

## Contribución del laboratorio de microbiología a la prevención y control de la legionelosis

J. Castro Urda<sup>1</sup>, H. Aguinaga Zapata<sup>2</sup>, A. Serrano Valín<sup>3</sup>, M.<sup>a</sup> E. Boluda Garrido<sup>3</sup>, R. Doncel Jiménez<sup>3</sup>, J. A. Galán Torres<sup>4</sup>

Sanid. mil. 2007; 63 (3): 224-226

Aunque mediante el estudio retrospectivo de la enfermedad se ha llegado a responsabilizar a la *Legionella* del cuadro clínico respiratorio que afectó a un grupo de turistas escoceses en Benidorm en el año 1973, no fue hasta 1976 después de la celebración de una Convención de la Legión Americana en un hotel de Filadelfia, cuando se vieron afectadas 221 personas, llegando a morir 49 de ellas, cuando esta nueva enfermedad se bautizó por la prensa como «enfermedad del legionario». Posteriormente, en 1977 se descubrió que el agente causal era una bacteria, a la que se denominó *Legionella*, y al proceso neumónico que producía, legionelosis.

La *Legionella* es una bacteria con forma de bacilo, que se tiñe débilmente con la tinción de Gram y posee flagelos que le confieren movilidad. No es capaz de producir esporas, pero si puede lograr una gran resistencia cuando parasita intracelularmente los macrófagos del huésped o diversos protozoos, que se encuentran normalmente en el agua, como la *Harmammella vermiformis*, formando parte de la biopelícula que tapiza los conductos de distribución de agua.

Su temperatura óptima de crecimiento es 35-37°C, y se multiplica cuando se encuentra entre 20 y 45°C. Si se mantiene una temperatura entre 45 y 55°C en el agua, la *Legionella* no compete con ningún otro microorganismo, y se produce un crecimiento claramente selectivo. Es una bacteria aerobia, aunque tiene cierta tolerancia a concentraciones limitadas de CO<sub>2</sub>. Necesita un alto grado de humedad (actividad de agua) y un pH ligeramente ácido, entre 6,8 y

El género *Legionella* engloba a un gran número de especies, muchas de ellas presentan distintos serogrupos. No todas ellas son patógenas para el hombre, pero si la mayoría pues se han aislado de brotes de enfermedad. La especie que con mas frecuencia se aísla como causa de la legionelosis es *Legionella pneumophila* serogrupo 1, que también es el serogrupo mas frecuente en el ambiente. La *Legionella* ocupa hábitats acuáticos naturales donde se encuentra como reservorio. Desde allí es capaz de colonizar los sistemas de abastecimiento de las grandes ciudades y distribuirse por la red sanitaria hasta instalaciones donde encuentran las condiciones propicias para su multiplicación hasta llegar a concentraciones que posibiliten la aparición de un brote de la enfermedad.

La aparición de casos de Legionelosis esta vinculada al cumplimiento de una serie de condiciones: Penetración de la bacteria en el circuito de agua, multiplicación de la bacteria hasta alcanzar una



Bandeja de una torre de refrigeración

concentración elevada, dispersión en el aire del agua contaminada en gotas respirables y exposición de los individuos al aerosol. La virulencia de la especie y serogrupo de *Legionella*, así como la susceptibilidad de las personas expuestas es determinante para que se produzca la infección.

La entrada de *Legionella* en el organismo humano se produce por vía respiratoria, mediante la inhalación de aerosoles contaminados. La legionelosis puede presentarse clínicamente de dos formas: Enfermedad del legionario y fiebre de Pontiac. La infección pulmonar o «enfermedad del legionario» es una neumonía atípica que se presenta con fiebre elevada, dolor de cabeza, mialgias, vómitos y diarreas. Tiene un periodo de incubación de 2 a 10 días. Su incidencia es baja (5%), pero tiene un curso agudo que puede ser mortal sin tratamiento en individuos inmunodeprimidos y con problemas respiratorios. El tratamiento antibiótico de elección es eritromicina, de gran eficacia y del que no se han descrito resistencias. La Fiebre de Pontiac es un síndrome febril agudo y autolimitado en el tiempo. Tiene un periodo de incubación de 4 a 60 horas. Su incidencia es muy alta (95%), pero su mortalidad es muy baja. Precisa solo un tratamiento sintomático.

La infección por *Legionella* puede diagnosticarse mediante el aislamiento e identificación de la bacteria en medios de cultivo a partir de muestras respiratorias humanas, serología por inmunofluorescencia indirecta (IFI), demostrando la presencia de anticuerpos específicos en el suero del enfermo, detección de antígeno específico de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 en orina, y visualización del microorganismo mediante fluorescencia directa (FD) sobre muestras patológicas (esputos, biopsias de pulmón, aspirados trans-

<sup>1</sup> Capitán Veterinario. Jefe Sección Análisis Clínicos.

<sup>2</sup> Licenciada en farmacia.

<sup>3</sup> Técnicos analistas.

<sup>4</sup> Teniente Coronel Veterinario Jefe de Servicio.

Servicio de Microbiología, Higiene y Sanidad Ambiental.

Centro Militar de Veterinaria de la Defensa.

Darío Gazapo, 3 - 28024 Madrid.

traqueales, lavados bronquiales y exudados bronquiales). Además puede llegarse a un diagnóstico de la enfermedad, mediante ampliación de material genómico en líquidos o tejidos, por técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La legionelosis es más frecuente en personas de edad comprendida entre 40 y 70 años, presentándose de dos a tres veces más en varones que en mujeres, siendo rara en niños (Memorando de la OMS 1990). El riesgo aumenta en fumadores, puesto que tienen destruidos los cilios del epitelio respiratorio, en alcohólicos, e inmunodeprimidos. La legionelosis se incluyó en 1996 entre las enfermedades de declaración obligatoria, a partir de la aprobación del Real Decreto 2210/95 de 28 de Diciembre por el que se creó la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

La aparición de la enfermedad puede ser como caso esporádico o en forma de brote. La Comisión de Salud Pública del Sistema Nacional de Salud, en las «Recomendaciones para la prevención y control de legionelosis» define brote, casos relacionados, caso aislado y caso nosocomial. Serán brotes o casos agrupados, dos o más casos ocurridos en un intervalo de tiempo inferior a 6 meses, en personas que hayan frecuentado un mismo lugar en los 2 a 10 días anteriores a la fecha de los primeros síntomas. Serán casos relacionados, dos o más casos ocurridos en un intervalo de tiempo superior a 6 meses, en personas que hayan frecuentado un mismo lugar en los 2 a 10 días anteriores a la fecha de los primeros síntomas. Será un caso aislado cuando éste no tenga relación epidemiológica con ningún otro. Por último se define como caso nosocomial confirmado aquél que tiene lugar en un enfermo que ha pasado los 10 días anteriores a la fecha de inicio de síntomas en un establecimiento hospitalario, y caso nosocomial probable cuando el enfermo ha estado ingresado por lo menos un día, en los 10 días anteriores a la fecha de inicio de síntomas.

Cuando un brote afecta a un grupo de turistas alojados en un hotel, se denomina «legionelosis del viajero». Desde 1987 existe una red europea de notificación de casos asociados a viajeros. Es el denominado Grupo Europeo para el estudio de infecciones por *Legionella* (EWGLI). A pesar de la vigilancia epidemiológica, un gran número de casos de legionelosis no son diagnosticados.

Desde 1997, primer año en que se dispone de datos del Sistema de Enfermedades de Declaración obligatoria, se produjo un aumen-

to importante y progresivo de casos hasta el año 2002. Es cierto que este incremento, se debe también a muchos casos de neumonía atípica que antes no se diagnosticaban como legionelosis. A partir del año 2002 se ha invertido la tendencia y los casos disminuyen de año en año. Los brotes más importantes han sido los aparecidos en Alcalá de Henares en 1996 con 221 afectados y 11 fallecidos, en Murcia en 2001 con 745 afectados y 4 fallecidos, siendo este el mayor brote documentado en todo el mundo y los originados en Zaragoza en 2004 y 2005 con 30 y 22 afectados, y 7 y 2 fallecidos respectivamente.

La Comisión de Salud Pública del Sistema Nacional de Salud, en su reunión del 29 de octubre de 1999, estimó necesario regular el control y prevención de la legionelosis para disminuir la aparición de brotes. Se aprobó entonces el RD. 909/2001 de 27 de julio que regulaba los criterios para la prevención y control de esta enfermedad. Posteriormente, éste fue derogado y sustituido por el RD. 865/2003 de 4 de julio, actualmente en vigor, a partir del cual se han desarrollado las diferentes normativas Autonómicas. El Real Decreto recoge en su artículo 2 «Ámbito de aplicación», las instalaciones y equipos en los que aplicar las medidas higiénico sanitarias y administrativas que desarrolla, al ser consideradas de riesgo para la proliferación y dispersión de *Legionella*. Se trata de torres de refrigeración, condensadores evaporativos, sistemas de agua sanitaria caliente y fría, humidificadores, fuentes ornamentales, sistemas de riego por aspersión, sistemas de agua contra incendios, bañeras de hidromasaje, equipos de terapia respiratoria y cualquier otra instalación que sea susceptible de convertirse en una fuente de emisión de *Legionella* en forma de aerosol.

Estas instalaciones deben ser objeto de una serie de acciones de mantenimiento técnico y sanitario. La Norma UNE 100030 IN. Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones, define las acciones preventivas para controlar la multiplicación de la bacteria y su dispersión.

El RD. 865/2003 de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis, al igual que el anterior R.D de 2001, señala, en una disposición adicional única, que en las Unidades, Centros u Organismos Militares, las labores de inspección sanitaria se realicen por los órganos competentes del Ministerio de Defensa. El artículo 10 del Real Decreto define las labores de la inspección sanitaria, entre las que menciona la toma de muestras de las instalaciones de riesgo.

Las condiciones específicas de mantenimiento, para los sistemas de agua fría de consumo humano y caliente, las torres de refrigeración y condensadores evaporativos y bañeras de hidromasaje, se recogen en los anexos 3, 4 y 5. En el anexo 3, en el último párrafo referente al mantenimiento de instalaciones de agua caliente sanitaria, se afirma que como mínimo anualmente debe realizarse una determinación de *Legionella*. En el anexo 4, en cuanto a la revisión de torres de refrigeración y condensadores evaporativos, se establece que debe determinarse *Legionella* con una periodicidad adecuada al nivel de peligrosidad de la instalación, como mínimo trimestralmente, y siempre 15 días después de la realización de un tratamiento de choque. Así mismo, cuando se detecten cambios en el recuento total de aerobios y en el nivel de desinfectante, se procederá a realizar una determinación de *Legionella*. De acuerdo con la tabla 2 de este anexo, se procederá a analizar aerobios totales una vez al mes, y si el resultado fuera superior a 10.000 UFC/mL será



Unidades formadoras de colonias de *legionella* en placa de cultivo

necesario comprobar la eficacia de la dosis y tipo de biocida utilizado, y realizar un muestreo de *Legionella*.

En definitiva, la legislación obliga a la realización de determinaciones de *Legionella* en un número elevado de muestras, teniendo en cuenta la cantidad de instalaciones consideradas de riesgo que existen en Unidades, Centros u Organismos dependientes del Ministerio de Defensa.

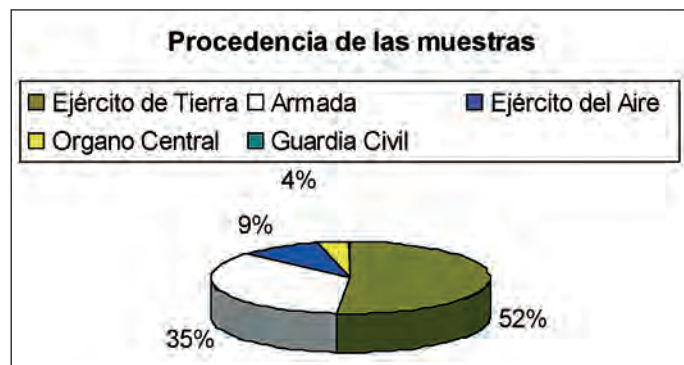
El Real Decreto 865/2003, en la tabla 3 del anexo 4, establece que los análisis deberán ser realizados en laboratorios acreditados para aislamiento de *Legionella* en agua o laboratorios que tengan implantado un sistema de control de calidad para este tipo de ensayos. Además, en la tabla 2 del mismo anexo se determina que el análisis debe realizarse según la norma ISO 11731:1998. *Calidad del agua. Detección y enumeración de Legionella*.

Mediante Resolución 320/38186/2004, de 30 de Julio, de la Dirección General de Armamento y Material, se acredita al Laboratorio de Ensayos del Centro Militar de Veterinaria de la Defensa para el ensayo «Detección y recuento de *Legionella* en muestras de agua», y se publica en el BOE núm. 200, de 19 de agosto de 2004 y en BOD núm. 165, de 23 de agosto.

El procedimiento de análisis de las muestras consiste en primer lugar, en una concentración mediante filtración del agua, a través de una membrana de 0,22 micras de tamaño de poro. El material retenido en el filtro se eluye mediante agitación en un volumen reducido de agua estéril. A continuación se somete a un tratamiento térmico (50°C durante 30 minutos) y a un tratamiento ácido (pH 2,2 durante 5 minutos) para eliminar las bacterias y hongos acompañantes. Posteriormente se siembra en los medios de cultivo específicos y se incuba a 36°C en una atmósfera con 2,5% de CO<sub>2</sub> durante al menos 10 días, en los cuales las placas se revisarán cada 48 horas. En las colonias sospechosas de pertenecer al género *Legionella* se comprobará su requerimiento de L-cisteína para crecer, y se identificarán en especie y serogrupo mediante aglutinación en látex.

En el Laboratorio de Legionella del Centro Militar de Veterinaria de la Defensa se procesan muestras procedentes de Unidades del Órgano Central del Ministerio de Defensa, del Ejército de Tierra, de la Armada, del Ejército de Aire y de la Guardia Civil. Desde el año 2002, en que se comenzaron a realizar los análisis de *Legionella*, el incremento en el número de muestras ha sido progresivo en cada ejercicio, hasta llegar a las ya 1.500 muestras de agua analizadas durante 2006, procedentes de 240 Unidades repartidas por todo el territorio nacional.

La toma de muestras de agua de las instalaciones de riesgo y su análisis, además de cumplir con las exigencias del Real Decreto 865/2003 en cuanto a los programas de mantenimiento y su monitorización, permite llevar un seguimiento ambiental de las instalaciones, pudiendo evaluar la eficacia de los programas preventivos y de los biocidas utilizados. Se ha diseñado para ello, una base de datos en la que se van registrando los datos de cada una de las muestras analizadas. El Ministerio de Defensa dispone de un inventario completo y real de todas las instalaciones de riesgo de su dependencia. Esto supone una gran ventaja frente a las Comunidades Autónomas, cuyas instalaciones en un gran número de casos no se declaran a pesar de la legislación que obliga a los propietarios.



Distribución de la procedencia de las muestras durante el ejercicio 2006

Uno de los primeros diagnósticos de legionelosis en España se realizó en el brote de la Residencia Militar «Castillejos» de Zaragoza en el año 1986. Desde entonces ha existido una especial sensibilización en las Fuerzas Armadas, teniendo en cuenta la gran cantidad de instalaciones de que dispone y el elevado número de personas que podría verse afectado. La realización de inspecciones periódicas en todas las instalaciones de riesgo dependientes del Ministerio de Defensa, incluidas aquellas existentes en los buques de la Armada, llevada a cabo por Oficiales del Cuerpo Militar de Sanidad, la mayoría veterinarios, garantiza que los programas de mantenimiento se cumplen disminuyendo la posibilidad de aparición de casos.

Así mismo, el Laboratorio de Legionella del Centro Militar de Veterinaria de la Defensa, no solo emite un resultado de las muestras recibidas, sino que asesora a los responsables de las instalaciones, realiza un seguimiento ambiental de éstas, y mantiene contacto e intercambia información con el Laboratorio de Legionella del Centro Nacional de Microbiología (Ministerio de Sanidad) y otros laboratorios públicos y privados.

## BIBLIOGRAFÍA

- Norma ISO 11731: 1998(E).
- Real Decreto 865/2003, de 18 de julio de 2003. (BOE n.º 171).
- Orden Ministerial número 87/2004, de 31 de Marzo, sobre la inspección de instalaciones para la prevención y control de la legionelosis en el Ministerio de Defensa. (BOD núm. 82).
- Instrucción Técnica Sanitaria n.º 12/04 «Guía de Inspección de Instalaciones para el control y prevención de la legionelosis en el ámbito del Ministerio de Defensa».
- Curso de Control y prevención de la Legionelosis a distancia. Escuela Militar de Sanidad. 2006.
- Epidemiology, prevention and control of legionellosis: Memorando from a WHO meeting. Bulletin of the World Health Organization.
- Pelaz, C., Martín Bourgon, C. Legionelosis. Datos de España, diagnóstico de laboratorio y recomendaciones para su prevención y control en instalaciones de edificios.
- Norma UNE 100030 IN. Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de Legionella en instalaciones.
- Datos epidemiológicos. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad.