descrito en neonatos fue debido a la exposición al agua de una bañera de parto natural (Fritschel,

Sanyal, Threadgill, y Cervantes, 2015). La legionelosis nosocomial infantil puede ser una enfermedad infradiagnosticada. Si bien es cierto que en los grandes brotes comunitarios la incidencia de legionelosis en este grupo poblacional es baja o nula, en el entorno hospitalario no debería descartarse esta enfermedad ante un niño con neumonía (Sabria, 2014).

En hospitales, el uso de agua para fines no asistenciales también puede ocasionar transmisiones nosocomiales. Se han descrito casos secundarios al consumo de cubitos de hielo de una máquina de un centro sanitario (Graman, Quinlan, y Rank, 1997), o a una fuente decorativa ubicada en una zona de paso (Palmore *et al.*, 2009).

Las publicaciones de brotes noscomiales en nuestro entorno son más bien escasos. El grupo de Sabrià, pionero en el reconocimiento de esta realidad, ha descrito la situación de hiperendemia de un hospital universitario corregida con medidas de desinfección sistémica (Modol *et al.*, 2007; Ragull *et al.*, 2006). Campins *et al.* (2000) reportaron cuatro casos de infección nosocomial por *L. pneumophila* serogrupo 6 en una unidad de trasplante renal pediátrico. Los casos se conocieron por análisis retrospectivo a partir de un paciente identificado en 1996. El estudio molecular evidenció el mismo patrón en muestras clínicas y ambientales; la exposición al agua de ducha fue el factor de riesgo que se identificó en todos los casos. Un brote de mayor magnitud se produjo en el año 2005 en un hospital monográfico onco-hematológico: afectó a doce pacientes de los que fallecieron tres (Gudiol *et al.*, 2007). El brote se relacionó con la presencia de concentraciones elevadas de *Legionella* en el agua caliente ebido a un mantenimiento inadecuado de las temperaturas. Bou y Ramos (2009) publicaron un brote nosocomial por *L. pneumophila* serogrupo 1 que afectó a cuatro pacientes atendidos en una unidad quirúrgica a lo largo de un mes. Se constataron deficiencias en la limpieza y desinfección de los humidificadores de oxígeno, aislándose *L. pneumophila* serogrupo 1 en los humidificadores implicados y en el agua del grifo de la misma área asistencial.

El conocimiento aportado por estas investigaciones pone de manifiesto que la prevención de la legionelosis en hospitales requiere de unos procedimientos asistenciales con regulaciones específicas sobre los usos del agua. Debido a que la erradicación completa de *Legionella* en el agua no es posible en la mayor parte de hospitales, el uso de agua estéril para maniobras que impliquen aerosoles o procedimientos semicríticos en contacto con mucosa oro-faríngea o respiratoria debería ser considerado como una precaución estándar de cuidados. Nuevas evidencias indican que el agua sanitaria es fuente de infección por microorganismos multiresistentes, como *Pseudomonas aeruginosa* o *Klebsiella* spp. (Decker y Palmore, 2013; Loveday *et al.*, 2014), por lo que la aplicación de políticas de uso seguro del agua sanitaria está siendo identificada como una necesidad emergente para la prevención de infecciones en los hospitales.

3.3. Aportación de la tipificación molecular de *Legionella*

Los aislados de *Legionella* procedentes de muestras clínicas y ambientales relacionadas en un brote de legionelosis tienen que ser contrastados para identificar la posible fuente de contagio y poder establecer una asociación epidemiológica. La ubicuidad de *Legionella* en los ecosistemas acuáticos obliga a realizar una serie de técnicas moleculares para establecer la relación clonal entre todas las cepas aisladas. Las primeras investigaciones dirigidas al confrontamiento de cepas de *Legionella* se basaron en la determinación del serogrupo (Pedro-Botet *et al.*, 1992; Tobin *et al.*, 1980). Sin embargo, la evidencia de que la mayoría de aislados obtenidos pertenecían al serogrupo 1, hizo necesaria la introducción de otros métodos para la tipificación de los aislados de *Legionella*.

Los métodos de tipificación genotípica comprenden una gran variedad de técnicas que tienen como objeto comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos. Estas técnicas permiten reconocer la relación entre aislados vinculados epidemiológicamente y, por tanto, derivados recientes de un microorganismo precursor común. A la vez, deben ser técnicas capaces de diferenciar aislados no relacionados, con independencia de su pertenencia a la misma especie microbiológica. La mayor ventaja de estos métodos radica en la estabilidad de los marcadores genéticos utilizados y en la posibilidad de aplicarlos universalmente a distintos géneros y especies de microorganismos. Los métodos de tipificación genotípica utilizados habitualmente en la actualidad son el tipado con anticuerpo monoclonal (MAb), la electroforesis en campo pulsante (PFGE), el método de secuenciación de genes (SBT) y la técnica basada en la amplificación de secuencias génicas (AFLP).

3.3.1. MAb

Esta técnica permite subdividir el serogrupo 1 de *L. pneumophila* según si presenta o no el epítipo reconocido por el MAb 3/1, comúnmente asociado a una mayor virulencia. Para esta técnica se aplica el panel de Dresden utilizando un test de inmunofluorescencia indirecta (Helbig *et al.*, 2002; Helbig, Kurtz, Pastoris, Pelaz, y Luck, 1997).

El MAb presenta como ventajas su facilidad técnica y un coste reducido, pero posee un bajo índice de discriminación comparado con otros métodos. Sin embargo, en el contexto de un brote en el que deban procesarse un número elevado de muestras resulta de gran utilidad puesto que permite excluir de entrada aquellas muestras ambientales no relacionadas con los casos clínicos.

3.3.2. PFGE

Las enzimas o endonucleasas de restricción son unas proteínas con acción catalítica que tienen la propiedad de reconocer secuencias de ADN y cortar los enlaces fosfodiéster en todos los puntos donde encuentren dicha secuencia. La secuencia de reconocimiento se denomina diana de restricción. Cada enzima de restricción tiene una diana determinada. Las variaciones en el número y en el tamaño de los fragmentos de restricción se denominan RFLPs (restriction fragment length polymorphisms).

La PFGE es un tipo especial de análisis de RFLPs basado en la utilización de enzimas de restricción de baja frecuencia de corte (macrorestricción). La digestión del ADN bacteriano con estas enzimas genera un número limitado de fragmentos (entre 10 y 30) de gran tamaño (de 10 a 800 kb). El tamaño de estos fragmentos no permite la separación por técnicas de electroforesis convencional por lo que es necesario usar un equipo de electroforesis en campo pulsante en el que la polaridad de los campos eléctricos se invierte periódicamente. La combinación de macrorestricción y PFGE se aplica a muchos estudios epidemiológicos en brotes de *Legionella* desde hace años, puesto que se había considerado hasta hace poco tiempo como el método “gold standard” (Luck, Kohler, Maiwald, y Helbig, 1995; Nguyen *et al.*, 2006; Ott, Bender, Marre y Hacker, 1991; Sabria *et al.*, 2006; Schoonmaker, Heimberger, y Birkhead, 1992; Visca *et al.*, 1999). Se trata de una técnica con un elevado poder de discriminación y gran reproducibilidad (Fry *et al.*, 1999) y permite demostrar que las cepas aisladas en pacientes afectos de legionelosis son indistinguibles de las cepas ambientales origen del contagio (Akermi *et al.*, 2006; Lanser, Adams, Doyle, Sangster, y Steele, 1990; Luck, Helbig, *et al.*, 1995; Matsui *et al.*, 2010). Sin embargo, es un proceso largo (de 2 a 5 días) y necesita un equipamiento específico, por lo que sólo algunos laboratorios lo puedan realizar.

3.3.3. SBT

En la actualidad, el European Working Group for *Legionella* infections (EWGLI) considera la SBT como la nueva metodología “gold standard” para la tipificación de *L. pneumophila* (Gaia *et al.*, 2005). Se realiza secuenciando fragmentos internos de siete genes determinados. Los resultados se reportan como tipo de secuencia o “sequence type” (ST), que resulta un descriptor fácil y cómodo de utilizar en investigaciones epidemiológicas (Casini *et al.*, 2008; Luck, Hahn, Senger, Boers y Brandsema, 2008; Scaturro, Losardo, De Ponte y Ricci, 2005). Las principales ventajas de la SBT son su rapidez y facilidad, así como su alto poder discriminación. La SBT es útil en investigaciones de prevalencia y distribución de ST de ADN en aislamientos clínicos y ambientales (Coscolla, Fenollar, Escribano y Gonzalez-Candelas, 2010; Euser, Pelgrim y den Boer, 2010; Haupt *et al.*, 2012; Rota *et al.*, 2011; Trop Skaza, Beskovnik, Storman, Kese, y Ursic, 2012). Sin embargo, algunos ST, como el ST1, pueden ser muy comunes, lo que reduce la discriminación en brotes en los que es el causante. En investigaciones de brotes llevadas a cabo en nuestro entorno, se ha observado que podía aparecer un mismo ST en patrones de PFGE diferentes (Garcia-Nunez *et al.*, 2013). A pesar de que la PFGE tiene un menor poder de discriminación que la SBT, la combinación de ambos métodos puede ser útil para caracterizar y obtener información adicional en brotes, especialmente aquellos de gran magnitud.

3.3.4. AFLP

La PCR, utilizada en los laboratorios desde hace años, presenta un gran potencial para la tipificación de aislados bacterianos. La ventaja de la PCR es la capacidad de crear millones de copias de un fragmento determinado de ADN en tan solo tres o cuatro horas y con una gran fidelidad (Tenover, Arbeit, y Goering,

1997) Una de las técnicas basadas en la PCR es la AFLP, que se basa en la restricción del ADN genómico y la posterior ligación de los fragmentos generados a unos adaptadores específicos que serán la diana para los cebadores utilizados en la PCR posterior. El producto de la PCR se separa por electroforesis convencional, obteniéndose un patrón de bandas de gran tamaño. Se trata de una técnica con un buen poder discriminatorio y de gran reproducibilidad, y que se puede llevar a cabo sin el conocimiento previo de las secuencias genómicas (Valsangiacomo *et al.*, 1995). Entre sus desventajas destaca la imprecisión del dimensionamiento de los fragmentos, que dificulta la comparación de los resultados de laboratorio con los patrones estándar. Para *L. pneumophila*, este método ha sido reemplazado por la SBT, pero continua siendo útil en análisis de los ST más comunes o en contextos con *Legionella no pneumophila* (Lindsay *et al.*, 2012).

4. Ecología de *Legionella* y su papel en el control ambiental

4.1. Fuentes naturales de *Legionella*

Las especies de *Legionella* son ubicuas en ambientes acuáticos de todo el mundo (Fliermans *et al.*, 1981). Su nicho ecológico natural son las aguas superficiales como lagos, ríos y estanques, donde forman parte de su flora bacteriana. Una única excepción es *L. longbeachae*, que se ha podido aislar en tierra húmeda y lodos, habiéndose descrito la afectación de jardineros y personas expuestas a tierras (Ruehlemann y Crawford, 1996).

Legionella se ha aislado en fuentes naturales tan diversas como agua de lluvia, aguas subterráneas (Riffard *et al.*, 2001) e incluso agua de mar (Ortiz-Roque y Hazen, 1987). La bacteria puede ser altamente tolerante a medios ácidos. Utilizando técnicas de PCR, se han podido aislar hasta cuatro especies de *Legionella* en aguas naturales del parque de Yellowstone con pH de 2,7 (Sheehan, Henson y Ferris, 2005). A pesar de su ubicuidad, las únicas fuentes acuáticas naturales de legionelosis documentadas hasta la fecha son las fuentes termales, cuyas temperaturas suelen oscilar entre los 35° y 40° (Mashiba, Hamamoto y Torikai, 1993). Desde estos reservorios naturales, *Legionella* puede colonizar los sistemas de abastecimiento de agua de consumo humano, o sistemas antropogénicos, donde las condiciones ambientales favorecen su proliferación.

4.2. El biofilm y *Legionella*

El conocimiento de la ecología de *Legionella* en relación con el biofilm es el primer paso para comprender el comportamiento de la bacteria en los sistemas de agua antropogénicos y, por lo tanto, para desarrollar y aplicar sistemas de control efectivos. El biofilm puede definirse como una comunidad compleja de microorganismos adheridos a una superficie y comunicados entre ellos a través de una matriz de sustancias poliméricas (Lindsay y von Holy, 2006). Esta matriz es una estructura altamente compleja que permite almacenar nutrientes y materiales no celulares, como minerales, cristales y productos de corrosión (Donlan y Costerton, 2002). Asimismo, las microcolonias bacterianas ubicadas en esta matriz están separadas entre ellas por una red de canales intersticiales en los que circulan nutrientes, oxígeno, genes e incluso los agentes implicados en la desinfección de los sistemas de agua antropogénicos (Prakash, Veeregowda, y Krishnappa, 2003). El biofilm es, en definitiva, un sistema de organización que proporciona a los microorganismos numerosas ventajas de supervivencia en comparación con las forma planctónicas.

Las bacterias integrantes de los biofilms son fisiológicamente diferentes de sus homólogas planctónicas, ya que se organizan de manera coordinada utilizando estrategias de cooperación no muy diferentes a las de los organismos pluricelulares (Davey y O'Toole, 2000). El cambio organizativo que supone pasar

de un estado relativamente simple como es el planctónico a una comunidad compleja y altamente diferenciada requiere estrictos mecanismos de regulación genética no del todo bien conocidos. Ello explicaría el carácter altamente dinámico de estas comunidades, que hace que puedan cambiar continuamente en el tiempo y en el espacio con el fin de proporcionar el medio más idóneo a sus comensales.

En el caso concreto de *Legionella*, su comportamiento en relación al biofilm ha sido objeto de diferentes revisiones en los últimos años (Abdel-Nour, Duncan, Low y Guyard, 2013; Declerck, 2010; Wright, 2000). Siguiendo el planteamiento de Declerck, exponemos a continuación los actuales conocimientos sobre el tema de acuerdo con las tres fases del ciclo de vida del biofilm: 1) adherencia bacteriana al sustrato; 2) maduración del biofilm; y 3) desprendimiento del biofilm y dispersión bacteriana en el entorno. La figura 9 esquematiza estas tres fases, que se describen a continuación.

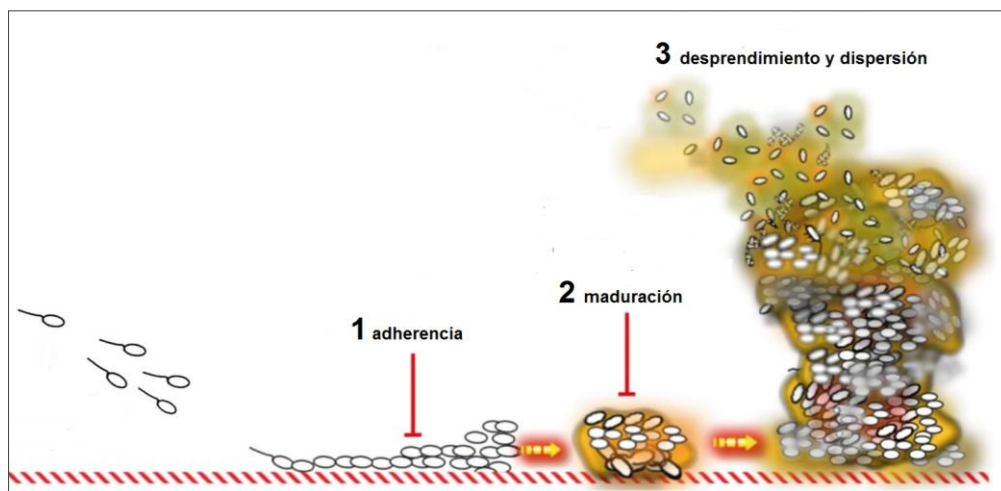


Figura 9. Representación de las fases del ciclo de vida de un biofilm tipo.
Adaptado de Rendueles, O., y Ghigo, J.-M. (2012). Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(5), 972–989.

Fase de adherencia

A diferencia de otras especies bacterianas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* o *Vibrio cholerae*, *Legionella* no forma biofilms de tipo monoespecie en condiciones naturales. Mampel *et al.* (2006) describieron que la presencia de *Legionella* en el biofilm responde más bien a la adhesión de la bacteria desde la fase acuosa (formas planctónicas) que a la replicación clonal desde la fase de biocapa (formas sésiles). Las evidencias actuales sugieren que *Legionella* se incorpora a biofilms previamente establecidos como un colonizador secundario; es decir, que en lugar de adherirse primariamente a una superficie para después desarrollar un biofilm, la bacteria establece asociaciones

con otros microorganismos previamente adheridos que ya han formado su propio biofilm (Watnick y Kolter, 2000). En biofilms multiespecies estudiados en condiciones reales, se ha demostrado que *L. pneumophila* coloniza rápidamente las comunidades ya existentes en tiempos muy cortos, de menos de dos horas (Declerck, Behets, van Hoef y Ollevier, 2007; Murga *et al.*, 2001; Vervaeren, Temmerman, Devos, Boon, y Verstraete, 2006).

Fase de maduración

Una vez incorporada en el biofilm, *Legionella* es capaz de cambiar su expresión genética para adaptarse al nuevo ambiente (Hindre, Bruggemann, Buchrieser, y Hechard, 2008). Esto le da capacidad para empezar a reproducirse y formar microcolonias embebidas en la matriz polimérica que, a su vez, van reforzando el biofilm (Rogers y Keevil, 1992). En biofilms multiespecies es ventajoso disponer de diferentes mecanismos para obtener nutrientes. En el caso de *Legionella*, estos mecanismos son dos: a) directamente desde la matriz gracias a los productos de desecho de otros microorganismos o bien de restos necróticos; y b) parasitando protozoos de los que obtiene péptidos y proteínas que degrada y utiliza como nutrientes. El conocimiento de ambos mecanismos es de gran importancia para comprender las limitaciones de los tratamientos empleados para erradicar *Legionella* de los sistemas de agua.

- a) Replicación extracelular en la matriz del biofilm: Tison *et al.* (1980) fueron los primeros en demostrar que *L. pneumophila* tiene la capacidad de crecer gracias a los productos extracelulares de otros microorganismos. En medios acuáticos gran parte de estos productos son debidos a la presencia de cianobacterias, habiéndose descrito que el crecimiento de *Legionella* está directamente relacionado con la actividad fotosintética de microorganismos como *Fisherella* spp. o *Clorella* spp. (Hume y Hann, 1984). También la presencia de bacterias heterotróficas habituales en el agua, como *Pseudomonas* spp. o *Acinetobacter* spp., favorece el crecimiento de *Legionella* gracias a la capacidad de ésta para organizarse en forma de colonias satélite alrededor de ellas (J. E. Stout, Yu y Best, 1985; Wadowsky y Yee, 1983). Finalmente, *Legionella* presenta también actividad necrotrófica: es capaz de reproducirse en medios con formas muertas de bacilos gramnegativos o protozoos, puesto que aprovecha la materia orgánica en descomposición (Temmerman, Vervaeren, Nosedá, Boon y Verstraete, 2006). Sin embargo, el comportamiento necrotrófico no es el mayoritario en la forma extracelular de la bacteria, siendo, por el contrario, la base de su nutrición en su forma intracelular.
- b) Replicación intracelular en formas libres de amebas (FLA): la replicación de *L. pneumophila* en FLA se describió por primera vez en 1980 (Rowbotham, 1980). Desde entonces, la interacción de *Legionella* con diversas FLA ha sido ampliamente estudiada, sabiéndose hoy en día que constituye la base su principal mecanismo de reproducción (Borella, Guerrieri, Marchesi, Bondi y Messi, 2005; Steinert, Hentschel y Hacker, 2002). Se han descrito hasta la fecha hasta 14 especies diferentes de FLA en las que *Legionella* puede reproducirse, siendo las más

frecuentes *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Naegleria* spp. y *Harmannella veriformis* (Fields, Benson y Besser, 2002). El inicio de la parasitación consiste en la internalización de la bacteria dentro de la ameba por un proceso de fagocitosis y formación de fagosoma intracelular. En el interior del fagosoma, *Legionella* secreta unas proteínas que inhiben la adherencia del lisosoma e interioriza componentes del retículo endoplasmático, lo que le confiere protección frente a ataques de la célula huésped (Tilney, Harb, Connelly, Robinson y Roy, 2001). *Legionella* se multiplica en el interior de esta vacuola protegida, aunque este proceso es altamente sensible a las condiciones ambientales, y muy especialmente, a la temperatura. Cuando la concentración de aminoácidos es demasiado baja para continuar con la multiplicación, *Legionella* genera flagelos que le permiten abandonar la célula huésped y abandonar la FLA por mecanismos de exocitosis no bien conocidos en los que parecen intervenir proteínas bacterianas, pero también puede causar la lisis del huésped (Silveira y Zamboni, 2010). Los cambios fenotípicos ocurridos en el paso de forma replicativa a forma infectante proporcionan ventajas adicionales a *Legionella*, como una mayor resistencia a antibióticos o a agentes biocidas, como se verá más adelante. Estas ventajas no se han demostrado en el mecanismo de reproducción extracelular, por lo que parece que el ciclo intracelular sería el preferido por *Legionella* (Temmerman *et al.*, 2006). La figura 10 muestra una imagen de una FLA con *L. pneumophila* en su interior.

Fase de desprendimiento

El desprendimiento de bacterias desde el biofilm y su dispersión en el entorno forma parte de la dinámica natural de la vida en los microorganismos que viven en superficies. *Legionella* se desprende principalmente por mecanismos de cizallamiento de agregados de biofilm debido a los efectos del flujo de agua (Donlan y Costerton, 2002). Estos desprendimientos pueden ser de diferente magnitud dependiendo principalmente de las condiciones ambientales y del tipo de flujo del agua. En síntesis, pueden diferenciarse dos tipos de desprendimiento: la erosión (eliminación continua de bacterias simples y pequeñas porciones de biofilm) y el desprendimiento a gran escala (pérdida masiva y rápida de gran cantidad de biofilm generalmente debido a factores no esperados) (Characklis, 1990). Esta segunda modalidad es la que permite que *Legionella* llegue a los humanos con una dosis infectiva (Storey, Ashbolt y Stenstrom, 2004). Finalmente, gracias a su fase intracelular en las FLA, *Legionella* tiene otras habilidades para trasladarse. Algunas especies de amebas, como *Naegleria* spp., tienen un estadio flagelar y pueden desplazarse navegando cuando las condiciones no les son favorables. Por otro lado, las amebas infectadas pueden emitir vesículas de pequeño tamaño (<5 micras) con *L. pneumophila* a concentraciones de 20 a 200 (Berk, Ting, Turner y Ashburn, 1998). Estas vesículas pueden incorporarse fácilmente a los aerosoles, que son los que transportarían la bacteria hasta largas distancias.

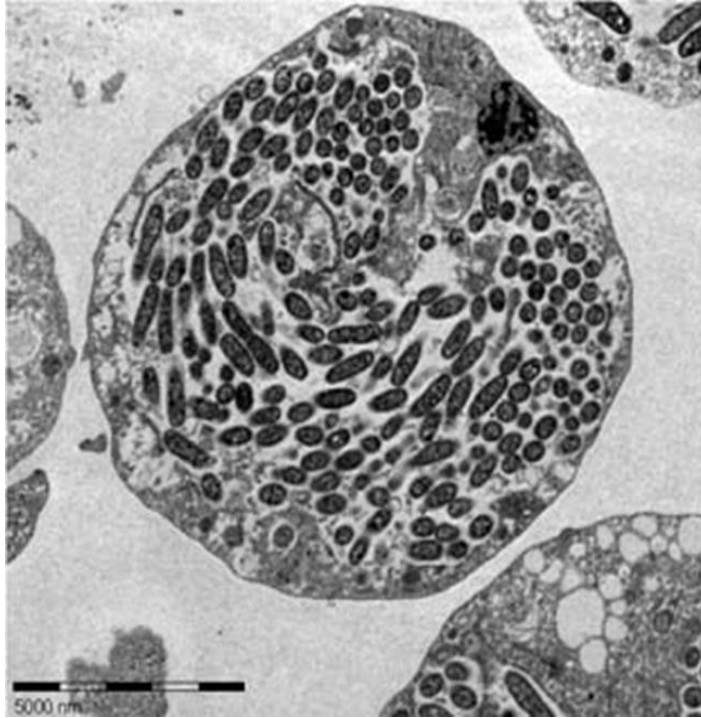


Figura 10. Fotografía con microscopía electrónica de un espécimen de *Hartmannella vermiformis* con *L. pneumophila* en su interior.

Fuente: Holland/Özel, Robert Koch-Institut. Accedido el 14 de septiembre de 2015 desde: <http://www.rki.de/EN/Content/Institute/DepartmentsUnits/JuniorGroups/LEGIA.html>

4.3. Influencia de la temperatura

El comportamiento de *Legionella* en relación a la temperatura del agua es bien conocido desde hace años y es lo que ha permitido hasta la fecha establecer las medidas básicas de control en los sistemas de agua antropogénicos. Una de las características de *Legionella* es que es capaz de sobrevivir en un amplio intervalo de condiciones físico-químicas. Se multiplica entre los 20°C y los 45°C, siendo el rango de temperatura óptimo para ello de 37°C a 43°C. A partir de 60° C muere rápidamente y con 70°C se destruye casi inmediatamente. Cabe destacar que a pesar de que temperaturas entre 45°C y 55°C no son las óptimas para *Legionella*, le permiten alcanzar concentraciones más elevadas que otras bacterias presentes en el medio acuático, por lo que presenta de manera inherente una ventaja selectiva frente a otros microorganismos. La figura 11 resume los niveles de temperatura sobre el comportamiento de *Legionella*.

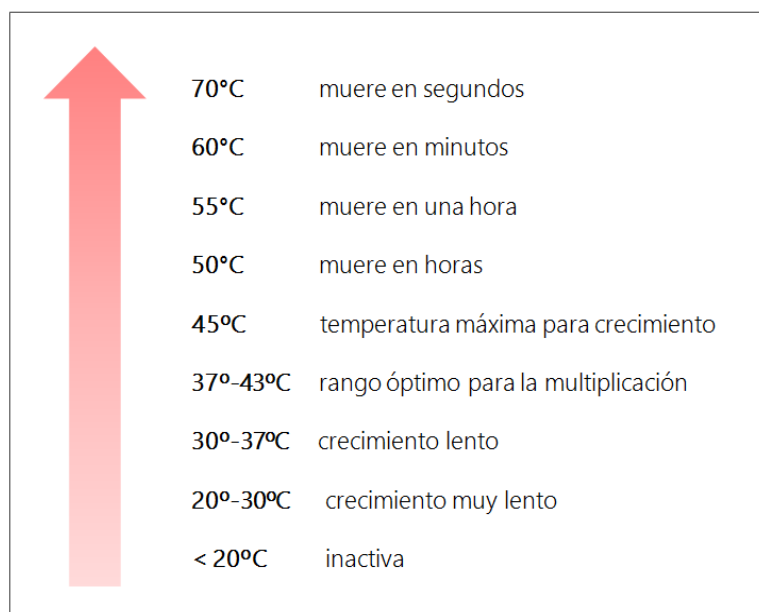


Figura 11. Niveles de temperatura y comportamiento de *Legionella*.

Un aspecto estudiado desde hace años es el denominado tiempo de reducción decimal aplicado a *Legionella* (“Decimal reduction time” en inglés, expresado como D). Se define como el tiempo requerido para destruir el 90% de una población de microorganismos a una temperatura constante, y se admite que es la unidad de resistencia microbiana al calor. Por ejemplo, un valor de D de 5 minutos a 60°C para un determinado microorganismo ($D_{60^\circ C} = 5$ minutos) indica que se requieren 5 minutos de exposición a 60°C para reducir la concentración de una suspensión de ese microorganismo en 1 log o el 90%. Los trabajos publicados al respecto presentan pequeñas variaciones en los valores de D para *Legionella*. En el caso concreto de *L. pneumophila*, el $D_{50^\circ C}$ oscilaría entre 80 y 124 minutos, el $D_{55^\circ C}$ sería de 19 minutos y el $D_{60^\circ C}$ estaría situado entre los 2 y 3,2 minutos (Dennis, Green y Jones, 1984; Schulze-Robbecke, Rodder y Exner, 1987; Stout, Best y Yu, 1986). Otras especies de *Legionella*, como *L. micdadei*, son más termotolerantes (Stout *et al.*, 1986). La figura 12 es una representación gráfica de estos parámetros.

La viabilidad de la bacteria en relación a la temperatura puede tener relación con su ciclo de reproducción. En el caso de las formas intracelulares, una vez *Legionella* se encuentra fagocitada en el interior de las FLA su supervivencia depende de la temperatura del agua: a 22°C es digerida por la ameba y no prospera, mientras que a 35°C puede proliferar en su interior (Rowbotham, 1980). La temperatura también afecta la expresión de los flagelos, siendo el rango de mayor expresión en 30°C a 37°C (Ott, Messner, Heesemann, Marre y Hacker, 1991).

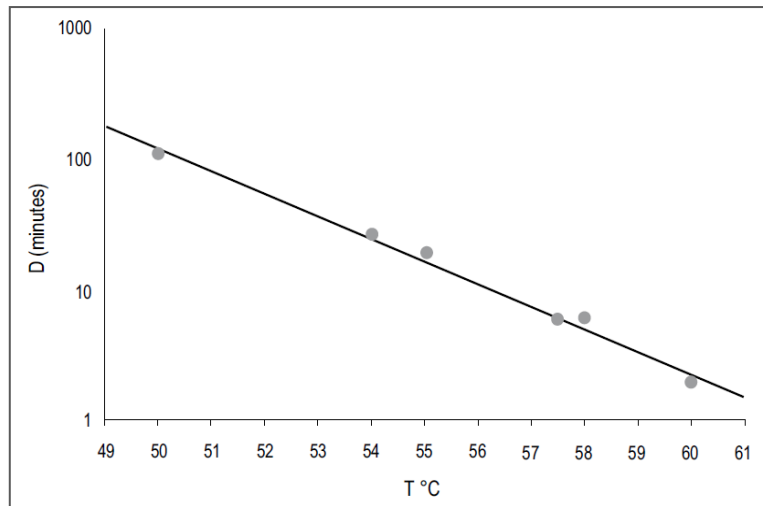


Figura 12. Tiempo de reducción decimal (D) en minutos de *L. pneumophila* a diferentes temperaturas.
Fuente: Bartram J. (2007). *Legionella and the prevention of legionellosis*. World Health Organization.

Otro aspecto interesante es la influencia de la temperatura sobre el grosor y adherencia del biofilm. Piao *et al.* (2006) han descrito que los biofilms formados a 25°C presentan su imagen más habitual de hongo aplanado, con canales de agua internos y conteniendo *L. pneumophila* con su forma alargada clásica. Por el contrario, los biofilms formados entre 37°C y 42°C mostraron una extensión de biofilm de mayor superficie, sin los típicos canales de agua y con una gran densidad microbiana. Asimismo, *L. pneumophila* presentó forma filamentosa. La traducción de estos hallazgos obtenidos a nivel experimental a las condiciones reales en sistemas de agua antropogénicos es difícil de esclarecer hasta el momento. Pero parece que la morfología de los biofilms a temperaturas más elevadas les permitiría incrementar más rápidamente su biomasa, obtener mayor cantidad de nutrientes y dispersar *Legionella* en mayores cantidades cuando las condiciones son favorables.

4.4. Influencia de otros factores físico-químicos

Además de la temperatura, existen otros factores físico-químicos de diversa índole que determinan la formación y el crecimiento del biofilm con *Legionella*. Diversos estudios han analizado el papel de los cationes (calcio, magnesio o zinc), del pH y de la disponibilidad de carbono como iniciadores o favorecedores de la colonización del biofilm, entre otros (Abdel-Nour *et al.*, 2013). En el contexto de esta tesis, hemos creído de mayor interés resumir las evidencias relacionadas con el régimen del flujo de agua y el tipo de material empleado en las conducciones de agua.

Clásicamente, el estancamiento o baja circulación del flujo de agua ha sido reconocido como una de las condiciones que más favorecen el crecimiento de *Legionella* en los sistemas de agua antropogénicos

(Ciesielski, Blaser y Wang, 1984; Harper, 1988). Sin embargo, más recientemente han aparecido publicaciones en las que se demostraba la persistencia de los biofilms en sistemas de agua con flujo turbulento (Storey *et al.*, 2004; Lehtola *et al.*, 2007). Además, el trabajo de Storey, realizado en ambiente simulado, detectó que en condiciones de flujo turbulento se desprenden grandes cantidades de biofilm de su sustrato, movilizándose más del 90% de la *Legionella* en fase sesil a la fase acuosa.

Otro trabajo analizó el efecto del tipo de flujo sobre el crecimiento de *Legionella* en un modelo de tuberías bajo condiciones controladas (Liu *et al.*, 2006). Los autores reprodujeron tres tipos de flujo: turbulento (número de Reynolds, Re , >10.000), laminar ($Re <1.000$) y estancado ($Re=0$) en tres conducciones diferentes todas ellas conectadas a un mismo depósito, en el cual se introdujo un inóculo controlado de *L. pneumophila*. A lo largo de cinco semanas se cultivaron muestras de los biofilms y la fase acuosa. En contra de lo esperado, las menores concentraciones de *Legionella* se obtuvieron en la conducción de flujo estancado, mientras que la conducción de flujo turbulento fue la que presentó mayores concentraciones. Teóricamente, a igual diámetro de una conducción, las velocidades elevadas del agua se traducen en una mayor erosión, lo que propiciaría el desprendimiento de biofilm y, por tanto, una menor formación del mismo en el sustrato. La principal explicación aducida por los autores a esta contradicción fue que la pérdida de biofilm por erosión se compensaba por ganancia del mismo a través de transferencia de masa desde la fase acuosa. Ohl, Horn y Hempel (2004) ya habían descrito que cuando se aumenta la velocidad en a fase acuosa, el biofilm tiene una mayor densidad, probablemente porque el aporte de oxígeno y nutrientes es mayor y facilita su crecimiento. Por el contrario, en un flujo estancado, el bajo aporte de los mismos no favorecería la proliferación del biofilm. La traducción práctica de estos resultados obtenidos bajo condiciones simuladas no parece ser posible hasta la fecha por la falta de estudios controlados en sistemas de agua reales.

Otro factor importante que regula la adherencia de *Legionella* en sistemas de agua antropogénicos es la composición del material de conducción del agua. Sin embargo, son escasas las publicaciones que han analizado este fenómeno en condiciones controladas. De manera genérica, se sabe que tanto la naturaleza hidrofóbica-hidrofílica de las superficies como su capacidad para proporcionar o mantener unos niveles adecuados de nutrientes son dos de los factores que determinan el desarrollo de biofilms. Las superficies plásticas, por ejemplo, desprenden bajas cantidades de iones metálicos, por lo que no resultan tóxicos para las células y en cambio contribuyen a su metabolismo (Colbourne y Ashworth, 1986). Un trabajo pionero en este aspecto fue el de Rogers *et al.* (1994), en el que se diseñó un sistema para medir la evolución del biofilm con *Legionella* reproduciendo las condiciones reales de los sistemas de agua. Las menores concentraciones de *Legionella* correspondieron a las superficies con cobre y polietileno, seguido del acero inoxidable y el polipropileno, siendo el latex el material con mayor cantidad. La capacidad de las tuberías de cobre para inhibir o reducir el crecimiento del biofilm con *Legionella* ya había sido descrita con anterioridad (Schofield y Locci, 1985) y en otro estudio más reciente que incluía también material elastomérico habitualmente utilizado en el ámbito doméstico (Moritz, Flemming y

Wingender, 2010). Se desconoce si estas diferencias son debidas a interacciones directas entre *Legionella* y el material en cuestión o bien si el cobre facilitaría una primera colonización por bacterias resistentes al mismo que establecerían competencia directa con *Legionella* evitando su integración en el biofilm.

Estos trabajos tienen en común que, a pesar de que trataron de reproducir unas condiciones lo más apreciadas posible a la realidad, su duración fue de pocas semanas. El único trabajo que ha analizado estos efectos durante un período de tiempo prolongado es el de van der Kooij, Veenendaal y Scheffer (2005), quienes constataron que si bien en un principio las tuberías de cobre presentaban una menor colonización por *Legionella* que las de acero y las de polietileno, al cabo de dos años las concentraciones se igualaban y desaparecía el efecto inhibitor del cobre. Los autores lo justificaron por la aparición de productos de corrosión, que actúan como nicho de nutrientes. Tal y como se ha apuntado antes, la aplicación práctica de estos hallazgos resulta complicada y, hasta la fecha persisten incertidumbres sobre el material idóneo para minimizar la presencia de *Legionella* en instalaciones.

4.5. Bases microbiológicas de la resistencia de *Legionella* a los métodos de desinfección

La eliminación de *Legionella* en sistemas de agua antropogénicos presenta múltiples y complejos problemas debido a que los métodos de desinfección deberían actuar en diferentes niveles: la propia bacteria, las FLA y la estructura del biofilm. Por otro lado, una erradicación masiva de formas bacterianas probablemente comporta un efecto rebote de mayor crecimiento posterior, ya que *Legionella* tiene un comportamiento necrofítico y puede obtener energía de materia orgánica en descomposición. Determinados métodos de desinfección, pues, podrían incluso seleccionar las formas más resistentes en el biofilm (Van der Kooij *et al.*, 2005). Como se verá más adelante, este fenómeno ha sido estudiado en relación a los tratamientos de choque en instalaciones de agua caliente sanitaria.

Es difícil establecer si los mecanismos de resistencia se deben únicamente a la protección que le ofrecen las FLA en su ciclo de vida intracelular o a algún mecanismo sinérgico con el propio biofilm. De manera general, la flora bacteriana de los biofilms presenta mayor resistencia a los biocidas debido a que la matriz reduce la penetración de los principios activos, dificultando su acceso a las formas sesiles ubicadas más profundamente. Este fenómeno, postulado por Costerton *et al.* (1994) se presenta esquematizado en la figura 13. Por otro lado, se sabe que *L. pneumophila* aislada en biofilms es más resistente que las formas libres (Emtiazi *et al.*, 2004). Es más, *L. pneumophila* aislada a partir de una superficie sólida es más resistente a los desinfectantes yodóforos que las formas cultivadas en medio líquido, lo que sugeriría que existen diferencias metabólicas entre las formas sesiles y las formas planctónicas (Cargill *et al.*, 1992). Este hallazgo sería consistente con el hecho de que ambas formas tienen diferentes perfiles de expresión genética (Hindré *et al.*, 2008).

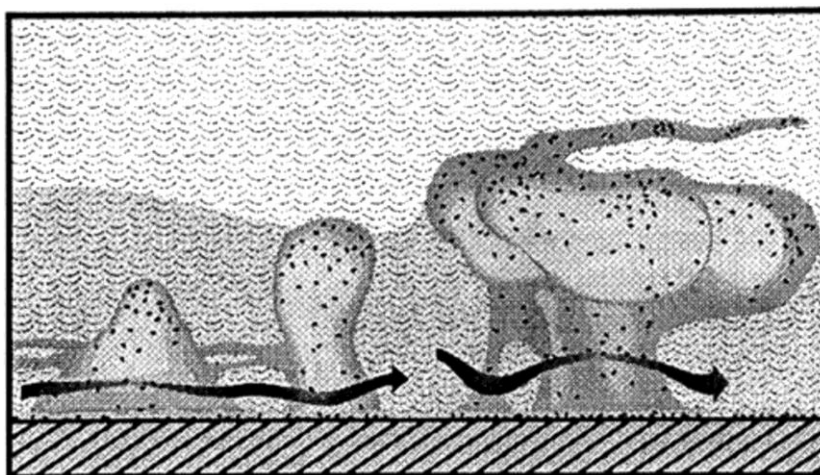


Figura 13. Modelo de los canales de agua según Costerton *et al.*
 Fuente: Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., y James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*, 176(8), 2137–2142.

El fenómeno que más se ha estudiado es la asociación de *Legionella* con las FLA y, en particular, con los quistes. En general, los trofozoítos son bastante sensibles a la mayoría de desinfectantes, pero sus quistes son mucho más resistentes. Numerosos trabajos han reportado que pueden resistir a la acción de hipoclorito, dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno y otros desinfectantes empleados en el ámbito clínico como las biguanidas y los compuestos de amonio cuaternario (Thomas *et al.*, 2010). Ello explicaría la persistencia de los protozoos en biofilms a pesar de la aplicación de métodos de desinfección (Kuiper *et al.*, 2004; Schwartz *et al.*, 2003). Pero, a diferencia de virus, bacterias y hongos, no existe un estándar unificado para cuantificar la actividad de los desinfectantes frente a las amebas. En los escasos estudios publicados se observan variaciones en el tipo de cepa, el tipo de exposición al desinfectante y su ulterior neutralización, así como los métodos para evaluar la actividad residual. Un estudio de Coulon *et al.* (2010) demostró que la eficacia de los desinfectantes era variable dependiendo del tipo de cepa. Los trofozoítos se inactivaron con la mayor parte de desinfectantes, excepto el glutaraldehído, pero los quistes se mostraron resistentes a todos ellos.

En su fase intraamebiana, *Legionella* se encuentra protegida frente a la acción de los desinfectantes químicos. Storey (2004), observó que los quistes de *Acanthamoeba* permanecieron viables después de un tratamiento con 100 mg/L de hipoclorito, por lo que postularon que este tipo de desinfección sería insuficiente para erradicar *Legionella* de sistemas de agua complejos. En su forma intracelular en *Acanthamoeba polyphaga*, *Legionella* resiste la acción de diversos biocidas (Barker *et al.*, 1992), así como de antibióticos como el ciprofloxacino y la rifampicina (Barker *et al.*, 1995). De manera similar, *Legionella* intracelular también puede sobrevivir durante una semana a la acción de 0,1 mg/L de plata y 1 mg/L de cobre, a diferencia de las formas planctónicas que sólo sobreviven durante 30 minutos

(Hwang *et al.*, 2006). Se ha observado también que después de la desinfección de un sistema, *Legionella* preservada en el interior de los quistes es capaz de recolonizar más partes de este sistema (Thomas *et al.*, 2004). Este fenómeno se agravaría si los niveles de desinfectante no se mantienen constantes.

Los quistes también interfieren en los sistemas de desinfección físicos. En el mismo trabajo de Storey los quistes de *Acanthamoeba* resistieron una temperatura de 80°C durante 10 minutos, mientras que con estos niveles todos los trofozoítos fueron inactivados. La radiación ultravioleta inactiva los protozoos, pero a diferencia de las bacterias se requiere una mayor intensidad para que sea efectiva (Hijnen *et al.*, 2006). La localización del biofilm también podría jugar un papel en la resistencia a la desinfección. En el caso de la radiación ultravioleta, los biofilms formados en sedimentos confieren una mayor protección a *L. pneumophila* (Kusnetsov *et al.*, 1994).

Entre las escasas publicaciones sobre este tema cabe destacar las recientes aportaciones del grupo de Cervero-Aragó. En un primer trabajo (Cervero-Aragó *et al.*, 2014), los autores evidenciaron que una temperatura de 50°C era relativamente efectiva para reducir los trofozoítos de diferentes especies de *Acanthamoeba* y *Hartmannella*, pero no los quistes, mientras que a partir de 60° se obtuvieron reducciones significativas en ambos estadios. En el segundo (Canals *et al.*, 2015), se objetivó que en muestras de agua obtenidas de edificios a temperaturas elevadas (54°C de promedio), el porcentaje de FLA era significativamente menor que en muestras con menor temperatura. El tercer trabajo analizó específicamente el efecto del cloro y de la temperatura sobre *Legionella* en forma libre y asociada a FLA (Cervero-Aragó, Rodríguez-Martínez, Puertas-Bennasar y Araujo, 2015). Observaron que en las formas libres el tiempo de reducción de 4 logs presentaba un punto de inflexión a los 55°C, en comparación a los 50°C, en especial para *L. pneumophila* serogrupo 1 (10 minutos y 117 minutos, respectivamente). Sin embargo, en *L. pneumophila* asociada a *Achantamoeba*, la diferencia se observó más marcada a partir de los 60°C.

En conclusión, la mayor parte de hallazgos de los estudios realizados a nivel básico indicarían que muchas de las estrategias empleadas actualmente para minimizar *Legionella* en los sistemas de agua antropogénicos difícilmente la erradicarían al 100% debido al ciclo de vida de la bacteria y a las ventajas protectoras que ofrece el biofilm.

5. Las instalaciones de agua sanitaria y *Legionella*

5.1. Características de las instalaciones de agua sanitaria

Los hospitales son edificios de alta complejidad en cuanto a los usos de agua y los sistemas de adecuación y distribución que se requieren. En términos de su temperatura, el agua de los hospitales puede ser:

- Agua Caliente Sanitaria (ACS): agua caliente para usos higiénicos y sanitarios.
- Agua Fría (AF): agua que se usa en las instalaciones de los edificios, que no ha sido sometida a ningún tratamiento de calentamiento, y que incluye tanto el agua para el consumo humano o de consumo público, suministrada a través de la red de distribución de los sistemas de abastecimiento, como el agua no apta para consumo humano que solo puede ser usada en algunas instalaciones.
- Agua Fría de Consumo Humano (AFCH): agua para consumo humano, suministrada a través de la red de distribución de los sistemas de abastecimiento de agua.

Los sistemas de ACS son instalaciones que permiten el calentamiento del agua procedente de la red general de agua fría y su posterior distribución en el edificio. La gran mayoría de hospitales tienen sistemas centralizados de producción de ACS con circuito de retorno. Estos sistemas son mantenidos en constante recirculación mediante bombas que permiten, por un lado, disponer de ACS de forma casi instantánea y, por otro, un ahorro energético considerable ya que evitan tener que desechar agua previamente calentada. De manera resumida, estas instalaciones constan de las siguientes etapas (figura 14):

- a. Acometida: es el punto de entrada del AFCH de la red general al edificio.
- b. Aljibe de AF: es el depósito en el que se acumula el AFCH. A partir del aljibe, una parte del AF se distribuye como tal en la red de AF del edificio y otra parte se incorpora al sistema de ACS
- c. Generador de calor: es el elemento o grupo de elementos encargados de elevar la temperatura del AF. En hospitales generalmente se utilizan los intercambiadores de calor, que transmiten el calor generado desde una caldera a través de un circuito cerrado denominado circuito primario.
- d. Acumulador: depósito que almacena el ACS y que permite absorber los caudales de máximo consumo sin perjuicio para la estabilidad de la temperatura del agua.
- e. Red de suministro de ACS: conjunto de tuberías que transportan el ACS en el edificio.
- f. Elementos terminales: conjunto de grifos que permiten el uso final del agua por el consumidor.
- g. Circuito de retorno: conjunto de tuberías que transportan el ACS de vuelta al acumulador.

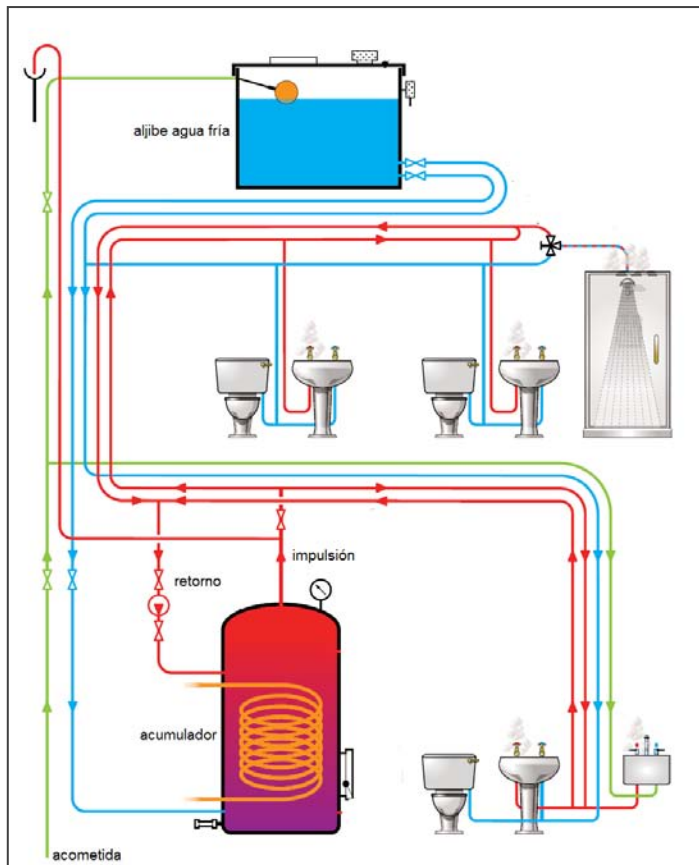


Figura 14. Esquema genérico del circuito de agua sanitaria. Adaptado de Health and Safety Executive (2013). Legionnaire's disease. The control of *Legionella* bacteria in water systems. Approved code of practice and guidance of regulations. L8 (Fourth edition).

En cuanto a los sistemas de generación de calor, los más utilizados son los intercambiadores de placas, que constan de un conjunto de placas de acero estampadas y enrolladas en espiral que permiten un elevado coeficiente de transmisión térmica y un calentamiento muy rápido del agua. Otros sistemas más complejos son los interacumuladores, que incorporan el serpentín conectado al circuito primario en el interior del acumulador. En Europa se empezaron a comercializar desde los años 2.000 un sistema de calentamiento basado en la pasteurización instantánea del agua que no precisa un depósito acumulador. Este sistema se expondrá con más detalle en el capítulo de material y métodos, por ser el empleado en el hospital objeto de la presente tesis.

Los sistemas de distribución de AF en los hospitales son independientes de los de ACS. Tienen en común la misma acometida y el aljibe. Desde aquí el AF se hace llegar a los puntos terminales mediante un sistema de tuberías de distribución sin retorno, gracias a bombas de impulsión (figura 14). A pesar de que el AFCH debe llegar con los niveles de biocida adecuados, en los aljibes de los hospitales se somete a tratamientos adicionales de cloración. Generalmente se utilizan sistemas electrónicos que realizan lecturas en continuo de los niveles de cloro y que, en caso de descenso, ponen en marcha una bomba dosificadora que inyecta hipoclorito hasta conseguir el valor deseado.

Las instalaciones de distribución del ACS y el AF hasta los puntos de uso transcurren en paralelo en el interior del edificio hospitalario. El diseño y características son difíciles de generalizar. En hospitales con unidades de hospitalización de tipo horizontal, las más comunes hoy en día, el abastecimiento a las plantas de hospitalización suele hacerse a través de montantes verticales de los que salen las distintas líneas de distribución en horizontal. Estas líneas circulan por los falsos techos, desde donde pueden ser fácilmente accesibles. Tanto en los montantes como en las líneas de distribución horizontales del ACS existe circuito de impulsión y retorno. Los tramos finales que llegan a los puntos de consumo serían los únicos que, por norma general, no disponen de recirculación (Figura 15).

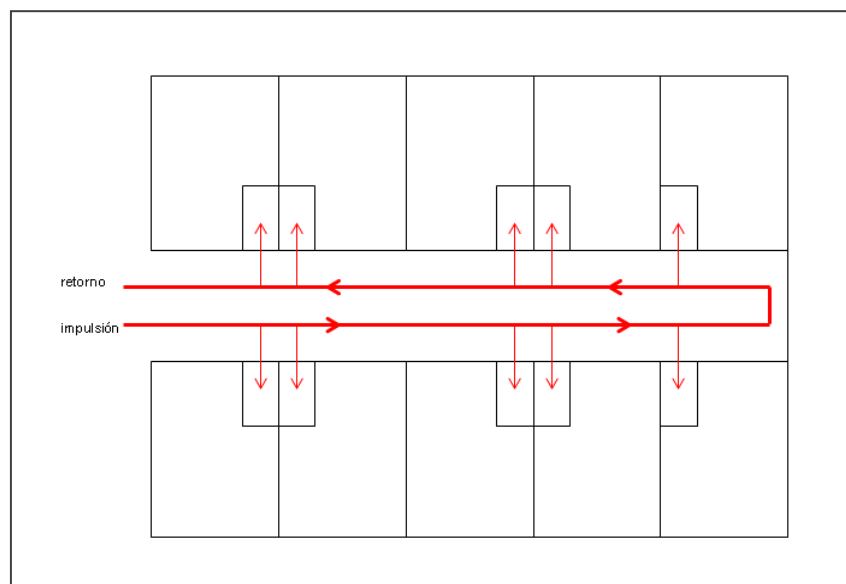


Figura 15. Recorrido y dirección del sistema de distribución de agua caliente sanitaria en una planta de hospitalización tipo.

En cuanto a los elementos terminales utilizados normalmente en los hospitales, se pueden clasificar de acuerdo a su uso (grifos comunes o duchas) o a su diseño en cuanto al accionamiento y al mecanismo de mezcla del ACS y del AF (tabla 6). Como se verá más adelante, determinados diseños son más proclives a propiciar el crecimiento de *Legionella* en su interior.

Tabla 6. Clasificación y características de las griferías utilizadas en instalaciones hospitalarias.

Tipo de grifo	Características
Grifo manual de accionamiento dual	La mezcla del ACS y el AF se hace separadamente con dos controles independientes en el mismo grifo. Habitualmente no se utilizan en hospitales por el riesgo de quemaduras en pacientes.
Grifo manual de accionamiento secuencial	La mezcla se hace con una sola palanca accionándola lateralmente, lo que permite la entrada progresiva del ACS o AF. Permiten también la regulación del caudal mediante el movimiento en vertical de la palanca.
Grifos electrónicos	Se accionan a través de sensores, habitualmente infrarrojos, sin que exista un contacto manual directo con el usuario. Requieren la instalación de una válvula termostática que regule la temperatura.
Grifos termostáticos	Son grifos mezcladores con una válvula termostática integrada. En caso de fallo en el suministro de AF, el grifo se bloquea impidiendo que salga ACS a altas temperaturas.

Un aspecto fundamental en los sistemas de ACS, e íntimamente ligado con el control de *Legionella*, son los materiales del sistema de tuberías. Dichos materiales no deben modificar las características de potabilidad de agua, puesto que el ACS está reconocida por el Código Técnico de Edificación como agua de consumo humano. Según dicho código, los materiales que pueden emplearse son o bien metálicos (acero inoxidable y cobre) o bien termoplásticos (polipropileno, polietileno, polibutileno, policloruro de vinilo y multicapa polímero/aluminio/polietileno). El acero galvanizado se permite sólo en agua fría. Aparte de estas especificaciones técnicas, y en relación con la prevención de legionelosis, se deben utilizar materiales capaces de resistir una desinfección mediante elevadas concentraciones de cloro o de otros desinfectantes o por elevación de temperatura. La tabla 7 resume las ventajas e inconvenientes de los diferentes tipos de materiales.

Tabla 7. Ventajas e inconvenientes de los materiales utilizados en los sistemas de distribución del agua en edificios hospitalarios.

Material	Ventajas	Inconvenientes
Acero galvanizado	Instalación sencilla Disponibilidad de grandes diámetros	Pérdidas de carga en la red cuando se produce corrosión o calcáreos en el depósitos interior La presencia de iones cobre en el agua favorece la corrosión galvánica y, secundariamente, la proliferación de biofilm y una deficiente desinfección
Cobre	Instalación sencilla Admite desinfección térmica y química. Limita la formación de biofilm por la acción bactericida de contacto	Es difícil encontrar materiales normalizados para dimensiones grandes. Posibilidad de corrosión por erosión/cavitación en tubos recalentados mucho tiempo
Acero inoxidable AISI 304/304L	Adaptado a aguas corrosivas y agresivas Soporta la desinfección química	Coste elevado e instalación difícil La presencia de cloruros favorece los procesos de corrosión, y, secundariamente, la proliferación de biofilm
Polivinil-cloruro (PVC)	Admite bien las aguas corrosivas Material muy resistente y autoextinguible Soporta la desinfección química	Puede ser poco resistente al calor (>60 °C) Produce gases tóxicos si se quema Su eliminación inadecuada puede perjudicar el medioambiente
Polietileno (PVC) Polietileno de alta densidad (PEHD)	Admiten bien las aguas corrosivas Soportan la desinfección térmica y química No se fragilizan	Coste elevado No producen llama pero sí humos No son autoextinguibles
Polibutileno (PB) Polipropileno (PP)	Admiten bien las aguas corrosivas Soportan la desinfección térmica y química No se fragilizan	Coste elevado No producen llama pero sí humos No son autoextinguibles

Nota. Adaptado de Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2007). Guía técnica para la prevención y control de legionelosis en instalaciones.

5.2. Normativa de aplicación en instalaciones hospitalarias

El marco normativo actual que regula la prevención de la legionelosis en el Estado Español es al Real Decreto 865/2003 de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. En este Decreto, se faculta al Ministerio de Sanidad y Consumo para que elabore las normas necesarias para la actualización de los anexos técnicos que contiene en forma de guías técnicas. En este apartado expondremos de manera resumida los principales requerimientos exigidos en el RD 865/2003 en relación a las instalaciones sanitarias y se hará mención de normativas similares aplicadas en otros países. No se pretende presentar una revisión exhaustiva de la legislación, sino hacer hincapié en aquellas medidas que pueden ser controvertidas, o incluso

contradictorias, con respecto a las evidencias aportadas por estudios realizados a nivel básico o de campo.

El RD 865/2003 incluye en su artículo 7 las medidas preventivas genéricas en las instalaciones de agua de consumo humano, entre las que cabe destacar:

- a) Garantizar la total estanqueidad y la correcta circulación del agua, evitando su estancamiento, así como disponer de suficientes puntos de purga para vaciar completamente la instalación.
- b) Facilitar la accesibilidad a los equipos para su inspección, limpieza, desinfección y toma de muestras.
- c) Utilizar materiales capaces de resistir una desinfección mediante elevadas concentraciones de cloro o de otros desinfectantes o por elevación de temperatura, evitando aquellos que favorezcan la formación de biofilm en el interior de las tuberías.
- d) Mantener la temperatura del agua en el circuito de AF lo más baja posible procurando, donde las condiciones climatológicas lo permitan, una temperatura inferior a 20°C, para lo cual las tuberías estarán suficientemente alejadas de las de agua caliente o, en su defecto, aisladas térmicamente.
- e) Garantizar que, si la instalación interior de AF de consumo humano dispone de depósitos, éstos estén tapados con una cubierta impermeable. Si se encuentran situados al aire libre estarán térmicamente aislados. Si se utiliza cloro como desinfectante, se añadirá al depósito mediante dosificadores automáticos.
- f) Asegurar, en todo el agua almacenada en los acumuladores de agua caliente finales una temperatura homogénea y evitar el enfriamiento de zonas interiores que propicien la proliferación de la flora bacteriana.
- g) Mantener la temperatura del agua, en el circuito de agua caliente, por encima de 50°C en el punto más alejado del circuito o en la tubería de retorno al acumulador. La instalación debe permitir que el agua alcance una temperatura de 70°C. Cuando se utilice un sistema de aprovechamiento térmico en el que se disponga de un acumulador conteniendo agua que va a ser consumida y en el que no se asegure de forma continua una temperatura próxima a 60°C, debe garantizar que se alcance una temperatura de 60°C en otro acumulador final antes de la distribución hacia el consumo.

En el artículo 8 se exponen los requerimientos que deben cumplir los programas de mantenimiento de las instalaciones consideradas de mayor probabilidad para la proliferación y dispersión de *Legionella*, entre las que se encuentran los sistemas de ACS con acumulador y circuito de retorno. Entre ellos, cabe destacar:

- a) Revisión y examen de todas las partes de la instalación para asegurar su correcto funcionamiento, estableciendo los puntos críticos, los parámetros a medir y los procedimientos a seguir, así como la periodicidad de cada actividad.
- b) Elaboración de un programa de tratamiento del agua, que asegure su calidad. Este programa incluirá productos, dosis y procedimientos, así como introducción de parámetros de control físicos, químicos y biológicos, los métodos de medición y la periodicidad de los análisis.
- c) Elaboración de un programa de limpieza y desinfección de toda la instalación para asegurar que funciona en condiciones seguridad, estableciendo claramente los procedimientos, productos a utilizar y dosis, precauciones a tener en cuenta, y la periodicidad de cada actividad.

El anexo 3 del RD 865/2003 y la Guía técnica para la prevención y control de la legionelosis en instalaciones del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2007) desarrollan con mayor detalle la aplicación de los requerimientos anteriormente especificados. Se presentan de manera resumida en las tabla 8.

Tabla 8. Principales actuaciones preventivas en los sistemas de agua sanitaria y su periodicidad, de acuerdo con el Real Decreto 865/2003.

Elemento	Actuación	Periodicidad
Aljibes	Realizar un tratamiento de limpieza y desinfección	Anual
	Comprobar por inspección visual que no presentan suciedad, corrosión o incrustaciones	Trimestral
	Comprobar el nivel de cloro	Diaria
Acumuladores	Realizar un tratamiento de limpieza y desinfección	Anual
	Comprobar por inspección visual que no presentan suciedad, corrosión o incrustaciones	Trimestral
	Comprobar la temperatura	Diaria
Grifos y duchas	Realizar un tratamiento de limpieza y desinfección	Anual
	Comprobar por inspección visual que no presentan suciedad, corrosión o incrustaciones	Trimestral
	Comprobar la temperatura	Mensual
	Abrir puntos de bajo consumo, dejando correr el agua unos minutos	Semanal
	Comprobar el nivel de cloro	Diaria

A nivel europeo, pocos países han desarrollado legislaciones o guías técnicas oficiales específicas con las medidas de prevención para el control de *Legionella* en instalaciones. Algunos países miembros de la Unión Europea las engloban de manera escueta en regulaciones genéricas de la calidad biológica del

agua de consumo humano o de seguridad y salud en el trabajo (European Agency for Safety and Health at Work, 2011). La calidad y el enfoque de las guías técnicas disponibles en Europa es variable, aunque la gran mayoría son compilaciones bastante exhaustivas. En las indicaciones referentes a las temperaturas aconsejables en las instalaciones y a las medidas dirigidas a minimizar el estancamiento de agua se observan diferencias de criterio. En la tabla 9 se detallan las guías y documentos técnicos analizados en la presente revisión. En la tabla 10 se resumen los aspectos relacionados con la temperatura y las medidas anti-estancamiento de la guía y legislaciones europeas.

Tabla 9. Principales guías y documentos técnicos de prevención de legionelosis en instalaciones de riesgo en países europeos y en EEUU.

Bélgica	Ministère des Affaires Sociales, de la Santé Publique et de l'Environnement. Conseil Supérieur d'Hygiène (2002). Recommandations pour la prevention des infections a <i>Legionella</i> dans les établissements de soins (CSS 7509).
Francia	Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé. Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (2012). Maîtrise du risque de développement des légionelles dans les réseaux d'eau chaude sanitaire Défaillances et préconisations
Alemania	DVGW German Technical and Scientific Association for Gas and Water (2004). Technical rule. W551 Code of Practice. Drinking water heating and drinking water piping systems; technical measures to reduce <i>Legionella</i> growth; design, construction, operation and rehabilitation of drinking water installations.
Reino Unido	Department of Health (2014). Water systems. Health Technical Memorandum 04-01: The control of <i>Legionella</i> , hygiene, "safe" hot water, cold water and drinking water systems. Part A: design, installation and testing. Health and Safety Executive (2013). Legionnaire's disease. The control of <i>Legionella</i> bacteria in water systems. Approved code of practice and guidance of regulations. L8 (Fourth edition).
Irlanda	Health Protection Surveillance Centre (2009). National Guidelines for the Control of Legionellosis in Ireland.
Austria	Erwärmungsanlagen (2007). Hygienic aspects of the planning, construction, operation, maintenance, surveillance and rehabilitation of central heating installations for drinking water, ÖNORM B5019.
Suiza	Office Fédérale de la Santé Publique (2009). Legionelles et légionellose.
EEUU	Allegheny County Health Department (2014). Updated Guidelines for the Control of <i>Legionella</i> in Western Pennsylvania
EEUU	American Society of Heating Refrigerating and Air-Conditioning Engineers (2014). ASHRAE Standard Project Committee 188 (SPC 188). Prevention of legionellosis associated with building water systems
EEUU	Occupational Safety y Health Administration (1999). OSHA technical manual, TED 01-00-015, section III, chapter 7: Legionnaires' disease
EEUU	Association of Water Technologies, 2003. <i>Legionella</i> 2003: An Update and Statement by the Association of Water Technologies (AWT). Rockville, MD: Association of Water Technologies.

Tabla 10. Requerimientos en los niveles de temperatura y acciones para minimizar el estancamiento de agua en las principales guías técnicas europeas específicas para el control de legionelosis.

País	Temperatura agua fría	Temperatura agua caliente sanitaria	Recomendaciones anti-estancamiento
Bélgica	<25°C	Entre 50°C y 55°C en puntos de consumo	Recomendado pero sin especificar acciones concretas
Francia	No especificado	>50°C en puntos de consumo	Dimensionamiento adecuado de la red de distribución para minimizar circulaciones deficientes.
Alemania	No especificado	≥55°C en puntos de consumo	No especificado
Reino Unido	<20°C	≥55°C incluso en los puntos de consumo más distales >50°C en el retorno	Abrir los puntos de bajo consumo con una frecuencia semanal, o mayor en instalaciones hospitalarias. Siempre que sea posible, eliminar los puntos de consumo que no se utilicen, desinstalando tramos muertos asociados.
Irlanda	<20°C	>50°C en los puntos de consumo, alcanzándose durante el primer minuto de abertura >50°C en el retorno	Abrir los puntos de bajo consumo con una frecuencia semanal. En unidades hospitalarias de alto riesgo, la frecuencia debe ser diaria. El tiempo de abertura es de 3 minutos para el AF y el ACS, una vez ésta ha alcanzado la temperatura estabilizada.
Austria	No especificado	≥55°C en puntos de consumo	Evitar un dimensionamiento excesivo de la red. Eliminar tramos muertos de tuberías.
Suiza	<20°C	≥55°C en los puntos de consumo en los dos primeros minutos de abertura	Dimensionamiento adecuado de la red de distribución para minimizar circulaciones deficientes.

En EEUU se han desarrollado diversas guías de prevención de legionelosis a nivel estatal, federal y local. El principal objetivo de la mayor parte de ellas ha sido, hasta no hace mucho, la estandarización de las acciones correctivas una vez se ha instaurado un brote, generalmente las medidas básicas de desinfección y la metodología a seguir en los estudios epidemiológicos. Estas guías presentan variaciones en cuanto a su alcance y además, en algunos casos, se observan recomendaciones contradictorias entre ellas (Parr, Whitney y Berkelman, 2014). En cuanto al posicionamiento de organizaciones de salud pública, cabe citar en primer lugar la guía de prevención de legionelosis de la OMS, que incluye recomendaciones específicas para edificios, aunque poco detalladas (Bartram, 2007). Los ECDC no han elaborado directrices específicas para instalaciones y los CDC se remiten a las

recomendaciones de la ASHRAE, especificando únicamente las temperaturas del ACS en los retornos del circuito (Sehulster *et al.*, 2003). La tabla 11 resume las recomendaciones en cuanto a temperatura de guías de EEUU y la OMS.

Tabla 11. Requerimientos de temperatura en las instalaciones de agua caliente sanitaria indicados por organismos de EEUU y la OMS.

Organismo	Temperatura agua caliente sanitaria	Tratamientos térmicos de de corrección
Alleghency County Health Department	>50°C en los puntos de consumo >50°C en el retorno	70°C en los acumuladores y dejar fluir a 60°C-65°C en los puntos de consumo durante 30 minutos
ASHRAE	>50°C en los puntos de consumo	Periódicamente, mantener 66°C en los acumuladores y dejar fluir en los puntos terminales
OSHA	>50°C en los puntos de consumo	70°C en los acumuladores durante 24h y dejar fluir en los puntos de consumo durante 20 minutos
AWT	>50°C en los puntos de consumo	66°C en los acumuladores y dejar fluir en los puntos de consumo durante 30 minutos
CDC	>51°C en el retorno	71°C-77°C en los acumuladores y dejar fluir en los puntos de consumo durante un mínimo de 5 minutos
WHO	>50°C en los puntos de consumo	Periódicamente, dejar fluir en los puntos terminales a 60°C

5.3. Controversias en las medidas de prevención de legionelosis relacionadas con las instalaciones

Muchas de las prácticas preventivas en instalaciones que se exigen en las normativas vigentes hoy en día tienen una evidencia científica débil. Si bien se basan en estudios básicos o llevados a cabo en escenarios simulados, es muy escasa la literatura científica que extrapole la efectividad de dichas medidas a escenarios reales y complejos.

El mantenimiento preventivo de las instalaciones de ACS es una medida preventiva incluida en la gran mayoría de guías técnicas de prevención de legionelosis. Sin embargo, por la propia naturaleza de este tipo de intervenciones resulta complicado llevar a cabo estudios con un diseño experimental o de elevada evidencia científica en instalaciones reales, y los estudios descriptivos de hospitales concretos no pueden ser concluyentes. En un estudio clásico sobre los factores que contribuyen a la colonización de las aguas, Alary y Joly (1992) encontraron como variables determinantes el tamaño del hospital y la

presencia de acumuladores de gran tamaño y de intercambiadores antiguos. Un hospital que aplicó un programa de mantenimiento preventivo exhaustivo, incluyendo la desinfección de los acumuladores de ACS durante una semana anualmente, presentó un grado de colonización de sus aguas similar al de otros hospitales con programas menos exhaustivos (Vickers *et al.*, 1987). Un estudio prospectivo describió que incluso después de llevar a cabo apropiadas prácticas de ingeniería para la prevención de legionelosis en 17 hospitales en Inglaterra y Gales, el 12% de ellos presentaron recolonización de las aguas (Liu, Healing, Yeomans y Elliott, 1993). Los investigadores concluyeron que además de los programas de mantenimiento preventivo es importante monitorizar microbiológicamente las aguas de manera regular para identificar áreas de mayor riesgo. En otro trabajo llevado a cabo en un contexto de brote de legionelosis nosocomial, se realizaron tratamientos de hipercloración y se eliminaron tramos muertos de instalaciones, pero cuando se cesó la hipercloración *Legionella* volvió a crecer (Patterson, Seal, Curran, Sinclair y McLuckie, 1994). En una publicación más reciente que analizaba la efectividad de la desinfección con dióxido de cloro (Sidari *et al.*, 2004) se optimizó el sistema de ACS, retirando los ramales muertos, pero ello no se tradujo en una menor colonización del agua. Podría concluirse, pues, que un buen mantenimiento preventivo de las instalaciones es imprescindible, por razones obvias de seguridad, pero no suficiente para minimizar el riesgo de legionelosis.

Otro aspecto importante es la influencia del estancamiento del agua en la proliferación de la bacteria. La mayoría de guías técnicas y legislaciones incluyen medidas dirigidas específicamente a minimizar el estancamiento del flujo de agua en las instalaciones. Los primeros trabajos publicados al respecto relacionaron el estancamiento del agua tanto en acumuladores como en la red de distribución con una colonización relevante de *Legionella* (Ciesielski, Blaser y Wang, 1984; Harper, 1988). La red de distribución es en sí misma un amplificador del inóculo de *Legionella*. Se ha constatado que el cierre de la válvula de un tramo de tubería contaminada con *Legionella* incrementa el inóculo bacteriano hasta 35 veces: de 150 UFC/mL antes de cerrar a 5370 UFC/mL al volver a abrir (Mermel, Josephson, Giorgio, Dempsey y Parenteau, 1995). Esta observación, corroborada en otras ocasiones, podría justificar muchos brotes hospitalarios. Otro trabajo fuera del ámbito hospitalario comparó diferentes resultados físicos y microbiológicos entre sistemas de ACS con y sin recirculación (Brazeau y Edwards, 2013). Se observó que cuando la temperatura en la red de distribución de ACS era de 49°C, el riesgo de colonización por *Legionella* aumentaba en un 130% respecto a los 60°C en los sistemas con recirculación. A 60°C, por el contrario, los sistemas con recirculación no presentaban crecimiento de *Legionella* mientras que los sistemas sin recirculación presentaron un 14% de resultados positivos. Existen dos estudios realizados en edificios de viviendas que objetivaron una mayor carga de recuentos bacterianos en muestras de agua caliente obtenidas a primera hora de la mañana, tras el tiempo de reposo nocturno (Lautenschlager, Boon, Wang, Egli y Hammes, 2010) o en el primer tramo de agua del grifo (Lipphaus *et al.*, 2014).

En el ámbito hospitalario cabe destacar el reciente trabajo de Bedard *et al.* (2015), desarrollado en cinco hospitales en los que la temperatura mínima deseada del ACS fue de 55°C. Uno de los aspectos analizados fue estudiar la velocidad con la que descendía la temperatura en tramos de tubería que no estuvieran en uso. Se comprobó que al cabo de tres horas y media la temperatura del agua se había igualado con la temperatura ambiente de 20°C, tiempo durante el cual se producirían las condiciones térmicas favorables para la proliferación de *Legionella*.

Como se ha apuntado anteriormente, el efecto del tipo de flujo de agua no se ha analizado en estudios de campo controlados, aunque sí en escenarios simulados y los resultados han sido contradictorios, puesto que un flujo estancado no se traduce necesariamente en una mayor proliferación de la bacteria, mientras que un flujo turbulento sí (Liu *et al.*, 2006).

La extrapolación de las medidas anti-estancamiento a las guías técnicas es la apertura durante unos minutos de los grifos y las duchas con un bajo uso de agua con una periodicidad como mínimo semanal. No existe evidencia de la efectividad que comporta la apertura expresa de los puntos de bajo uso, aunque seguramente el coste-efectividad es elevado debido al tiempo y a los recursos humanos que deben invertirse en estos programas.

El papel de los grifos en la biología bacteriana de los hospitales ha sido estudiado con mayor detalle, siendo objeto diversas publicaciones. Uno de los aspectos más polémicos es el diferente riesgo que suponen los grifos de accionamiento automático en comparación con los grifos de accionamiento manual. Los grifos de accionamiento automático “no touch” se han ido introduciendo paulatinamente en los hospitales por ofrecer dos ventajas principales: la regulación del consumo de agua y la reducción de las contaminaciones cruzadas a través de las manos de los profesionales sanitarios. Sin embargo, pronto se constató que este tipo de griferías podían ser un reservorio importante de diversos microorganismos, especialmente bacilos gramnegativos (Assadian *et al.*, 2002; Chaberny y Gastmeier, 2004; Hargreaves *et al.*, 2001; Merrer *et al.*, 2005; van der Mee-Marquet, Bloc, Briand, Besnier y Quentin, 2005). Este fenómeno se explicaría por diversas razones: 1) debido a su función de ahorro de agua, estas griferías minimizarían el flujo en su interior, lo cual reduciría su capacidad de arrastre; 2) al unirse los conductos de ACS y AF en la parte terminal (figura 16), el agua estancada permanecería a temperaturas templadas, ideales para el sobrecrecimiento bacteriano; 3) la estructura interna de estos grifos es compleja, con múltiples piezas, y con materiales susceptibles de favorecer el crecimiento del biofilm.

Halabi *et al.* (2001) estudiaron la calidad bacteriológica del agua de 38 grifos de accionamiento automático en un hospital australiano, de los cuales 10 mostraron crecimiento de *Legionella*. El análisis del origen de la contaminación en las muestras positivas encontró que las válvulas magnéticas y la parte interna de los propios grifos estaban altamente colonizadas por *Legionella*, mientras que las tuberías de alimentación de agua de esos mismos grifos estaban libres de la bacteria. Un tiempo después, (Sydnor

et al., 2012) publicaron un trabajo cuyos resultados preliminares, por su trascendencia, ya habían implicado un posicionamiento conjunto de la American Society for Healthcare Engineering, ASHE, y la Association for Professionals in Infection Control y Epidemiology, APIC (ASHE-APIC, 2011). El trabajo reportó que la gran mayoría de los grifos accionados automáticamente del Johns Hopkins Hospital estaban colonizados con *Legionella* y que su desinfección con 5 ppm de dióxido de cloro no fue capaz de erradicarla por completo, aunque sí reducir el porcentaje de colonización equiparándolo al de los grifos de accionamiento manual. *Legionella* se aisló en diferentes piezas internas de los grifos automáticos, indicando que la colonización de este tipo de dispositivos es amplia y compleja.

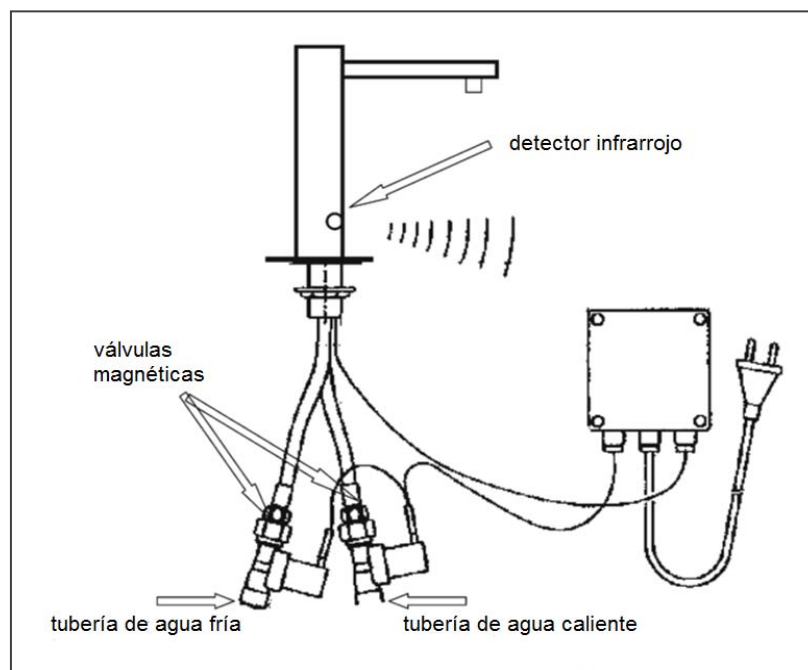


Figura 16. Esquema de grifo de accionamiento automático.
Adaptado de Merrer, J., Girou, E., Ducellier, D., Clavreul, N., Cizeau, F., Legrand, P., y Leneveu, M. (2005). Should electronic faucets be used in intensive care and hematology units? *Intensive Care Medicine*, 31(12), 1715–1718.

Por último, algunas publicaciones han analizado el papel específico de los aireadores instalados en la mayoría de grifos para obtener un flujo laminar del agua y regular su consumo. Entre los más recientes cabe destacar el trabajo de Cristina *et al.* (2014), quienes estudiaron 304 muestras de agua de áreas críticas de dos hospitales italianos, diferenciando entre agua obtenida a través de los aireadores (el primer flujo de agua) o bien de la tuberías de la instalación. Los porcentajes de positividad tanto para bacilos gramnegativos como para *L. pneumophila* serogrupo 1 fueron significativamente más elevados en las muestras obtenidas a través de los aireadores que en las de las tuberías. Sin embargo, para *L. pneumophila* serogrupos 2-14, no se observaron diferencias en el porcentaje de positividad (superior al 40%), aunque sí en la concentración (menor en las tuberías). Los autores concluyeron que para la

mayoría de microorganismos los aireadores juegan un papel de reservorio amplificador, pero en el caso concreto de *L. pneumophila* serogrupos 2-14 este papel sería menos relevante puesto que la propia red de distribución es la que originariamente se encuentra colonizada. Es difícil unificar las conclusiones obtenidas en este tipo de trabajos debido a la diversidad de escenarios en los que se han llevado a cabo y a su variabilidad en la ecología bacteriana. Pero tampoco los estudios en escenarios simulados permiten establecer resultados concluyentes. Por ejemplo, los resultados de un trabajo realizado en un modelo de instalación de ACS no mostraron diferencias en las concentraciones de *Legionella* en el agua obtenida a través de aireadores o en grifos control sin aireadores (Huang y Lin, 2007), contrariamente al estudio anteriormente citado.

Con todo ello se evidencia que, de manera global, el papel de las instalaciones sanitarias como reservorio de *Legionella* es altamente complejo y variable en su interpretación, y también difícilmente reproducible de un centro a otro. La instauración de medidas preventivas concretas basadas en estudios de elevada evidencia científica es, hasta el momento, un reto por resolver.

5.4. Colonización y persistencia de *Legionella* en el agua sanitaria

Los primeros estudios dirigidos a investigar la colonización por *Legionella* del agua de hospitales se remontan a finales de los años 80 y principios de los 90. Surgieron de la inquietud de mejorar el conocimiento de la epidemiología de la legionelosis nosocomial y del debate, aún hoy no resuelto, sobre la necesidad de llevar a cabo monitorizaciones rutinarias del agua sanitaria como medida de prevención y control. La realidad objetivada por estos primeros estudios fue que en la mayoría de hospitales *Legionella* está presente en mayor o menor grado. El porcentaje de hospitales colonizados fue superior al 60% en EEUU y Canadá (Vickers *et al.*, 1987; Alary y Joly 1992), mientras que en Inglaterra y Nueva Escocia estos porcentajes fueron del 12% y del 23%, respectivamente (Liu *et al.*, 1993; Marrie *et al.*, 1994). En estos trabajos, además, se intentó analizar por primera vez la relación entre *Legionella* ambiental y determinadas características de los edificios por una parte, y la presencia de casos nosocomiales de legionelosis, por otra. En un estudio posterior (Kool *et al.*, 1999), se encontró que 11 de 12 hospitales de Texas presentaban colonización por *Legionella* en sus aguas y que el porcentaje de puntos positivos, más que la concentración de *Legionella*, se asociaba a un mayor riesgo de casos de legionelosis nosocomial. En la actualidad, los estudios de prevalencia para establecer el grado de colonización de las aguas de los centros sanitarios se continúan llevando a cabo en países con escasa tradición al respecto (Rafiee, Jahangiri-rad, Hajjaran, Mesdaghinia y Hajaghazadeh, 2014; Sikora, Wójtowicz-Bobin, Koziol-Montewka, Magryś y Gładysz, 2015).

Un gran avance para comprender mejor esta realidad fue la introducción de técnicas de tipaje molecular. Sabria *et al.* (2001) fueron pioneros en este nuevo enfoque, que aplicaron al estudio de las aguas de 20 hospitales de Cataluña. Tres importantes conclusiones se derivaron de este estudio: 1) *L. pneumophila*

estaba presente en el ACS de la mayoría de hospitales (85%); 2) *L. pneumophila* serogrupo 1 no fue el serogrupo aislado con mayor frecuencia; y 3) cada hospital presentaba un subtipo de ADN dominante, no compartido con otros hospitales. El elevado porcentaje de hospitales colonizados por *Legionella* se ha ido corroborando en otros estudios descriptivos transversales realizados en diferentes ámbitos geográficos, con porcentajes siempre superiores al 60% (Leoni *et al.*, 2005; Mavridou *et al.*, 2008; Napoli *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2008). Los serogrupos 2-14, además del 1, se aíslan también frecuentemente en todos ellos.

La realización de estudios longitudinales a lo largo de varios años ha permitido ahondar en el conocimiento de la persistencia de *Legionella* en las instalaciones. Uno de los primeros trabajos fue el de Garcia-Nunez *et al.* (2008) en muestras de 7 hospitales de Cataluña obtenidas durante un período de 17 años. Los resultados mostraron una elevada variabilidad genómica de subtipos de *Legionella*, teniendo cada hospital sus propios patrones de PFGE no compartidos con otros centros. A pesar de esta variabilidad, algunos de los patrones persistían hasta 17 años en las aguas de un mismo hospital, y fueron los que se aislaron también en las muestras clínicas de pacientes que adquirieron una legionelosis nosocomial. La existencia de uno o más patrones dominantes en aguas de hospitales durante períodos de tiempo prolongados es también la conclusión a la que han llegado otros estudios realizados en países como Alemania (Oberdorfer *et al.*, 2008), Polonia (Pancer, Matuszewska, Bartosik, Kacperski y Krogulska, 2013), Italia (Iatta, Cuna, Napoli, De Giglio y Montagna, 2013) o Grecia (Alexandropoulou *et al.*, 2015). En cuanto a los factores que explicarían la variabilidad genética o, en otras palabras, la aparición o desaparición determinados subtipos a lo largo del tiempo en un mismo hospital, no son bien conocidos. Algunos autores lo atribuyen a los métodos de desinfección utilizados (Perola *et al.*, 2005; Triassi *et al.*, 2006), ya que cuando se aplican tratamientos de desinfección se reducen los subtipos predominantes en el agua, lo que permitiría el crecimiento de otros subtipos no mayoritarios hasta entonces.

Todos estos datos han puesto de manifiesto que si se investigan las aguas se aísla *Legionella* en la mayoría de instalaciones sanitarias. Asimismo, la persistencia de determinados clones justificaría la realización de análisis de genotipado periódicos de las muestras ambientales, que ayudarían a diseñar un mapa más exacto de cada hospital. Las implicaciones que ello conlleva en la gestión del riesgo de legionelosis nosocomial son controvertidas y se expondrán más adelante.

6. Vigilancia microbiológica de *Legionella* en el agua de hospitales

6.1. Métodos de detección ambiental de *Legionella*

El aislamiento de *Legionella* en cultivo es el método más utilizado y estandarizado actualmente por los laboratorios ambientales. En 1998, se desarrolló una norma estándar internacional, ISO11731:1998 (ISO11731, 1998), que recogía las estrategias utilizadas en diferentes instituciones para una recuperación y detección eficiente de *Legionella* en muestras ambientales. Los métodos descritos por esta norma permiten realizar un recuento de la concentración de *Legionella* en la muestra.

Ante la imposibilidad de conocer de antemano el nivel de contaminación de la muestra a analizar, se recomienda realizar siembras directas de la muestra (muestras con inóculos muy elevados) y otras siembras tras la concentración de la muestra por filtración o centrifugación (muestras con inóculos bajos). Al igual que las muestras clínicas, las muestras de origen ambiental deben de recibir un tratamiento ácido y de calor antes de ser sembradas. El medio de cultivo utilizado y la metodología a seguir para la identificación de las colonias aisladas es el mismo que se utiliza para las muestras clínicas. El cultivo, a diferencia de otras técnicas, detecta únicamente las células viables y permite el aislamiento de diferentes cepas bacterianas que podrán ser confrontadas con las cepas obtenidas del cultivo de muestras clínicas.

Actualmente, la identificación y cuantificación por cultivo son las herramientas principales desde el punto de vista de salud pública. El aislamiento y el recuento de las cepas procedentes de instalaciones relacionadas epidemiológicamente con casos de legionelosis, y la posterior tipificación molecular de dichas cepas, permite determinar la fuente de infección para así, poder realizar los tratamientos de desinfección adecuados.

En los últimos años se han desarrollado una serie de técnicas moleculares para la detección de *Legionella* en muestras ambientales basadas en la PCR, y especialmente, la PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR), que permite obtener resultados cuantitativos en pocas horas. Estudios en muestras ambientales han descrito un elevado grado de sensibilidad, incluso superior al del cultivo (Levi, Smedley y Towner, 2003). Sin embargo, presenta diversos inconvenientes. Por un lado, las muestras ambientales suelen tener un elevado grado de contaminación por la presencia de microorganismos y residuos químicos que pueden interferir en esta técnica inhibiendo la reacción enzimática. Por otro lado, esta técnica no demuestra la viabilidad de las bacterias detectadas. Además, el uso de la qPCR puede llevar a confusión si se comparan los resultados con los obtenidos en cultivo, ya que no se miden en las mismas unidades ni son equivalentes (unidades genómicas por litro o unidades formadoras de colonias por litro o respectivamente). Por ello y por los demás motivos anteriormente expuestos, el método de vigilancia microbiológica ambiental utilizado mayoritariamente hasta la fecha es el cultivo.

6.2. Papel de la vigilancia microbiológica ambiental en los planes de autocontrol de la *Legionella* en hospitales

La vigilancia microbiológica del agua puede llevarse a cabo en programas de prevención primaria o secundaria (O'Neill y Humphreys, 2005). La prevención primaria hace referencia a centros hospitalarios en los que no se han documentado casos de legionelosis nosocomial, o fuera de un contexto de transmisión de la enfermedad. La totalidad de estas medidas preventivas conforman los denominados planes de autocontrol, que en países con legislación específica son de obligada elaboración y cumplimiento en las instalaciones de riesgo. La prevención secundaria se refiere a la investigación ambiental en presencia de brotes o casos esporádicos, con el fin de evitar nuevas transmisiones. Desde hace años, existe una controversia no resuelta sobre la utilidad de la vigilancia microbiológica ambiental como medida de prevención primaria, lo que se ha traducido en recomendaciones poco uniformes, cuando no contradictorias. En síntesis, dos son las estrategias defendidas para la prevención primaria de la legionelosis en centros sanitarios. La primera, defendida tradicionalmente por los CDC, consiste en la intensificación de la vigilancia clínica sin realizar vigilancia ambiental de manera rutinaria. Esta estrategia no responde en sentido estricto al concepto de prevención primaria, puesto que implementa las medidas de corrección una vez ha habido casos. La segunda estrategia enfatiza la vigilancia ambiental rutinaria del agua sanitaria bajo la premisa que la presencia de *Legionella* supone una situación de riesgo para los pacientes, por lo que se deben tener instauradas medidas de control en ausencia de casos clínicos. En sus primeras recomendaciones sobre prevención de neumonía nosocomial, los CDC desestimaban la realización rutinaria de cultivos de agua para detectar *Legionella*, argumentando que no existe una relación evidente entre los resultados y el riesgo de legionelosis (Centers for Disease Control and Prevention, 1997). Otro argumento fue que al ser *Legionella* un microorganismo ubicuo no se justificaría su completa erradicación. Sin embargo, en recomendaciones más recientes sí que recomienda la vigilancia en áreas con pacientes inmunodeprimidos, aunque sin especificar periodicidad ni metodología (Centers for Disease Control and Prevention, 2003, 2004).

Por el contrario, diferentes estudios apuntaban desde hace más de veinte años que la presencia de *Legionella* en las aguas de los hospitales se asociaba a la aparición de casos de legionelosis nosocomial (Goetz *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1985; Kool *et al.*, 1999; Rudin y Wing, 1986). Stout y Yu (2001) defendieron tradicionalmente una postura opuesta a los CDC a favor de la vigilancia rutinaria de las aguas, que fue adoptada en la legislación del condado de Allegheny (Allegheny County Health Department, 1997). Tras su aplicación, los casos de legionelosis nosocomial se redujeron ostensiblemente (Squier *et al.*, 2005). Estos mismos autores llevaron a cabo un estudio prospectivo con datos clínicos y ambientales en 20 hospitales de 13 estados de EEUU (Stout *et al.*, 2007). Se constató la presencia de *Legionella* en 14 de los 20 hospitales, mientras que sólo en 4 hospitales se identificaron casos de neumonía nosocomial por *L. pneumophila* serogrupo 1 mediante investigación específica con antigenuria. Las aguas de estos 4 hospitales presentaban una elevada colonización, con más del 30%

de puntos de muestreo positivos. Los autores concluyeron que la monitorización ambiental junto con la vigilancia clínica específica es la mejor estrategia para conocer la situación real de la transmisión de *Legionella* en los hospitales.

Con anterioridad, Sabria *et al.* (2004) publicaron un trabajo pionero sobre esta problemática. Habiendo constatado previamente que un elevado porcentaje de hospitales en Cataluña estaban colonizados por *Legionella* (Sabria *et al.*, 2001), llevaron a cabo un seguimiento de los casos de legionelosis nosocomial en estos mismos hospitales a lo largo de cinco años. Si bien inicialmente solamente uno de los hospitales efectuaba vigilancia activa de legionelosis mediante antigenuria, esta técnica se fue introduciendo en los hospitales participantes. Al final del período de estudio se identificaron casos de neumonía por *Legionella* en 11 de los 20 hospitales participantes. Significativamente, los hospitales sin *Legionella* en las aguas no presentaron casos.

Los países europeos con legislaciones o recomendaciones específicas de control de legionelosis en hospitales han adoptado mayoritariamente el enfoque de la prevención primaria en base a la vigilancia ambiental. Entre ellos, cabe destacar el Reino Unido, Irlanda, Holanda, Francia, Italia y Suiza. La legislación de aplicación en el Estado Español (RD 865/2003) también ha adoptado la estrategia proactiva de la prevención primaria, obligando a realizar como mínimo un muestreo anual de las aguas de instalaciones consideradas de riesgo. La Guía técnica para la prevención y control de la legionelosis en instalaciones que desarrolla la legislación vigente, especifica que la frecuencia del muestreo ambiental en los hospitales debería ser trimestral (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2007). Sin embargo, ni el RD ni la guía técnica incluyen indicaciones específicas para la vigilancia clínica de la neumonía por *Legionella*. En este sentido, la legislación catalana sí que establece la obligatoriedad de investigar la etiología por *Legionella* en los casos de neumonía nosocomial (Decret 352/2004).

6.3. Controversias en la metodología de la vigilancia microbiológica de *Legionella* en el agua de hospitales

6.3.1. Principales legislaciones y recomendaciones

Los centros hospitalarios que lleven a cabo la monitorización de *Legionella* en sus aguas deberían tener bien definidos los siguientes puntos: los criterios de muestreo, el número de muestras a obtener, la metodología de la toma de las muestras y los criterios de interpretación de los resultados. Para todo ello no existen criterios unificados, lo que se ha traducido en recomendaciones poco uniformes. La tabla 12 recoge las principales guías técnicas y legislaciones que incluyen recomendaciones específicas sobre vigilancia microbiológica de las aguas de hospitales y la tabla 13 compara diferentes aspectos de estas recomendaciones.

Tabla 12. Guías técnicas y legislaciones que incluyen recomendaciones específicas sobre vigilancia microbiológica de *Legionella* en las aguas de hospitales.

EEUU	Allegheny County Health Department (2014). Updated Guidelines for the Control of <i>Legionella</i> in Western Pennsylvania
Francia	Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. (2001). Gestion du risque lié aux légionelles.
Reino Unido	Health and Safety Executive (2013). Legionnaire's disease. The control of <i>Legionella</i> bacteria in water systems. Approved code of practice and guidance of regulations. L8 (Fourth edition).
Irlanda	Health Protection Surveillance Centre (2009). National Guidelines for the Control of Legionellosis in Ireland.
Italia	Conferenza permanente per i rapporti tra lo stato le regioni e le province autonome di Trento e Bolzano. (2000). Documento di linee-guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi. Gazzetta Ufficiale de la Repubblica Italiana, serie general n° 103.
Suiza	Office Fédérale de la Santé Publique (2009). Legionelles et légionellose.
España	Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2007). Guía técnica para la prevención y control de legionelosis en instalaciones.
Cataluña	DECRET 352/2004, de 27 de juliol, pel qual s'estableixen les condicions higienicosanitàries per a la prevenció i el control de la legionel·losi.

Tabla 13. Comparación de los criterios de la vigilancia microbiológica ambiental en hospitales.

Guía técnica o legislación	Tipo de monitorización	Tipo de muestra	Método de toma de muestra	Límites aceptados
EEUU- Condado de Allegheny	Anual en todos los hospitales. Periódicamente en áreas con pacientes de alto riesgo	Biofilm	Frotis de grifos y duchas	<30% puntos positivos
Francia	Anual en todos los hospitales	Agua	Pre y post flushing en una misma muestra	<10 ³ , <10 ² , ó <50 UFC/L según el área
Reino Unido	A criterio técnico de la instalación	Agua	Pre y post flushing en muestras separadas	<10 ³ UFC/L
Irlanda	A criterio técnico de la instalación. Mensual en áreas con pacientes de riesgo	Biofilm y agua	Frotis, pre y post flushing en muestras separadas	<10 ³ UFC/L
Italia	Periódicamente en áreas con pacientes de alto riesgo	Biofilm y agua	Frotis, pre y post flushing en una misma muestra	<10 ⁴ UFC/L
Suiza	Semestral en hospitales con pacientes de alto riesgo	Biofilm y agua	Frotis, pre y post flushing en una misma muestra	<30% puntos positivos
España	Trimestral en hospitales con pacientes de alto riesgo	Biofilm y agua	Frotis, pre y post flushing en una misma muestra	<10 ³ UFC/L
Cataluña	Mínimo anual	-----	-----	<30% puntos positivos

6.3.2. Criterios de muestreo

El muestreo del agua en los hospitales puede obedecer a dos necesidades diferentes: conocer el riesgo de exposición de los pacientes o bien conocer el estado de colonización del sistema de distribución. Dependiendo, pues, de estas necesidades, deberían seleccionarse puntos de muestreo en base a diferentes criterios: el uso que hacen los pacientes o las características la red de distribución. Las legislaciones y guías técnicas recogen recomendaciones dispares. Tal y como se ha indicado antes, los CDC indican cultivar el agua a la que están expuestos los pacientes inmunodeprimidos, y no consideran aspectos técnicos del sistema de distribución. Por el contrario, las recomendaciones del Reino Unido siguen un criterio exclusivamente técnico, y recomiendan tomar muestras de agua en puntos donde las temperaturas no son adecuadas, con flujo estancado o de bajo uso, del punto de entrada de la instalación, de los puntos más alejados de los acumuladores, así como de los propios acumuladores, la impulsión y el retorno.

En el mismo sentido, la guía técnica de Irlanda aboga por cultivar el agua cuando existen problemas técnicos en el sistema de distribución, como temperaturas inadecuadas o averías. Sin embargo, también recomienda cultivos mensuales del agua en áreas de ingreso de pacientes inmunodeprimidos. La legislación española propone criterios de muestreo que tienen en cuenta ambos enfoques, indicando los siguientes puntos:

- Depósitos de agua caliente y fría
- Puntos terminales de la red de agua caliente y fría preferiblemente de habitaciones relacionadas con enfermos, así como de algún servicio común, intentando elegir habitaciones no utilizadas en los días previos.
- En la red de agua caliente, la impulsión y el retorno.

6.3.3. Número de muestras

No existen estudios con criterios de coste-efectividad sobre el número de muestras óptimo que se precisaría en los programas de prevención primaria de la legionelosis en hospitales. Es más, la mayoría de recomendaciones oficiales ni tan sólo hace una aproximación a esta cifra. La legislación del condado de Allegheny propone obtener un número de muestras acorde con el número de camas del hospital: un mínimo de 10 muestras para hospitales de menos de 500 camas, e ir aumentando 2 muestras adicionales por cada 100 camas. En la guía técnica de Irlanda, el punto de partida del muestreo no es el número de camas sino el número de puntos de uso de agua. Así, por ejemplo, para un centro con 50 puntos de uso se recomienda tomar dos muestras y para un centro con más de 1.600 puntos de uso, el número de muestras recomendado es de 14.

En realidad, el número de muestras necesario responde a la necesidad de disponer de una información representativa tanto del riesgo al que están expuestos los pacientes como del estado sanitario de la red de distribución, dependiendo del criterio de muestreo utilizado. Existen, sin embargo, problemas

derivados de la repetibilidad de los resultados, puesto que éstos pueden variar dependiendo de múltiples factores. En un reciente estudio, Napoli *et al.* (2009), repitieron analíticas de los mismos puntos de muestreo durante cinco días consecutivos y en la misma hora. Se constataron importantes variaciones en las concentraciones de *Legionella* en los mismos puntos, con el agravante de que en algunos casos las concentraciones fueron superiores o inferiores a 10^4 ufc/L, que es el límite admitido en la legislación italiana para emprender medidas correctoras en la red. Los autores concluyeron que la toma de decisiones de desinfectar o no desinfectar la red basada en una sola muestra puede no ser realista.

6.3.4. Método de la toma de muestras

De acuerdo con el objetivo de la vigilancia, las muestras pueden tomarse con dos métodos diferentes: recogiendo la primera cantidad de agua que sale del punto terminal (método “preflushing”) o dejar correr el agua unos minutos hasta obtener la que sale de la tubería (método “postflushing”). Se acepta que, en el caso del ACS, la identificación del agua procedente de la tubería se corresponde cuando la temperatura se estabiliza y no aumenta más. En el primer caso, el objetivo sería cuantificar el riesgo del usuario en las condiciones normales de uso de los puntos de consumo. En el segundo, los objetivos serían analizar el grado de contaminación de las tuberías o comprobar la eficacia de tratamientos de desinfección. Por otro lado, el muestreo también puede incluir o no el biofilm existente en el interior de grifos o duchas obtenido mediante escobillones. Tal y como se muestra en la tabla 13, las recomendaciones al respecto no son uniformes.

El RD 865/2003 establece que en depósitos y acumuladores se tomará un litro de agua preferiblemente de la parte baja del depósito, recogiendo, si existieran, materiales sedimentados. En los puntos terminales se tomará un litro de agua, recogiendo los primeros 100 mL rascando después la parte interna del grifo o ducha con una torunda que debe incorporarse en el mismo envase y recoger finalmente el resto de agua, hasta aproximadamente un litro, arrastrando los restos del rascado. Cabe destacar que es la única legislación en la que la muestra del biofilm se incorpora a la muestra de agua.

Ditommaso *et al.* (2010) analizaron la concordancia de resultados entre las muestras de agua y las de biofilm en un total de 3910 pares de muestras. Los resultados indicaron que el 81% de muestras fueron concordantes, por lo que se concluyó que, eliminando la toma del biofilm se podían obtener resultados válidos de una manera más simplificada. Otro factor que puede influir en la validez de los resultados es el tiempo de demora entre la toma de la muestra y el procesamiento de la misma en el laboratorio. Un estudio del año 2012 describió que si las muestras se demoraban más de seis horas en ser procesadas, se producían variaciones considerables en los recuentos finales (McCoy *et al.*, 2012). Sin embargo, otro trabajo posterior en el que se tuvo en cuenta el error aleatorio muestral no corroboró este efecto (Flanders, Kirkland y Shelton, 2014). Un tercer estudio también concluyó que las concentraciones de *Legionella* se mantienen estables en las muestras durante el tiempo normal de transporte hasta su cultivo (Mietzner, Schaeffer, Yassin, Wagener y Stout, 2013).

6.3.5. Valoración de los resultados

La finalidad de la vigilancia microbiológica de *Legionella* en las aguas de los hospitales es disponer de una información que permita gestionar el riesgo ambiental para que no se produzcan casos clínicos. Existen dos maneras de valorar los resultados de los cultivos para la toma de decisiones: la identificación de puntos terminales con concentraciones elevadas de *Legionella* o bien el cálculo de la prevalencia de puntos positivos de un muestreo global, con independencia de su concentración. No existe consenso en la utilización de uno u otro criterio, por lo que las diferentes recomendaciones sobre prevención de legionelosis nosocomial adoptan uno de los dos sin especificar los motivos de esta decisión. En cuanto a las normativas vigentes en el Estado Español, el RD 865/2003 no especifica cómo valorar los resultados de los cultivos del agua sanitaria. En la Guía técnica para la prevención y control de la legionelosis en instalaciones, sin embargo, se especifica que en caso de hallar concentraciones superiores a 10^3 UFC/L se debe realizar limpieza y desinfección según protocolo en caso de brote y una nueva toma de muestras aproximadamente a los 15 días. En el ámbito de Cataluña, el Decreto 352/2004 indica que la constatación de más de un 30% de puntos de consumo positivos en un muestreo periódico obliga también a realizar limpieza y desinfección según protocolo en caso de brote.

La mayor parte de guías técnicas europeas recomiendan emprender acciones correctoras en puntos concretos de la instalación cuando se detectan concentraciones de *Legionella* superiores a 10^3 o 10^4 UFC/L (tabla 13). Apenas existen trabajos en escenarios reales que validen estos puntos de corte como predictores de riesgo. En un estudio prospectivo de tres años de duración, Boccia *et al* (2006) determinaron que por debajo de un 20% de puntos colonizados con concentraciones menores de 10^2 UFC/L, el riesgo de legionelosis nosocomial es insignificante. La base fisiopatológica de considerar las concentraciones de *Legionella* como indicador de riesgo de enfermedad estaría relacionado con la dosis infectante en humanos. Esta dosis no está bien definida ni en estudios experimentales con animales ni en estudios de brotes con afectación de personas (Whiley, Keegan, Fallowfield y Ross, 2014), por lo que la aplicación práctica de este criterio continúa basándose en estimaciones poco empíricas.

En relación a la prevalencia de *Legionella*, se considera que si un hospital presenta más del 30% de sus puntos de muestreo con crecimiento se deben poner en marcha medidas de corrección. Esta aproximación fue publicada por primera vez por Best en 1983 (Best *et al.*, 1983), quién describió que la aparición de casos de neumonía nosocomial por *Legionella* se relacionaba con la prevalencia global de puntos positivos, y no con la concentración. Basándose en este trabajo, este criterio fue el adoptado por la legislación del condado de Allegheny. Desde entonces, numerosos autores y, secundariamente, guías de prevención, han adoptado el 30% como el punto de corte para implementar acciones. En una interesante revisión, Allen *et al* (2012) analizaron los artículos publicados entre 1983 y 2011 y las recomendaciones que adoptan este criterio. En una valoración conjunta de estos trabajos, calcularon la validez del 30% como punto de corte para predecir casos de legionelosis nosocomial y obtuvieron una sensibilidad del 59% y una especificidad del 74%. Ello se traduciría en que el 40% de situaciones de

riesgo no serían detectadas y que en el 25% de ocasiones se iniciarían medidas correctoras sin estar justificadas. Los autores recomiendan una aproximación multidisciplinar al problema basada en considerar conjuntamente tanto la prevalencia de puntos positivos como la concentración de *Legionella*, evaluar el tipo de paciente expuesto y considerar aspectos técnicos del edificio y la instalación.

Recientemente, un trabajo de Ditommaso *et al* (2014) apuntó que otro aspecto importante a tener en cuenta en la gestión del riesgo ambiental es el serogrupo y la virulencia de las cepas aisladas. Encontraron una asociación estadísticamente significativa entre la aparición de casos nosocomiales y la presencia en el agua de cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1 con un determinado epítipo. Con anterioridad, y en esta misma línea, García-Núñez *et al.* (2009) analizaron la citopatogenicidad de muestras ambientales de 17 hospitales catalanes, encontrando que los aislados de *L. pneumophila* serogrupo 1 eran más citopatogénicos que los aislados de otros serogrupos y que los hospitales con aislados de *L. pneumophila* pertenecientes a los grupos más citopatogénicos tendían a declarar más casos de enfermedad del legionario. Todos estos datos, aunque aún poco estudiados, apuntarían a que la virulencia debería ser otro aspecto importante a tener en cuenta en los programas de autocontrol de *Legionella* de los hospitales.

7. Métodos de desinfección del agua sanitaria

7.1. Clasificación de los métodos de desinfección del agua sanitaria y criterios para evaluar su efectividad

Los métodos de desinfección del agua aplicados a edificios, entre ellos los hospitales, se pueden clasificar según diferentes criterios (Yu, Liu, Stout y Goetz, 1993). Según su ámbito de aplicación, pueden ser:

- Métodos de desinfección sistémicos: se aplican a todo el circuito de agua, y, por tanto, pretenden actuar sobre la totalidad de la biomasa de *Legionella*.
- Métodos de desinfección focales o terminales: se aplican en una parte de la instalación, generalmente afectando las partes más distales de la misma de manera independiente a otros métodos de desinfección ya instalados.

Según su aplicación en el tiempo, pueden ser:

- Métodos de desinfección en continuo: se aplican sin interrupción a lo largo del tiempo, siendo la base para el control continuado de *Legionella*.
- Métodos de desinfección de choque: se aplican de manera puntual, generalmente en el contexto de un brote u otra situación de alerta epidemiológica. Se pueden aplicar tanto de manera sistémica a toda la instalación como sólo a una parte de ella.

Desde el punto de vista de las ciencias de la salud, el análisis de la efectividad de estos sistemas es muy dificultoso si se aplican los criterios de la medicina basada en la evidencia, puesto que no se trata de estudios en poblaciones humanas. En el contexto de evaluación de tecnologías de desinfección, la evidencia de la eficacia *in vitro* puede establecerse de manera apropiada pero la efectividad en condiciones reales en medios inanimados es complejo de llevar a cabo. El diseño epidemiológico de mayor evidencia científica es el ensayo clínico aleatorizado (y sus metaanálisis cuando son posibles). La aleatorización pretende la homogeneización de los sujetos participantes para poder concluir que, si se observan diferencias en los resultados, éstas se deben a la intervención que se ha aplicado. Ello también permite que los resultados sean reproducibles y generalizables a otros pacientes. Sin embargo, la aleatorización de hospitales, o de zonas geográficas, para el análisis de la efectividad de los sistemas de desinfección raramente se podrá llevar a cabo bajo esta premisa (homogeneizar el escenario) y, por tanto, la generalización de los resultados es una de las principales limitaciones cuando se desean establecer recomendaciones basadas en la evidencia. Con el fin de ayudar a la toma de decisiones, Lin, Stout y Yu (2011) propusieron unos criterios de evaluación estandarizados de los métodos de desinfección para *Legionella* en aguas de edificios, basados en cuatro pasos ordenados de menor a mayor exigencia:

- A. Eficacia demostrada *in vitro* frente a *Legionella*.
- B. Reportes o comunicaciones puntuales en el control de *Legionella* en las instalaciones de hospitales individuales.
- C. Estudios publicados de larga duración (años) en el control de *Legionella* en las instalaciones y en la prevención de legionelosis nosocomial en hospitales individuales.
- D. Estudios confirmatorios de larga duración (años) en múltiples hospitales con resultados similares.

A pesar de la simplicidad de estos criterios, son una herramienta en la que se han basado algunas de las revisiones publicadas hasta el momento.

7.2. Métodos de desinfección sistémicos en continuo

7.2.1. Temperatura del agua caliente sanitaria

Los métodos de desinfección sistémicos en continuo básicos en edificios considerados de riesgo para la proliferación de *Legionella* son el mantenimiento de determinados niveles de temperatura en ACS y AF, además de adecuados niveles de cloración del AF. En el caso del ACS, se considera que, si a pesar de esta medida, se producen casos nosocomiales de legionelosis o bien se detectan colonizaciones significativas de la red, debe añadirse un método de desinfección complementario. Estas recomendaciones se han basado en investigaciones que han analizado el impacto de la introducción de estos métodos suplementarios con independencia de la temperatura. No obstante, pocos trabajos han analizado con profundidad si, simplemente aumentando permanentemente los niveles de temperatura basales del ACS se puede mejorar el estado microbiológico de la red. Este hecho resulta paradójico por cuanto es muy bien conocida la sensibilidad de *Legionella* a los dinteles de temperatura.

Cuando se habla de la temperatura del ACS como método de desinfección en continuo, debe diferenciarse entre mantener unos determinados niveles en los puntos centrales o de impulsión y los niveles de que se logran en los puntos de distribución terminales de la red. Es sabido que la temperatura de almacenaje en acumuladores de agua caliente no debe descender por debajo de los 60°C. A esta conclusión han llegado diferentes trabajos llevados a cabo tanto en instalaciones sanitarias como en otro tipo de edificios, y en los que la temperatura del acumulador y del agua caliente impulsada se elevó como medida de control tras la detección de *Legionella*, consiguiéndose una reducción significativa de la colonización (Zacheus y Martikainen, 1996 ; Pryor *et al.*, 2004; Berry *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2006).

Si bien a nivel técnico es relativamente sencillo garantizar unas temperaturas de impulsión del ACS estables, el principal reto en las instalaciones hospitalarias, generalmente de gran recorrido y elevada complejidad, es hacer llegar a los puntos terminales las temperaturas deseadas. Es por ello que el análisis de la temperatura como método de desinfección sistémico y en continuo debe hacerse teniendo

en cuenta los niveles conseguidos en puntos terminales y no centrales. La principal controversia estriba en cuál debería ser el rango de temperatura óptima que ofreciera los mejores resultados en cuanto a control ambiental de *Legionella* pero que a la vez garantice la seguridad para el usuario y un equilibrio asumible para la institución en términos de coste-efectividad. Como se expone a continuación, la mayor parte de publicaciones aparecidas hasta la fecha defienden que dicho rango sería entre los 55°C y los 60°C.

Algunos estudios han analizado los resultados obtenidos con la temperatura en combinación con otros métodos adicionales de desinfección. Blanc, Carrara, Zanetti y Francioli (2005), compararon la efectividad de un sistema de ionización cobre-plata en un edificio hospitalario con un sistema de ozono, en otro edificio, partiendo de una situación de brote de legionelosis nosocomial. Dado que no se obtuvieron buenos resultados, se decidió elevar y mantener la temperatura del ACS entre 50°C y 60°C en puntos periféricos en ambos edificios, tras lo cual se observó un descenso significativo tanto en el porcentaje de puntos positivos como en la concentración de *Legionella*. En un trabajo anterior (Colville *et al.*, 1993), se describe una experiencia en sentido contrario: tras la instauración de un choque térmico y el mantenimiento de temperaturas de impulsión a 60°C (no se especifican los niveles logrados en puntos periféricos), se decidió instalar un sistema de ionización cobre-plata porque continuaban apareciendo casos esporádicos de legionelosis nosocomial. Tras esta intervención, se logró controlar la situación.

Dos publicaciones han analizado el efecto a largo término de mantener temperaturas elevadas del ACS como medida de control instaurada tras la aparición de casos de legionelosis nosocomial. En una de ellas (Borau *et al.*, 2000), tras la realización de choques térmicos se mantuvieron las temperaturas en puntos periféricos entre 52°C y 55°C. Durante los 7 años posteriores no se objetivaron nuevos casos de legionelosis nosocomial; sin embargo, también se había eliminado la práctica de administrar agua del grifo a través de las sondas nasogástricas, por lo que es difícil establecer una relación de causa-efecto. Darelid *et al.* (2002) publicaron una experiencia de 9 años de seguimiento en un hospital sueco. Tras la aparición de un brote de legionelosis nosocomial en 1991, se mantuvo la temperatura del ACS en puntos terminales permanentemente por encima de los 55°C como único método de control. Entre 1991 y 2000 se diagnosticó un solo caso de legionelosis nosocomial. *L. pneumophila* serogrupo 1 se aisló en el 12% de las muestras obtenidas durante el período de estudio. Los autores concluyeron que el mantenimiento del ACS por encima de 55°C es un buen método de control a largo término.

Cuatro trabajos han comparado los resultados obtenidos con temperaturas a partir de los 55°C en términos de reducción de *Legionella*, fuera de un contexto de brote, aunque con diseños diferentes. Durante nueve meses, Kusnetsov *et al.* (2003) mantuvieron una temperatura media en puntos terminales de 56°C, consiguiendo una reducción de las concentraciones de *Legionella* con respecto a temperaturas inferiores, pero no su completa eliminación. En un estudio de diseño transversal Hrubá (2009) analizó 805 muestras de ACS obtenidas de diferentes edificios en la República Checa, incluidos hospitales. Las

mayores concentraciones de *Legionella* se observaron en muestras con temperaturas entre 30°C y 35°C. A partir de los 50°C tanto el porcentaje de puntos positivos como la concentración media de *Legionella* se reducían de manera significativa, pero es a partir de los 55°C cuando la reducción fue óptima. Los autores recomendaron elevar la temperatura mínima del ACS hasta 55°C, e indicaron que los requerimientos legales exigidos en su país (más de 50°C) resultan insuficientes para un buen control ambiental. Bedard *et al.* (2015) estudiaron las aguas de cinco hospitales en los que se mantuvo la temperatura del ACS por encima de los 55°C. En los puntos de consumo en los que se mantuvieron temperaturas por encima de dicha temperatura no se detectó *Legionella* ni por cultivo ni por qPCR; el número de muestras analizadas, sin embargo, fue tan sólo de 64. Una nueva perspectiva la aportan Völker y Kistemann (2015), en un trabajo que analizó diferentes opciones de desinfección con temperatura sola o combinada con dióxido de cloro a lo largo de tres años, y en el que se analizaron un total de 476 muestras. Cuando la temperatura en puntos terminales se mantuvo por debajo de los 55°C, y sin ningún sistema de desinfección añadido, aumentó el grado de colonización por *Legionella* con un 14% de muestras positivas, frente al 3% cuando se mantuvo por encima.

Borella *et al.* (2005) y Bargellini *et al.* (2011) describieron el efecto relativo de temperaturas superiores a 55°C teniendo en cuenta otros parámetros físico-químicos del agua. Se analizaron 119 y 408 muestras, respectivamente, procedentes de diferentes edificios. Los resultados fueron muy parecidos en ambos estudios: en el análisis multivariante ajustado por otras variables, las odds ratios obtenidas para la presencia de *Legionella* fueron 0,31 y 0,38, ambas con significación estadística. Estas cifras permitirían afirmar que la probabilidad de aislar *Legionella* en agua caliente se reduce entre un 60% y 70% si la temperatura se mantiene por encima de los 55°C.

A diferencia de otros métodos de desinfección en continuo, como la ionización cobre-plata, no existen apenas estudios en instalaciones simuladas que analicen el comportamiento de *Legionella* tanto en fase acuosa como en fase sénil. Cabe destacar la publicación de Saby *et al.* (2005), en el que se instaló un sistema distribución piloto de ACS elaborado con diferentes materiales y se analizó la evolución de *Legionella* a lo largo de 14 semanas tras la aplicación de diferentes métodos de desinfección. Los resultados indicaron que a temperaturas por encima de los 55°C las concentraciones medias de *Legionella* tanto en fase acuosa como sénil se reducían ostensiblemente respecto a los 40°C, con promedios de entre 10^1 y 10^2 .

Otro aspecto que puede ser controvertido, y del que tampoco existen apenas publicaciones es si el mantenimiento de temperaturas elevadas en el ACS puede favorecer la aparición de cepas más termoresistentes. Aplicando técnicas de citometría de flujo, Allegra *et al.* (2011) analizaron *Legionella* aislada en aguas de diferentes hospitales italianos obtenidas a lo largo de 18 años. Las aguas procedentes de hospitales que habían utilizado repetidamente tratamientos de choque térmico presentaron mayores porcentajes de formas viables de *Legionella* después de someterlas *in vitro* a 70°

durante 30 minutos. No se han publicado trabajos que analicen este mismo fenómeno en hospitales que hayan mantenido temperaturas elevadas de ACS de manera continuada.

A pesar de que estas evidencias son escasas en número y débiles en metodología, apoyarían la hipótesis de que, en condiciones reales, un incremento de temperatura del ACS hasta niveles de entre 55°C y 60°C ofrecería niveles de protección bastante superiores a los 50°C que preconizan muchas guías técnicas o legislaciones. La principal limitación de este método sería que en instalaciones grandes y complejas es muy difícil asegurar estos niveles en todos los puntos terminales. Asimismo, se desconoce si ello llevaría implícito un aumento de riesgo de quemaduras para usuarios y profesionales, por lo que se deberían garantizar medidas adicionales en las instalaciones. Finalmente, también se desconoce el impacto en términos de coste-efectividad, puesto que la demanda energética derivada de aumentar 5°C o 10°C puede ser considerable en instalaciones grandes y complejas, como los hospitales.

7.2.2. Otros métodos aplicados en agua caliente sanitaria

Sistemas de ionización cobre-plata

Los efectos bactericidas del cobre y la plata son conocidos desde hace ya tiempo. En la actualidad, su uso en la desinfección del agua se basa en el efecto sinérgico de ambos metales. Los iones de cobre y plata están cargados positivamente e interaccionan con los grupos sulfuro de carga negativa de la membrana celular, haciéndola permeable. La entrada de los iones de plata en el interior de la bacteria provoca la inhibición de los ácidos nucleicos, enzimas y proteínas, ocasionando la muerte celular. La liberación de los cationes a la red de agua se hace a través de unos dispositivos controlados consistentes en unos electrodos de cobre y plata a los que se aplica un bajo potencial eléctrico. Para la erradicación de *Legionella* en las instalaciones de ACS se recomiendan unos valores de 0,2-0,8 mg/L de cobre y 0,02-0,08 mg/L de plata. Las concentraciones de ambos metales deben monitorizarse rutinariamente en el agua de uso. Para la medición del cobre se utilizan kits colorimétricos, mientras que la plata requiere sistemas más complejos.

Hasta la fecha, los sistemas de ionización cobre-plata son los únicos que han demostrado su efectividad frente a *Legionella* en múltiples hospitales a lo largo de períodos de tiempo prolongados. Stout y Yu publicaron en 2003 la primera revisión de su efectividad en 16 hospitales de EEUU durante períodos de estudio de más de diez años (Stout y Yu, 2003). Antes de la instalación de los sistemas, trece de los dieciséis hospitales analizados presentaban colonización por *Legionella*, y de ellos, siete en más del 30% de los puntos de muestreo. Con posterioridad a la instalación de la ionización las muestras fueron repetidamente negativas en ocho de los dieciséis hospitales, y en ningún caso se observaron porcentajes superiores al 30%. Tampoco se observaron más casos de legionelosis nosocomial, excepto en uno de los centros. En una revisión más reciente (Cachafeiro, Naveira y Garcia, 2007), se hace hincapié en la heterogeneidad de los 32 estudios incluidos. En algunos hospitales, los sistemas de ionización se utilizaron concomitantemente con otros métodos de desinfección. Además, las

concentraciones de iones y a la temperatura del ACS era variable entre los centros, así como los tiempos de seguimiento. Sin embargo, los autores concluyeron que la ionización cobre-plata es un método efectivo y seguro para erradicar *Legionella* y que en hospitales donde se combinó con temperaturas más elevadas de ACS los resultados fueron mejores. Se han reportado experiencias con resultados negativos, que se atribuyeron a que utilizaron concentraciones de iones menores a las recomendadas (Rohr, Senger, Selenka, Turley y Wilhelm, 1999). Los malos resultados que también reportó un hospital francés se asociaron a la adición al agua de un compuesto con fosfato para evitar la corrosión (Blanc, Carrara, Zanetti, y Francioli 2005; Lin y Vidic, 2006). En nuestro entorno, cabe destacar la experiencia de Modol *et al.* (2007) en un hospital con antecedentes de legionelosis nosocomial hiperendémica. Después de la instalación del sistema de ionización, la colonización del agua se redujo considerablemente y la enfermedad decreció de 2,45 a 0,18 casos por 1.000 altas hospitalarias. Coincidiendo con una avería del sistema, la tasa de casos nosocomiales volvió a aumentar hasta la resolución del problema.

Las principales ventajas del sistema de ionización de cobre-plata son su facilidad de instalación y que no se ve alterado por la temperatura del ACS, a diferencia de los sistemas de desinfección basados en cloro. Además, tiene un efecto remanente prolongado: si deja de estar en funcionamiento, la recolonización se retrasa entre 6 y 12 meses (Liu *et al.*, 1994), por lo que ofrece mayores garantías de seguridad en comparación con otros sistemas más sensibles a un malfuncionamiento. Como precauciones debe tenerse en cuenta que precisa de una monitorización regular de los niveles de iones y de un buen mantenimiento, puesto que los electrodos pueden acumular formaciones calcáreas con relativa facilidad. Un pH elevado del agua puede comprometer la efectividad del sistema (Casini *et al.*, 2008; Marchesi *et al.*, 2011; Sidari *et al.*, 2004; Srinivasan *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007). Por ello, es imprescindible realizar un análisis de la compatibilidad del agua previo a la instalación, en especial en centros donde las aguas son más bien alcalinas (Dziewulski, Ingles, Codru, Strepelis y Schoonmaker-Bopp, 2015).

Dióxido de cloro

El dióxido de cloro es un gas en solución que se genera en el mismo lugar de su aplicación utilizando dos posibles métodos: la mezcla controlada de precursores químicos o la generación electroquímica. El dióxido de cloro tiene una mayor penetración en el biofilm que el cloro, debido a un mecanismo de acción diferente que el hipoclorito. Este sistema se ha aplicado con resultados variables en hospitales principalmente europeos, aunque hasta la fecha no está generalizado. Todos los estudios de campo tienen en común el largo período de tiempo que precisa el dióxido de cloro para observar su efecto sobre *Legionella* (entre uno y tres años). Cinco estudios publicados indican que tras la aplicación del dióxido de cloro la colonización del sistema se redujo notablemente (Casini *et al.*, 2008; Marchesi *et al.*, 2011; Sidari *et al.*, 2004; Srinivasan *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007). Recientemente, Casini *et al.* (2014) han publicado la experiencia de mayor duración con dióxido de cloro en hospitales. Tras nueve años de

funcionamiento, el porcentaje de muestras positivas se redujo significativamente en un 55% (del 66,7% al 32,9%), así como la concentración de *Legionella* en las mismas (de $3,2 \times 10^4$ a $2,9 \times 10^3$). Sin embargo, los elevados costes y la complejidad del mantenimiento, así como la aparición de un clon de *Legionella* tolerante al tratamiento motivaron la introducción de un sistema de desinfección basado en la monocloramina.

Las principales ventajas de este método de desinfección son que no se afecta por el pH del agua y que sus efectos corrosivos son mucho menores que el hipoclorito. La mayor dificultad de los sistemas que utilizan dióxido de cloro es mantener una concentración residual efectiva (0,3 – 0,5 mg/L) en toda la red de distribución. Entre las limitaciones, aparte del largo tiempo que precisa para ser efectivo, cabe destacar que es incompatible con tuberías de polipropileno por la rápida degradación que ocasiona. En cuanto a la toxicidad, su principal subproducto, el clorito, se ha asociado a defectos cardiacos congénitos y anemia hemolítica. Otro subproducto, el clorato, no se halla regulado por falta de datos en la salud humana. En cumplimiento de las legislaciones referentes al agua de consumo humano, algunos países exigen que en centros sanitarios se monitorice no sólo los niveles de dióxido de cloro sino también sus subproductos, lo que es complejo y costoso.

Monocloramina

La monocloramina es un compuesto inestable que se obtiene por la combinación de amoníaco y ácido hipocloroso en condiciones alcalinas. Es efectiva frente a *Legionella* in vitro y en condiciones de biofilm. Se han publicado experiencias en edificios no hospitalarios en los estados de California y Florida, indicando que cuando eran abastecidos con agua tratada con monocloramina el porcentaje de muestras positivas para *Legionella* en los circuitos de ACS se reducía drásticamente (Flannery *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2006). Sin embargo, aumentaba la proporción de edificios colonizados por especies de micobacterias. La experiencia a largo término en hospitales es muy escasa. Dos estudios han sugerido que los hospitales abastecidos por agua de consumo desinfectada con monocloramina reportaban menos casos de legionelosis nosocomial (Heffelfinger *et al.*, 2003; Kool *et al.*, 1999). Marchesi *et al.* (2012) han publicado una experiencia de un año comparándola evolución de los aislamientos de *Legionella* obtenidos en una parte del hospital tratada con monocloramina con otra parte tratada con dióxido de cloro. Los resultados con monocloramina fueron significativamente mejores: del 97% antes de la instalación al 13% al cabo de un año, mientras con el dióxido de cloro la reducción pasó del 100% al 57%. En el trabajo de Casini *et al.* (2014), tras la introducción de monocloramina se eliminaron las formas planctónicas de *Legionella* en la red de distribución del hospital. Sin embargo, se constató un aumento de los aislamientos de micobacterias atípicas. Este hallazgo ha sido también descrito recientemente por otros autores (Baron, Vikram, Duda, Stout y Bibby, 2014). Las consecuencias que puede tener este efecto inverso de la monocloramina sobre el crecimiento de micobacterias en las aguas de edificios están por determinar. Sin embargo, parece ser una tecnología prometedora puesto que ofrece dos ventajas importantes en relación a la ionización cobre-plata y al dióxido de cloro: no se

afecta por el pH del agua y su efecto sobre la colonización por *Legionella* se observa a las pocas semanas de su aplicación. Se ha reportado que además reduce la presencia de otros patógenos presentes en las aguas hospitalarias (Baron *et al.*, 2015; Mancini *et al.*, 2015). Recientemente se han divulgado experiencias con buenos resultados en hospitales italianos que han aplicado un nuevo sistema de producción in situ de las cloraminas desde precursores diluidos y no tóxicos, mediante un proceso automatizado y controlado por microprocesador (Casini *et al.* 2014; Coniglio *et al.* 2014).

7.2.3. Cloración del agua fría en hospitales

Tradicionalmente se ha considerado que el inóculo de *Legionella* en la red de AF de hospitales es poco importante o inexistente. Sin embargo, en los últimos años se han publicado datos que contradicen tal creencia, puesto que se han documentado colonizaciones importantes así como casos de legionelosis nosocomial secundarios a dicha colonización (Arvand, Jungkind y Hack 2011; Johansson *et al.* 2006). La posible implicación de la aspiración de agua en la patogénesis de la enfermedad obliga a controlar y mantener niveles de cloración adecuados a la legislación actual sobre agua de consumo humano.

El cloro es el agente desinfectante más utilizado en todo el mundo para la potabilización del agua de consumo humano. Sus principales ventajas son su elevado espectro de acción, su inocuidad para la salud humana en las concentraciones que se requieren y su facilidad de dosificación y control. El cloro es un agente oxidante altamente reactivo con diversos componentes celulares, en especial los grupos sulfhidrilos de las proteínas. En condiciones reales en el agua su capacidad biocida se ve afectada por el pH, la temperatura y su tiempo de acción.

El cloro fue uno de los primeros desinfectantes utilizados para el control de *Legionella* en hospitales. En la modalidad de hipercloración continua fue abandonándose debido a la importante corrosión que sufrían los materiales de distribución. Actualmente, se considera que con niveles de cloro residual libre de 0,2 a 0,8 ppm se consigue un buen control de *Legionella* en AF sin peligro para la salud humana y con un mínimo riesgo de dañar las instalaciones. Sin embargo, *Legionella* presenta una relativa tolerancia al cloro. Además, la acción del cloro sobre el biofilm es mínima. Existen trabajos que han demostrado la capacidad de supervivencia de *Legionella* en el biofilm a pesar de exposiciones a niveles elevados de cloro (Kilvington y Price, 1990; Cooper y Hanlon, 2010). Por todo ello se puede concluir que, a pesar de que la cloración del AF de los hospitales es una buena herramienta de control de *Legionella*, al igual que sucede con los sistemas de desinfección de ACS tampoco es eficaz al 100%. A ello contribuyen desde el ciclo de vida de *Legionella* y su resistencia a los biocidas a factores relacionados con el diseño y mantenimiento de las instalaciones, así como la baja capacidad del propio agente desinfectante para actuar sobre el biofilm.

7.3. Métodos de desinfección de choque

Los métodos de desinfección de choque de los sistemas de ACS se utilizan cuando se requiere una desinfección adicional y se caracterizan por tener una duración limitada en el tiempo. Las modalidades más empleadas son el choque térmico y el choque de cloro.

7.3.1. Choque térmico

Consiste en elevar la temperatura de los acumuladores a 80° y, posteriormente, abrir todos los grifos y duchas durante 30 minutos para erradicar *Legionella* de estos puntos terminales. Es fundamental conseguir que la temperatura alcance como mínimo los 60°C, ya que en caso contrario el tratamiento no será del todo eficaz. En grandes edificios es preciso sectorizar el sistema de distribución y realizar la apertura de grifos en diferentes etapas.

La experiencia clínica con este método de desinfección es bastante extensa, pues fue uno de los primeros métodos utilizados para la erradicación de brotes de legionelosis en hospitales. La mayor parte de estudios concluyen que, tras el choque térmico, la recolonización del sistema con *Legionella* se produce de manera inevitable y en un corto período de tiempo (Mietzner *et al.*, 1997; Stout, Lin, Goetz y Muder, 1998; Struelens *et al.*, 1992; Sydnor *et al.*, 2012; Zacheus y Martikainen, 1996). En nuestro entorno, Ragull *et al.* (2006) estudiaron las aguas de un hospital de elevada complejidad durante los tres días anteriores y los 15 días posteriores a la realización del choque térmico. Encontraron que, tras el tratamiento, el inóculo de *L. pneumophila* en puntos centrales disminuyó, pero aumentó a partir del día 11 y alcanzó su valor máximo a los 15 días. No se detectó *L. pneumophila* en puntos de consumo a los cuatro días. Sin embargo, a partir del día siete, hubo recolonización, que alcanzó el 66% el día nueve. No se detectaron casos clínicos de legionelosis durante el período de estudio. Más recientemente, el mismo grupo ha reportado los resultados de un estudio prospectivo de dos años de duración en el que constataron que, en muestras tomadas a los 15 días tras la realización de diversos choques térmicos, no se modificaron ni el porcentaje de puntos positivos ni la concentración de *L. pneumophila*; sin embargo, sí que se había reducido la presencia de amebas en el agua (Modol *et al.* 2014). Como se ha comentado en apartados anteriores, algunos autores han descrito que si tras el choque se mantiene la temperatura del ACS a 60°C los cultivos de agua permanecen negativos y los casos clínicos de legionelosis nosocomial prácticamente desaparecieron. Sin embargo, estos hallazgos ponen en duda de si realmente era necesaria la realización de un tratamiento de choque previo.

La explicación a estos fenómenos radica en que este tipo de desinfección actúa contra las bacterias que se encuentran en la fase acuosa o libre, pero no actúa en las que se encuentran en el biofilm, que constituyen la mayoría. Farhat *et al.* (2010) intentaron profundizar en el conocimiento de estas dinámicas mediante un estudio con instalaciones simuladas de acero inoxidable. Tras el choque térmico, se observó una reducción transitoria de *Legionella* en la instalación, pero que rápidamente se recolonizó con formas procedentes de las partes más distales (grifos) y de tramos muertos que no habían sido

afectadas por el tratamiento y que, encontrando restos de biofilm y volviendo a temperaturas menores, se pudieron reproducir de nuevo.

Las principales ventajas del choque térmico son que no requiere ningún equipamiento especial y que se puede llevar a cabo rápidamente en casos de urgencia. Sus limitaciones son que requieren un amplio despliegue de personal entrenado, en especial en hospitales de gran envergadura, y que se pueden producir quemaduras a los pacientes y otros usuarios. Por ello, no se debe considerarlo un método único, sino una medida complementaria a métodos de eficacia continuada.

7.3.2. Choque de cloro

El tratamiento de hipercloración consiste en añadir hipoclorito a concentraciones elevadas durante un determinado período de tiempo. En los circuitos de ACS, esta operación se debe realizar utilizando agua fría. El procedimiento consiste en clorar el agua de los acumuladores con 20-30 ppm de cloro residual libre, manteniendo el agua por debajo de 30 °C y con un pH de 7-8. Este agua se hace llegar a todos los puntos terminales de la red a 1-2 ppm, manteniéndose por un período de tres horas. Transcurrido este tiempo, se reestablecen las condiciones de uso normales del circuito de ACS. Al igual que los tratamientos de choque térmico, aunque menos estudiado, la recolonización del circuito tras un choque de cloro es inevitable (Biurrún, Caballero, Pelaz, Leon y Gago, 1999; Levin *et al.*, 1995). Garcia *et al.* (2008) analizaron las muestras con *Legionella* de diferentes edificios, incluido un hospital, sometidos a tratamientos repetidos de choque de cloro a lo largo de 10 años. Encontraron que un clon específico de *Legionella* se mantuvo colonizando uno de los sistemas durante todo este tiempo, pero sin presentar un aumento de resistencia al cloro, ya que su resistencia in vitro fue la misma que la de otros clones no expuestos. Modol *et al.* (2014) han descrito que los tratamientos de choque de cloro en AF apenas afectan los niveles de *Legionella*, mientras que, paradójicamente, se asocian a un aumento de la presencia de amebas.

Aparte de estas limitaciones, la realización repetida de este tipo de tratamiento puede dañar las instalaciones debido al efecto corrosivo del cloro, por lo que también debe ser contemplado como un tratamiento de emergencia o una medida complementaria a tratamientos de desinfección en continuo.

7.4. Métodos de desinfección focales o terminales

Estos métodos de desinfección se utilizan para el tratamiento de las partes más distales de las instalaciones, siendo útiles para tratar tramos específicos de la instalación. Los más utilizados son la luz ultravioleta y los filtros bacterianos.

7.4.1. Luz ultravioleta

La luz ultravioleta (UV) tiene un efecto germicida por generar la formación de dímeros de ARN (uracilo y citosina) o ADN (timina y citosina) que impiden la replicación microbiana. Su uso para la desinfección del agua ofrece ventajas importantes: presenta un amplio espectro de acción, no genera subproductos tóxicos y no altera la calidad organoléptica del agua. Las lámparas productoras de luz UV se sitúan en una cámara de cuarzo que se intercalan en puntos clave del sistema de distribución que alimentan áreas de tamaño reducido. Para que sean efectivas, la distancia hasta el punto de uso debe ser pequeña, puesto que la luz UV no tiene efecto residual (Franzin, Cabodi y Fantino, 2002).

En hospitales a luz UV se ha utilizado para el tratamiento de áreas de pacientes de alto riesgo, como unidades con pacientes sometidos a trasplante hematopoyético o a otros tipos de inmunosupresión (Matulonis, Rosenfeld y Shadduck, 1993; Triassi *et al.*, 2006). En una experiencia de trece años de duración se analizó el efecto de instalar un sistema de luz UV en la entrada principal de agua en un hospital de nuevo uso desde el momento de la puesta en marcha de la instalación (Hall, Giannetta, Getchell-White, Durbin y Farr, 2003). Ninguna de las 930 muestras ambientales que se obtuvieron a lo largo de estos trece años fue positiva para *Legionella* y tampoco se diagnosticaron casos de legionelosis nosocomial. Estos datos podrían indicar un efecto beneficioso en instalaciones vírgenes donde todavía no se ha formado el biofilm. Al igual que otros sistemas de desinfección, su efecto sobre las formas intracelulares de *Legionella* parece limitado. Se ha descrito que la asociación de *L. pneumophila* con *Acanthamoeba* disminuye a la mitad su efectividad y que la efectividad frente a trofozoitos fue tres veces superior que frente a quistes de *Acanthamoeba* y *Vermamoeba* (Cervero-Arago, Sommer y Araujo, 2014).

7.4.2. Filtros bacterianos

Los filtros bacterianos son dispositivos generalmente de un solo uso que se instalan en las parte finales de grifos y duchas actuando como barrera física para el paso de los microorganismos que colonizan el agua. Para ser efectivos el tamaño del poro no debe ser superior a 0,2 μm . En hospitales, actualmente se utilizan de manera bastante generalizada en las unidades de pacientes de alto riesgo para legionelosis y otros microorganismos vehiculizados por el agua, como unidades con pacientes sometidos a trasplante hematopoyético o a otros tipos de inmunosupresión, unidades de quemados, de neonatos o de medicina intensiva (Cervia *et al.*, 2008, Srinivasan *et al.* 2003; Sheffer *et al.* 2005). También se pueden utilizar en puntos donde se desea agua estéril para el tratamiento de utillaje sanitario de uso semicrítico.

Los filtros bacterianos son fáciles de colocar, aunque deben ser manejados por el personal técnico adecuado. Es recomendable que se lleve una correcta trazabilidad del proceso, puesto que su duración es limitada, en general, de un mes. Dependiendo de las características organolépticas del agua o de la frecuencia de uso de los grifos, los filtros pueden colmatarse con cierta facilidad, ocasionando

alteraciones en la cantidad de flujo, desequilibrios de temperatura, o contaminación retrógrada de la red de distribución (Warris *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2011).

7.5. Tolerancia de las instalaciones a los métodos de desinfección

Desde el ámbito de la ingeniería son bien conocidas las propiedades de los diferentes materiales empleados en las instalaciones de conducción de agua. Sin embargo, las compatibilidades entre dichos materiales una vez instalados en edificios y los métodos de desinfección empleados aún son motivo de controversia o insuficiente información. Este hecho reviste de gran importancia práctica, puesto que una elección inadecuada del tipo de tuberías y el tipo de desinfección puede acarrear desperfectos notables, que, en un centro hospitalario, implican un riesgo añadido a los usuarios, además de costes económicos. En una reciente revisión sobre el tema, se concluye que la mayor parte de guías técnicas no ofrecen indicaciones específicas sobre la protección de las instalaciones y que se necesitan más investigaciones de campo sobre los efectos a largo término de los desinfectantes sobre las redes de distribución de agua sanitaria (Rhoads *et al.*, 2014). A pesar de que este cuerpo de conocimiento no es el propio de la presente tesis, de ámbito biomédico, hemos creído conveniente realizar una breve reseña de la evidencia disponible hasta el momento.

El principal problema de las elevadas temperaturas del ACS sobre las instalaciones es que pueden provocar incrustaciones debido a que algunas sales disueltas en el agua, como el carbonato cálcico, pierden solubilidad. La capa de carbonatos reduce el diámetro de tuberías, produciéndose una pérdida de carga, lo que se traduce en una mayor demanda de energía para mantener la recirculación. Este fenómeno aumenta exponencialmente a partir de los 50°C. La temperatura también influye sobre la velocidad de corrosión, aunque con variaciones importantes según el tipo de material. En el caso del acero galvanizado, temperaturas por encima de 60 °C pueden ocasionar corrosión por inversión de polaridad: la capa protectora de hidróxido o carbonato se modifica y aumenta el potencial de oxidación del zinc, que deja de actuar como ánodo de sacrificio y es el hierro el que se corroe para proteger al zinc. Respecto al acero inoxidable, la presencia de iones cloruro puede provocar graves procesos de corrosión al actuar como ión complejante, fenómeno que se agrava con las temperaturas elevadas. En cuanto a las tuberías de material plástico, el PVC puede soportar temperaturas de hasta 82°C de manera continuada. Sin embargo, existe escasa evidencia de los efectos que pueda tener la temperatura a largo término en los otros tipos de plásticos.

Los efectos del cloro sobre las instalaciones son probablemente los mejor conocidos. El cloro es un potente agente oxidante y puede reaccionar con la mayor parte de los materiales, incluidos el acero, el cobre y el polietileno, aunque no con el PVC. El cloro puede acelerar el proceso de envejecimiento de las tuberías de cobre por consumo del hidróxido cúprico, su componente soluble, con lo que se reducen a la vez los niveles en agua de cobre y de cloro. Se ha observado que en tuberías de cobre con aguas sin

desinfectante clorado residual se mantienen elevados niveles de cobre soluble, que actúan como biocida (Edwards *et al.*, 2000). En cuanto al dióxido de cloro, es sabido que es más agresivo que el cloro sobre las tuberías de polietileno, polipropileno y polibutileno. La explicación más aceptada es que, al ser un gas, penetra más fácilmente en el polímero. Los efectos a largo término de la cloramina sobre las instalaciones apenas han sido estudiados. Parece ser que precipita la formación de óxidos en tuberías metálicas y su desprendimiento (Edwards y Dudi, 2004). Igualmente, tampoco se conoce con detalle el impacto de los sistemas de ionización cobre-plata. Dado que estos sistemas ya se están utilizando en bastantes hospitales desde hace años, la escasez de publicaciones podría ser indicativa de que no conllevan problemas importantes.

Tres

Hipótesis y objetivos

*You have to let it all go, Neo. Fear, doubt, and disbelief.
Free your mind.*

Laurence Fishburne as Morpheus

The Matrix (1999)

1. Hipótesis

Las hipótesis en las que se basa la presente tesis son:

1. En instalaciones de ACS bien dimensionadas y con recirculaciones adecuadas, el mantenimiento de una temperatura mínima de 55°C en los puntos terminales es un sistema efectivo de desinfección en continuo para *Legionella*, mientras que una temperatura mínima de 50°C es insuficiente para garantizar un buen control ambiental.
2. En instalaciones de ACS con recirculaciones y/o dimensionamiento no apropiados, las temperaturas elevadas en continuo no son un método efectivo para reducir la colonización por *Legionella*, puesto que el estancamiento del agua favorece su enfriamiento.
3. En instalaciones de ACS bien dimensionadas y con recirculaciones adecuadas, la colonización por *Legionella* está condicionada principalmente por la temperatura, por lo que ésta es un buen predictor del control ambiental del microorganismo.
4. El diseño y el dimensionamiento de las instalaciones de ACS determinan la colonización por *Legionella*, con independencia de la temperatura.
5. El ACS de un edificio hospitalario presenta una baja variabilidad genotípica de *Legionella*, pero en redes de distribución independientes del mismo edificio, los genotipos predominantes de *Legionella* no están relacionados entre sí.
6. Los genotipos predominantes de *Legionella* en instalaciones de ACS independientes son diferentes en función de las temperaturas alcanzadas, puesto que las temperaturas elevadas favorecerían la selección y persistencia de patrones más termorresistentes.

2. Objetivos

El **primer objetivo general** de esta tesis es determinar la efectividad a largo término de mantener el ACS a temperaturas elevadas como único método de desinfección en continuo para *Legionella* en un edificio hospitalario con instalaciones antiguas, de gran recorrido y de elevada complejidad.

Los **objetivos específicos** de este primer objetivo general son:

1. Determinar si el mantenimiento de la temperatura del ACS en puntos terminales a un mínimo de 55°C reduce la colonización por *Legionella* en instalaciones bien dimensionadas y con circuitos de recirculación adecuados, en comparación con una temperatura mínima de 50°C.
2. Determinar si el mantenimiento de la temperatura del ACS en puntos terminales a un mínimo de 55°C reduce la colonización por *Legionella* en instalaciones con dimensionamiento y/o recirculaciones no apropiados, en comparación con una temperatura mínima de 50°C.
3. Determinar si existe una asociación positiva entre diferentes gradientes de temperatura en puntos terminales de instalaciones de ACS y la colonización por *Legionella*.
4. Cuantificar el efecto relativo sobre la colonización por *Legionella* de parámetros relacionados con el diseño y el dimensionamiento de las instalaciones de ACS.

El **segundo objetivo general** de esta tesis es describir la variabilidad genotípica de *Legionella* en ACS de un edificio hospitalario con instalaciones antiguas, de gran recorrido y de elevada complejidad, en función de factores asociados a la instalación.

Los **objetivos específicos** de este segundo objetivo principal son:

5. Describir la variabilidad genotípica de *Legionella* en dos redes de distribución independientes de ACS de un mismo edificio hospitalario.
6. Describir la variabilidad genotípica de *Legionella* en ACS de un edificio hospitalario según los niveles de temperatura alcanzados para su control ambiental.

Cuatro

Material y métodos

Help me, Obi-Wan Kenobi, you are my only hope!

Carrie Fisher as Princess Leia

Star Wars: Episode IV – A New Hope (1977)

1. Ámbito del estudio

El Hospital Universitari de Bellvitge (HUB) es un centro hospitalario y universitario de titularidad pública que pertenece al Institut Català de la Salut y está localizado geográficamente en el término municipal de l'Hospitalet de Llobregat. El HUB es uno de los cinco hospitales de Cataluña acreditados como centro de tercer nivel, o máxima complejidad. Dispone de todas las especialidades médico-quirúrgicas excepto pediatría, obstetricia, hematología clínica, oncología médica y oncología radioterápica. Dentro de los procedimientos de la más elevada complejidad, cabe destacar el trasplante renal, hepático y cardiaco.

Como hospital de referencia comunitario, su área de influencia comprende la zona sur de l'Hospitalet de Llobregat y el municipio del Prat de Llobregat (343.172 habitantes). Como hospital de referencia de alta complejidad, su área de influencia incluye el municipio de l'Hospitalet de Llobregat y las comarcas del Baix Camp, el Alt Penedès i el Garraf (1,3 millones de habitantes). Para determinadas especialidades y procedimientos de la más elevada complejidad, su área de influencia se extiende, además, a las comarcas del Camp de Tarragona y las Terres de l'Ebre (más de 2 millones de habitantes). Los principales indicadores de la actividad asistencial en el área de hospitalización a lo largo del período de estudio de la presente tesis se exponen en la tabla 14.

Tabla 14. Indicadores de la actividad asistencial en el área de hospitalización del Hospital Unversitari de Bellvitge. Período 2005 – 2014.

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Número de camas	789	788	820	775	790	759	645	628	649	619
Ingresos	33.494	31.398	32.560	33.372	33.750	33.014	29.994	29.128	30.320	31.584
Estancias	240.423	246.038	249.638	226.625	243.480	233.294	210.663	209.906	208.695	211.942
Estancia media	7,2	7,7	8,0	7,9	7,8	8,4	8,5	8,7	8,3	8,1
Índice de ocupación	84,2	84,6	83,2	85,5	84,5	88,0	89,7	88,0	94,9	94,3

2. Diseño del estudio

Para responder al primer objetivo general se diseñó un estudio cuasi-experimental. La intervención consistió en aumentar la temperatura mínima del ACS en puntos terminales a niveles $\geq 55^{\circ}\text{C}$. En base a esta intervención, los períodos de estudio fueron:

- *Período pre-intervención (período 1)*: la temperatura mínima exigida del ACS en puntos terminales fue la establecida por la legislación vigente ($>50^{\circ}\text{C}$). Este período comprendió un total de 2 años y un mes (mayo 2005 - mayo 2007).
- *Período post-intervención (período 2)*: la temperatura mínima exigida del ACS en puntos terminales se aumentó en 5°C respecto a la establecida por la legislación vigente ($\geq 55^{\circ}\text{C}$). Este período comprendió un total de 6 años y 2 meses (junio 2007 - julio 2013).

Para responder al segundo objetivo general se diseñó un estudio descriptivo de una muestra representativa de aislamientos criopreservados de *L. pneumophila* que se habían obtenido en un período de tres años (enero 2012 – diciembre 2014).

3. Descripción del lugar del estudio

3.1. Descripción arquitectónica y de servicios

La denominada Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge se ubica en un solar con una superficie de parcela de 135.747 m² e incluye edificios pertenecientes a la Universitat de Barcelona y al Institut Català de la Salut, siendo el edificio principal del HUB el más antiguo del recinto. Este edificio se empezó a construir a mediados del año 1970 y se inauguró el 8 de noviembre de 1972. El hospital cuenta con tres edificaciones más en su recinto (figura 17): el edificio de rehabilitación-antigua escuela de enfermería, el de consultas externas (inaugurado en el año 2006), y el nuevo edificio de urgencias y técnico-quirúrgico (inaugurado en octubre de 2014).

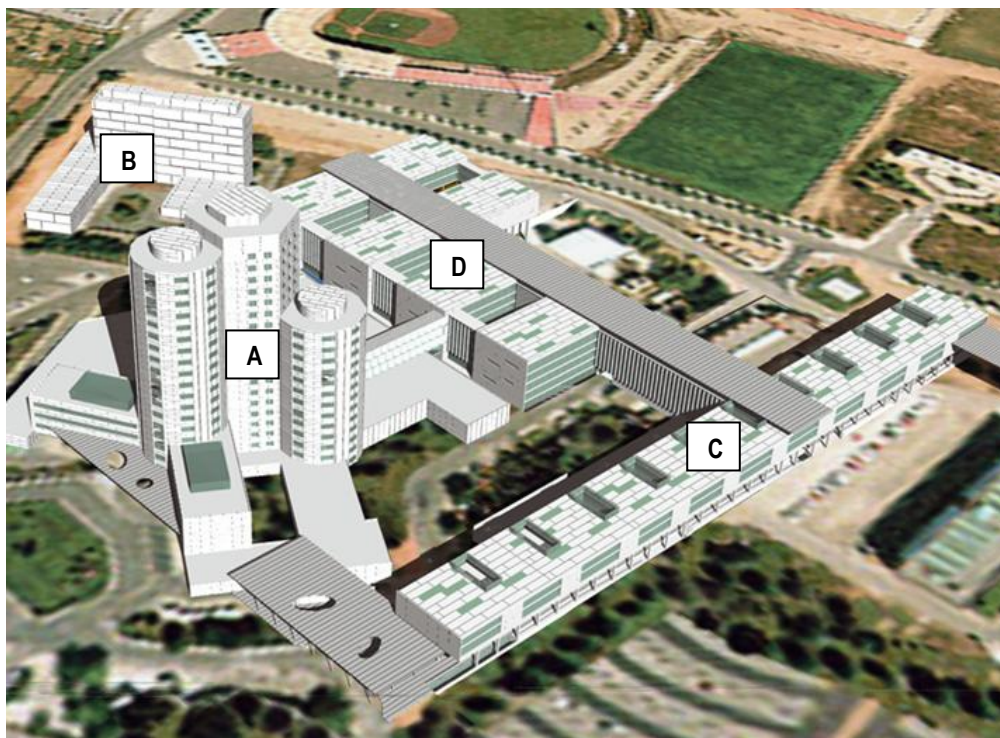


Figura 17. Representación aérea del recinto del Hospital Universitari de Bellvitge (A: edificio central de hospitalización; B: edificio de rehabilitación-antigua escuela de enfermería; C: edificio de consultas externas; D: edificio de urgencias y técnico-quirúrgico). Fuente: archivo del Hospital Universitari de Bellvitge.

La disposición vertical característica del edificio principal responde al patrón común de hospitales impulsado por el Instituto Nacional de Previsión en los años 60 y 70 (figura 18). Se trata de una edificación de veinte plantas sobre rasante y dos plantas bajo rasante. Todas las plantas tienen acceso público excepto la segunda bajo rasante que es una planta técnica y de instalaciones. El edificio consiste en un elemento central, donde se sitúa el núcleo de comunicaciones verticales, tres torres de forma poliédrica de alturas diferentes y dos elementos rectangulares de menor altura. Cada una de las torres

se nombra de acuerdo con su altura, sin contar la planta baja: diecinueve plantas la torre 19 (T19), trece plantas la torre 13 (T13), y nueve plantas la torre 9 (T9). Anexados lateralmente a la T19, en su cara frontal, hay dos edificaciones rectangulares de cuatro plantas sobre rasante y también dos bajo rasante. Asimismo, las plantas 0 y -1 cuentan con una mayor extensión edificada orientada a la parte posterior del núcleo principal. Las tres torres a partir de la planta 1 configuran las denominadas “zonas verticales” (ZV). La edificación frontal anexada, así como las plantas -1 y 0 en su totalidad conforman las denominadas “zonas horizontales” (ZH). La figura 19 muestra la identificación de estas zonas.

En sección, a medida que el edificio crece en altura, disminuye el número de poliedros por planta (tres hasta la planta 9, dos entre las plantas 10 y 13 y uno entre las plantas 14 y 19). En las plantas 1, 2 y 3, el poliedro que correspondería a la T19 no se aprecia como tal debido a la solución de continuidad con las ZH. En las plantas 0 y -1 la distribución de espacios no permite apreciar la estructura poliédrica de ninguna de las tres torres.



Figura 18. Fotografía del edificio principal del Hospital Universitari de Bellvitge.
Fotografía: archivo del Hospital Universitari de Bellvitge.

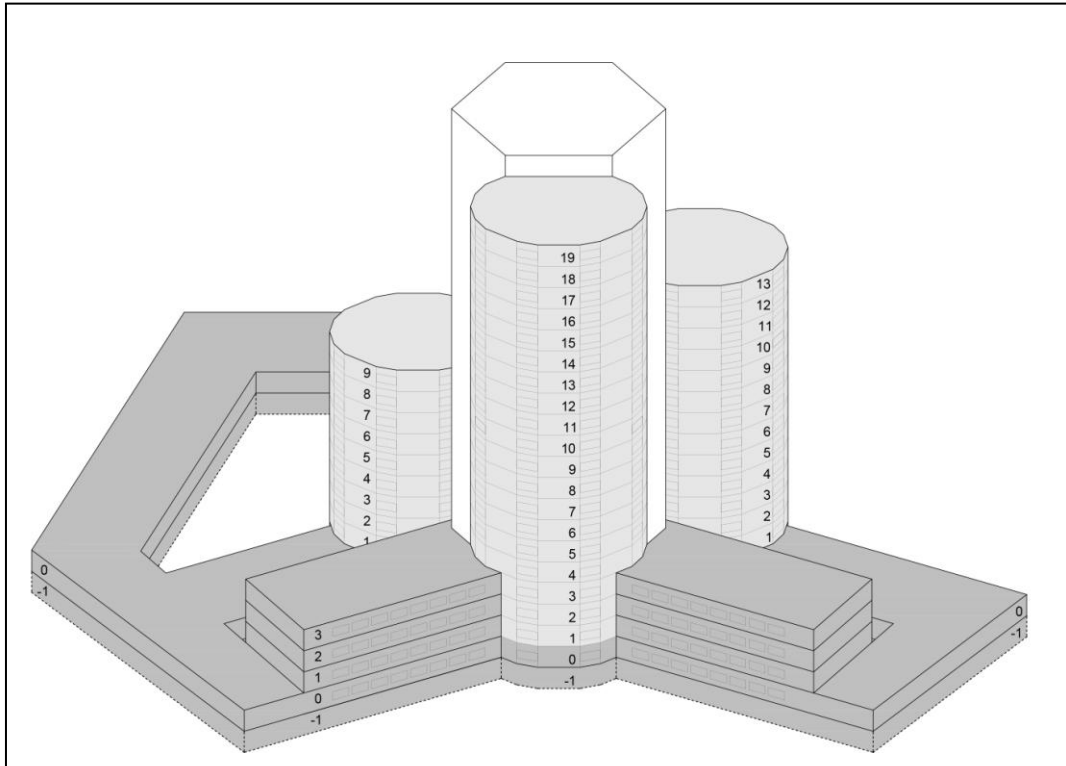


Figura 19. Representación sin escala real del edificio principal del Hospital Universitari de Bellvitge con identificación de zonas según criterio arquitectónico: zonas verticales (color claro) y zonas horizontales (color oscuro).
Infografía: Pol Valls Alonso.

La distribución de las áreas asistenciales y no asistenciales del edificio se resume como sigue:

- Hospitalización de agudos convencional: ocupa las plantas 4 a 19 de las tres torres y la planta 3 de la T9. A lo largo del período de estudio esta distribución ha variado como consecuencia de la reducción del número de camas, siendo la tendencia el cierre de las plantas más altas de la T19.
- Unidades de críticos: incluyen las unidades de curas intensivas (UCIs), la unidad coronaria y las dos áreas de reanimación post-quirúrgica (bloque quirúrgico central y de urgencias). Las UCIs están ubicadas en la planta 1 de T9, la planta 2 de T9, la planta 2 de T13 (sin funcionamiento desde el año 2011) y la planta 3 de T13. La unidad coronaria ocupa la planta 4 de T19. La reanimación del bloque quirúrgico central está en la planta 1 de T13 y la del bloque quirúrgico de urgencias en la planta 0.
- Bloque quirúrgico central: está ubicado en las ZH, ocupando la totalidad de las plantas 1 y 2, y la mitad de la planta 3.
- Hemodiálisis y hospitalización de trasplantados renales: ocupa la mitad de la planta 3 de las ZH.
- Urgencias: se distribuye en tres áreas de la planta 0 (nivel 1, nivel 2 y enfermería de urgencias).

- Los laboratorios de análisis clínicos, hematología, bioquímica y microbiología, las instalaciones de radiodiagnóstico y el área administrativa se ubican en la planta 0.
- En la planta -1 coexisten áreas de servicio (cocina, comedor, hospedería, vestuarios y taller-almacén de mantenimiento) con servicios centrales (esterilización, farmacia y anatomía patológica) y servicios asistenciales ambulatorios (gabinetes de pruebas complementarias y área de endoscopias).

A modo de resumen, la hospitalización de agudos convencional se ubica íntegramente en las ZV (con la excepción del área de hospitalización de trasplantados renales, que cuenta con tres habitaciones en ZH) y en ZH no hay camas de hospitalización, aunque sí áreas asistenciales sin ingreso (bloque quirúrgico, hemodiálisis, urgencias, radiodiagnóstico, gabinetes de pruebas complementarias y área de endoscopias).

3.2. Descripción de las instalaciones de agua sanitaria

3.2.1. Antecedentes: de las instalaciones originales al inicio del estudio

En sus orígenes, la producción de ACS del HUB se realizaba mediante un sistema de intercambiadores y la red de distribución original era de hierro galvanizado. Poco después de la puesta en marcha del hospital, se fueron realizando frecuentes sustituciones de tramos de tuberías empleando recambios de cobre, lo que ocasionó una importante corrosión catódica en la mayor parte de la red de ACS. Ello obligó a su recambio total por cobre en el año 1977. En el año 1984 se procedió a sustituir la red de AF por PVC y se empezó a cambiar la red de ACS por poliéster con capa de fibra. En el año 1985 se sustituyeron los intercambiadores originales de producción de ACS por tres depósitos acumuladores alimentados por vapor de agua, con una capacidad de 10.000 litros cada uno. En el año 1990 se sustituyen las acometidas principales y los anillos de distribución por acero inoxidable 316-L. A partir del año 2000 también se fueron sustituyendo progresivamente los montantes principales por acero inoxidable. A raíz de la entrada en vigor del RD 865/2003 para la prevención y control de la legionelosis y, de acuerdo con los servicios de sanidad ambiental del Departament de Salut, se instaló un sistema de pasteurización en continuo del ACS que permitió prescindir de los tres acumuladores. El primer pasteurizador entró en funcionamiento en abril de 2004 para alimentar las plantas más inferiores del edificio, y con posterioridad, en enero de 2005, entró en funcionamiento el segundo acumulador para el resto de plantas.

3.2.2. Descripción de los circuitos de agua sanitaria durante el período de estudio

Los circuitos de agua sanitaria del HUB se mantuvieron sin apenas variaciones a lo largo del período de estudio. Debido a la magnitud del edificio principal, las instalaciones ya se diseñaron desde sus inicios con dos circuitos independientes que siguen la misma distribución geográfica para ACS y AF: el circuito

que alimenta las denominadas “zonas altas” (ZA) y el que alimenta las denominadas “zonas bajas” (ZB). En la figura 20 se representa la identificación de estas zonas. A su vez, en las ZB cabe distinguir dos circuitos más, que se explican con detalle en los apartados posteriores: el circuito de ZB para las zonas verticales y el circuito de ZB para las zonas horizontales. La red de ZB funciona a 6 bars y distribuye 60m³/día con una punta de 9 m³/hora y la red de ZA funciona a 10 bars y produce 40 m³/día, con una punta de 5m³/hora. En la tabla 15 se exponen con detalle las plantas y áreas que alimenta cada circuito de instalación. La figura 21 representa el diagrama de flujo de la instalación de agua sanitaria del edificio principal del HUB y la figura 22 expone el esquema hidráulico de la instalación de ACS.

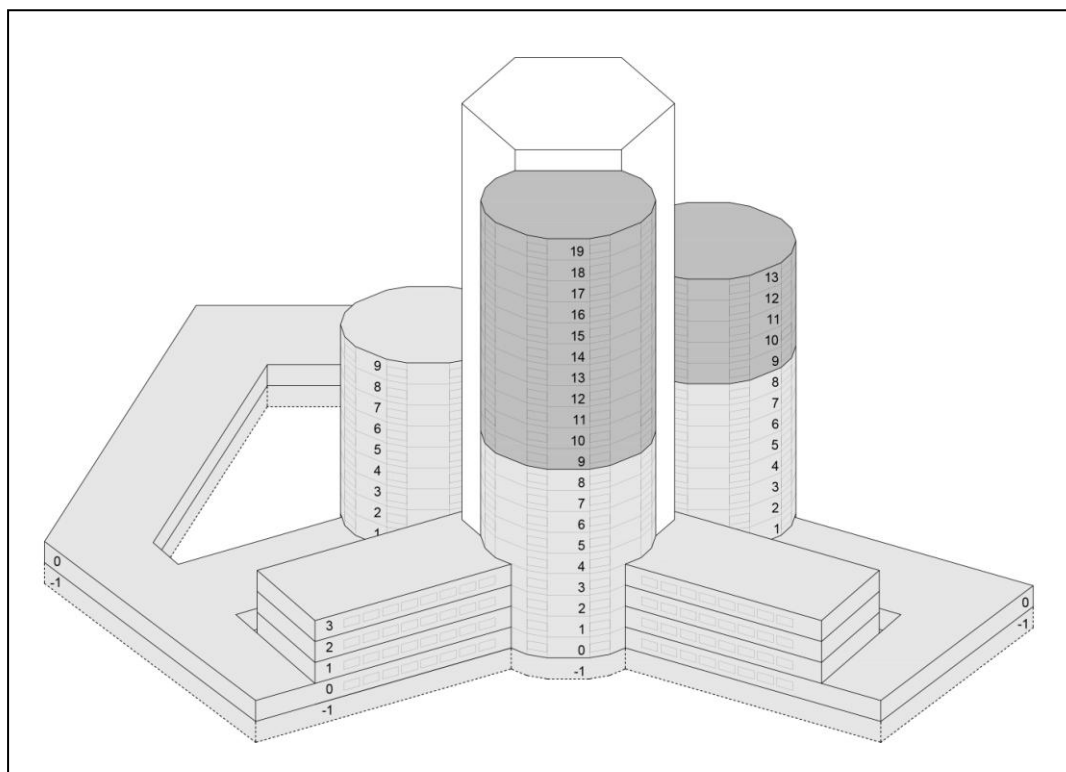


Figura 20. Representación sin escala real del edificio principal del Hospital Universitari de Bellvitge con identificación de zonas según criterio de instalación del agua sanitaria: zonas bajas (color claro) y zonas altas (color oscuro).
Infografía: Pol Valls Alonso

Tabla 15. Descripción de la distribución de los circuitos de agua caliente sanitaria y agua fría y sus áreas de alimentación.

Criterio arquitectónico	Circuito de instalación	Componentes del edificio	Plantas	Áreas de alimentación
Zonas verticales	Zonas altas	T19 T13	19 a 9 13 a 9	Hospitalización convencional
Zonas verticales	Zonas bajas	T19 T13 T9	8 a 1 8 a 1 9 a 1	Hospitalización convencional, hospitalización de críticos
Zonas horizontales	Zonas bajas	T19 y anexos T13 y anexos T9 y anexos	0, -1 0, -1 0, -1	Urgencias, área administrativa, laboratorios, radiodiagnóstico, gabinetes, esterilización, cocina, farmacia, talleres, hospedería, vestuarios, lencería
Zonas horizontales	Zonas bajas	Anexos	3 a 1 3 a 1	Bloque quirúrgico central, hemodiálisis, hospitalización de trasplante renal

Nota. T19: torre 19; T13: torre 13; T9: torre 9.

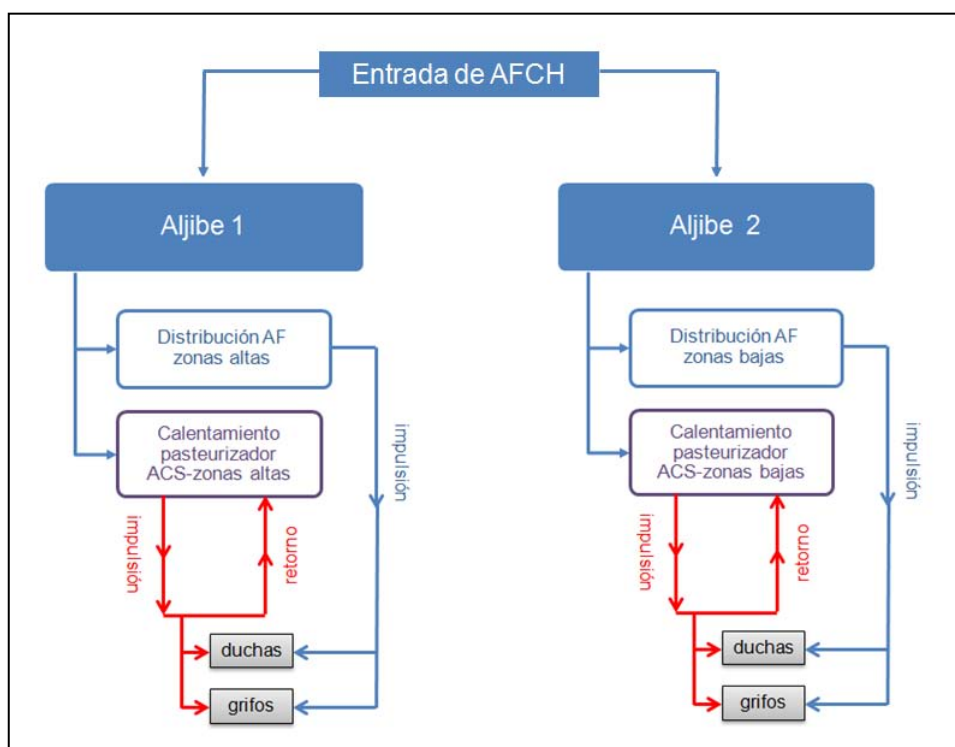
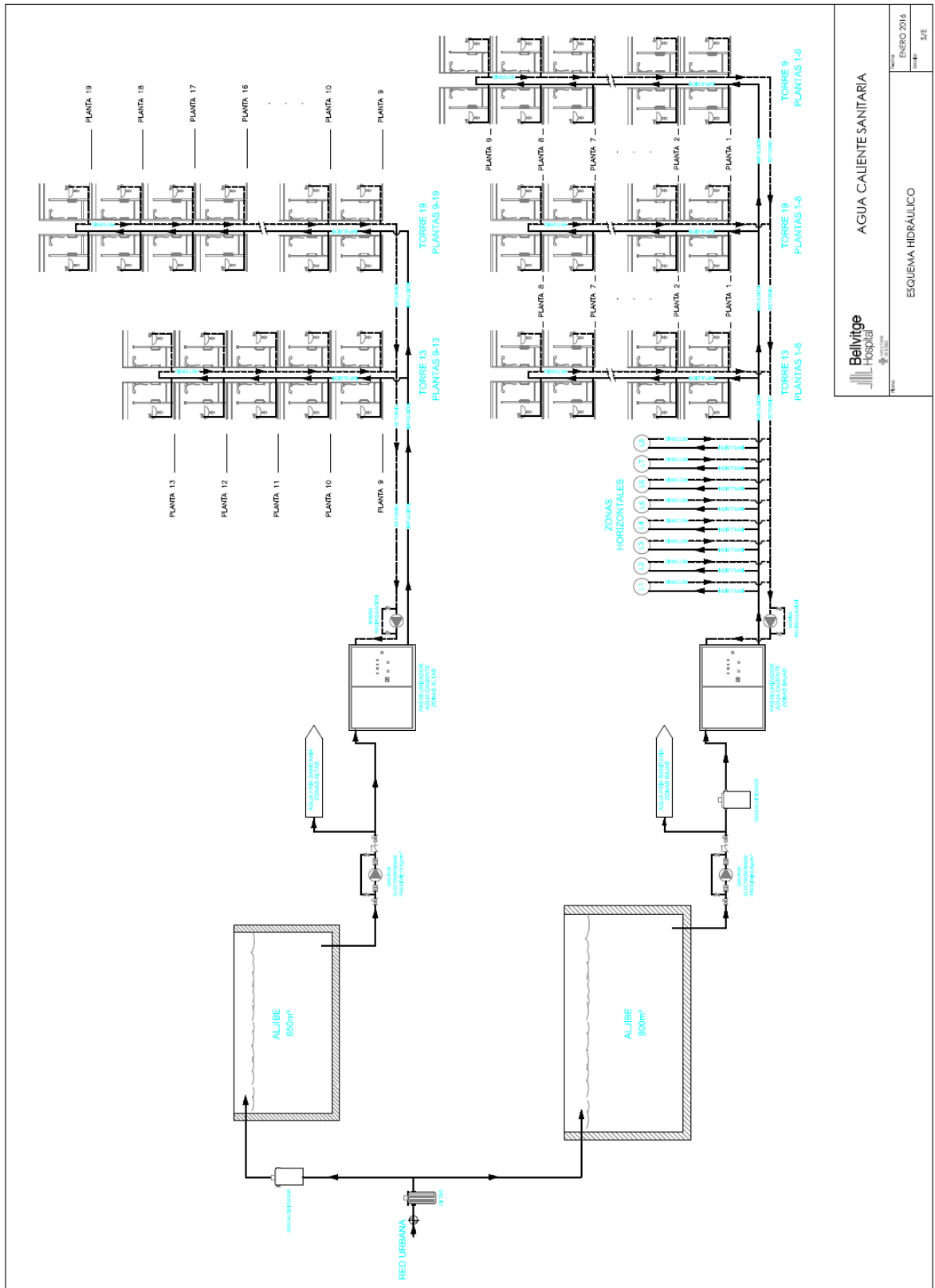


Figura 21. Diagrama de flujo de de la instalación de agua sanitaria del edificio principal del Hospital Universitari de Bellvitge.



Bellvitge
HOSPITAL

AGUA CALIENTE SANITARIA

ESQUEMA HIDRÁULICO

FECHA: ENERO 2016
 TÍTULO: S/E

Figura 22. Esquema hidráulico de la instalación de agua caliente sanitaria del edificio principal del Hospital Universitari de Bellvitge.
 Diseño: Sergi Rodriguez Garcia.

El recorrido de los circuitos de ACS y AF discurre según se expone a continuación.

a. Entrada del agua e instalaciones comunes

a.1. Entrada del agua de red: el suministro de agua se realiza mediante una acometida única en la red general de la compañía Aigües de Barcelona, que cuenta con una unidad de filtrado de 80 µm. Desde aquí, el agua es conducida a dos aljibes subterráneos ubicados en el área del edificio técnico-quirúrgico.

a.2. Aljibes de AFCH: los dos aljibes de AFCH tienen una capacidad de 650 m³ y 800 m³, respectivamente. Ambos cuentan con sistemas de cloración automáticos consistentes en lectura en continuo de los niveles de cloro en un circuito de recirculación e inyección de cloro, si es necesario, por diferentes puntos del aljibe para garantizar la homogeneidad. La velocidad del circuito de recirculación permite la lectura de la totalidad del volumen de cada aljibe en un tiempo aproximado de dos horas.

a.3. Derivaciones desde los aljibes: ambos aljibes alimentan las redes de AF y ACS de las áreas de hospitalización, además de otras redes de uso sanitario fuera del área de hospitalización y de las aguas de uso industrial. La descripción de los aljibes es la siguiente:

- Aljibe de 650 m³: cuenta con una bomba de presión de 10 kg/cm², desde donde el agua se distribuye de la siguiente manera:
 - Una línea sale hacia el edificio central del hospital para alimentar la red de AF de ZA.
 - Otra línea es sometida a descalcificación en la misma zona de los aljibes y se dirige al edificio de la central térmica para alimentar un pasteurizador.
- Aljibe de 800 m³: cuenta con una bomba de presión de 6 kg/cm², desde donde el agua se distribuye de la siguiente manera:
 - Una línea sale hacia el edificio central del hospital para alimentar la red de AF de ZB.
 - Otra línea es sometida a descalcificación en la misma zona de los aljibes, y de aquí parten cuatro líneas independientes: 1) a la central térmica para alimentar un segundo pasteurizador, previa descalcificación; 2) al servicio de lavandería; 3) a la central de esterilización; y 4) a las instalaciones de agua industrial.
 - Una tercera línea alimenta de manera independiente la cadena de diálisis.

b. Circuito de ACS

Se considera que el circuito de ACS del edificio central del hospital se inicia a partir del punto de conexión de las dos líneas de AF procedentes ambos aljibes a cada uno de los pasteurizadores ubicados en el edificio de la central térmica.

b.1. Calentamiento y distribución hacia el edificio central del hospital: el calentamiento del ACS se realiza mediante el sistema de pasteurización Pastormaster® (Physis Development, S.L.), cuyo funcionamiento se describe con detalle más adelante. En la central térmica se encuentran ubicados tres pasteurizadores,

dos de los cuales están en permanente funcionamiento y el tercero es un equipo de reserva. El primer pasteurizador alimenta las ZB del hospital, así como el edificio de consultas externas. El segundo pasteurizador alimenta las ZA. Cada pasteurizador cuenta con una bomba de circulación para mantener la recirculación constante de todo el circuito de ACS. Las dos líneas siguen su recorrido desde los pasteurizadores a la terraza del edificio de la central térmica, de donde salen las derivaciones para el edificio de consultas externas. Posteriormente descienden y discurren por la galería de servicio subterránea, en paralelo con otros servicios, hasta alcanzar el edificio central del hospital en la planta de servicio ubicada en el sótano -2.

b.2. Circuito de impulsión para las ZB: una vez en la planta -2, la línea del pasteurizador de ZB se divide en dos ramas para conectar con dos colectores de impulsión.

- Colector de impulsión 1: se encuentra debajo de las T19 y T9. De él parten:
 - Una línea hacia un anillo circular de impulsión que alimenta ZV-ZB de T19.
 - Una línea hacia un anillo circular de impulsión que alimenta ZV-ZB de T9.
 - Cinco líneas independientes que alimentan diferentes partes de las ZH-ZB: cuatro de ellas para las plantas -1 y 0 del AS y otra que asciende para la mitad del bloque quirúrgico, en las plantas 1, 2 y 3.
- Colector de impulsión 2: se encuentra debajo de la T13. De él parten:
 - Una línea hacia un anillo circular de impulsión que alimenta ZV-ZB de T13.
 - Cuatro líneas independientes que alimentan diferentes partes de las ZH-ZB: tres de ellas para las plantas -1 y 0 y otra que asciende para la otra mitad del bloque quirúrgico, en las plantas 1, 2 y 3.

b.3. Circuito de impulsión para las ZA: Una vez en la planta -2, la línea del pasteurizador de ZA se divide en dos ramas que ascienden directamente hasta la planta 8 de T13 y T19, respectivamente, donde hay dos anillos circulares de impulsión más (uno por torre).

b.4. Distribución en las áreas de ZV: el circuito de distribución en las áreas de hospitalización de ZV sigue el mismo esquema tanto para ZA como para ZB y parte íntegramente de los anillos circulares. De los tres anillos de la planta -2 suben los diferentes montantes por los patinillos para alimentar las plantas -1 a 8 de T19 y T13, y -1 a 9 de T9. De los dos anillos de las plantas 8 suben los montantes por los patinillos para alimentar las plantas 9 a 19 de T19 y 9 a 13 de T13, respectivamente. De forma general, cada montante alimenta cuatro habitaciones: dos en su tramo de subida, o impulsión, y dos en su tramo de bajada, o retorno. A cada anillo le corresponden 8 montantes (4 de impulsión y 4 de retorno). El número total de montantes de la instalación de ACS en las torres es 40 (20 de impulsión y 20 de retorno).

b.5. Distribución en las áreas de ZH: estas áreas se alimentan de las líneas que parten de los colectores 1 y 2, antes mencionados. Atendiendo a su circuito, existen dos clases de líneas: a) las que alimentan

las plantas -1 y 0, que circulan por los falsos techos de la planta -1, y de donde parten tuberías en sentido descendente y ascendente para dichas plantas; b) las que alimentan las alas de las plantas 1, 2 y 3, que circulan por los falsos techos de las plantas 1 y 2, y de donde parten tuberías en sentido descendente y ascendente para dichas plantas. En ambos casos, hay salidas de conducciones para los elementos terminales tanto en los tramos de impulsión como de retorno. En la tabla 16 se detallan la circulación y zonas de alimentación de las líneas de ZH.

b.6. Elementos terminales: la distribución de los elementos terminales es muy similar en las unidades de hospitalización de las torres. Una unidad de hospitalización común de tipo estándar dispone de 14 habitaciones dobles con baño sin ducha, dos duchas comunes a la entrada de la unidad, dos lavamanos ubicados en el centro de la unidad, una zona de sucio con punto de desinfección del material y una zona de office para el personal, con pica de cocina. Ellos supone un promedio por unidad de 2 duchas y 11 grifos de lavabos. El censo de elementos terminales del edificio principal del hospital correspondiente al año 2012 contabiliza un total de 1.380 grifos y 130 duchas, distribuidos en 79 duchas y 786 grifos en ZV y 51 duchas y 594 grifos en ZH. Todas las duchas son de tipo flexo desmontable y los grifos son monomandos. EN ZV, tanto las duchas como los lavabos de las habitaciones de los pacientes apenas tienen tramo sin recirculación por encontrarse las tomas muy cerca de los montantes principales. Los elementos terminales ZH no tienen una distribución uniforme por tener que adecuarse a los diversos usos que existen en estas áreas.

b.7. Circuito de retorno de ZV: los montantes originados en los cinco anillos circulares de impulsión retornan a otros tantos anillos circulares de retorno, igualmente ubicados (dos en la planta 8 y tres en la planta -2). La localización de los tramos de inicio del retorno es la siguiente:

- ZB de T19, T13 y T9: falso techo de las respectivas plantas 8. La alimentación de la planta 9 de T9 se hace a través de líneas ascendentes.
- ZA de T19: falso techo de la planta 19.
- ZA de T13: falso techo de la planta 13.

De cada anillo de retorno parte una línea para los dos colectores de retorno de la planta -2, siguiendo el mismo trazado que las líneas de impulsión.

b.8. Circuito de retorno de ZH: las líneas de retorno de las ZH siguen también el mismo trazado que el especificado en la impulsión, llegando igualmente a sus respectivos colectores de retorno. De éstos parten las líneas de retorno generales hacia la central térmica por la misma galería de servicio, hasta empalmar con los pasteurizadores, donde se cierra el circuito del ACS.

Tabla 16. Descripción de los circuitos de agua caliente sanitaria y áreas de alimentación en zonas horizontales.

Colector	Línea	Áreas de alimentación en planta -1	Áreas de alimentación en planta 0	Áreas de alimentación en plantas 1 a 3
1	1	Endoscopias Gabinetes	Laboratorio de microbiología	
1	2	Medicina nuclear	Urgencias Área administrativa	
1	3			Bloque quirúrgico
2	4	Hospedería Vestuarios	Urgencias	
2	5	Cocina	Urgencias	
2	6			Bloque quirúrgico Hemodiálisis Hospitalización trasplante renal
1	7	Farmacia Anatomía patológica	Laboratorios de bioquímica y hematología	
1	8	Esterilización		
2	9	Taller y almacén de mantenimiento	Radiología	

c. Circuito de AF

El circuito del AF discurre en paralelo al circuito de impulsión del ACS, excepto en lo concerniente a la central térmica, pudiéndose resumir de la siguiente manera:

- De cada aljibe parten dos líneas independientes que discurren por la galería de servicio hasta llegar a la planta -2 del edificio central, donde conectan con dos colectores de impulsión del AF ubicados al lado de los del ACS.
- La instalación de distribución es paralela a la del ACS: 3 anillos de impulsión en la planta -2, 2 anillos de impulsión en los falsos techos de las plantas 8, de T19 y T13 y la misma red de distribución para ZH.
- Cada montante que sale de los anillos y sube por los patinillos de la torres alimenta dos habitaciones.

3.2.3. Modificaciones de los materiales de las instalaciones durante el estudio

A lo largo de los años 2005 a 2014 se realizaron numerosas intervenciones de renovación y saneamiento de la red de ACS, motivadas tanto por el desgaste y corrosión de materiales como por la detección de áreas de riesgo a través del plan de autocontrol de legionelosis. La elevada complejidad de la red de distribución a la que hacemos referencia en la presente tesis se debe, no tan sólo a la magnitud de la instalación, sino a la evolución y remodelación constantes de dicha red.

A continuación se detalla el cronograma de las actuaciones llevadas a cabo en las líneas principales durante el periodo 2005 – 2014, y que afectaron tanto a la instalación del ACS como del AF (se especifica el mes en que se hizo entrega de la nueva instalación). Estas actuaciones son las que se han incluido en el análisis de resultados de la presente tesis. Debe especificarse que también se fueron renovando diversas líneas secundarias en sucesivas etapas, tanto en ZV como en ZH, pero que no se han podido tener en cuenta en este análisis por no haberse registrado de manera prospectiva.

- Octubre 2006: sustitución de los colectores y todos los anillos de distribución por acero inoxidable 316-L.
- Octubre 2007: sustitución por acero inoxidable de la línea de impulsión y retorno de ZH que alimenta endoscopias
- Diciembre 2007: sustitución por acero inoxidable de la línea de impulsión y retorno de ZH que alimenta gabinetes (planta -1) y laboratorio de microbiología (planta 0).
- Octubre 2008: sustitución por acero inoxidable de la línea de impulsión y retorno de ZH que alimenta medicina nuclear (planta -1), servicio de urgencias – nivel II medicina (planta 0) y zona administrativa (planta 0).
- Octubre 2010: sustitución por acero inoxidable de la línea de impulsión y retorno de ZH que alimenta hospedería y vestuarios (planta -1) y servicio de urgencias – nivel I medicina y nivel II cirugía (planta 0).
- Agosto 2012: sustitución por polipropileno de los tres anillos de impulsión de ACS de la planta - 2 y sus conexiones con los colectores.

3.2.4. Descripción del sistema de pasteurización en continuo

El sistema de pasteurización en continuo del ACS Pastormaster® (Physis Development, S.L.) se instaló al constatarse la necesidad de un recambio de los acumuladores tras la entrada en vigor del RD 865/2003. El primer pasteurizador entró en funcionamiento en abril de 2004 para alimentar las ZB y el segundo, en enero de 2005 para alimentar las ZA. Con posterioridad, se instaló un tercer pasteurizador de reserva en caso de fallo de alguno de los anteriores. El sistema de pasteurización recibe el aporte del agua de red a través de los dos aljibes. Asimismo, para lograr la temperatura de pasteurización, está conectado al sistema primario de calderas, que trabaja con una temperatura media de 150°C.

El pasteurizador de ZB es una subestación Pastormaster, tipo standard BB014, construcción polibutileno/poliamida. El pasteurizador de ZA es una subestación Pastormaster, tipo alta presión BB014, construcción acero inoxidable AISI 31 6L. Ambos equipos constan de:

- Una unidad de mezcla del agua en la que confluyen el aporte de AF de los aljibes y el ACS del circuito de retorno.
- Un intercambiador de transferencia (no mezcla), donde la temperatura del agua de mezcla se eleva hasta los 42 °C por el aporte del agua procedente de la unidad de pasteurización.
- Un intercambiador de pasteurización (no mezcla), en el que el agua procedente del intercambiador de transferencia se eleva hasta los 70°C por intercambio de calor con el circuito primario de calderas. El agua del circuito primario recircula por medio de una bomba y una válvula de tres vías motorizada controlada por la regulación propia del pasteurizador.
- Una unidad de pasteurización, en la que se mantiene el agua a 70°C durante un mínimo de tres minutos a caudal lento.

El control de la temperatura se mantiene a través de la central electrónica de monitorización de cada pasteurizador, que realiza las siguientes funciones:

- Control de la temperatura de pasteurización (70°C) enviando señal digital a la válvula motorizada exterior del circuito primario de calderas.
- Control de la temperatura de salida a distribución, enviando señal digital a la válvula motorizada del interior del pasteurizador.
- Control de la temperatura de entrada de agua precalentada, enviando señal digital a la válvula motorizada exterior.
- Visualización de las temperaturas de: consigna manual de temperatura de salida, entrada de agua fría sanitaria, entrada de agua retorno de la instalación, entrada de agua precalentada, salida de ACS a distribución, unidad de pasteurización, circuitos primarios de entrada y de salida.

Estos elementos no variaron a lo largo del período de estudio, con la única excepción de la regulación de los niveles de temperatura de salida. En la figura 23 se muestra una fotografía de los pasteurizadores instalados y en la figura 24 el esquema de funcionamiento de dos pasteurizadores Pastormaster® simultáneos.



Figura 23. Equipo de pasteurizadores de agua caliente sanitaria instalados en el HUB.
Fuente: archivo del Hospital Universitari de Bellvitge.

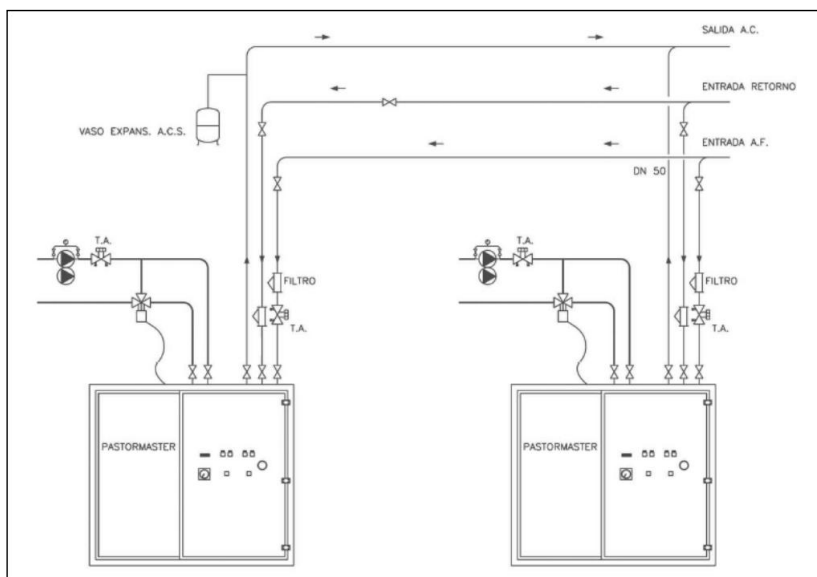


Figura 24. Esquema de funcionamiento de dos pasteurizadores Pastormaster® (Physis Development, S.L.) simultáneos.
Fuente: Physis Development, S.L.

3.3. Plan de autocontrol de *Legionella* durante el estudio

El plan de autocontrol de legionelosis del HUB está vigente como tal desde el año 2005, siguiendo las especificaciones del RD 865/2003 y el Decret 352/2004. En el plan se establecen las medidas para: 1) adaptar la legislación vigente sobre prevención y control de legionelosis en el HUB; 2) establecer los ámbitos de actuación y responsabilidades de las diferentes partes implicadas; y 3) establecer los circuitos de comunicación que deben seguir las diferentes partes implicadas.

El plan contempla las acciones referentes al mantenimiento y vigilancia de las instalaciones. En dichas acciones los responsables implicados son el Servicio de mantenimiento del HUB, la empresa acreditada subcontratada y el Servicio de medicina preventiva. Cabe destacar que a lo largo del período de estudio la empresa acreditada ha sido siempre la misma (Sahicasa Higienal, registro número 5016CAT-SA-LGT de la Dirección General de Salud Pública del Departament de Salut) y que las acciones descritas en el plan apenas sufrieron variaciones.

En el plan se especifican las situaciones que requieren la puesta en marcha del sistema de alerta rápida, consistente en la comunicación urgente por parte del Servicio de mantenimiento al Servicio de medicina preventiva. Estas situaciones son: incidencias con daños materiales, cualquier actuación en el área quirúrgica o zonas con pacientes de alto riesgo, cualquier actuación sobre una línea general y cortes de agua con una duración superior a cuatro horas en todas las áreas asistenciales.

Finalmente, el plan también contempla los circuitos de comunicación en la vigilancia clínica de la enfermedad, quedando establecido que todos los casos de antigenuria positiva o crecimiento en cultivo específico deben ser notificados por el Servicio de microbiología al Servicio de medicina preventiva. Éste a su vez los declara a la Unidad de vigilancia epidemiológica territorial del Departament de Salut. Ante la detección de un caso sospechoso de adquisición hospitalaria se inicia la investigación pertinente en coordinación con dicha unidad.

4. Intervención del estudio

El RD 865/2003, de aplicación en el Estado Español, exige que la temperatura de los puntos terminales sea superior a 50°C. La intervención llevada a cabo en la presente tesis fue aumentar en 5°C esta temperatura, con el objetivo de alcanzar una temperatura mínima de 55°C en los puntos terminales de la instalación. La intervención se implementó en julio de 2007, tras apreciarse un control subóptimo de *Legionella* a lo largo del período de estudio anterior. Esta decisión se apoyó esencialmente en un cuerpo de conocimiento microbiológico sobre el comportamiento de *Legionella* frente a los diferentes dinteles de temperatura, y no en indicaciones de guías técnicas de otros países, muy escasas en ese momento.

Para implementar este cambio se llevaron a cabo los siguientes ajustes previos:

- Identificación de la temperatura de impulsión adecuada para cada uno de los pasteurizadores en funcionamiento.
- Instalación en cada pasteurizador de un registro informático continuo de las temperaturas de impulsión y de retorno.
- Ajuste de la instalación para mantener la temperatura de impulsión de manera continuada minimizando picos y valles gracias a la instalación de alarmas en caso de sobrepasar los dinteles máximo y mínimo.

Asimismo, tanto en el período pre-intervención como en el período post-intervención se registraron las temperaturas del ACS a días alternos en puntos terminales del edificio escogidos con carácter rotatorio. En caso de detectarse temperaturas con niveles inferiores a los permitidos se notificaba al servicio técnico para las comprobaciones y ajustes pertinentes.

En agosto de 2013 se instaló en ZB un dispositivo de alimentación de dióxido de cloro para mejorar la desinfección del ACS, que se retiró a los pocos meses al comprobarse que no se alcanzaban niveles adecuados del desinfectante y por incompatibilidad con el polipropileno de las tuberías. Por este motivo el estudio de intervención se dio por finalizado en julio de 2013, dado que a partir de esta fecha la temperatura no fue el único método de desinfección en continuo de una parte de la red. El muestreo microbiológico de las aguas se continuó realizando siguiendo la misma metodología, a fin de dar cumplimiento al plan de autocontrol del centro.

5. Metodología del análisis microbiológico

5.1. Muestreo del agua caliente sanitaria

El criterio empleado para organizar el plan de muestreo se estableció de acuerdo con los dos primeros objetivos específicos del estudio. Se consideró que en las ZV los puntos terminales estaban ubicados muy próximos a los circuitos de recirculación prácticamente en la totalidad de la instalación, siendo los tramos sin recirculación muy cortos, inferiores a 0,5m. También se consideró que el dimensionamiento de la red era adecuado dado que el uso de la mayoría de grifos y duchas era frecuente y diario. En la elección de los puntos de muestreo se priorizaron aquellos considerados de mayor riesgo para los pacientes ingresados: duchas de pacientes en unidades de hospitalización convencional y grifos en las zonas asistenciales de las unidades de críticos. Con el fin de obtener la máxima representatividad de la instalación, estos puntos se analizaron con carácter rotatorio a lo largo del período de estudio. Asimismo, se estratificó teniendo también en cuenta que la instalación constaba de dos circuitos independientes entre sí (ZA y ZB). Este muestreo rotatorio fue el empleado para responder al primer objetivo específico.

En ZH se fueron identificando sobre plano los puntos más alejados de los circuitos de recirculación. Un mismo punto podía ser muestreado en más de una ocasión en base a los resultados obtenidos en los cultivos y a si se llevaban a cabo medidas de mejora, como recambios en las tuberías o en los grifos. Dado que estas zonas no son áreas de ingreso de pacientes, no se tuvo en cuenta el tipo de punto terminal, incluyéndose mayoritariamente lavamanos y algunas duchas de vestuarios. Este muestreo dirigido fue el empleado para responder al segundo objetivo específico.

De acuerdo con estos requisitos, se estableció un muestreo estratificado en tres áreas teniendo en cuenta el circuito de ACS y los objetivos del muestreo (tabla 17). La toma de las muestras se hizo con periodicidad mensual, y el número de muestras obtenidas fue como mínimo de una por área de muestreo, pudiendo aumentar este número en base a criterios asistenciales o técnicos.

Tabla 17. Descripción de los criterios de muestreo durante el período de estudio.

Área de muestreo	Circuito	Edificio	Planta	Puntos de muestreo	Tipo de muestreo
1	ZV-ZA	T19 T13	19 a 9 13 a 9	Duchas de pacientes	Rotatorio
2	ZV-ZB	T19 T13 T9	8 a 1 8 a 1 9 a 1	Duchas de pacientes Grifos de lavamanos en unidades de críticos	Rotatorio
3	ZH-ZB	Alas Torres y anexos	3 a 1 0 y -1	Duchas de vestuarios y grifos indistintamente	Dirigido

Nota. ZV: zonas verticales; ZH: zonas horizontales; ZA: zonas altas; ZB: zonas bajas; T19: torre 19; T13: torre 13; T9: torre 9.

5.2. Procedimiento de la toma de muestras

El procedimiento de la toma de muestras fue el mismo a lo largo del período de estudio, siendo responsable el personal técnico de la empresa Sahicasa-Higienal. El personal técnico apenas sufrió variaciones a lo largo del período de estudio, puesto que estaba destinado de manera permanente al HUB. Los muestreos se realizaron preferentemente en lunes o martes, en horario de mañana y el transporte de la muestra desde el hospital hasta el laboratorio externo lo realizó el mismo personal técnico al finalizar las tomas. Para la recogida y transporte de las muestras se utilizaron envases estériles de polietileno de 1.000 mL de capacidad y para la recogida de biofilm, hisopos estériles de dracon.

En el muestreo de los puntos terminales se siguieron los requisitos exigidos por el RD 865/2003, siendo el procedimiento normalizado de trabajo el siguiente:

- a. Identificar del punto a muestrear, según plan de muestreo.
- b. Abrir el punto y recoger los primeros 100 mL de agua.
- c. Desmontar, si es posible, el grifo o ducha. Rascar con un hisopo estéril la parte interna del terminal, procurando acceder a la mayor parte posible de la superficie. Romper la parte final del hisopo e incorporarla al envase con agua. Volver a montar el grifo o ducha. En caso de no poder desmontar el elemento terminal, realizar esta operación accediendo a la parte interna igualmente.
- d. Recoger el resto de agua hasta completar los 1.000 mL.
- e. Medir en la muestra la temperatura y el cloro libre. Para medir la temperatura se utiliza un termómetro digital con sonda, correctamente calibrado.
- f. En caso de detectarse niveles de biocida, neutralizar con tiosulfato sódico al 99% (5 mg por cada ppm de cloro libre).
- g. Colocar las muestras en una nevera portátil y transportarlas al laboratorio en un plazo máximo de 6 horas desde el momento de la toma.

Con este procedimiento se obtiene el agua contenida en los tramos finales lo que, traducido en términos de riesgo biológico, es el agua que recibe el usuario en el momento de la apertura del terminal. Las muestras así obtenidas, pues, no reflejan necesariamente el estado general de la instalación.

5.3. Procesamiento de las muestras para el análisis de *Legionella*

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona. Dicho laboratorio está acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) para ensayos químicos y microbiológicos de productos agroalimentarios y medioambientales con los números 227/LE 459 y 227/LE 1338 y está incluido en el registro de laboratorios de salud ambiental y alimentaria,

secciones Autoritzats i Acreditats del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya con el número R8-089-96. Todas las muestras fueron analizadas para el aislamiento y recuento de *Legionella* siguiendo la norma UNE-EN ISO 11731:98 antes de las 72 horas posteriores a su recogida.

5.3.1. Aislamiento de *Legionella* por cultivo

De cada muestra de agua se extrae una alícuota para hacer una siembra directa. Para ello se traspasan 9 mL a un tubo estéril con tapón de rosca. A esta alícuota se le hace un tratamiento de descontaminación añadiendo 1mL de tampón ácido. Tras la homogeneización mediante vortex e incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente, se inoculan 0,2 mL en una placa de medio BCYE-GVPC. El inóculo, una vez seco, se extiende por toda la placa mediante la técnica de estría escocesa.

Con el resto de la muestra se emplea la técnica de concentración por filtración mediante una bomba peristáltica de desplazamiento positivo (Millipore, Milan, Italy), utilizando filtros estériles de membrana de policarbonato de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore, Milan, Italy). Tras bombear todo el volumen de la muestra, el filtro se retira cuidadosamente con la ayuda de unas pinzas estériles y se resuspende en 5 mL de agua filtrada que previamente se ha depositado en un tubo estéril de tapón de rosca. Con la finalidad de desprender las partículas que han quedado retenidas en el filtro, se coloca el tubo en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. La muestra concentrada se divide en tres fracciones para su posterior siembra en placa:

- Sin tratamiento de descontaminación: se inocula 100 µL en una placa de medio BCYE-GVPC.
- Tratamiento con tampón ácido: a un tubo estéril se traspasan 900 µL de la muestra filtrada y se añaden 100 µL de tampón ácido. Tras la homogeneización, se incuba 5 minutos a temperatura ambiente y se inoculan 100 µL en una placa de medio BCYE-GVPC.
- Tratamiento con calor: en un tubo estéril se deposita 1mL de la muestra filtrada. El tubo se coloca en un baño a 49°C±0,2°C durante 30 minutos. Tras el tratamiento térmico se inoculan 100 µL en una placa con medio BCYE-GVPC.

Una vez secos, los inóculos se extendieron por toda la placa mediante la técnica de estría escocesa. Todas las placas se incuban a 36°C±0,2°C durante 10-12 días en atmósfera húmeda y enriquecida con CO₂. Las placas se examinan cada 2 días anotando su evolución en la hoja de recogida de datos de cada muestra. El crecimiento de *Legionella* suele ser visible a las 72 horas de incubación, sin embargo, en ocasiones puede requerir más tiempo por lo que las placas no se consideraron negativas hasta que transcurren 10 días.

5.3.2. Confirmación de las colonias sospechosas

A partir de las placas que presentan colonias sospechosas de ser *Legionella* se procede a la identificación de 10 colonias por muestra siempre que sea posible. Esta identificación se basa en:

- Morfología de la colonia: las colonias de *Legionella* que crecen en medio de cultivo son lisas con aspecto granular y presentan un color grisáceo o azulado.
- Requerimientos nutricionales: se aísla cada una de las colonias y se subcultiva paralelamente en dos agar BCYE- α enriquecido y agar sangre (OXOID). Ambas placas se incuban a 36°C. Los aislados de *Legionella* se identifican por crecer en agar BCYE- α pero no en agar sangre.
- Tinción de Gram: *Legionella* es un bacilo gramnegativo, por lo tanto, la presencia de bacilos rosados largos y finos de aspecto lanceolado indican que puede tratarse de *Legionella*.

5.3.3. Determinación del serogrupo

El serogrupo se determina mediante un test de aglutinación (*Legionella* LATEX TEST®, OXOID) que permite clasificar a los aislados de *Legionella* en tres grandes grupos: *L. pneumophila* serogrupo 1, *L. pneumophila* serogrupos 2-14 y *Legionella* spp., que incluye a otras siete especies. El método consiste en una reacción antígeno-anticuerpo mediante una aglutinación, utilizando como reactivo partículas de látex azul sensibilizadas con anticuerpos específicos que, tras un minuto de contacto, aglutinan en presencia de antígenos de la pared celular de *Legionella*. Se considera resultado positivo si la aglutinación de las partículas de látex azul se produce en un minuto y no se observa aglutinación en el círculo del control. Se considera resultado negativo si no se produce aglutinación y queda una suspensión de color azul suave en los medios después de un minuto. La prueba no es interpretable si el reactivo control presenta aglutinación. Esto indica que el cultivo produce autoaglutinación.

5.3.4. Recuento

Para calcular el número de unidades formadoras de colonia (UFC) de *Legionella* por litro de muestra original, se selecciona la placa de cultivo que contiene más colonias y se aplica la siguiente fórmula:

$$R = [(N \times V_1) / V_2] / (1 / V_3),$$

siendo: R = UFC por litro de muestra; N = número de colonias en la placa de cultivo; V_1 = volumen del concentrado (ml); V_2 = volumen inoculado en la placa (ml); y V_3 = volumen filtrado de la muestra original expresado en litros. El recuento de las muestras con presencia de colonias de *Legionella* se expresa como UFC/L. En el caso de las muestras en las que no se observen colonias de *Legionella*, el resultado se expresa como UFC/L por debajo del límite de detección.

5.3.5. Criopreservación

Después de este proceso se criopreservaron un máximo de 10 colonias por muestra para su posterior estudio molecular. Como medio de criopreservación se utilizó Brain Heart Infusion Broth (BHI) (OXOID). A la solución de BHI se le añade el 20% de glicerol previamente esterilizado en autoclave a 121°C durante

20 minutos. La solución se mezcla por agitación con ayuda de un vortex y se reparte en criotubos de 2mL. De las placas de agar BCYE- α en las que se había subcultivado cada una de las colonias, se recoge toda la masa bacteriana y se resuspende en uno de los criotubos con BHI+glicerol. Estas muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el momento del análisis molecular.

5.4. Tipificación molecular de los aislados de *Legionella* por electroforesis en campo pulsante (PFGE)

La tipificación molecular se llevó a cabo en el laboratorio del Grup d'Estudi de la Legionel·losi de la Fundació Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol (Badalona). Se eligió una muestra representativa de aislados de *Legionella* criopreservados obtenidos entre 2012 y 2014 mediante muestreo estratificado por las tres áreas de muestreo (ZV-ZA, ZV-ZB y ZH-ZB). Para cada área de muestreo y año se eligieron al azar un máximo de cuatro muestras criopreservadas, o la totalidad de las que hubiere si su número era inferior a cuatro.

Los aislados se descongelaron y cultivaron en placas de agar BCYE en un incubador a 37°C durante 72 horas. La masa bacteriana se embebió en bloques de agarosa donde se realizó la extracción de ácidos nucleicos para preservar su integridad. En un primer paso, se degradaron las membranas bacterianas mediante incubaciones con lisozima y proteinasa. En un segundo paso, se procedió a la digestión del ADN con la enzima Sfi I en el mismo bloque de agarosa. Posteriormente la separación de los fragmentos de ADN generados se realizó en un equipo "Contour-clamped homogeneous electric field" (CHEF-DRII Pulsed Field Electrophoresis Systems. Bio Rad). Una vez finalizada la electroforesis, los fragmentos de ADN se visualizaron mediante tinción del gel con SYBR Safe (intercalante del ADN que emite fluorescencia cuando se irradia con luz ultravioleta) en un trasiluminador con luz ultravioleta.

La interpretación de los patrones de restricción obtenidos por *sfiI*-PFGE se realizó de forma visual siguiendo los criterios de Tenover (Tenover *et al.*, 1995). Según estos criterios, los patrones de ADN cromosómico que presentan el mismo número de bandas, con idéntico peso molecular se consideran indistinguibles. Los patrones que presentaban diferencias en más de una banda se consideraron patrones de ADN cromosómico diferentes.

Todos los patrones obtenidos se compararon entre sí. Cada nuevo patrón que apareció fue denominado con una letra de abecedario por riguroso orden de aparición.

6. Variables de estudio y recogida de datos

6.1. Variables de estudio

6.1.1. Variables del primer objetivo general

Las variables consideradas para el primer objetivo general fueron las siguientes:

- Variables de resultado:
 - *Concentración de Legionella en ACS*: expresada como variable cuantitativa en UFC/L. Las concentraciones informadas como “presencia” sin especificar la cifra, se exponen como tal.
 - *Presencia de Legionella en ACS*: expresada como variable dicotómica (ausencia; presencia).
 - *Niveles de Legionella en ACS*: expresada como variable ordinal con cuatro categorías (ausencia; $<10^2$ UFC/L; $10^2 - 9 \times 10^2$ UFC/L; $\geq 10^3$ UFC/L).
 - *Presencia de concentraciones elevadas de Legionella*: expresada como variable dicotómica ($<10^3$ UFC/L; $\geq 10^3$ UFC/L).
- Variables explicativas:
 - *Temperatura del ACS en la muestra*: expresada como variable cuantitativa en °C.
 - *Niveles de temperatura del ACS en la muestra*: expresada como variable ordinal con tres categorías ($\leq 50^\circ\text{C}$; $50,1^\circ\text{C}-54,9^\circ\text{C}$; $\geq 55^\circ\text{C}$).
 - *Adecuación de la temperatura de la muestra*: expresada como variable dicotómica (adecuada; no adecuada). Se consideró adecuada toda temperatura $>50^\circ\text{C}$ en el período pre-intervención y $\geq 55^\circ\text{C}$ en el período post-intervención.
 - *Frecuencia de uso del punto terminal*: expresada como variable dicotómica (diaria; no diaria).
 - *Tipo de punto terminal*: expresado como variable cualitativa con dos categorías (grifo; ducha).
 - *Renovación del material de la instalación*: expresada como variable dicotómica (renovado; no renovado).

6.1.2. Variables del segundo objetivo general

Las variables consideradas para el segundo objetivo general fueron las siguientes:

- *Patrón de restricción obtenido por PFGE*: expresada como variable cualitativa en las que las categorías se denominaron con una letra de abecedario por riguroso orden de aparición.
- *Presencia de patrón de restricción B obtenido por PFGE*: expresada como variable dicotómica (presencia; ausencia).
- *Temperatura del ACS en la muestra*: expresada como variable cuantitativa en °C.

- *Nivel de temperatura del ACS en la muestra con punto de corte a 50°C: expresada como variable dicotómica ($\leq 50^{\circ}\text{C}$; $> 50^{\circ}\text{C}$).*
- *Nivel de temperatura del ACS en la muestra con punto de corte a 55°C: expresada como variable dicotómica ($< 55^{\circ}\text{C}$; $\geq 55^{\circ}\text{C}$).*
- *Circuito de instalación del ACS: expresado como variable cualitativa (ZA; ZB).*

6.2. Recogida de datos

En el momento de la toma de las muestras de ACS, se recogían los siguientes datos:

- Área del muestreo, de acuerdo con el plan de muestreo previamente definido
- Código geográfico del punto terminal según codificación interna del centro
- Tipo de punto terminal
- Temperatura de la muestra en el envase

La información referente a la frecuencia de uso de los puntos terminales se obtenía para cada punto en base a su localización geográfica o a entrevistas personales con los responsables de las áreas en cuestión. Todos aquellos códigos que correspondían a duchas de pacientes y a grifos de lavamanos de los profesionales en áreas de hospitalización se clasificaron con una frecuencia de uso diario. Los puntos que no se correspondían con áreas de hospitalización se clasificaron de acuerdo a la información facilitada por los responsables de área y el servicio de mantenimiento.

Los resultados de los cultivos se remitían por escrito desde el laboratorio a los responsables del estudio en un período máximo de 15 días.

La información relacionada con el recambio de materiales de la instalación se incluyó en el momento de producirse cada una de las renovaciones, concretamente desde la fecha de entrega de la nueva instalación, que era comunicada por el servicio de mantenimiento a los responsables del estudio. A partir de la fecha comunicada, y teniendo en cuenta el código geográfico de los puntos analizados, se consideró que las muestras procedía de un tramo renovado.

7. Métodos estadísticos

7.1. Análisis descriptivo general

En el análisis descriptivo de los puntos de muestreo, las temperaturas de las muestras obtenidas, los resultados de los cultivos y los resultados de la tipificación molecular se aplicaron los parámetros habituales dependiendo de si las variables se trataban como cualitativas o cuantitativas. En el primer caso, se expresaron con porcentajes. En el segundo caso, se utilizaron la media como variable de tendencia central y la desviación estándar como medida de dispersión si la distribución era normal. Cuando la distribución de la variable no se aproximaba a la normalidad se utilizaron la mediana (percentil 50) y los percentiles 25 y 75. En la descripción de la cuantificación de *Legionella* expresada en UFC/L no se calculó el rango intercuartil debido a que, cuando las muestras presentaron bajas concentraciones, los resultados se reportaron como presencia del microorganismo acompañado del límite de detección especificado por el laboratorio en cada caso. Para esta variable se especificó también el valor máximo encontrado.

7.2. Análisis estadístico aplicado a los objetivos específicos 1 a 4

Para la comparación de proporciones entre las categorías de una variable se aplicaron la prueba ji-cuadrado de Pearson, el test exacto de Fisher en caso de alguna categoría tuviera un valor esperado inferior a 5, o la prueba ji-cuadrado de tendencia lineal para variables ordinales. Para la comparación de medias se aplicó la prueba t de Student en caso de distribución normal, o la prueba U de Mann-Whitney como prueba no paramétrica para la comparación de medianas.

Para analizar el impacto global del aumento de la temperatura a 55°C en un momento dado se elaboraron modelos de regresión lineal segmentada. En este tipo de modelos de regresión, se analiza la relación entre una variable dependiente y una o más variables independientes cuando a lo largo del tiempo se realiza una intervención bajo la hipótesis de que tras la misma, se producirá un cambio en esta relación. Los modelos de regresión lineal segmentada han sido ampliamente utilizados en los estudios con un diseño cuasi-experimental. En el presente trabajo, la variable dependiente fue el porcentaje semestral de muestras positivas para *Legionella* y la variable independiente el período de estudio. Los parámetros obtenidos con este análisis son:

- Cambio de nivel: este parámetro indica si, tras la introducción de la intervención se observa un cambio en el primer valor de la variable dependiente que sea significativamente diferente al valor que cabría esperar. Expresa si la intervención provoca un cambio inmediato (aumento o reducción) y, por tanto, es efectiva a corto plazo.

- Cambio de pendiente: este parámetro indica si, tras la introducción de la intervención se observa un cambio significativo en la pendiente de la variable dependiente a lo largo del tiempo, en comparación con la pendiente que presentaba antes de la intervención, Expresa si el efecto de la intervención se mantienen a lo largo del período estudiado.

En el análisis de la validez de la temperatura como predictor de la colonización de *Legionella* se elaboraron en primer lugar las curvas ROC de las muestras obtenidas en ZV y de las obtenidas en ZH, considerando dos tipos de variables resultado: la ausencia de muestras positivas y la ausencia de inóculos $\geq 1 \times 10^3$ UFC/L. Se estimó el área bajo la curva con su correspondiente error estándar e intervalo de confianza al 95%. Asimismo, se calcularon la sensibilidad, especificidad y valores predictivos con sus correspondientes intervalos de confianza al 95% considerando la temperatura como variable dicotomizada en $\geq 55^\circ\text{C}$ o $< 55^\circ\text{C}$.

Para analizar si la temperatura de ACS presentaba un efecto gradiente como medida de control, se elaboraron dos modelos de regresión logística (uno para ZV y otro para ZH) tomando como variable resultado la presencia de *Legionella* y como variable independiente la temperatura considerada como continua. Con este modelo se pretendió discernir si por cada grado de aumento de temperatura, la presencia de *Legionella* presentaba una reducción significativa.

El papel relativo de los factores de la instalación de ACS se abordó primero con un análisis bivariado en el que se compararon las temperaturas de las muestras según el tipo de punto terminal, la frecuencia de uso, y el tipo de material de las líneas de distribución principales. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis bivariado de tres estos factores y los niveles de *Legionella* agrupados en cuatro categorías. Las variables que presentaron un nivel de significación estadística con un valor de $p < 0,10$ se utilizaron para el análisis multivariado. Para dicho análisis se construyeron modelos de regresión logística en los que la variable dependiente fue la presencia de *Legionella* o la presencia de inóculos $\geq 1 \times 10^3$ UFC/L.

En todos los análisis se consideró que la significación estadística era adecuada cuando el valor de p era $\leq 0,05$. El paquete estadístico utilizado fue el software de libre distribución "R" (R core team, 2013).

7.3. Análisis estadístico aplicado a los objetivos específicos 5 y 6

Para la comparación de proporciones entre las categorías de una variable se aplicó la prueba ji-cuadrado de Pearson. Para la comparación de medias se aplicó la prueba t de Student. En todos los análisis se consideró que la significación estadística era adecuada cuando el valor de p era $\leq 0,05$. El paquete estadístico utilizado fue el software de libre distribución "R" (R core team, 2013).

Cinco

Resultados

*Perhaps it is good to have a beautiful mind,
but an even greater gift is to discover a beautiful heart.*

Russell Crowe as John Nash

A beautiful mind (2001)

1. Efectividad de mantener temperaturas elevadas en el agua caliente sanitaria sobre la colonización por *Legionella*

En este apartado se analiza la relación entre la temperatura del ACS y la colonización por *Legionella* y la influencia que tienen otros condicionantes relacionados con el diseño y el mantenimiento de la instalación. Para ello, se han considerado diferentes aspectos. En primer lugar, se describen los puntos de muestreo analizados y las temperaturas de las muestras en base a diferentes parámetros. En segundo lugar, se presenta la evolución temporal de la colonización por *Legionella* en las instalaciones del hospital bien dimensionadas y con adecuadas recirculaciones para estimar el impacto global de aumentar en continuo la temperatura mínima del ACS. En tercer lugar, se presenta este mismo análisis para instalaciones con recirculaciones y/o dimensionamiento no apropiados. En cuarto lugar, se analiza la asociación entre diferentes dinteles de temperatura en puntos terminales y el papel de la temperatura como predictor del estado de colonización de los mismos. Finalmente, se describe el efecto relativo de diferentes aspectos relacionados con el diseño y el mantenimiento de la instalación sobre la colonización por *Legionella*. A lo largo del período de estudio, y de acuerdo con los resultados obtenidos a través de la vigilancia ambiental de *Legionella*, se fueron implementando medidas de mejora en las instalaciones del hospital (datos no mostrados en la presente tesis).

1.1. Descripción general de los puntos de muestreo

Durante el período comprendido entre mayo de 2005 y julio de 2013 se obtuvieron un total de 399 muestras de ACS. 251 (62,9%) correspondieron a puntos terminales de ZV y 148 (37,1%) a puntos terminales de ZH. Las características de los puntos de muestreo se resumen en la tabla 18. En ZV se obtuvieron como mínimo una muestra mensual de ZA y otra de ZB. La mayor parte de dichas muestras correspondieron a duchas cuya utilización era diaria. En ZH se obtuvieron muestras de líneas que abastecían áreas sin pacientes ingresados, siendo la mayor parte de puntos grifos que no se utilizaban diariamente.

Tabla 18. Descripción de los puntos terminales de toma de las muestras analizadas durante el período de estudio.

Zonas verticales			Zonas horizontales		
	n	%		n	%
Circuito			Circuito		
ZB	130	51,8	Planta -1	50	33,8
ZA	121	41,2	Planta 0	42	28,4
			Bloque quirúrgico	56	37,8
Anillo de distribución			Línea de distribución		
ZB-T19	22	8,8	Línea 1	14	9,5
ZB-T13	55	21,9	Línea 2	30	20,3
ZB-T9	53	21,1	Línea 3	36	24,3
ZA-T19	100	29,8	Línea 4	30	20,3
ZA-T13	21	8,4	Línea 5	7	4,7
			Línea 6	20	13,5
			Línea 7	8	5,4
			Línea 8	3	2,0
Material del anillo			Material de la línea principal		
Acero inoxidable-1 ^a	59	23,5	Acero inoxidable-1 ^a	116	78,4
Acero inoxidable-2 ^b	178	70,9	Acero inoxidable-2 ^b	32	21,6
Polipropileno	14	5,6			
Punto terminal			Punto terminal		
Duchas	231	92,0	Duchas	67	45,3
Grifos	20	8,0	Grifos	81	54,7
Frecuencia de uso			Frecuencia de uso		
Diaria	233	92,8	Diaria	62	41,9
No diaria	18	7,2	No diaria	86	58,1

Nota. ^aAcero inoxidable 316-L instalado en 1999. ^bAcero inoxidable 316-L instalado durante el período de estudio. ZB: zonas bajas; ZA: zonas altas; T9: torre 9; T19: torre 19; T13: torre 13.

La tabla 19 muestra las características de los puntos de muestreo de ZV según si se analizaron en el primer período de estudio (mayo 2005 – mayo 2007), en el que se mantenía una temperatura mínima del ACS >50°C, o en el segundo período (junio 2007 – julio 2013), en el que dicho dintel se aumentó a

≥55°C. Las muestras no difirieron significativamente en cuanto a la zona de muestreo, el tipo de punto terminal y su frecuencia de uso. Las diferencias observadas según los anillos de distribución presentaron significación estadística, así como también según el tipo de material de los anillos. Este último hecho es inherente al diseño longitudinal del estudio, dado que en el período 2 tuvo lugar la sustitución del acero inoxidable por polipropileno.

Tabla 19. Zonas verticales. Comparación de las características de los puntos de muestreo según el período de estudio.

	Período 1 (n=75)	Período 2 (n=176)	<i>p</i>
Circuito			
Zonas bajas	39 (52,0)	91 (51,7)	0,966
Zonas altas	36 (48,0)	85 (48,3)	
Anillo de distribución			
ZB-T19	5 (6,7)	17 (9,7)	0,039
ZB-T13	16 (21,3)	39 (22,2)	
ZB-T9	18 (24,0)	35 (19,9)	
ZA-T19	24 (32,0)	76 (43,2)	
ZA-T13	12 (16,0)	9 (5,1)	
Material del anillo			
Acero inoxidable-1 ^a	59 (78,7)	0 (0,0)	<0,001
Acero inoxidable-2 ^b	16 (21,3)	162 (92,0)	
Polipropileno	0 (0,0)	14 (8,0)	
Punto terminal			
Duchas	70 (93,3)	161 (91,5)	0,619
Grifos	5 (6,7)	15 (8,5)	
Frecuencia de uso			
Diaria	71 (94,7)	162 (92,1)	0,468
No diaria	4 (5,3)	14 (7,9)	

Nota. ^aAcero inoxidable 316-L instalado en 1999. ^bAcero inoxidable 316-L instalado durante el período de estudio. ZB: zonas bajas; ZA: zonas altas; T9: torre 9; T19: torre 19; T13: torre 13.

A diferencia de las ZV, el análisis de las características de los puntos de muestreo de las ZH revela diferencias estadísticamente significativas entre las muestras obtenidas en ambos períodos (tabla 20). Así, en el período 1 se obtuvieron más muestras del bloque quirúrgico, mientras que en el período 2 se muestreó más frecuentemente la planta -1. Asimismo, en el período 2 no se tomaron muestras de las líneas L6, L7 y L8. También difirieron tanto el porcentaje de grifos y duchas muestreados como su frecuencia de uso. Todo ello obedece a los criterios de muestreo aplicados en las ZH y a que a lo largo del período de estudio se fueron eliminando puntos de consumo conflictivos o de bajo uso.

Tabla 20. Zonas horizontales. Comparación de las características de los puntos de muestreo según el período de estudio.

	Período 1 (n=82)	Período 2 (n=66)	<i>p</i>
Área			
Planta -1	21 (25,6)	29 (43,9)	0,029
Planta 0	23 (28,0)	19 (28,8)	
Bloque quirúrgico	38 (46,4)	18 (27,3)	
Línea de distribución			
Línea 1	8 (9,8)	6 (9,1)	<0,001
Línea 2	17 (20,7)	13 (19,7)	
Línea 3	18 (22,0)	18 (27,3)	
Línea 4	7 (8,5)	23 (34,8)	
Línea 5	1 (1,2)	6 (9,1)	
Línea 6	20 (24,4)	0	
Línea 7	8 (9,8)	0	
Línea 8	3 (3,7)	0	
Material de la línea de distribución			
Acero inoxidable-1 ^a	82 (100)	34 (51,5)	<0,001
Acero inoxidable-2 ^b	0	32 (48,5)	
Punto terminal			
Duchas	27 (32,9)	40 (60,6)	0,001
Grifos	55 (67,1)	26 (29,4)	
Frecuencia de uso			
Diaria	40 (48,8)	22 (33,3)	0,058
No diaria	42 (51,2)	44 (66,7)	

Nota. ^aAcero inoxidable 316-L instalado en 1999. ^bAcero inoxidable 316-L instalado durante el período de estudio

1.2. Descripción de la temperatura de las muestras

En ZV, y considerando conjuntamente ZA y ZB, la temperatura media de las muestras fue **significativamente mayor en el período 2 que en el período 1** (56,2°C vs. 51,0°C; $p < 0,001$). También el porcentaje de muestras que alcanzaron la temperatura deseada fue superior en el período 1, aunque la diferencia no presentó significación estadística (81,3% vs. 73,9%; $p = 0,204$). La tabla 21 resume las temperaturas de las muestras obtenidas en ZV según el período de estudio, y diferenciando entre ZA y ZB por tratarse de instalaciones independientes. Se constata que **en ZB, los parámetros de temperatura fueron inferiores a ZA en ambos períodos de estudio.**

Tabla 21. Zonas verticales. Temperaturas de las muestras analizadas según el período de estudio.

	Período 1	Período 2	<i>p</i>
Temperatura media (DE), °C			
Zonas altas	51,6 (3,7)	56,8 (2,4)	<0,001
Zonas bajas	50,6 (5,3)	55,7 (3,2)	<0,001
Valores mínimo- máximo, °C			
Zonas altas	37,0 - 59,0	50,0 - 63,7	
Zonas bajas	35,0 - 57,0	43,3 - 61,4	
Muestras con la temperatura deseada ^a , %			
Zonas altas	88,9	82,4	0,426
Zonas bajas	74,4	65,9	0,413

Nota. ^a período 1: >50°C; período 2: ≥55°C.

En el análisis de la temperatura de las muestras de ZH se observa que en el período 2 los niveles fueron claramente inferiores a los objetivos perseguidos (tabla 22). Destaca que la temperatura media fue de 52,5°C y que tan sólo el 27% de los puntos alcanzaron los 55°C. En el período 1, sin embargo, el 78% de las muestras presentaron temperaturas superiores a 50°C.

Tabla 22. Zonas horizontales. Temperaturas de las muestras analizadas según el período de estudio.

	Período 1	Período 2	<i>p</i>
Temperatura media (DE), °C	51,3 (3,6)	52,5 (3,7)	0,048
Valores mínimo- máximo, °C	40,0 – 59,0	42,0 – 59,0	
Muestras con la temperatura deseada ^a , %	78,0	27,3	<0,001

Nota. ^a período 1: >50°C; período 2: ≥55°C

En el análisis semestral de las temperaturas de las muestras de ZV (figura 25) se observa que a partir de julio de 2007 se produce un aumento de las temperaturas medias que se mantienen por encima de los 55°C a lo largo del período 2. En ZH (figura 26), durante el primer semestre del período 2, la media de las temperaturas se sitúa por encima de los 55°C, pero en los semestres posteriores no se alcanzan estos niveles. Las medias de temperatura en ambos períodos permanecieron similares.

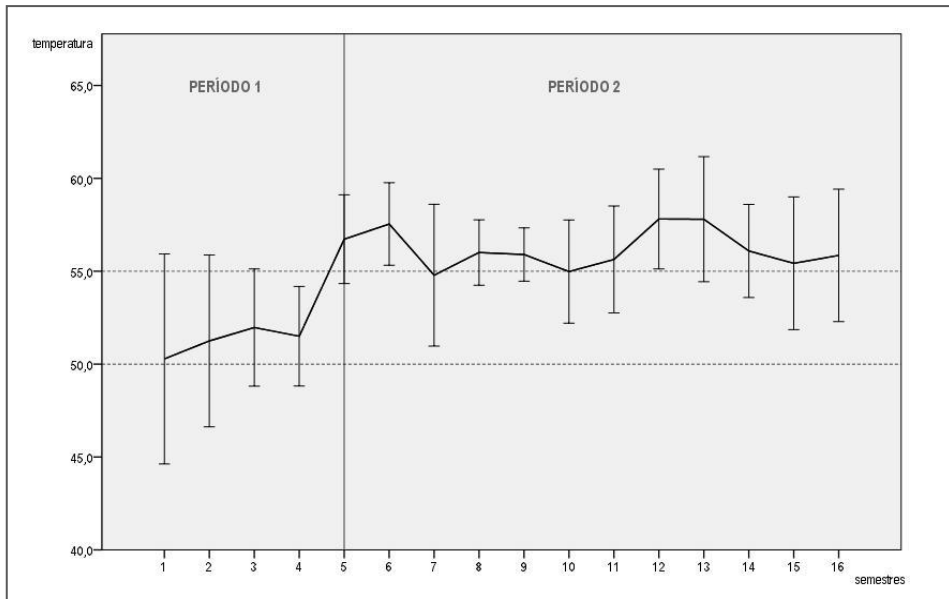


Figura 25. Zonas verticales. Temperaturas medias de las muestras y desviaciones estándar para cada semestre de estudio, en el período 1 y el período 2.

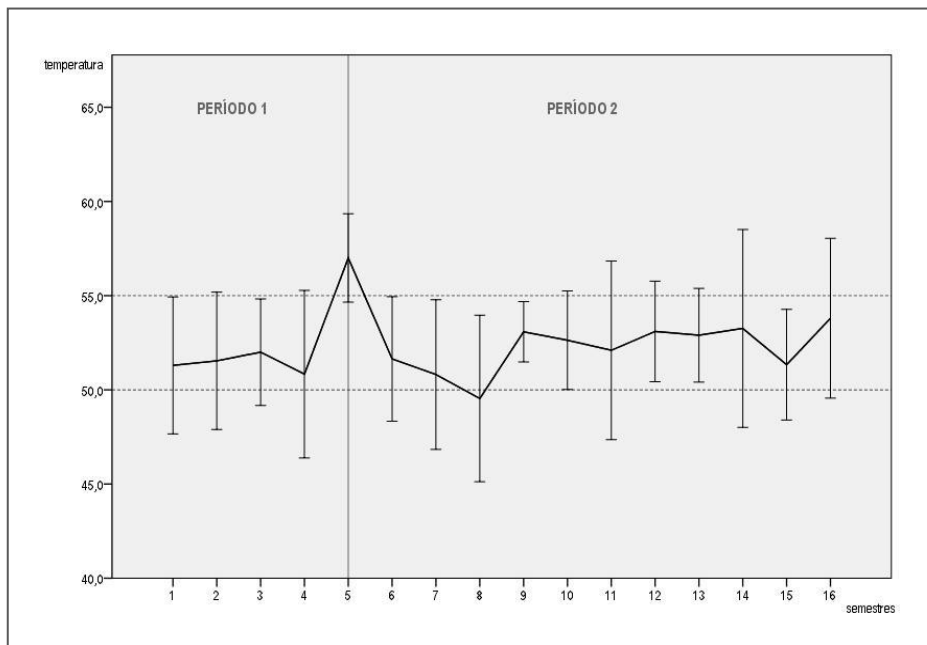


Figura 25. Zonas horizontales. Temperaturas medias de las muestras y desviaciones estándar para cada semestre de estudio, en el período 1 y el período 2.

1.3. Impacto del aumento de temperatura en instalaciones bien dimensionadas y con recirculaciones adecuadas

Para este análisis se consideraron las muestras obtenidas con carácter rotatorio en los puntos distales de las ZV. De las 251 muestras que se obtuvieron en ZV durante el período de estudio, se identificó *Legionella* en 66 (26,3%). El número total de aislamientos fue 67, siendo el 97% *L. pneumophila* serogrupos 2-14 (65 aislamientos) y el 3% *L. pneumophila* serogrupo 1 (2 aislamientos). Los resultados se exponen bajo la expresión genérica de *Legionella*, que corresponde a *L. pneumophila*, ya que no hubo aislamientos de *Legionella* no *pneumophila*.

El porcentaje global de muestras positivas fue menor en el segundo período de estudio (23,3% vs. 33,3%), aunque no de manera significativa (tabla 23). **Se observó una reducción significativa en los niveles de concentración de *Legionella*, siendo el porcentaje de muestras con inóculos $\geq 10^3$ UFC/L inferior en el período 2 respecto al período 1 (2,3% vs. 4%; p tendencia=0,047).** El análisis de las muestras positivas mostró que la mediana de UFC/L fue ligeramente inferior en el período 2, aunque los valores máximos detectados fueron similares.

Tabla 23. Zonas verticales. Resultados de las muestras analizadas según el período de estudio.

	Período 1 (n=75)	Período 2 (n=176)	<i>p</i>
Muestras positivas de <i>Legionella</i> , n (%)	25 (33,3)	41 (23,3)	0,098
Niveles de <i>Legionella</i> , n (%)			
Ausencia	50 (66,7)	135 (76,7)	
<10 ² UFC/L	10 (13,3)	23 (13,1)	
10 ² – 9,9x10 ² UFC/L	12 (16,0)	14 (8,0)	
$\geq 10^3$ UFC/L	3 (4,0)	4 (2,3)	0,047*
Valores de cuartiles en muestras positivas			
Percentil 25, UFC/L	Presencia ^a	Presencia ^a	
Percentil 50, UFC/L	1,3 x10 ²	5,6 x10 ²	0,071 [§]
Percentil 75, UFC/L	2,7 x10 ²	4,1 x10 ²	
Valor máximo en muestras positivas, UFC/L	2,7x10 ³	6,0x10 ³	

Nota. ^aPresencia de *Legionella* sin cuantificar, con límites de detección variables. *Prueba chi cuadrado de tendencia lineal. [§]Prueba U de Mann-Whitney de comparación de medianas.

La cronología semestral de la colonización por *Legionella* muestra que los porcentajes de muestras positivas fueron menores en los semestres del período 2 (figura 27). En tres semestres del período 2 el porcentaje de muestras positivas fue superior al 30%. **En cuanto a las concentraciones de *Legionella*, se observa que en el segundo período raramente se detectan inóculos $\geq 10^3$ UFC/L. En cifras absolutas, a lo largo de los seis años de este período tan sólo se detectaron 4 aislamientos con inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.**

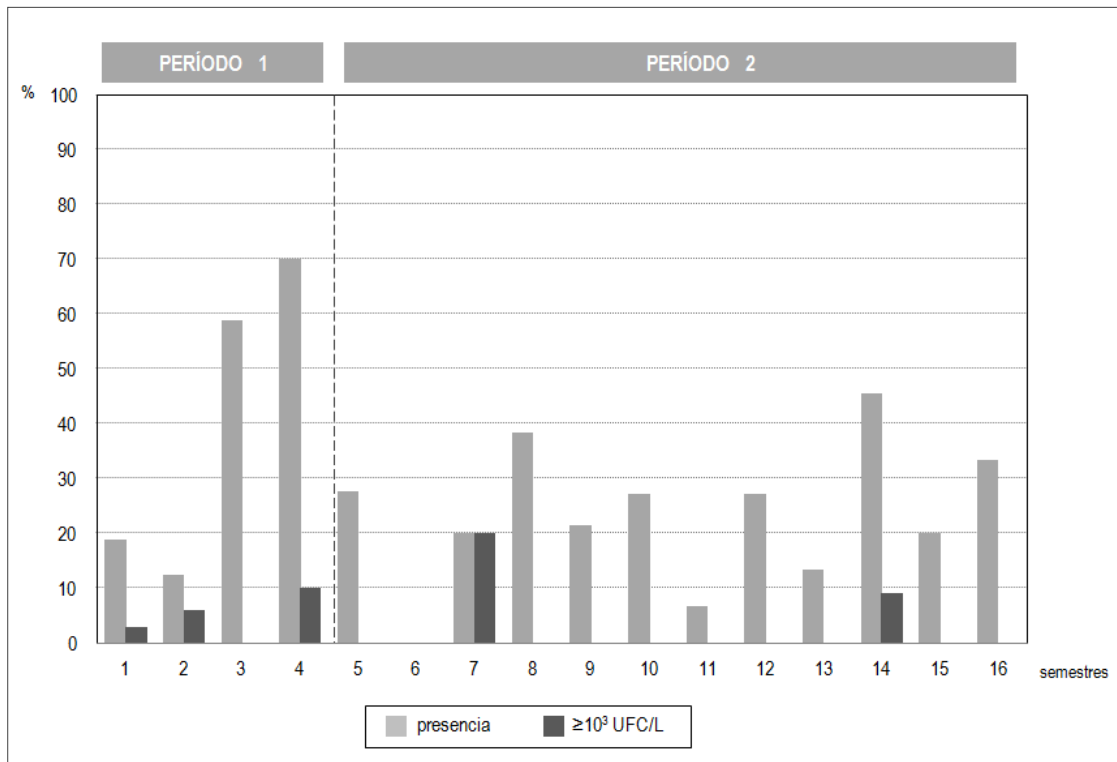


Figura 27. Zonas verticales. Evolución semestral del porcentaje de muestras positivas para *Legionella* y del porcentaje de muestras con inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.

Los resultados del análisis de regresión lineal segmentada para valorar el impacto de aumentar la temperatura mínima de 50°C a 55°C sobre el porcentaje semestral de muestras positivas en las ZV se presentan en la tabla 24. El hecho de aumentar la temperatura mínima no se tradujo en un cambio de nivel significativo entre los valores observados en el período 1 y el primer valor del período 2. Sin embargo, **la pendiente del período 2 presentó un cambio negativo significativo: mientras que en el período 1, la pendiente era positiva (23,539; $p < 0,001$), en el período 2 esta tendencia desaparece y los porcentajes de muestras positivas se estabilizan.**

Tabla 24. Zonas verticales. Parámetros del análisis de regresión lineal segmentada del impacto de aumentar la temperatura mínima a 55°C sobre el porcentaje semestral de muestras positivas.

	Coefficiente	Error estándar	<i>p</i>
Constante	-19,225	-1,636	0,130
Pendiente antes de la intervención	23,539	4,331	<0,001
Cambio de nivel después de la intervención	4,051	1,223	0,220
Cambio de pendiente después de la intervención	-22,425	4,319	<0,001

1.4. Impacto del aumento de temperatura en instalaciones con recirculaciones y/o dimensionamiento no apropiados

Para este análisis se consideraron las muestras obtenidas con carácter dirigido en los puntos distales de las ZH. De las 148 muestras que se obtuvieron en las ZH durante el período comprendido entre mayo de 2005 y julio de 2013, se identificó *Legionella* en 99 (66,9%). El número total de aislamientos fue 103, de los que el 95% correspondieron a *L. pneumophila* serogrupos 2-14 (98 aislamientos), el 4% a *Legionella* no *pneumophila* (4 aislamientos) y el 1% *L. pneumophila* serogrupo 1 (1 aislamiento). Los resultados se exponen bajo la expresión genérica de *Legionella*, ya que en todos los aislamientos con *Legionella* no *pneumophila* hubo crecimiento concomitante de *L. pneumophila*.

En el análisis comparativo por período de estudio, se observa que ni el porcentaje global de muestras positivas ni los niveles de *Legionella* difirieron entre el período 1 y el período 2 (tabla 25). Considerando las muestras positivas, cabe de destacar que en el período 2 la mediana de UFC/L se situó en $1,85 \times 10^3$, es decir, que el 50% de aislamientos positivos presentaron valores $\geq 10^3$ UFC/L. Este valor fue significativamente más elevado que el mismo en el período 1.

La evolución temporal semestral de la colonización por *Legionella* muestra elevados porcentajes de presencia de *Legionella*, siempre superiores al 30%, así como de inóculos $\geq 10^3$ UFC/L, que oscilaron entre el 11% y el 80% (figura 28).

Tabla 25. Zonas horizontales. Resultados de las muestras analizadas según el período de estudio.

	Período 1 (n=82)	Período 2 (n=66)	<i>p</i>
Muestras positivas de <i>Legionella</i> , n (%)	51 (62,2)	48 (72,7)	0,219
Niveles de <i>Legionella</i> , n (%)			
Ausencia	31 (37,8)	18 (27,3)	
<10 ² UFC/L	14 (17,1)	12 (18,2)	
10 ² – 9,9x10 ² UFC/L	14 (17,1)	8 (12,1)	
≥10 ³ UFC/L	23 (28,0)	28 (42,4)	0,102*
Valores de cuartiles en muestras positivas			
Percentil 25, UFC/L	6,7 x10 ¹	8,0 x10 ¹	
Percentil 50, UFC/L	3,9 x10 ²	1,8 x10 ³	<0,001§
Percentil 75, UFC/L	3,4 x10 ³	6,0 x10 ³	
Valor máximo en muestras positivas, UFC/L	1,5x10 ⁶	1,5x10 ⁵	

Nota. *Prueba chi cuadrado de tendencia lineal. §Prueba U de Mann-Whitney de comparación de medianas.

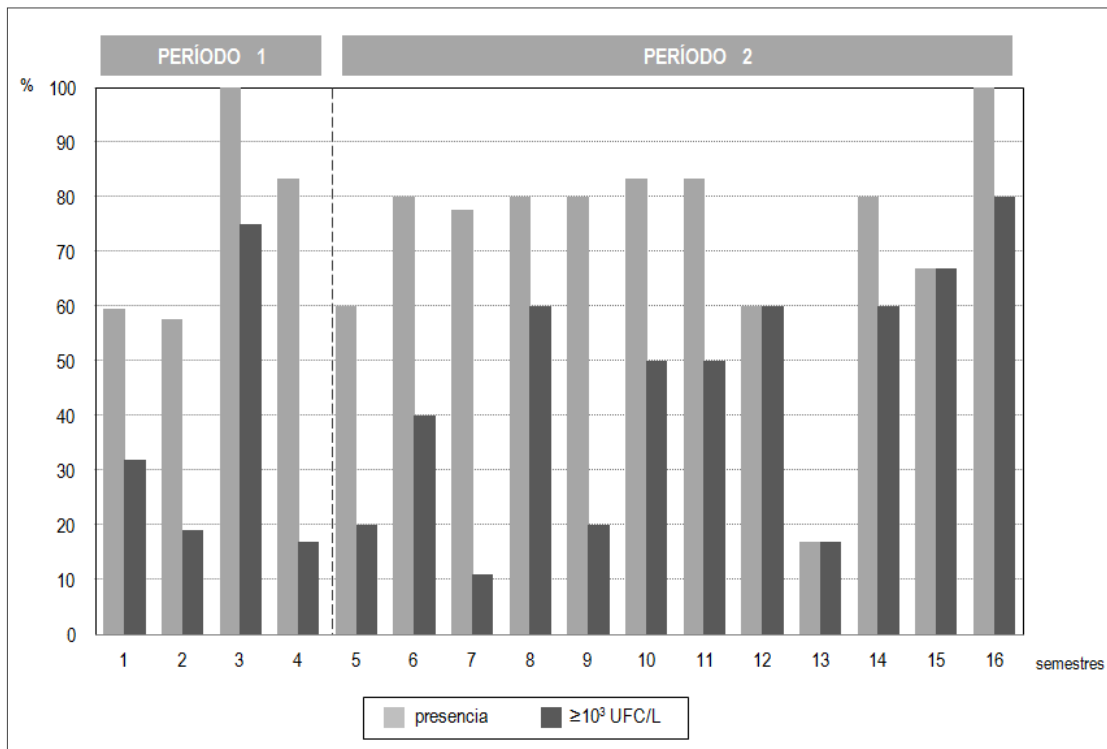


Figura 28. Zonas horizontales. Evolución semestral del porcentaje de muestras positivas para *Legionella* y del porcentaje de muestras con inóculos ≥10³ UFC/L.

Los resultados del análisis de regresión lineal segmentada para valorar el impacto de aumentar la temperatura mínima de 50°C a 55°C sobre el porcentaje semestral de muestras positivas en las ZH se presentan en la tabla 26. La pendiente en el período 1 no presentó ninguna tendencia significativa. **Tras intentar aumentar la temperatura mínima en puntos terminales a 55°C, no se produjo un cambio de nivel significativo entre los valores observados en el período 1 y el primer valor del período 2, ni tampoco en un cambio de la pendiente en el período 2.** Cabe recordar, sin embargo, que en estas zonas no se consiguió alcanzar los niveles de temperatura deseados en la mayoría de puntos.

Tabla 26. Zonas horizontales. Parámetros del análisis de regresión lineal segmentada del impacto de aumentar la temperatura mínima a 55°C sobre el porcentaje semestral de muestras positivas.

	Coefficiente	Error estándar	p
Constante	46,645	26,679	0,108
Pendiente antes de la intervención	11,382	9,821	0,271
Cambio de nivel después de la intervención	6,645	3,331	0,351
Cambio de pendiente después de la intervención	-11,579	10,012	0,272

1.5. Asociación entre gradientes de temperatura y *Legionella*

Para este análisis se consideraron tres niveles de temperatura de las muestras obtenidas: $\leq 50^\circ\text{C}$; $50,1^\circ\text{C}-54,9^\circ\text{C}$; y $\geq 55^\circ\text{C}$. Debido a las diferentes metodologías del muestreo los resultados de ZV y de ZH se presentan por separado.

En ZV, la presencia de *Legionella* es menor en las muestras del grupo de temperatura $\geq 55^\circ\text{C}$ que en los otros dos grupos, con una tendencia decreciente significativa (16,8%, 35,1% y 48,4%, respectivamente; p de tendencia lineal $< 0,001$) (tabla 27). Asimismo, en este grupo de temperatura, la mayor parte de muestras positivas presentan inóculos bajos y no se aíslan inóculos $\geq 10^3$ UFC/L. El valor máximo aislado corresponde a una muestra con $5,9 \times 10^2$ UFC/L. En los grupos de temperatura $\leq 50^\circ\text{C}$ y $50,1^\circ\text{C}-54,9^\circ\text{C}$ se observan mayores prevalencias, pero bajos porcentajes de muestras con inóculos $\geq 1 \times 10^3$ UFC/L (3,2% y 7,8%, respectivamente). Los valores máximos fueron similares ($1,3 \times 10^3$ UFC/L y $6,0 \times 10^3$ UFC/L, respectivamente).

Tabla 27. Zonas verticales. Resultados de las muestras según los niveles de temperatura.

	≤50°C (n=31)	50,1°C-54,9°C (n=77)	≥55°C (n=143)	<i>p</i>
Muestras positivas de <i>Legionella</i> , n (%)	15 (48,4)	27 (35,1)	24 (16,8)	<0,001
Niveles de <i>Legionella</i> , n (%)				
Ausencia	16 (51,6)	50 (64,9)	119 (83,2)	
<10 ² UFC/L	4 (12,9)	13 (16,9)	16 (11,2)	
10 ² – 9,9x10 ² UFC/L	10 (32,3)	8 (10,4)	8 (5,6)	
≥10 ³ UFC/L	1 (3,2)	6 (7,8)	0 (0,0)	<0,001*

Nota. *Prueba chi cuadrado de tendencia lineal.

En ZH, la presencia de *Legionella* fue elevada pero no presentó una tendencia decreciente significativa entre los tres niveles de temperatura considerados. Sin embargo, fue algo menor en el grupo de temperatura ≥55°C que en los otros dos grupos (55,3%, 71,0% y 70,8%, respectivamente; *p* tendencia lineal 0,148) (tabla 28). En los tres grupos, el porcentaje de muestras con inóculos ≥1x10³ UFC/L fue también elevado. Cabe destacar que en los grupos de temperatura ≤50°C y 50,1°C-54,9°C, existen más muestras con estos altos inóculos que muestras negativas o muestras con bajos inóculos. El valor máximo aislado correspondió a una muestra con 1,5x10⁶ UFC/L en el grupo de temperatura de 50,1°C-54,9°C.

Tabla 28. Zonas horizontales. Resultados de las muestras según los niveles de temperatura.

	≤50°C (n=48)	50,1°C-54,9°C (n=62)	≥55°C (n=38)	<i>p</i>
Muestras positivas de <i>Legionella</i> , n (%)	34 (70,8)	44 (71,0)	21 (55,3)	0,148
Niveles de <i>Legionella</i> , n (%)				
Ausencia	14 (29,2)	18 (29,0)	17 (44,7)	
<10 ² UFC/L	9 (18,8)	12 (19,4)	5 (13,2)	
10 ² – 9,9x10 ² UFC/L	7 (14,6)	10 (16,1)	5 (13,2)	
≥10 ³ UFC/L	18 (37,5)	22 (35,5)	11 (28,9)	0,235*

Nota. *Prueba chi cuadrado de tendencia lineal.

Para analizar la validez de la temperatura del ACS en puntos periféricos como predictor de colonización por *Legionella* se han considerado como *gold standard* los dos parámetros admitidos en las instalaciones de ACS, según diferentes guías: porcentaje de muestras positivas para *Legionella* y porcentaje de muestras con inóculos ≥10³ UFC/L, ambos tratados como porcentajes. Dado que la temperatura elevada reduce la colonización por *Legionella*, el evento de interés es en, este caso, el valor complementario de estos parámetros, es decir: porcentaje de muestras negativas y porcentaje de muestras con inóculos <10³ UFC/L.

Las figuras 29 y 30 presentan las curvas ROC que relacionan la temperatura del ACS con la ausencia de *Legionella* y de inóculos $\geq 10^3$ UFC/L en ZV y las figuras 31 y 32 presentan las curvas ROC para los mismos parámetros en ZH. Se observa que en ZV la curva de temperatura clasifica mejor estos parámetros que en ZH, por encontrarse más desplazada en el área superior izquierda, que es la que se corresponde con mayores sensibilidad y especificidad.

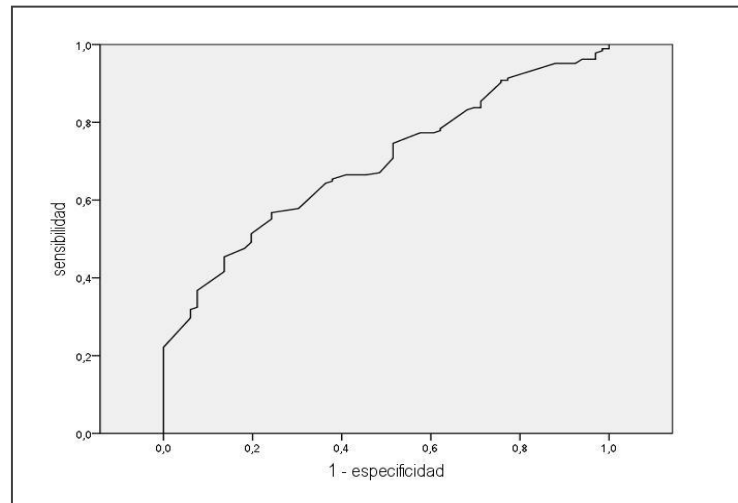


Figura 29. Zonas verticales. Curvas ROC entre la temperatura de agua caliente sanitaria en puntos terminales y la ausencia de *Legionella*.

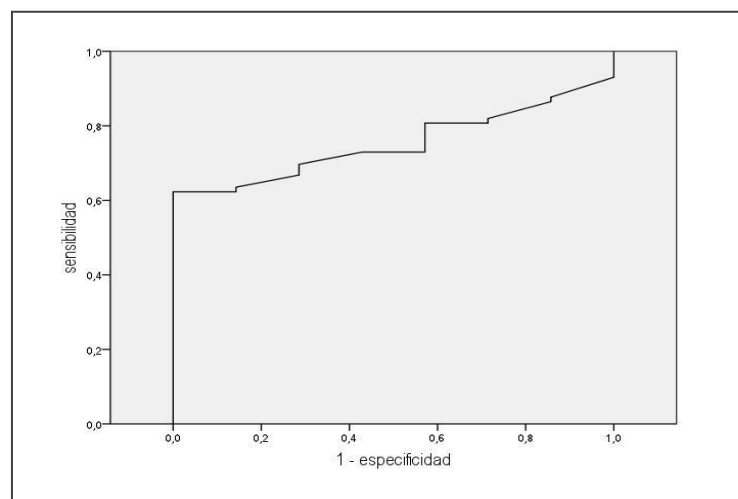


Figura 30. Zonas verticales. Curvas ROC entre la temperatura de agua caliente sanitaria en puntos terminales y la ausencia de inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.

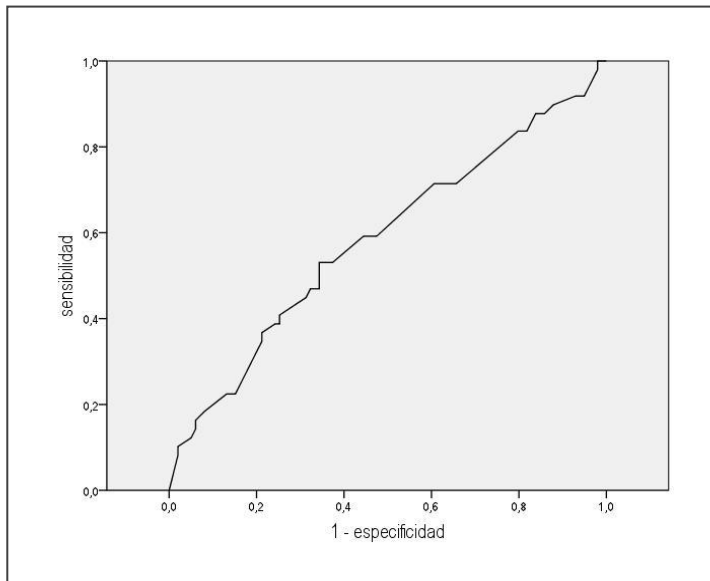


Figura 31. Zonas horizontales. Curvas ROC entre la temperatura de agua caliente sanitaria en puntos terminales y la ausencia de *Legionella*.

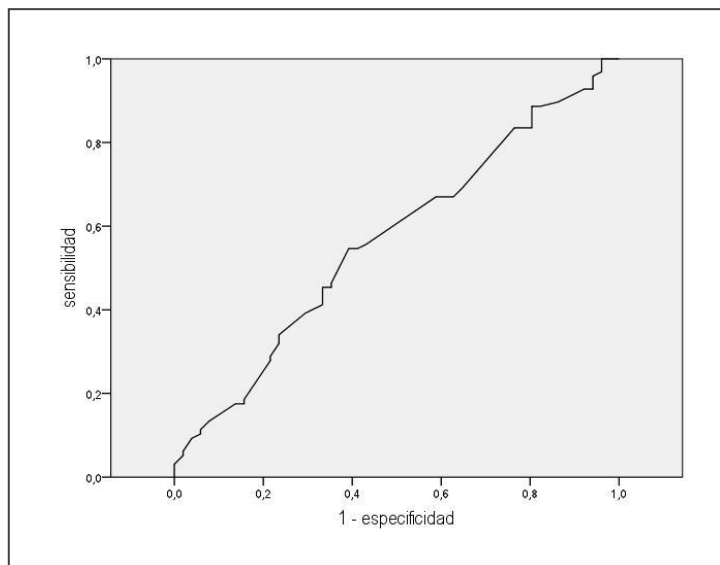


Figura 32. Zonas horizontales. Curvas ROC entre la temperatura de agua caliente sanitaria en puntos terminales y la ausencia de inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.

Los parámetros estimados de las curvas ROC especificados en la tabla 29 indican que **en ZV la temperatura por sí sola es una variable que clasifica correctamente y de manera significativa el 69,5% de ocasiones en las que no hay *Legionella* (área bajo la curva: 0,695) y el 75,3% de ocasiones en que no hay inóculos $\geq 10^3$ UFC/L (área bajo la curva: 0,753). En ZH la temperatura no es un buen clasificador: el área bajo la curva es muy similar a 0,5, tanto para la ausencia de *Legionella* como para como para bajos inóculos, lo que significa que tan sólo clasificaría correctamente el 50% de las observaciones.**

Tabla 29. Parámetros de la curva ROC en zonas verticales y zonas horizontales entre temperatura y la ausencia de *Legionella* y de inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.

	Área bajo la curva	EE	IC 95%	<i>p</i>
Zonas verticales				
Ausencia de <i>Legionella</i>	0,695	0,034	0,628 – 0,762	<0,001
Ausencia de inóculos $<10^3$ UFC/L	0,753	0,043	0,668 – 0,838	0,023
Zonas horizontales				
Ausencia de <i>Legionella</i>	0,585	0,051	0,484 – 0,686	0,092
Ausencia de inóculos $<10^3$ UFC/L	0,567	0,049	0,470 – 0,664	0,664

Las tablas 30 y 31 exponen la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos del punto de corte de la temperatura en $<55^{\circ}\text{C}$ para el porcentaje de muestras positivas y de muestras con inóculos $\geq 10^3$ UFC/L. En este contexto, las definiciones de estos parámetros son las siguientes:

- Sensibilidad: del total de muestras positivas o de muestras con inóculos $\geq 10^3$ UFC/L), porcentaje que ha clasificado correctamente el punto de corte de la temperatura.
- Especificidad: del total de muestras negativas o de muestras con inóculos $<10^3$ UFC/L), porcentaje que ha clasificado correctamente el punto de corte de la temperatura.
- Valor predictivo positivo: probabilidad de que, cuando una muestra tiene una temperatura inferior al punto de corte, sea positiva o presente inóculos $\geq 10^3$ UFC/L).
- Valor predictivo negativo: probabilidad de que, cuando una muestra tiene una temperatura superior al punto de corte, sea negativa o presente inóculos $<10^3$ UFC/L).

En la práctica clínica tendrían mayor interés los valores predictivos, dado que permitirían deducir la situación microbiológica a partir de la lectura de la temperatura. Así, **en ZV, se observa que cada vez que se obtiene una lectura de temperatura $<55^{\circ}\text{C}$, la probabilidad de que se aisle *Legionella* es del 35,6%, mientras que cada vez que dicha lectura sea $\geq 55^{\circ}\text{C}$, la probabilidad de no aislar *Legionella* será del 83,2% (tabla 30). En cuanto a la capacidad de predicción de concentraciones elevadas de**

Legionella, destaca que para lecturas $\geq 55^{\circ}\text{C}$, en el 100% de ocasiones no se aislarán inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.

Tabla 30. Zonas verticales. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos del punto de corte $< 55^{\circ}\text{C}$ para muestras positivas por *Legionella* y para inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.

	Muestras positivas	Inóculos $\geq 10^3$ UFC/L
Sensibilidad (IC 95%)	63,5 (51,3 - 76,0)	100 (92,9 - 100)
Especificidad (IC 95%)	61,0 (53,9 - 68,1)	58,6 (52,2 - 65,0)
Valor predictivo positivo (IC 95%)	35,6 (26,5 - 44,7)	6,5 (1,68 - 11,6)
Valor predictivo negativo (IC 95%)	83,2 (76,7 - 89,7)	100 (99,7 - 100)

En ZH los valores predictivos del punto de corte de la temperatura a 55°C difieren de los ZV (tabla 31). Cada vez que se obtiene una lectura de temperatura $< 55^{\circ}\text{C}$, la probabilidad de que se aisle *Legionella* es del 65,7%, mientras que cada vez que la temperatura sea $\geq 55^{\circ}\text{C}$, la probabilidad de no aislar *Legionella* será tan sólo del 34,7%. Asimismo, destaca también que para lecturas $\geq 55^{\circ}\text{C}$, no se aislarán inóculos $\geq 10^3$ UFC/L en el 71% de ocasiones, o lo que es lo mismo, **a pesar de tener una temperatura elevada, en una tercera parte de ocasiones pueden existir concentraciones elevadas.**

Tabla 31. Zonas horizontales. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos del punto de corte $< 55^{\circ}\text{C}$ para muestras positivas por *Legionella* y para inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.

	Muestras positivas	Inóculos $\geq 10^3$ UFC/L
Sensibilidad (IC 95%)	65,7 (55,8 - 75,5)	78,4 (66,2 - 90,7)
Especificidad (IC 95%)	34,7 (20,3 - 49,0)	27,8 (18,4 - 37,3)
Valor predictivo positivo (IC 95%)	67,0 (57,1 - 76,9)	36,4 (26,9 - 45,8)
Valor predictivo negativo (IC 95%)	33,3 (19,4 - 47,2)	71,0 (55,3 - 86,8)

Finalmente, para analizar si la temperatura de ACS presenta un efecto gradiente como medida de control, se presentan los resultados del análisis de regresión logística tomando como variable resultado el aislamiento de *Legionella* y como variable independiente la temperatura considerada como continua. **En ZV, por cada °C de aumento de temperatura en un punto terminal, el riesgo de que aparezca colonizado por *Legionella* se reduce de manera significativa en un 11% (OR: 0,89; IC95: 0,83-0,95; $p=0,001$). Sin embargo, en ZH, el aumento gradual de la temperatura no se comporta como un factor que reduzca el riesgo de manera significativa (tabla 32).**

Tabla 32. Resultados de los modelos de regresión logística para describir la relación entre el aislamiento de *Legionella* y la temperatura como variable continua.

	OR	IC 95%	p
Zonas verticales Temperatura (°C)	0,89	0,83 - 0,95	0,001
Zonas horizontales Temperatura (°C)	0,93	0,84 - 1,02	0,134

1.6. Papel de las características de la instalación sobre la colonización por *Legionella*

Los factores relacionados con el diseño y el mantenimiento de la instalación del ACS que se consideraron relevantes para la proliferación de *Legionella* fueron la frecuencia de uso del punto terminal (diario vs. ocasional), el tipo de punto terminal (ducha vs. grifo) y el tipo de material de las líneas principales de distribución o de los anillos según la cronología de su renovación.

En ZV, la media de la temperatura fue similar en puntos de uso diario que en los de uso no diario y también en grifos y duchas (tabla 33). En cuanto a la renovación del material de los anillos de distribución, la temperatura media fue significativamente inferior en las muestras de la primera instalación de acero inoxidable, que corresponde al periodo con una temperatura mínima $>50^{\circ}\text{C}$.

Tabla 33. Zonas verticales. Descripción de las temperaturas de las muestras según los factores relacionados con la instalación.

	Media (DE)	<i>p</i>
Frecuencia de uso		
Diaria	54,6 (4,2)	0,383
Ocasional	55,5 (4,4)	
Tipo de punto terminal		
Ducha	54,6 (4,3)	0,540
Grifo	55,2 (4,1)	
Material del anillo de distribución		
Acero inoxidable-1 ^a	51,1 (4,1)	<0,001
Acero inoxidable-2 ^b	55,9 (3,2)	
Polipropileno	54,7 (5,0)	

Nota. ^aAcero inoxidable 316-L instalado en 1999. ^bAcero inoxidable 316-L instalado durante el período de estudio.

En ZH, la media de la temperatura no presentó variaciones significativas entre grifos y duchas ni entre el tipo de material de la línea principal. Las muestras obtenidas en los puntos terminales con una frecuencia de uso ocasional presentaron una temperatura media menor que las de puntos con un uso diario (51,1°C vs. 52,4°C; $p=0,033$) (tabla 34).

Tabla 34. Zonas horizontales. Descripción de las temperaturas de las muestras según los factores relacionados con la instalación.

	Media (DE)	<i>p</i>
Frecuencia de uso		
Diaria	52,4 (3,7)	0,033
Ocasional	51,1 (3,6)	
Tipo de punto terminal		
Ducha	51,8 (2,8)	0,855
Grifo	51,9 (4,3)	
Material de la línea principal		
Acero inoxidable-1 ^a	51,9 (3,5)	0,672
Acero inoxidable-2 ^b	51,6 (3,4)	

Nota. ^aAcero inoxidable 316-L instalado en 1999. ^bAcero inoxidable 316-L instalado durante el período de estudio.

En ZV ninguno de los factores relacionados con la instalación de ACS estuvo significativamente asociado a la colonización por *Legionella* (tabla 35). Cabe destacar, sin embargo, que el número de muestras obtenidas en puntos de uso ocasional y en grifos fue reducido. Asimismo, sólo un pequeño porcentaje de muestras se obtuvieron tras la renovación de los anillos de distribución por polipropileno.

En el análisis bivariado de ZH (tabla 36), sin embargo, destaca que en los grifos con uso ocasional, más del 40% de las muestras presentaron inóculos $\geq 10^3$ UFC/L, siendo este porcentaje en los grifos de uso diario significativamente menor, del 25,8% ($p=0,043$). También fueron significativas las diferencias en las distribuciones según el tipo de punto terminal: en los grifos, una tercera parte de muestras fueron negativas, mientras que otra tercera parte presentó inóculos $\geq 10^3$ UFC/L, mientras que en las duchas los niveles de *Legionella* se distribuyeron de manera más uniforme. La renovación del material de la línea principal no se asoció significativamente a los niveles de colonización por *Legionella*.

Tabla 35. Zonas verticales. Resultados de las muestras según los factores relacionados con la instalación.

	Niveles de <i>Legionella</i> ^a				<i>p</i>
	Ausencia	<10 ² UFC/L	1x10 ² -9,9x10 ² UFC/L	$\geq 10^3$ UFC/L	
Frecuencia de uso					
Diaria	170 (73,0)	31 (13,2)	26 (11,2)	6 (2,6)	0,416
Ocasional	15 (83,3)	2 (11,1)	0 (0,0)	1 (5,6)	
Tipo de punto terminal					
Ducha	171 (74,0)	30 (13,0)	25 (10,8)	5 (2,2)	0,191
Grifo	14 (70,0)	3 (15,0)	1 (5,0)	2 (10,0)	
Material del anillo					
Acero inoxidable-1 ^b	45 (76,3)	6 (10,2)	6 (10,2)	2 (3,4)	0,760
Acero inoxidable-2 ^c	130 (73,0)	26 (14,6)	17 (9,6)	5 (2,8)	
Polipropileno	10 (71,4)	1 (7,1)	3 (21,4)	0 (0,0)	

Nota. ^a Resultados expresados como n (%). ^b Acero inoxidable 316-L instalado en 1999. ^c Acero inoxidable 316-L instalado durante el período de estudio.

Tabla 36. Zonas horizontales. Resultados de las muestras según los factores relacionados con la instalación.

	Niveles de <i>Legionella</i> ^a				p
	Ausencia	<10 ² UFC/L	1x10 ² -9,9x10 ² UFC/L	≥10 ³ UFC/L	
Frecuencia de uso					
Diaria	28 (45,2)	10 (16,1)	8 (12,9)	16 (25,8)	0,043
Ocasional	21 (24,4)	16 (18,6)	14 (16,3)	35 (40,7)	
Tipo de punto terminal					
Ducha	16 (23,9)	17 (25,4)	13 (19,4)	21 (31,3)	0,024
Grifo	33 (40,7)	9 (11,1)	9 (11,1)	30 (37,0)	
Material del anillo					
Acero inoxidable-1 ^b	37 (31,9)	22 (19,0)	21 (18,1)	36 (31,0)	0,092
Acero inoxidable-2 ^c	12 (37,5)	4 (12,5)	1 (3,1)	15 (46,9)	

Nota. ^a Resultados expresados como n (%). ^b Acero inoxidable 316-L instalado en 1999. ^c Acero inoxidable 316-L instalado durante el período de estudio.

El efecto independiente de la temperatura y de las características de la instalación del ACS sobre la colonización de *Legionella* se ha analizado mediante modelos de regresión logística aplicados únicamente a las ZH, dado que sólo en estas zonas los factores de la instalación se asociaron significativamente a la presencia del microorganismo. Se consideraron dos variables independientes: el aislamiento de *Legionella* y la presencia de inóculos ≥10³ UFC/L. La temperatura se incluyó como variable dicotómica con el punto de corte en 55°C.

En la tabla 37 se presentan los resultados del análisis de regresión logística para el aislamiento de *Legionella* en ZH. Las OR ajustadas indican que **el riesgo de aislar *Legionella* en un punto terminal es 2,46 veces superior cuando la temperatura es <55°C respecto a ≥55°C** (IC 95%: 1,04 – 5,83; p=0,041) y **2,84 veces superior cuando la frecuencia de uso del punto terminal es ocasional respecto a diaria** (IC 95%: 1,26 – 6,41; p=0,012). En este modelo, el tipo de punto terminal no supone un factor de riesgo significativo para la presencia del microorganismo. La inclusión en el modelo del material de la instalación como tercera variable explicativa no introdujo cambios significativos.

Tabla 37. Zonas horizontales. Análisis de regresión logística para describir la relación entre aislamiento de *Legionella*, nivel de temperatura del punto terminal y factores de la instalación de agua caliente sanitaria.

	OR ajustada	IC 95%	<i>p</i>
Temperatura del punto terminal			
≥55°C	Ref.		
<55°C	2,46	1,04 – 5,83	0,041
Frecuencia de uso del punto terminal			
Diario	Ref.		
Ocasional	2,84	1,26 – 6,41	0,012
Tipo de punto terminal			
Ducha	Ref.		
Grifo	0,76	0,34 – 1,71	0,507

Cuando se analiza como variable independiente la presencia de inóculos $\geq 10^3$ UFC/L, el uso no diario el punto terminal presenta una OR ajustada de 3,18 (IC 95%: 1,36 – 7,42; $p=0,008$) y adquiere significación el hecho de que la muestra se haya obtenido de un grifo y no de una ducha (OR ajustada: 2,34; IC 95%: 1,02 – 5,38; $p=0,045$) (tabla 38). Si se tienen en cuenta únicamente los valores inferiores de los intervalos de confianza, estos hallazgos indican que **el riesgo de encontrar concentraciones elevadas de *Legionella* aumenta, como mínimo, un 36% cuando los puntos terminales no se usan diariamente y, también como mínimo, un 2% en los grifos respecto a las duchas.** La temperatura inferior a 55°C presenta una OR ajustada puntual de 2,29, aunque sin significación estadística en este modelo. La inclusión en el modelo del material de la instalación como tercera variable explicativa no introdujo cambios significativos.

Tabla 38. Zonas horizontales. Análisis de regresión logística para describir la relación entre inóculos de *Legionella* $\geq 10^3$ UFC/L, nivel de temperatura y factores de la instalación de ACS.

	OR ajustada	IC 95%	<i>p</i>
Temperatura del punto terminal			
≥55°C	Ref.		
<55°C	2,29	0,92 – 5,69	0,074
Frecuencia de uso del punto terminal			
Diario	Ref.		
Ocasional	3,18	1,36 – 7,42	0,008
Tipo de punto terminal			
Ducha	Ref.		
Grifo	2,34	1,02 – 5,38	0,045

2. Variabilidad genotípica de *Legionella* en agua caliente sanitaria

En este apartado se describen los patrones genotípicos de *Legionella* identificados mediante PFGE en una muestra representativa de inóculos criopreservados obtenidos en ACS. Asimismo, se exponen los genotipos predominantes teniendo en cuenta la instalación a partir de la cual se habían aislado, a fin de determinar si existen variaciones en instalaciones independientes de un mismo edificio. En último lugar, se presentan los patrones identificados en función de la temperatura de la muestra en el momento de la recogida y se ha analizado si existen diferencias significativas en relación a este parámetro, o, en otras palabras, si se identifica un patrón con mayor termorresistencia.

2.1. Resultados generales

Se analizaron un total de 50 aislamientos procedentes de 28 muestras de agua obtenidas en los puntos terminales de la instalación de ACS entre los años 2012 y 2014. Todos los aislamientos correspondieron a *L. pneumophila* serogrupos 6 o 2-14.

Los 50 aislamientos **se discriminaron en cuatro patrones de restricción por análisis PFGE**: patrón A (n=30), patrón Aa (n=3), patrón B (n=15) y patrón C (n=2) (figura 33). El patrón Aa fue una variante del patrón A, del que sólo difirió en una banda. **Los patrones A, B y C fueron claramente diferentes entre sí** (figura 34).

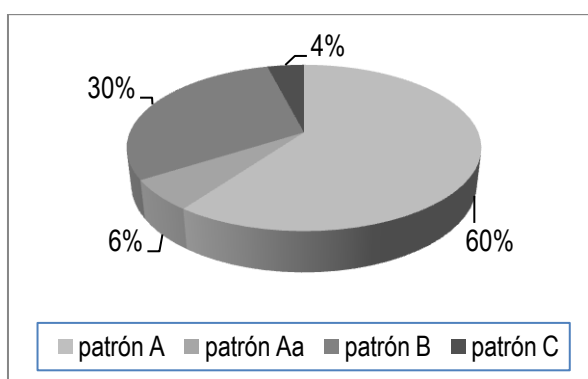


Figura 33. Distribución de los patrones de restricción de *L. pneumophila* obtenidos por análisis PFGE.

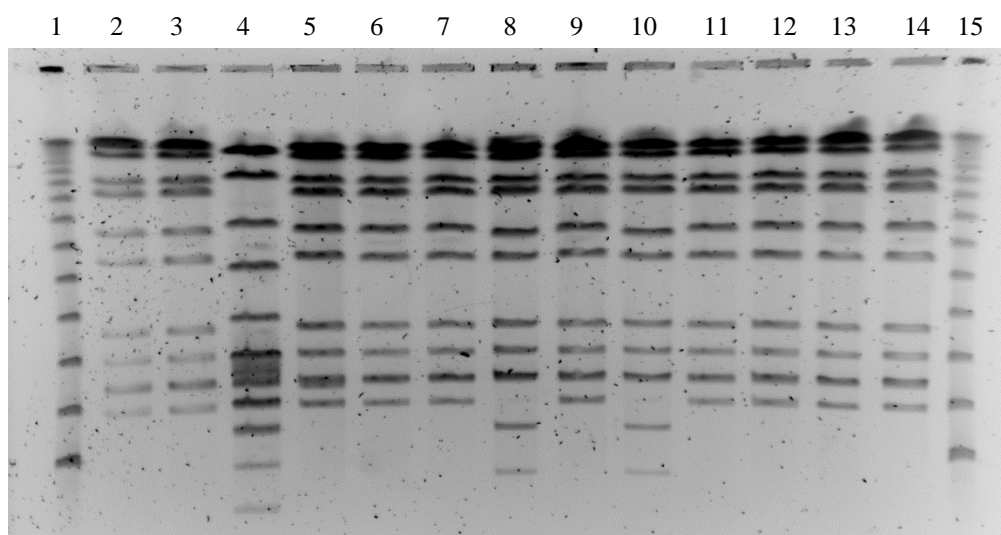


Figura 34. Patrones de restricción detectados por análisis PFGE de los aislamientos de *L. pneumophila*. Carriles 2, 3, 6, 7, 9, 11, 12, 13 y 14: patrón A; carril 5: patrón Aa; carriles 8 y 10: patrón B; carril 4: patrón C; carriles 1 y 15: marcador lambda ladder (New England).

2.2. Variabilidad genotípica de *Legionella* según la instalación

La descripción nominal de los patrones de restricción se presenta clasificada en las tres zonas de muestreo consideradas durante el período de estudio: ZV-ZA, ZV-ZB y ZH-ZB. La instalación de ZA es totalmente independiente a la de ZB y ZH, puesto que el agua fría proviene de un aljibe único y el ACS se obtiene de un pasteurizador de uso exclusivo. A su vez, las ZB tienen tanto instalaciones verticales como horizontales. Las tablas 39, 40 y 41 detallan el año de obtención y la temperatura de la muestra, el serogrupo de *L. pneumophila* y el patrón de restricción obtenido por análisis PFGE.

Al considerar las dos instalaciones independientes (ZA y ZB), el patrón B fue el predominante en las ZA (75% de los aislamientos), mientras que el patrón A+Aa lo fue en ZB (82% de los aislamientos). Estas diferencias presentaron significación estadística ($p < 0,001$) (figura 35). Los dos aislamientos con patrón C se obtuvieron en una muestra de ZA y otra de ZB. Dentro de las dos subzonas de ZB (ZV y ZH), no hubo diferencias en la distribución de los patrones.

Tabla 39. Descripción de los aislamientos obtenidos en ZV-ZA: año de obtención y temperatura de la muestra, serogrupo de *L. pneumophila* y patrón obtenido por PFGE.

Aislamiento	Año	Temperatura	Serogrupo	Patrón PFGE
1	2012	52°	6	B
2	2012	52°	6	B
3	2012	56°	6	B
4	2012	56°	6	B
5	2012	57°	6	B
6	2012	57°	6	B
7	2012	53,7°	2-14	C
8	2013	54,1°	6	B
9	2013	54,1°	6	B
10	2013	56,5°	6	B
11	2014	53°	6	Aa
12	2014	53°	6	A

Tabla 40. Descripción de los aislamientos obtenidos en ZV-ZB: año de obtención y temperatura de la muestra, serogrupo de *L. pneumophila* y patrón obtenido por PFGE.

Aislamiento	Año	Temperatura	Serogrupo	Patrón PFGE
13	2012	52,7°	6	A
14	2012	55°	6	A
15	2012	55°	6	B
16	2012	56,6°	2-14	A
17	2012	56,6°	2-14	A
18	2012	58,2°	6	B
19	2012	58,2°	6	B
20	2012	51,7°	2-14	A
21	2012	51,7°	2-14	A
22	2013	49°	6	A
23	2013	56°	6	A
24	2013	56°	2-14	A
25	2013	51°	6	A
26	2013	51°	6	A
27	2014	56,2°	6	A
28	2014	56,2°	6	Aa
29	2014	54°	6	A
30	2014	54°	6	B

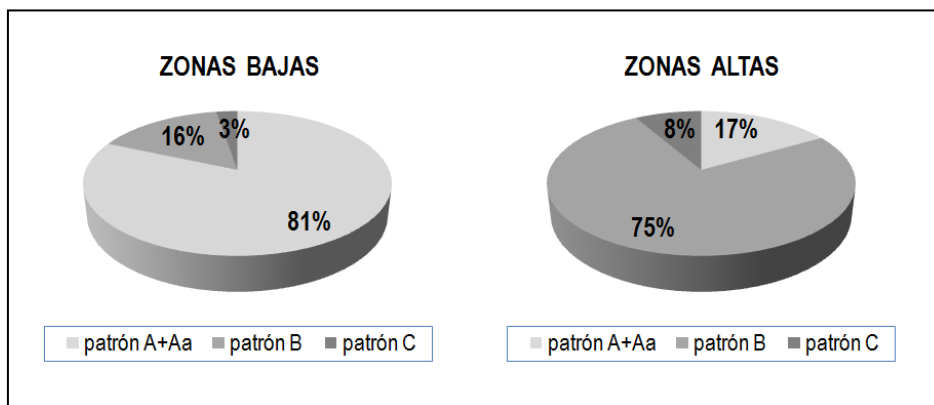


Figura 35. Distribución de los patrones de restricción detectados por análisis PFGE de los aislamientos de *L. pneumophila* en zonas altas y zonas bajas.

Tabla 41. Descripción de los aislamientos obtenidos en ZH-ZB: año de obtención y temperatura de la muestra, serogrupo de *L. pneumophila* y patrón obtenido por PFGE.

Aislamiento	Año	Temperatura	Serogrupo	Patrón PFGE
31	2012	50,7°	6	A
32	2012	56,3°	2-14	A
33	2012	55,2°	6	A
34	2012	55,2°	6	A
35	2012	44°	2-14	A
36	2012	44°	2-14	A
37	2012	54,3	2-14	A
38	2012	54,3	2-14	A
39	2012	49,3°	2-14	A
40	2012	49,3°	2-14	A
41	2013	56°	6	A
42	2013	56°	6	A
43	2013	57°	6	B
44	2013	57°	6	B
45	2013	52,3°	6	Aa
46	2013	52,3°	6	A
47	2013	47°	2-14	A
48	2013	47°	2-14	A
49	2014	54,6°	6	A
50	2014	54,6°	2-14	C

3. Variabilidad genotípica de *Legionella* según la temperatura

El análisis de la temperatura de las muestras de las que se obtuvieron los aislamientos mostró que la media fue significativamente mayor en aquellas muestras con el patrón B que en el patrón A+Aa (55,6°C vs. 52,6°C, $p=0,001$) (tabla 42). Asimismo, el patrón B se encontró en muestras con las temperaturas más elevadas: cuatro aislamientos correspondieron a muestras a 57°C y dos aislamientos en muestras que habían alcanzado los 58,2°C. No hubo ningún aislamiento del patrón B en muestras con temperaturas inferiores a los 50°C. Contrariamente, el patrón A se encontró a una temperatura mínima de 44°C y una temperatura máxima de 56,5°C. Los dos aislamientos con patrón C correspondieron a muestras obtenidas a 53,7°C y 54,6°C, respectivamente, y no se han incluido en el contraste estadístico.

Tabla 42. Descripción de la temperatura de las muestras según los patrones de restricción de *L. pneumophilla* A+a y B obtenidos por PFGE.

	Patrón A+Aa (n=33)	Patrón B (n=15)	<i>p</i>
Descriptores de temperatura			
Media (DE)	52,6 (3,6)	55,6 (2,0)	0,001
Mínima-máxima	44,0 – 56,5	52,0 – 58,2	

Considerando los tres gradientes de temperatura presentados en esta tesis, **el patrón A se identificó en muestras obtenidas mayoritariamente en muestras con temperaturas inferiores a los 55°C, mientras que este porcentaje es el inverso en el patrón B, con el 67% de casos identificados en muestras con temperaturas $\geq 55^\circ\text{C}$** (figura 36). En la figura 37 se representa la distribución numérica de los dos patrones dominantes en relación a la escala de temperatura. Se observa que **la serie de patrones B están desplazados hacia niveles de temperatura superiores a los de la serie A+Aa.**

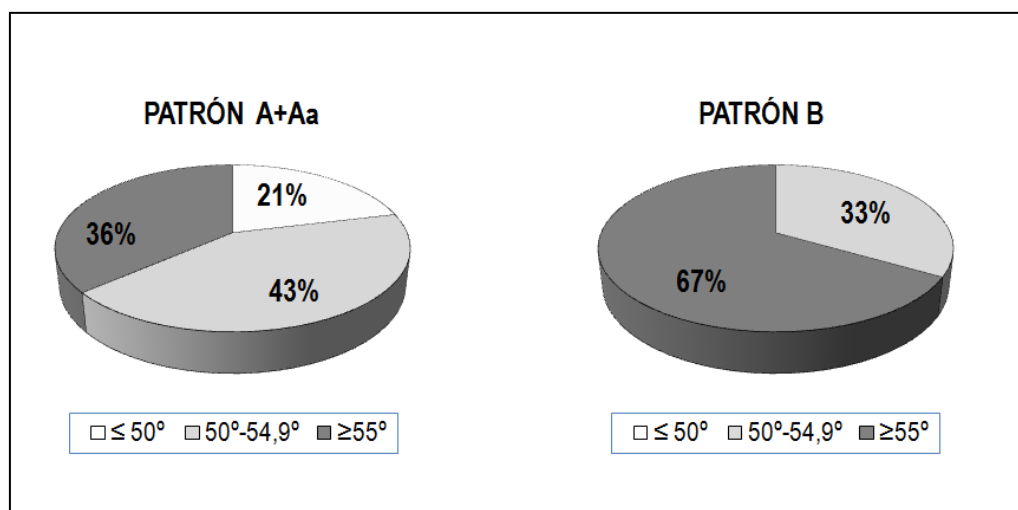


Figura 36. Distribución de los niveles de temperatura en los patrones de restricción detectados por análisis PFGE de los aislamientos de *L. pneumophila*.

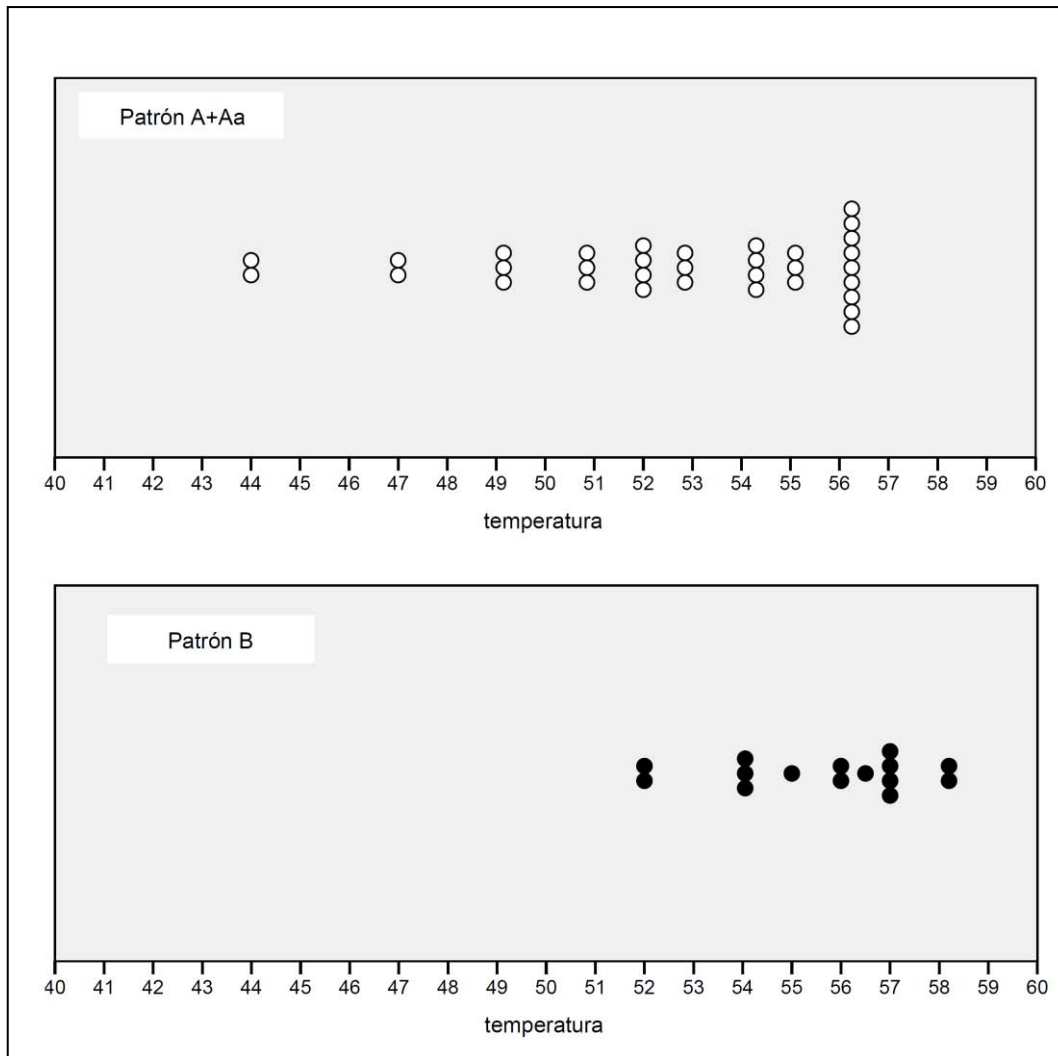


Figura 37. Distribución numérica de los dos patrones de restricción detectados por análisis PFGE de los aislamientos de *L. pneumophila* en relación a la escala de temperatura.

Seis

Discusión

If I could behold all I imagine!

Mia Wasikowska as Jane Eyre

Jane Eyre (2011)

1. Consideraciones generales

La presente tesis es, hasta nuestro conocimiento, el primer estudio de intervención a largo plazo en el que se analiza la temperatura del ACS como único método de desinfección en continuo para *Legionella* en un edificio hospitalario, teniendo además en cuenta el papel de determinados factores de la instalación. Como es sabido, el mantenimiento de la temperatura del ACS por encima de unos dinteles determinados es una de las medidas de prevención básicas incluida en todas las guías técnicas y legislaciones de control de *Legionella* publicadas hasta la fecha. El RD 865/2003, de aplicación en el Estado Español, exige que la temperatura de los puntos terminales sea superior a 50°C. La intervención llevada a cabo en la presente tesis fue aumentar en 5°C esta temperatura mínima exigida, tras apreciar un control subóptimo en la red de distribución del hospital objeto de estudio. Esta decisión, tomada en el año 2007, se apoyó esencialmente en un cuerpo de conocimiento microbiológico sobre el comportamiento de *Legionella* frente a los diferentes dinteles de temperatura, y no en guías técnicas de otros países, muy escasas en ese momento. Con posterioridad, se fueron publicando nuevas guías técnicas en las que se definía como temperatura mínima aceptada los 55°C, lo que respaldó, al menos desde un punto de vista normativo, continuar con esta estrategia de control.

En esta tesis también se llevó a cabo un estudio de tipificación molecular de *Legionella* no meramente con finalidades descriptivas sino para analizar posibles asociaciones con parámetros de la instalación de ACS. Es sabido que, como norma general, una misma instalación de agua suele presentar unos pocos patrones predominantes. Sin embargo, la evidencia publicada hasta la fecha no ahonda en qué factores pueden haber influido en la selección de determinados genotipos. En nuestro trabajo se ha realizado un análisis teniendo en cuenta el tipo instalación y la temperatura del ACS como posibles determinantes de la variabilidad genotípica de *Legionella* en un mismo edificio. Hasta donde conocemos, este enfoque tampoco se ha descrito en trabajos previamente publicados.

2. Resultados principales de esta tesis

2.1. Efectividad de mantener temperaturas elevadas sobre la colonización por *Legionella*

El primer aspecto que se ha abordado en esta tesis ha sido analizar la capacidad de una instalación de ACS altamente compleja para alcanzar unos determinados niveles de temperatura considerados como los óptimos para controlar la colonización por *Legionella*. Este análisis se ha hecho bajo un enfoque sanitario, quedando fuera del alcance del presente trabajo el ahondamiento desde el punto de vista de la ingeniería de instalaciones. Debe puntualizarse que las temperaturas de las muestras obtenidas para el análisis microbiológico del agua no reflejan la temperatura máxima que puede alcanzarse en la red de distribución, puesto que, al haber aplicado la metodología indicada en la legislación vigente, las muestras incluyeron el agua acumulada en el punto terminal. Este matiz es relevante por cuanto es indicativo del verdadero riesgo de exposición de los pacientes a *Legionella*.

Los resultados obtenidos en las temperaturas de las muestras indican que en instalaciones con buenas recirculaciones y un adecuado dimensionamiento de la red de distribución, el porcentaje de puntos terminales que alcanzan las temperaturas deseadas es elevado, aunque no del 100%. En ZV, el 81% de las muestras presentaron temperaturas $>50^{\circ}\text{C}$ cuando éste fue el dintel deseado, siendo este porcentaje del 73% cuando el dintel fue $\geq 55^{\circ}\text{C}$. A pesar de que esta diferencia no presentó significación estadística, los diferentes porcentajes parecen indicar que es más difícil mantener unos determinados niveles de temperatura cuando éstos son más elevados. No obstante, el análisis temporal evidenció que a lo largo del segundo período de estudio, la media semestral de la temperatura de las muestras se mantuvo siempre por encima de los 55°C de una manera estable.

Los resultados obtenidos en las muestras de ZH no reflejan necesariamente la capacidad de térmica de la instalación, sino que, al haberse analizado los puntos terminales más distales de las líneas principales, indican el estado de las partes más deficitarias de la red de distribución. En estas zonas sí que se evidenciaron diferencias significativas entre los dos períodos de estudio: el 78% de las muestras presentaron temperaturas $>50^{\circ}\text{C}$ cuando éste fue el dintel deseado, mientras que sólo el 27% alcanzaron temperaturas $\geq 55^{\circ}\text{C}$ en el segundo período del estudio. **Esta baja capacidad para alcanzar temperaturas más elevadas se explicaría mayoritariamente por las características de la red de distribución y por un menor consumo que en ZV, que favorecería el estancamiento y, como consecuencia, la pérdida de temperatura.**

El segundo aspecto analizado fue el impacto global de aumentar la temperatura mínima en puntos terminales sobre la colonización por *Legionella*. Para ello, se analizó el porcentaje semestral de muestras positivas y el porcentaje de muestras con inóculos $\geq 10^3$. **En instalaciones con buenas recirculaciones y un adecuado dimensionamiento de la red de distribución, los resultados indican que tras el aumento de temperatura raramente se observaron porcentajes de muestras positivas**

superiores al 30%. Sin embargo, en tres semestres a lo largo de seis años de estudio se sobrepasó este nivel. **El hallazgo más significativo, sin embargo, fue que las concentraciones de *Legionella* se mantuvieron permanentemente bajas desde que se elevó la temperatura: en cifras absolutas, a lo largo de los seis años de este segundo período tan sólo se detectaron cuatro aislamientos con inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.** El análisis de regresión lineal segmentada evidenció que en el segundo período se produjo un descenso significativo de la tendencia de los porcentajes de colonización en comparación con el primer período, en el que la tendencia era ascendente. Estos datos indicarían que, si bien de manera global el grado de colonización de *Legionella* mejoró tras aumentar la temperatura, no se logró erradicar el microorganismo ni evitar que, puntualmente, se detectaran porcentajes de colonización superiores al 30%, lo que obligaría a la realización de desinfecciones extraordinarias de acuerdo con la legislación vigente. A pesar de ello, el hecho de que los inóculos con concentraciones elevadas fueron excepcionales es un dato añadido que apunta a una reducción del riesgo global.

En ZH no se observó ningún impacto derivado del aumento de la temperatura ya que, como se ha expuesto anteriormente, los 55°C mínimos se alcanzaron en poco más de una cuarta parte de los puntos periféricos muestreados. **El porcentaje de muestras positivas fue superior al 30% en todos los semestres de ambos periodos de estudio, excepto en uno. El porcentaje de muestras con inóculos $\geq 10^3$ UFC/L presentó valores muy variables, pero se observaron en todos los semestres.** Estas evidencias indicarían que los puntos terminales más alejados de las líneas de distribución principales estarían permanentemente colonizados por *Legionella*.

El tercer aspecto analizado en esta tesis fue la efectividad de una temperatura mínima de 55°C sobre la colonización por *Legionella*, en comparación con dinteles inferiores de temperatura. **El resultado más relevante fue constatar la existencia de un gradiente significativo entre los niveles de temperatura y los niveles de *Legionella* en instalaciones bien dimensionadas y con recirculaciones adecuadas.** En ZV, se aisló *Legionella* en el 16,8% de las muestras con temperaturas $\geq 55^\circ\text{C}$, mientras que este porcentaje fue del 48,4% en muestras con temperaturas $\leq 50^\circ\text{C}$ y del 35,1% en muestras con temperaturas entre estos dos dinteles. Asimismo, **en el grupo de muestras con temperaturas $\geq 55^\circ\text{C}$ no se constataron muestras con inóculos $\geq 10^3$ UFC/L a lo largo de los ocho años de estudio.** Estos datos son relevantes por dos motivos: en primer lugar, se corrobora la hipótesis que una temperatura mínima de 55°C resulta más efectiva para reducir la colonización por *Legionella* que una temperatura mínima de 50°C; y, en segundo lugar, las muestras en el grupo intermedio de temperaturas presentaron un porcentaje de muestras positivas de más del doble que las muestras del grupo con temperaturas $\geq 55^\circ\text{C}$. De todo ello se podría deducir que **los 55°C suponen un punto de inflexión tanto para la presencia de *Legionella* como para el aislamiento de inóculos elevados de la misma.**

En ZH no se observa el gradiente descrito para las ZV. Sin embargo, el porcentaje de muestras positivas y de muestras con inóculos $\geq 10^3$ UFC/L fue también inferior en el grupo con temperaturas $\geq 55^\circ\text{C}$. En los otros dos grupos, los resultados fueron muy similares. Este hecho también apoyaría la observación de

que los 55°C suponen un punto de inflexión. **En ZH, sin embargo, el resultado más relevante fue que, a igualdad de temperaturas respecto a ZV, los porcentajes de muestras positivas y las concentraciones de *Legionella* fueron mayores. Ello indica que en puntos terminales alejados de las líneas principales de distribución, o que se usan con poca frecuencia, el hecho de tener temperaturas elevadas no logra, por sí solo, reducir los niveles de *Legionella*.** Se desprende que otros factores inherentes a las características de estos puntos influyen de manera relevante en su estado de colonización.

Un aspecto novedoso de la presente tesis fue considerar la temperatura como un factor predictor de la colonización por *Legionella* en puntos terminales. El hallazgo de mayor relevancia en el contexto clínico fue cuantificar los valores predictivos, por la aplicación directa que supone en la gestión del riesgo biológico de las instalaciones. En concreto, **en instalaciones con buenas recirculaciones y un adecuado dimensionamiento de la red de distribución, cada vez que se obtiene una lectura de temperatura $\geq 55^{\circ}\text{C}$, la probabilidad de no aislar *Legionella* sería del 83%. En cuanto a la capacidad de predicción de concentraciones elevadas de *Legionella*, para lecturas $\geq 55^{\circ}\text{C}$, en el 100% de ocasiones no se aislarían inóculos $\geq 10^3$ UFC/L.** Otra lectura complementaria es la obtenida mediante el análisis de regresión logística con un solo factor: por cada grado de aumento de temperatura, el riesgo de que un punto terminal aparezca colonizado por *Legionella* se reduce de manera significativa en un 11%. Dado que los valores predictivos son variables dependiendo de la prevalencia del factor bajo estudio, estos resultados serían extrapolables únicamente a otras instituciones que tuvieran porcentajes de colonización similares. Igualmente, en zonas de un mismo edificio con diferentes prevalencias, los valores predictivos también diferirán. De todo lo expuesto se desprende que, **cuando las instalaciones están bien dimensionadas, la temperatura de ACS podría utilizarse como un indicador bastante aproximado del grado de colonización por *Legionella*, aunque su aplicación práctica es, por el momento, incierto.**

El último bloque de resultados corresponde al análisis del papel relativo de los factores relacionados con la instalación de ACS sobre la colonización por *Legionella*. En ZV debe puntualizarse que, debido a los criterios de muestreo y a los usos del ACS, se muestrearon pocos puntos terminales del tipo grifo común (en comparación con las duchas) y de uso no diario (en comparación con los de uso diario), lo que probablemente ha restado potencia estadística en las comparaciones. Así, no se observó ninguna asociación entre el tipo de punto terminal y su frecuencia de uso con el grado de colonización por *Legionella*. Por este motivo no se llevó a cabo el análisis multivariante. En ZH se evidenció la situación contraria. Debido a que tanto la frecuencia de uso como el tipo de punto terminal se asociaban significativamente a los niveles de *Legionella*, se realizó un análisis multivariado para determinar el papel de cada uno de estos factores con independencia de la temperatura. El modelo de regresión logística constató que el riesgo de aislar *Legionella* se asociaba significativamente a temperaturas inferiores a 55°C y a no utilizar diariamente el punto terminal.

En el modelo para la presencia de inóculos $\geq 10^3$ UFC/L como variable dependiente, el uso no diario del punto terminal presentó un riesgo aún mayor, y adquirió significación el hecho de que la muestra se hubiera obtenido de un grifo y no de una ducha. La temperatura inferior a 55°C no presentó significación estadística en este modelo. Estos resultados permiten corroborar la importancia de la frecuencia de uso de los puntos terminales como un factor independiente que favorece en gran medida la proliferación de *Legionella*. **Con independencia de si se alcanzan las temperaturas adecuadas, el hecho de no utilizar diariamente los puntos de consumo aumenta el riesgo de colonización en casi el triple respecto a los puntos de uso diario. Además, la falta de uso no sólo favorece la colonización sino que también se asocia a inóculos elevados.** La presencia de inóculos elevados también estaría condicionada por el tipo de elemento terminal, siendo el riesgo mayor en grifos que en duchas. La interpretación de este último dato debe hacerse con cautela. Podría explicarse tanto por el propio diseño de grifos y duchas (más complejo el de los grifos, en general) o bien por la mayor dificultad de aplicar adecuadamente las tareas de mantenimiento y desinfección de los grifos en comparación con las duchas.

Finalmente, este análisis evidenció también que la renovación de materiales de las líneas principales de distribución no se asociaba a una reducción de la colonización por *Legionella*. Este hallazgo no significa necesariamente que el saneamiento de la instalación no afecte el estado sanitario de la red, ya que sólo se tuvieron en cuenta los cambios en anillos de distribución y líneas principales, y no los de tramos secundarios, más próximos a los puntos de consumo. Esta cuestión, pues, es un aspecto por resolver que precisaría un enfoque metodológico diferente al de la presente tesis.

2.2. Variabilidad genotípica de *Legionella* en agua caliente sanitaria

El análisis de 50 aislamientos de *L. pneumophila* obtenidos en los años 2012, 2013 y 2014 mostró que la instalación de ACS está colonizada exclusivamente por serogrupo 6, no habiéndose detectado otros serogrupos. **En cuanto a la variabilidad genotípica de *L. pneumophila*, el primer resultado relevante fue constatar que existe un patrón mayoritario diferente para circuitos independientes de ACS.** En el circuito de ZB, de mayor recorrido y complejidad, predominó el patrón A+Aa, mientras que en el circuito de ZA, más simple, predominó el patrón B. Cabe matizar que, si bien el patrón B fue el mayoritario en las ZA, el 60% de los aislamientos correspondieron a este circuito pero el 40% correspondieron al circuito de ZB. En contraste, el patrón A+Aa sólo se identificó en dos aislamientos del circuito de ZA a lo largo de los tres años estudiados.

Este hallazgo corrobora la hipótesis planteada al respecto en la presente tesis. Como se ha indicado, los circuitos de ACS analizados son completamente independientes entre sí, ya que si bien tienen una misma acometida, cada uno dispone de su propio aljibe de AF a partir del cual se alimenta su propio pasteurizador. **Cabe destacar que desde el año 2005 el AF de los aljibes se cultivó con una**

periodicidad bimensual, siendo los resultados persistentemente negativos. Ello apunta a que es en la instalación de ACS donde se seleccionan unos determinados patrones genéticos de *L. pneumophila* y donde, además, se produce la amplificación del inóculo.

Al analizar la asociación entre los patrones genéticos y la temperatura en puntos terminales del ACS, se constató una mayor termorresistencia del patrón B en comparación con el patrón A+Aa, o, en otras palabras, que el patrón B era capaz de sobrevivir a mayores temperaturas que el patrón A+Aa. En concreto, el patrón B se aislaba en muestras con temperaturas de hasta 58,2°C. A efectos prácticos, y considerando los dos puntos de corte de la temperatura objeto de estudio, el 100% de inóculos del patrón B sobrevivían a los 50°C, y el 66,7% a los 55°C. Estos porcentajes fueron menores en el patrón A+Aa (78,8% y 36,4%, respectivamente).

Este segundo hallazgo indica que en puntos terminales con temperaturas de ACS elevadas se aísla un genotipo más termoresistente, lo que iría a favor de la hipótesis planteada. El análisis previo de las temperaturas de las muestras obtenidas entre los años 2007 y 2013, tras decidir aumentar la temperatura global de la instalación, mostró que en ZA, la mayor parte de puntos terminales alcanzaban los 55°C, mientras que en ZB este porcentaje fue significativamente menor. En otras palabras, **en la instalación con el patrón más termorresistente, las temperaturas se mantuvieron mayoritariamente por encima de los 55°C, mientras que en la instalación con el patrón menos termorresistente hubo dificultades para alcanzar los 55°C de manera uniforme.** Podría deducirse que en instalaciones con temperaturas permanentemente elevadas durante largos períodos de tiempo probablemente se redujeron aquellos patrones genéticos más termolábiles a favor de los más termorresistentes. Debe mencionarse que los dos únicos aislamientos de patrón A+Aa encontrados en la instalación de ZA correspondieron a muestras con temperaturas de 53°C.

En definitiva, los resultados descritos hasta ahora indican, en primer lugar, que existe una baja variabilidad genética de *L. pneumophila* aislada en las instalaciones de ACS; en segundo lugar, que existe un patrón predominante en instalaciones independientes de un mismo edificio; y en tercer lugar, que uno de los patrones está mejor adaptado a temperaturas elevadas del ACS.

3. Relación de los resultados obtenidos con la evidencia existente

3.1. Efectividad de mantener temperaturas elevadas sobre la colonización por *Legionella*

Son escasas las publicaciones que han analizado bajo la doble perspectiva técnica y sanitaria el funcionamiento de los sistemas de ACS como base para el control de *Legionella* en hospitales. Peiró *et al.* describieron la optimización de las instalaciones de ACS de un centro sanitario de 150 camas previa a la puesta en marcha del sistema de pasteurización Pastormaster® (Peiro, Sierra, Pombo, Baquedano y Huerta, 2005) y que requirió el ajuste de puntos de consumo que no alcanzaban los 50°C. Bedard *et al.* (2015) publicaron recientemente un estudio descriptivo del funcionamiento en condiciones reales de las instalaciones de cinco hospitales en los que la temperatura mínima deseada fue 55°C. Constataron, en consonancia con nuestros resultados, que estos niveles no se alcanzaban en el 100% de puntos terminales, oscilando entre el 85% y el 57%, según el hospital. Otro trabajo publicado en 2010 llevado a cabo en dos hospitales comprobó que las temperaturas del ACS pueden oscilar ostensiblemente dependiendo de los picos de consumo, lo que, según los autores, justificaría disponer de registros en continuo que monitorizaran este aspecto (Bujak, 2010).

Las guías técnicas publicadas hasta el momento proponen distintos niveles de temperatura de control. Así en Austria, Alemania, el Reino Unido y Suiza se recomienda mantener una temperatura mínima de 55°C en puntos terminales, mientras que en España, Francia, Italia e Irlanda dicha temperatura es de 50°C. Por otro lado, algunas guías especifican otros aspectos relacionados con el control de la temperatura. En concreto, las guías de Alemania y Suiza indican que la pérdida de temperatura entre impulsión y retorno no debe ser inferior a 5°C. Asimismo, la OMS recomienda que entre la impulsión y el punto más distal no se superen los 5°C de diferencia. Estas cifras serían indicativas de que la red de distribución está bien dimensionada y no se producen pérdidas excesivas de temperatura por estancamiento o por recorridos de longitudes excesivas. Se estima que aproximadamente el 30% de la energía total consumida en un hospital se destina al calentamiento del ACS (Bujak, 2010; Pérez-Lombard, Ortiz y Pout, 2008). Sería necesario, pues, profundizar más en la relación entre consumo energético y efectividad biocida de la temperatura en escenarios complejos y cambiantes como son los centros hospitalarios.

Se han publicado algunos trabajos describiendo la experiencia de utilizar en hospitales una temperatura mínima de control de 55°C, aportando todos ellos resultados coherentes con los nuestros. Los contextos y metodologías, sin embargo, son poco coincidentes. Hasta la fecha, sólo se han publicado dos estudios que presenten resultados a largo término. En uno de ellos se mantuvo esta temperatura durante siete años tras la aparición de un brote nosocomial de legionelosis (Borau *et al.*, 2000); el resultado fue que no aparecieron nuevos casos de enfermedad, pero no se llevó a cabo un estudio ambiental de las aguas. Darelid *et al.* (2002) también aplicaron esta medida para controlar un brote nosocomial, con un seguimiento de nueve años. Durante este período, además de no producirse nuevos casos de

legionelosis, se aisló *L. pneumophila* en el 12% de las muestras analizadas. Este porcentaje es inferior al hallado en nuestra investigación, aunque debe tenerse en cuenta que el número de muestras fue menor (un total de 125) y no se dan detalles de los criterios de muestreo.

Otros estudios de menor duración describen reducciones significativas del grado de colonización de *Legionella* tras la instauración de temperaturas superiores a 55°C. Durante nueve meses, Kusnetsov *et al.* (2003) mantuvieron una temperatura media en puntos terminales de 56°C, consiguiendo una reducción de las concentraciones de *Legionella* con respecto a temperaturas inferiores, pero no su completa eliminación. El estudio ya citado de Bedard *et al.* (2015) describe que en los puntos de consumo en los que se mantuvieron temperaturas por encima de 55°C no se detectó *Legionella* ni por cultivo ni por qPCR; el número de muestras analizadas, sin embargo, fue tan sólo de 64. Una nueva perspectiva la aportan Völker y Kistemann (2015), en un trabajo que analizó diferentes opciones de desinfección con temperatura sola o combinada con dióxido de cloro a lo largo de tres años, y en el que se analizaron un total de 476 muestras. Cuando la temperatura en puntos terminales se mantuvo por debajo de los 55°C, y sin ningún sistema de desinfección añadido, aumentó el grado de colonización por *Legionella* con un 14% de muestras positivas, frente al 3% cuando se mantuvo por encima. De nuevo, estos porcentajes son inferiores a nuestros resultados, aunque siguen acordes con la misma tendencia de mayor efectividad de los 55°C respecto a los 50°C.

Existen también publicaciones con diseños de tipo transversal en los que se describe que la presencia de *Legionella* en ACS es significativamente más frecuente en muestras de agua con temperaturas por debajo de los 55°C (Bargellini *et al.*, 2011; Borella *et al.*, 2005; Hruba, 2009). En esta misma línea cabe destacar la publicación de Serrano-Suarez *et al.* (Serrano-Suarez *et al.*, 2013), que presenta los resultados del análisis de 231 muestras de agua de diferentes edificios, entre ellos, hospitales, encontrándose que los dos factores de riesgo significativos para aislar *Legionella* fueron unos niveles de cobre inferiores a 0,76 ppm y una temperatura inferior a 55°C. Finalmente, dos trabajos combinan a la vez el mantenimiento de temperaturas elevadas en continuo con sistemas de ionización cobre plata (Blanc *et al.*, 2005; Colville *et al.*, 1993).

En comparación con los estudios citados, nuestro trabajo aporta, en primer lugar, un período de seguimiento largo, sólo superado por una publicación, y en segundo lugar, un número de muestras considerable, también sólo superado por otra. La coherencia de los resultados en todos estos trabajos conforma una base de conocimiento lo suficientemente sólida como para poder afirmar que en centros hospitalarios confiere una mayor seguridad mantener el ACS a temperaturas no inferiores a los 55°C, mientras que temperaturas cercanas a los 50°C no garantizan un buen control de la bioseguridad en relación a *Legionella*.

Además de los estudios en escenarios reales, existen también evidencias basadas en estudios de laboratorio que identifican los 55°C como un buen punto de corte para reducir la presencia de *Legionella*.

En primer lugar, deben mencionarse los estudios ya clásicos que calcularon el tiempo de reducción decimal (D) de *Legionella*. Para *L. pneumophila*, el D50°C oscilaría entre 80 y 124 minutos, mientras que el D55°C sería mucho menor, de unos 19 minutos (Dennis *et al.*, 1984; Schulze-Robbecke *et al.*, 1987; Stout *et al.*, 1986). Aplicando estos tiempos a conducciones de agua, se podría deducir que, **cuando se producen desprendimientos de *Legionella* desde el biofilm a la fase acuosa, si el agua se encuentra a 50°C puede sobrevivir hasta 3 horas, mientras que si se encuentra a 55°C, este tiempo se reduce a unos 20 minutos.** En segundo lugar, diversos estudios han aportado datos referentes al comportamiento de las amebas frente a diferentes niveles de temperatura. Entre los más recientes, cabe destacar los trabajos de Cervero-Arago *et al.* (2014) y Canals *et al.* (2015). En el primero, se evidenció que una temperatura de 50°C era relativamente efectiva para reducir los trofozoitos de diferentes especies de *Acanthamoeba* y *Hartmannella*, pero no los quistes, mientras que a partir de 60°C se obtuvieron reducciones significativas en ambos estadios. En el segundo, se objetivó que en muestras de agua obtenidas de edificios a temperaturas elevadas (54°C de promedio), el porcentaje de FLA era significativamente menor que en muestras con menor temperatura. Dada la estrecha relación que se establece entre *Legionella* y las FLA, estos datos apoyarían también, aunque de manera indirecta, que las temperaturas de 50°C no mejorarían el estado de colonización de las redes de distribución de agua con biofilms ya establecidos. En un trabajo más reciente del mismo grupo, en el que se analizó efecto de distintos gradientes de temperatura sobre *Legionella* en forma libre y asociada a FLA, se constató que en las formas libres el tiempo de reducción de 4 logs presentaban un punto de inflexión a los 55°C, en comparación a los 50°C (Cervero-Aragó *et al.*, 2015). Sin embargo, en *L. pneumophila* asociada a *Achantamoeba*, la diferencia se observó más marcada a partir de los 60°C. Los autores concluyeron que, extrapolarando estos datos a las condiciones reales de las instalaciones, aquellos puntos de mayor riesgo serían los puntos más distales de la instalación (grifos y duchas), en los que comúnmente las temperaturas son menores.

A pesar de todas estas evidencias, y a diferencia de otros métodos de desinfección en continuo como la ionización cobre-plata, no existen apenas estudios en instalaciones simuladas que analicen el comportamiento de *Legionella* frente a diferentes niveles de temperatura. Cabe destacar la publicación de Saby *et al.* (2005), en el que se instaló un sistema distribución piloto elaborado con diferentes materiales y se analizó la evolución de *Legionella* a lo largo de 14 semanas tras la aplicación de diferentes métodos de desinfección. Los resultados indicaron que a temperaturas por encima de 55°C las concentraciones medias de *Legionella* tanto en fase acuosa como sésil se reducían ostensiblemente respecto a los 40°C. **Dadas las dificultades para poder llevar a cabo estudios experimentales en escenarios reales, los estudios controlados en escenarios que simulen los sistemas de ACS podrían ayudar enormemente a establecer cuáles son los dinteles de temperatura óptimos.**

En cuanto al papel de las instalaciones en el riesgo de proliferación de *Legionella*, resulta difícil establecer comparaciones de nuestros resultados con otros trabajos, ya que en ninguna de las publicaciones sobre el papel de la temperatura que se han citado anteriormente se tuvo en cuenta el efecto relativo del diseño y el mantenimiento de la instalación. Sin embargo, esta situación de interacción entre los sistemas de desinfección del agua y el estado de las instalaciones es el escenario real de trabajo en los centros sanitarios. Además de la temperatura, la medida más ampliamente aceptada en las guías técnicas de prevención de *Legionella* es minimizar el estancamiento del agua. Esto se conseguiría optimizando los diseños de la red de distribución y reduciendo al máximo los puntos terminales de bajo consumo. En concreto, diferentes guías y legislaciones, entre ellas la española, indican abrir los grifos poco utilizados una vez por semana. No hemos encontrado ninguna publicación que analice la efectividad de esta medida concreta en relación a *Legionella*. Existen dos trabajos realizados en edificios de viviendas que objetivaron una mayor carga de recuentos bacterianos en muestras de agua caliente obtenidas a primera hora de la mañana, tras el tiempo de reposo nocturno (Lautenschlager *et al.*, 2010) o en el primer tramo de agua del grifo (Lipphaus *et al.*, 2014). Otro dato que justificarían indirectamente la necesidad de abrir frecuentemente los grifos lo aporta el trabajo de Bedard *et al.* (2015), en el que comparó la velocidad con la que descendía la temperatura en tramos de tubería. Se comprobó que al cabo de tres horas y media la temperatura del agua se había igualado con la temperatura ambiente de 20°C, tiempo durante el cual se producirían las condiciones térmicas favorables para la proliferación de *Legionella*. Otros datos indirectos los aportan estudios más antiguos que describieron el papel amplificador que tenían los depósitos acumuladores (Ciesielski *et al.*, 1984; Harper, 1988). Se ha documentado también que las averías en las instalaciones, y el consiguiente estancamiento de agua, son una clara situación de riesgo de proliferación de *Legionella* debido al enfriamiento del ACS (Mermel *et al.*, 1995). **Nuestros datos concluyen que si los puntos de consumo no se utilizan diariamente, el riesgo de aislar *Legionella* se multiplica por más de dos, con independencia de la temperatura alcanzada. La lectura subyacente de estos resultados es doble: la primera, y más importante, es que en los hospitales debería reducirse al máximo el número de grifos o duchas con ACS que tengan un bajo uso; la segunda lectura es que, en caso de llevarse a cabo programas de abertura sistemática de grifos la frecuencia debería ser diaria, y no semanal. Ante estas dos opciones, parece más seguro y coste-efectivo decantarse por llevar a cabo un mapa dinámico de la instalación de ACS con retirada de puntos de uso poco útiles.**

Otro aspecto controvertido es el papel del tipo de punto terminal como amplificador de *Legionella*. Nuestros hallazgos indican que, a igualdad de temperatura y de frecuencia de uso, los grifos de accionamiento manual tienen mayor riesgo de presentar inóculos elevados en comparación con las duchas. De nuevo, no hemos encontrado publicaciones que hayan analizado esta cuestión. Se sabe que los grifos de tipo electrónico presentan una mayor probabilidad de estar colonizados que los grifos de accionamiento manual (Assadian *et al.*, 2002; Chaberny y Gastmeier, 2004; Hargreaves *et al.*,

2001; Merrer *et al.*, 2005; van der Mee-Marquet *et al.*, 2005). También se sabe que en los aireadores de los grifos se pueden aislar mayores concentraciones de *L. pneumophila* serogrupo 1 (Cristina *et al.*, 2014). Dado que en las duchas no hay aireadores, esta podría ser una explicación a nuestros resultados. Otro posible motivo podría ser las mayores dificultades para llevar a cabo las desinfecciones reglamentarias en los grifos en comparación con las duchas. De cualquier modo, esta cuestión debe ser considerada como una primera evidencia susceptible de ser investigada con más profundidad. De corroborarse este supuesto, podrían derivarse implicaciones importantes en la gestión del agua sanitaria, puesto que en pacientes hospitalizados los grifos comunes suponen una fuente de exposición a *Legionella* tanto o más importante que las duchas de aseo.

Por último, uno de los aspectos analizados en la presente tesis es la influencia del recambio de las líneas de distribución principales sobre la colonización por *Legionella*. De nuevo, son muy escasas las investigaciones al respecto llevadas a cabo en escenarios reales. En dos estudios se describe que tras llevarse a cabo trabajos de saneamiento en la red de distribución de ACS, con eliminación de tramos muertos, no se observó una mejora en el porcentaje de muestras positivas crecer (Patterson *et al.*, 1994; Sidari *et al.*, 2004). Otro trabajo llevado a cabo en diecisiete hospitales del Reino Unido encontró que después de llevar a cabo apropiadas prácticas de ingeniería para la prevención de legionelosis, el 12% de ellos presentaron recolonización de las aguas (Liu *et al.*, 1993). Esta falta de evidencia puede explicarse por las dificultades metodológicas para llevar a cabo estudios controlados que analicen este aspecto. En nuestro caso, al haberse analizado solamente el recambio de las líneas de distribución principales, y no los tramos secundarios, los resultados deben interpretarse con cautela.

3.2. Variabilidad genotípica de *Legionella* en agua caliente sanitaria

Es conocido que las instalaciones de ACS de los edificios hospitalarios pueden estar colonizadas mayoritariamente por un mismo serogrupo de *L. pneumophila*. En nuestro caso, los aislamientos analizados correspondieron exclusivamente al serogrupo 6. Este hallazgo es concordante con otros trabajos en los que se describe que este serogrupo puede ser igual o más frecuente que el serogrupo 1 en aguas de hospitales (Leoni *et al.*, 2005; Mavridou *et al.*, 2008; Napoli *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2008).

La variabilidad genética de *L. pneumophila* en edificios hospitalarios fue estudiada por Sabrià *et al.* (2001) en uno de los estudios pioneros al respecto, que puso de manifiesto que cada hospital presentaba un subtipo de ADN dominante, no compartido con otros hospitales. Con posterioridad, el mismo grupo constató que los patrones de restricción obtenidos por análisis PFGE de cada hospital podía persistir durante largos períodos de tiempo en las aguas, siendo los mismos que se aislaban también en las muestras clínicas de pacientes que adquirieron una legionelosis nosocomial (García-Núñez *et al.*, 2008). Esta escasa variabilidad genética intra-centro con grandes diferencias entre centros ha sido corroborada en posteriores estudios realizados en Alemania (Oberdorfer *et al.*, 2008), Italia (Iatta *et al.*, 2013) y

Grecia (Alexandropoulou *et al.*, 2015). En todos ellos, se reporta que cada edificio hospitalario presenta en sus aguas un perfil genotípico predominante que persiste a lo largo de prolongados períodos de tiempo, de entre 4 a 10 años, según el tiempo de observación.

Nuestros datos son los resultados del análisis de inóculos obtenidos a lo largo de tres años. Si bien no es un plazo de tiempo tan largo como los estudios citados anteriormente, podemos afirmar que se confirma una baja variabilidad en las aguas del hospital objeto de estudio, puesto que hay tan sólo dos patrones predominantes. **Una de las principales aportaciones de nuestro trabajo es haber identificado que cada patrón se corresponde con instalaciones independientes de un mismo edificio. Hasta la fecha, sólo un estudio ha reportado también este hallazgo, aunque lo ha descrito de una manera indirecta en el contexto del control de un brote de legionelosis nosocomial en un hospital de Australia** (Bartly *et al.*, 2015). En las muestras de ACS se aislaron tres variantes clonales, cada una de ellas asociadas a diferentes partes del edificio. El trabajo, sin embargo, no detalla si se corresponden con instalaciones independientes ni las posibles causas de este hallazgo.

Los motivos por los cuales en una instalación de ACS predomina un determinado patrón no han sido estudiados en condiciones reales. Un reciente trabajo ha analizado estos aspectos en edificios convencionales (Pan Ji *et al.*, 2015). Un mismo equipo de distribución de agua potable instalado en cinco edificios permitió identificar qué parámetros se relacionaban con la composición y cantidad del microbioma del agua, incluyendo *Legionella* detectada por qPCR. Estos parámetros fueron la arquitectura del propio edificio, el material de la instalación y el estancamiento del agua. Dos de los edificios tenían la misma acometida, por lo que los autores destacaron la importancia de las características de la instalación como un importante factor que determina el microbioma del agua potable. Otro estudio previo llevado a cabo en condiciones simuladas llegó a conclusiones similares (Wang *et al.*, 2015). Como se ha apuntado anteriormente, disponemos de datos históricos que confirman que en el AF de los aljibes del hospital, procedente de la misma acometida de la red pública de distribución, no se aísla *Legionella*. Es, por tanto, en la red de ACS donde *Legionella* se selecciona y prolifera. **La diferencia de patrones en las dos instalaciones estudiadas podría obedecer a motivos relacionados con el diseño y los materiales de las mismas. Sin embargo, en nuestro caso, esta explicación sería poco plausible, ya que el diseño y los materiales del circuito de ZA y del circuito de ZB son muy similares, mientras que el de ZH tiene otro tipo de distribución y materiales de diversa antigüedad.**

A pesar de que el comportamiento termofílico de *Legionella* es bien conocido desde hace años, poco se sabe de las implicaciones que pueda tener el uso continuado de temperaturas elevadas en la selección de variantes genéticas más resistentes a estas condiciones ambientales. **Nuestros datos muestran una clara diferencia entre los dos patrones mayoritarios identificados, que coincide, además con cada una de las instalaciones independientes.** Tres estudios han apuntado que los métodos de desinfección aplicados en las instalaciones hospitalarias pueden explicar la selección y proliferación de

determinados clones. Uno de ellos fue el uso de ultravioleta (Triassi *et al.*, 2006). En otro trabajo, se constató que tras varios años aplicando choques térmicos periódicos, se consiguió erradicar un clon de *L. pneumophila* serogrupo 6 pero, sin embargo, persistió otro clon del serogrupo 5, ambos identificados por SBT (Perola *et al.*, 2005). Un interesante trabajo del año 2013 llevado a cabo en dos hospitales de Polonia (Pancer *et al.*, 2013) compara los cambios en los clones de *L. pneumophila* analizados por SBT tras aplicar desinfección con dióxido de cloro, en ambos centros y tras añadir además choques térmicos en sólo uno de ellos. Tras un período de observación de 7 años, en el hospital con ambas métodos se constataron cambios en los clones dominantes. **Aún siendo escasos, estos datos son concordantes con nuestra hipótesis de trabajo sobre las consecuencias del uso a largo término de temperaturas elevadas como método de desinfección en continuo.**

La comprensión a nivel microbiológico de la selección de los clones más termorresistentes queda fuera del ámbito de la presente tesis. Debe apuntarse, sin embargo que existen evidencias de que en un mismo edificio, los clusters de *Legionella* son más diversos en el agua fría que en el agua caliente y que, además, la distancia filogenética es también mayor (Lesnik, 2015). Ello indica una menor variabilidad genética en los circuitos de agua caliente, lo que podría ser explicado porque la temperatura elevada permite sobrevivir a los genotipos de mayor resistencia.

4. Limitaciones

La presente investigación presenta diversas limitaciones que deben ser tenidas en cuenta tanto para la interpretación de los resultados como para la generalización de los mismos.

En primer lugar, la técnica con la se recogieron las muestras puede suponer una limitación. Para poder diferenciar entre colonización de puntos terminales y colonización de la red de distribución se hubieran tenido que procesar por separado los primeros 100 mL de agua, junto con el biofilm obtenido por hisopo, y el agua recogida al alcanzar el punto máximo de temperatura. Esto no fue posible porque la presente investigación se llevó a cabo en el contexto del plan de autocontrol de *Legionella* del centro, por lo que se tuvo que aplicar la técnica de muestreo indicada en el RD 865/2003. Una lectura alternativa a esta limitación es que las muestras así obtenidas representan la carga real de *Legionella* a la que pueden estar sometidos los usuarios de los hospitales, por lo que, desde el punto de vista de gestión de riesgo del paciente, aportan una mejor información.

Asimismo, y por el motivo antes expuesto, todos los análisis relacionando la carga microbiana y la temperatura se han hecho en base a la temperatura de la muestra, no de la instalación propiamente dicha. Las limitaciones que puede reportar este aspecto son difíciles de esclarecer. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que la mayoría de estudios sobre colonización de *Legionella* en instalaciones reales se han hecho también en base a la temperatura de las muestras.

Los resultados relacionados con los aspectos técnicos y de funcionamiento de la instalación presentan dos limitaciones importantes. En primer lugar, no se ha podido analizar el impacto sobre la totalidad de la red de las medidas de mejora que se fueron introduciendo a lo largo de los años de estudio, en concreto, la eliminación de puntos terminales en desuso y la optimización de temperaturas en puntos deficientes. Para este propósito hubiera sido necesario diseñar otro estudio concurrente dentro de la proyecto de investigación principal. En segundo lugar, no se ha tenido en cuenta la carga de partículas sólidas en suspensión en la instalación, a pesar de que se sabe que es un factor directamente relacionado con la colonización por *Legionella*. No obstante, debemos puntualizar que si bien esta asociación se ha analizado en estudios de diseño transversal, no ha sido así en estudios longitudinales a largo plazo, como es el nuestro, por las dificultades logísticas que comporta.

En esta investigación no se han aportado datos sobre la carga de *Legionella* en puntos centrales de la instalación. El primer motivo es que no se recogieron de manera sistemática muestras de las zonas de impulsión del ACS para ir comprobando de manera regular la efectividad de los pasteurizadores. El segundo motivo es que, si bien en los retornos se recogieron muestras mensualmente (de acuerdo con el plan de autocontrol del centro), la técnica se modificó en mitad del período de estudio. Así, a partir del año 2010, las muestras de los retornos se recogieron dejando purgar el agua durante 1 minuto. Esta modificación comportó un cambio significativo en el porcentaje de muestras positivas de los retornos (datos no mostrados). El hecho de no disponer de datos fiables en puntos centrales ha limitado tener

una visión más global del grado de colonización de la red, ya que hubieran complementado, o incluso ayudado a entender, los resultados obtenidos en puntos terminales.

Idealmente, para determinar el efecto a largo plazo de la temperatura elevada de ACS sobre los patrones de *L. pneumophila* se hubiera tenido que llevar a cabo un estudio de intervención, en los mismos períodos de intervención que los del primer objetivo principal de esta tesis. Debido a que no se disponía de criopreservados de tanta antigüedad, se planteó un diseño descriptivo en el que para obtener un volumen mínimo de inóculos se tuvo que abarcar tres años consecutivos. Por tanto, nuestro trabajo no permite demostrar que el hecho de aumentar la temperatura fue la causa de que se seleccionara un determinado patrón genético, ya que no disponemos de la información previa. Sí permite, sin embargo, establecer una asociación entre temperaturas más elevadas y un determinado patrón.

Otra limitación a considerar es que, tal y como se ha especificado en el apartado de material y métodos, entre agosto de 2013 y enero de 2014 se aplicó en ZB un sistema de desinfección en continuo del ACS basado en dióxido de cloro, que se retiró por la dificultad en obtener niveles adecuados del desinfectante en los puntos terminales, entre otros motivos. A la vista de los resultados obtenidos, resulta poco probable que esta intervención tuviera algún efecto sobre los subtipos dominantes ya asilados antes de su puesta en marcha.

Finalmente, otra limitación que presenta nuestro trabajo es que no se han podido tener en cuenta otros factores que también podrían explicar esta desigual distribución, como por ejemplo, los componentes químicos del agua de cada circuito.

5. Implicaciones de los resultados obtenidos

Los resultados de la presente tesis tienen una implicación directa en la reconsideración de cuál es la temperatura óptima del ACS para minimizar la colonización por *Legionella* en las instalaciones hospitalarias. Nuestros resultados permiten afirmar que una temperatura mínima de 55°C es más efectiva que una temperatura por encima de los 50°C, tal y como se acepta en diversas guías técnicas y legislaciones. Esta afirmación, sin embargo, debe matizarse teniendo en cuenta las características de la instalación.

En instalaciones con redes de distribución bien dimensionadas, con retornos adecuados y que se usan frecuentemente a lo largo del día, el mantenimiento de temperaturas $\geq 55^\circ\text{C}$ se puede considerar como un método efectivo de desinfección en continuo, siempre que se garanticen estos niveles mínimos. Para ello, sería imprescindible conocer exactamente el estado hidráulico de la red de distribución, identificar los puntos con deficiencias y corregirlos. **La recomendación formulada genéricamente en diversas guías técnicas referente a que se debe garantizar una mínima temperatura del ACS en puntos terminales podría traducirse, a nuestro parecer, en la elaboración de un mapa de temperaturas de todos los puntos terminales, que debería ser revisado y actualizado periódicamente.**

En instalaciones con retornos deficientes o que tengan bajos consumos que favorezcan el estancamiento y el enfriamiento del ACS, nuestros resultados indican que pueden estar permanentemente colonizados por *Legionella*, a pesar de que se llegue a una buena temperatura en puntos terminales. También hemos constatado que otra de las medidas que frecuentemente aconsejan las guías técnicas, la apertura semanal de grifos de bajo uso, no aporta beneficios en cuanto a la reducción del grado de colonización, puesto que la frecuencia de uso óptima debería ser, como mínimo, diaria. De todo ello se desprende que **se debería llevar a cabo un buen saneamiento de aquellas instalaciones deficientes, eliminando los puntos que no se utilizan y los tramos muertos, y mejorando los retornos. Estas mejoras no sólo tendrían repercusiones en la seguridad biológica del agua sino también en la optimización de los recursos energéticos de la institución.**

Además, al considerar la temperatura como un método en desinfección en continuo de la red, se debería disponer de sistemas de monitorización lo más optimizados posible y adaptados a la detección a tiempo real de variaciones de temperatura. **El manteniendo de temperaturas elevadas del ACS, bien monitorizado, y en instalaciones saneadas, junto con una política de uso de filtros bacterianos en áreas con pacientes de especial riesgo es, a nuestro parecer, un enfoque racional y asequible para la mayoría de hospitales.** Bajo este enfoque, los profesionales de ingeniería de instalaciones, en trabajo conjunto con los profesionales de control de infección, tienen un papel central en la prevención de la legionelosis nosocomial.

La persistencia de determinados clones de *Legionella* en las instalaciones de ACS justificaría la realización de análisis de genotipado de las muestras ambientales, al menos de manera puntual.

Dos ventajas se derivarían de llevar a cabo este tipo de análisis. Por un lado, el conocimiento de la distribución de los patrones genéticos ayudaría a diseñar un mapa de riesgo más exacto las aguas de cada hospital. Por otro lado, la identificación de los mismos, facilitaría confirmar o descartar el origen nosocomial de casos de legionelosis en los que el período de incubación es dudoso. Esta incertidumbre no es infrecuente cuando se trata de pacientes con antecedentes de corticoterapia u otros factores inmunosupresores, por cuanto los primeros síntomas pueden aparecer de manera más tardía o enmascarada que en personas inmunocompetentes.

Otra implicación importante es que, debido a que en un mismo edificio hospitalario puede haber más de una instalación independiente de ACS, el muestreo microbiológico del ACS debería partir de un conocimiento detallado de las instalaciones. Es plausible que en un mismo hospital puedan coexistir formas más o menos patógenas de *L. pneumophila*, con las consecuencias que ello implicaría en la ubicación de los pacientes ingresados.

El hecho de que las temperaturas elevadas puedan seleccionar los clones más termorresistentes no supone, por sí mismo, una implicación de la que se deban derivar necesariamente actuaciones. El predominio de un determinado serogrupo o clon sería un hecho relevante desde el punto de vista clínico cuando tienen capacidad para generar la enfermedad, lo que depende del grado de citopatogenicidad. **En este sentido, nos remitimos una vez más a los tres pilares que conforman la prevención y control de la legionelosis nosocomial en los centros sanitarios: el conocimiento de la situación clínica mediante la investigación activa de *Legionella* en los casos de neumonía nosocomial, el conocimiento del estado microbiológico de las aguas y el conocimiento del diseño y las características de uso de las instalaciones.**

6. Futuras líneas de investigación

Las futuras líneas de investigación planteadas a partir de los resultados encontrados en la presente tesis pretenden profundizar más en el conocimiento de los factores que condicionan la colonización de *Legionella* en instalaciones reales de agua sanitaria.

Un aspecto no abordado en esta tesis y que sí ha sido descrito por otros autores es la relación entre la presencia de partículas físicas de diferentes materiales en el ACS y *Legionella*. En este sentido, una de las acciones de mejora llevadas a cabo en el HUB ha sido reducir la carga de partículas circulantes en la red mediante un sistema de filtración posterior al filtro general de la acometida y diseñado *ad hoc*. La hipótesis de trabajo es que esta intervención reducirá los niveles de *Legionella*, en un principio en las grandes líneas de recirculación y, posiblemente también en puntos terminales.

Por otro lado, uno de los hallazgos no descritos con anterioridad ha sido identificar diferentes genotipos predominantes en sistemas de distribución independientes de un mismo edificio, aunque todos correspondientes a *L. pneumophila* serogrupo 6. Una línea de trabajo derivada de ello es llevar a cabo un mapeo genotípico de las aguas de otros edificios próximos al HUB alimentados con la misma red de distribución de agua, y más concretamente, con la misma tubería principal según datos proporcionados por la empresa suministradora. La comparación de los resultados permitiría conocer mejor los factores asociados a la selección y proliferación de determinados serogrupos y genotipos en instalaciones independientes.

Finalmente, otra línea de interés es ahondar en el conocimiento del agua sanitaria como reservorio de otros patógenos y el papel que desempeñan los protozoos en este ecosistema. Así, el análisis de microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, micobacterias atípicas y FLA, basado en un conocimiento de las características de las instalaciones, permitiría mejorar el riesgo sanitario asociado al agua y, secundariamente, evitar la transmisión de infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria.

Siete

Conclusiones

Best way to clean the air is to have it all out in the open.

Gregory Peck as Atticus Finch

To kill a mockingbird (1962)

PRIMERA

La efectividad de mantener la temperatura del agua caliente sanitaria en puntos terminales como mínimo a 55°C es significativamente superior a la de mantenerla por encima de 50°C, que es dintel indicado en legislaciones o guías técnicas de prevención de legionelosis vigentes en la actualidad para el control ambiental de *Legionella*. Sin embargo, esta efectividad sólo es aplicable cuando las instalaciones cuentan con recirculaciones adecuadas y el dimensionamiento de la red está adaptado al consumo real.

SEGUNDA

A pesar de que las instalaciones tengan recirculaciones y dimensionamiento adecuados, las temperaturas elevadas del agua caliente sanitaria son difíciles de garantizar en todos los puntos terminales de manera homogénea. Los hospitales deberían llevar a cabo una monitorización exhaustiva y dinámica de la temperatura en todos los puntos de consumo de la red para garantizar que el dintel mínimo de temperatura se mantuviera con las mínimas variaciones posibles.

TERCERA

En instalaciones con recirculaciones y dimensionamiento adecuados, la temperatura del agua caliente sanitaria por encima de los 55°C en puntos terminales podría utilizarse como un predictor del grado de colonización por *Legionella*, puesto que por encima de estos niveles es altamente improbable encontrar muestras con elevadas concentraciones del microorganismo.

CUARTA

Las instalaciones de agua caliente sanitaria con recirculaciones y/o dimensionamiento no adecuados están colonizadas permanentemente por *Legionella* y las temperaturas elevadas no logran, por sí solas, reducir la colonización. El muestreo microbiológico regular de puntos terminales en zonas distales de la instalación o de puntos terminales de bajo consumo, tal y como recogen algunas legislaciones o guías técnicas de prevención de legionelosis, no estaría justificado si no va acompañado de acciones de mejora y optimización de la red.

QUINTA

La indicación de abrir semanalmente los grifos y duchas de bajo uso, tal y como recogen algunas legislaciones o guías técnicas de prevención de legionelosis, sería insuficiente para mejorar el control ambiental de *Legionella*, puesto que la frecuencia de uso más óptima sería diaria. Los centros sanitarios

deberían llevar a cabo una revisión exhaustiva de sus necesidades reales de agua caliente sanitaria y eliminar aquellos puntos de uso no estrictamente necesario.

SEXTA

Las instalaciones independientes de agua caliente sanitaria de un mismo edificio están colonizadas por subtipos genéticos de *L. pneumophila* no relacionados entre sí y con un patrón predominante en cada una de ellas. Esto ocurre a pesar de que se alimenten de la misma acometida general que proporciona el agua de la red, que a su vez, está libre de *Legionella*. Es, pues, en la red de distribución del edificio donde se produce la selección los patrones dominantes de *Legionella* y la amplificación del inóculo.

SÉPTIMA

En instalaciones de agua caliente sanitaria que han sido sometidas a temperaturas elevadas en continuo durante largos períodos de tiempo se aíslan subtipos genéticos de *L. pneumophila* adaptados a esas temperaturas. Estos patrones predominan frente a otros que se aíslan en instalaciones con menores temperaturas en continuo.

OCTAVA

A pesar de que el mantenimiento de temperaturas elevadas es una medida efectiva para el control ambiental de *Legionella* en las instalaciones de agua caliente sanitaria, las dificultades técnicas para mantenerlas constantes, las características de la red de distribución y la persistencia de patrones termirresistentes de *Legionella* son limitaciones para su uso como método único de desinfección en continuo. Por ello, los hospitales deberían incorporar métodos adicionales de control, ya sean sistémicos o focales, que garantizaran un mínimo riesgo de legionelosis para los usuarios.

NOVENA

La tipificación molecular de *Legionella* permite caracterizar y mapear con precisión el microorganismo en el hábitat hospitalario. El conocimiento de los patrones genéticos que habitan un edificio sería de gran utilidad en el contexto de la investigación de casos de legionelosis en usuarios que han estado expuestos al agua del hospital. El análisis molecular periódico de las cepas de *Legionella* de una instalación sería una herramienta a considerar en los planes de autocontrol de legionelosis de los centros sanitarios.

Bibliografía

- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D. E., y Guyard, C. (2013). Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), 21660–21675.
- Addiss, D. G., Davis, J. P., LaVenture, M., Wand, P. J., Hutchinson, M. A., y McKinney, R. M. (1989). Community-acquired Legionnaires' disease associated with a cooling tower: evidence for longer-distance transport of *Legionella pneumophila*. *American Journal of Epidemiology*, 130(3), 557–568.
- Akermi, M., Doleans, A., Forey, F., Reyrolle, M., Meugnier, H., Freney, J., ... Jarraud, S. (2006). Characterization of the *Legionella anisa* population structure by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, 258(2), 204–207.
- Alary, M., y Joly, J. R. (1992). Factors contributing to the contamination of hospital water distribution systems by *Legionella*. *The Journal of Infectious Diseases*, 165(3), 565–569.
- Alexandropoulou, I. G., Ntougias, S., Konstantinidis, T. G., Parasidis, T. A., Panopoulou, M., y Constantinidis, T. C. (2015). Environmental surveillance and molecular epidemiology of waterborne pathogen *Legionella pneumophila* in health-care facilities of Northeastern Greece: a 4-year survey. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(10), 7628–7640.
- Allegheny County Health Department. (1997). *Approaches to prevention and control of Legionella infection in Allegheny County health care facilities* (2nd ed.). Pittsburgh: Allegheny County Health Department.
- Allegra, S., Grattard, F., Girardot, F., Riffard, S., Pozzetto, B., y Berthelot, P. (2011). Longitudinal evaluation of the efficacy of heat treatment procedures against *Legionella* spp. in hospital water systems by using a flow cytometric assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1268–1275.
- Allen, J. G., Myatt, T. A., Macintosh, D. L., Ludwig, J. F., Minegishi, T., Stewart, J. H., ... McCarthy, J. F. (2012). Assessing risk of health care-acquired Legionnaires' disease from environmental sampling: the limits of using a strict percent positivity approach. *American Journal of Infection Control*, 40(10), 917–921.
- Amodeo, M. R., Murdoch, D. R., y Pithie, A. D. (2010). Legionnaires' disease caused by *Legionella longbeachae* and *Legionella pneumophila*: comparison of clinical features, host-related risk factors, and outcomes. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(9), 1405–1407.
- Aragon, V., Kurtz, S., Flieger, A., Neumeister, B., y Cianciotto, N. P. (2000). Secreted enzymatic activities of wild-type and pilD-deficient *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, 68(4), 1855–1863.
- Arnow, P. M., Chou, T., Weil, D., Shapiro, E. N., y Kretzschmar, C. (1982). Nosocomial Legionnaires' disease caused by aerosolized tap water from respiratory devices. *The Journal of Infectious Diseases*, 146(4), 460–467.
- Arvand, M., Jungkind, K., y Hack, A. (2011). Contamination of the cold water distribution system of health care facilities by *Legionella pneumophila*: do we know the true dimension? *Euro Surveillance*, 16(16), pii=19844.
- ASHE-APIC. (7 de abril de 2011). *Joint ASHE y APIC Statement on Recently Presented Research on Electronic Faucets*. Recuperado de: http://www.apic.org/Resource_TinyMceFileManager/Practice_Guidance/APIC-ASHE-Statement-electronic-faucets.pdf.
- Assadian, O., El-Madani, N., Seper, E., Mustafa, S., Aspöck, C., Koller, W., y Rotter, M. L. (2002). Sensor-operated faucets: a possible source of nosocomial infection? *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 23(1), 44–46.
- Bargellini, A., Marchesi, I., Righi, E., Ferrari, A., Cencetti, S., Borella, P., y Rovesti, S. (2011). Parameters predictive of *Legionella* contamination in hot water systems: association with trace elements and heterotrophic plate counts. *Water Research*, 45(6), 2315–2321.
- Baron, J. L., Harris, J. K., Holinger, E. P., Duda, S., Stevens, M. J., Robertson, C. E., ... Stout, J. E. (2015). Effect of monochloramine treatment on the microbial ecology of *Legionella* and associated bacterial populations in a hospital hot water system. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(3), 198–205.
- Baron, J. L., Vikram, A., Duda, S., Stout, J. E., y Bibby, K. (2014). Shift in the microbial ecology of a hospital hot water system following the introduction of an on-site monochloramine disinfection system. *PLoS One*, 9(7), e102679.
- Bartlett CLR. (1984). Recurrent Legionnaires' Disease from a Hotel Water System. En *Legionella: Proceedings of the Second International Symposium* (pp. 237–9). Washington, DC: Clyde Thornsberry (ed.).
- Bartram, J. (2007). *Legionella and the prevention of legionellosis*. World Health Organization. Recuperado de: http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf
- Bedard, E., Fey, S., Charron, D., Lalancette, C., Cantin, P., Dolce, P., ... Prevost, M. (2015). Temperature diagnostic to identify high risk areas and optimize *Legionella pneumophila* surveillance in hot water distribution systems. *Water Research*, 71, 244–256.
- Berk, S. G., Ting, R. S., Turner, G. W., y Ashburn, R. J. (1998). Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 279–286.
- Berry, D., Xi, C., y Raskin, L. (2006). Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(3), 297–302.

- Best, M., Yu, V. L., Stout, J., Goetz, A., Muder, R. R., y Taylor, F. (1983). *Legionellaceae* in the hospital water-supply. Epidemiological link with disease and evaluation of a method for control of nosocomial legionnaires' disease and Pittsburgh pneumonia. *Lancet*, 2(8345), 307–310.
- Biurrun, A., Caballero, L., Pelaz, C., Leon, E., y Gago, A. (1999). Treatment of a *Legionella pneumophila*-colonized water distribution system using copper-silver ionization and continuous chlorination. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 20(6), 426–428.
- Blanc, D. S., Carrara, P., Zanetti, G., y Francioli, P. (2005). Water disinfection with ozone, copper and silver ions, and temperature increase to control *Legionella*: seven years of experience in a university teaching hospital. *The Journal of Hospital Infection*, 60(1), 69–72.
- Blatt, S. P., Parkinson, M. D., Pace, E., Hoffman, P., Dolan, D., Lauderdale, P., ... Melcher, G. P. (1993). Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition. *The American Journal of Medicine*, 95(1), 16–22.
- Blyth, C. C., Adams, D. N., y Chen, S. C. A. (2009). Diagnostic and typing methods for investigating *Legionella* infection. *New South Wales Public Health Bulletin*, 20(9-10), 157–161.
- Boccia, S., Laurenti, P., Borella, P., Moscato, U., Capalbo, G., Cambieri, A., ... Ricciardi, G. (2006). Prospective 3-year surveillance for nosocomial and environmental *Legionella pneumophila*: implications for infection control. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 27(5), 459–465.
- Bodro, M., Carratala, J., y Paterson, D. L. (2014). Legionellosis and biologic therapies. *Respiratory Medicine*, 108(8), 1223–1228.
- Borau, J., Czap, R. T., Strellrecht, K. A., y Venezia, R. A. (2000). Long-term control of *Legionella* species in potable water after a nosocomial legionellosis outbreak in an intensive care unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 21(9), 602–603.
- Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M., y Messi, P. (2005). Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnology Annual Review*, 11, 355–380.
- Borella, P., Montagna, M. T., Stampi, S., Stancanelli, G., Romano-Spica, V., Triassi, M., ... Boccia, S. (2005). *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 5805–5813.
- Bou, R., y Ramos, P. (2009). Outbreak of nosocomial Legionnaires' disease caused by a contaminated oxygen humidifier. *The Journal of Hospital Infection*, 71(4), 381–383.
- Brazeau, R. H., y Edwards, M. A. (2013). Role of Hot Water System Design on Factors Influential to Pathogen Regrowth: Temperature, Chlorine Residual, Hydrogen Evolution, and Sediment. *Environmental Engineering Science*, 30(10), 617–627.
- Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., y McDade, J. E. (1979). Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Annals of Internal Medicine*, 90(4), 656–658.
- Bruggemann, H., Cazalet, C., y Buchrieser, C. (2006). Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 9(1), 86–94.
- Brulet, A., Nicolle, M.-C., Giard, M., Nicolini, F.-E., Michallet, M., Jarraud, S., ... Vanhems, P. (2008). Fatal nosocomial *Legionella pneumophila* infection due to exposure to contaminated water from a washbasin in a hematology unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 29(11), 1091–1093.
- Bujak, J. (2010). Heat consumption for preparing domestic hot water in hospitals. *Energy and Buildings*, 42(7), 1047–1055.
- Burdet, C., Lepeule, R., Duval, X., Caseris, M., Rioux, C., Lucet, J.-C., y Yazdanpanah, Y. (2014). Quinolones versus macrolides in the treatment of legionellosis: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(9), 2354–2360.
- Cachafeiro, S. P., Naveira, I. M., y Garcia, I. G. (2007). Is copper-silver ionisation safe and effective in controlling legionella? *The Journal of Hospital Infection*, 67(3), 209–216.
- Campins, M., Ferrer, A., Callis, L., Pelaz, C., Cortes, P. J., Pinart, N., y Vaque, J. (2000). Nosocomial Legionnaire's disease in a children's hospital. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 19(3), 228–234.
- Canals, O., Serrano-Suarez, A., Salvado, H., Mendez, J., Cervero-Arago, S., Ruiz de Porras, V., ... Araujo, R. (2015). Effect of chlorine and temperature on free-living protozoa in operational man-made water systems (cooling towers and hot sanitary water systems) in Catalonia. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(9), 6610–6618.
- Carratala, J., Gudiol, F., Pallares, R., Dorca, J., Verdaguer, R., Ariza, J., y Manresa, F. (1994). Risk factors for nosocomial *Legionella pneumophila* pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 149(3), 625–629.
- Casini B. (2014). *Changes in microbial population in hospital water networks treated by monochloramine and hydrogen peroxide*. Comunicación presentada en el 2 ESGLI Congress, Barcelona.

- Casini, B., Buzzigoli, A., Cristina, M. L., Spagnolo, A. M., Del Giudice, P., Brusaferrò, S., ... Privitera, G. (2014). Long-term effects of hospital water network disinfection on *Legionella* and other waterborne bacteria in an Italian university hospital. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 35(3), 293–299.
- Casini, B., Valentini, P., Baggiani, A., Torracca, F., Frateschi, S., Nelli, L. C., y Privitera, G. (2008). Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates following long-term chlorine dioxide treatment in a university hospital water system. *The Journal of Hospital Infection*, 69(2), 141–147.
- Casini, B., Valentini, P., Baggiani, A., Torracca, F., Lorenzini, C., Frateschi, S., ... Privitera, G. (2008). Comparison of two molecular methods used for subtyping of *Legionella pneumophila* 1 strains isolated from a hospital water supply. *Water Science and Technology*, 58(3), 683–688.
- Cazalet, C., Rusniok, C., Bruggemann, H., Zidane, N., Magnier, A., Ma, L., ... Buchrieser, C. (2004). Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nature Genetics*, 36(11), 1165–1173.
- Centers for Disease and Prevention Control. (2004). Guidelines for Preventing Health-Care--Associated Pneumonia, 2003. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *MMWR*, 53(RR03), 1–36.
- Centers for Disease and Prevention Control and Prevention. (1997). Guidelines for Prevention of Nosocomial Pneumonia. *MMWR*, 46(RR-1), 1–79.
- Centers for Disease Control. (2003). Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR*, 52(RR10), 1–42.
- Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. (2012). *Brotos de legionelosis notificados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Años 1999 a 2011*. Recuperado de http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/Legionelosis_brotos_1999-2011.pdf
- Centro Nacional de Epidemiología. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. (2013). *Protocolos de las enfermedades de declaración obligatoria*. Recuperado de http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/PROTOCOLOS_RENAVE.pdf
- Cervero-Arago, S., Rodríguez-Martínez, S., Canals, O., Salvado, H., y Araujo, R. M. (2014). Effect of thermal treatment on free-living amoeba inactivation. *Journal of Applied Microbiology*, 116(3), 728–736.
- Cervero-Arago, S., Rodríguez-Martínez, S., Puertas-Bennasar, A., y Araujo, R. M. (2015). Effect of Common Drinking Water Disinfectants, Chlorine and Heat, on Free *Legionella* and *Amoebae*-Associated *Legionella*. *PLoS One*, 10(8), e0134726.
- Cervero-Arago, S., Sommer, R., y Araujo, R. M. (2014). Effect of UV irradiation (253.7 nm) on free *Legionella* and *Legionella* associated with its amoebae hosts. *Water Research*, 67, 299–309.
- Cervia, J. S., Ortolano, G. A., y Canonica, F. P. (2008). Hospital tap water as a source of *Stenotrophomonas maltophilia* infection. *Clinical Infectious Diseases*, 46(9), 1485–1487.
- Chaberny, I. F., y Gastmeier, P. (2004). Should electronic faucets be recommended in hospitals? *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 25(11).
- Characklis W.G. (1990). Biofilm processes. En *Biofilms*. Characklis, W.G., and Marshall, K.C. eds (pp. 195–231). New York: John Wiley and Sons.
- Chidiac, C., Che, D., Pires-Cronenberger, S., Jarraud, S., Campese, C., Bissery, A., ... Vanhems, P. (2012). Factors associated with hospital mortality in community-acquired legionellosis in France. *The European Respiratory Journal*, 39(4), 963–970.
- Chow, J. W., y Yu, V. L. (1998). *Legionella*: a major opportunistic pathogen in transplant recipients. *Seminars in Respiratory Infections*, 13(2), 132–139.
- Cianciotto, N. P. (2001). Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(5), 331–343.
- Ciesielski, C. A., Blaser, M. J., y Wang, W. L. (1984). Role of stagnation and obstruction of water flow in isolation of *Legionella pneumophila* from hospital plumbing. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(5), 984–987.
- Colbourne, J. S., y Ashworth, J. (1986). Rubbers, water, and *Legionella*. *Lancet*, 2(8506), 583.
- Colville, A., Crowley, J., Dearden, D., Slack, R. C., y Lee, J. V. (1993). Outbreak of Legionnaires' disease at University Hospital, Nottingham. *Epidemiology, microbiology and control*. *Epidemiology and Infection*, 110(1), 105–116.
- Coniglio MA. (2014). *Monochloramine for the control of Legionella contamination of domestic hot water systems of health-care facilities. A six months experience from Sicily (Italy)*. Comunicación presentada en el 2 ESGLI Congress, Barcelona.
- Cooper, I. R., y Hanlon, G. W. (2010). Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. *The Journal of Hospital Infection*, 74(2), 152–159.

- Coscolla, M., Fenollar, J., Escribano, I., y Gonzalez-Candelas, F. (2010). Legionellosis outbreak associated with asphalt paving machine, Spain, 2009. *Emerging Infectious Diseases*, 16(9), 1381–1387.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., y James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*, 176(8), 2137–2142.
- Cristina, M. L., Spagnolo, A. M., Casini, B., Baggiani, A., Del Giudice, P., Brusaferrero, S., ... Orlando, P. (2014). The impact of aerators on water contamination by emerging gram-negative opportunists in at-risk hospital departments. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 35(2), 122–129.
- Darelid, J., Lofgren, S., y Malmvall, B.-E. (2002). Control of nosocomial Legionnaires' disease by keeping the circulating hot water temperature above 55 degrees C: experience from a 10-year surveillance programme in a district general hospital. *The Journal of Hospital Infection*, 50(3), 213–219.
- Davey, M. E., y O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847–867.
- Decker, B. K., y Palmore, T. N. (2013). The role of water in healthcare-associated infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 26(4), 345–351.
- Declerck, P. (2010). Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology*, 12(3), 557–566.
- Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V., y Ollevier, F. (2007). Replication of *Legionella pneumophila* in floating biofilms. *Current Microbiology*, 55(5), 435–440.
- Decret 352/2004, de 27 de juliol, pel qual s'estableixen les condicions higienicosanitàries per a la prevenció i el control de la legionel·losi.
- Dennis, P. J., Green, D., y Jones, B. P. (1984). A note on the temperature tolerance of *Legionella*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 56(2), 349–350.
- De Olalla, P. G., Gracia, J., Rius, C., Cayla, J. A., Panella, H., Villalbi, J. R., ... Sabria, M. (2008). [Community outbreak of pneumonia due to *Legionella pneumophila*: importance of monitoring hospital cooling towers]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 26(1), 15-22.
- De Ory, F., y Minguito, T. (2009). [Comparison of five commercial assays for the detection of *Legionella pneumophila* antigens in urine]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 27(2), 81–84.
- Diederer, B. M. W., de Jong, C. M. A., Marmouk, F., Kluytmans, J. A. J. W., Peeters, M. F., y Van der Zee, A. (2007). Evaluation of real-time PCR for the early detection of *Legionella pneumophila* DNA in serum samples. *Journal of Medical Microbiology*, 56(Pt 1), 94-101.
- Ditommaso, S., Giacomuzzi, M., Gentile, M., Moiraghi, A. R., y Zotti, C. M. (2010). Effective environmental sampling strategies for monitoring *Legionella* spp contamination in hot water systems. *American Journal of Infection Control*, 38(5), 344–349.
- Ditommaso, S., Giacomuzzi, M., Rivera, S. R. A., Raso, R., Ferrero, P., y Zotti, C. M. (2014). Virulence of *Legionella pneumophila* strains isolated from hospital water system and healthcare-associated Legionnaires' disease in Northern Italy between 2004 and 2009. *BMC Infectious Diseases*, 14, 483.
- Donlan, R. M., y Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193.
- Dziewulski, D. M., Ingles, E., Codru, N., Strepelis, J., y Schoonmaker-Bopp, D. (2015). Use of copper-silver ionization for the control of legionellae in alkaline environments at health care facilities. *American Journal of Infection Control*, 43(9), 971–976.
- Edwards M, y Dudi A. (2004). Role of Chlorine and Chloramines in Corrosion of Lead-Bearing Plumbing Materials. *J Am Water Works Assoc*, 96, 69–81.
- Edwards M, Jacob S, y Taylor RJ. (2000). The Blue Water Phenomenon. *J Am Water Works Assoc*, 92, 72–82.
- European Agency for Safety and Health at Work. (2011). *EU-OSHA report: Legionella and legionnaires' disease: a policy overview*. Recuperado de https://osha.europa.eu/en/publications/literature_reviews/legionella-policy-overview.pdf/view.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2012). *European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet): Operating procedures*. Stockholm: ECDC. Recuperado de <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1202-TED-ELDSNet-operating-procedures.pdf>.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2014). *Legionnaire's disease surveillance in Europe, 2012*. Stockholm: ECDC. Recuperado de <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/legionnaires-disease-surveillance-2012.pdf>.
- Euser, S. M., Pelgrim, M., y den Boer, J. W. (2010). Legionnaires' disease and Pontiac fever after using a private outdoor whirlpool spa. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 42(11-12), 910–916.
- Euzéby JP. (2013). *List of Prokaryotic names with standing in nomenclature - Genus Legionella*. Recuperado de <http://www.bacterio.net>.
- Farhat, M., Trouilhe, M.-C., Briand, E., Moletta-Denat, M., Robine, E., y Frere, J. (2010). Development of a pilot-scale 1 for *Legionella* elimination in biofilm in hot water network: heat shock treatment evaluation. *Journal of Applied Microbiology*, 108(3), 1073–1082.

- Feeley, J. C., Gibson, R. J., Gorman, G. W., Langford, N. C., Rasheed, J. K., Mackel, D. C., y Baine, W. B. (1979). Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*, 10(4), 437–441.
- Fields, B. S., Benson, R. F., y Besser, R. E. (2002). *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 506–526.
- File, T. M. J., Segreti, J., Dunbar, L., Player, R., Kohler, R., Williams, R. R., ... Rubin, A. (1997). A multicenter, randomized study comparing the efficacy and safety of intravenous and/or oral levofloxacin versus ceftriaxone and/or cefuroxime axetil in treatment of adults with community-acquired pneumonia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(9), 1965–1972.
- Flanders, W. D., Kirkland, K. H., y Shelton, B. G. (2014). Effects of holding time and measurement error on culturing *Legionella* in environmental water samples. *Water Research*, 62, 293-301.
- Flannery, B., Gelling, L. B., Vugia, D. J., Weintraub, J. M., Salerno, J. J., Conroy, M. J., ... Besser, R. E. (2006). Reducing *Legionella* colonization in water systems with monochloramine. *Emerging Infectious Diseases*, 12(4), 588–596.
- Fliermans, C. B., Cherry, W. B., Orrison, L. H., Smith, S. J., Tison, D. L., y Pope, D. H. (1981). Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(1), 9–16.
- Franzin, L., Cabodi, D., y Fantino, C. (2002). Evaluation of the efficacy of ultraviolet irradiation for disinfection of hospital water contaminated by *Legionella*. *The Journal of Hospital Infection*, 51(4), 269.
- Fritschel, E., Sanyal, K., Threadgill, H., y Cervantes, D. (2015). Fatal Legionellosis after Water Birth, Texas, USA, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 21(1), 130.
- Fry, N. K., Alexiou-Daniel, S., Bangsberg, J. M., Bernander, S., Castellani Pastoris, M., Etienne, J., ... Harrison, T. G. (1999). A multicenter evaluation of genotypic methods for the epidemiologic typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: results of a pan-European study. *Clinical Microbiology and Infection*, 5(8), 462-477.
- Gaia, V., Fry, N. K., Afshar, B., Luck, P. C., Meugnier, H., Etienne, J., ... Harrison, T. G. (2005). Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2047-2052.
- Garcia, M. T., Baladron, B., Gil, V., Tarancon, M. L., Vilasau, A., Ibanez, A., ... Pelaz, C. (2008). Persistence of chlorine-sensitive *Legionella pneumophila* in hyperchlorinated installations. *Journal of Applied Microbiology*, 105(3), 837–847.
- Garcia-Nunez, M., Pedro-Botet, M. L., Ragull, S., Sopena, N., Morera, J., Rey-Joly, C., y Sabria, M. (2009). Cytopathogenicity and molecular subtyping of *Legionella pneumophila* environmental isolates from 17 hospitals. *Epidemiology and Infection*, 137(2), 188–193.
- Garcia-Nunez, M., Quero, S., Catini, S., Pedro-Botet, M. L., Mateu, L., Sopena, N., y Sabria, M. (2013). Comparative molecular and antibody typing during the investigation of an outbreak of Legionnaires' disease. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 19(5), 896-901.
- Garcia-Nunez, M., Sopena, N., Ragull, S., Pedro-Botet, M. L., Morera, J., y Sabria, M. (2008). Persistence of *Legionella* in hospital water supplies and nosocomial Legionnaires' disease. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52(2), 202–206.
- Glick, T. H., Gregg, M. B., Berman, B., Mallison, G., Rhodes, W. W. J., y Kassanoff, I. (1978). Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *American Journal of Epidemiology*, 107(2), 149–160.
- Goetz, A. M., Stout, J. E., Jacobs, S. L., Fisher, M. A., Ponzer, R. E., Drenning, S., y Yu, V. L. (1998). Nosocomial legionnaires' disease discovered in community hospitals following cultures of the water system: seek and ye shall find. *American Journal of Infection Control*, 26(1), 8-11.
- Graman, P. S., Quinlan, G. A., y Rank, J. A. (1997). Nosocomial legionellosis traced to a contaminated ice machine. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 18(9), 637–640.
- Greenberg, D., Chiou, C. C., Famigilletti, R., Lee, T. C., y Yu, V. L. (2006). Problem pathogens: paediatric legionellosis—implications for improved diagnosis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 6(8), 529–535.
- Grist, N. R., Reid, D., y Najera, R. (1979). Legionnaires' disease and the traveller. *Annals of Internal Medicine*, 90(4), 563–564.
- Gudiol, C., Garcia-Vidal, C., Fernandez-Sabe, N., Verdaguer, R., Llado, L., Roca, J., ... Carratala, J. (2009). Clinical features and outcomes of Legionnaires' disease in solid organ transplant recipients. *Transplant Infectious Disease*, 11(1), 78-82.
- Gudiol, C., Verdaguer, R., Angeles Dominguez, M., Fernandez-Sevilla, A., y Carratala, J. (2007). Outbreak of Legionnaires' disease in immunosuppressed patients at a cancer centre: usefulness of universal urine antigen testing and early levofloxacin therapy. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(11), 1125–1128.
- Halabi, M., Wiesholzer-Pittl, M., Schoberl, J., y Mittermayer, H. (2001). Non-touch fittings in hospitals: a possible source of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella* spp. *The Journal of Hospital Infection*, 49(2), 117–121.

- Hall, K. K., Giannetta, E. T., Getchell-White, S. I., Durbin, L. J., y Farr, B. M. (2003). Ultraviolet light disinfection of hospital water for preventing nosocomial Legionella infection: a 13-year follow-up. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 24(8), 580–583.
- Hargreaves, J., Shireley, L., Hansen, S., Bren, V., Fillipi, G., Lacher, C., ... Watne, T. (2001). Bacterial contamination associated with electronic faucets: a new risk for healthcare facilities. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 22(4), 202–205.
- Harper, D. (1988). Legionnaires' disease outbreaks—the engineering implications. *The Journal of Hospital Infection*, 11 Suppl A, 201–208.
- Haupt, T. E., Heffernan, R. T., Kazmierczak, J. J., Nehls-Lowe, H., Rheineck, B., Powell, C., ... Davis, J. P. (2012). An outbreak of Legionnaires disease associated with a decorative water wall fountain in a hospital. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 33(2), 185–191.
- Health and Safety Executive. (2013). *Legionnaire's disease. The control of legionella bacteria in water systems. Approved code of practice and guidance of regulations*. L8 (Fourth edition). Recuperado de http://www.hseni.gov.uk/l8_legionnaires__disease_the_control_of_legionella_bacteria_in_water_systems.pdf
- Heffelfinger, J. D., Kool, J. L., Fridkin, S., Fraser, V. J., Hageman, J., Carpenter, J., y Whitney, C. G. (2003). Risk of hospital-acquired legionnaires' disease in cities using monochloramine versus other water disinfectants. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 24(8), 569–574.
- Helbig, J. H., Bernander, S., Castellani Pastoris, M., Etienne, J., Gaia, V., Lauwers, S., ... Harrison, T. G. (2002). Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *European Journal of Clinical Microbiology y Infectious Diseases*, 21(10), 710–716.
- Helbig, J. H., Kurtz, J. B., Pastoris, M. C., Pelaz, C., y Luck, P. C. (1997). Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2841–2845.
- Helbig, J. H., Uldum, S. A., Bernander, S., Luck, P. C., Wewalka, G., Abraham, B., ... Harrison, T. G. (2003). Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial legionnaires' disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), 838–840.
- Helms, C. M., Massanari, R. M., Wenzel, R. P., Pfaller, M. A., Moyer, N. P., y Hall, N. (1988). Legionnaires' disease associated with a hospital water system. A five-year progress report on continuous hyperchlorination. *JAMA*, 259(16), 2423–2427.
- Helms, C. M., Viner, J. P., Weisenburger, D. D., Chiu, L. C., Renner, E. D., y Johnson, W. (1984). Sporadic Legionnaires' disease: clinical observations on 87 nosocomial and community-acquired cases. *The American Journal of the Medical Sciences*, 288(1), 2-12.
- Hindre, T., Bruggemann, H., Buchrieser, C., y Hechard, Y. (2008). Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology*, 154(Pt 1), 30-41.
- Hruba, L. (2009). The colonization of hot water systems by *Legionella*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 16(1), 115–119.
- Huang, W.-K., y Lin, Y. E. (2007). A controlled study of *Legionella* concentrations in water from faucets with aerators or laminar water flow devices. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 28(6), 765–766.
- Hume RD, y Hann WD. (1984). Growth relationships of *Legionella pneumophila* with green algae *Chlorophyta*. En *Legionella: proceedings of the 2nd international symposium* (pp. 323–324). Washington DC: ASM Press.
- Iatta, R., Cuna, T., Napoli, C., De Giglio, O., y Montagna, M. T. (2013). Environmental surveillance and molecular investigation of *Legionella* spp. in Apulia, in the years 2008-2011. *Annali Di Igiene : Medicina Preventiva E Di Comunita*, 25(5), 435–441.
- ISO 11731:1998. (n.d.). ISO Standard: Water quality - detection and enumeration of *Legionella*. International Organization for Standardization.
- Jacobson, K. L., Miceli, M. H., Tarrand, J. J., y Kontoyiannis, D. P. (2008). *Legionella* pneumonia in cancer patients. *Medicine*, 87(3), 152–159.
- Jespersen, S., Sogaard, O. S., Schonheyder, H. C., Fine, M. J., y Ostergaard, L. (2010). Clinical features and predictors of mortality in admitted patients with community- and hospital-acquired legionellosis: a Danish historical cohort study. *BMC Infectious Diseases*, 10, 124.
- Johansson, P. J. H., Andersson, K., Wiebe, T., Schalen, C., y Bernander, S. (2006). Nosocomial transmission of *Legionella pneumophila* to a child from a hospital's cold-water supply. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 38(11-12), 1023–1027.
- Johnson, J. T., Yu, V. L., Best, M. G., Vickers, R. M., Goetz, A., Wagner, R., ... Woo, A. (1985). Nosocomial legionellosis in surgical patients with head-and-neck cancer: implications for epidemiological reservoir and mode of transmission. *Lancet*, 2(8450), 298-300.

- Kaufmann, A. F., McDade, J. E., Patton, C. M., Bennett, J. V., Skaliy, P., Feeley, J. C., ... Brachman, P. S. (1981). Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. *American Journal of Epidemiology*, 114(3), 337–347.
- Kilvington, S., y Price, J. (1990). Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *The Journal of Applied Bacteriology*, 68(5), 519–525.
- Kool, J. L., Bergmire-Sweat, D., Butler, J. C., Brown, E. W., Peabody, D. J., Massi, D. S., ... Fields, B. S. (1999). Hospital characteristics associated with colonization of water systems by *Legionella* and risk of nosocomial legionnaires' disease: a cohort study of 15 hospitals. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 20(12), 798-805.
- Kool, J. L., Fiore, A. E., Kioski, C. M., Brown, E. W., Benson, R. F., Pruckler, J. M., ... Breiman, R. F. (1998). More than 10 years of unrecognized nosocomial transmission of legionnaires' disease among transplant patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 19(12), 898-904.
- Kusnetsov, J., Torvinen, E., Perola, O., Nousiainen, T., y Katila, M.-L. (2003). Colonization of hospital water systems by legionellae, mycobacteria and other heterotrophic bacteria potentially hazardous to risk group patients. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 111(5), 546–556.
- Lanser, J. A., Adams, M., Doyle, R., Sangster, N., y Steele, T. W. (1990). Genetic relatedness of *Legionella longbeachae* isolates from human and environmental sources in Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9), 2784–2790.
- Lanternier, F., Tubach, F., Ravaud, P., Salmon, D., Dellamonica, P., Bretagne, S., ... Lortholary, O. (2013). Incidence and risk factors of *Legionella pneumophila* pneumonia during anti-tumor necrosis factor therapy: a prospective French study. *Chest*, 144(3), 990–998.
- Lautenschlager, K., Boon, N., Wang, Y., Egli, T., y Hammes, F. (2010). Overnight stagnation of drinking water in household taps induces microbial growth and changes in community composition. *Water Research*, 44(17), 4868–4877.
- Leoni, E., De Luca, G., Legnani, P. P., Sacchetti, R., Stampi, S., y Zanetti, F. (2005). *Legionella* waterline colonization: detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems. *Journal of Applied Microbiology*, 98(2), 373–379.
- Lepine, L. A., Jernigan, D. B., Butler, J. C., Pruckler, J. M., Benson, R. F., Kim, G., ... Fields, B. S. (1998). A recurrent outbreak of nosocomial legionnaires' disease detected by urinary antigen testing: evidence for long-term colonization of a hospital plumbing system. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 19(12), 905–910.
- Levi, K., Smedley, J., y Towner, K. J. (2003). Evaluation of a real-time PCR hybridization assay for rapid detection of *Legionella pneumophila* in hospital and environmental water samples. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(7), 754–758.
- Levin, A. S., Gobara, S., Scarpitta, C. M., Warschauer, C. L., Sinto, S. I., Rodrigues, E., ... Boulos, M. (1995). Electric showers as a control measure for *Legionella* spp. in a renal transplant unit in Sao Paulo, Brazil. Legionellosis Study Team. *The Journal of Hospital Infection*, 30(2), 133–137.
- Levy, M. L., Le Jeune, I., Woodhead, M. A., Macfarlaned, J. T., y Lim, W. S. (2010). Primary care summary of the British Thoracic Society Guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: 2009 update. Endorsed by the Royal College of General Practitioners and the Primary Care Respiratory Society UK. *Primary Care Respiratory Journal*, 19(1), 21–27.
- Levy, P.-Y., Teyssere, N., Etienne, J., y Raoult, D. (2003). A nosocomial outbreak of *Legionella pneumophila* caused by contaminated transesophageal echocardiography probes. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 24(8), 619–622.
- Lindsay, D. S. J., Abraham, W. H., Findlay, W., Christie, P., Johnston, F., y Edwards, G. F. S. (2004). Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. *Journal of Medical Microbiology*, 53(Pt 3), 183–187.
- Lindsay, D. S. J., Brown, A. W., Brown, D. J., Pravinkumar, S. J., Anderson, E., y Edwards, G. F. S. (2012). *Legionella longbeachae* serogroup 1 infections linked to potting compost. *Journal of Medical Microbiology*, 61(Pt 2), 218–222.
- Lindsay, D., y von Holy, A. (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *The Journal of Hospital Infection*, 64(4), 313–325.
- Lin, Y. E., Stout, J. E., y Yu, V. L. (2011). Controlling *Legionella* in hospital drinking water: an evidence-based review of disinfection methods. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 32(2), 166–173.
- Lin, Y. E., y Vidic, R. D. (2006). Possible phosphate interference with copper-silver ionization for *Legionella* control. *The Journal of Hospital Infection*, 62(1), 119.
- Lipphaus, P., Hammes, F., Kotzsch, S., Green, J., Gillespie, S., y Nocker, A. (2014). Microbiological tap water profile of a medium-sized building and effect of water stagnation. *Environmental Technology*, 35(5-8), 620–628.

- Liu, W. K., Healing, D. E., Yeomans, J. T., y Elliott, T. S. (1993). Monitoring of hospital water supplies for *Legionella*. *The Journal of Hospital Infection*, 24(1), 1-9.
- Liu, Z., Lin, Y. E., Stout, J. E., Hwang, C. C., Vidic, R. D., y Yu, V. L. (2006). Effect of flow regimes on the presence of *Legionella* within the biofilm of a model plumbing system. *Journal of Applied Microbiology*, 101(2), 437–442.
- Liu, Z., Stout, J. E., Tedesco, L., Boldin, M., Hwang, C., Diven, W. F., y Yu, V. L. (1994). Controlled evaluation of copper-silver ionization in eradicating *Legionella pneumophila* from a hospital water distribution system. *The Journal of Infectious Diseases*, 169(4), 919–922.
- Loveday, H. P., Wilson, J. A., Kerr, K., Pitchers, R., Walker, J. T., y Browne, J. (2014). Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: a rapid systematic review. *The Journal of Hospital Infection*, 86(1): 7-15.
- Lowry, P. W., Blankenship, R. J., Gridley, W., Troup, N. J., y Tompkins, L. S. (1991). A cluster of *Legionella* sternal-wound infections due to postoperative topical exposure to contaminated tap water. *The New England Journal of Medicine*, 324(2), 109–113.
- Luck, P. C., Dinger, E., Helbig, J. H., Thurm, V., Keuchel, H., Presch, C., y Ott, M. (1994). Analysis of *Legionella pneumophila* strains associated with nosocomial pneumonia in a neonatal intensive care unit. *European Journal of Clinical Microbiology y Infectious Diseases*, 13(7), 565–571.
- Luck, P. C., Hahn, F., Senger, M., Boers, S. A., y Brandsema, P. (2008). European network cooperation to identify hotel as source for pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 2. *Euro Surveillance*, 13(24), pii:18903.
- Luck, P. C., Helbig, J. H., Hagedorn, H. J., y Ehret, W. (1995). DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis to investigate a nosocomial pneumonia caused by *Legionella bozemanii* serogroup 1. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2759–2761.
- Luck, P. C., Kohler, J., Maiwald, M., y Helbig, J. H. (1995). DNA polymorphisms in strains of *Legionella pneumophila* serogroups 3 and 4 detected by macrorestriction analysis and their use for epidemiological investigation of nosocomial legionellosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 2000–2003.
- Mampel, J., Spirig, T., Weber, S. S., Haagenen, J. A. J., Molin, S., y Hilbi, H. (2006). Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2885–2895.
- Mancini, B., Scurti, M., Dormi, A., Grottola, A., Zanotti, A., y Cristino, S. (2015). Effect of Monochloramine Treatment on Colonization of a Hospital Water Distribution System by *Legionella* spp.: A 1 Year Experience Study. *Environmental Science y Technology*, 49(7), 4551–4558.
- Mandell, L. A., Wunderink, R. G., Anzueto, A., Bartlett, J. G., Campbell, G. D., Dean, N. C., ... Whitney, C. G. (2007). Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clinical Infectious Diseases*, 44 Suppl 2.
- Marchesi, I., Cencetti, S., Marchegiano, P., Frezza, G., Borella, P., y Bargellini, A. (2012). Control of *Legionella* contamination in a hospital water distribution system by monochloramine. *American Journal of Infection Control*, 40(3), 279–281.
- Marchesi, I., Marchegiano, P., Bargellini, A., Cencetti, S., Frezza, G., Miselli, M., y Borella, P. (2011). Effectiveness of different methods to control *Legionella* in the water supply: ten-year experience in an Italian university hospital. *The Journal of Hospital Infection*, 77(1), 47-51.
- Marrie, T., Green, P., Burbridge, S., Bezanson, G., Neale, S., Hoffman, P. S., y Haldane, D. (1994). *Legionellaceae* in the potable water of Nova Scotia hospitals and Halifax residences. *Epidemiology and Infection*, 112(1), 143–150.
- Marrie, T. J., Haldane, D., MacDonald, S., Clarke, K., Fanning, C., Le Fort-Jost, S., ... Joly, J. (1991). Control of endemic nosocomial legionnaires' disease by using sterile potable water for high risk patients. *Epidemiology and Infection*, 107(3), 591-605.
- Mashiba, K., Hamamoto, T., y Torikai, K. (1993). [A case of Legionnaires' disease due to aspiration of hot spring water and isolation of *Legionella pneumophila* from hot spring water]. *Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, 67(2), 163–166.
- Mastro, T. D., Fields, B. S., Breiman, R. F., Campbell, J., Plikaytis, B. D., y Spika, J. S. (1991). Nosocomial Legionnaires' disease and use of medication nebulizers. *The Journal of Infectious Diseases*, 163(3), 667–671.
- Mathys, W., Deng, M. C., Meyer, J., y Junge-Mathys, E. (1999). Fatal nosocomial Legionnaires' disease after heart transplantation: clinical course, epidemiology and prevention strategies for the highly immunocompromized host. *The Journal of Hospital Infection*, 43(3), 242–246.
- Matsui, M., Fujii, S., Shirowa, R., Amemura-Maekawa, J., Chang, B., Kura, F., y Yamauchi, K. (2010). Isolation of *Legionella rubrilucens* from a pneumonia patient co-infected with *Legionella pneumophila*. *Journal of Medical Microbiology*, 59(Pt 10), 1242–1246.

- Matulonis, U., Rosenfeld, C. S., y Shadduck, R. K. (1993). Prevention of *Legionella* infections in a bone marrow transplant unit: multifaceted approach to decontamination of a water system. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 14(10), 571–575.
- Mavridou, A., Smeti, E., Mandilara, G., Pappa, O., Plakadonaki, S., Grispou, E., y Polemis, M. (2008). Prevalence study of *Legionella* spp. contamination in Greek hospitals. *International Journal of Environmental Health Research*, 18(4), 295–304.
- McCoy, W. F., Downes, E. L., Leonidas, L. F., Cain, M. F., Sherman, D. L., Chen, K., ... Neville, M. J. (2012). Inaccuracy in *Legionella* tests of building water systems due to sample holding time. *Water Research*, 46(11), 3497–3506.
- McDade JE. (2002). Legionnaires' disease 25 years later: lessons learned. En Marre R, Kwaik YA, Bartlett C, Cianciotto N, Fields BS, Frosh M, Hacker J, Lück PC, *Legionella* (pp. 1–10). Washington DC: ASM Press.
- Mentasti, M., Fry, N. K., Afshar, B., Paleou-Foxley, C., Naik, F. C., y Harrison, T. G. (2012). Application of *Legionella pneumophila*-specific quantitative real-time PCR combined with direct amplification and sequence-based typing in the diagnosis and epidemiological investigation of Legionnaires' disease. *European Journal of Clinical Microbiology y Infectious Diseases*, 31(8), 2017–2028.
- Mercante, J. W., y Winchell, J. M. (2015). Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 95–133.
- Mermel, L. A., Josephson, S. L., Giorgio, C. H., Dempsey, J., y Parenteau, S. (1995). Association of Legionnaires' disease with construction: contamination of potable water? *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 16(2), 76–81.
- Merrer, J., Girou, E., Ducellier, D., Clavreul, N., Cizeau, F., Legrand, P., y Leneveu, M. (2005). Should electronic faucets be used in intensive care and hematology units? *Intensive Care Medicine*, 31(12), 1715–1718.
- Mietzner S, Schaeffer AJ, Yassin MH, Wagener MM, y Stout J. (2013). Testing for *Legionella* in healthcare Facilities: Evaluation of the Reproducibility of *Legionella* Test Results and the Impact of Time on Viability and Variability. *Am J Infect Control*, (41), S69.
- Mietzner, S., Schwillie, R. C., Farley, A., Wald, E. R., Ge, J. H., States, S. J., ... Wadowsky, R. M. (1997). Efficacy of thermal treatment and copper-silver ionization for controlling *Legionella pneumophila* in high-volume hot water plumbing systems in hospitals. *American Journal of Infection Control*, 25(6), 452–457.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. (2007). *Guía técnica para la prevención y control de la legionelosis en instalaciones*. Recuperado de <http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/agenBiologicos/guia.htm>
- Misch, E. A., Verbon, A., Prins, J. M., Skerrett, S. J., y Hawn, T. R. (2013). A TLR6 polymorphism is associated with increased risk of Legionnaires' disease. *Genes and Immunity*, 14(7), 420–426.
- Modol JM, Garcia-Nuñez, M, Pedro-Botet ML, Mateu L, Sanchez I, Sagristà A, ... Sabrià M. (September). *Impact of heat flushing treatments and hyperchlorination on water contamination by Legionella and amoeba in a university hospital*. Comunicación presentada en el 2 ESGLI Congress, Barcelona.
- Modol, J., Sabria, M., Reynaga, E., Pedro-Botet, M. L., Sopena, N., Tudela, P., ... Rey-Joly, C. (2007). Hospital-acquired legionnaires disease in a university hospital: impact of the copper-silver ionization system. *Clinical Infectious Diseases*, 44(2), 263–265.
- Molmeret, M., y Abu Kwaik, Y. (2002). How does *Legionella pneumophila* exit the host cell? *Trends in Microbiology*, 10(6), 258–260.
- Moore, M. R., Pryor, M., Fields, B., Lucas, C., Phelan, M., y Besser, R. E. (2006). Introduction of monochloramine into a municipal water system: impact on colonization of buildings by *Legionella* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 378–383.
- Moritz, M. M., Flemming, H.-C., y Wingender, J. (2010). Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213(3), 190–197.
- Murga, R., Forster, T. S., Brown, E., Pruckler, J. M., Fields, B. S., y Donlan, R. M. (2001). Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology*, 147(Pt 11), 3121–3126.
- Mykietiuik, A., Carratala, J., Fernandez-Sabe, N., Dorca, J., Verdaguer, R., Manresa, F., y Gudiol, F. (2005). Clinical outcomes for hospitalized patients with *Legionella* pneumonia in the antigenuria era: the influence of levofloxacin therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 40(6), 794–799.
- Napoli, C., Fasano, F., Iatta, R., Barbuti, G., Cuna, T., y Montagna, M. T. (2010). *Legionella* spp. and legionellosis in southeastern Italy: disease epidemiology and environmental surveillance in community and health care facilities. *BMC Public Health*, 10, 660.
- Napoli, C., Iatta, R., Fasano, F., Marsico, T., y Montagna, M. T. (2009). Variable bacterial load of *Legionella* spp. in a hospital water system. *The Science of the Total Environment*, 408(2), 242–244.

- Nguyen, T. M. N., Ilf, D., Jarraud, S., Rouil, L., Campese, C., Che, D., ... Desenclos, J.-C. (2006). A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers--how far can contaminated aerosols spread? *The Journal of Infectious Diseases*, 193(1), 102–111.
- Oberdorfer, K., Mussigbrodt, G., y Wendt, C. (2008). Genetic diversity of *Legionella pneumophila* in hospital water systems. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211(1-2), 172–178.
- Ohl, L., Horn, H., y Hempel, D. (2004). Behaviour of biofilm systems under varying hydrodynamic conditions. *Water Science y Technology*, 49(11-12), 345–351.
- O'Neill, E., y Humphreys, H. (2005). Surveillance of hospital water and primary prevention of nosocomial legionellosis: what is the evidence? *The Journal of Hospital Infection*, 59(4), 273–279.
- Ortiz-Roque, C. M., y Hazen, T. C. (1987). Abundance and distribution of *Legionellaceae* in Puerto Rican waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(9), 2231–2236.
- Osterholm, M. T., Chin, T. D., Osborne, D. O., Dull, H. B., Dean, A. G., Fraser, D. W., ... Hall, W. N. (1983). A 1957 outbreak of Legionnaires' disease associated with a meat packing plant. *American Journal of Epidemiology*, 117(1), 60–67.
- Ott, M., Bender, L., Marre, R., y Hacker, J. (1991). Pulsed field electrophoresis of genomic restriction fragments for the detection of nosocomial *Legionella pneumophila* in hospital water supplies. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(4), 813–815.
- Ott, M., Messner, P., Heesemann, J., Marre, R., y Hacker, J. (1991). Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*. *Journal of General Microbiology*, 137(8), 1955–1961.
- Palmore, T. N., Stock, F., White, M., Bordner, M., Michelin, A., Bennett, J. E., ... Henderson, D. K. (2009). A cluster of cases of nosocomial legionnaires disease linked to a contaminated hospital decorative water fountain. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 30(8), 764–768.
- Pancer, K., Matuszewska, R., Bartosik, M., Kacperski, K., y Krogulska, B. (2013). Persistent colonization of 2 hospital water supplies by *L. pneumophila* strains through 7 years--sequence-based typing and serotyping as useful tools for a complex risk analysis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20(4), 687–694.
- Parr, A., Whitney, E. A., y Berkelman, R. L. (2014). Legionellosis on the rise: a review of guidelines for prevention in the United States. *Infection*, 21, 24–26.
- Patterson, W. J., Seal, D. V., Curran, E., Sinclair, T. M., y McLuckie, J. C. (1994). Fatal nosocomial Legionnaires' disease: relevance of contamination of hospital water supply by temperature-dependent buoyancy-driven flow from spur pipes. *Epidemiology and Infection*, 112(3), 513–525.
- Pedro-Botet, L., y Yu, V. L. (2006). *Legionella*: macrolides or quinolones? *Clinical Microbiology and Infection*, 12 Suppl 3, 25-30.
- Pedro-Botet, M. L., Sabria-Leal, M., Haro, M., Rubio, C., Gimenez, G., Sopena, N., y Tor, J. (1995). Nosocomial and community-acquired *Legionella* pneumonia: clinical comparative analysis. *The European Respiratory Journal*, 8(11), 1929–1933.
- Pedro-Botet, M. L., Sabria-Leal, M., Sopena, N., Manterola, J. M., Morera, J., Blavia, R., ... Gimeno, J. M. (1998). Role of immunosuppression in the evolution of Legionnaires' disease. *Clinical Infectious Diseases*, 26(1), 14–19.
- Pedro-Botet, M. L., Sabria, M., Sopena, N., Garcia Nunez, M., Morera, J., y Reynaga, E. (2002). Environmental legionellosis and oropharyngeal colonization by *Legionella* in immunosuppressed patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 23(5), 279–281.
- Pedro-Botet Montoya, M. L., Sabria Leal, M., Espinosa, L., Condom Mundo, M. J., Carrasco Miserachs, I., y Foz Sala, M. (1992). [The use of molecular epidemiologic markers in the study of an epidemic outbreak of legionnaires' disease of nosocomial origin]. *Medicina clinica*, 99(20), 761–765.
- Peiro Callizo, E. F., Sierra, J. D., Pombo, J. M. S., Baquedano, C. E., y Huerta, B. P. (2005). Evaluation of the effectiveness of the Pastormaster method for disinfection of *Legionella* in a hospital water distribution system. *The Journal of Hospital Infection*, 60(2), 150–158.
- Pérez-Lombard, L., Ortiz, J., y Pout, C. (2008). A review on buildings energy consumption information. *Energy and Buildings*, 40(3), 394–398.
- Perola, O., Kauppinen, J., Kusnetsov, J., Karkkainen, U.-M., Luck, P. C., y Katila, M.-L. (2005). Persistent *Legionella pneumophila* colonization of a hospital water supply: efficacy of control methods and a molecular epidemiological analysis. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 113(1), 45-53.
- Phin, N., Parry-Ford, F., Harrison, T., Stagg, H. R., Zhang, N., Kumar, K., ... Abubakar, I. (2014). Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *The Lancet. Infectious Diseases*, 14(10), 1011–1021.
- Piao, Z., Sze, C. C., Barysheva, O., Iida, K., y Yoshida, S. (2006). Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1613–1622.
- Prakash, B., Veeragowda, B. M., y Krishnappa, G. (2003). Biofilms: a survival strategy of bacteria. *Current Science*, 85(9), 1299–1307.

- Prodinge, W. M., Bonatti, H., Allerberger, F., Wewalka, G., Harrison, T. G., Aichberger, C., ... Tiefenbrunner, F. (1994). *Legionella pneumonia* in transplant recipients: a cluster of cases of eight years' duration. *The Journal of Hospital Infection*, 26(3), 191-202.
- Pryor, M., Springthorpe, S., Riffard, S., Brooks, T., Huo, Y., Davis, G., y Sattar, S. A. (2004). Investigation of opportunistic pathogens in municipal drinking water under different supply and treatment regimes. *Water Science and Technology*, 50(1), 83-90.
- Rafiee, M., Jahangiri-rad, M., Hajjaran, H., Mesdaghinia, A., y Hajaghadzadeh, M. (2014). Detection and identification of *Legionella* species in hospital water supplies through Polymerase Chain Reaction (16S rRNA). *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12(1), 83.
- Ragull, S., Luisa Pedro-Botet, M., Garcia-Nunez, M., Esteve, M., Sopena, N., Rey Joly, C., y Sabria, M. (2006). [Superheat-and-flush effect on the control of hospital-acquired *Legionella* infection]. *Medicina clinica*, 127(6), 211-213.
- R core team. (2013). *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Recuperado de <http://www.R-project.org>.
- REAL DECRETO 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis.
- Rendueles, O., y Ghigo, J.-M. (2012). Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(5), 972-989.
- Rhoads, W. J., Pruden, A., y Edwards, M. A. (2014). Anticipating challenges with in-building disinfection for control of opportunistic pathogens. *Water Environment Research*, 86(6), 540-549.
- Riffard, S., Douglass, S., Brooks, T., Springthorpe, S., Filion, L. G., y Sattar, S. A. (2001). Occurrence of *Legionella* in groundwater: an ecological study. *Water Science and Technology*, 43(12), 99-102.
- Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V., y Keevil, C. W. (1994). Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 1842-1851.
- Rogers, J., y Keevil, C. W. (1992). Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(7), 2326-2330.
- Rohr, U., Senger, M., Selenka, F., Turley, R., y Wilhelm, M. (1999). Four years of experience with silver-copper ionization for control of *Legionella* in a german university hospital hot water plumbing system. *Clinical Infectious Diseases*, 29(6), 1507-1511.
- Rota, M., Scaturro, M., Fontana, S., Foroni, M., Boschetto, G., Trentin, L., ... Ricci, M. (2011). Cluster of travel-associated Legionnaires' disease in Lazise, Italy, July to August 2011. *Euro Surveill*, 16(40), pii:19982.
- Rowbotham, T. J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology*, 33(12), 1179-1183.
- Rudin, J. E., y Wing, E. J. (1986). Prospective study of pneumonia: unexpected incidence of legionellosis. *Southern Medical Journal*, 79(4), 417-419.
- Ruehleemann, S. A., y Crawford, G. R. (1996). Panic in the potting shed. The association between *Legionella longbeachae* serogroup 1 and potting soils in Australia. *The Medical Journal of Australia*, 164(1), 36-38.
- Sabria, M. (2014). [Legionellosis in children and new transmission sources]. *Medicina clinica*, 142(2), 67-69.
- Sabria, M., Alvarez, J., Dominguez, A., Pedrol, A., Sauca, G., Salleras, L., ... Barrufet, M. P. (2006). A community outbreak of Legionnaires' disease: evidence of a cooling tower as the source. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(7), 642-647.
- Sabria, M., Garcia-Nunez, M., Pedro-Botet, M. L., Sopena, N., Gimeno, J. M., Reynaga, E., ... Rey-Joly, C. (2001). Presence and chromosomal subtyping of *Legionella* species in potable water systems in 20 hospitals of Catalonia, Spain. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 22(11), 673-676.
- Sabria, M., Modol, J. M., Garcia-Nunez, M., Reynaga, E., Pedro-Botet, M. L., Sopena, N., y Rey-Joly, C. (2004). Environmental cultures and hospital-acquired Legionnaires' disease: a 5-year prospective study in 20 hospitals in Catalonia, Spain. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 25(12), 1072-1076.
- Sabria, M., Pedro-Botet, M. L., Gomez, J., Roig, J., Vilaseca, B., Sopena, N., y Banos, V. (2005). Fluoroquinolones vs macrolides in the treatment of Legionnaires' disease. *Chest*, 128(3), 1401-1405.
- Sabria M, y Yu V. (2012). Legionella infection. In *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18th edition.
- Sabria, M., y Yu, V. L. (2002). Hospital-acquired legionellosis: solutions for a preventable infection. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(6), 368-373.
- Saby, S., Vidal, A., y Suty, H. (2005). Resistance of *Legionella* to disinfection in hot water distribution systems. *Water Science and Technology*, 52(8), 15-28.
- Scaturro, M., Losardo, M., De Ponte, G., y Ricci, M. L. (2005). Comparison of three molecular methods used for subtyping of *Legionella pneumophila* strains isolated during an epidemic of Legionellosis in Rome. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5348-5350.

- Schoen, M. E., y Ashbolt, N. J. (2011). An in-premise model for *Legionella* exposure during showering events. *Water Research*, 45(18), 5826–5836.
- Schofield, G. M., y Locci, R. (1985). Colonization of components of a model hot water system by *Legionella pneumophila*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 58(2), 151–162.
- Schoonmaker, D., Heimberger, T., y Birkhead, G. (1992). Comparison of ribotyping and restriction enzyme analysis using pulsed-field gel electrophoresis for distinguishing *Legionella pneumophila* isolates obtained during a nosocomial outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(6), 1491–1498.
- Schulze-Robbecke, R., Rodder, M., y Exner, M. (1987a). [Multiplication and killing temperatures of naturally occurring legionellas]. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Serie B, Umwelthygiene, Krankenhaushygiene, Arbeitshygiene, präventive Medizin*, 184(6).
- Schulze-Robbecke, R., Rodder, M., y Exner, M. (1987b). [Propagation and killing temperatures for Legionella]. *Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene*, 72, 83–89.
- Sehulster, L., Chinn, R. Y., Arduino, M. J., Carpenter, J., Donlan, R., Ashford, D., ... Whitney, C. (2003). Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. *Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports RR*, 52(10), 1-42.
- Serrano-Suarez, A., Dellunde, J., Salvado, H., Cervero-Arago, S., Mendez, J., Canals, O., ... Araujo, R. (2013). Microbial and physicochemical parameters associated with *Legionella* contamination in hot water recirculation systems. *Environmental Science and Pollution Research International*, 20(8), 5534–5544.
- Sheehan, K. B., Henson, J. M., y Ferris, M. J. (2005). *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 507–511.
- Sheffer, P. J., Stout, J. E., Wagener, M. M., y Muder, R. R. (2005). Efficacy of new point-of-use water filter for preventing exposure to *Legionella* and waterborne bacteria. *American Journal of Infection Control*, 33(5 Suppl 1), S20–25.
- Sidari FP, Stout J, VanBriesen JM, Bowman AM, Grubb D, Neuner A, ... Yu V. (2004). Keeping *Legionella* out of water systems. *J Am Water Works Assoc*, 96, 111–9.
- Sikora, A., Wójtowicz-Bobin, M., Koziol-Montewka, M., Magryś, A., y Gładysz, I. (2015). Prevalence of *Legionella pneumophila* in water distribution systems in hospitals and public buildings of the Lublin region of eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(2), 195–201.
- Silveira, T. N., y Zamboni, D. S. (2010). Pore formation triggered by *Legionella* spp. is an Nlr4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. *Infection and Immunity*, 78(3), 1403–1413.
- Squier, C. L., Stout, J. E., Krsytofiak, S., McMahon, J., Wagener, M. M., Dixon, B., y Yu, V. L. (2005). A proactive approach to prevention of health care-acquired Legionnaires' disease: the Allegheny County (Pittsburgh) experience. *American Journal of Infection Control*, 33(6), 360–367.
- Srinivasan, A., Bova, G., Ross, T., Mackie, K., Paquette, N., Merz, W., y Perl, T. M. (2003). A 17-month evaluation of a chlorine dioxide water treatment system to control *Legionella* species in a hospital water supply. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 24(8), 575–579.
- Steinert, M., Hentschel, U., y Hacker, J. (2002). *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2), 149–162.
- Storey, M. V., Ashbolt, J., y Stenstrom, T. A. (2004). Biofilms, thermophilic amoebae and *Legionella pneumophila*—a quantitative risk assessment for distributed water. *Water Science and Technology*, 50(1), 77-82.
- Stout, J. E., Best, M. G., y Yu, V. L. (1986). Susceptibility of members of the family *Legionellaceae* to thermal stress: implications for heat eradication methods in water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(2), 396–399.
- Stout, J. E., Lin, Y. S., Goetz, A. M., y Muder, R. R. (1998). Controlling *Legionella* in hospital water systems: experience with the superheat-and-flush method and copper-silver ionization. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 19(12), 911–914.
- Stout, J. E., Muder, R. R., Mietzner, S., Wagener, M. M., Perri, M. B., DeRoos, K., ... Yu, V. L. (2007). Role of environmental surveillance in determining the risk of hospital-acquired legionellosis: a national surveillance study with clinical correlations. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 28(7), 818–824.
- Stout, J. E., y Yu, V. L. (1997). Legionellosis. *The New England Journal of Medicine*, 337(10), 682–687.
- Stout, J. E., y Yu, V. L. (2001). *Legionella* in the hospital water supply: a plea for decision making based on evidence-based medicine. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 22(11), 670–672.
- Stout, J. E., y Yu, V. L. (2003). Experiences of the first 16 hospitals using copper-silver ionization for *Legionella* control: implications for the evaluation of other disinfection modalities. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 24(8), 563–568.
- Stout, J. E., Yu, V. L., y Best, M. G. (1985). Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1), 221–228.
- Struelens, M. J., Maes, N., Rost, F., Deplano, A., Jacobs, F., Liesnard, C., ... McIntyre, M. P. (1992). Genotypic and phenotypic methods for the investigation of a nosocomial *Legionella pneumophila* outbreak and efficacy of control measures. *The Journal of Infectious Diseases*, 166(1), 22-30.

- Svarrer, C. W., Luck, C., Elverdal, P. L., y Uldum, S. A. (2012). Immunochromatic kits Xpect *Legionella* and BinaxNOW *Legionella* for detection of *Legionella pneumophila* urinary antigen have low sensitivities for the diagnosis of Legionnaires' disease. *Journal of Medical Microbiology*, 61(Pt 2), 213–217.
- Swanson, M. S., y Hammer, B. K. (2000). *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annual Review of Microbiology*, 54, 567–613.
- Sydnor, E. R. M., Bova, G., Gimburg, A., Cosgrove, S. E., Perl, T. M., y Maragakis, L. L. (2012). Electronic-eye faucets: *Legionella* species contamination in healthcare settings. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 33(3), 235–240.
- Teare, L., y Millership, S. (2012). *Legionella pneumophila* serogroup 1 in a birthing pool. *The Journal of Hospital Infection*, 82(1), 58–60.
- Temmerman, R., Vervaeren, H., Nosedá, B., Boon, N., y Verstraete, W. (2006). Necrotrophic growth of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4323–4328.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., y Goering, R. V. (1997). How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 18(6), 426–439.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., y Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233–2239.
- Terranova, W., Cohen, M. L., y Fraser, D. W. (1978). 1974 outbreak of Legionnaires' Disease diagnosed in 1977. Clinical and epidemiological features. *Lancet*, 2(8081), 122–124.
- Thacker, S. B., Bennett, J. V., Tsai, T. F., Fraser, D. W., McDade, J. E., Shepard, C. C., ... Eickhoff, T. C. (1978). An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by the Legionnaires' disease bacterium. *The Journal of Infectious Diseases*, 138(4), 512–519.
- Tilney, L. G., Harb, O. S., Connelly, P. S., Robinson, C. G., y Roy, C. R. (2001). How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 24), 4637–4650.
- Tison, D. L., Pope, D. H., Cherry, W. B., y Fliermans, C. B. (1980). Growth of *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (cyanobacteria). *Applied and Environmental Microbiology*, 39(2), 456–459.
- Tobin, J. O., Beare, J., Dunnill, M. S., Fisher-Hoch, S., French, M., Mitchell, R. G., ... Muers, M. F. (1980). Legionnaires' disease in a transplant unit: isolation of the causative agent from shower baths. *Lancet*, 2(8186), 118–121.
- Triassi, M., Di Popolo, A., Ribera D'Alcala, G., Albanese, Z., Cuccurullo, S., Montegrosso, S., ... Zarrilli, R. (2006). Clinical and environmental distribution of *Legionella pneumophila* in a university hospital in Italy: efficacy of ultraviolet disinfection. *The Journal of Hospital Infection*, 62(4), 494–501.
- Trop Skaza, A., Beskovnik, L., Storman, A., Kese, D., y Ursic, S. (2012). Epidemiological investigation of a legionellosis outbreak in a Slovenian nursing home, August 2010. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 44(4), 263–269.
- Tubach, F., Ravaut, P., Salmon-Ceron, D., Petitpain, N., Brocq, O., Grados, F., ... Lortholary, O. (2006). Emergence of *Legionella pneumophila* pneumonia in patients receiving tumor necrosis factor-alpha antagonists. *Clinical Infectious Diseases*, 43(10).
- Valsangiacomo, C., Baggi, F., Gaia, V., Balmelli, T., Peduzzi, R., y Piffaretti, J. C. (1995). Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(7), 1716–1719.
- Van der Kooij, D., Veenendaal, H. R., y Scheffer, W. J. H. (2005). Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Research*, 39(13), 2789–2798.
- Van der Mee-Marquet, N., Bloc, D., Briand, L., Besnier, J.-M., y Quentin, R. (2005). Non-touch fittings in hospitals: a procedure to eradicate *Pseudomonas aeruginosa* contamination. *The Journal of Hospital Infection*, 60(3), 235–239.
- Van Heijnsbergen, E., Schalk, J. A., Euser, S. M., Brandsema, P. S., den Boer, J. W., y de Roda Husman, A. M. (2015). Confirmed and potential sources of *Legionella* reviewed. *Environmental Science y Technology*, 49(8), 4797–4815.
- Venezia, R. A., Agresta, M. D., Hanley, E. M., Urquhart, K., y Schoonmaker, D. (1994). Nosocomial legionellosis associated with aspiration of nasogastric feedings diluted in tap water. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 15(8), 529–533.
- Vergis, E. N., Indorf, A., File, T. M. J., Phillips, J., Bates, J., Tan, J., ... YU, V. L. (2000). Azithromycin vs cefuroxime plus erythromycin for empirical treatment of community-acquired pneumonia in hospitalized patients: a prospective, randomized, multicenter trial. *Archives of Internal Medicine*, 160(9), 1294–1300.

- Vervaeren, H., Temmerman, R., Devos, L., Boon, N., y Verstraete, W. (2006). Introduction of a boost of *Legionella pneumophila* into a stagnant-water model by heat treatment. *FEMS Microbiology Ecology*, 58(3), 583–592.
- Vickers, R. M., Yu, V. L., Hanna, S. S., Muraca, P., Diven, W., Carmen, N., y Taylor, F. B. (1987). Determinants of *Legionella pneumophila* contamination of water distribution systems: 15-hospital prospective study. *Infection Control*, 8(9), 357–363.
- Visca, P., Goldoni, P., Luck, P. C., Helbig, J. H., Cattani, L., Giltri, G., ... Castellani Pastoris, M. (1999). Multiple types of *Legionella pneumophila* serogroup 6 in a hospital heated-water system associated with sporadic infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(7), 2189–2196.
- Völker, S., y Kistemann, T. (2015). Field testing hot water temperature reduction as an energy-saving measure—does the *Legionella* presence change in a clinic's plumbing system? *Environmental Technology*, 36(16), 2138–2147.
- Von Baum, H., Ewig, S., Marre, R., Suttrop, N., Gonschior, S., Welte, T., y Luck, C. (2008). Community-acquired Legionella pneumonia: new insights from the German competence network for community acquired pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, 1356–1364.
- Wadowsky, R. M., y Yee, R. B. (1983). Satellite growth of *Legionella pneumophila* with an environmental isolate of *Flavobacterium breve*. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(6), 1447–1449.
- Warris, A., Onken, A., Gaustad, P., Janssen, W., van der Lee, H., Verweij, P. E., y Abrahamsen, T. G. (2010). Point-of-use filtration method for the prevention of fungal contamination of hospital water. *The Journal of Hospital Infection*, 76(1), 56–59.
- Watnick, P., y Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2675–2679.
- Wei, S.-H., Chou, P., Tseng, L.-R., Lin, H.-C., Wang, J.-H., Sheu, J.-N., ... Chiang, C.-S. (2014). Nosocomial neonatal legionellosis associated with water in infant formula, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases*, 20(11), 1921–1924.
- Whiley, H., Keegan, A., Fallowfield, H., y Ross, K. (2014). Uncertainties associated with assessing the public health risk from *Legionella*. *Frontiers in Microbiology*, 5, 501.
- Williams, M. M., Chen, T.-H., Keane, T., Toney, N., Toney, S., Armbruster, C. R., ... Arduino, M. J. (2011). Point-of-use membrane filtration and hyperchlorination to prevent patient exposure to rapidly growing mycobacteria in the potable water supply of a skilled nursing facility. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 32(9), 837–844.
- Womack, S. J., Liang, K. C., Ilagan, N. B., Weyhing, B. T., y Planas, A. (1992). *Legionella pneumophila* in a preterm infant. A case report. *Journal of Perinatology*, 12(3), 303–305.
- Woo, A. H., Goetz, A., y Yu, V. L. (1992). Transmission of *Legionella* by respiratory equipment and aerosol generating devices. *Chest*, 102(5), 1586–1590.
- Wright JB. (2000). *Legionella* biofilms: their implication, study and control. In *Biofilms: recent advances in study and control* (pp. 291–310). Harwood Academic Publishers, The Netherlands.
- Yiallourous, P. K., Papadouri, T., Karaoli, C., Papamichael, E., Zeniou, M., Pieridou-Bagatzouni, D., ... Hadjidemetriou, A. (2013). First outbreak of nosocomial *Legionella* infection in term neonates caused by a cold mist ultrasonic humidifier. *Clinical Infectious Diseases*, 57(1), 48–56.
- Yu, P.-Y., Lin, Y. E., Lin, W.-R., Shih, H.-Y., Chuang, Y.-C., Ben, R.-J., ... Shi, Z.-Y. (2008). The high prevalence of *Legionella pneumophila* contamination in hospital potable water systems in Taiwan: implications for hospital infection control in Asia. *International Journal of Infectious Diseases*, 12(4), 416–420.
- Yu, V. L. (1993). Could aspiration be the major mode of transmission for *Legionella*? *The American Journal of Medicine*, 95(1), 13–15.
- Yu, V. L., Liu, Z., Stout, J. E., y Goetz, A. (1993). *Legionella* disinfection of water distribution systems: principles, problems, and practice. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 14(10), 567–570.
- Zacheus, O. M., y Martikainen, P. J. (1996). Effect of heat flushing on the concentrations of *Legionella pneumophila* and other heterotrophic microbes in hot water systems of apartment buildings. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(8), 811–818.
- Zhang, Z., McCann, C., Stout, J. E., Piesczynski, S., Hawks, R., Vidic, R., y Yu, V. L. (2007). Safety and efficacy of chlorine dioxide for *Legionella* control in a hospital water system. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 28(8), 1009–1012.

