



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Departamento de Microbiología
Programa de doctorado en Medicina 3139

Control de *Legionella* en instalaciones
de red de agua hospitalaria

Tesis Doctoral

Presentada por:
MARTA JIMÉNEZ MAYORDOMO
Dirigida por:
Dra. María Dolores Ocete Mochón
Dra. Concepción Gimeno Cardona

Valencia, febrero de 2024



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Departamento de Microbiología
Programa de doctorado en Medicina 3139

Control de *Legionella* en instalaciones
de red de agua hospitalaria

Tesis Doctoral

Presentada por:
MARTA JIMÉNEZ MAYORDOMO

Dirigida por:
Dra. María Dolores Ocete Mochón
Dra. Concepción Gimeno Cardona

Valencia, febrero de 2024

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de varias personas a las que quiero mostrar mi agradecimiento...

En primer lugar, a mis directoras de tesis:

*A la **Dra María Dolores Ocete**. Gracias por la dedicación y el apoyo que has brindado a este trabajo y por el respeto a mis sugerencias e ideas. Gracias Loli a todos los niveles. Gracias por tu generosidad, por compartir tu conocimiento y enseñarme tanto sobre *Legionella*, calidad y compañerismo. Gracias por transmitirme tu experiencia, tu orientación y tu confianza. Es un placer trabajar así.*

*A la **Dra Concepción Gimeno**. Mis agradecimientos van más allá que por la dirección de esta tesis. Gracias por todo tu apoyo desde el inicio de mi formación como residente. Por enseñarme, ser guía y ejemplo cuando tuve que salir de mi zona de confort. Por asesorarme y estar siempre dispuesta a ayudarme.*

Asimismo, quisiera expresar mi gratitud a todas las personas que contribuyeron con el desarrollo de mi investigación. Agradezco a todos los que me ayudaron en la ejecución de este trabajo, especialmente a Mari Carmen Bresó por su ayuda con las muestras y la recopilación de datos.

A mi familia y amigos, especialmente a mis padres y a mi hermano, quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a ser quien soy, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y superación y por estar siempre a mi lado, apoyándome incondicionalmente en todos mis proyectos.

Pero, sobre todo, gracias a mi marido y a mis hijos, por su amor, su paciencia y comprensión, por el tiempo que me han concedido, un tiempo robado a la vida familiar. Sin su apoyo este trabajo nunca se habría escrito. Os quiero.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	11
ÍNDICE DE FIGURAS	14
ÍNDICE DE TABLAS	19
INTRODUCCIÓN	28
1. LA ENFERMEDAD DEL LEGIONARIO. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA.	29
2. DESCRIPCIÓN DE <i>LEGIONELLA</i> SPP.	31
3. ECOLOGIA	34
3.1 Asociación con amebas.....	36
3.2 Asociación con biofilms	38
4. PATOGÉNESIS	40
4.1 Ciclo celular y factores de virulencia	40
4.2 Presentación clínica, diagnóstico y tratamiento.....	46
5. EPIDEMIOLOGÍA, PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA LEGIONELOSIS	58
5.1 Incidencia.....	58
5.2 Prevención y control	65
5.3 Métodos de detección en muestras de origen ambiental	80
OBJETIVOS	95
METODOLOGÍA	98
1. DESCRIPCIÓN DE LA INSTALACIÓN	99
2. MUESTRAS ANALIZADAS	99
3. IDENTIFICACIÓN Y MONITORIZACIÓN DE LOS PUNTOS CRÍTICOS.....	102
4. MUESTRAS	109
4.1 Toma de las muestras	109
4.2 Transporte y almacenamiento	110
5. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	110
5.1 Reactivos	110
4.2 Medios de cultivo	111
6. EQUIPOS Y MATERIAL	115
7. PROCEDIMIENTO	116

Tesis Doctoral Universitat de València 2024 8

7.1 Seguridad y condiciones ambientales	116
7.2 Concentración de las muestras	116
7.3 Descontaminación e inoculación en los medios de cultivo.....	117
7.4 Condiciones de incubación.....	118
7.5 Examen de las placas.....	119
7.6 Identificación de las colonias de <i>Legionella</i>	119
8. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.....	120
9. CONTROL DEL PROCEDIMIENTO	120
9.1 Control de calidad interno de los ensayos.....	121
9.2 Participación en estudios intercomparación	123
9.3 Evaluación de los resultados.....	125
10. IDENTIFICACIÓN DE SEROGRUPOS DE <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i>	125
11. GENOTIPADO DE <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> MEDIANTE SBT (SEQUENCE-BASED TYPING)	127
12. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>LEGIONELLA SPP</i>	128
12.1 Identificación por MALDI-TOF-MS.....	128
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	130
RESULTADOS	134
1. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE MUESTREO: VALIDEZ DEL USO DE PC REPRESENTATIVOS DE LOS PT	135
1.1 Análisis de los PC vs PT de la instalación con una sola determinación por cada PT	135
1.2 Análisis del uso de PC vs PT durante el período de estudio.....	162
1.3 Análisis comparativo de la instalación con una sola determinación por cada PT frente al seguimiento de los PC.....	221
2.COMPARACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE <i>LEGIONELLA SPP</i> . POR CULTIVO EN MEDIO BCYE Y GVPC EN MUESTRAS DE AGUA SANITARIA.....	223
2.1 Mejora de la sensibilidad del método al añadir el BCYE.....	223
2.2 Influencia en la sensibilidad del método según pretratamiento.....	227
2.3 Influencia en la sensibilidad del método de la presencia de otros microorganismos.	233
2.4 Influencia de la temperatura, el pH y el cloro libre en la sensibilidad del método	235
3. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	238
DISCUSIÓN.....	246
CONCLUSIONES GENERALES	256
BIBLIOGRAFÍA.....	259
ANEXOS.....	277
ANEXO 1. Distribución de los PC en la instalación a partir de 2018.....	278
ANEXO 2. Tabla F5 UNE 100030:2017	281

<i>ANEXO 3. Medios de cultivo. Norma UNE-EN-ISO 11731:2017</i>	<i>283</i>
<i>ANEXO 4. Protocolo para la preparación de la suspensión bacteriana (Lpn CECT 10⁴)</i>	<i>287</i>
<i>ANEXO 5. Material de control preparado con cepas de trabajo procedentes de colecciones de cultivo tipo: (CI positivo Lg CECT 10⁻⁴ y 10⁻⁵).....</i>	<i>289</i>
<i>ANEXO 6. Parámetros estadísticos del recuento del log del N° UFC/L obtenido de los cultivos de AS por pabellón, planta y unidad, realizando una determinación por cada PT en el mismo período de tiempo</i>	<i>292</i>
<i>ANEXO 7. Comunicaciones a congresos</i>	<i>296</i>

ABREVIATURAS

ACS	Agua caliente sanitaria
ADN	Ácido ribonucleico
ADNc	ADN cíclico
AFC	Agua fría de consumo
ARNr	Ácido desoxirribonucleico ribosómico
BAL	Lavado broncoalveolar
BAS	Broncoaspirado
BCYE	<i>Buffered charcoal yeast extract</i>
BCYEcys/Wcys	BCYE sin cisteína
BMPA	BCYE con polimixina, cefamandol y anisomicina
BOE	Boletín Oficial del Estado
c-di-GMP	Diguanilato dimérico cíclico
CCAA	Comunidades autónomas
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DGVP	BCYE selectivo (dyes, glycine, vancomycin, polimixin B)
DIL 1/10	Muestra diluida 1/10 sin tratamiento
dNTP	Desoxirribosa nucleósidos trifosfato
DOGV	Diario oficial de la Generalitat Valenciana
Dot/lcm	<i>Defective for organelle trafficking/intracellular multiplication</i>
ECDC	Centro europeo para el control y prevención de enfermedades
EDO	Enfermedad de declaración obligatoria
EEE	Espacio económico europeo
EIA/ELISA	Enzimoimmunoanálisis
ELDSNet	<i>European Legionnaire's Disease Surveillance Network</i>
EMA	Monoacida de etidio
ENR	Medio enriquecido
EPFs	Formas en fase exponencial replicativa
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EWGLI	Grupo de Trabajo Europeo para las Infecciones por <i>Legionella</i>

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

EWGLINET	Red de vigilancia para los casos de legionelosis asociada a viajes de EWGLI
FA	Filtrada con tratamiento ácido
FC	Filtrada con tratamiento por calor
FFS	Formas filamentosas
FST	Filtrada sin tratamiento
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GVPC	BCYE con Glycine, vancomycin, polymyxin B, cycloheximide
GU	Unidades genómicas
H-NOX	Unión de óxido nítrico / oxígeno
Hsp60	Heat shock protein
IF	inmunofluorescencia
IFD	Inmunofluorescencia directa
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IIF	Formas intracelulares inmaduras
ISO	International Organization for Standardization
LLAPs	" <i>Legionella</i> -like amoebal pathogens"
LPS	lipolisacárido
Lvh	<i>Legionella vir</i> homologue
MALDI-TOF-MS/MALDI-TOF	Espectrometría de masas en tiempo de vuelo, ionización y desorción láser asistida por matriz
MIF	Formas infecciosas maduras
<i>mip</i>	Potenciador de la infecciosidad de macrófagos
MOMP	<i>Major outer membrane protein</i>
MWY	Agar Wadowsky Yee modificado
NAC	Neumonía adquirida en la comunidad
NO	Óxido nítrico
PC	Punto crítico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMA	Monoacida de propidio
PPCL	Plan de prevención y control de <i>Legionella</i>
PSL	Paln sanitario frente a <i>Legionella</i>
PT	Punto terminal
QS	Quorum sensing
QX	Quirúrgico

RENAVE	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica de España
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RIA	Radioinmunoensayo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPF	Formas de la fase replicativa
Rtx	<i>Repeats-in-toxin</i>
SBT	<i>Sequence-based-typing</i>
Sg	Serogrupo
SPFs	Formas en fase estacionaria
ST	Sin tratamiento
TA	Tratamiento ácido
TALD	Travel associated Legionnaires' disease
TC	Tratamiento con calor
UA	Antígeno urinario
UE	Unión Europea
UFC	Unidades formadoras de colonias
UK	United Kingdom /Reino Unido
UNE	Asociación Española de Normalización
VBNC	Células viables no cultivables

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 EJEMPLOS GRÁFICOS DE CÓMO EL NÚMERO DE FORMAS Y SUS DIFERENTES CONEXIONES DEFINEN DIFERENTES TIPOS DE CICLOS DE DESARROLLO, O UNA RED DE DESARROLLO. (A) CICLO BIFÁSICO EN EL CUAL DOS FORMAS SENCILLAS ALTERNAN UNA CON OTRA. (B) CICLO MULTIFÁSICO MOSTRANDO CUATRO FORMAS QUE DAN LUGAR UNAS A OTRAS DE FORMA SECUENCIAL. (C) RED DE DESARROLLO CON CINCO FORMAS CUYAS RELACIONES NO SON LINEALES. LA RED DE DESARROLLO DE <i>L.PNEUMOPHILA</i> INCLUYE 14 FORMAS RECONOCIDAS HASTA LA FECHA, RELACIONADAS DE UN MODO NO LINEAL, HACIENDO LA RED ALTAMENTE COMPLEJA.	41
FIGURA 2. RESUMEN ESQUEMÁTICO DE LOS ESTADOS MORFOLÓGICOS DE <i>L. PNEUMOPHILA</i> DURANTE SU CICLO DE CRECIMIENTO.	45
FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN DE CASOS POR MES DE ENFERMEDAD DEL LEGIONARIO EN PAÍSES DE LA UE/EEA DURANTE 2017 Y EL PERÍODO 2013-2016.	59
FIGURA 4. DISTRIBUCIÓN DE CASOS POR MES DE ENFERMEDAD DEL LEGIONARIO EN PAÍSES DE LA UE/EEA DURANTE 2021 Y EL PERÍODO 2017-2011. TOMADO DE: <i>EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. LEGIONNAIRES' DISEASE. IN: ECDC. ANNUAL EPIDEMIOLOGICAL REPORT FOR 2021. STOCKHOLM: ECDC; 2023(203)</i>	61
FIGURA 5. LEGIONELOSIS. INCIDENCIA POR 100.000 HABITANTES. ESPAÑA. AÑOS 1997-2011. EXTRAÍDA DE BROTES DE LEGIONELOSIS NOTIFICADOS A LA RED NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA. AÑOS 1999 A 2011. HTTP://WWW.ISCIII.ES/ISCIII/ES/CONTENIDOS/FD-SERVICIOS-CIENTIFICO-TECNICOS/FD-VIGILANCIAS-ALERTAS/FD-ENFERMEDADES/LEGIONELOSIS__BROTES_1999-2011.PDF	63
FIGURA 6. ATLAS DE VIGILANCIA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS. ECDC. TOMADO DE: HTTPS://ATLAS.ECDC.EUROPA.EU/PUBLIC/INDEX.ASPX EL 01/06/2020(207).....	63
FIGURA 7. LEGIONELOSIS, TASAS DE NOTIFICACIÓN POR 100.000 HABITANTES SEGÚN EL AÑO DE INICIO SÍNTOMAS Y EL SEXO. ESPAÑA, AÑOS 2012 A 2021. TOMADO DE: INFORME EPIDEMIOLÓGICO SOBRE LA SITUACIÓN DE LEGIONELOSIS EN ESPAÑA. AÑO 2021. CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGÍA. INSTITUTO DE SALUD CARLOS III.(208)	64
FIGURA 8. ANEXO I DEL RD 487/2022 EN EL QUE SE DESCRIBEN LAS INSTALACIONES SUSCEPTIBLES DE CONVERTIRSE EN FOCOS DE EXPOSICIÓN HUMANA A LA BACTERIA Y, POR TANTO, DE PROPAGACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE LA LEGIONELOSIS DURANTE SU FUNCIONAMIENTO, PRUEBAS DE SERVICIO O MANTENIMIENTO	69
FIGURA 9. ESQUEMA GENERAL DEL PLAN DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA <i>LEGIONELLA</i> (PPCL). NORMA UNE 100030:2017(210).	71
FIGURA 10. PUNTOS DE TOMA DE MUESTRA EN FUNCIÓN DE LOS PUNTOS TERMINALES EN INSTALACIONES DE ACS.	76
Tesis Doctoral Universitat de València 2024	14

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

FIGURA 11. TEMPERATURA MEDIA DE ALGUNAS INSTALACIONES Y SU EFECTO SOBRE <i>LEGIONELLA</i> SPP.	80
FIGURA 12 . MATRIZ DE DECISIÓN PARA LA ELECCIÓN DEL MÉTODO PARA EL CULTIVO DE <i>LEGIONELLA</i> SSP.(ANEXO J).....	88
FIGURA 13. ELECCIÓN DEL MÉTODO UTILIZADO PARA EL RECuento DE <i>LEGIONELLA</i> SPP. NORMA UNE- EN ISO 11731:2017. (ST: SIN TRATAMIENTO; TA: TRATAMIENTO ÁCIDO; TC: TRATAMIENTO CON CALOR; AB: ANTIBIÓTICO; A+C: ÁCIDO MÁS CALOR). ADAPTADO DEL ANEXO J DE LA NORMA UNE- EN ISO 11731:2017. EN SOMBRADO VERDE SE INDICA EL PROCEDIMIENTO ANALIZADO EN ESTE OBJETIVO.....	84
FIGURA 14. REPRESENTACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LA INSTALACIÓN Y LA LOCALIZACIÓN DE LOS PC DE LOS PABELLONES A, B Y C.....	101
FIGURA 15. NÚMERO DE PUNTOS TERMINALES DE LA INSTALACIÓN Y NÚMERO DE PUNTOS CRÍTICOS ANALIZADOS.....	102
FIGURA 16. NÚMERO DE MUESTRAS ANALIZADAS POR PABELLÓN.	103
FIGURA 17. DATOS ACUMULADOS DE LAS MEDICIONES DE LOS PUNTOS CRÍTICOS DEL PABELLÓN A..	106
FIGURA 18. DATOS ACUMULADOS DE LAS MEDICIONES DE LOS PUNTOS CRÍTICOS DEL PABELLÓN B..	107
FIGURA 19. DATOS ACUMULADOS DE LAS MEDICIONES DE LOS PUNTOS CRÍTICOS DEL PABELLÓN C..	108
FIGURA 20. REPRESENTACIÓN LOGARÍTMICA DEL NÚMERO DE UFC/L INFORMADOS FRENTE A LA FRECUENCIA DE LOS INFORMES. LA VARIABLE QUE RECOGE EL NÚMERO DE UFC/L NO ES UNA VARIABLE NORMAL YA QUE ESTÁ TRUNCADA A CERO.	131
FIGURA 21. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA</i> SPP. EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR LA INSTALACIÓN COMPLETA, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	136
FIGURA 22. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA</i> SPP. EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL PABELLÓN A, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	137
FIGURA 23. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA</i> SPP. EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL PABELLÓN B, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	139
FIGURA 24. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA</i> SPP. EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL PABELLÓN C, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	140
FIGURA 25. RESUMEN DE CONTRASTE DE HIPÓTESIS DEL ANÁLISIS DE LOS DATOS DEL PABELLÓN QX, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	141
FIGURA 26. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA</i> SPP. EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL PABELLÓN QX, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	142
FIGURA 27. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA</i> SPP. EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL SEGUNDO PISO DEL PABELLÓN A,	

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	146
FIGURA 28. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL TERCER PISO DEL PABELLÓN B, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	151
FIGURA 29. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L INFORMADOS EN LOS PUNTOS CRÍTICOS Y LOS PUNTOS TERMINALES.	163
FIGURA 30. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL PABELLÓN A, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	164
FIGURA 31. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL PABELLÓN B, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	166
FIGURA 32. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL PABELLÓN C, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	167
FIGURA 33. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL PABELLÓN QX, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	169
FIGURA 34. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL SÓTANO DEL PABELLÓN A, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	170
FIGURA 35. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL SEGUNDO PISO DEL PABELLÓN A, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	173
FIGURA 36. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL SEGUNDO PISO DEL PABELLÓN C, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	180
FIGURA 37. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL SECTOR A22, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	194
FIGURA 38. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL SECTOR B14, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	207
FIGURA 39. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL SECTOR B31, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	211

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

FIGURA 40. DISTRIBUCIÓN DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> EN LOS PUNTOS TERMINALES Y EN LOS PUNTOS CRÍTICOS AL ANALIZAR EL SECTOR C32, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	220
FIGURA 41. DISTRIBUCIÓN GLOBAL DEL N° DE UFC/L INFORMADAS EN EL MEDIO DE MÁXIMO RECUENTO.	223
FIGURA 42. PORCENTAJE DE VECES EN LAS QUE CADA MEDIO DE CULTIVO HA RESULTADO SER EL ÓPTIMO (MEDIO MÁXIMO RECUENTO).	224
FIGURA 43. MEDIANA DEL N° UFC/L EN BCYE (ENR) Y GVPC CUANDO SE UTILIZAN PARA REALIZAR EL CONTAJE AL SER EL MEDIO DE MÁXIMO RECUENTO.....	225
FIGURA 44. COMPARACIÓN DE LAS DISTRIBUCIONES DEL N° DE COLONIAS PARA AMBOS MEDIOS DE CULTIVO.	226
FIGURA 45. COMPARACIÓN DE LAS DISTRIBUCIONES DEL N° DE COLONIAS PARA AMBOS MEDIOS DE CULTIVO AMPLIANDO LA ZONA DE LA MEDIANA (ENR=BCYE).....	227
FIGURA 46. PORCENTAJE DEL NÚMERO DE MUESTRAS INFORMADAS EN BCYE CON CADA UNO DE LOS PRETRATAMIENTOS UTILIZADOS (BCYE=ENR).....	228
FIGURA 47. PORCENTAJE DEL NÚMERO DE MUESTRAS INFORMADAS EN GVPC CON CADA UNO DE LOS PRETRATAMIENTOS UTILIZADOS.....	229
FIGURA 48. DISTRIBUCIÓN DEL NÚMERO DE UFC/L INFORMADOS EN BCYE EN FUNCIÓN DEL PRETRATAMIENTO UTILIZADO. (ENR=BCYE).....	230
FIGURA 49. DISTRIBUCIÓN DEL NÚMERO DE UFC/L INFORMADOS EN GVPC EN FUNCIÓN DEL PRETRATAMIENTO UTILIZADO.	231
FIGURA 50. DISTRIBUCIÓN DEL NÚMERO DE UFC/L INFORMADOS EN GVPC EN FUNCIÓN DEL PRETRATAMIENTO UTILIZADO, ELIMINANDO LOS VALORES EXTREMOS.	232
FIGURA 51. PORCENTAJE DE VECES QUE EL RECUENTO MÁXIMO LO DETECTA CADA MEDIO DE CULTIVO (ENR= BCYE).	234
FIGURA 52. DISTRIBUCIONES DE LAS CANTIDADES DE COLONIAS QUE SE HAN INFORMADO EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE FLORA.	234
FIGURA 53. DISTRIBUCIONES DE LAS CANTIDADES DE COLONIAS QUE SE HAN INFORMADO EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE FLORA ELIMINANDO EL 5% DE VALORES EXTREMOS (RECUENTOS POR ENCIMA DE 190.000 QUE ES EL PERCENTIL 95 DE LA DISTRIBUCIÓN).	235
FIGURA 54. CORRELACIÓN DE LA TEMPERATURA Y EL NÚMERO DE UFC/L INFORMADOS.....	238
FIGURA 55. DISTRIBUCIÓN DE CULTIVOS PUROS Y MIXTOS DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> EN EL TOTAL DE MUESTRAS POSITIVAS.	238
FIGURA 56. DISTRIBUCIÓN DEL PORCENTAJE DE ESPECIES DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> IDENTIFICADAS POR AGLUTINACIÓN EN LÁTEX.....	239
FIGURA 57. DISTRIBUCIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> IDENTIFICADAS POR MALDI-TOF-MS.	239
FIGURA 58. DISTRIBUCIÓN DE LAS ST ANALIZADAS EN EL PERÍODO DE ESTUDIO.....	240
FIGURA 59. DISTRIBUCIÓN DE ST POR PABELLONES.	241
FIGURA 60. DISTRIBUCIÓN DE ST POR AÑOS EN TODA LA RED DE AGUA ESTUDIADA.....	243

FIGURA 61. DISTRIBUCIÓN DE ST POR AÑOS EN EL PABELLÓN A.	244
FIGURA 62. DISTRIBUCIÓN DE ST POR AÑOS EN EL PABELLÓN B.	244
FIGURA 63. DISTRIBUCIÓN DE ST POR AÑOS EN EL PABELLÓN C.	244

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. ESPECIES Y SEROGRUPOS DE <i>LEGIONELLA</i> SPP.Y SU PATOGENICIDAD EN HUMANOS.	33
TABLA 2. FORMAS DE DESARROLLO DE <i>L. PNEUMOPHILA</i> IDENTIFICADAS Y PUBLICADAS HASTA LA FECHA.	42
TABLA 3. FACTORES DE RIESGO PARA LA ADQUISICIÓN DE LA INFECCIÓN POR <i>LEGIONELLA</i> SPP.	47
TABLA 4. DISTRIBUCIÓN DE CASOS Y RATIOS DE ENFERMEDAD DEL LEGIONARIO EN PAÍSES DE LA UE/EEA.....	62
TABLA 5. CLASIFICACIÓN DE LAS INSTALACIONES DE RIESGO DE <i>LEGIONELLA</i> SPP. SEGÚN RD865/2003.....	68
TABLA 6. DESCRIPCIÓN DE LA INSTALACIÓN A ESTUDIO. DISTRIBUCIÓN DE PUNTOS TERMINALES Y PUNTOS CRÍTICOS. PORCENTAJE DE PUNTOS ANALIZADOS DEL TOTAL DE LA INSTALACIÓN.	105
TABLA 7. CONTROL DE MEDIOS Y CEPAS A UTILIZAR PARA COMPROBAR LA PRODUCTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO SEGÚN EL ANEXO F DE LA UNE-EN ISO 11133.....	113
TABLA 8. CONTROL DE MEDIOS Y CEPAS A UTILIZAR PARA COMPROBAR LA SELECTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO SEGÚN EL ANEXO F DE LA UNE-EN ISO 11133.....	114
TABLA 9. VARIABLES REGISTRADAS PARA LA REALIZACIÓN DE LA BASE DE DATOS UTILIZADA PARA EL ESTUDIO ESTADÍSTICO.	130
TABLA 10. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DE LA INSTALACIÓN COMPLETA, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	135
TABLA 11. PABELLÓN = A PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	137
TABLA 12. PABELLÓN = B. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	138
TABLA 13. PABELLÓN = C. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN C, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	139
TABLA 14. PABELLÓN = QUIRÚRGICO. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN QX, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	141
TABLA 15. PABELLÓN A, PLANTA S. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A PLANTA SÓTANO, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	143
TABLA 16. PABELLÓN A, PLANTA BAJA. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A PLANTA BAJA, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	144
TABLA 17. PABELLÓN A, PLANTA 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A PLANTA 1, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	145

TABLA 18. PABELLÓN A, PLANTA 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A PLANTA 2, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	146
TABLA 19. PABELLÓN A, PLANTA 3. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A PLANTA 3, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	147
TABLA 20. PABELLÓN B, PLANTA B. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B PLANTA BAJA, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	148
TABLA 21. PABELLÓN B, PLANTA 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B PLANTA PRIMERA, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	149
TABLA 22. PABELLÓN B, PLANTA 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B PLANTA SEGUNDA, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	150
TABLA 23. PABELLÓN B, PLANTA 3. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B PLANTA TERCERA, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	151
TABLA 24. PABELLÓN C, PLANTA SÓTANO. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A PLANTA 3, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	152
TABLA 25. PABELLÓN C, PLANTA B. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B PLANTA BAJA, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	153
TABLA 26. PABELLÓN B, PLANTA 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN C PLANTA PRIMERA, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	153
TABLA 27. PABELLÓN C, PLANTA 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN C PLANTA SEGUNDA, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	154
TABLA 28. PABELLÓN C, PLANTA 3. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN C PLANTA TERCERA, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	155
TABLA 29. PABELLÓN C, PLANTA 4. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN C PLANTA CUARTA, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	156
TABLA 30. PABELLÓN QX, PLANTA SÓTANO. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN QX PLANTA SÓTANO, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	157

TABLA 31. RESUMEN DE CONTRASTES DE HIPÓTESIS DE LA PRUEBA U DE MANN WHITNEY PARA LAS MUESTRAS DEL SÓTANO DEL PABELLÓN QX.	157
TABLA 32. PABELLÓN QX, PLANTA B. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN QX PLANTA BAJA, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	158
TABLA 33. RESUMEN DE CONTRASTES DE HIPÓTESIS DE LA PRUEBA U DE MANN WHITNEY PARA LAS MUESTRAS DE LA PLANTA BAJA DEL PABELLÓN QX.	159
TABLA 34. PABELLÓN QX, PLANTA 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN QX PLANTA PRIMERA, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	159
TABLA 35. RESUMEN DE CONTRASTES DE HIPÓTESIS DE LA PRUEBA U DE MANN WHITNEY PARA LAS MUESTRAS DE LA PRIMERA PLANTA DEL PABELLÓN QX.	160
TABLA 36. PABELLÓN QX, PLANTA 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN QUIRÚRGICO PLANTA SEGUNDA, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	160
TABLA 37. RESUMEN DE CONTRASTES DE HIPÓTESIS DE LA PRUEBA U DE MANN WHITNEY PARA LAS MUESTRAS DE LA SEGUNDA PLANTA DEL PABELLÓN QX.	161
TABLA 38. PABELLÓN QX, PLANTA 4. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN QX PLANTA CUARTA, REALIZANDO UNA DETERMINACIÓN POR CADA PUNTO TERMINAL EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO.	161
TABLA 39. COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> DETECTADOS EN LOS PUNTOS CRÍTICOS Y EN LOS PUNTOS TERMINALES A LO LARGO DEL TIEMPO.	162
TABLA 40. COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL LOG DEL NÚMERO DE UFC/L DE <i>LEGIONELLA SPP.</i> DETECTADOS EN LOS PUNTOS CRÍTICOS Y EN LOS PUNTOS TERMINALES A LO LARGO DEL TIEMPO EN EL PABELLÓN A.	164
TABLA 41. PABELLÓN = B. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	165
TABLA 42. PABELLÓN = C. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN C, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	167
TABLA 43. PABELLÓN = QUIRÚRGICO. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN QX, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	168
TABLA 44. PABELLÓN A, PLANTA S. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A PLANTA SÓTANO, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	169
TABLA 45. PABELLÓN A, PLANTA BAJA. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A PLANTA BAJA, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	171

TABLA 46. PABELLÓN A, PLANTA 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A PLANTA 1, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	172
TABLA 47. PABELLÓN A, PLANTA 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A PLANTA 2, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	172
TABLA 48. PABELLÓN A, PLANTA 3. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A PLANTA 3, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	174
TABLA 49. PABELLÓN B, PLANTA B. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B PLANTA BAJA, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	174
TABLA 50. PABELLÓN B, PLANTA 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B PLANTA PRIMERA, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	175
TABLA 51. PABELLÓN B, PLANTA 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B PLANTA SEGUNDA, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	176
TABLA 52. PABELLÓN B, PLANTA 3. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B PLANTA TERCERA, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	177
TABLA 53. PABELLÓN C, PLANTA SÓTANO. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A PLANTA 3, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	178
TABLA 54. PABELLÓN C, PLANTA B. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B PLANTA BAJA, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	178
TABLA 55. PABELLÓN B, PLANTA 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN C PLANTA PRIMERA, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	179
TABLA 56. PABELLÓN C, PLANTA 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN C PLANTA SEGUNDA, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	180
TABLA 57. PABELLÓN C, PLANTA 3. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN C PLANTA TERCERA, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	181
TABLA 58. PABELLÓN C, PLANTA 4. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN C PLANTA CUARTA, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	182

TABLA 59. PABELLÓN QX, PLANTA SÓTANO. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN QX PLANTA SÓTANO, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	183
TABLA 60. PABELLÓN QX, PLANTA B. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN QX PLANTA BAJA, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	184
TABLA 61. PABELLÓN QX, PLANTA 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN QX PLANTA PRIMERA, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	185
TABLA 62. PABELLÓN QX, PLANTA 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN QUIRÚRGICO PLANTA SEGUNDA, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	186
TABLA 63. PABELLÓN QX, PLANTA 4. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN QX PLANTA CUARTA, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	186
TABLA 64. PABELLÓN A, PLANTA BAJA, UNIDAD 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A, PLANTA BAJA, UNIDAD 2, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	187
TABLA 65. PABELLÓN A, PLANTA BAJA, UNIDAD 3. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A, PLANTA BAJA, UNIDAD 3, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	188
TABLA 66. PABELLÓN A, PLANTA 1, UNIDAD 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A, PLANTA PRIMERA, UNIDAD 1, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	189
TABLA 67. PABELLÓN A, PLANTA 1, UNIDAD 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A, PLANTA PRIMERA, UNIDAD 2, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	190
TABLA 68. PABELLÓN A, PLANTA 1, UNIDAD 3. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A, PLANTA PRIMERA, UNIDAD 3, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	191
TABLA 69. PABELLÓN A, PLANTA 1, UNIDAD 4. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A, PLANTA PRIMERA, UNIDAD 4, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	192
TABLA 70. PABELLÓN A, PLANTA 2, UNIDAD 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A, PLANTA SEGUNDA, UNIDAD 1, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	193
TABLA 71. PABELLÓN A, PLANTA 2, UNIDAD 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A, PLANTA SEGUNDA, UNIDAD 2, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.....	194

TABLA 72. PABELLON A, PLANTA 2, UNIDAD 3. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A, PLANTA SEGUNDA, UNIDAD 3, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	195
TABLA 73. PABELLON A, PLANTA 2, UNIDAD 4. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A, PLANTA SEGUNDA, UNIDAD 4, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	196
TABLA 74. PABELLON A, PLANTA 3, UNIDAD 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A, PLANTA TERCERA, UNIDAD 1, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	197
TABLA 75. PABELLON A, PLANTA 3, UNIDAD 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A, PLANTA TERCERA, UNIDAD 2, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	198
TABLA 76. PABELLON A, PLANTA 3, UNIDAD 3. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A, PLANTA TERCERA, UNIDAD 3, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	199
TABLA 77. PABELLON A, PLANTA 3, UNIDAD 4. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN A, PLANTA TERCERA, UNIDAD 4, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	200
TABLA 78. PABELLON B, PLANTA B, UNIDAD 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, PLANTA BAJA, UNIDAD 1, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	200
TABLA 79. PABELLON B, PLANTA B, UNIDAD 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, PLANTA BAJA, UNIDAD 2, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	201
TABLA 80. PABELLON B, PLANTA B, UNIDAD 3. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, PLANTA BAJA, UNIDAD 3, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	202
TABLA 81. PABELLON B, PLANTA B, UNIDAD 4. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, PLANTA BAJA, UNIDAD 4, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	203
TABLA 82. PABELLON B, PLANTA 1, UNIDAD 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, PLANTA PRIMERA, UNIDAD 1, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	204
TABLA 83. PABELLON B, PLANTA 1, UNIDAD 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, PLANTA PRIMERA, UNIDAD 2, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	205
TABLA 84. PABELLON B, PLANTA 1, UNIDAD 3. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, PLANTA PRIMERA, UNIDAD 3, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	206

TABLA 85. PABELLON B, PLANTA 1, UNIDAD 4. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, PLANTA PRIMERA, UNIDAD 4, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	206
TABLA 86. PABELLON B, PLANTA 2, UNIDAD 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, PLANTA SEGUNDA, UNIDAD 2, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	208
TABLA 87. PABELLON B, PLANTA 2, UNIDAD 3. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, PLANTA SEGUNDA, UNIDAD 3, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	209
TABLA 88. PABELLON B, PLANTA 2, UNIDAD 3. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, PLANTA SEGUNDA, UNIDAD 4, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	210
TABLA 89. PABELLON B, PLANTA 3, UNIDAD 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, PLANTA TERCERA, UNIDAD 1, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	211
TABLA 90. PABELLON B, PLANTA 3, UNIDAD 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, PLANTA TERCERA, UNIDAD 2, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	212
TABLA 91. PABELLON B, PLANTA 3, UNIDAD 3. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, PLANTA TERCERA, UNIDAD 3, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	213
TABLA 92. PABELLON B, PLANTA 3, UNIDAD 4. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN B, PLANTA TERCERA, UNIDAD 4, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	214
TABLA 93. PABELLON C, PLANTA 1, UNIDAD 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN C, PRIMERA PLANTA, UNIDAD 1, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	215
TABLA 94. PABELLÓN C, PLANTA 1, UNIDAD 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN C, PRIMERA PLANTA, UNIDAD 2, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	216
TABLA 95. PABELLON C, PLANTA 2, UNIDAD 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN C, SEGUNDA PLANTA, UNIDAD 1, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	217
TABLA 96. PABELLON C, PLANTA 2, UNIDAD 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN C, SEGUNDA PLANTA, UNIDAD 2, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	218
TABLA 97. PABELLON C, PLANTA 3, UNIDAD 1. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN C, TERCERA PLANTA, UNIDAD 1, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	218

TABLA 98. PABELLON C, PLANTA 3, UNIDAD 2. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL ANÁLISIS DEL PABELLÓN C, PLANTA TERCERA, UNIDAD 2, REALIZANDO DETERMINACIONES REPETIDAS DE CADA PUNTO TERMINAL A LO LARGO DEL TIEMPO.	220
TABLA 99. (A) PARÁMETROS ESTADÍSTICOS OBTENIDOS DEL ESTUDIO DE LA INSTALACIÓN EN EL PERÍODO 2006-2018 Y DISTRIBUCIÓN DE LAS MEDIANAS DE LOS PC Y PT DE LA INSTALACIÓN ESTUDIADA EN EL PERÍODO 2006-2018. (B) PARÁMETROS ESTADÍSTICOS OBTENIDOS DEL ESTUDIO DE LA INSTALACIÓN COMPLETA EN UN MOMENTO DETERMINADO Y DISTRIBUCIÓN DE LAS MEDIANAS DE LOS PC Y PT DEL ESTUDIO DE LA INSTALACIÓN COMPLETA EN UN MOMENTO DETERMINADO.....	222
TABLA 100. INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO Y DEL PRETRATAMIENTO UTILIZADO EN LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.	224
TABLA 101. COMPARACIÓN DE LA MEDIANA DEL Nº DE UFC/L INFORMADO EN BCYE Y GVPC	225
TABLA 102 INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN MEDIO BCYE. FA= TRATAMIENTO ÁCIDO; FC= TRATAMIENTO CALOR; FST= SIN TRATAMIENTO.	228
TABLA 103. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN MEDIO GVPC.	229
TABLA 104. MEDIANA DEL NÚMERO DE COLONIAS INFORMADAS EN FUNCIÓN DEL PRETRATAMIENTO UTILIZADO EN BCYE.	230
TABLA 105. MEDIANA DEL NÚMERO DE COLONIAS INFORMADAS EN FUNCIÓN DEL PRETRATAMIENTO UTILIZADO EN GVPC.	231
TABLA 106. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN EL NÚMERO DE UFC/L INFORMADOS EN EL MEDIO BCYE EXCEPTUANDO EL PRETRATAMIENTO DIL 1/10.	232
TABLA 107. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN EL NÚMERO DE UFC/L INFORMADOS EN EL MEDIO GVPC EXCEPTUANDO EL PRETRATAMIENTO DIL 1/10.....	233
TABLA 108. INFLUENCIA DEL CLORO LIBRE, TEMPERATURA Y PH EN LA MEDIANA DEL NÚMERO DE UFC/L INFORMADO EN AMBOS MEDIOS DE CULTIVO.	236
TABLA 109. P- VALOR DE LAS PRUEBAS DE COMPARACIÓN DE DISTRIBUCIONES DE M-W DEL ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, EL PH Y EL CLORO EN LA SENSIBILIDAD DE LOS MÉTODOS.	237
TABLA 110. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE LAS DISTRIBUCIONES DEL NÚMERO DE COLONIAS DETECTADAS CON CADA UNO DE LOS PARÁMETROS (PH, TEMPERATURA Y CLORO).	237
TABLA 111. DISTRIBUCIÓN DE ST POR AÑO DE ESTUDIO Y PABELLÓN.	241
TABLA 112. DISTRIBUCIÓN DE LAS ST POR PABELLONES Y SECTORES EN LOS PABELLONES A, B Y C. (SC=SALA DE CALDEAS).	242

INTRODUCCIÓN

1. LA ENFERMEDAD DEL LEGIONARIO. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA.

La enfermedad de los legionarios, o legionelosis pulmonar, es una enfermedad neumónica aguda causada por un bacilo gramnegativo del género *Legionella*. El término legionelosis se refiere a los dos síndromes clínicos causados por las bacterias del género *Legionella*. La fiebre de Pontiac es un proceso agudo, febril y de evolución limitada estrechamente relacionada con especies del género *Legionella* spp. Legionelosis es el término que engloba todas las enfermedades causadas por las bacterias del género *Legionella*, como la propia legionelosis pulmonar, las infecciones focales no pulmonares y la Fiebre de Pontiac (1).

La enfermedad de los legionarios fue identificada inicialmente en 1976, cuando se produjo un brote de neumonía en un hotel de Filadelfia en el que se celebraba una reunión de la *American Legion Convention*. Inicialmente, no se detectó la causa de la infección. El estudio epidemiológico determinó que se trataba de una enfermedad de transmisión aérea cuyo foco de infección era el hotel donde se había celebrado la reunión. Unos meses después McDade y Shepard publicaron el descubrimiento del agente etiológico y lo relacionaron con una bacteria que causó brotes anteriores, *Legionella pneumophila* (2). No obstante, ni la bacteria ni la enfermedad resultaron ser nuevos, ya que el primer caso conocido de enfermedad del legionario data de 1957 (3). Las primeras cepas de *Legionella* spp. se aislaron a partir de cobayas usando técnicas de aislamiento de *Rickettsia* s(2). En primer lugar, se aisló por Tatlock en 1943 y por Jackson *et. al* en 1947(4). En 1954, Drozanski aisló una bacteria que infectaba amebas de vida libre en Polonia(5). Este microorganismo se clasificó como especie de *Legionella* spp. en 1996(6).

La fiebre de Pontiac se describió también en relación con las cepas aisladas en un brote de fiebre de corta duración y sin foco aparente que había afectado en 1968 a personal sanitario y visitantes del *Oakland County Health Department de Pontiac* (Michigan).

Desde 1976 son numerosos los brotes descritos de enfermedad de los legionarios, como el ocurrido en Holanda en 1999 en el transcurso de una exposición floral con 106 casos confirmados(7). Un año más tarde, en abril del año 2000, se confirmaron 125 casos en Melbourne, Australia, relacionados con el agua de un acuario(8). En octubre de 2014 se declaró un brote en Portugal con 377 casos declarados y 14 muertes (9). Los investigadores consideraron que las temperaturas excesivamente cálidas durante octubre de 2014 pudieron haber jugado un papel en la proliferación de especies de *Legionella* spp. en los sistemas de torres de enfriamiento. El episodio se exacerbó aún más por la alta humedad relativa y una inversión térmica que limitó la dispersión bacteriana(10). En diciembre de 2015 en Manzanares, Ciudad Real, España, se declaró un brote de *Legionella* spp. y se cerró el 03 de febrero de 2016. El número de casos declarados fue de 593 con 277 casos confirmados pudiendo considerarse como uno de los brotes con mayor tasa de ataque(11). En la Unión Europea, en 2012, se comunicaron un total de 5.856 casos en 30 países(12), mientras que en el año 2018 el número de casos ascendió a 11343. En España en el año 2012 se declararon 972 casos frente a los

1513 detectados en 2018(13). Diversos autores alertan de la relación entre el aumento de temperaturas debido al cambio climático y el incremento de casos de legionelosis (14,15).

En España Boyd *et al.* describieron de forma retrospectiva un pequeño brote de enfermedad de los legionarios en 5 turistas escoceses alojados en un hotel de Benidorm en 1973 (16). Posteriormente, se han registrado otros brotes como el de Almuñécar en 1991 con 91 casos(17), Alcalá de Henares en el año 1997 con 224 casos(18) o Barcelona con 54 casos en el año 2000(19). Fue a partir del año 2001, tras un brote declarado en Murcia con 449 casos confirmados y unos 800 sospechosos(20), cuando la legionelosis se convirtió en uno de los problemas prioritarios de salud pública en España. El Ministerio de Sanidad y Consumo publicó, con el respaldo de la Comisión de Salud Pública, el primer Real Decreto (RD) de prevención y control de la legionelosis, como normativa básica del estado (RD 909/2001 del 27 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis)(21) que, posteriormente fue sustituido por el RD 865/2003, de 4 de julio (22) y este ha sido derogado por el RD 487/2022(23).

En 1986, se creó el Grupo de Trabajo Europeo para las Infecciones por *Legionella* (EWGLI) para permitir la colaboración internacional en toda Europa en lo que respecta a la enfermedad de los legionarios. EWGLI introdujo el Plan Europeo de Vigilancia para la Enfermedad de los Legionarios Asociados a Los Viajes, que más tarde llegó a ser conocido como EWGLINET. El plan fue coordinado por el Laboratorio Nacional de Bacteriología de Estocolmo y financiado por la OMS hasta 1993, cuando la coordinación se transfirió al Centro de Vigilancia de Enfermedades Transmisibles del Servicio de Salud Pública en Londres y la Comisión Europea se convirtió en la principal fuente de apoyo financiero. Entre 2007 y 2010, EWGLINET fue financiado por ECDC. Desde abril de 2010, está coordinado por la ECDC y el nombre del plan cambió a *European Legionnaires' Disease Surveillance Network* (ELDSNet). Los procedimientos operativos del régimen de vigilancia de la enfermedad del legionario asociado a los viajes en la UE/EEE se actualizaron en diciembre de 2017(24). El objetivo de estos procedimientos es ofrecer un enfoque normalizado a la notificación de casos por los Estados miembros de la Unión Europea y otros países contribuyentes con el fin de detectar y responder a grupos de enfermedades de legionarios asociados a viajes (TALD)(25).

2. DESCRIPCIÓN DE *LEGIONELLA* SPP.

En el año 1979, los estudios de hibridación ADN-ADN realizados por Brenner demostraron que el agente etiológico de la enfermedad de los legionarios constituía un nuevo género bacteriano, el género *Legionella* spp., que fue incluido dentro de la familia *Legionellaceae*(26). Y apareció en la lista de nombres de bacterias en 1980(27).

La familia *Legionellaceae* está compuesta por un único género, *Legionella*, que comprende 58 especies y más de 70 serogrupos distintos (<http://www.bacterio.net/Legionella.html>). El estudio del medio ambiente ha permitido el descubrimiento de nuevas especies y es muy probable que el número de especies y serogrupos continúe aumentando; aunque no todas causan patología. Entre ellas destaca *Legionella pneumophila*, la primera especie descrita, que comprende 16 serogrupos. En la tabla 1 se muestran las especies y serogrupos de *Legionella* spp. y su patogenicidad en humanos.

La familia *Legionellaceae* está estrechamente relacionada con la familia *Coxiellaceae*, y estas dos familias comprenden el “propuesto orden *Legionellales*” dentro de la clase *Gammaproteobacteria* y del phylum *Proteobacteria* phy.nov. *Coxiella burnetti*, el agente etiológico de la fiebre Q, comparte muchas características con *Legionella pneumophila*, que incluyen su parasitismo intracelular y estrechas homologías en varios genes de virulencia.

Algunos investigadores propusieron tres géneros separados (*Legionella*, *Fluoribacter* y *Tatlockia*) atendiendo a las características fenotípicas de algunas especies de la familia *Legionellaceae*(28)(29). Sin embargo, otros estudios basados en el análisis del ARN 16S ribosómico concluyen que la familia *Legionellaceae* forma un único grupo con una relación entre especies del 96%(30).

Los miembros de la familia *Legionellaceae* son bacilos aerobios, finos y gramnegativos que no crecen en los medios microbiológicos habituales. El medio que se utiliza para el crecimiento de *Legionella* spp. es agar taponado con extracto de levadura de carbón (*Buffered Charcoal Yeast Extract*, BCYE). Algunas especies no pueden crecer en los medios de cultivo habituales y se han llamado “*Legionella*-like amoebal pathogens” (LLAPs). Estos organismos se han aislado y mantenido mediante cocultivo de la bacteria con su hospedador protozoario. Una de las LLAPs, *Legionella lytica* ha demostrado causar enfermedad en humanos. Puede que haya otras cepas LLAPs que sean patógenos humanos, pero esto es difícil de comprobar debido a la dificultad de crecimiento en los medios convencionales de cultivo de *Legionella* spp.(4).

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

Se ha secuenciado el genoma de varias cepas de *Legionella pneumophila* serogrupo 1: entre ellas Philadelphia 1, Lens, Paris y Corby. El análisis de estas secuencias muestran que *L.pneumophila* contiene ciertos genes similares a los eucariotas, algunos de los cuales permiten a esta bacteria crear ambientes intracelulares favorables utilizando la maquinaria celular normal. También muestra que existe una diversidad genética de especies y que algunas cepas virulentas están distribuidas por todo el mundo(31)(32). Los genes que codifican la región core del lipopolisacárido y la unión del lado O predominan en los aislados clínicos de *L. pneumophila* serogrupo 1 y podría ser la razón por la que este serogrupo es la principal causa de enfermedad del legionario(32).

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS

Los miembros de la familia *Legionellaceae* son bacilos gramnegativos mesófilos, móviles (excepto *L. oakridgensis*), asacarolíticos, aerobios estrictos, de crecimiento intracelular facultativo (lisosomas y retículo endoplásmico de macrófagos), nutricionalmente exigentes, dependientes de L- cisteína, cuyo crecimiento se ve favorecido en presencia de hierro y con uniones de ácidos grasos de cadena ramificada y ubiquinonas inusuales en los bacilos gramnegativos(4). Miden de 0.3 a 0.9 µm de ancho y de 1.5 a 20 µm de longitud dependiendo del tiempo de cultivo. Se ha demostrado la presencia de uno o más flagelos en disposición polar o lateral y la presencia de fimbrias y de una estructura polisacáridica acídica extracelular(33). No obstante, en tejidos y especímenes clínicos se han observado diferentes formas cocobacilares inmóviles y una gran variedad morfológica en el interior de amebas.

Es una bacteria gramnegativa que no se tiñe con el gram por su composición lipídica(4), para su identificación utilizamos diversas técnicas de fluorescencia y alternativamente la tinción de Giménez(34) o la impregnación argéntica de Dieterle(35).

Son oxidasa variable, catalasa positiva débil, licuan la gelatina, y las reacciones de reducción de nitrato y ureasa son negativas. Se colorea mal con la tinción de Gram, por lo que se utiliza inmunofluorescencia directa (IFD) o tinciones de plata para su identificación. *L. micdadei* es débilmente ácido-alcohol-resistente. La mayoría producen beta-lactamasas y pigmento marrón que se incrementa con la adición de tirosina al medio de cultivo. Algunas especies son capaces de producir pigmentos fluorescentes. En contraste con otras bacterias acuáticas, utilizan los aminoácidos y otros compuestos orgánicos como el almidón, como principal fuente de carbono y energía(4).

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

TABLA 1. Especies y serogrupos de *Legionella* spp. y su patogenicidad en humanos.

Modificada de: German collection of microorganism and cell cultures. (http://www.dsmz.de/microorganisms/pnu/bacterial_nomenclature_info_mm.php?genus=Legionella&show_all_details=1)

+^a, relacionada con infecciones humanas; +^b, presuntamente relacionada con infecciones humanas; -, no relacionada con infecciones humanas.

Especies <i>Legionella</i>¹	de	Nº	de	Patogenicidad en humanos	Especies <i>Legionella</i>¹	de	Nº	de	Patogenicidad en humanos
		serogrupos					serogrupos		
<i>L. adelaidensis</i>		1		-	<i>L. longbeachae</i>		2		+ ^a
<i>L. anisa</i>		1		+ ^a	<i>L. lytica</i>		1		+ ^a
<i>L. beliardensis</i>		1		-	<i>L. maceachernii</i>		1		+ ^a
<i>L. birminghamensis</i>		1		+ ^a	<i>L. massiliensis</i>		1		-
<i>L. bozemanae</i>		2		+ ^a	<i>L. micdadei</i>		1		+ ^a
<i>L. bozemanii</i>		1		-	<i>L. moravica</i>		1		-
<i>L. brunensis</i>		1		-	<i>L. nagasakiensis</i>		1		+ ^a
<i>L. busanensis</i>		1		-	<i>L. nautarum</i>		1		-
<i>L. cardiaca</i>		1		+ ^a	<i>L. oakridgensis</i>		1		+ ^a
<i>L. cherrii</i>		1		-	<i>L. parisiensis</i>		1		+ ^a
<i>L. cincinnatiensis</i>		1		+ ^a	<i>L. pittsburghensis</i>		1		+ ^a
<i>L. drancourtii</i>		1		-	<i>L. pneumophila</i>		16		+ ^a
<i>L. dresdenensis</i>		1		-	<i>L. quateirensis</i>		1		-
<i>L. drozanskii</i>		1		-	<i>L. quinlivanii</i>		2		+ ^b
<i>L. dumoffii</i>		1		+ ^a	<i>L. rowbothamii</i>		1		-
<i>L. erythra</i>		1		+ ^a	<i>L. rubrilucens</i>		1		+ ^b
<i>L. fairfieldensis</i>		1		-	<i>L. sainthelensi</i>		2		+ ^a
<i>L. fallonii</i>		1		-	<i>L. santicrucis</i>		1		-
<i>L. feeleeii</i>		2		+ ^a	<i>L. shakespearei</i>		1		-
<i>L. geestiana</i>		1		-	<i>L. spiritensis</i>		2		-
<i>L. gormanii</i>		1		+ ^a	<i>L. steelei</i>		1		+ ^b
<i>L. gratiana</i>		1		-	<i>L. steigerwaltii</i>		1		-
<i>L. gresilensis</i>		1		-	<i>L. taurinensis</i>		1		-
<i>L. hackeliae</i>		2		+ ^a	<i>L. tucsonensis</i>		1		+ ^a
<i>L. impletisoli</i>		1		-	<i>L. tunisiensis</i>		1		-
<i>L. israelensis</i>		1		-	<i>L. wadsworthii</i>		1		+ ^a
<i>L. jamestowniensis</i>		1		-	<i>L. waltersii</i>		1		+ ^a
<i>L. jordanis</i>		1		+ ^a	<i>L. worsleiensis</i>		1		+ ^b
<i>L. lansingensis</i>		1		+ ^a	<i>L. yabuuchiae</i>		1		-
<i>L. londiniensis</i>		1		+ ^b					

3. ECOLOGIA

En cuanto al reservorio y fuente de infección, *Legionella* spp. es considerada una *bacteria* ambiental, ya que su nicho natural son las aguas superficiales de lagos, ríos o estanques. Desde estos reservorios naturales, la bacteria puede pasar a colonizar los sistemas de abastecimientos de las ciudades y así se incorpora a los sistemas de agua sanitaria u otros que requieran agua para su funcionamiento, especialmente en las tuberías de agua caliente y los calentadores de agua, torres de refrigeración, equipos de tratamiento respiratorio, humidificadores e instalaciones recreativas climatizadas. El agua caliente (25-40°C) y el estancamiento de esta en tuberías con escaso o ningún flujo, facilitan el desarrollo de concentraciones bacterianas elevadas. Estas instalaciones en ocasiones favorecen el estancamiento del agua y la acumulación de desechos y productos que sirven como nutrientes a la bacteria, favoreciendo así su multiplicación, a una temperatura adecuada, *hasta alcanzar concentraciones infectantes para el hombre*. Se ha encontrado *Legionella* spp. mediante cultivo en el 40% de las muestras de aguas superficiales y en el 80% mediante PCR(36). Excepto *L. longbeache* que habitualmente está presente en la tierra para abono. Esta especie es la principal causa de legionelosis en Australia y Nueva Zelanda asociada a jardineros y a personas expuestas a tierra para abono que, a diferencia de los compuestos europeos, contienen corteza de pino y serrín(37,38). *L. longbeache* parece adaptarse mejor al suelo y al material vegetal compostado que otras especies de *Legionella*(39) *L. pneumophila* se multiplica a temperaturas entre 25 y 42°C, y tiene una temperatura óptima de crecimiento de 35°C(40). La mayoría de los casos de legionelosis están asociados a medios acuáticos fabricados por el hombre donde la temperatura del agua es superior a la del medio ambiente. En estos medios el balance entre protozoos y bacterias se ve alterado, produciéndose una rápida multiplicación de *Legionella* spp., que puede transformarse en enfermedad humana. La legionelosis es una enfermedad emergente en la segunda mitad del siglo XX debido a la alteración del medio ambiente por el ser humano. En su hábitat natural, sería muy infrecuente la infección humana por *Legionella* spp.(4).

Aunque, hay un caso publicado de probable transmisión de *Legionella* spp. de persona a persona (41), la gran mayoría de la evidencia sugiere una enfermedad no transmisible. La exposición humana ocurre predominantemente a través de la inhalación de aerosoles de agua contaminada(42), lo que puede conducir a una enfermedad respiratoria neumónica(43).

La fuente de infección es desconocida en la mitad de los casos, en los brotes en que se recoge la posible causa del brote (confirma o sospecha), en el 50,83% se implicó el sistema de agua sanitaria, en 36,8% una torre de refrigeración u otros dispositivos similares como condensadores evaporativos, en 4,0% baños con movimiento y en 8,4% distintos mecanismos como humidificadores, una arqueta, una cisterna abierta, una instalación de agua de un barco, nebulizadores, etc.)(44).

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

En los últimos años ha aumentado el número de brotes asociados a ámbitos cerrados como: residencias de ancianos, distintas instituciones o colectivos, prisiones, balnearios, tanto los naturales como los urbanos, con instalaciones que utilizan agua en forma de chorros o piscinas con movimiento (spas).

La transmisión de la infección es aérea y la vía de entrada al aparato respiratorio. Se necesitan factores asociados para que se produzca la enfermedad: presencia de cepas virulentas en el ambiente, forma eficaz de diseminación de la bacteria (aerosolización), condiciones ambientales adecuadas que permitan la supervivencia e inhalación de una dosis infectante.

Actualmente se considera que otras especies de *Legionella* spp., como *L. anisa*, pueden estar implicados en brotes de legionelosis, y por lo tanto interesa la búsqueda activa en los sistemas de agua principalmente en agua sanitaria. La producción de biopelículas también se observa en las cepas de *L. pneumophila* serogrupos 2-14, que son particularmente resistentes a los procesos de desinfección del agua, lo que significa que son difíciles de erradicar del medio ambiente y del suministro de agua de los hospitales (45).

Legionella spp. presente en biopelículas y sedimentos y puede ser movilizada por el lavado de calderas, la demanda de agua, así como por la temperatura y el flujo, considerados factores de crecimiento de *Legionella* spp. (46). El estudio de la influencia de la ocupación de los edificios o de la frecuencia de descarga de las tuberías en la cantidad de *Legionella* spp. presente en los sistemas de agua potable, ha mostrado que la reducción de la demanda de agua asociada con la baja ocupación del edificio no siempre causa el crecimiento de *Legionella* spp., documentándose cambios variables en la concentración de *Legionella* spp., desde no detectarse cambios, hasta aumentos de $> 4 \log$ o disminuciones de $> 1,5 \log$ de *L. pneumophila* en períodos de baja demanda. Estos resultados demuestran que el impacto de la baja demanda de agua (coloquialmente llamado estancamiento) no es tan sencillo como generalmente se supone, y que algunas prácticas de descarga tienen posibles consecuencias no deseadas. En particular, el estancamiento debe considerarse en contexto con otros factores de crecimiento de *Legionella* spp., como la temperatura y los perfiles de flujo. Las prácticas de lavado de calderas que aumentan drásticamente el caudal y reducen rápidamente la temperatura de la caldera pueden movilizar la bacteria presente en biopelículas y sedimentos (47).

Otro factor que influye en el aumento de *Legionella* spp. es el tiempo de retención hidráulica (edad del agua) en los sistemas de agua de los edificios. Este aumento se ha asociado a la presencia de *Legionella* spp. en el 100% de las muestras analizadas de los sistemas de aguas subterráneas, así como en grifos y torres de refrigeración. Las cinco especies más frecuentes en sistemas de agua son *L. pneumophila* seguida de *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. micdadei* y *L. anisa* (48,49).

L. pneumophila es un patógeno medioambiental, y la comprensión de su ecología nos ayudará a desarrollar métodos para prevenir su diseminación en el medio ambiente y la transmisión de la legionelosis.

3.1 ASOCIACIÓN CON AMEBAS

La presencia de la bacteria en el ambiente acuático y el aumento de la temperatura del agua son dos factores que pueden aumentar el riesgo de enfermedad del Legionario. El tercer factor es la presencia de factores nutricionales que permiten el crecimiento de la bacteria. Sin embargo, los niveles nutricionales requeridos por *Legionella* spp. no suelen encontrarse en aguas superficiales, y si lo están suelen favorecer el crecimiento de otras bacterias que competirían con ella(50).

En el medio ambiente, las bacterias son objetivos de depredación por protozoos (51,52). Muchas bacterias han desarrollado estrategias para evitar la depredación o sobrevivir y, en algunos casos, replicarse dentro de los protozoos. Como las bacterias están destinadas a encontrar una gran cantidad de especies de protozoos en la naturaleza, su aptitud estará determinada por la amplitud y diversidad de protozoos dentro de los cuales pueden crecer. Aunque muchos tipos de bacterias pueden replicarse dentro de los protozoos (53), este comportamiento se caracteriza mejor en el patógeno bacteriano *Legionella* spp., en particular *Legionella pneumophila* (43).

Los huéspedes protozoarios de *Legionella* spp. se definen por dos técnicas principales: cocultivo y coaislamiento. Las técnicas de cocultivo dan información del comportamiento de la *bacteria in vitro*, mientras que en el coaislamiento intentan abordar este problema examinando la coexistencia de protozoos y *Legionella* spp. en muestras ambientales. Aunque la mayoría de los estudios de coaislamiento no proporcionan evidencia directa del crecimiento de *Legionella* spp. dentro de los protozoos identificados, pueden usarse para predecir interacciones ambientalmente relevantes, para corroborar hallazgos experimentales de técnicas de cocultivo y es probable que impliquen nuevas especies de protozoos como potenciales anfitriones de *Legionella* spp.(43).

Legionella spp. sobrevive en medios acuáticos y terrestres como parásito intracelular de protozoos de vida libre(42,54). Aunque sus interacciones con otras bacterias promueven la supervivencia de *L. pneumophila* en entornos oligotróficos, el crecimiento intracelular dentro de los protozoos es probablemente el mecanismo predominante de proliferación de *L. pneumophila* en su hábitat natural(54). Se ha demostrado su crecimiento en al menos 14 especies de amebas, 2 especies de protozoos ciliados, y en hongos mucilaginosos, mientras que el crecimiento de *Legionella* spp. en ausencia de protozoos solo se ha documentado en el laboratorio(4,42,55).

Los protozoos naturalmente presentes en los medios relacionados como fuentes de *Legionella* spp. pueden favorecer su crecimiento *in vitro* (55). Mientras que los protozoos son el hospedador natural de *Legionella* spp., la infección de las células fagocitarias humanas es oportunista(56). La comprensión de la patogénesis de *Legionella* spp. ha venido de la mano del análisis de los procesos infecciosos en protozoos y macrófagos humanos(4).

Los protozoos en ambientes naturales y artificiales pueden alterar la composición de las comunidades microbianas al eliminar las bacterias a través de la depredación o aumentar las poblaciones de bacterias que son capaces de replicarse dentro de estos organismos(43).

Tanto los análisis basados en cocultivo y en coaislamiento, pueden no estar teniendo en cuenta la totalidad de protozoos y bacterias involucrados en los ecosistemas estudiados, es por esto por lo que la metagenómica podría eludir las limitaciones inherentes a los enfoques basados en el cultivo y proporcionar un perfil más completo e imparcial de estas comunidades(43,57,58).

Si bien *L. pneumophila* tiene un amplio rango de huéspedes, el destino de la bacteria una vez que ingresa a la célula huésped puede variar mucho, desde promover su degradación a través de lisosomas, vesículas, expresión de determinantes patogénicos o ser digerido por el hospedador hasta resistir en el interior del huésped sin replicarse o favorecer la formación de quistes (59–64). Ya sea porque *L. pneumophila* resiste la depredación o bien es expulsado en gránulos, se considera que el huésped es solo parcialmente restrictivo en cuanto a la supervivencia de *L. pneumophila* y su potencial para la transición a otras células huésped. De hecho, se podría especular que tales interacciones intermedias huésped-bacteria (resistencia a la depredación de protozoos en ausencia de replicación) podrían parecerse al primer paso evolutivo para convertirse en un patógeno intracelular(43).

Está ampliamente aceptado que la capacidad de *L. pneumophila* para prosperar dentro de la biopelícula de los sistemas de plomería domésticos se basa en la utilización de protozoos huéspedes para protegerse de los factores estresantes ambientales y aumentar su tasa de crecimiento y la infectividad de la bacteria en las células huésped humanas (65–74). Los genes que regulan la secreción de proteínas y, en última instancia, las características filogenéticas de replicación efectiva dentro y fuera de las células huésped se utilizan para modelar el ciclo de vida de las bacterias. Como las bacterias tienen una infectividad limitada para los macrófagos humanos sin replicarse dentro de una célula protozoaria huésped, la replicación dentro y la salida de una célula huésped protozoaria es una parte integral del ciclo de vida de la bacteria. Hay una gran cantidad de redundancias en las funciones genéticas de *L. pneumophila*, lo que hace que la bacteria sea más resistente a los factores estresantes ambientales y adaptable a sus condiciones ambientales. Sin embargo, está claro que delecciones genéticas específicas, como

las descritas en la revisión de Mraz *et al.*, reducen la virulencia de las bacterias en la biopelícula y los sistemas de plomería de las instalaciones (75).

A pesar de la posible gravedad de los casos individuales de enfermedad, y aunque, hay un caso reportado de probable transmisión de *Legionella* spp. *de persona a persona* (41), la gran mayoría de la evidencia sugiere una enfermedad no transmisible. *Legionella* spp. no se transmite de persona a persona. Por lo tanto, desde la perspectiva del patógeno, las interacciones con las células humanas son accidentes de tiempo y espacio: callejones sin salida evolutivos sin impacto en la supervivencia a largo plazo o la trayectoria patogénica de *Legionella* spp. Entender *Legionella* spp. como patógeno es comprender su interacción con sus huéspedes naturales: los protozoos, un grupo de eucariotas unicelulares con una asombrosa cantidad de diversidad evolutiva(43).

Recientemente se ha descrito la coexistencia de *L. pneumophila* con nematodos en comunidades de biopelículas presentes en torres de enfriamiento. La investigación de las interacciones *entre Legionella* spp., nematodos y amebas subrayó la importancia de las amebas como reservorios y vehículos de transmisión del patógeno para los depredadores de nematodos. Hemmerling *et al.* subrayan la necesidad de estudios futuros para obtener una imagen más realista de la relación depredador-presa entre nematodos y *L. pneumophila* (76).

3.2 ASOCIACIÓN CON BIOFILMS

Legionella spp. sobrevive dentro de biofilms en los sistemas de agua de los edificios. La colonización y actividad microbiana asociada a las superficies, o a la formación de biofilms, aparece ampliamente descrita en los ambientes acuáticos naturales y artificiales, y en un amplio rango de tipos de superficies. En el biofilm, los microorganismos están embebidos en una matriz extracelular que proporciona estructura, estabilidad, nutrientes y protección de los posibles efectos tóxicos en el sustrato sobre los que el biofilm crece (70,77–79) . El biofilm es un mecanismo de resistencia de los microorganismos que lo forman en condiciones adversas tales como la limitación de nutrientes y las condiciones extremas. Los gradientes de nutrientes, pH y oxígeno en la matriz suplen las distintas necesidades de los diferentes microorganismos de la población heterogénea que forma el biofilm(80,81). *Legionella* spp. es capaz de alimentarse de otras bacterias y amebas presentes en la comunidad y regula la formación del biofilm (82).

La bacteria se detecta más fácilmente a partir de muestras recogidas con escobillón o muestras de biofilm que de agua corriente, lo que sugiere que la mayoría se encuentra asociada al biofilm (83). Los biofilms, que pueden incluir *Legionella* spp. y protozoos, se pueden formar en la superficie de los circuitos de agua de edificios o torres de refrigeración poco controlados. Los

biofilms se desarrollan tanto en las interfases sólido-agua (biofilms asociados a sustratos) como en las interfases aire-agua (biofilms flotantes)(84). La presión del movimiento del agua en los circuitos de agua puede provocar el desprendimiento de algunas partes del biofilm, permitiendo la colonización de otras partes del sistema si las condiciones son adecuadas(85). Esto explicaría por qué después de tratamientos de choque o en épocas de aumento de flujo de los dispositivos se observan aumentos de los inóculos de *Legionella* spp.

Las últimas publicaciones sugieren que el crecimiento de *Legionella* spp. en biofilms puede favorecer su virulencia. Los aislados de *L. pneumophila* serogrupos 1, 10 y 12 que fueron aislados de biofilms se mostraron más citotóxicos hacia las amebas que las cepas de referencia de los brotes y epidemias mundiales(86). Además, los datos iniciales indican que la *Legionella* spp. que proviene del biofilm puede evadir la respuesta inmune de los macrófagos(87).

Al papel de los protozoos como medio de replicación hay que añadir que el medio intracelular confiere protección a *L. pneumophila* frente a los factores adversos medioambientales(88,89), incluidos los biocidas usados para desinfectar los sistemas de agua. Además, los biofilms en los que están presentes amebas termotolerantes les proporcionan protección frente a tratamientos con calor (90), lo cual demuestra que las amebas proporcionan un nicho de protección para *L. pneumophila*(89).

Diversos estudios ponen de manifiesto el diferente papel que juegan ciertas especies bacterianas en la colonización del biofilm por *L. pneumophila*. Algunas especies pueden promover su crecimiento, mientras que otras lo inhiben. En las estaciones calurosas, que coinciden con los brotes de legionelosis, se favorece la proliferación de *L. pneumophila* frente a otras especies de *Legionella* spp. en las torres refrigeradoras(91). Basado en este hecho, se piensa que *L. pneumophila* podría inhibir el crecimiento de otras especies del mismo género. Se ha demostrado que la presencia en solitario de *Pseudomonas aeruginosa* en el biofilm inhibe el crecimiento de *L. pneumophila*. Mientras que en los biofilms donde se encuentra *P. aeruginosa* junto a otras especies bacterianas o amebianas favorecen su crecimiento(77,92–95).

Son muchos los factores que pueden influir en la producción de biofilms por *L. pneumophila*, y muchos aún son desconocidos. La presencia de otras especies microbianas, parámetros fisicoquímicos, y la regulación genética de *L. pneumophila* son factores que podrían utilizarse para prevenir la colonización por *L. pneumophila* en sistemas antropogénicos de agua. Un área de creciente interés es el rol de otras bacterias en la producción del biofilm junto con *L. pneumophila*, y el mecanismo por el que ciertas especies promueven su crecimiento mientras que otras lo inhiben, así como la regulación mediante el *quórum sensig* y la expresión del gen *mip*. *L. pneumophila* asociada a biofilms es resistente a los biocidas y los brotes de legionelosis se han atribuido a los biofilms. Por lo tanto, prevenir la formación de biopelículas aparece como una estrategia para reducir la contaminación del sistema de agua (82,96,97).

La mayoría de los sistemas acuáticos de ingeniería (especialmente hospitales y hoteles) tienen áreas con biofilms, incluso cuando el sistema tiene un buen funcionamiento. Cuando las medidas de control se relajan, los microorganismos se multiplican rápidamente a niveles detectables y capaces de infectar al hombre, por tanto, es necesario controlar el crecimiento de *L. pneumophila* y sus huéspedes naturales para optimizar la erradicación de la bacteria (98–101).

4. PATOGÉNESIS

4.1 CICLO CELULAR Y FACTORES DE VIRULENCIA

La ecología y patogénesis de *Legionella* spp. están muy relacionadas. La principal característica de la patogénesis de *Legionella* spp. es su capacidad de multiplicarse intracelularmente. El ciclo celular de *Legionella* spp. se ha descrito en protozoos y en células de mamíferos. Varios experimentos llevados a cabo por Howrwitz *et al.* en los años 80 mostraron la multiplicación intracelular en macrófagos humanos evitando la fusión del fagosoma-lisosoma (102). Rowbotham demostró que *L. pneumophila* podía infectar amebas, y describió el ciclo de vida intracelular en ellas(85). La bacteria comenzaba a multiplicarse y adquiría movilidad dentro de la célula hospedadora. Sus investigaciones mostraban que la bacteria podía abandonar la célula hospedadora tras lisis celular o bien permanecer en la ameba enquistada (85).

Parece haber una notable similitud en el proceso por el cual *Legionella* spp. infecta protozoos y células fagocíticas de mamíferos. Diversos estudios han determinado que la entrada de la bacteria en la célula hospedadora se produce por fagocitosis (103). Una vez la bacteria está en el interior celular, ocupa un único fagosoma que no sigue la vía endosomal. Unas 4-6 horas después, el fagosoma de *L. pneumophila* se fusiona con el retículo endoplásmico de la célula hospedadora. El último estadio del ciclo infeccioso sería la muerte de la célula hospedadora y la liberación de la bacteria. *L. pneumophila* mata a su célula hospedadora bien por apoptosis, bien por necrosis mediada por formación de poros, o por las dos. Varios estudios sugieren que existen diferencias en la mediación de la muerte celular para la liberación de la bacteria en células de mamíferos o de protozoos (50).

La interacción de legionellas virulentas con células fagocíticas humanas puede dividirse en diferentes etapas: a) adhesión del microorganismo a los receptores de la superficie de las células, b) endocitosis, penetración del microorganismo en los fagocitos, c) vacuolización, escape del ataque bacteriano, d) formación de la vacuola replicativa, e) multiplicación intracelular y, f) muerte de la célula huésped y liberación de las bacterias que pueden infectar otros

macrófagos, de manera que se inicia de nuevo el ciclo celular con el consecuente aumento de la concentración de bacterias en el pulmón. En consecuencia, su multiplicación intracelular se considera un paso fundamental de su ciclo biológico en general, y en su diferenciación en particular (104–108).

Los últimos datos publicados señalan la existencia de un mecanismo complicado que incluye varias formas de desarrollo(109) (tabla 2). Teniendo en cuenta la complejidad de la ecología de *L. pneumophila* y la diversidad de formas de desarrollo implicadas, Garduño *et. al*(104,106) proponen la existencia de una red de desarrollo (dividida en cinco ciclos de desarrollo), y nos invitan a dejar de lado la visión de la diferenciación de *L. pneumophila* como un proceso bifásico que alterna entre las formas de replicación y las de transmisión(110). Esta red de desarrollo incluye el hospedador “accidental” que alberga las formas intracelulares de *L. pneumophila* en el contexto de las investigaciones de laboratorio, o en el contexto de la enfermedad del Legionario.

Para poder establecer un ciclo de desarrollo es imprescindible demostrar que varias formas pueden diferenciarse en otras, cerrando un proceso circular. En un ciclo bifásico una forma original se convierte en otra, que vuelve a convertirse en la primera. En el caso de un ciclo multifásico, más de dos formas pueden diferenciarse de forma secuencial en otra. Cuando las diferentes conexiones no siguen una secuencia circular se establece una red de desarrollo (figura 1)(110).

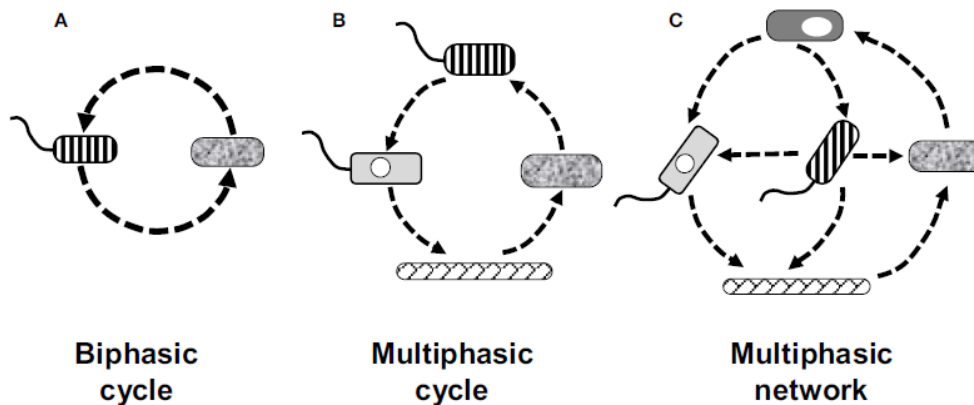


FIGURA 1 Ejemplos gráficos de cómo el número de formas y sus diferentes conexiones definen diferentes tipos de ciclos de desarrollo, o una red de desarrollo. (a) ciclo bifásico en el cual dos formas sencillas alternan una con otra. (b) ciclo multifásico mostrando cuatro formas que dan lugar unas a otras de forma secuencial. (c) red de desarrollo con cinco formas cuyas relaciones no son lineales. La red de desarrollo de *L. pneumophila* incluye 14 formas reconocidas hasta la fecha, relacionadas de un modo no lineal, haciendo la red altamente compleja.

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

Tabla 2. Formas de desarrollo de *L. pneumophila* identificadas y publicadas hasta la fecha.

Extraída de: *L. pneumophila's developmental network*. Robertson *et al.*, 2014.

^aVBNCC: Células viables no cultivables.

Nombre (abreviatura en inglés)	Características principales	Primeras publicaciones
Forma de la fase exponencial (EPF)	Se produce de forma extracelular, no infecta células del hospedador, sensible al estrés, se replica activamente	Byrne y Swanson, 1998
Forma de la fase estacionaria (SPF)	Se produce de forma extracelular, infecta células del hospedador, resistente al estrés	Byrne y Swanson, 1998
Forma filamentosa (FF)	Se produce de forma extra e intracelular, infecta células del hospedador, forma densos biofilms	Rodgers <i>et al.</i> , 1978; Piao <i>et al.</i> , 2006
Formas infecciosas maduras (MIF)	Se produce de forma intracelular, infecta células del hospedador, resistente al estrés	Garduño <i>et al.</i> , 2002
Formas intracelulares inmaduras (IIF)	Se producen en cultivos de macrófagos, morfológicamente indiferenciadas, menos infecciosas y menos resistentes al estrés que las MIFs, alargadas	Abdelhady y Garduño, 2013
Formas de la fase replicativa (RPF)	Se producen intracelularmente, se replican de forma activa	Faulkner y Garduño, 2002
Formas intermedias MIF-EPF.	Se producen extracelularmente tras la germinación de formas infecciosas maduras en BYE, parecen vesículas intraperiplásmicas	Faulkner y Garduño, 2002
Formas intermedias MIF-RFP	Se producen intracelularmente en respuesta a la presencia de aminoácidos, precursor de la iniciación de la replicación en las vacuolas que contienen <i>Legionella</i> (LCV)	Sauer <i>et al.</i> , 2005 ^a
Formas intermedias RFP-MIF	Se producen intracelularmente en los últimos estadios del ciclo infeccioso, exhiben perfiles de envoltura únicos. Parecen similares a las IIFs	Faulkner y Garduño, 2002
VBNCC ^a derivadas de SPF	Se producen extracelularmente en respuesta a factores estresantes, resucitan en presencia de amebas	Steinert <i>et al.</i> , 1997; Al-Bana <i>et al.</i> , 2014
VBNCC derivadas de MIF	Se producen extracelularmente en respuesta al estrés, muestran una ultraestructura intracelular intacta, no resucitan en presencia de amebas	Al-Bana <i>et al.</i> , 2014
VBNCC derivadas de EPF	Aparentemente más frágiles que las VBNCC mencionadas anteriormente	Ohno <i>et al.</i> , 2003
MIFs recicladas (pelleted)	Producidas por ciliados y amebas, muestran rasgos de desarrollo únicos	Berk <i>et al.</i> , 1998, 2008
VBNCCs recicladas	Producidas por ciliados, pueden mostrar rasgos de desarrollo únicos	Al-Bana <i>et al.</i> , 2014

La fase de desarrollo extracelular de *L. pneumophila* implica un ciclo bifásico que engloba formas en fase exponencial replicativa (EPFs) y formas de la fase estacionaria (SPFs) con vínculos diferenciados a células viables no cultivables (VBNCs) y formas filamentosas (FFs) (Tabla 2)(110).

Los ciclos de desarrollo intracelulares de *L. pneumophila* son multifásicos. Se ha observado que la progenie de *L. pneumophila* producida en *Acanthamoeba castellanii* está morfológicamente diferenciada e infecta las células en cultivo, mientras que la progenie derivada de macrófagos humanos está diferenciada solo parcialmente y muestra defectos en su capacidad infectiva (111). Además, Berk *et al.* y Faulkner *et al.* comprobaron que cuando *L. pneumophila* interactúa con protozoos ciliados del género *Tetrahymena* a temperaturas de 30°C o menores, no se replica, pero sigue diferenciándose intracelularmente, estableciendo un nuevo ciclo de desarrollo (68,106,110).

En 2018 Oliva G. *et al.* publican una revisión donde describen cómo se regulan los diferentes estados de desarrollo de esta bacteria, con un énfasis particular en la respuesta estricta activada durante la transición de la fase replicativa a la fase infecciosa y las características metabólicas que van de la mano. Proponen que la diferenciación celular de este patógeno intracelular está estrechamente asociada a cambios metabólicos clave en la bacteria y la célula huésped, que en conjunto tienen un papel crucial en la regulación de la virulencia de *L. pneumophila* (112).

L. pneumophila alterna entre diferentes formas morfogénicas, incluida una forma replicativa (RF) y una forma transmisiva / virulenta que tiene muchas características distintas (106,113–115). El hambre y el estrés ambiental inducen la transición de las bacterias metabólicamente replicantes a bacterias virulentas móviles resistentes al estrés(113). Además, se describió una forma intracelular madura (MIF), caracterizada por bacterias altamente infecciosas, móviles y similares a quistes (107,110) así como formas viables pero no cultivables (VBNC) que se desarrollan en respuesta a condiciones dispares(109,116). La capacidad de alternancia, utilizando diferentes elementos reguladores, hace posible su supervivencia y el éxito de su ciclo biológico (112).

La transición entre la fase replicativa no virulenta y la fase no replicativa virulenta se rige por una red reguladora compleja, en la cual los elementos reguladores transcripcionales y postranscripcionales están comprometidos para asegurar un ciclo de infección eficiente. Fields *et al.* y Hilbi *et al.* sugirieron que la coevolución de *Legionella* spp. dentro de los protozoos había proporcionado a la bacteria una estrategia efectiva para colonizar dos células huésped evolutivamente diferentes (50,117). De hecho, esta coevolución se refleja en su genoma, tal como demostraron diferentes autores, que demostraron que *L. pneumophila* y *L. longbeachae* han adquirido genes que codifican proteínas con propiedades similares a las eucariotas de sus hospedadores protozoarios. Mostrando que la mímica molecular es una importante estrategia

de virulencia, desarrollada por *Legionella* spp. debido a la presión selectiva del entorno natural(114,118,119).

Dentro de la célula huésped, la capacidad de adaptación depende del establecimiento de un ciclo de infección exitoso, mediado por más de 300 proteínas efectoras que se sabe que son secretadas por el sistema Dot/Icm. Después de la absorción de *Legionella* spp. por las células fagocíticas, la bacteria evita la degradación mediada por lisosomas y forma un compartimento permisivo de replicación único dentro de su célula huésped: una vacuola que contiene *Legionella* (LCV). El desencadenante de esta respuesta al estrés morfológico está mediado principalmente por cambios metabólicos y, por lo tanto, por la disponibilidad de nutrientes en los alrededores. Por lo tanto, dentro del LCV, el uso de serina como fuente de carbono y energía apoya la multiplicación de las bacterias en las cuales las bacterias replicantes muestran una alta actividad metabólica. Tras el agotamiento de los aminoácidos, la respuesta estricta media la expresión de los rasgos virulentos, pero en paralelo también permite que las bacterias sobrevivan a largo plazo bajo condiciones de estrés y hambre. Esto se garantiza, entre otros, mediante la expresión de genes relacionados con el estrés y la virulencia y un cambio metabólico general que conduce al uso de fuentes alternativas de carbono como glucosa y glicerolípidos y una mayor producción de la molécula de almacenamiento PHB (poli-3-hidroxi-butarato). Bajo estas condiciones, *L. pneumophila* está óptimamente equipado para escapar del huésped que ha usado, y sobrevivir durante un período incierto en el entorno extracelular y eventualmente comenzar un nuevo ciclo de infección. En la figura 2 se muestra un resumen esquemático de los estados morfológicos de *L. pneumophila* durante su ciclo de crecimiento: 1) Absorción de *L. pneumophila* virulenta por la célula huésped como los protozoos o macrófagos a través de la convención o la fagocitosis en espiral. 2) Después de la internalización, las bacterias evaden la fusión fagosoma-lisosoma y comienzan la multiplicación intracelular dentro del LCV, que está rodeado de vesículas (en amarillo) ricas en lípidos y proteínas. 3) La inanición de nutrientes induce la activación de la respuesta estricta y los cambios morfológicos. Las bacterias expresan los rasgos transmisivos como la motilidad (flagelos) y se vuelven citotóxicas. 4) Estas bacterias infecciosas pueden lisar la membrana vacuolar y se liberan en el entorno extracelular. 5) Las bacterias transmisoras de vida libre pueden comenzar un nuevo ciclo o persistir en el ambiente extracelular como forma planctónica. 6) Alternativamente, *L. pneumophila* puede estar asociado a biofilms, ya sea en hábitats naturales de agua dulce o artificiales. 7) En el caldo de cultivo, *L. pneumophila* muestra también un ciclo de vida bifásico, que imita de cerca las formas intracelulares replicativas y transmisivas (112).

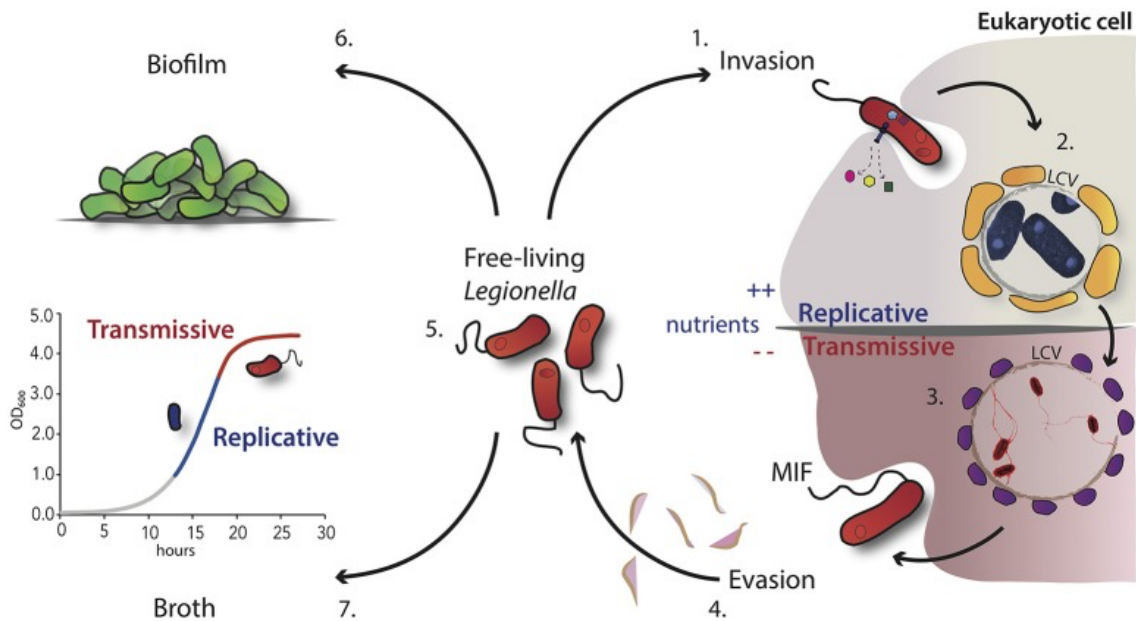


FIGURA 2. Resumen esquemático de los estados morfológicos de *L. pneumophila* durante su ciclo de crecimiento.

Tomado de Oliva G. *et al.*: "The life cycle of *L. pneumophila*: cellular differentiation is linked to virulence and metabolism"(112).

En conjunto, el ciclo de vida bifásico de *L. pneumophila* produce cambios morfológicos distintos y un metabolismo bipartito del carbono. Por lo tanto, durante el ciclo de vida bifásico, el metabolismo influye en la transición entre la fase replicativa y transmisiva, así como en la expresión recíproca de los factores de virulencia y sus reguladores. Todavía falta un análisis exhaustivo de la adaptación de *L. pneumophila* a las señales metabólicas durante la fase transmisiva *in vivo*, ya sea en amebas o macrófagos. La revelación continua de esta compleja interacción entre el metabolismo y la virulencia de *L. pneumophila* también puede enseñarnos sobre la interacción huésped-patógeno en general (112).

No se han identificado de forma clara los factores individuales biológicos e inmunológicos que median la virulencia de *Legionella* spp. No obstante, el análisis del proceso de infección en protozoos y células huésped humanas han ayudado a identificar algunos factores que pueden afectar a la virulencia. Para mantener su estilo de vida intracelular, *Legionella* spp. extrae hierro esencial de la célula, bloquea las respuestas inflamatorias y manipula el tráfico para evitar la fusión con el lisosoma. El huésped mamífero tiene estrategias contrarias, que incluyen la liberación de citocinas proinflamatorias, la activación de caspasas y la inmunidad mediada por anticuerpos (120).

Las estructuras de superficie de membrana son importantes en la patogenia de *Legionella* spp. (121). 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* spp. en macrófagos alveolares y protozoos. Estas proteínas incluyen, entre otras, a la proteína principal de la membrana externa (“major outer membrane protein”, MOMP), las proteínas de choque térmico (“heat shock protein”, Hsp60), la proteína potenciadora de la infectividad (“major infectivity potentiator”, Mip) y la toxina implicada en la formación del poro (“pore-formation protein”, RtxA). La MOMP es una porina que se une al componente C3 de complemento, y media la entrada de *L. pneumophila* vía receptores de macrófagos de complemento CR1 y CR3(122). Sin embargo, la fagocitosis de *L.pneumophila* también puede producirse por un mecanismo independiente de complemento (123). La proteína Hsp60 aumenta la invasión en células epiteliales (108). La proteína Mip, codificada por el gen *mip* es un producto claramente relacionado con la virulencia de *Legionella* spp. (56). Esta proteína interviene en los estadios de infección temprana y es necesaria para una infección eficiente tanto en las células fagocíticas humanas como en los protozoos (124). Se piensa que la proteína Mip está conservada en todo el género (125), e incluso se utiliza la secuencia del gen *mip* para identificar especies de *Legionella* spp (126). La toxina RtxA, perteneciente a la familia Rtx (*repeats-in-toxin*) y codificada por el gen *rtxA*, participa en la adherencia, entrada de *Legionella* spp. en la célula huésped y formación del poro, así como en la supervivencia intracelular de la misma (127,128).

En respuesta a la bacteria, la célula huésped puede activar varias caspasas y enviar señales a sus vecinos no infectados, lo que permite la elaboración de citocinas inflamatorias. Las subclases de anticuerpos proporcionan una protección robusta contra *Legionella* spp (120).

4.2 PRESENTACIÓN CLÍNICA, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

El abanico de manifestaciones clínicas de la legionelosis abarca desde cuadros asintomáticos, detectables únicamente por estudios de seroprevalencia, a procesos pseudogripales como la fiebre de Pontiac o neumónicos como la enfermedad del legionario descrita por primera vez en Filadelfia. Se desconoce la causa de esta variabilidad clínica, aunque es probable que tenga relación con el tamaño del inóculo, la forma de transmisión y con algunos factores del huésped. La seroprevalencia de anticuerpos frente a *Legionella* spp. en estudios poblacionales oscila entre el 0.1 al 26%. Estos individuos no recogen antecedentes de enfermedad sintomática por *Legionella* spp. (129–131).

La Fiebre de Pontiac, es una enfermedad auto limitada que da lugar a un cuadro clínico similar al de la gripe. El periodo de incubación suele oscilar entre uno y tres días. Los síntomas incluyen fiebre, malestar, escalofríos y cefalea. La radiología de tórax es normal. La enfermedad es benigna y no requiere tratamiento. Este síndrome se ha descrito en contados brotes epidémicos y la patogenia es confusa. Las especies de *Legionella* spp. implicadas en la mayoría de los casos

han sido *L. pneumophila* serogrupos 1, 4 y 6(132–136), *L. feeley* sg. 1(137), *L. micdadei* (138–140) y *L. anisa* (141,142). La neumonía causada por *Legionella* spp. o enfermedad del legionario, es clínicamente indistinguible de otras neumonías y se caracteriza por un período de incubación que oscila entre 2 y 10 días, aunque este periodo podría ser algo mayor. Esta enfermedad se incluye en el diagnóstico diferencial de la neumonía atípica, junto con las infecciones producidas por *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamidophyla psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Coxiella burnetii* y algunos virus (143). Por tanto, el diagnóstico de la enfermedad debe realizarse por métodos microbiológicos. Una información muy valiosa que se debe recabar durante la anamnesis es la relacionada con algunos factores de riesgo predisponentes y antecedentes epidemiológicos, tales como viajes a países con una incidencia elevada de legionelosis, estancia en hospitales y exposición a sistemas generadores de aerosoles (tabla 3).

TABLA 3. Factores de riesgo para la adquisición de la infección por *Legionella* spp.

Factores de riesgo clínicos mayores

Trasplante

Diálisis

Inmunodepresión farmacológica

Glucocorticoides

Neoplasias

Tabaquismo

Factores de riesgo clínicos menores

EPOC¹

Alcoholismo

Diabetes

Sexo masculino

Edad>50años

Factores de riesgo ambientales

Exposición a duchas y/o aerosoles generados por agua caliente sanitaria

Exposición a aerosoles generados por las torres de refrigeración

Exposición a aerosoles generados por excavaciones

Estancia en hotel

Estancia en hospital

¹EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Modificada de Pedro-Botet *et al.* 2008(143).

El comienzo de la enfermedad suele ser abrupto, con fiebre alta, malestar general, debilidad, mialgias, dolor de cabeza y tos inicialmente no productiva, y frecuentemente requiere hospitalización. Las manifestaciones extrapulmonares generalmente incluyen confusión, diarrea

y dolor pleural, a veces los primeros síntomas son diarrea, dolor muscular y moderada cefalea. La enfermedad puede llegar a cursar con confusión mental e insuficiencia respiratoria y renal. Con el tratamiento adecuado al inicio de la infección se llega a la curación total de esta. Sin embargo, es posible que queden algunas secuelas como enfermedad restrictiva pulmonar, debilidad, fallo en la memoria y fatiga, entre otros que, en ocasiones, permanecen durante varios meses. La enfermedad de los legionarios puede ser mortal si no se trata correctamente durante la primera semana.

El patrón radiológico también es similar al de otras neumonías, siendo común el infiltrado alveolar unilateral. Se han descrito bilateralización de los infiltrados en pacientes inmunodeprimidos en relación con la evolución desfavorable de estos pacientes. Puede observarse derrame pleural de escasa cuantía en un 20% de los casos. La cavitación aparece hasta en un 4% de los pacientes y suele incidir en pacientes inmunodeprimidos(144).

La mayoría de los casos de neumonía por *Legionella* spp. están causados por *L. pneumophila*. Teniendo en cuenta que todas las especies de *Legionella* spp. pueden multiplicarse intracelularmente, cabe sospechar que las infecciones causadas por las cepas menos comunes no se encuentran habitualmente por su rareza y por la metodología diagnóstica disponible actualmente(4).

Existen datos de laboratorio sugestivos de la enfermedad del legionario como son el incremento de las transaminasas, la hiponatremia, el incremento de la creatinquinasa(145). Se describen casos de rabdomiólisis en formas graves de la infección en pacientes infectados por el VIH(144). Se puede observar proteinuria y hematuria que denotan la existencia de afección glomerular secundaria. La afectación extrapulmonar es rara, aunque se han descrito casos que incluyen sinusitis, celulitis, pielonfritis, pancreatitis y endocarditis. En estos casos es probable que la vía de entrada siga siendo respiratoria, la vía de diseminación sea hematológica y que la expresividad clínica pulmonar sea mínima o inexistente. La precocidad en el diagnóstico y la eficacia del tratamiento actual justifican esta menor incidencia con respecto a descripciones previas. Contrastan estos casos con los de infección de herida quirúrgica por *Legionella* spp., relacionados con el uso de agua contaminada, en la ducha o lavado de la herida, en los que la inoculación de *Legionella* spp. es directa.

MÉTODOS DE DETECCIÓN EN MUESTRAS DE ORIGEN CLÍNICO

Desde un punto de vista clínico, es difícil distinguir la neumonía causada por *Legionella* spp. de otras neumonías como las producidas por *Mycoplasma* spp. o SARS-CoV2, por lo que resulta necesario recurrir a procedimientos microbiológicos específicos. La sospecha diagnóstica se basa, principalmente, en el contexto epidemiológico y en algunos datos clínicos. El diagnóstico

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

de neumonía por *Legionella* spp. incluye la integración de características epidemiológicas, manifestaciones clínicas, hallazgos radiológicos y pruebas de laboratorio. La incidencia de neumonía por *Legionella* spp. se correlaciona directamente con las precipitaciones y la estacionalidad, siendo más frecuente en verano y al inicio del otoño, lo que demuestra la afinidad de *Legionella* spp. por los climas cálidos y húmedos(146). Debemos sospechar neumonía por *Legionella* spp. cuando se cumplan los criterios epidemiológicos y clínicos en pacientes ancianos, inmunodeprimidos o pluripatológicos. Disponemos de múltiples pruebas de diagnóstico microbiológico para detectar *Legionella* spp. a partir de muestras respiratorias por cultivo o PCR, detección de anticuerpos en suero y detección de antígeno urinario de *L. pneumophila* sg 1 en orina.

DEFINICIÓN DE CASO

Según el protocolo recogido en la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, los casos de legionelosis se clasifican en(147):

Definición de caso

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 (SG) de *Legionella* spp. a a partir de secreciones respiratorias, tejido pulmonar o sangre.

— Detección de antígeno *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* SG1 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* spp., incluido el sg1.

— 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* spp. distinto de *L. pneumophila* SG1, por inmunofluorescencia indirecta, en sueros tomados en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad.

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

— Título único de anticuerpos elevado (≥ 256) frente a *L. pneumophila* sg 1.

Criterio epidemiológico

Pacientes que presentan sintomatología compatible con legionelosis, pero sin pruebas diagnósticas de laboratorio y que están relacionados con una fuente de infección que ha sido la causa de casos confirmados. El criterio de relación epidemiológica se tendrá en cuenta en el estudio de brotes.

Clasificación de los casos

Caso sospechoso: No procede.

Caso probable: Persona que cumple con los criterios clínicos junto con, al menos, un resultado positivo en las pruebas de laboratorio que definen caso probable o si tienen una relación epidemiológica, especialmente cuando el caso se estudie en el contexto de un brote.

Caso confirmado: Compatible con la definición clínica de caso y con al menos un resultado positivo en alguna de las pruebas de laboratorio consideradas de confirmación.

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE *LEGIONELLA* SPP.

El aislamiento de la bacteria en cultivo es el método de referencia y proporciona un diagnóstico de confirmación de la infección causada por *Legionella* spp. Es el único método disponible que permite detectar infecciones causadas por cualquiera de las especies y serogrupos de *Legionella* spp. (aproximadamente 15-20 % de las infecciones se deben a especies o serogrupos diferentes de *L. pneumophila* serogrupo 1)(148).

La sensibilidad está cerca del 60% y la especificidad del 100% al comparar el cultivo en pacientes con serología positiva(149,150). Sin olvidar, que existen varios factores que limitan la sensibilidad del cultivo, como la experiencia del laboratorio en el aislamiento de *Legionella* spp. Además, en muchos laboratorios, para aumentar la especificidad en el aislamiento de bacterias piogénicas, se rechazan muestras de esputos con muchas células escamosas o pocos leucocitos polimorfonucleares. Sin embargo, los pacientes con enfermedad del legionario producen esputos muy poco o nada purulentos, que serían descartados para su cultivo rutinario. La bacteria vive poco tiempo en las secreciones respiratorias, por lo que su procesamiento debe ser rápido(4). Aunque se puede considerar un método tedioso e incluso de difícil realización, es muy recomendable su utilización de forma rutinaria, ya que permite realizar posteriores estudios que ayudan a mejorar el conocimiento de la bacteria, como las investigaciones epidemiológicas para detectar las posibles fuentes de infección, o la realización de estudios de sensibilidad frente a antimicrobianos.

La muestra de elección para el cultivo de *Legionella* spp. son las secreciones respiratorias (esputo, lavado broncoalveolar (BAL), broncoaspirados (BAS), líquido pleural, líquido

cefalorraquídeo; aunque se puede aislar a partir de sangre, tejido pulmonar, y heces. También se ha aislado de médula ósea, prótesis valvulares cardíacas y heridas esternas(149,151–153). *L. pneumophila* se aisló inicialmente en agar Mueller-Hinton suplementado con hemoglobina e IsoVitakex (MH-IH). Los componentes esenciales suministrados por estos suplementos son el hierro y la L- cisteína. Este conocimiento ayudó al desarrollo del agar Feeley-Gorman, que favorece el crecimiento del microorganismo a partir de tejidos(154). Actualmente, el medio que se utiliza para el crecimiento de *Legionella* spp. es agar taponado con extracto de levadura de carbón (*Buffered Charcoal Yeast Extract*, BCYE) enriquecido con α -cetoglutarato con o sin otros agentes añadidos(155–157). Son necesarios de 3 a 10 días para visualizar colonias. Aunque la mayoría de cepas crecen en agar BCYE, algunas necesitan un suplemento de albúmina de suero bovino para favorecer el crecimiento(158).

Para el cultivo de *Legionella* spp. además del BCYE, se utiliza un medio selectivo suplementado con antibióticos, BPA (BCYE suplementado con polimixina, cefamandol y anisomicina). Para el primer aislamiento las placas deben incubarse a 35-37°C, en condiciones de aerobiosis y humedad, y aunque el crecimiento de la bacteria generalmente empieza a ser visible a partir del tercer día de incubación, los cultivos se deben mantener en estas condiciones 10-12 días antes de considerarlos negativos. Pequeñas cantidades de CO₂ (2,5-5%) pueden favorecer el crecimiento de algunas especies. Cuando se procesan muestras contaminadas (esputo) se recomiendan tratamientos de descontaminación, ya que ayudan a eliminar la microbiota acompañante y favorecen el reconocimiento de las colonias de *Legionella* spp. Los tratamientos utilizados son de 2 tipos, calor (50°C 30 min) y tratamiento ácido (pH de 2,2 durante 5 min). Como la mayoría de las cepas de *Legionella* spp. empleadas en el control de los medios de cultivo se adaptan rápidamente a los medios tras sucesivos subcultivos, se recomienda la utilización de un tejido infectado con la bacteria para comprobar el crecimiento. El uso de estos métodos hace posible el aislamiento en cultivo de *Legionella* spp., pero sólo si la carga bacteriana es relativamente suficiente y se encuentra en un estado cultivable. Sin embargo, *Legionella* spp. podría entrar en un estado viable pero no cultivable (VBNC), reduciéndose la tasa de aislamiento. En un estudio reciente, Mohammadi *et al.* desarrollaron un proceso de descontaminación selectiva utilizando agar glicina, vancomicina, polimixina y cicloheximida (GVPC), con separación inmunomagnética para el cultivo de *Legionella longbeache*, disminuyendo así el límite de detección, paso fundamental en el diagnóstico de neumonía leve por *Legionella* spp. (159) Desafortunadamente, no existen métodos eficaces disponibles para romper la limitación del aislamiento en cultivo de VBNC o *Legionella* spp. muerta.

Aunque el género *Legionella* spp. comprende 58 especies y más de 70 serogrupos, la mayoría de los cultivos recuperados de muestras de pacientes pertenecen a la especie *L. pneumophila*, siendo *L. pneumophila* serogrupo 1 el que se identifica con mayor frecuencia. Se debe tener en cuenta que mientras *L. pneumophila* crece bien en los medios de cultivo utilizados, no ocurre lo

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

mismo con otras especies, que crecen con más dificultad, requieren más tiempo y, en ocasiones pueden llegar a perderse en subcultivos sucesivos.

Las especies de *Legionella* spp. pueden identificarse por varios métodos. Estos incluyen la inmunofluorescencia (IF) con anticuerpos poli o monoclonales, aglutinación en porta o con partículas de látex, ensayos con anticuerpos género-específicos mediante *dot-blot* en colonias y amplificación específica del ADN mediante técnicas de PCR. También se pueden utilizar algunas pruebas bioquímicas, aunque no suelen ser muy útiles debido a que aportan resultados variables. También se han desarrollado métodos de secuenciación de fragmentos de genes, utilizando como dianas el gen 16S ribosomal o el gen *mip* (*macrophage infectivity potentiator*). La identificación se realiza por comparación de la secuencia obtenida con las secuencias conocidas e incluidas en las bases de datos de secuencias existentes. En el caso del fragmento 16S ribosomal se utiliza la base de datos "Gene Bank Database" (www.ncbi.nlm.nih.gov) y en el caso del gen *mip* la base de datos del EWGLI (www.ewgli.org).

En los últimos años se han introducido los sistemas automáticos de espectrometría de masas para la identificación de especies bacterianas. Entre ellos, la espectrometría de masas de tiempo de vuelo, ionización y desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS) es la más común. Tal como publican múltiples autores, el sistema de biotipado produce espectros de MALDI-TOF constantes y reproducibles para las cepas de *Legionella* spp. y se puede utilizar para una identificación rápida y fiable. También proponen la inclusión de más especies de *Legionella* (*no pneumophila*) en la base de datos del sistema para aumentar la precisión en la identificación de las cepas (160,161). Sus principales limitaciones son la necesidad de aislar la bacteria en cultivo para realizar la identificación, lo que retrasa el resultado con especial relevancia en pacientes críticos (162) y la imposibilidad de puede discriminar especies de *Legionella* spp. en serogrupos (163).

Sin embargo, recientemente Kyritsi *et al.* proponen un método mediante el cual MALDI-TOF MS ofrece un buen rendimiento para la asignación del serogrupo de *Legionella pneumophila* y la detección de los genes de virulencia *lvh* y *rtxA*. Estos hallazgos podrían contribuir a la investigación de casos y evaluación de riesgos rápida, económica y completa. Los autores sostienen que se necesitan más estudios para estandarizar y evaluar el método utilizando el perfil directo de proteínas de la placa directa en lugar de la extracción de proteínas para simplificar el protocolo (164).

Diferentes estudios en los campos de la identificación de bacterias sugieren que combinar el análisis del sistema MALDI Biotyper con la FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), que se puede utilizar para analizar compuestos de carbohidratos y glicoproteínas, es capaz de proporcionar un espectro de "huella digital" único para cada especie de bacterias que exceden el límite previamente descrito. La espectroscopía infrarroja aplicada a la microbiología se basa

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

en que las moléculas presentes en las células pueden ser excitadas mediante la absorción de radiación infrarroja y emitir vibración que será registrada en el equipo. La selectividad de la técnica de FTIR es tan alta que permite la diferenciación de microorganismos altamente relacionados entre sí. Por ello, que es una técnica excelente para el tipado de microorganismos, ya que pequeñas variaciones dentro de la misma especie se pueden utilizar para clasificar los aislados en distintos grupos (162,163,165).

INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

La microscopía directa con anticuerpos fluorescentes es un método rápido y fue el primer método diagnóstico usado para detectar *Legionella* spp. en tejido pulmonar y secreciones respiratorias. La inmunofluorescencia directa es un procedimiento de tinción que permite detectar con rapidez la presencia de cualquier serogrupo de *L. pneumophila* en muestras clínicas(166). Se realiza con reactivos polivalentes, algunos de los cuales están disponibles comercialmente. Estos reactivos contienen un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer todos los serogrupos de *L. pneumophila*. Los anticuerpos, marcados con fluoresceína, se unen a los antígenos de la pared de *L. pneumophila*, un posterior lavado elimina los anticuerpos no fijados y al examinar la extensión con un microscopio de fluorescencia se puede observar la fluorescencia en la pared de estas bacterias.

Es un método que ha sido sustituido por otras pruebas como la detección de antígeno urinario de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 o la detección de ácidos nucleicos.

SEROLOGÍA

Se han desarrollado una variedad de pruebas para detectar anticuerpos específicos en muestras de suero, incluyendo inmunofluorescencia indirecta (IFI), microaglutinación y métodos de enzoinmunoensayo (ELISA), así como ensayos de hemaglutinación indirecta y contrainmunolectroforesis (148).

Se han descrito reacciones cruzadas de antígenos entre *Legionella* spp. y otros patógenos, o diferentes serogrupos y especies de *Legionella* spp., que pueden disminuir la especificidad de los ensayos serológicos y dar lugar a falsos positivos (162,167,168)

La IFI ha sido el método diagnóstico más utilizado durante años y por ello, el más evaluado, principalmente para *L. pneumophila* serogrupo 1. Las pruebas de microaglutinación presentan la ventaja de que por su facilidad de realización permiten ensayar un gran número de muestras a la vez, presentando una sensibilidad del 80% y una especificidad que oscila entre el 97 y 99%. También existen disponibles ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos frente a

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

Legionella spp., aunque éstos no han sido suficientemente evaluados. Se han desarrollado ensayos frente a proteínas purificadas (FLA, MOMP, MIP, IP, and PILE) para mejorar la especificidad de la técnica (162,169).

La IFI se realiza utilizando un sustrato antigénico de *L. pneumophila* serogrupo 1 inactivado con calor, o un pool conteniendo antígenos de varios serogrupos. Estos antígenos están comercializados, estandarizados y prefijados en los portaobjetos sobre los que se añaden diluciones seriadas del suero del paciente. La detección de anticuerpos en el suero del paciente se realiza mediante una reacción antígeno-anticuerpo que se revela con una antiglobulina humana marcada con fluoresceína, que permite la visualización de los microorganismos con un microscopio de fluorescencia. La sensibilidad de la IFI oscila entre 78-91%, siendo la especificidad del 99%. Para la determinación del título de anticuerpos en el suero de un paciente es preferible realizar un ensayo de IFI en una pareja de sueros, tomados en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad, para demostrar una seroconversión (aumento del título al menos al cuádruple). Se considera positiva una seroconversión en la q se objetiva un aumento del título de anticuerpos en cuatro veces o más, con un segundo título $\geq 1/128$ frente a *L. pneumophila* SG1 por inmunofluorescencia indirecta, en sueros tomados en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad (147). La seroconversión se produce en alrededor del 70-80% de los casos confirmados con cultivo, se puede producir en la primera semana tras el inicio de los síntomas, aunque también puede requerir de 6 semanas a 2 meses en aparecer, e incluso no producirse.

Cuando se cuenta con un suero único la interpretación de los resultados es más compleja, ya que el nivel de anticuerpos de la población general puede variar de unos lugares a otros, y en general este nivel no se conoce. Por ello, títulos superiores a 1/256 son sugerentes de enfermedad reciente o pasada, pero títulos inferiores a este valor deben considerarse negativos. Por otro lado, un resultado negativo no descarta la enfermedad, ya que en ocasiones se han detectado fallos en la producción de anticuerpos.

Para aumentar la sensibilidad es importante utilizar reactivos que detecten inmunoglobulinas totales (IgG, IgM e IgA). Aunque la IFI ha sido una herramienta diagnóstica de gran utilidad, las limitaciones que presenta y el tiempo requerido en tener un resultado hacen que en los últimos años haya disminuido su uso, sin embargo, es de gran utilidad para realizar diagnósticos retrospectivos y en investigaciones epidemiológicas (148).

DETECCIÓN DE ANTÍGENO DE *L. PNEUMOPHILA* EN MUESTRAS DE ORINA

En el transcurso de un episodio neumónico por *L. pneumophila* se libera antígeno específico que puede detectarse en la orina. La detección de este antígeno ofrece un diagnóstico rápido de

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

confirmación de neumonía por *L. pneumophila* reciente o pasada, por lo que estos ensayos se deberán realizar únicamente en presencia de un cuadro clínico compatible, o con menor sospecha clínica en el caso de brotes hospitalarios(170). Estas técnicas han revolucionado el diagnóstico de esta enfermedad y han mostrado ser extraordinariamente útiles, ya que permiten la detección de un mayor número de casos y la aplicación de un tratamiento antibiótico específico en las fases iniciales de la enfermedad. También permiten el reconocimiento temprano de brotes epidémicos, favoreciendo una rápida respuesta en la aplicación de medidas preventivas (171,172).

El antígeno detectado es un componente soluble del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de *Legionella* spp., es termoestable, y es detectable desde el inicio de la sintomatología, y en algunos casos hasta muchos meses después (en algún caso hasta más de 1 año), no viéndose los resultados claramente influenciados por la administración previa de antibióticos.

Estos antígenos se han detectado por varias técnicas, como aglutinación con partículas de látex, hemaglutinación pasiva, radioinmunoensayo (RIA) y técnicas de enzimoimmunoensayo (EIA)(171)(173,174). Todas las técnicas detectan con una gran sensibilidad el antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1, siendo además capaces de detectar “*in vitro*” antígeno soluble de todos los serogrupos de *L. pneumophila*. La capacidad de detectar antígeno de otros serogrupos está en función de las características propias de cada antígeno, como la capacidad de pasar a la orina, la cantidad excretada y su inmunogenicidad. Los antígenos de otros serogrupos de *L. pneumophila* podrían no excretarse por la orina, ya que pueden pasar a través de las paredes de los capilares glomerulares o no hacerlo, en función de su tamaño y de su carga(148).

Hoy día, la técnica más utilizada es la inmunocromatografía (ICT). Es más rápida, ya que ofrece resultados en 15 minutos o menos dependiendo de la concentración de antígeno en la orina. Es técnicamente menos compleja que las técnicas de EIA, no requiere equipamiento específico y se realiza de forma individualizada. Los resultados obtenidos son absolutamente equiparables con los de las técnicas de EIA en sensibilidad y especificidad, exhibiendo específicamente una concordancia global con el EIA de Binax del 98% (171,172). El uso de IC para diagnóstico de legionelosis está ampliamente extendido y su limitación más importante es que solo detecta *L. pneumophila* sg 1, hecho que pudiera estar infradiagnosticado los casos de neumonía por otros serogrupos de *L. pneumophila* e incluso por otras especies que son mayoritarias en los sistemas de abastecimiento de agua (38).

Es interesante destacar que el tratamiento térmico de la orina no supone la desaparición de la positividad y sí la eliminación de falsos positivos en muestras negativas. También es importante conocer que la concentración del antígeno presente en la orina por ultrafiltración selectiva incrementa significativamente la sensibilidad sin que se vea afectada la especificidad(148).

DETECCIÓN DE *LEGIONELLA* SPP. EN MUESTRAS CLÍNICAS POR PCR

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos son herramientas atractivas para la detección de la bacteria en muestras clínicas, ya que son capaces de detectar todas las especies y serogrupos y proporcionar resultados rápidos(175–177).

Se han desarrollado métodos diagnósticos basados en la detección de ADN de *Legionella* spp. en muestras humanas, utilizando métodos de hibridación con sondas génicas específicas o basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)(178,179).

Se han estudiado métodos dirigidos principalmente a tres dianas del cromosoma bacteriano: el gen *mip* (*macrophage infectivity potentiator*) y los genes 5S rRNA y 16S rRNA del ribosoma. Los resultados mostraron una alta prevalencia de tres genes: *mip*, *dotH* y *gspD*, por lo que el uso de estos genes es útil como método de detección rápida para el diagnóstico de *Legionella* spp.(180). Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de la PCR convencional es que se trata de un método cualitativo, por lo que el empleo de diferentes sondas marcadas fluorogénicamente en un sistema de PCR a “tiempo real” ha desplazado el uso de la PCR convencional (181). Si a esto se añade la posible utilización de una PCR múltiple que además de detectar *L. pneumophila* permita la detección simultánea de otros microorganismos causantes de neumonía, como *Chlamydophila pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*, el valor de esta metodología se podría ver muy incrementado en el diagnóstico etiológico de las neumonías atípicas adquiridas en la comunidad. En 2011, Thurman *et al.* encontraron una alta sensibilidad y especificidad tras ensayar una PCR a tiempo real multiplex para neumonías atípicas(182).

El diagnóstico molecular supera a la detección del UA tanto en muestras respiratorias como en hisopos, aunque las muestras respiratorias inferiores son mejores, mostrando un aumento del rendimiento diagnóstico de entre el 18-44% tal como muestran diferentes publicaciones (183). Aunque estos ensayos moleculares no son tan rápidos como la prueba del antígeno de orina y son más caros, son altamente sensibles, se pueden realizar más rápido que el cultivo y tienen la clara ventaja de detectar cepas distintas del serogrupo 1 de *L. pneumophila* (184).

Las principales limitaciones de esta técnica son la presencia de inhibidores en las muestras clínicas, como hemoglobina, urea o heparina, pueden dar lugar a la aparición de falsos negativos debidos a inhibición de la amplificación, por lo que es fundamental la preparación de la muestra de modo que se eliminen eficazmente estos inhibidores. Se ha documentado la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación del agua con *Legionella* spp.(185).

TRATAMIENTO

Legionella spp. es resistente intrínsecamente a los Beta-lactámicos. El tratamiento efectivo está condicionado por la naturaleza intracelular de este patógeno. Los únicos agentes antibióticos que son clínicamente aceptables son aquellos que alcanzan altas concentraciones intracelulares como macrólidos, quinolonas, rifampicina, cotrimoxazol y tetraciclinas. No se dispone de estudios clínicos randomizados sobre el tratamiento de la neumonía por *Legionella* spp., por lo que el conocimiento de la eficacia de los diferentes antibióticos disponibles se basa en modelos experimentales y en estudios clínicos retrospectivos observacionales.

Los estudios clínicos observacionales sugieren que la monoterapia con levofloxacino es más segura y eficaz que el tratamiento con claritromicina, incluso en pacientes con neumonía grave(186,187). En algunos casos graves se han empleado asociaciones de levofloxacino con azitromicina, o de azitromicina o levofloxacino con rifampicina durante los primeros 3-5 días. Aunque el tratamiento conjunto con rifampicina no aporta beneficio adicional(186) y la rifampicina puede disminuir la concentración sérica de moxifloxacino, claritromicina y doxicilina. En estudios retrospectivos publicados por Nagel *et al.* en 2014 y Gershengorn *et al.* en 2015, la azitromicina mostró una eficacia clínica similar a fluorquinolonas en el tratamiento de la neumonía por *L. pneumoniae*(188,189). Jasper *et al.* no encontraron diferencias en la efectividad de las fluoroquinolonas versus los macrólidos para reducir la mortalidad entre los pacientes con neumonía por *Legionella* spp. en una revisión y metaanálisis publicado en 2021(190). La mayoría de los estudios publicados son observacionales por lo que Viasus *et al.* consideran necesarios más ensayos aleatorizados ya que hay poca información disponible sobre eventos adversos o complicaciones, o sobre la duración de la terapia con antibióticos y su asociación con los resultados clínicos(191).

El tratamiento empírico para los pacientes hospitalizados con neumonía atípica debería incluir cobertura para la enfermedad del legionario(192). Un retraso en la administración del tratamiento apropiado está asociado a un aumento de la mortalidad(193). Martínez *et al.* en 2009 publicaron que el 75% de las neumonías atípicas adquiridas en la comunidad (NAC) diagnosticadas en los servicios de Urgencias de los hospitales españoles se tratan empíricamente con antibióticos activos frente a *Legionella* spp.(194). El tratamiento por vía oral puede ser eficaz en los casos leves, pero es recomendable la vía parenteral hasta obtener respuesta clínica, que habitualmente se produce entre el tercer y el quinto día post-tratamiento. La duración de tratamiento depende del antibiótico, el grado de inmunosupresión, la presencia continua de infección y el curso clínico del paciente, aunque normalmente dura de 10-15 días. Otras pautas potencialmente activas incluyen doxiciclina y cotrimoxazol durante 14 días, ambos de segunda elección(195).

La lefamulina es un nuevo antibiótico de pleuromutilina. Exhibe un mecanismo de acción único mediante la inhibición de la síntesis de proteínas. Muestra actividad contra organismos grampositivos y atípicos asociados con NAC (es decir, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y *Chlamydia pneumoniae*), con un espectro expandido grampositivo incluyendo *Staphylococcus aureus* (es decir, meticilina resistente cepas intermedias de vancomicina y heterogéneas) y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina entre otros(196). La lefamulina fue aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) el 19 de agosto de 2019 para el tratamiento de la NAC. Cumple con los criterios de no inferioridad para NAC con un perfil mínimo de efectos secundarios(197). Múltiples estudios han probado su eficacia frente a tratamientos convencionales de pacientes con neumonía adquirida en la comunidad, generalmente orientados hacia patógenos como *S. pneumoniae*, *H. influenzae* o *S. aureus* multirresistentes(198–200).

5. EPIDEMIOLOGÍA, PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA LEGIONELOSIS

5.1 INCIDENCIA

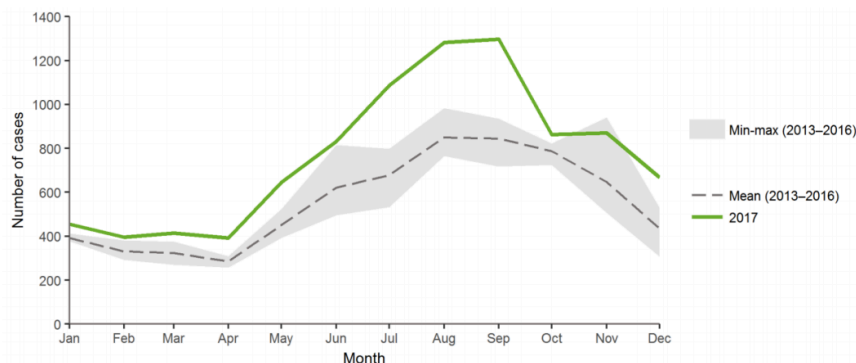
En la Unión Europea, en 2011 se notificaron 40 brotes, 17 menos que en 2010. El descenso afectó a todos los ámbitos excepto a los nosocomiales. Los brotes más frecuentes fueron los que se produjeron en el ámbito comunitario (408 brotes), 36 fueron nosocomiales y 153 se asociaron a viajes, 62 de éstos fueron declarados por la red europea de vigilancia de legionelosis asociadas a viajar (hubo, al menos, un turista extranjero entre los afectados).

Según datos del Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades (ECDC), en 2012, se comunicaron un total de 5.856 casos por 30 países(12). Seis países (Italia, Francia, España, Alemania, Reino Unido y Países Bajos) acumulan el 84% de todos los casos notificados. La tasa global de notificación fue de 1.1 por 100.000 habitantes, manteniéndose en niveles de años anteriores (2008-2011). Los países del este de Europa como Bulgaria, Polonia o Rumanía han comunicado muy pocos casos. Con la notable excepción del pico de agosto de 2010, la media mensual del número de casos informados se ha mantenido estable durante los cinco años estudiados. Como en años anteriores, la mayoría de los casos son adquiridos en la comunidad (69%), mientras que el 20% están asociados a viajes, el 85% asociados a cuidados sociosanitarios y el 3% con otros orígenes. La distribución mensual de los casos mostró un pico en verano, en el cual el 57% de los casos se concentraban entre junio y octubre.

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

En la Unión europea en 2017 se comunicaron 9238 casos, mientras que en el año 2018 el número de casos ascendió a 11343. En 2017, el número de notificaciones por cada 100 000 habitantes aumentó a 1.8, la cifra más alta jamás observada para la UE / EEE, siendo de 1.4 por cada 100 000 habitantes en 2017 1.2 por cada 100 000 habitantes en 2013. Un aumento del 30% en el número de casos reportados en la UE / EEE se observó en 2017 en comparación con 2016, con un aumento en la tasa general de notificaciones de la UE / EEE desde 1.4 a 1.8 por 100.000 habitantes. En 2017 de 6976 casos con resultado conocido, se informó que 574 (8%) tuvieron un desenlace fatal. Cuatro países, Francia, Alemania, Italia y España representaron el 68% de todos los casos notificados, aunque solo sus poblaciones combinadas representaban aproximadamente el 50% de la población de la UE / EEE(201).

La distribución de casos por mes informado muestra que la mayoría de los casos (58%) tuvieron lugar entre junio y octubre, como es habitual. Se observa un aumento de los casos comparados con la temporada 2013-2016 excepto en el mes de noviembre, debido a un brote en Portugal en 2014. El pico de septiembre de 2017 con 1301 casos fue el dato más alto del informe epidemiológico anual de 2017. No se informó de ningún brote en ningún país de la UE/EEE que pueda explicar este particular incremento estacional(201). En la figura 3 se muestra la distribución de casos por mes de enfermedad del legionario en países de la UE/EEA durante 2017 y el período 2013-2016.



Source: Country reports Austria, Belgium, Bulgaria, Cyprus, the Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, the Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden and the United Kingdom.

FIGURA 3. Distribución de casos por mes de enfermedad del legionario en países de la UE/EEA durante 2017 y el período 2013-2016.

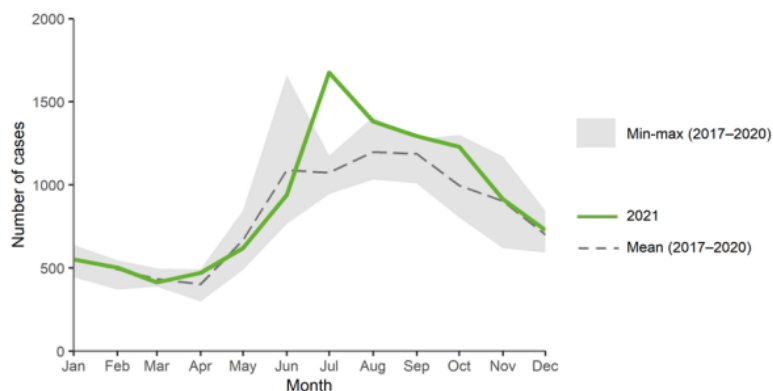
Tomado de: *European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019(201).*

Como en años anteriores, la mayoría fueron casos adquiridos en la comunidad (69%), mientras que el 21% estaban asociados a viajes, el 8% asociados a cuidados sanitarios y el 2% a otras causas. De los datos actuales se desprende que la mayor parte de los brotes se dan en el ámbito comunitario, seguidos por los asociados a viajar. Los brotes nosocomiales declarados son muy

pocos. En 2017 el 91% de los casos se registraron en personas mayores de 45 años (8363 de 9236). La tasa de notificación aumenta con la edad siendo ≤ 0.1 por 100.000 habitantes en menores de 25 años a una tasa de 4.6 por 100.000 habitantes en mayores de 65 años. La ratio hombre: mujer fue de 2.4:1. *Legionella pneumophila* serogrupo 1 fue el patógeno más frecuentemente informado (79%). El aumento observado a lo largo de los años seguramente se debe a varios factores, incluida una mejor vigilancia, el envejecimiento de la población, los viajes y el cambio climático(14)(202). Las condiciones ambientales tales como la temperatura, la humedad y la lluvia están asociadas a una mayor incidencia de legionelosis, probablemente por un efecto sobre la ecología de la bacteria y/o por un aumento en el uso de dispositivos que generan aerosoles o a las torres de refrigeración(201).

La tendencia general en el período 2017-2021 ha sido la de un número creciente de casos notificados, exceptuando la disminución durante el período de la pandemia de COVID-19. En 2021, se observó la tasa de notificación anual de enfermedad del legionario más alta hasta la fecha en la UE y el EEE, con 2,4 casos por 100 000 habitantes. Las tasas son heterogéneas en toda la región de la UE y el EEE, con tasas estandarizadas por edad que varían según el país entre <1 y 5 casos por 100 000 habitantes. Cuatro países (Italia, Francia, España y Alemania) representaron el 75% de todos los casos notificados. Los hombres mayores de 65 años fueron el grupo más afectado (8,9 casos por 100.000 habitantes). Sólo el 11% de los casos fueron confirmados por cultivo. Es probable que esto lleve a una subestimación de los casos de enfermedad del legionario causada por especies de *Legionella* spp. distintas de *Legionella pneumophila*. Se notificaron 1.255 casos (12%) diagnosticados por pruebas moleculares (PCR). Entre los casos notificados del patógeno confirmados por cultivo (1 133; 11%), se notificaron un total de 32 especies de *Legionella* no-*pneumophila* (3%): *L. anisa* (2), *L. bozemanii* (4), *L. longbeachae* (22), *L. micdadei* (3) y *L. cincinnatiensis* (1). De los 1.133 casos, 14 fueron notificados como especies de *Legionella* spp. desconocidas. La mayoría de los casos se consideraron adquiridos en la comunidad. Ocho de los 27 países de la UE y el EEE que comunicaron datos al sistema de notificación de brotes notificaron la aparición de al menos un brote de enfermedad del legionario. Se notificaron un total de 19 brotes con 137 casos confirmados. El plan de vigilancia de la enfermedad del legionario asociada a viajes (TALD) observó un aumento del 38 % en los casos en comparación con 2020. Al igual que en años anteriores, el 90 % de los casos de TALD ocurrieron en personas de 45 años o más. Se observó una distribución por edades similar en la recopilación de datos retrospectivos anuales de casos de enfermedad del legionario(203). En 2021, la distribución de los casos por mes de notificación muestra que la mayoría (6.521; 61 %) de los casos ocurrieron entre junio y octubre, similar a años anteriores (figura 4). Se produjo un pico inusual en el número de casos detectados en julio (1.676 casos), que fue similar al observado en junio de 2018. Estos picos se produjeron en ausencia de un brote específico en un país. La distribución general para todos los demás meses estuvo dentro del rango de los cuatro años anteriores (tabla 4)(203).

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria



Source: Country reports from Austria, Belgium, Bulgaria, Cyprus, Czechia, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Luxembourg, Malta, the Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, and Sweden.

FIGURA 4. Distribución de casos por mes de enfermedad del legionario en países de la UE/EEA durante 2021 y el período 2017-2011. Tomado de: *European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2021. Stockholm: ECDC; 2023(203)*

En Europa el Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades (ECDC) coordina la vigilancia de casos de legionelosis asociados a viajar. El objetivo es identificar los alojamientos turísticos que pueden suponer un riesgo para contraer la enfermedad y que las autoridades de salud pública de los países adopten las medidas de control para evitar nuevos casos.

En España el 26% de los brotes declarados se relacionan con alojamientos turísticos visitados, tanto por turistas y viajeros nacionales como extranjeros. En España, la legionelosis es una enfermedad de declaración obligatoria desde 1996 (BOE, 1995)(204). En 1997, se declararon un total de 201 casos de legionelosis en 11 comunidades autónomas. En los últimos diez años se ha declarado a La red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) 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 y en 2011 ha descendido claramente. El incremento en el periodo de 1997 a 2000 se debe a la implantación progresiva de la notificación de legionelosis en las CCAA y a la introducción de técnicas rápidas de diagnóstico como la detección de antígeno en orina a finales de la década de los noventa. Durante el periodo 1999 a 2011 se declararon 597 brotes de legionelosis (Figura 3). En total resultaron afectadas 3.785 personas de las que 3.144 requirieron hospitalización (83%). Se produjeron 155 fallecimientos, la letalidad global fue de 4,1%. Para la interpretación de los resultados hay que tener en cuenta que Cataluña ha notificado 287 brotes de los 408 brotes comunitarios (70%). La mayor parte de ellos son de 2 y tres casos y para en los que no se halla la fuente de infección.

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

TABLA 4. Distribución de casos y ratios de enfermedad del legionario en países de la UE/EEA.

Tomado de: *European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2021. Stockholm: ECDC; 2023(203).*

Country	2017		2018		2019		2020		2021		
	Number	Rate	Number	Rate	Number	Rate	Number	Rate	Number	Rate	ASR
Austria	219	2.5	237	2.7	255	2.9	249	2.8	278	3.1	2.8
Belgium	235	2.1	270	2.4	224	2.0	143	1.2	274	2.4	2.2
Bulgaria	2	0.0	11	0.2	5	0.1	7	0.1	1	0.0	0.0
Croatia	33	0.8	43	1.0	ND	NR	ND	NR	ND	NR	NR
Cyprus	1	0.1	5	0.6	4	0.5	3	0.3	4	0.4	0.5
Czechia	217	2.1	231	2.2	277	2.6	231	2.2	219	2.0	1.8
Denmark	278	4.8	264	4.6	269	4.6	278	4.8	281	4.8	4.3
Estonia	16	1.2	18	1.4	12	0.9	18	1.4	10	0.8	0.7
Finland	27	0.5	24	0.4	44	0.8	24	0.4	34	0.6	0.5
France	1 630	2.4	2 133	3.2	1 816	2.7	1 328	2.0	2 039	3.0	2.8
Germany	1 279	1.5	1 448	1.7	1 554	1.9	1 272	1.5	1 524	1.8	1.5
Greece	43	0.4	65	0.6	45	0.4	29	0.3	25	0.2	0.2
Hungary	62	0.6	74	0.8	113	1.2	101	1.0	85	0.9	0.8
Iceland	3	0.9	5	1.4	4	1.1	4	1.1	10	2.7	3.1
Ireland	25	0.5	25	0.5	21	0.4	12	0.2	4	0.1	0.1
Italy	2 037	3.4	3 018	5.0	3 205	5.4	2 120	3.6	2 726	4.6	3.6
Latvia	31	1.6	37	1.9	42	2.2	27	1.4	61	3.2	3.0
Liechtenstein	ND	NR	ND	NR	ND	NR	ND	NR	2	5.1	4.7
Lithuania	14	0.5	21	0.7	17	0.6	12	0.4	4	0.1	0.1
Luxembourg	9	1.5	10	1.7	14	2.3	10	1.6	17	2.7	2.8
Malta	11	2.4	13	2.7	5	1.0	16	3.1	8	1.6	1.5
Netherlands	561	3.3	584	3.4	566	3.3	461	2.6	658	3.8	3.4
Norway	52	1.0	69	1.3	65	1.2	39	0.7	43	0.8	0.8
Poland	38	0.1	70	0.2	74	0.2	46	0.1	46	0.1	0.1
Portugal	231	2.2	211	2.1	201	2.0	307	3.0	254	2.5	2.2
Romania	19	0.1	62	0.3	19	0.1	8	0.0	8	0.0	0.0
Slovakia	14	0.3	54	1.0	85	1.6	98	1.8	148	2.7	2.7
Slovenia	117	5.7	160	7.7	196	9.4	120	5.7	86	4.2	3.7
Spain	1 363	2.9	1 513	3.2	1 542	3.3	1 336	2.8	1 704	3.6	3.1
Sweden	189	1.9	198	2.0	182	1.8	135	1.3	168	1.6	1.4
United Kingdom ¹	504	0.8	532	0.8	517	0.8	ND	ND	ND	ND	ND
EU/EEA	9 260	1.8	11 405	2.2	11 373	2.2	8 434	1.9	10 723	2.4	2.1

Source: country reports
ASR: age-standardised rate
ND: no data reported
NR: no rate calculated.

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

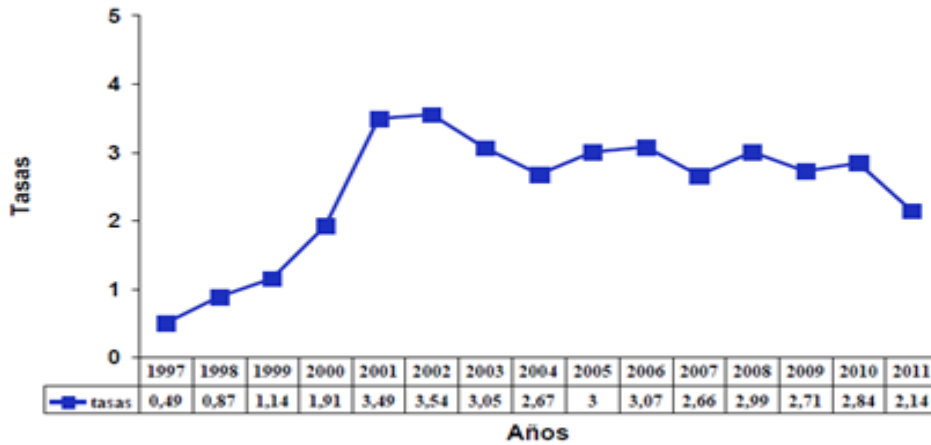


FIGURA 5. Legionelosis. Incidencia por 100.000 habitantes. España. Años 1997-2011. Extraída de brotes de legionelosis notificados a la Red Nacional De Vigilancia Epidemiológica. Años 1999 a 2011. http://www.isciii.es/isciii/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/legionelosis_brotos_1999-2011.pdf

En España en el año 2012 se declararon 972 casos frente a los 1.513 detectados en 2018(205). Entre septiembre y octubre de 2017 se informó un aumento en el número de enfermedad del Legionario en turistas europeos que habían viajado a Mallorca. Hubo 18 casos, uno de ellos fatal. No se identificó el origen del brote. Se sospecha que fue un brote comunitario(206). En 2018, se mantiene la tendencia al alza en el número de casos tanto en Europa (11.343) como en España (1.513).

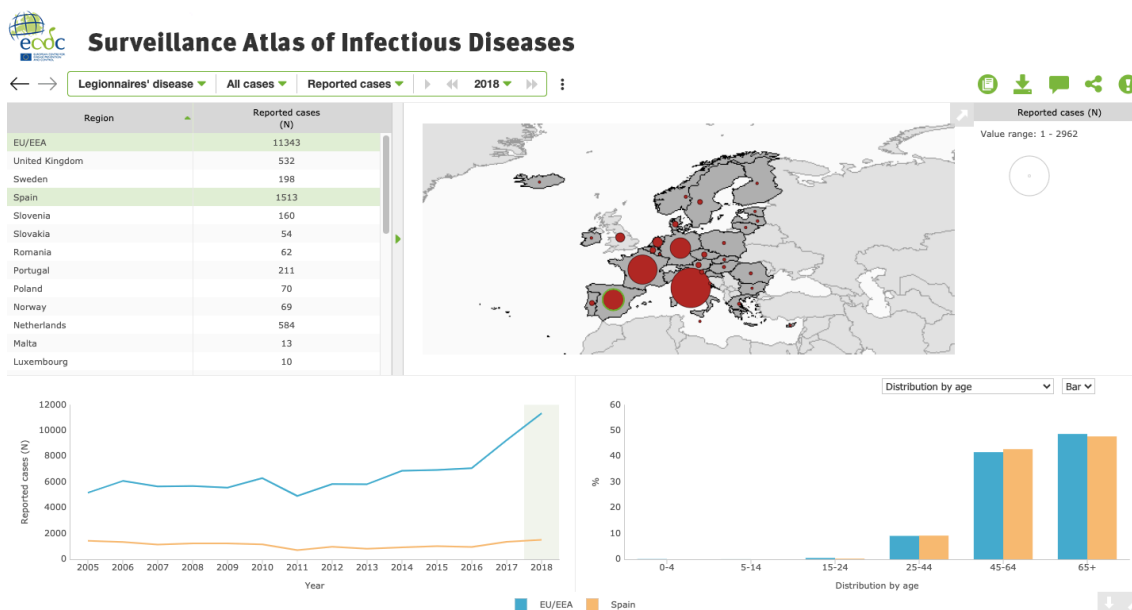


FIGURA 6. Atlas de vigilancia de enfermedades infecciosas. ECDC. Tomado de: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx> el 01/06/2020(207).

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

En 2021 se notificaron a la RENAVE 1.733 casos de legionelosis, de éstos, 1.720 fueron casos autóctonos (Tasa de notificación (TN)=3,63 por 100.000 habitantes) y 13 fueron casos importados contraídos en otros países. Además, a través de la red de vigilancia de casos asociados a viajes del ECDC (ELDSNet), se notificaron 41 casos en viajeros de otros países que tuvieron como antecedente permanecer en nuestro país durante el periodo de incubación. La incidencia en 2021 fue un 25,3% mayor que la registrada en 2020. Este aumento confirma la tendencia ascendente de los casos, después del descenso en el año pandémico. En 2021, de los 111 casos residentes en España con antecedente de viaje 83 viajaron a otra CA distinta a la de residencia. En 2021 las cinco CCAA con tasas más elevadas fueron: Cataluña (TN=6,27 y 480 casos), Navarra (TN=6,24 y 41 casos), Cantabria (TN=5,65 y 33 casos), País Vasco (TN=5,28 y 75 casos), Baleares (TN=4,92 y 60 casos). Las tasas más bajas correspondieron a Madrid (TN=1,50 y 101 casos), Extremadura (TN=1,42 y 15 casos) y Canarias (0,67 y 15 casos). Ceuta y Melilla no notificaron ningún caso. Los datos analizados confirman el carácter estacional de esta enfermedad, con el pico de máxima incidencia de junio a octubre(208).

En los últimos años ha aumentado el número de brotes asociados a ámbitos cerrados como las residencias de ancianos, distintas instituciones o colectivos, prisiones y balnearios, tanto los naturales como los urbanos, con instalaciones que utilizan agua en forma de chorros o piscinas con movimiento (spas). El mantenimiento de estas instalaciones para que no supongan un riesgo requiere una especial atención debido a que sus residentes y usuarios pertenecen a grupos de la población con más susceptibilidad para contraer la enfermedad.

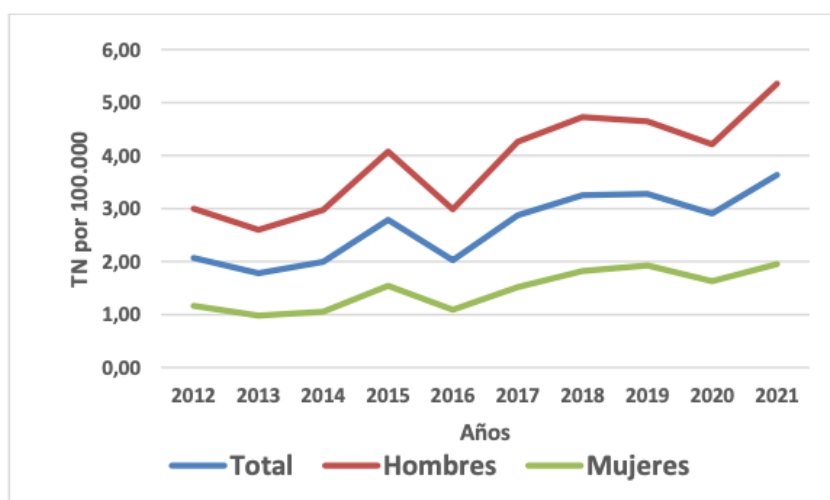


FIGURA 7. Legionelosis, tasas de notificación por 100.000 habitantes según el año de inicio síntomas y el sexo. España, años 2012 a 2021. Tomado de: Informe epidemiológico sobre la situación de legionelosis en España. Año 2021. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III.(208)

5.2 PREVENCIÓN Y CONTROL

La idea de que esta enfermedad, de origen ambiental, es prevenible se sustenta en el importante cuerpo de conocimiento disponible para su control, así como en los procedimientos de evaluación que permiten la prevención en las instalaciones de riesgo. A esto hay que añadir la existencia de una legislación nacional y autonómica, así como otras normas que permiten la intervención de las autoridades de salud pública en caso de que sea necesario(23,209,210). Sin embargo, la vigilancia epidemiológica y la investigación de brotes son fundamentales, no sólo para disminuir el impacto de los brotes en la población, sino para identificar nuevas fuentes de infección (211) como las que siguen describiéndose como causa de brotes en la comunidad(44).

Conocer los factores que favorecen la transmisión de *Legionella* spp. y su nicho ecológico proporciona una información de gran utilidad a la hora de abordar la prevención de la enfermedad. El desarrollo de la enfermedad depende principalmente de la intensidad de la exposición a aerosoles, medida por el tiempo de exposición y por la concentración de la bacteria en el aerosol y, de la susceptibilidad de las personas expuestas. Por ello, las medidas de prevención y control de la enfermedad que se proponen van en dos direcciones, de un lado evitar las condiciones que favorecen la supervivencia y multiplicación de la bacteria, mediante la limpieza de las instalaciones y el control de la temperatura del agua, y de otro lado, controlar la eliminación de los aerosoles, evitando que su eliminación se realice en zonas muy transitadas, en lugares cercanos a ventanas o tomas de aire de otros sistemas, o en lugares donde las personas expuestas sean especialmente susceptibles(148).

LEGISLACIÓN VIGENTE: ASPECTOS NORMATIVOS

En España, la legionelosis fue incluida como Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO) en 1995 (RD 2210/1995) (212). En julio de 2001 se publica el Real Decreto 909/2001 por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis(213). Posteriormente diferentes Comunidades Autónomas editan normas que suponen la adaptación de lo indicado en este Real Decreto al marco legislativo autonómico. En julio de 2003 se publica el RD 865/2003 en el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis(22). Este Real Decreto, vigente durante 19 años, surge por la necesaria adaptación a las innovaciones y al avance científico técnico en el control de la legionelosis. El análisis microbiológico del agua en búsqueda de *Legionella* spp. se realiza siguiendo las directrices de la norma UNE-EN ISO 11731, y la prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* spp. en instalaciones por la UNE 100030(209,210,214–216).

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

Durante el período de vigencia del RD 865/2003 se han desarrollado diferentes disposiciones y normas para aplicarlo, como la UNE 100030:2017(210). Tal como argumenta Caballo Diéguez, en la monografía “*Legionella* y legionelosis” de la Fundación Ramón Areces en 2021: “Además de las normativas de las comunidades autónomas, algunas previas al RD 865/2003, también surgieron otras normativas sobre piscinas, agua regenerada, etc., que ahora era necesario referenciar, junto con los avances en procedimientos analíticos para la investigación de *Legionella* spp, especialmente en la metodología de la toma de muestras, y el recurso a los métodos analíticos alternativos al cultivo. El resultado de la revisión del documento técnico en el grupo de trabajo mostró una heterogeneidad importante en las interpretaciones. Fue diversa la información que allí se vio y surgieron dilemas como que, el Real Decreto establece algunos apartados mínimos a tener en cuenta y la normativa establece otros valores diferentes. Todo esto motivó la elaboración de una nueva normativa por parte de la Dirección General de Salud Pública del Gobierno de España”, dando paso a la publicación del RD 487/2022 de 21 de junio (22,23,217–219).

Así pues, el nuevo RD 487/2022 contempla mejoras técnicas y nuevas medidas de gestión del riesgo e innovaciones necesarias para un mayor control de las instalaciones o equipos susceptibles e incluye muchos de los contenidos de la UNE 100030:2017; considerando necesario seguir investigando en aquellos aspectos que dan lugar a la proliferación de *Legionella* spp., así como en los procedimientos posibles para su eliminación de forma eficaz, adaptando en consecuencia la normativa a los sucesivos avances que se van produciendo(23). Actualiza diferentes puntos como el ámbito de aplicación, el tipo de control y mantenimiento a realizar o los límites de los parámetros establecidos. Indica que los laboratorios de análisis de *Legionella* spp. deben acreditarse según la ISO 17025:2017 haciéndose cargo de la toma de muestras y de su cultivo según la normativa vigente, dando un plazo de dos años desde su entrada en vigor para su cumplimiento. La frecuencia mínima de análisis se determinará en función del PPCL o el PSL, y ante cualquier incidencia que se produzca en la instalación, el responsable técnico deberá valorar la adopción de nuevas medidas. En ese caso, las autoridades sanitarias podrán requerir aumentar los parámetros del análisis. Para el control de las aguas, además de cultivo de *Legionella* spp., se deberán determinar al menos los siguientes parámetros: pH (cuando el biocida dependa de su valor), temperatura, conductividad y concentración de desinfectante residual. Hay novedades en la clasificación de las instalaciones y su mantenimiento que afectan a las responsabilidades de los titulares de la instalación, la frecuencia con la que aplicar los tratamientos de mantenimiento, e incluye la necesidad de parametrizar todos los aspectos que puedan influir en la aparición y proliferación de bacterias.

Estos cambios en aspectos técnicos como la definición del PPCL y PSL han motivado la actualización de la UNE 100030 en octubre de 2023 (216).

ÁMBITO DE APLICACIÓN

En este apartado se exponen las instalaciones con riesgo de proliferación y dispersión de *Legionella* spp. A diferencia del artículo 2 del RD 865/2003, en el RD 487/2022 ya no se clasifican en instalaciones con mayor y menor probabilidad de riesgo de proliferación y dispersión de *Legionella* spp. La ampliación en la clasificación permite abarcar un mayor número de instalaciones susceptibles a control de *Legionella* spp. En la tabla 5 se muestra la clasificación de las instalaciones de riesgo de *Legionella* spp. según RD865/2003.

El RD 487/2022 se aplica en las instalaciones que puedan ser susceptibles de convertirse en focos de exposición humana a la bacteria y, por tanto, de propagación de la enfermedad de la legionelosis durante su funcionamiento, pruebas de servicio o mantenimiento, tales como las descritas la figura 8. Quedan excluidas las instalaciones ubicadas en edificios dedicados al uso exclusivo de vivienda, siempre y cuando no afecten al ambiente exterior de estos edificios. No obstante, ante la sospecha de un riesgo para la salud de la población, la autoridad sanitaria podrá exigir que se adopten las medidas de control que se consideren oportunas.

En general, en instalaciones que acumulan agua y pueden generar aerosoles los aspectos técnicos que ayudan a minimizar la multiplicación de la bacteria se pueden resumir en, al menos, 5 puntos:

- 1) Evitar temperaturas de almacenamiento o distribución de agua comprendidas entre 25°C y 45°C.
- 2) Evitar la presencia de suciedad, la acumulación de sustratos y la formación de biocapas.
- 3) Evitar el estancamiento del agua, especialmente importante en lugares donde hay escasez de agua, en instalaciones con funcionamiento intermitente (por temporada baja, períodos vacacionales, reparaciones, etc.), así como en sistemas de agua complejos, como por ejemplo los sometidos a modificaciones.
- 4) Evitar la utilización de materiales que favorecen el crecimiento de microorganismos, o que se degraden por efecto del cloro o la temperatura, o que sean de difícil limpieza.
- 5) Poner todos los medios disponibles para que el sistema opere correctamente y en buenas condiciones de mantenimiento. Es importante introducir programas de revisión, limpieza y desinfección periódicas, así como realizar muestreos y análisis periódicos.

TABLA 5. Clasificación de las instalaciones de riesgo de *Legionella* spp. según RD865/2003.

Instalaciones con mayor probabilidad de proliferación y dispersión por <i>Legionella</i>
<ul style="list-style-type: none">- <i>Torres de refrigeración y condensadores evaporativos</i>- <i>Sistemas de agua caliente sanitaria con acumulador y circuito de retorno</i>- <i>Sistemas de agua climatizada con agitación constante y recirculación a través de chorros de alta velocidad o la inyección de aire (instalaciones termales)</i>- <i>Centrales humidificadores industriales</i>
Instalaciones con menor probabilidad de proliferación y dispersión por <i>Legionella</i>
<ul style="list-style-type: none">- <i>Sistemas de instalación interior de agua fría de consumo humano (tuberías, depósitos, aljibes), cisternas o depósitos móviles y agua caliente sanitaria sin circuito de retorno.</i>- <i>Sistemas de agua fría</i>- <i>Humectadores</i>- <i>Fuentes ornamentales</i>- <i>Sistemas de riego por aspersión en medio urbano</i>- <i>Sistemas de agua contra incendios</i>- <i>Sistemas de riego urbano</i>- <i>Otros aparatos que acumulen agua y puedan producir aerosoles</i>
Instalaciones de riesgo en terapia respiratoria
<ul style="list-style-type: none">- <i>Equipos de terapia respiratoria</i>- <i>Respiradores</i>- <i>Nebulizadores</i>- <i>Otros equipos médicos en contacto con las vías respiratorias</i>

ANEXO I

Relación no exhaustiva de instalaciones y equipos

1. Sistemas de agua sanitaria.
2. Torres de refrigeración y condensadores evaporativos.
3. Equipos de enfriamiento evaporativo.
4. Centrales humidificadoras industriales.
5. Humidificadores.
6. Sistemas de agua contra incendios.
7. Sistemas de agua climatizada o con temperaturas similares a las climatizadas (≥ 24 °C) y aerosolización con/sin agitación y con/sin recirculación a través de chorros de alta velocidad o la inyección de aire, vasos de piscinas polivalente con este tipo de instalaciones, vasos de piscinas con dispositivos de juego, zonas de juegos de agua, setas, cortinas, cascadas, entre otras.
8. Fuentes ornamentales con difusión de aerosoles y fuentes transitables.
9. Sistemas de riego por aspersión en el medio urbano o en campos de golf o deportes.
10. Dispositivos de enfriamiento evaporativo por pulverización mediante elementos de refrigeración por aerosolización.
11. Sistemas de lavado de vehículos.
12. Máquinas de riego o baldeo de vías públicas y vehículos de limpieza viaria.
13. Cualquier elemento destinado a refrigeración y/o humectación susceptible de producir aerosoles no incluido en el resto de puntos.
14. Instalaciones de uso sanitario / terapéutico: Equipos de terapia respiratoria; respiradores; nebulizadores; sistemas de agua a presión en tratamientos dentales; bañeras terapéuticas con agua a presión; bañeras obstétricas para partos e instalaciones que utilicen aguas declaradas mineromedicinales o termales.
15. Cualquier otra instalación que utilice agua en su funcionamiento y produzca o sea susceptible de producir aerosoles que puedan suponer un riesgo para la salud de la población.

FIGURA 8. ANEXO I del RD 487/2022 en el que se describen las instalaciones susceptibles de convertirse en focos de exposición humana a la bacteria y, por tanto, de propagación de la enfermedad de la legionelosis durante su funcionamiento, pruebas de servicio o mantenimiento

PROGRAMA DE MUESTREO Y ANÁLISIS DEL AGUA.

El RD 865/2003, legislación en vigor durante el período de estudio, regula en el Anexo 3 los aspectos mínimos a realizar para la revisión, limpieza y desinfección de las instalaciones interiores de agua caliente sanitaria y de agua fría de consumo humano para su mantenimiento. Para cumplir con lo exigido, se debía realizar la revisión del estado de conservación y limpieza de la instalación de agua caliente sanitaria, trimestralmente en los depósitos acumuladores y mensualmente en un número representativo, rotatorio a lo largo del año, de los puntos terminales de la red interior (grifos y duchas), de forma que al final del año se hayan revisado todos los puntos terminales de la instalación (22). Como mínimo anualmente se debía realizar una

determinación de *Legionella* spp. de los puntos representativos de la instalación, adoptándose las medidas oportunas para garantizar la calidad del agua de esta.

Para el estudio de *Legionella* spp. las muestras deben tomarse donde es probable que la bacteria pueda aislarse a altas concentraciones y deben ser representativas de modo que reflejen las características de la instalación que se investiga.

La norma UNE 100030 que regula la prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* spp. en instalaciones se aplica a las instalaciones que utilicen agua en su funcionamiento, produzcan aerosoles y se encuentren ubicadas en el interior o exterior de edificios, instalaciones industriales o medios de transporte que puedan ser susceptibles de convertirse en focos para la propagación de la enfermedad, durante su funcionamiento, pruebas de servicio o mantenimiento. Dentro de las instalaciones estudiadas en esta norma se encuentran los sistemas de agua caliente sanitaria y los sistemas de agua fría de consumo, objeto de nuestro estudio (210,215). La edición vigente durante el período de estudio hasta 2017 fue la UNE-EN ISO 100030: 2005 IN en la que sugieren la adopción de medidas adecuadas de algunos sistemas de acondicionamiento de aire y ventilación y los de preparación y distribución de agua caliente sanitaria y agua fría. Las acciones preventivas propuestas se basan en dos tipos de actuaciones, las que reducen la probabilidad de multiplicación de la bacteria (mantenimiento de las condiciones de diseño, limpieza y desinfección) y las que reducen la probabilidad de su dispersión en zonas ocupadas (control del vertido de los aerosoles). En el caso de las instalaciones de agua caliente sanitaria y agua fría de consumo humano las medidas preventivas durante la fase de explotación las operaciones de mantenimiento a realizar son revisión o inspección, limpieza y desinfección de toda la instalación o parte de ella; comprobación de la temperatura del agua en puntos determinados; y determinación de *Legionella* spp. La periodicidad establecida para el control de *Legionella* spp. en la instalación completa es anual. Y como mínimo se deberá realizar una determinación anual de *Legionella* spp. en muestras de agua de puntos representativo de las instalaciones y se adoptarán las medidas necesarias para garantizar la calidad del agua de las mismas (215).

La actualización de la la UNE-EN ISO 100030:2017 indica que se debe diseñar e implantar un PPCL cuyo primer paso es realizar un diagnóstico inicial de la instalación, siendo necesario identificar los **puntos críticos** de la misma (figura 9).

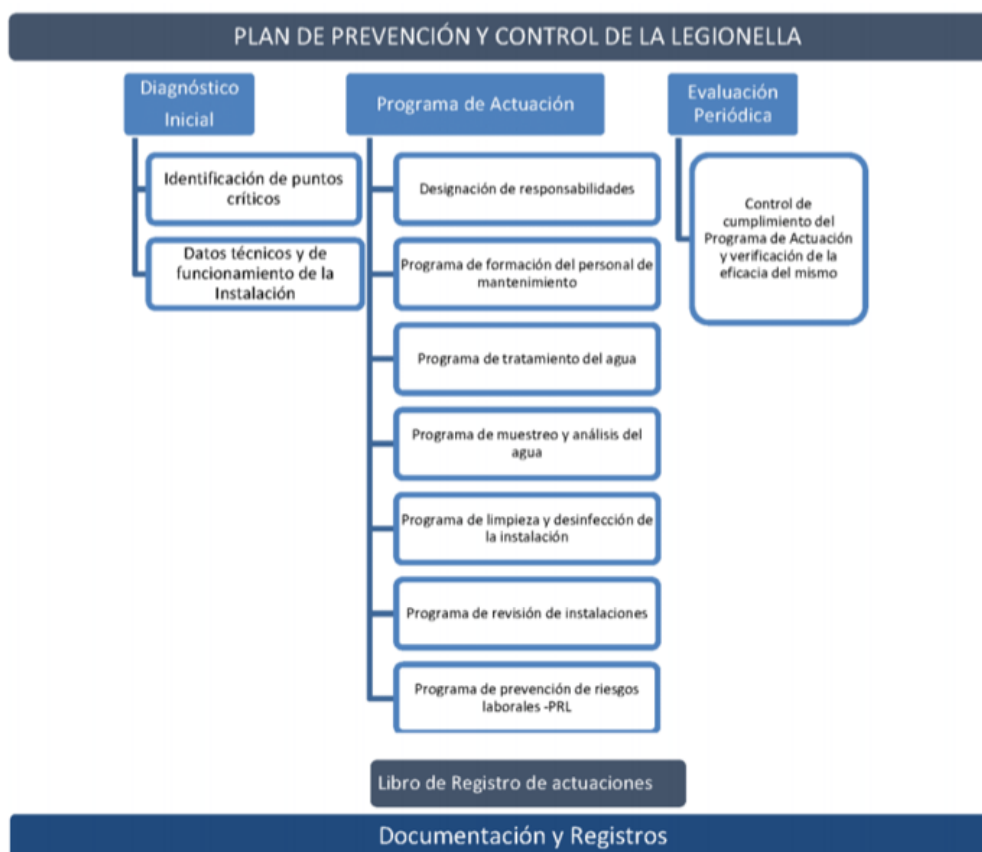


FIGURA 9. Esquema general del plan de prevención y control de la *Legionella* (PPCL). NORMA UNE 100030:2017(210).

Se trata de llevar a cabo la evaluación inicial de la instalación con identificación de los puntos o áreas críticas, planteando las posibles modificaciones estructurales necesarias y las actuaciones para minimizar el riesgo.

El **Programa de muestreo y análisis del agua** incluye un conjunto de actuaciones dirigidos al control de la eficacia de las tareas de los programas de mantenimiento higiénico sanitario, tratamiento del agua, de la posible limpieza y desinfección, y de la verificación de la calidad fisicoquímica y microbiológica del agua. Para este último punto debe incluir la determinación de los puntos a muestrear, periodicidades, número y tipo de determinaciones a realizar, métodos de muestreo y ensayo, criterios de evaluación de la calidad del agua, etc. para minimizar los procesos de corrosión, incrustación y crecimiento de *Legionella* spp. en la instalación.

El muestreo debe ser representativo y comprender los diferentes partes de la instalación revisando los puntos críticos (PC) identificados en el diagnóstico inicial y definiendo el número

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

de puntos a muestrear, en función del objetivo concreto del muestreo (rutinario, inspección, comprobación limpieza y desinfección, etc.). La elección de los puntos de muestreo, el procedimiento de toma de muestras, la custodia y transporte y las condiciones de recepción por el laboratorio son aspectos que incidirán en la fiabilidad de los resultados de los ensayos, lo que puede repercutir en la toma de decisiones acertadas para optimizar el funcionamiento de las instalaciones y prevención de la legionelosis. Una vez caracterizada la instalación, el diseño del muestreo (identificación, número de puntos,...) estará relacionado con el objetivo del mismo, ya sea para investigación de brotes o casos esporádicos, para caracterización de la misma, para verificación tras una Limpieza y Desinfección (L+D) o como seguimiento periódico (210).

Con el RD 487/2022 todas las actuaciones están dirigidas a controlar la eficacia de los programas y verificar la calidad del agua. La toma de muestras se llevará a cabo, bajo procedimientos documentados, que figuren siempre en el programa de muestreo, y será realizada por o bajo la responsabilidad del laboratorio que realice el ensayo mediante cultivo. Los laboratorios que realicen los ensayos descritos deberán estar acreditados bajo la norma ISO 17025:2017 (220).

La frecuencia mínima se determinará en función del PPCL o el PSL, y ante cualquier incidencia que se produzca en la instalación, el responsable técnico deberá valorar la adopción de nuevas medidas. En ese caso, las autoridades sanitarias podrán requerir el aumento de los parámetros a analizar.

El método de referencia para la detección de *Legionella spp.* es el método de cultivo contemplado en la norma UNE-EN ISO 11731:2017 Calidad del agua. Recuento de *Legionella*(209), aunque como aspecto novedoso la nueva legislación contempla el uso de otros métodos de análisis distintos al cultivo para la detección de *Legionella spp.* en las siguientes situaciones:

- a) En investigación de riesgo para la salud de la población.
- b) En investigación de la aparición de casos.
- c) En investigación de la aparición de un brote.
- d) Cuando la autoridad sanitaria lo considere necesario.
- e) Cuando los equipos presentan un funcionamiento irregular o múltiples paradas, y puestas en marcha en periodos de tiempo cortos, sin menoscabo de la realización de los correspondientes cultivos.

Los métodos alternativos serán complementarios al cultivo y tendrán una certificación nacional o internacional de validez en base a la norma ISO 16140-2:2016, emitido por un organismo nacional o internacional de certificación (221).

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

Cuando se tomen muestras para analizar *Legionella spp.*, además deberán determinarse *in situ* al menos los siguientes parámetros físicos químicos: pH (si el efecto del desinfectante depende del pH), temperatura, conductividad y, en su caso, desinfectante residual.

La frecuencia mínima de muestreo será la señalada en el anexo V, cuando se opte por el PPCL. En caso de optar por el PSL se podrán modificar los parámetros a determinar y frecuencias de control de dichos parámetros en base a este PSL. Se establece una frecuencia mínima trimestral para para la determinación de *Legionella spp* en ACS y se muestra en la tabla 6.

El RD 487/2022 establece novedades respecto al anterior RD 865/2003, tomando como referencia las indicaciones de la UNE 100030:2017 como son, entre otros, la elaboración del PPCL y la metodología para la elección de los puntos de muestreo. En el artículo 11 del capítulo IV se indica que el programa de muestreo, la toma de muestras y su transporte se realizarán según lo dispuesto en los anexos V y VI, respectivamente. Entre otros aspectos, la toma de muestras, para el análisis de *Legionella spp.*, debe ser realizada por o bajo la responsabilidad del laboratorio que realiza el ensayo de *Legionella spp.* mediante cultivo.

La nueva legislación modifica la dinámica para la elección de los puntos de muestreo que dependerá del número de puntos terminales (PT) y la autoridad sanitaria podrá cambiar o añadir otros puntos de muestreo en cada una de las instalaciones.

Existen una serie de factores que influyen en el muestreo y pueden condicionar los resultados:

- Localización de los puntos de muestreo en términos de representatividad de la instalación de agua que se está estudiando.

- El momento del muestreo en relación con las operaciones de control y mantenimiento que se llevan a cabo en la instalación, incluido el momento de dosificación del biocida y los niveles del mismo.

- El procedimiento de recogida de muestras.

- El adecuado transporte y almacenamiento de las muestras.

La elección de los puntos de muestreo depende del objetivo de la investigación:

- **Control preventivo o rutinario:** Dar prioridad a aquellos puntos terminales que lleven tiempo sin utilizar, que presenten algún problema, que hayan estado involucrados en alguna obra o reforma o aquellos puntos que hayan resultado positivos a *Legionella spp.* en muestreos anteriores. Si no es el caso, se deben muestrear aquellos puntos más alejados de la posible dosificación de biocida o de la central de producción de calor, además de las muestras tomadas en acumuladores y retorno.

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

Cuando sea posible, se deben priorizar los muestreos en duchas antes que en grifos, al tratarse de los puntos de mayor exposición posible.

TABLA 6. Frecuencia mínima de muestreo. Extraída del anexo V del RD 487/2022.

	<i>Legionella</i> spp. (UFC/L)	Aerobios (UFC/ml)	pH (1) (2)	Temperatura (°C)(2)	Turbidez (UNF)(2)	Biocida (3)	Hierro total (µg/L)	Conductividad
Sistemas de agua sanitaria.	Trimestral.	Trimestral.	Diario.	Diario, rotatorio.	Semanal.	Diario, en su caso, con lectura automática en continuo.	Trimestral.	–
Torres de refrigeración y condensadores evaporativos.	Mensual.	Trimestral.	Diario.	Diario.	Semanal.	Diario, en su caso, con lectura automática en continuo.	Mensual.	Mensual.
Instalaciones con sistemas de agua climatizada o con temperaturas similares a las climatizadas y aerosolización con agitación y recirculación a través de chorros de alta velocidad y/o la inyección de aire, etc.	Mensual.	Mensual.	Diario.	Diario.	Diario.	Diario, en su caso con lectura automática en continuo.	–	–
Dispositivos de enfriamiento evaporativo por pulverización mediante elementos de refrigeración por aerosolización.	Semestral.	Semestral.	Mensual.	Mensual.	Mensual.	Mensual.	–	–
Instalaciones o equipos en los que se utilizan agua declarado minero medicinal y/o termal.	Mensual.	Trimestral.	Semanal.	Semanal.	Semanal.	–	–	–
Otras instalaciones que puedan producir aerosolización con depósito y recirculación (4).	Anual.	Semestral.	Mensual.	Mensual.	Mensual.	Mensual.	–	–
Otras instalaciones que puedan producir aerosolización sin recirculación.	Anual.	–	Mensual.	Mensual.	–	Mensual.	–	–

(1) En función del biocida.

(2) En el caso del pH, temperatura y turbidez se podrá controlar *in situ* preferentemente con lectura automática en continuo.

(3) En el caso de utilización de tratamientos de desinfección físicos se debe sustituir el control del biocida por los controles que aseguren el correcto funcionamiento del sistema de desinfección.

(4) Si fuera necesario, se incluirán otros parámetros que se consideren útiles en la determinación de la calidad del agua o de la efectividad del programa de tratamiento del agua. Sin embargo, la autoridad sanitaria podrá eximir a la persona titular de la instalación del análisis de alguno de estos parámetros si, en base al tipo de instalación de que se trate, no es probable su presencia en el agua en niveles tales que supongan un riesgo para la salud.

– **Comprobación de la eficacia de un tratamiento o tras Limpieza y Desinfección (L+D):** Se debe incluir, si es el caso, puntos que anteriormente hayan resultado positivos a *Legionella* spp. o que hayan estado relacionados con casos, además de los puntos habituales, cumpliendo para las tomas de muestra los tiempos señalados en la legislación vigente.

– **Asociación a casos/brotes:** se deben muestrear los elementos de riesgo relacionados con el mismo según la autoridad sanitaria, legislación vigente y las investigaciones epidemiológicas y/o ambientales. Las muestras para comprobar la eficacia de un tratamiento de limpieza y desinfección se toman dejando transcurrir un plazo aproximado de 15 a 30 días después de la realización del mismo.

El número de muestras para el análisis de *Legionella* spp. en el estudio de estos sistemas depende del tipo de establecimiento, así como de la complejidad y número de terminales que tenga la instalación e incluyendo siempre los puntos críticos determinados en el diagnóstico de situación.

En todo caso, se deben muestrear un número suficiente de puntos para que se pueda determinar un porcentaje de resultados positivos que permita valorar el riesgo de la instalación.

Según la UNE 100030:2017, para calcular el número de muestras mínimas a tomar en las instalaciones de AFC, ACS y de bañeras de hidromasaje, se debería utilizar las fórmulas siguientes:

Número de muestras mínimas en ACS = $0,5 \times \sqrt{n^\circ}$ de puntos terminales

Número de muestras mínimas en AFC = $0,25 \times \sqrt{n^\circ}$ de puntos terminales

Estos valores se aproximan a las directrices del anexo V del RD 487/2022: el número de puntos de toma de muestra en instalaciones de uso colectivo, como los hospitales, estará en función de los puntos terminales, acumuladores de agua caliente y depósitos de agua fría que tenga la instalación. El número de **puntos de muestreo** se calculará en función del número de puntos terminales tal como se muestra en la figura 10.

Puntos terminales	Puntos de toma de muestra	
	Circuito de agua caliente	Circuito de agua fría
< 20	3	1
21 a 50	4	1
51 a 100	4	2
101 a 150	5	2
151 a 200	6	3
201 a 250	7	3
251 a 300	8	4
301 a 350	9	4
> 350	Aumentar proporcionalmente.	Aumentar proporcionalmente.

FIGURA 10. Puntos de toma de muestra en función de los puntos terminales en instalaciones de ACS.

Además, a diferencia del RD 865/2003 que señalaba como requisito analizar mensualmente un número representativo, rotatorio a lo largo del año, de los PT de la red interior (grifos y duchas), de forma que al final del año se hayan revisado todos los PT de la instalación (22), el RD 487/2022 define cuáles son los PT e indica que:

En instalaciones sin circuito de retorno, el muestreo se realizará en función de los PT representativos de la instalación identificados como puntos de toma de muestra.

En instalaciones con circuito de retorno, el muestreo se realizará en función de los PT, los acumuladores de agua caliente y los depósitos de agua fría representativos de la instalación e identificados como puntos de toma de muestra.

En cada muestreo se recogerá muestra del agua como mínimo de los siguientes puntos de la instalación, que no se deberán mezclar, teniendo en cuenta que se deberá aumentar en función del tamaño y características de la instalación:

- a) Un punto en el depósito.
- b) Un punto en el acumulador.
- c) Un punto en el circuito de retorno.
- d) Dos puntos medios de la instalación.
- e) Cada uno de los puntos terminales identificados.

También hay novedades con respecto a la toma de muestras con la nueva legislación, de manera que el en el anexo 6 del RD 865/2003 indicaba que la toma de muestras debía hacerse rascando

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

con una torunda que se introducía en el recipiente de toma de muestra tal como se indica a continuación: En la red de agua fría y caliente se tomarán muestras de agua de los puntos terminales de la red (duchas, grifos, lavamanos), preferiblemente de habitaciones relacionadas con enfermos, así como de algún servicio común, intentando elegir habitaciones no utilizadas en los días previos a la toma. En la red de agua caliente se deberán tomar muestras de la salida más cercana y de la más lejana al depósito, de la salida más cercana al punto de retorno y de otros puntos terminales considerados de interés. Se tomará un litro de agua, recogiendo primero una pequeña cantidad (unos 100 ml) para después rascar el grifo o ducha con una torunda que se incorporará en el mismo envase y recoger el resto de agua (hasta aproximadamente un litro) arrastrando los restos del raspado. Medir temperatura del agua y cantidad de cloro libre (22).

Mientras que en el RD 487/2022 en función del objetivo del muestreo, en los PT puede realizarse la toma de muestra de dos maneras diferentes:

a) Sin purga (sin dejar correr el agua): Su objetivo es muestrear el terminal y su tubería. Representa la colonización del punto terminal, ya que una de las zonas donde es mayor la probabilidad de que *Legionella* spp. crezca y se multiplique es en el interior del grifo o ducha, por lo que el primer litro tomado nada más abrir el punto terminal es el que tendría la mayor concentración de *Legionella* spp. y preferiblemente se debería tomar en uno que haya estado al menos unas horas sin utilizarse.

Se recomienda tomar muestras, sin purga de:

1. Primer tramo en puntos terminales.
2. Puntos terminales alejados y de poco uso.
3. Tramos de baja circulación.
4. Puntos terminales de agua mezclada con temperaturas por debajo de 50°C.

b) Con purga (dejando correr el agua): Su objetivo es muestrear el agua del circuito. Se deja correr el agua hasta alcanzar temperatura constante. Representa la calidad del agua circulante suministrada al grifo o la ducha.

En la nueva legislación la toma de muestra con torunda se reserva para cuando se requiera un mayor conocimiento de la contaminación por *Legionella* spp. de la instalación, como la investigación tras la declaración de casos/brotos, cuando se pretenda comprobar la eficacia de los tratamientos de limpieza y desinfección de choque o lo consideren oportuno las autoridades competentes. En estos caso la muestra se obtendrá mediante el raspado con torundas estériles del interior del grifo haciéndola girar tres veces sobre la superficie interna y raspando también sobre el filtro o el cabezal si se aprecia biocapa de forma evidente. Se introducirá la torunda en un tubo estéril con solución de acuerdo con el anexo C de la norma UNE-EN ISO 11731:2017.

El muestreo de puntos terminales debe abarcar los diferentes sectores de la instalación, atendiendo al número de plantas del edificio o a la extensión horizontal de la red interior de distribución. Priorizando los muestreos en duchas por tratarse de puntos de mayor exposición.

CIRCUNSTANCIAS FAVORECEDORAS DE LA LEGIONELOSIS HOSPITALARIA

En los centros sanitarios coinciden una constelación de factores que favorecen la incidencia y gravedad de la legionelosis. Se han documentado muchos brotes prolongados en hospitales, que se han atribuido a la contaminación de los sistemas de abastecimiento de agua. Muchos hospitales describen experiencias de casos o brotes sucesivos en el tiempo, que en la mayor parte de las ocasiones suelen corresponder a legionelosis nosocomial endémica, situación frecuente en la actualidad (98,222–225).

Actualmente se consideran muy poco probables los brotes nosocomiales asociados a torres de refrigeración, sin embargo, estas instalaciones han estado implicadas en brotes de legionelosis comunitaria, produciendo en ocasiones un elevado número de casos, por lo que también deben ser consideradas (148).

Entre los factores de riesgo se encuentran la concentración de enfermos de riesgo y la presencia de estructuras de soporte hidromecánico que favorecen la contaminación de las aguas. Diversas variables se han relacionado con la colonización de los hospitales por *Legionella* spp., como son el tamaño del hospital, la presencia de acumuladores de gran tamaño, la baja temperatura en los puntos periféricos del sistema de agua caliente e intercambiadores de calor antiguos. Otro punto clave es la amplificación del inóculo. La reapertura de tramos del circuito de agua sanitaria reparados, en los que ha proliferado *Legionella* spp., justifican muchos de los brotes hospitalarios. También lo son la despresurización y el consiguiente estancamiento de agua y la temperatura. En la figura 11 se muestra la temperatura media de algunas instalaciones y su efecto sobre *Legionella* spp. Otro aspecto importante es la formación de biocapas en el interior de las cañerías, acumuladores e interiores de las torres de refrigeración (226).

El hospital ofrece múltiples fuentes potenciales de exposición. Los aerosoles más habitualmente implicados en la aparición de legionelosis nosocomial son los generados por las duchas y grifos de agua caliente de los lavabos. La colonización orofaríngea y la aspiración de agua sanitaria podrían explicar algunos casos. Se han descrito casos asociados con el uso de nebulizadores y equipos de terapia respiratoria, material de irrigación, piscinas de hidroterapia, equipos de

extinción de incendios utilizados recientemente y cubitos de hielo producidos por máquinas situadas en plantas de hospitalización, entre otras fuentes.

Se han documentado muchos brotes prolongados en hospitales, atribuidos a la contaminación de los sistemas de abastecimiento de agua. Muchos centros describen experiencias de casos o brotes sucesivos en el tiempo, que en la mayor parte de las ocasiones suelen corresponder a legionelosis nosocomial endémica, situación frecuente en la actualidad (222).

Aunque las torres de refrigeración son una causa poco probable de brotes nosocomiales, éstas también deben ser consideradas (148,226–229).

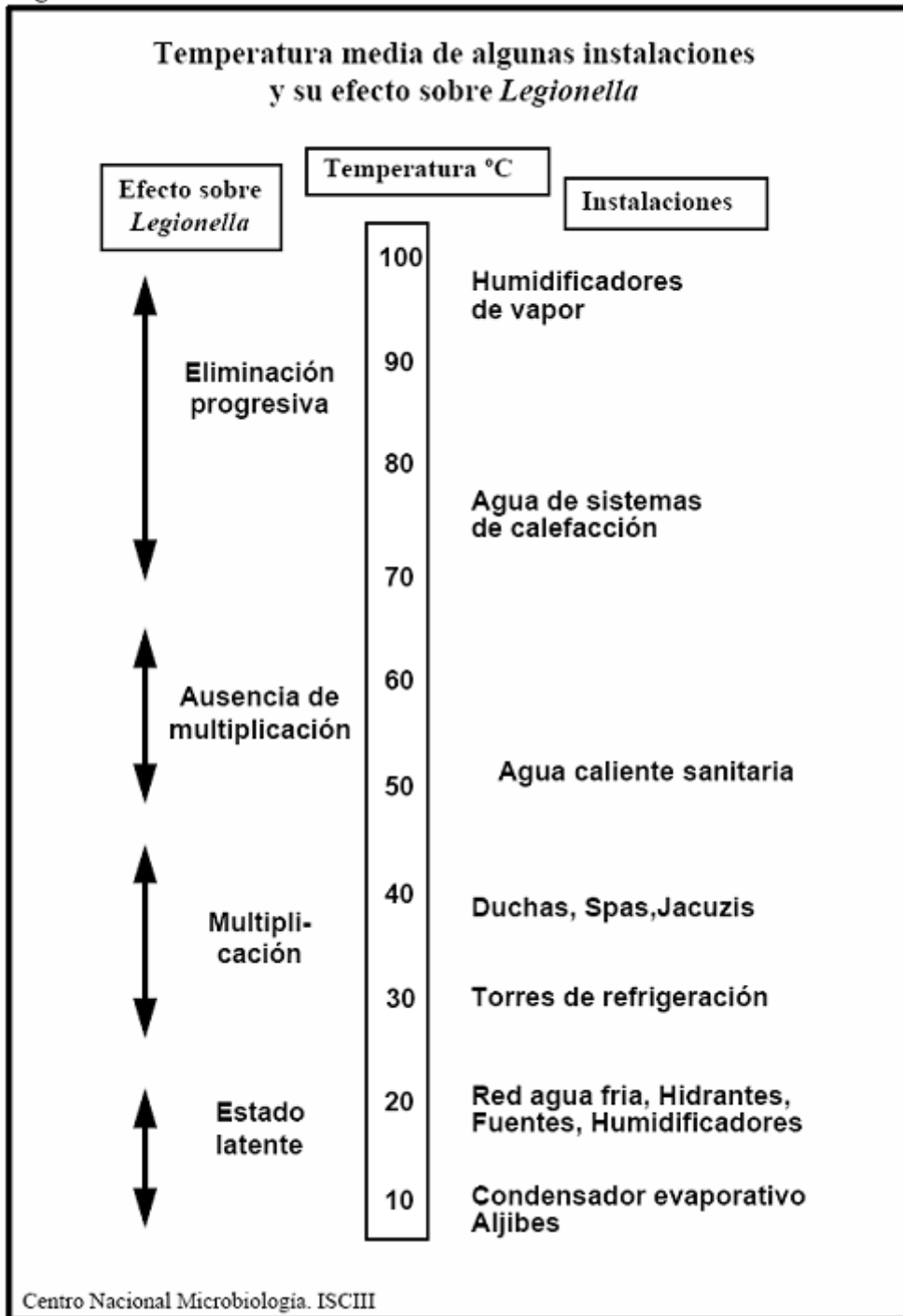


FIGURA 11. Temperatura media de algunas instalaciones y su efecto sobre *Legionella* spp.

5.3 MÉTODOS DE DETECCIÓN EN MUESTRAS DE ORIGEN AMBIENTAL

Los métodos disponibles de detección de *Legionella* spp. en muestras de agua incluyen el cultivo e identificación de la bacteria, métodos inmunológicos y métodos moleculares.

CULTIVO, IDENTIFICACIÓN Y RECuento DE *LEGIONELLA* SSP. EN MUESTRAS DE AGUA.

El aislamiento de la bacteria en cultivo es el método de referencia y se basa en la norma UNE-EN ISO 11731 (209,230,231). Es el único método disponible que permite detectar cualquier especie y serogrupo de *Legionella* spp. y estimar el número de colonias presentes (UFC). Se ha demostrado que *L. pneumophila* es la especie más frecuentemente recuperada de muestras ambientales, siendo la prevalencia del serogrupo 1 similar a la de la suma de otros serogrupos, a diferencia de lo que ocurre en humanos, donde *L. pneumophila* serogrupo 1 es el predominante. El cultivo permite la realización de estudios posteriores, como las investigaciones epidemiológicas dirigidas a detectar las fuentes de infección causantes de los casos, ensayos de sensibilidad frente a productos biocidas y análisis moleculares. Tiene como inconveniente el tiempo que tarda en crecer el microorganismo, de 3 a 12-15 días (148).

Para su aislamiento en cultivo, al igual que ocurre en el procesamiento de muestras clínicas, estos microorganismos requieren medios específicos, como BCYE que contiene los elementos requeridos por la bacteria (hierro y cisteína) y medio selectivo suplementado con antibióticos, como GVPC (BCYE suplementado con glicina, vancomicina, polimixina y cicloheximida), agar Wadowsky Yee modificado (MWY) y BCYE con cefazolina, polimixina B y piramicina (BCYE+AB). Se obtienen colonias visibles a partir del 3º-7º día de incubación a 35-37°C y en condiciones de aerobiosis y humedad, aunque en ocasiones pueden requerir hasta 12-15 días de incubación. Pequeñas cantidades de CO₂ (2,5-5%) pueden favorecer el crecimiento de algunas especies. Como en las muestras de agua la concentración de *Legionella* spp. puede ser baja, y además puede ir acompañada de otro tipo de microbiota, es necesario concentrar y reducir la microbiota acompañante presente en las muestras antes de inocular los medios de cultivo mediante tratamiento ácido o con calor (209).

Estudios recientes avalan el uso de medios selectivos y enriquecidos en función de la matriz de partida y de los pretratamientos empleados (232–234). En noviembre de 2017 se publicó la actualización de la norma UNE-EN ISO 11731:2017 (Calidad del agua. Recuento de *Legionella*). Este documento especifica los métodos de cultivo para el aislamiento de *Legionella* spp. y su recuento en muestras de agua. Como novedad, la nueva versión de la norma incluye además del GVPC (UNE-ES ISO 11731:2007) nuevos medios de cultivo para el aislamiento de *Legionella* spp.: BCYE, BCYE + AB (agar BCYE suplementado con Sulfato de polimixina B, Cefazolina de sodio y Pimaricina) y Agar Wadowsky Yee modificado (MWY).

La elección del método utilizado para el recuento de *Legionella* spp. depende del origen y características de la muestra y del objetivo del muestreo o del estudio. Debe hacerse una previsión de la concentración esperada de microorganismos interferentes, basándose en la

experiencia o en el origen de la muestra. Además, es necesario considerar el límite de detección inferior deseado. En la figura 12 se muestra el anexo J de la norma donde se detalla una matriz de decisión que permite escoger un método adecuado (235).

El **primer paso** para elegir el método de cultivo a utilizar es determinar el origen y características de la muestra. Se elige al menos una de las diferentes posibilidades que se indican a continuación (ver esquema en figura 12):

- Agua con una concentración baja de microorganismos interferentes, por ejemplo, agua potable:

- y una concentración alta esperada de especies de *Legionella* spp. → la muestra debe analizarse según el procedimiento operativo descrito en el apartado 8.4.2 de la norma;

“8.4.2 Muestras con una concentración alta de *Legionella* spp. y una concentración baja de microorganismos interferentes

*Se siembra directamente la muestra si se prevé que el número de *Legionella* sea superior a 10⁴ ufc/l. Se inocula y se distribuyen uniformemente de 0,1 ml a 0,5 ml de la muestra sobre una placa de agar BCYE y una placa de agar BCYE+AB (Sulfato de polimixina B, Cefazolina de sodio, Pimaricina). Se registra el volumen inoculado.”*

- y una concentración baja esperada de especies de *Legionella* spp. → la muestra debe analizarse según el procedimiento operativo descrito en el apartado 8.4.3 de la norma:

“8.4.3 Muestras con una concentración baja de *Legionella* spp. y una concentración baja de microorganismos interferentes

8.4.3.1 Colocación del filtro de membrana directamente sobre el medio de cultivo tras filtración por membrana

Se filtra la muestra y se coloca el filtro de membrana sin tratar directamente en una placa de agar BCYE. El filtro de membrana tratado con solución ácida conforme a lo especificado en el apartado se coloca en una o más placas del agar selectivo o altamente selectivo de BCYE+AB o agar GVPC o agar MWY.

8.4.3.2 Inoculación tras filtración por membrana seguida de un proceso de elución

Se inocula y se distribuyen uniformemente de 0,1 ml a 0,5 ml de cada porción concentrada de la muestra (no tratada, tratada térmicamente y tratada con ácido) de la filtración por membrana con posterior elución sobre una placa de agar BCYE y una o

más placas del agar selectivo o altamente selectivo de BCYE+AB, agar GVPC o agar MWY. Se registra el volumen inoculado.”

– Agua con una concentración alta esperada de microorganismos interferentes, por ejemplo, agua de torres de refrigeración, agua de proceso, agua de las cámaras de lavadores de aire, agua de unidades dentales → la muestra debe analizarse según el procedimiento operativo descrito en el apartado 8.4.4 de la norma.

“8.4.4 Muestras con una concentración alta de microorganismos interferentes

Muestras con una concentración alta de microorganismos interferentes se cultivan sin concentrar (directas), concentradas (véase 8.2) o diluidas (1:10). Se divide cada submuestra en tres porciones. Una primera porción se utiliza sin tratar, la segunda para tratamiento térmico (véase 8.3.1) y la tercera para tratamiento con solución ácida (véase 8.3.2). Se inocula y se distribuyen uniformemente de 0,1 ml a 0,5 ml de cada porción de las submuestras sobre una placa de agar GVPC (véase el capítulo B.4) o una placa de agar MWY (véase el capítulo B.5). Se registra el volumen inoculado.”

– Agua con una concentración esperada de microorganismos interferentes extraordinariamente elevada o de microorganismos que solo pueden eliminarse de las muestras mediante un tratamiento ácido combinado con calentamiento, por ejemplo, aguas residuales, aguas superficiales → la muestra debe analizarse según el procedimiento operativo descrito en el apartado 8.4.5.

“8.4.5 Muestras con una concentración extremadamente alta de microorganismos interferentes

Las muestras con una concentración extremadamente alta de microorganismos interferentes se cultivan sin concentrar (directas) y diluidas (1:10 y 1:100) tras someterlas a un pretratamiento combinado térmico y ácido. Para este tratamiento combinado se lleva a cabo primero el tratamiento térmico (véase 8.3.1), seguido del tratamiento ácido (véase 8.3.2). Es importante enfriar la muestra tratada térmicamente hasta alcanzar la temperatura ambiente antes de efectuar el tratamiento ácido. Las diluciones se preparan directamente después del tratamiento ácido en un diluyente estéril (véase el anexo C). Se mezcla bien mediante agitación utilizando un agitador vortex (5.7) o un baño de agua de ultrasonidos (5.8). Si fuera necesario se añade una capa (la cantidad justa suficiente para cubrir el fondo del recipiente) de perlas de vidrio estériles para facilitar la disgregación del material. Se inocula y se distribuyen uniformemente de 0,1 ml a 0,5 ml de cada porción sobre una placa de agar GVPC (véase B.4) o una placa de agar MWY (véase B.5). Se registra el volumen inoculado.”

El **segundo paso** es determinar el límite inferior de detección deseado y seleccionar uno o más métodos:

a. Inoculación directa (8.4.2)

$$C_s = \frac{a}{V_{tot}} \times V_s$$

- C_s es el nº de ufc por litro de *Legionella* spp.
- a es el nº calculado de colonias de *Legionella* spp. confirmadas

$$a = \frac{\text{Fracción de colonias confirmadas}}{\text{Fracción del nº total de colonias confirmadas}} \times N^{\circ} \text{ total de colonias}$$

- V_t es el volumen total (mL) de la muestra analizada
- V_s es el volumen de referencia elegido para expresar la concentración de microorganismos en la muestra (normalmente 1000 ml).

Ejemplo de límite de detección: en el caso de una muestra inoculada con 0,1 ml, el límite de detección es 10 000 UFC/L.

b. Filtro de membrana sobre placa (8.4.3.1)

$$C_s = \frac{a}{V_{tot}} \times V_s$$

Donde:

- C_s es el nº de ufc por litro de *Legionella* spp.
- a es el nº calculado de colonias de *Legionella* spp. confirmadas

$$a = \frac{\text{Fracción de colonias confirmadas}}{\text{Fracción del n° total de colonias confirmadas}} \times N^{\circ} \text{ total de colonias}$$

- V_t es el volumen total (mL) de la muestra analizada
- V_s es el volumen de referencia elegido para expresar la concentración de microorganismos en la muestra (normalmente 1000 ml).

Ejemplo de límite de detección: en caso de una muestra filtrada de 10 ml, el límite de detección es 100 UFC/L

c. Filtración con procedimiento de elución (8.4.3.2)

$$C_s = \frac{a \times V_c}{V \times V_{tot}} \times V_c$$

Donde:

- C_s es el nº de ufc por litro de *Legionella* spp.
- a es el nº calculado de colonias de *Legionella* spp. confirmadas

$$a = \frac{\text{Fracción de colonias confirmadas}}{\text{Fracción del n° total de colonias confirmadas}} \times N^{\circ} \text{ total de colonias}$$

- V_c es el volúmen de muestra (concentrada) en mL
- V es el volúmen de muestra inoculado por placa o serie de placas (del mismo medio de cultivo) en mililitros (mL)
- V_t es el volumen total (mL) de la muestra analizada
- V_s es el volumen de referencia elegido para expresar la concentración de microorganismos en la muestra (normalmente 1000 ml).

Ejemplo de límite de detección: en el caso de una muestra filtrada de 500 ml eluída en 5 ml de agua y sembrada con 0,1 ml, el límite de detección es 100 UFC/L.

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

Si se detecta un sobrecrecimiento sobre las placas "tratadas térmicamente" y las no "no tratadas" y no hay *Legionella* spp. detectable en las placas "tratadas con ácido", el límite de detección del ejemplo se incrementa en un factor de 10.

d. Inoculación tras dilución (8.4.4 y 8.4.5)

$$C_s = \frac{A \times V_s}{V_{dil}} \times D_f$$

Donde:

- C_s es el nº de ufc por litro de *Legionella* spp.
- a es el nº calculado de colonias de *Legionella* spp. confirmadas

Fracción de colonias confirmadas

$$a = \frac{\text{Fracción de colonias confirmadas}}{\text{Fracción del nº total de colonias confirmadas}} \times N^\circ \text{ total de colonias}$$

- V_t es el volumen total (mL) de la muestra analizada
- V_s es el volumen de referencia elegido para expresar la concentración de microorganismos en la muestra (normalmente 1000 ml).
- V_{dil} es el volumen de muestra diluida inoculado por placa o serie de placas (a partir del mismo medio de cultivo) en mililitros, ml;
- D_f es el factor de dilución.

Ejemplo de límite de detección: 1 ml de muestra tratada térmicamente y tratada con 9 ml de ácido. En el caso de una dilución de 1 a 10 y de 0,1 ml de muestra tratada inoculada, el límite de detección es 1 000 000 UFC/L

Si se detecta un crecimiento excesivo sobre las placas "tratadas térmicamente" y las "no tratadas" y no hay *Legionella* spp. detectable en las placas "tratadas con ácido", el límite de detección del ejemplo se incrementa en un factor de 10.

Los distintos métodos presentan tanto ventajas como desventajas. Así, en la inoculación directa es fácil realizar el recuento y tiene una buena tasa de recuperación, pero presenta un elevado límite de detección. La inoculación del filtro sobre membrana se trata de un método sencillo y con un bajo límite de detección, aunque el recuento es difícil, debido al sobrecrecimiento de

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

microorganismos interferentes y el filtro de membrana influye en el resultado obtenido. La filtración con procedimiento de elución también es un método sencillo y con bajo límite de detección, pero la tasa de recuperación es menor en comparación con la inoculación directa y con el filtro de membrana sobre placa y consume mucho tiempo. Por último, la inoculación tras filtración presenta como ventajas un fácil recuento y una buena tasa de recuperación, y como desventajas un límite de detección elevado y alto consumo de tiempo.

El **tercer paso** es la selección del tratamiento o tratamientos requeridos. Además de éstos puede llevarse a cabo algún tratamiento opcional.

El **cuarto paso** es la selección de los medios de cultivo requeridos. Además de estos medios, pueden utilizarse medios de cultivo opcionales.

Ejemplo: Para el análisis de las muestras incluidas en nuestro estudio, hemos seleccionado la matriz A, con los medios de cultivo A y C (BCYE y GVPC). Procedimientos 8, 9 y 10 del anexo J.

(ISO 11731) [Matriz A; Procedimientos 8, 9 y 10; Medios A y C].

Paso 1: Determinar el origen y las características esperadas de la muestra y seleccionar uno de los tipos de agua entre las dos filas superiores de la matriz de decisión.

Muestra: agua con una concentración baja de microorganismos interferentes (agua potable).

Paso 2: Elegir uno de los métodos de la primera columna basándose en el límite inferior de detección deseado y en los elementos indicados como requeridos en la matriz de decisión.

Método: filtración con procedimiento de elución.

Paso 3: Seleccionar el tratamiento o tratamientos sobre la base de los elementos indicados como requeridos en la matriz de decisión.

Paso 4: Seleccionar los medios de cultivo sobre la base de los elementos indicados como requeridos en la matriz de decisión.

Tratamiento: sin tratamiento, con tratamiento térmico y con tratamiento ácido.

Medio requerido: agar BCYE.

Medio opcional (adicional, si se desea): agar GVPC o agar MWY.

Paso 1											
Agua o agua derivada de matrices relacionadas con agua Por ejemplo, hisopos, biofilms, sedimentos											
Matriz A			Matriz B			Matriz C					
Agua con bajo nivel de fondo (véanse 8.4.2 y 8.4.3) (por ejemplo, agua potable)			Agua con nivel de fondo elevado (véase 8.4.4) (por ejemplo, torres de refrigeración, agua de procesos, agua de las cámaras de los lavadores de aire, agua de unidades dentales)			Agua con nivel de fondo extremadamente elevado ^a (véase 8.4.5) (por ejemplo, aguas residuales, aguas superficiales)					
Paso 4											
Medios de cultivo											
Paso 2	Paso 3	Procedimiento	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Inoculación directa	Sin tratamiento	1	R	R	O		O	R			
	Tratamiento térmico	2	O	O	O		O	R			
	Tratamiento ácido	3	O	O	O		O	R			
	Tratamiento combinado térmico/ácido	4					O	O		O	R
Filtro de membrana sobre placa	Sin tratamiento	5	R	O	O						
	Tratamiento térmico	6	O	O	O		O	O			
	Tratamiento ácido	7	O	R _b			O	O			
Filtración con procedimiento de elución	Sin tratamiento	8	R	R _b			O	R			
	Tratamiento térmico	9	R	R _b			O	R			
	Tratamiento ácido	10	R	R _b			O	R			
Inoculación tras dilución	Sin tratamiento	11	O ^c	O ^c	O ^c		O ^c	R ^c			
	Tratamiento térmico	12	O ^c	O ^c	O ^c		O ^c	R ^c			
	Tratamiento ácido	13	O ^c	O ^c	O ^c		O ^c	R ^c			
	Tratamiento combinado térmico/ácido	14					O ^c	O ^c		O ^d	R ^d
Medio de cultivo											
A: Agar BCYE (véase B.1)											
B: Agar selectivo BCYE [agar BCYE+AB (véase B.3)].											
C: Medio de cultivo de alta selectividad [agar GVPC o agar MWY (véanse B.4 o B.5)].											
Legenda											
R Requerido											
O Opcional											
a Para este tipo de agua, se requieren ambos métodos (inoculación directa e inoculación tras dilución)											
b Elección del medio de cultivo B o C.											
c Con dilución 1:10.											
d Con dilución 1:10 y 1:100.											

FIGURA 12 . Matriz de decisión para la elección del método para el cultivo de *Legionella* ssp.(ANEXO J)

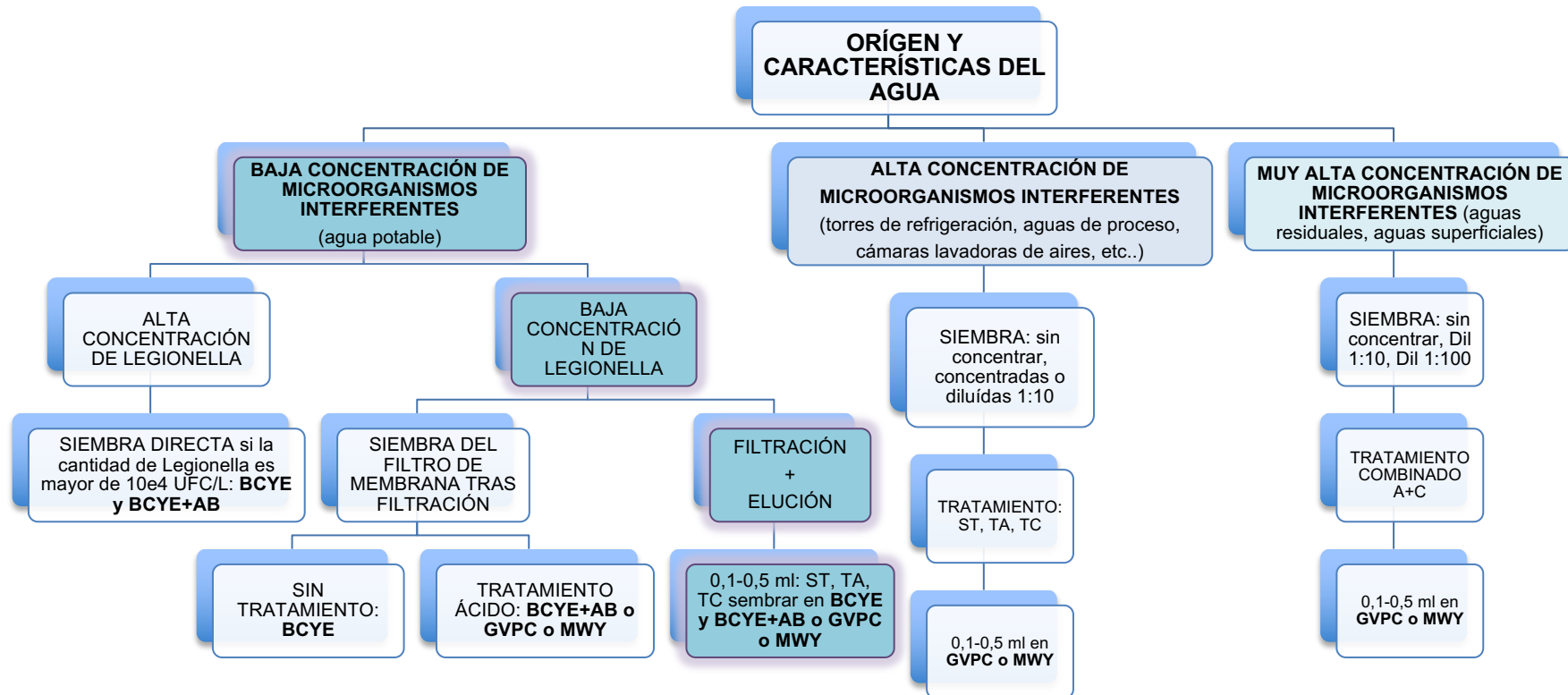


FIGURA 13. Elección del método utilizado para el recuento de *Legionella* spp. Norma UNE-EN ISO 11731:2017. (ST: sin tratamiento; TA: tratamiento ácido; TC: tratamiento con calor; AB: antibiótico; A+C: ácido más calor). Adaptado del anexo J de la norma UNE-EN ISO 11731:2017. En sombreado verde se indica el procedimiento analizado en este objetivo.

Los métodos de identificación de *Legionella* spp. a partir de los cultivos de muestras ambientales son los mismos que los utilizados en la identificación de los cultivos de origen humano (181), incluyendo la espectrometría de masas por MALDI-TOF, FTIR, PCR o secuenciación genómica (236–242).

MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

También se ha utilizado la IFD en muestras ambientales de manera limitada (176,243), para identificar especies y serogrupos de *Legionella* spp. por tinción directa (244). Su sensibilidad varía al igual que las muestras clínicas principalmente debido a que tiene un límite de detección muy elevado.

IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS DE *LEGIONELLA* POR SUS REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS

Este es el método indicado por la UNE-EN ISO 11731:2017. Para la identificación del género *Legionella* en función de sus requerimientos nutritivos se seleccionan para subcultivo varias colonias con morfología característica de *Legionella* spp. provenientes de de las placas de cultivo: cada colonia morfológicamente compatible con *Legionella* spp. es seleccionada para subcultivo y se inocula en BCYE y medio BCYE sin cisteína (WCys). Se deben incubar los subcultivos de colonias como mínimo 2 días a 36 ± 2 ° C y humedad hasta que se produzca crecimiento confluyente o como pequeñas colonias aisladas. Se consideran como *Legionella* spp. las colonias que han crecido en agar enriquecido (BCYE) y presentan crecimiento nulo en agar BCYE sin cisteína (WCys)(209).

IDENTIFICACIÓN DE SEROGRUPOS: AGLUTINACIÓN CON LÁTEX

El método consiste en una reacción antígeno-anticuerpo mediante una aglutinación en porta, utilizando como reactivo partículas de látex azul sensibilizadas con anticuerpos específicos que aglutinan visiblemente en presencia de antígenos de la pared celular de *Legionella* spp., tras un minuto de contacto. Permite la diferenciación de *L. pneumophila* serogrupo 1, *L. pneumophila* serogrupos 2 a 14 y *Legionella* spp. que incluye otras 7 especies diferentes. La aglutinación se puede realizar directamente de colonias o preparando una suspensión bacteriana en solución salina 0,85%. Los valores de sensibilidad y especificidad, según el fabricante, son 99 y 100%, respectivamente (148).

IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS: MALDI-TOF-MS (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION-TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY)

En los últimos años se han introducido los sistemas automáticos de espectrometría de masas para la identificación de especies bacterianas. Entre ellos, la espectrometría de masas de tiempo de vuelo, ionización y desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS) es la más común.

La espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) permite realizar la identificación de distintas especies de microorganismos mediante comparación de los espectros de proteínas obtenidos por ionización suave de las muestras con un láser de nitrógeno (337 nm) y la base de datos que contiene los espectros de proteínas específicos de cada una de las especies de microorganismos más frecuentemente encontrados en la práctica clínica. El espectrómetro de masas consta de un láser que incide sobre la muestra a la que se le ha añadido una matriz orgánica y que funciona como fuente de ionización, un tubo de vacío por donde se desplazan los iones generados por la energía del láser, a distinta velocidad según su masa, y un detector de estos iones, ubicado al final del tubo de vacío. Además, los espectros de proteínas generados se comparan con la base de datos que contiene espectros de referencia específicos de las especies de microorganismos más frecuentemente detectadas en el laboratorio de Microbiología (165).

Los estudios publicados avalando el uso de MALDI-TOF ya se han comentado en el apartado del cultivo de muestras clínicas. Otros autores también encontraron que los métodos estándar y MALDI-TOF mostraron resultados comparables y se pueden aplicar con éxito para la identificación de cepas de *L. pneumophila* en muestras ambientales (245).

IDENTIFICACIÓN POR MÉTODOS MOLECULARES

La detección de *Legionella* spp. en muestras ambientales mediante cultivo presenta diversas dificultades que pueden hacer disminuir su rendimiento, como son la necesidad de pretratamiento de las muestras, la presencia de otras bacterias que pueden enmascarar la presencia de *Legionella* spp., las formas de *Legionella* spp. parásitas de amebas, la presencia de desinfectantes y otras sustancias químicas (*Legionella* viable no cultivable).

Aunque el método de referencia es el cultivo (UNE-EN ISO 11731:2017), el RD 487/2022 permite utilizar otros métodos de análisis distintos al cultivo para la detección de *Legionella* spp. en diversas situaciones como la investigación de brotes, la aparición de casos, cuando los equipos

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

presenten un funcionamiento irregular o cuando la autoridad sanitaria lo considere necesario (23).

El desarrollo de métodos más rápidos, independientes del cultivo y que sean capaces de discriminar entre células vivas y muertas es muy importante para medir los riesgos de infección por *Legionella* spp. y prevenir la legionelosis. Actualmente se encuentran disponibles varios kits comerciales en tiempo real diseñados para la detección y cuantificación de especies de *Legionella* spp. en agua mediante PCR en tiempo real.

Últimamente, los métodos moleculares han ganado importancia como método para detectar *Legionella* spp. en muestras ambientales. A partir de una muestra de agua filtrada y concentrada, se realiza una extracción de ADN y amplificación mediante PCR para detectar pequeñas secuencias de ADN de *Legionella* spp. (246–248). El empleo de una PCR a tiempo real permite la cuantificación del número de bacterias presentes en la muestra, y disminuye el tiempo requerido en el procesamiento frente a las plataformas convencionales (248–250).

Los ensayos se han dirigido fundamentalmente a las mismas dianas utilizadas con muestras respiratorias, el gen *mip* y los genes ribosómicos 5S ARNr y 16S ARNr (30,251).

La principal ventaja que muestra la detección de *Legionella* spp. mediante qPCR es su alto valor predictivo negativo, permitiendo descartar la presencia de *Legionella* spp. en las muestras en las que no se detecta DNA por qPCR (242,252).

El mayor problema de la PCR es la posibilidad de informar resultados falsos positivos o recuentos superiores a los reales, ya que se extrae tanto el ADN de células vivas como el de células muertas. Para solventar este problema, se emplean moléculas dianas diferentes, que se emplean como marcadores de viabilidad, uno de los mejores candidatos es el ARNm, debido principalmente a su corto tiempo de vida medio. De este modo, mediante una reacción de retrotranscripción previa se puede obtener un ADNc específico, que se puede amplificar por PCR como cualquier muestra de ADN, permitiendo la detección de células con actividad metabólica, y, en consecuencia, células vivas (viables y no viables)(148).

Recientemente varios estudios indican que el uso de monoazida de etidio (EMA) o monoazida de propidio (PMA) podría inhibir selectivamente la amplificación de ADN de células muertas(241,253,254). El uso de colorantes intercalantes de ácidos nucleicos impermeables a la membrana celular fotoactivables, como la EMA o PMA, seguido de la exposición a la luz antes de la extracción y amplificación del ADN, es uno de los enfoques más exitosos para detectar células viables. El uso de colorantes de unión a ácidos nucleicos (EMA o PMA) en combinación con qPCR, a pesar de sus limitaciones, es una alternativa atractiva para detectar y enumerar selectivamente bacterias viables (lo que lleva al término PCR de viabilidad, v-PCR). Esta técnica

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

se utiliza para la detección de diferentes patógenos en muestras clínicas y ambientales (241,255–257).

Ditommasso *et al.* publican un estudio en el que comparan los resultados obtenidos mediante qPCR convencional y métodos de cultivo en muestras artificiales (preparadas en solución salina de Page por adicción de *L. pneumophila* serogrupo 1 (ATCC 33152)) y analizan la cuantificación selectiva de células viables de *Legionella* spp. mediante el método qPCR-PMA. La cantidad de ADN de *Legionella* spp. (GU) determinada por qPCR fue 28 veces mayor que la carga detectada por cultivo (UFC). Aplicando la qPCR combinada con el tratamiento con PMA obtuvieron una reducción del 98,5% de la señal de qPCR de las células muertas. Observaron una diferencia en la capacidad de PMA para suprimir la señal de PCR en muestras con diferentes cantidades de bacterias: la eliminación efectiva de las señales de detección por PMA dependía de la concentración de GU y cantidades crecientes de células dieron como resultado valores más altos de reducción (254).

También la gran variedad de inhibidores de la PCR que pueden encontrarse presentes en muestras medioambientales puede dificultar su desarrollo. Se han descrito varios métodos para su eliminación, sin embargo, actualmente no existe un método universalmente aceptado que permita obtener resultados reproducibles en todo tipo de muestras(181).

En 2017 Collins *et al.* se propusieron evaluar la utilidad de la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) frente al cultivo tradicional para realizar el recuento de *Legionella* spp. de muestras de agua como parte de las pruebas de investigación de rutina y de salud pública. Un resultado negativo de qPCR fue altamente predictivo de un resultado de cultivo negativo para todos los sistemas de agua (valores predictivos negativos, VPN de 97.4 a 100%). Los valores predictivos positivos (VPP) fueron más bajos (0-50%). Los resultados para qPCR fueron generalmente mayores que los de cultivo. Se proponen niveles de alerta y acción entre 1000 y 10.000 UG por litro, respectivamente, en la qPCR para sistemas de agua fría y caliente. El uso de qPCR redujo significativamente el tiempo de resultados para las investigaciones de salud pública al identificar rápidamente las fuentes potenciales y descartar otras, lo que permite una respuesta más rápida y eficiente. Los autores concluyeron que el alto VPN de qPCR apoya su uso para detectar rápidamente muestras negativas sin cultivo(250).

La metodología del cocultivo permite detectar bacterias viables pero no cultivables en medios de cultivo habituales. Varios autores han demostrado la capacidad de activación de las VBCN al entrar en contacto con especies de *Acanthamoeba*(116,258) y también la letalidad al infectar embriones de pollo(259), lo que sugiere que serían capaces de producir infección en humanos ya que los macrófagos son sus hospedadores accidentales. Está demostrado que las cepas de *Legionella* spp. entran en estado VBNC en cuanto las condiciones del medio son adversas. Aunque la capacidad de cultivo de *L. pneumophila* podría inhibirse por completo, la posibilidad

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

de que resista los tratamientos de desinfección tiene implicaciones que preocupan en salud pública, y puede explicar, en parte, la presencia y persistencia de *Legionella* spp. tanto en el agua de consumo como en los sistemas de agua de uso doméstico(260). Akiko Edagawa *et al.* analizan la contaminación de muestras de agua ambiental con *Legionella* spp. utilizando un método de cultivo convencional, PCR y qPCR en tiempo real combinados con un método de cocultivo amebiano. Demostró que la detección de *Legionella* spp., incluso en aquellas muestras donde no fueron detectadas por el método de cultivo, fue posible utilizando qPCR y un método de cocultivo amebiano. Siendo una herramienta útil para detectar *Legionella* spp. viable y virulenta(261).

Joly *et al.* encontraron diferencias interlaboratorio entre el cultivo y la qPCR en 2006 (262). Tras analizar 28 estudios de la última década, Whiley *et al.* publican una revisión que identifica las numerosas inconsistencias entre el cultivo y la qPCR mostrando una diferencia del 50% entre los métodos. Es por esto, que es necesario realizar estudios para llegar a un consenso internacional para desarrollar un protocolo de prueba universalmente aceptado para garantizar la consistencia de los resultados tanto para fines de investigación como para la evaluación de riesgos y cumplir la legislación (263).

Otra línea de investigación para detectar la presencia de VBNC *Legionella* spp. que no se puede detectar mediante los métodos de cultivo estándar (ISO11731:2017) y qPCR es la combinación de estos métodos con la citometría flujo. Se ha demostrado la utilidad de la citometría de flujo para detección y caracterización de *Legionella* spp. en muestras ambientales(264–267). Nissar *et al.* describen un método novedoso para cuantificar *Legionella* spp. VBNC a partir de muestras de ambientales de agua utilizando un ensayo de “clasificación de células por citometría de flujo basado en viabilidad y qPCR” (VFC + qPCR), validado cuantificando la carga genómica de *Legionella* spp. VBNC a partir de muestras de agua de hospitales. Las células VBNC no pudieron cultivarse en agar tamponado con extracto de levadura de carbón (BCYE); sin embargo, su viabilidad se confirmó a través de su actividad ATP y su capacidad para infectar amebas hospedadoras. Posteriormente, una evaluación del procedimiento de pretratamiento ISO11731:2017 demostró que el tratamiento con ácido o calor provoca una subestimación de la población viva de *Legionella* spp. Los resultados de este estudio mostraron que estos procedimientos de pretratamiento inducen a las células cultivables a entrar en un estado VBNC. Esto puede explicar la baja sensibilidad y la falta de reproducibilidad observadas a menudo entre el método de cultivo de *Legionella* spp y la PCR. Este estudio representa la primera vez que se utiliza la clasificación de células por citometría de flujo junto con un ensayo qPCR como método rápido y directo para cuantificar células VBNC de *Legionella* spp. de fuentes ambientales (268). De momento, no hay un consenso en cuanto a la técnica de elección para la detección rápida de *Legionella* spp. en muestras de agua. Parece que la qPCR se muestra como la mejor técnica para este fin, sobre todo para descartar contaminación por *Legionella* spp. Los resultados positivos son más difíciles de interpretar tal como hemos mostrado.

ESTUDIOS DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR: GENOTIPADO

Los aislados de *Legionella* spp. procedentes de muestras clínicas y ambientales, tienen que ser analizados para poder identificar la posible fuente de contagio y establecer una asociación epidemiológica, hecho que se ve dificultado por la ubicuidad de *Legionella* spp. en ecosistemas acuáticos. La identidad de especie y serogrupo no es suficiente para implicar una cepa como causante de un brote de legionelosis. Por ello, resulta imprescindible tipificar las cepas procedentes de los pacientes y las ambientales, mediante su estudio genotípico(4). La epidemiología molecular es, en estos casos, de gran interés para corroborar la hipótesis establecida inicialmente y adoptar medidas de prevención eficaces.

Para realizar estos estudios es fundamental contar con cultivos del mayor número posible de pacientes y con cultivos del mayor número de instalaciones relacionadas posible. Se ha demostrado la coexistencia de varias cepas *Legionella* spp. diferentes en una misma instalación, por lo que es importante identificar al menos 5 ó 6 colonias de cada muestra analizada. La genotipificación de los cultivos de los pacientes define de manera precisa el tipo de *Legionella* spp. que produce los casos, siendo éste el que se busca entre los cultivos ambientales. Para ello se comparan los cultivos humanos y ambientales mediante técnicas de epidemiología molecular (genotipificación). Muchas han sido las técnicas utilizadas para discriminar los aislados de *Legionella* spp.: análisis de plásmidos, electroforesis de proteínas (PAGE), análisis multienzimático, digestión del ADN cromosómico (RFLP), digestión del ADN cromosómico en combinación con hibridación con sondas (ribotipificación), digestión del ADN cromosómico con enzimas de restricción de corte poco frecuente (PFGE). También se han utilizado diferentes tipos de amplificación del ADN, como la amplificación arbitraria (AP-PCR), la amplificación al azar (RAPD), o de regiones repetidas en el cromosoma (REP-PCR), o de fragmentos intergénicos repetidos en el cromosoma (ERIC). Otra técnica utilizada en la caracterización molecular de *Legionella* spp. es la combinación de la digestión del ADN con la amplificación de los fragmentos de restricción (AFLP)(148). Otras técnicas como el tipificado con anticuerpos monoclonales y el *multilocus variable-number tandem-repeat analysis* (MLVA), han sido desarrollados(269). Sin embargo, estas técnicas tienen limitaciones a la hora de realizar los estudios epidemiológicos moleculares debido a su bajo poder de discriminación, y son tediosas y lentas. También se ha desarrollado un RFLP-IS (*restriction fragment length polymorphisms-insertion sequence*) y se espera que mejore las investigaciones moleculares en los brotes de *Legionella* (270).

Gomgnimbou *et al.* en 2014 publicaron otra técnica para subtipado de *Legionella pneumophila* basada en la técnica de membrana *spoligotyping*, que permite clasificar en grupos de diversidad genética mediante CRISPRs (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). La posibilidad de llevar a cabo el *spoligotyping* en otros soportes diferentes a las membranas, como citómetros de flujo con *multiplex-microbead* o con monitores de fluorescencia, aporta numerosas

ventajas. Estos sistemas son válidos para utilizarlos en los análisis rutinarios para la investigación y control de enfermedades infecciosas (271).

La necesidad de disponer de métodos de caracterización molecular que ofrezcan resultados rápidos y reproducibles, con la posibilidad de ser compartidos en tiempo real por diferentes laboratorios, ha llevado al desarrollo de métodos de secuenciación de genes basados en técnicas de MLST (*multilocus sequence typing*). Una variante de esta técnica es el SBT (*sequence-based typing*) en la que se emplean tanto genes “housekeeping” como genes de virulencia, y ha sido empleada para la tipificación molecular de *L. pneumophila* serogrupo 1. Es método de referencia para llevar a cabo el estudio molecular de la epidemiología de *L. pneumophila*, y los grupos obtenidos están referidos a secuencias tipo (STs)(181). Los resultados obtenidos inicialmente con el análisis de seis genes, *flaA*, *pilE*, *Asd*, *mip*, *mompS* y *proA*, fueron los que se emplearon en el primer estudio piloto de SBT (*Sequence-based-typing*) en el EWGLI. Actualmente, el perfil alélico de siete genes permite la asignación de un ST al aislado correspondiente. Una base de datos, comisariada por Public Health England (PHE), Londres, Reino Unido, en cooperación con el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC), Estocolmo, Suecia, facilita el intercambio de datos y puede consultarse para estudios de vigilancia y epidemiología de *L. pneumophila*(272). En 2017, la base de datos constaba de más de 11,000 aislamientos reportados con 2,298 ST diferentes. Los datos del esquema de SBT revelaron que un pequeño subconjunto de ST representa un número desproporcionadamente alto de casos clínicos. En particular, cinco ST (1, 23, 37, 47 y 62) han representado casi la mitad de todos los casos de LD sin relación epidemiológica en el noroeste de Europa informados a la base de datos SBT. A pesar de que el índice de discriminación del esquema SBT es de alrededor de 0,92, la tipificación de los ST que circulan con frecuencia con este método, por ejemplo, ST1, ST47 y ST23, resulta menos informativo para diferenciar aún más las cepas dentro de estos grupos clonales bastante grandes(273). Por lo tanto, se necesita un paso adicional, pero las modalidades intentadas hasta aquí, como spoligotyping, eran de valor limitado (274).

Debido a un mayor nivel de discriminación en comparación con los métodos de tipificación estándar de oro de diferentes bacterias, incluida *L. pneumophila*, la secuenciación del genoma completo (WGS) se ha convertido en una herramienta frecuentemente aplicada en las investigaciones de brotes(275–280). Si bien el uso de esta herramienta se ha basado principalmente en el análisis de polimorfismos nt únicos (SNP), algunos estudios se basan en un enfoque de estudio de todo el genoma para las cepas de *L. pneumophila* sg1. Estos esquemas MLST extendidos permiten una comparación detallada de dos o más aislados al considerar todos los genes de una especie (pangenoma) en lo que se llama MLST del genoma completo (wgMLST), o alternativamente, un conjunto de genes conservados de una especie, a saber, el genoma central MLST (cgMLST)(281). El análisis de varias cepas relacionadas y cepas que estuvieron involucradas en pequeños brotes usando estos cgMLST o wgMLST produjo resultados que estaban de acuerdo con los métodos de tipificación estándar actuales, lo que

indica la idoneidad de estos métodos como herramientas de tipificación para aislamientos de *L. pneumophila* sg1(277,278,282). En 2013 varios autores publicaron el estudio de un brote en Alemania utilizando un enfoque de tipificación gen por gen basado en 1,521 genes centrales: tipificación de secuencia multilocus de genoma central (cgMLST). Esta metodología les permitió conocer que los aislados epidémicos se dividieron en dos grupos distintos, ST345-A y ST345-B, cada uno de los cuales contiene respectivamente una mezcla de muestras ambientales clínicas y epidemiológicamente relacionadas. Los autores concluyen que el brote probablemente fue causado por ambas variantes del tipo de secuencia única, que preexistieron en los reservorios ambientales. Los dos grupos diferían en 40 alelos ubicados en dos regiones genómicas vecinas de aproximadamente 42 y 26 kb. Ambos grupos eran indistinguibles por los métodos estándar de oro comunes y otros métodos de genotipado(283). El genoma central MLST combina un alto nivel discriminatorio con un flujo de trabajo estandarizado y una nomenclatura que permite una comparabilidad global de los aislados. En general, cgMLST demostró ser útil para desenredar la compleja epidemiología genómica del brote(284).

En 2016, David *et al.* publicaron un estudio comparativo para evaluar la metodología óptima para la tipificación de *Legionella pneumophila* utilizando el genoma completo (WGS) de acuerdo con las directrices publicadas, que incluyen (i) un método basado en un solo polimorfismo de nucleótido (SNP), (ii) MLST extendido usando diferentes números de genes, (iii) determinación de la presencia o ausencia de genes, y (iv) un método basado en *kmer*. Analizaron 106 aislamientos del serogrupo 1 de *L. pneumophila* del "panel de tipificación" estándar, utilizado previamente por el Grupo de Estudio de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica sobre Infecciones por *Legionella* (ESGLI), junto con otros 229 aislamientos. Los autores proponen un esquema MLST extendido con ~50 genes que proporciona una concordancia epidemiológica óptima al tiempo que mejora sustancialmente la discriminación ofrecida por SBT y puede usarse como parte de un esquema de tipificación jerárquico que debería mantener la compatibilidad con versiones anteriores y aumentar la discriminación cuando sea necesario (285).

Recientemente el ECDC ha elaborado un informe: "**Marco estratégico del ECDC para la integración de la tipificación molecular y genómica en la vigilancia europea y las investigaciones de brotes en varios países**". En este informe resume el progreso realizado en las áreas de tipificación molecular mejorada en toda la UE para la vigilancia de enfermedades, la vigilancia genómica y el apoyo a brotes en varios países. También documenta cómo los Estados miembros usan la secuenciación del genoma completo (WGS) en las operaciones de salud pública y revisa la evidencia actual de la efectividad del WGS (286).

El marco estratégico propuesto establece una lista revisada de patógenos/enfermedades prioritarias para la integración a mediano plazo en 2019-2021. Durante este período, el ECDC propone prepararse y/o implementar apoyo para investigaciones de brotes en varios países, vigilancia continua de la UE y vigilancia centinela, para varios patógenos, incluida *Legionella spp.*

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

Las metodologías de diagnóstico actuales permiten la identificación de especies de *Legionella* spp. y sus serogrupos. El método SBT para tipificación de los aislados de *Legionella pneumophila* fue desarrollado por el Grupo de Trabajo Europeo sobre Infecciones por *Legionella* (EWGLI)(287) y ha sido referenciado para su uso en informes de vigilancia por la red de Vigilancia Europea de Enfermedades del Legionario (ELDSNet) desde 2010, tanto para sistemas de vigilancia de enfermedades de legionarios anuales como para viajes.

Actualmente, el esquema SBT utiliza una combinación de siete genes y puede discriminar a más de 2 000 tipos de secuencia (ST)(24). Sin embargo, dado que una gran proporción de los casos son causados por algunos ST comunes, el método SBT puede carecer de poder discriminatorio. Investigaciones recientes ya comentadas, han resaltado el valor superior de WGS para igualar cepas ambientales y clínicas al identificar la fuente en brotes y guiar las medidas de control. Un estudio de genomas de *L. pneumophila* indica la aparición reciente de clones hipervirulentos (272). Un esquema MLST basado en WGS extendido con aproximadamente 50 genes proporciona una concordancia epidemiológica óptima al tiempo que mejora sustancialmente la discriminación de SBT y mantiene la compatibilidad con la nomenclatura anterior (285).

Aunque la tipificación directa en muestras clínicas o ambientales es posible hasta cierto punto, el acceso limitado a los aislados de *L. pneumophila* basados en cultivos es un obstáculo importante para WGS. Se propone que el ECDC analice la capacidad europea para la tipificación basada en SBT y WGS de *L. pneumophila* en la red ELDSNet y los países de la UE en el año 2019. El ECDC también discutirá con la red ELDSNet cómo se puede mejorar el informe TESS y de datos moleculares para casos de enfermedad del legionario asociada a los viajes (TALD). El ECDC tiene como objetivo fomentar el desarrollo de un esquema/algoritmo de escritura estándar basado en WGS y trabajar para facilitar el acceso a una base de datos de nomenclatura en colaboración con ELDSNet y ESGLI(277), mientras tanto el esquema SBT sigue siendo el *gold standard*.

Aunque los brotes de legionelosis pueden aparecer en distintos ámbitos (hospitalario, comunitario o relacionado con viajeros) la estrategia para la tipificación epidemiológica de los cultivos de *Legionella* spp. puede ser la misma(181,288–290).

Recientemente Girolamini *et al.* aplican un enfoque de genotipo basado en SBT durante la vigilancia rutinaria de la *Legionella* spp. en un sistema de distribución de agua caliente del hospital para evaluar la contaminación de *Legionella* spp. durante un período de siete años tratando con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y sales de plata (Ag⁺) (H₂O₂/Ag⁺). El estudio se centró en evaluar los cambios en términos de muestras positivas, concentración de *Legionella* spp. y distribución de aislados. El enfoque de genotipo y el análisis de las relaciones filogenéticas entre las cepas permitieron el estudio de las correlaciones o diferencias entre las cepas y su respuesta a los parámetros fisicoquímicos involucrados en la ecología de *Legionella* spp., como la

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

temperatura y el tratamiento de desinfección. Los autores concluyen que el conocimiento adquirido les permite crear un mapa de riesgo de *Legionella* spp. para cada edificio, que podría apoyar el control de infecciones nosocomiales, el mantenimiento y las estrategias de desinfección de los sistemas de distribución de agua, así como facilitar una respuesta rápida durante la investigación epidemiológica mediante la comparación genómica con casos clínicos(237).

OBJETIVOS

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

La normativa vigente durante el período de estudio (RD 865/2003), establecía como criterio para controlar las instalaciones de riesgo el análisis de puntos rotativos de manera que se analizaran todos los puntos terminales a lo largo del año (22). Tiene como inconveniente que en instalaciones poco contaminadas o con una contaminación no uniforme, puede haber períodos de falsa sensación de seguridad al no detectar *Legionella* spp. en puntos no contaminados. Para el estudio de *Legionella* spp. las muestras deberían tomarse donde es probable que la bacteria pueda aislarse a altas concentraciones y deberían ser representativas de modo que reflejen las características de la instalación que se investiga. Nos planteamos establecer un sistema de muestreo alternativo a los puntos terminales de la instalación completa basado en el control periódico de los puntos de la instalación susceptibles de presentar recuentos de *Legionella* spp. más elevados que denominaremos puntos críticos (PC).

En cuanto a la detección de *Legionella* spp., el cultivo convencional en medios selectivos según la UNE-EN ISO 11731 es el método de referencia. Hasta 2017 solo incluía GVPC, que es un medio selectivo con alta rentabilidad en el cultivo de muestras con una mayor carga de microbiota interferente, aunque es conocido que puede inhibir el crecimiento de *Legionella* spp. obteniendo resultados falsos negativos o con recuentos inferiores a los reales. La UNE-EN ISO 11731 describe un método para identificar *Legionella* spp. basado exclusivamente en la confirmación de presuntas colonias mediante subcultivo en agar BCYE y Wcys. Sin embargo, existen diferentes métodos para la identificación de colonias siendo el más usado la aglutinación con partículas de látex. En los últimos años la espectrometría de masas por MALDI-TOF se ha generalizado en los laboratorios de diagnóstico microbiológico y estudios recientes utilizan la PCR y la secuenciación por SBT para el control de instalaciones hospitalarias(23,209).

Para asegurar un buen control de la legionelosis hospitalaria nos propusimos:

1) Definir un sistema de muestreo optimizado basado en la identificación y monitorización de puntos críticos (PC), identificados en función del número y distribución de los PT de la red y definidos como el inicio y el final de cada tramo de la instalación, un punto intermedio de la misma y áreas de pacientes de alto riesgo, con el objetivo de realizar un seguimiento periódico que nos permita tener un control de la instalación.

2) Evaluar los métodos de cultivo para detección y recuento de *Legionella* spp. en muestras de agua sanitaria comparando la recuperación de *Legionella* spp. viable por cultivo en medio BCYE y GVPC basado en una modificación de la UNE-EN ISO 11731 al que incorporamos un medio enriquecido (BCYE) para el cultivo de las muestras de agua sanitaria, y comparamos los resultados expresados como el log del nº de UFC/L obtenidos, para valorar la mejora en términos de sensibilidad en cuanto al nº de colonias informadas según el medio utilizado y el medio que utilizamos con más frecuencia para informar los recuentos máximos de colonias.

Además, como objetivos secundarios:

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

- 1) analizamos el uso de la aglutinación con partículas de látex
- 2) analizamos el uso de MALDI-TOF-MS para la identificación de las colonias compatibles con *Legionella* spp. obtenidas del cultivo de las muestras de agua sanitaria
- 3) realizamos el genotipado por SBT en un grupo de cepas para conocer la diversidad genética de *Legionella* spp. en el hospital y analizar los cambios observados tras los distintos protocolos de desinfección aplicados en la instalación.

METODOLOGÍA

1. DESCRIPCIÓN DE LA INSTALACIÓN

La instalación a estudio es un hospital de diseño horizontal y consta de cuatro edificios: pabellón A, pabellón B, pabellón C y pabellón quirúrgico (QX). Se trata de una instalación antigua, excepto el pabellón QX, donde el agua de aporte proviene de la red de consumo (agua potable).

Dentro de cada pabellón hay diferentes sectores:

- Pabellón A: Sectores 1, 2, 3 y 4.
- Pabellón B: Sectores 1, 2 y 3.
- Pabellón C: Sectores 1 y 2.
- Pabellón QX: solo 1 sector.

Además del pabellón QX los sótanos de los pabellones A, B y C tampoco están divididos en sectores.

A su vez, cada sector tiene diferentes alturas, que están representadas de abajo a arriba empezando por el sótano, planta baja, planta 1, planta 2, planta 3 y planta 4. La Unidad es el conjunto del pabellón + planta + sector. Ejemplo: A11= pabellón A, planta 1, sector 1. En la figura 14 se muestra el esquema de la distribución espacial de la instalación de los pabellones A, B y C. En rojo se indica la localización de los PC.

2. MUESTRAS ANALIZADAS

Para el estudio hemos utilizado una base de datos de 2.137 muestras de agua sanitaria analizadas para cultivo de *Legionella* spp. durante el período 2006-2018 mediante un procedimiento de ensayo según la norma UNE-EN ISO 11731 (procedimiento acreditado por la entidad nacional de acreditación ENAC conforme a los criterios recogidos en la norma UNE-EN-ISO/IEC 17025 (CGA-ENAC-LEC). Además, analizamos parámetros físico-químicos (temperatura, cloro y pH) y microbiológicos (aerobios totales).

Para el análisis de los puntos críticos utilizamos los resultados de las UFC/L de *Legionella* spp. detectadas en los cultivos del total de las muestras analizadas; de estas, 1.304 se utilizaron para valorar el rendimiento de los medios de cultivo.

La identificación de serogrupos de *Legionella* spp. por aglutinación en látex se realizó a partir de las cepas aisladas de los cultivos de todas las muestras de agua.

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

Seleccionamos para análisis por SBT 65 cepas congeladas de *L. pneumophila* representativas de los puntos terminales de la red de agua sanitaria del hospital, aisladas durante el período 2011-2015. Las cepas fueron remitidas para su análisis a la Unidad Mixta de Investigación en Infección y Salud Pública de la Universitat de València, la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana y el Consejo superior de Investigaciones Científicas (FISABIO/CSISP/Universitat de València).

Identificamos mediante MALDI-TOF-MS 60 colonias que no aglutinaron o las que aglutinaron como *Legionella* spp.

.

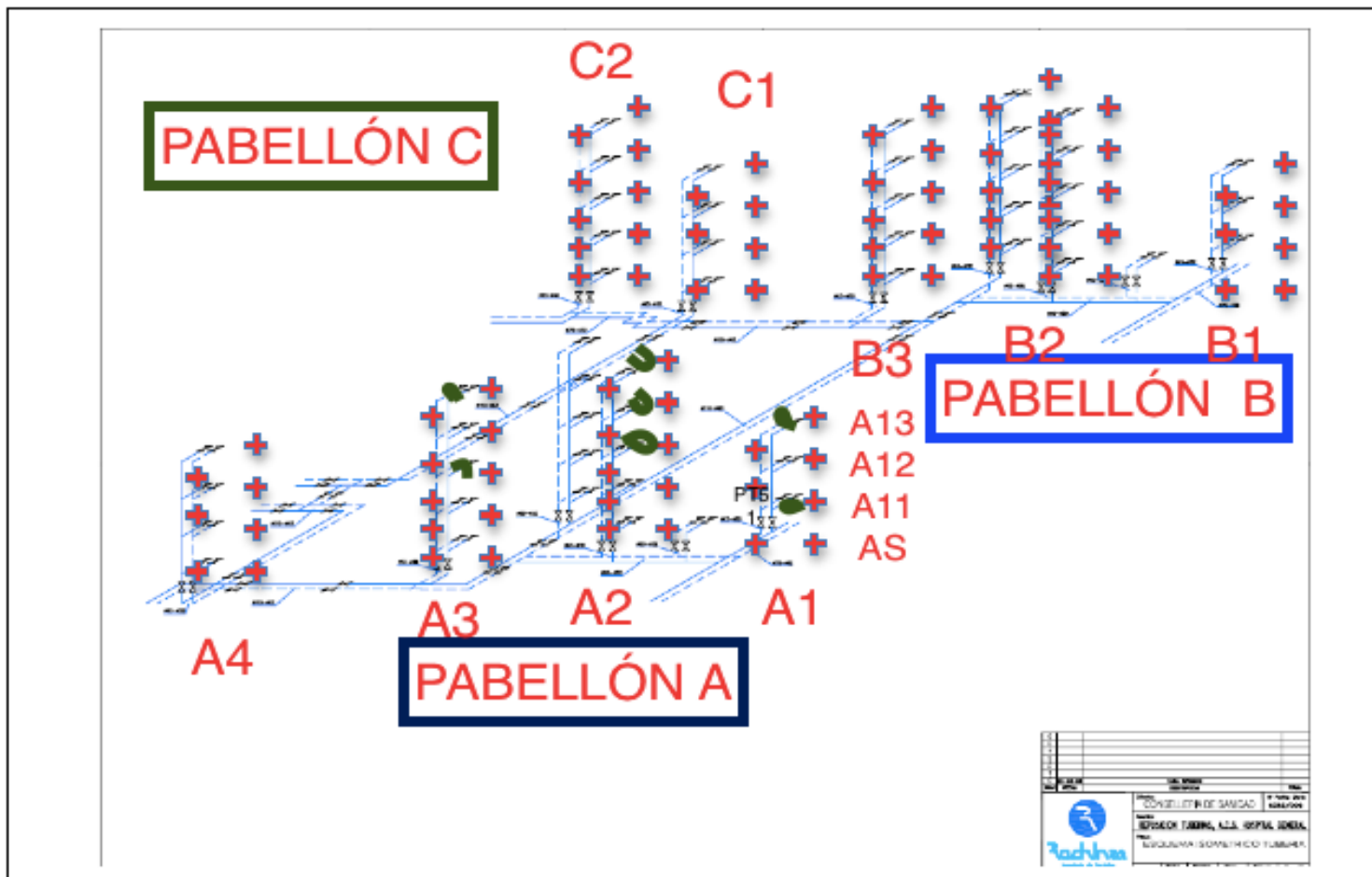


FIGURA 14. Representación de la distribución espacial de la instalación y la localización de los PC de los pabellones A, B y C.

3. IDENTIFICACIÓN Y MONITORIZACIÓN DE LOS PUNTOS CRÍTICOS

Definimos los PC como los puntos de muestreo donde había mayor probabilidad de encontrar altas concentraciones de *Legionella* spp. como son el inicio y el fin de cada tramo de tubería. También incluimos puntos intermedios en cada tramo y puntos donde se encontraban pacientes vulnerables o la concentración de *Legionella* spp. detectada en análisis anteriores era alta como metodología de control alternativo al muestreo anual rotatorio de todos los puntos terminales de la instalación de acuerdo al RD 865/2003 y a la UNE 100030:2005 IN(22,215).

Debido a la magnitud de la instalación a estudio, y los múltiples puntos con cultivo positivo para *Legionella* spp., seleccionamos los PC para que fueran representativos de todos los PT.

Para llevar a cabo esta selección se revisaron los planos de la red interna y se determinaron los puntos más representativos y accesibles tanto de la red de agua fría, como de la caliente. En caso de que haya ramificaciones de la red que suministren a diversos bloques se aumentó los puntos de muestreo (uno para cada bloque).

La instalación completa consta de 869 puntos terminales de red (PT) distribuidos de la siguiente forma: el pabellón A cuenta con 327 PT, el pabellón B con 294 PT, el pabellón C con 140 PT y el pabellón quirúrgico con 108 PT.

Del total de PT se seleccionaron 99 PC en los cuatro pabellones, que suponen el 11,4% (0-100%) del total de puntos terminales de la instalación. En la figura 15 se muestra el número de PC y PT analizados.

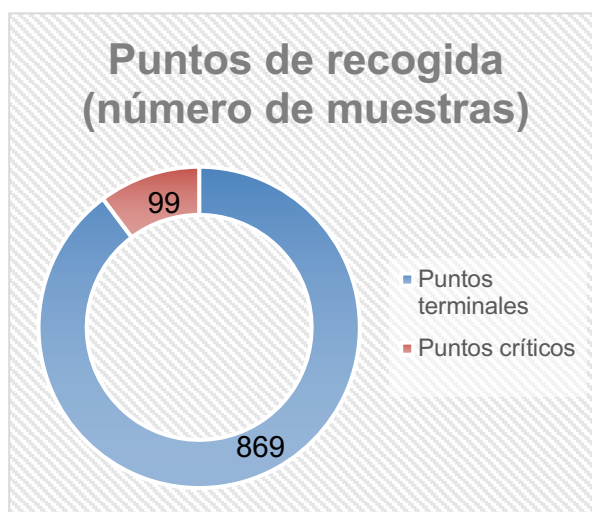


FIGURA 15. Número de puntos terminales de la instalación y número de puntos críticos analizados.

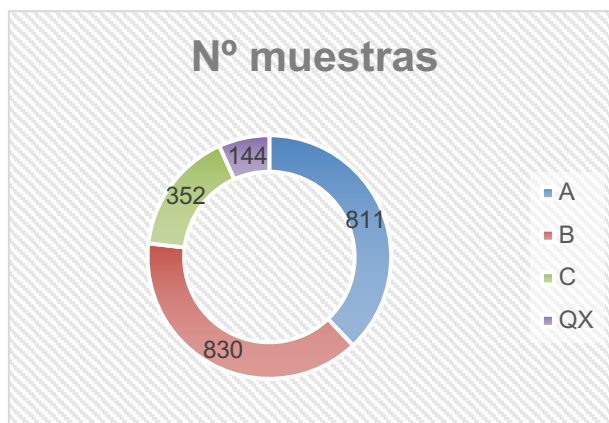


FIGURA 16. Número de muestras analizadas por pabellón.

(QX= Pabellón Quirúrgico).

Para monitorizar los PC, analizamos los datos del nº UFC/L de *Legionella* spp. recuperados de las muestras de agua sanitaria de todos los PT de la red, recogidas en distintos períodos de tiempo entre los años 2006-2018. Se dispone de una base de datos de 2.137 muestras de agua, de los cuales 1.067 corresponden a determinaciones de los PC. La distribución de las muestras analizadas por pabellones se describe en la figura 16, siendo de 811 muestras en el pabellón A, 830 muestras en el pabellón B, 352 muestras en el pabellón C y 144 muestras en el pabellón quirúrgico.

En la tabla 6, se muestra la distribución de PT y PC de los 4 pabellones por sectores, plantas y unidades. Se señala en color azul las zonas destinadas a hospitalización de pacientes, en esta zona la media del porcentaje de PC analizados es del 27% (3-100%).

Los PC han sufrido modificaciones durante el período de análisis de la instalación, debido a reformas estructurales de los edificios que han obligado a modificar o anular el punto de toma de muestra. En función de los resultados obtenidos (nº UFC/L) y del uso que se le daba a la instalación (presencia/ausencia de pacientes, realización de obra o reforma, puntos positivos para *Legionella* sp...) algunos PC se han monitorizado de forma más constante. Es por estas razones que los PC han ido variando y encontramos la distribución de datos acumulados en las ilustraciones 16, 17 y 18. En el año 2018 quedaron establecidos 88 PC en los 4 pabellones que se muestran en el anexo 1.

En algunos sectores no se han definido PC ya que no se destinan a uso hospitalario y no se analizan en la serie de datos, como son la unidad 1 de la planta baja del pabellón A (AB1), la unidad 1 de la segunda planta baja del pabellón B (B21), el sótano del pabellón B (BS) y la planta

3 del pabellón quirúrgico (QX3). Hemos excluido del análisis por sectores 6 puntos terminales en cuya definición no constaba el sector al que pertenecen.

No analizamos de forma periódica el depósito, el acumulador ni el circuito de retorno al no estar contemplado en la normativa vigente durante el período de estudio, por lo que no se incluyeron como PC. No obstante, si se realizó el análisis de estos puntos tras la puesta en marcha de los fotocatalizadores durante los años 2011 y 2012. En el apartado de resultados se muestra un resumen de estos datos.

TABLA 6. Descripción de la instalación a estudio. Distribución de puntos terminales y puntos críticos. Porcentaje de puntos analizados del total de la instalación.

PABELLÓN	SECTOR	PLANTA	UNIDAD	Nº PT	RANGO PT	Nº PC	RANGO PC	% PC/PT
A	S	S	AS	7	1-7	1	1	14,28
A	B	B	AB	41	8-48	5	2-6	12,19
A	1	1	A11	4	49-51, 868	2	7, 8	50
A	1	2	A12	2	52, 869	1	9	50
A	1	3	A13	42	53-94	3	11-13	7,14
A	1	4	A14	1	95	1	10	100
A	2	1	A21	11	96-106	1	14	9,09
A	2	2	A22	139	107-245	4	15-18	2,87
A	2	3	A23	9	246-254	2	19, 20	22,22
A	2	4	A24	18	255-272	1	21	5,55
A	3	1	A31	4	273-276	1	22	25
A	3	2	A32	31	277-307	3	23-25	9,67
A	3	3	A33	14	308-321	4	26-29	28,57
A	3	4	A34	4	322-325	4	30-33	100
B	S	S	BS	6	326-329	0		0
B	B	B	BB	9	330-338	5	34-38	55,55
B	1	1	B11	4	339-342	2	39-40	50
B	1	2	B12	50	343-392	3	41-43	6
B	1	3	B13	47	393-439	3	44-46	6,38
B	1	4	B14	22	440-461	1	47	4,54
B	2	1	B21	1	463	0		0
B	2	2	B22	7	462, 464-468, 523	3	48-50	42,85
B	2	3	B23	51	469-519	3	51-53	5,88
B	2	4	B24	3	520-522	1	54	33,33
B	3	1	B31	71	524-594	3	55-57	4,22
B	3	2	B32	14	595-608	5	58-62	35,71
B	3	3	B33	4	609-612	3	63-65	75
B	3	4	B34	5	613-617	3	66-68	60
C	S	S	CS	1	618	1	69	100
C	B	B	CB	2	619, 620	2	70, 71	100
C	1	1	C11	19	621-637, 639-640	1	72	5,26
C	1	2	C12	1	638	1	73	100
C	2	1	C21	34	641-674	3	74-76	8,82
C	2	2	C22	22	675-696	3	77-79	13,63
C	3	1	C31	34	697-730	2	80, 81	5,88
C	3	2	C32	23	731-753	1	82	4,34
C	4		C4	4	754-757	1	83	25
QX	S	S	QXS	49	758-806	4	84-87	8,16
QX	B	B	QXB	19	807-825	4	88-91	21,05
QX		1	QX1	12	826-837	2	92, 93	16,66
QX		2	QX2	25	838-862	3	94-96	12
QX		4	QX4	3	863-865	3	97-99	100
TOTAL				869		99		11,39

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

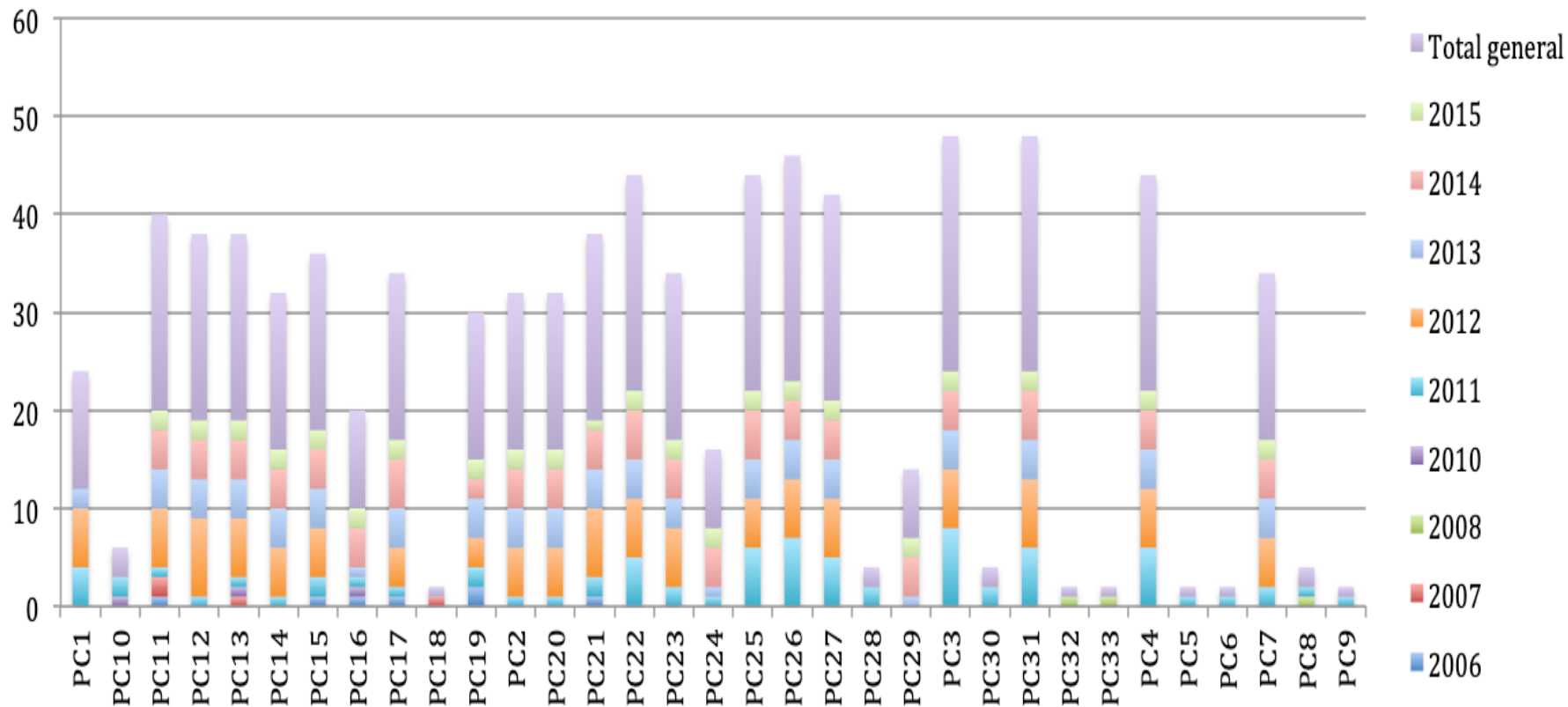


FIGURA 17. Datos acumulados de las mediciones de los puntos críticos del pabellón A.

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

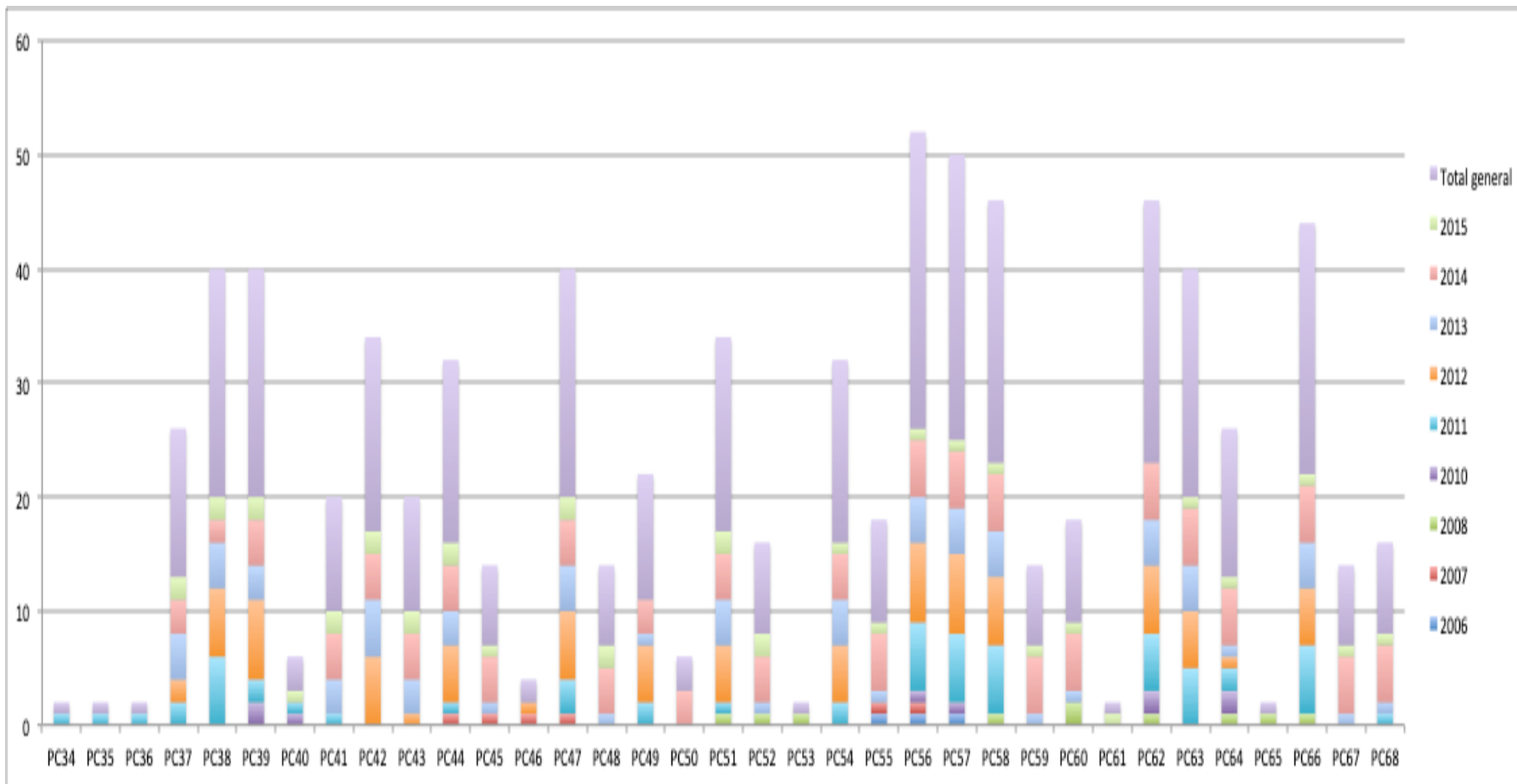


FIGURA 18. Datos acumulados de las mediciones de los puntos críticos del pabellón B.

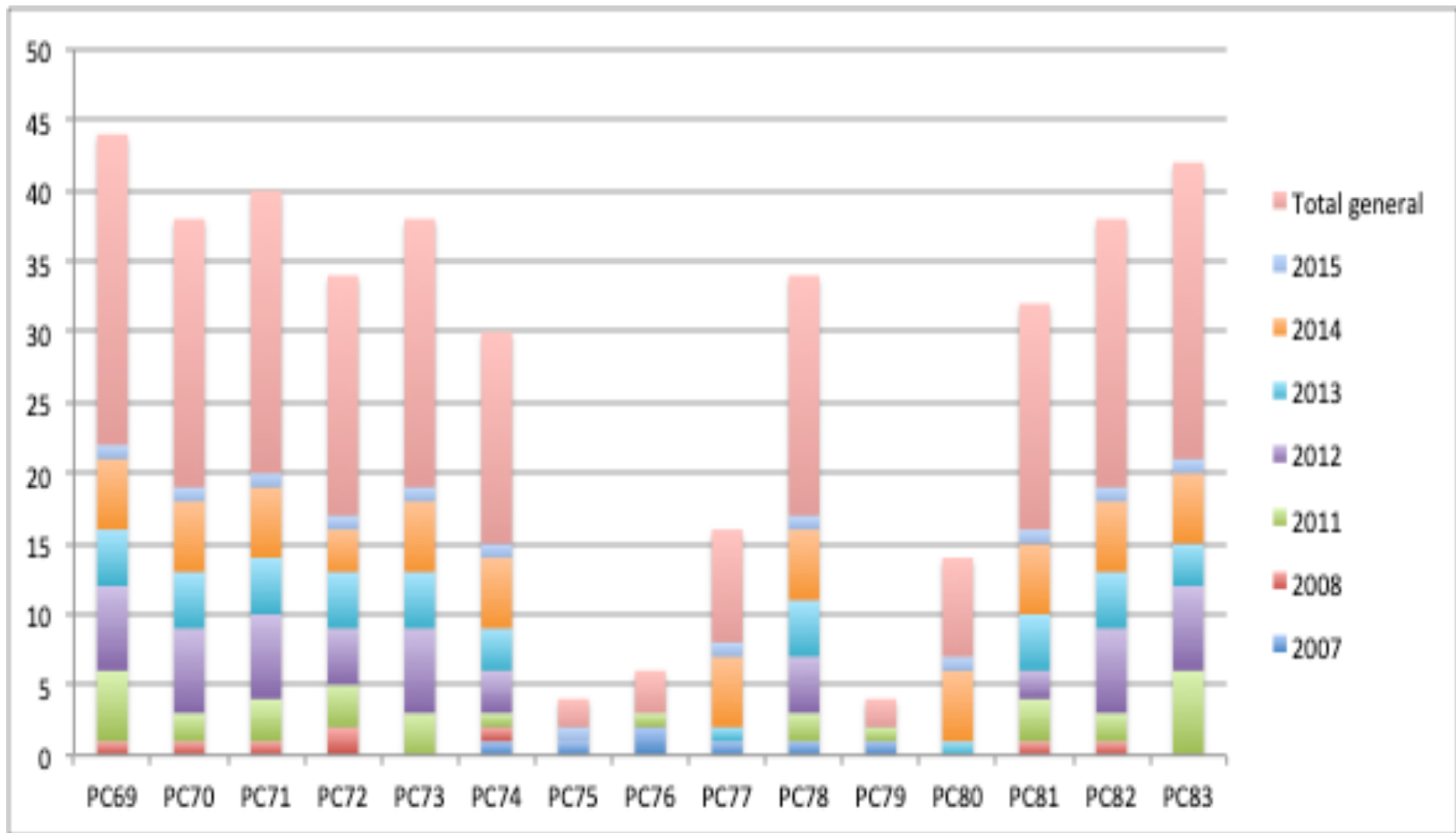


FIGURA 19. Datos acumulados de las mediciones de los puntos críticos del pabellón C.

4. MUESTRAS

4.1 TOMA DE LAS MUESTRAS

Las muestras analizadas fueron muestras de aguas destinadas al consumo humano. Comenzamos el análisis microbiológico lo antes posible tras la recepción de la muestra en el laboratorio.

Para tomar muestras de los puntos terminales, como duchas y grifos, se eligieron servicios o habitaciones no utilizados en los días previos a la toma, y la toma se realizó en 3 pasos, según el método recomendado en anexo 6 del RD 865/2003:

- 1) Abrir la ducha o grifo suavemente y recoger los primeros 100 ml aproximadamente.
- 2) Rascar con una torunda de algodón, o espátula en el caso de haber incrustaciones duras, e incluir en el agua.
- 3) Dejar correr otra pequeña cantidad de agua (hasta completar 1 L) para que arrastre los restos del rascado.

Tomamos un litro de agua, recogiendo primero una pequeña cantidad (unos 100 ml) para después rascar el grifo o ducha con una torunda que se incorporará en el mismo envase y recoger el resto de agua arrastrando los restos del rascado.

Las muestras de agua se recogieron en recipientes estériles de polietileno y se mantuvieron en oscuridad entre 6-8°C hasta su procesado. Se recogieron los detalles sobre el origen (punto concreto de la toma, instalación/edificio, dirección de la instalación) y volumen de la muestra así como la posible presencia de algún biocida, la temperatura del agua y cantidad de cloro libre.

Establecimos como tiempo máximo entre la toma de la muestra y su procesamiento en 5 días, aunque siempre que fue posible las muestras se procesarán dentro de las 48 horas tras su recogida. Las muestras que a la recepción en el laboratorio presentaron derrames o carecían de información sobre sus características se registraron en el registro de incidencias y en caso necesario se desecharon.

La periodicidad del muestreo fue trimestral.

4.2 TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO

El transporte de muestras de agua al laboratorio se realizó a temperatura ambiente (evitando temperaturas altas en verano) y protegidas de la luz solar, en el menor tiempo posible (24-48 h) en embalajes adecuados para evitar su rotura o vertido. Las muestras de agua se almacenaron en nevera entre 2-8°C hasta su procesamiento un máximo de 5 días.

5. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

5.1 REACTIVOS

5.1.1 TAMPÓN ÁCIDO

Preparamos la solución ácida de KCl/HCl 0,2N (pH 2,2±0.2) para usar en el tratamiento de descontaminación de las muestras contaminadas siguiendo los siguientes pasos:

1. Solución A (Solución de HCl de 0,2 mol/L)

HCl concentrado (1,16 g/ml, contenido mínimo 35,4%)..... 17,4 ml

Agua destilada..... 1000 ml

2. Solución B: Cloruro potásico (KCl) 0,2 mol/L.

KCl..... 14,9 g

Agua destilada.....1000 ml

3. KOH 1 mol/L, disolviendo 5,6 g de KOH en 100 ml de agua destilada

La caducidad de cada una de esas soluciones será de 1 año a partir de su fecha de preparación.

Preparamos el tampón ácido mezclando:

- 3,9 ml de solución A y
- 25 ml de solución B.
- Ajustar el pH a 2,2 por adición de KOH 1 mol/L.

Almacenamos en frascos de vidrio con tapón de rosca a temperatura ambiente protegidos de la luz un máximo de un mes. Evitamos la excesiva manipulación para evitar posibles contaminaciones.

5.1.2 MEDIO DE CONGELACIÓN

Para la conservación de los aislados de *Legionella* spp. se utilizó un sistema estéril de conservación de cepas microbiológicas, consistente en un criovial de 2 ml que contiene crioperlas de vidrio tratadas con crioprotectores que actúan como conservante (CRYOINSTANT®, Deltalab). Los aislados se conservaron a -20°C.

4.2 MEDIOS DE CULTIVO

Para el cultivo de las muestras analizadas empleamos medios adquiridos comercialmente:

- **ENR=BCYE:** Agar BCYE α (Bufferd charcoal yeast extract suplementado con α -cetoglutarato), *LEGIONELLA* AGAR ENRICHED.
- **BCYEcys=WCys:** Agar BCYE α sin Cisterna, *LEGIONELLA* WO/CYSTEINE (UNE-EN ISO 11731).
- **GVPC:** Medio Selectivo Agar GVPC (BCYE α suplementado con glicina, vancomicina, polimixina B y cicloheximida), *LEGIONELLA* GVPC (UNE-EN ISO 11731).

Los medios se conservaron entre 4–12°C hasta la fecha de caducidad indicada por el fabricante, y se sometieron a controles de calidad antes de su uso para confirmar las condiciones de esterilidad, viabilidad y recuperación según el protocolo descrito a continuación.

La composición de los medios según la UNE-EN ISO 11731 se muestra en el anexo 2.

5.1.3 CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Para evaluar la capacidad del medio para soportar el crecimiento bacteriano usamos cepas de referencia de la colección española de cultivos tipo (CECT) y seguimos los criterios de la UNE-EN ISO 11133 “*Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua. Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo*”.

A. DEFINICIONES

Nº ID o Nº lote del medio de cultivo: Corresponde a un número que identifica un lote de medio de cultivo provisto por el fabricante en el caso de medios ya listos para el uso.

Productividad: Rendimiento, recuperación, crecimiento de un microorganismo que se espera que se desarrolle en el medio de cultivo.

Selectividad: La supresión del crecimiento de un microorganismo que se espera sea inhibido en el medio de cultivo.

Cepas de Referencia: Microorganismos obtenidos de una colección nacional o internacional reconocida.

Cepas de Reserva: Cepas obtenidas a partir del cultivo de una cepa de referencia preparada y conservada por un laboratorio.

Cepas de Trabajo: Cultivos de microorganismos obtenidos a partir de las cepas de reserva para su utilización en los ensayos que lo precisen.

Esterilización: Tratamiento mediante el cual se elimina todo tipo de microorganismos vivos.

Nivel de Recuperación: Es el porcentaje de microorganismos obtenidos en un medio de cultivo donde se ha inoculado un número conocido y pequeño de microorganismos.

Medios de Cultivo: Preparación nutritiva líquida o sólida utilizada para inducir el crecimiento de microorganismos.

Medios Selectivos: Medios de cultivo que seleccionan el desarrollo de ciertas cepas de microorganismos.

Medios no Selectivos: Medios de cultivo que dejan desarrollarse casi cualquier tipo de microorganismo. No hay selección.

MICROORGANISMOS CONTROL

- *Legionella pneumophila* CECT 7109
- *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212
- *Escherichia coli* ATCC® 25922
- *Legionella anisa* CECT 8177T

Para cada lote de medio de cultivo comercial, confirmamos que cumplían los mismos requisitos antes de su uso, comprobando su esterilidad y su capacidad para recuperar *Legionella* spp. con el siguiente protocolo:

1. Comprobar su esterilidad. En cada lote de medio de cultivo preincubamos el 1% de placas a 35°C, para comprobar la ausencia de crecimiento bacteriano. Las placas se incubarán a la temperatura y el tiempo adecuado específico para cada medio de cultivo:

- a. GVPC: Incubamos a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5-10 días.
- b. BCYE: Incubamos a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5-10 días.
- c. BCYE-cys: Incubamos a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 2-5 días.

La temperatura y el tiempo de incubación utilizado en los ensayos cuantitativos de rendimiento (productividad) serán los utilizados en el ensayo para el que se utilice el medio.

2. Comprobar su capacidad para el crecimiento de *Legionella* spp: Para comprobar que el medio de cultivo preparado soporta el crecimiento de *Legionella* spp., y que las colonias que produce presentan el aspecto característico, realizamos controles de productividad y selectividad. Para los controles de **productividad** el nivel de inóculo ha de ser de 10^2 UFC por medio en placa (rango de 80-120).

- a. GVPC: Incubamos a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5-10 días.
- b. BCYE: Incubamos a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5-10 días.
- c. BCYE-cys: Incubamos a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 2-5 días

El volumen de inóculo es de 0,1 ml para todas las placas. La temperatura y el tiempo de incubación, así como el volumen de inóculo utilizado en los ensayos cuantitativos de rendimiento (productividad) serán los utilizados en el ensayo para el que se utilice el medio.

El control de medios y cepas a utilizar se realiza según ANEXO F de la UNE-EN ISO 11133 tal como se muestra en la tabla 7 para el cálculo de la productividad y en la tabla 8 para el cálculo de la selectividad.

TABLA 7. Control de medios y cepas a utilizar para comprobar la productividad de los medios de cultivo según el anexo F de la UNE-EN ISO 11133.

⁽⁴⁾ PRODUCTIVIDAD (P_R)							
Medio	Tipo	Norma	Incubación	Cepa control	Medio de referencia	Método de control	Criterio de aceptación
GVPC	Sólido	ISO 11731	$36^{\circ}\text{C} \pm 2$ 2-5 días	<i>Legionella pneumophila</i> CECT 7109	BCYE	Cuantitativo ⁽³⁾	$P_R \geq 0,5$
GVPC	Sólido	ISO 11731	$36^{\circ}\text{C} \pm 2$ 2-5 días	<i>Legionella pneumophila</i> CECT 7109 <i>Legionella anisa</i> CECT 8177	BCYE ya validado	Cuantitativo ⁽³⁾	$P_R \geq 0,7$
BCYE	Sólido	ISO 11731	$36^{\circ}\text{C} \pm 2$ 2-5 días	<i>Legionella pneumophila</i> CECT 7109	BCYE ya validado	Cuantitativo ⁽³⁾	$P_R \geq 0,7$

⁽³⁾Reacciones características: colonias de color blanco-gris-azul-púrpura con el borde completo y apariencia característica de vidrio esmerilado

⁽⁴⁾Cálculo de la razón de Productividad (P_R)

$$(P_R) = N_s/N_0$$

N_s = nº (número) de colonias obtenidas en el medio de cultivo estudiado, rango de recuento de 10^2 ufc/placa

N_0 = nº de colonias obtenidas en el medio de referencia

3. Comprobar que el medio selectivo es capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos no diana: Para los controles de **selectividad** la suspensión del microorganismo no diana ha de ser de $10^4 - 10^6$ UFC/ ml. Las placas se incubarán a la temperatura especificada. El volumen de inóculo es de 0,1 ml.

- a. GVPC: Incubamos a $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5-10 días.

TABLA 8. Control de medios y cepas a utilizar para comprobar la selectividad de los medios de cultivo según el anexo F de la UNE-EN ISO 11133.

SELECTIVIDAD						
Medio	Tipo	Norma	Incubación	Cepa control	Método de control	Criterio de aceptación
GVPC	Sólido	ISO 11731	36 °C ± 2 3 días	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Cualitativo	Inhibición parcial (0-1 ufc/placa)
				<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	Cualitativo	Inhibición total
				<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	Cualitativo (Ns)	Inhibición total

N_s = nº (número) de colonias obtenidas en el medio de cultivo estudiado, rango de recuento entre de 10^3 y 10^4 UFC/placa.

MÉTODO DE CONTROL DE LA RECUPERACIÓN MEDIANTE EL USO COMO MICROORGANISMO CONTROL CEPAS DE REFERENCIA (*LEGIONELLA PNEUMOPHILA* CECT 7109)

A.1. Inocular 0,1 mL *suspensión bacteriana (Lpn CECT 10⁻⁴* realizada a partir de un Mac Farland de 0,5) e **incubar** 48±4 h a 36±2 °C. en una placa de medio de *Legionella* ENR y en una placa

del nuevo lote del medio de GVPC. El inóculo se distribuye por toda la placa con ayuda de un asa bacteriológica estéril y se deja que el medio inoculado permanezca en reposo hasta que se haya absorbido.

A.3. Realizar el **recuento de colonias** en ambos medios y registrar los resultados (Registro controles internos).

A.4. Valorar los resultados y aceptar del lote de medio de cultivo según lo establecido en las tablas 7 y 8.

El protocolo para la preparación de la suspensión bacteriana (Lpn CECT 10⁻⁴) se muestra en el anexo 3.

6. EQUIPOS Y MATERIAL

A continuación, mostramos el listado de los equipos y el material utilizado para el análisis de las muestras:

- Estufa de 36±2 °C
- Agitador vortex
- Baño Termostático de agua a 50±1 °C
- Medidor de pH
- Balanza de precisión
- Lupa binocular
- Nevera 4-8 °C
- Congelador de -20°C
- Centrifuga
- Micropipetas automáticas de 10-100 µL y 100-1000 µL
- Medidor de McFarland
- Sistema de filtración: Combi Microfil® (SM262, SM264) y EZ-Pack® (Millipore) (SM261) con Filtros de nylon o policarbonato de 47 mm de diámetro y con tamaño de poro de 0,45 µm. y Matraz de vidrio de 3 litros, con salida lateral para vacío, con tapón adaptador para conectar la goma de vacío.
- Tubos de centrifuga: Tubos Falcon de 15 ml con tapón de rosca (Greiner®)
- Material plástico estéril: puntas con filtro para micropipetas automáticas de 10-100 µL y 100-1000 µL
- Asas de cultivo desechables

- Cabina Bioseguridad tipo II-A de bioseguridad (ThermoFisher SCIENTIFIC MSC Advantage 12)

7. PROCEDIMIENTO

7.1 SEGURIDAD Y CONDICIONES AMBIENTALES

El procesamiento de las muestras recibidas en el Laboratorio, así como los cultivos se realizó en el área de aislamiento en la campana de bioseguridad (Tipo II-A). (CBS *Legionella*). Conectamos cabina 15 minutos antes de su utilización y tras las centrifugaciones y agitaciones vigorosas dejar reposar durante 5 a 10 min antes de abrir los contenedores para evitar el riesgo por la producción de aerosoles.

7.2 CONCENTRACIÓN DE LAS MUESTRAS

7.2.1. CONCENTRACIÓN MEDIANTE FILTRACIÓN

Todo el volumen de muestra recibida (1L) se filtró siguiendo las instrucciones de uso del Sistema Combi Microfil y EzPack® Millipore (Merck, Darmstadt, Alemania), usando membranas de nylon o policarbonato de un tamaño de poro de 0,45 µm y 47 mm de diámetro.

Una vez terminada la filtración se retiró cuidadosamente el filtro del soporte con pinzas estériles y se insertó en un tubo Falcon estéril (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) conteniendo 10 ml de agua destilada estéril. La bomba de vacío no se desconectó hasta que se hubo retirado la membrana para evitar una posible contaminación por reflujo.

Se agitó vigorosamente el tubo Falcon conteniendo la membrana durante al menos 2 min, mediante vórtex.

Tras la agitación el tubo Falcon se centrifugó a 3500 rpm durante 25 minutos, para favorecer la liberación de las bacterias del filtro. El sedimento se resuspendió mediante agitación vigorosa, durante al menos 2 minutos en vórtex.

Antes de iniciar la filtración de otra muestra de agua, limpiamos el soporte con alcohol de 96 °C, y se flameamos con llama. Esterilizamos los cabezales de filtración en autoclave después de cada lote de muestras.

7.3 DESCONTAMINACIÓN E INOCULACIÓN EN LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los concentrados de las muestras se procesaron inmediatamente. Si no se pudieron procesar inmediatamente, las muestras concentradas se conservaron a 6 ± 2 °C en oscuridad durante no más de 10 días.

Dividimos tres fracciones de las muestras concentradas en tubos *ependorf* estériles (esterilizados mediante autoclave a 120°C):

1. **Muestra concentrada Sin tratamiento de descontaminación (FST)**

- Inoculamos:
 - dos placas de GVPC, una con 0,1 ml (FST GVPC) y la otra con 0,5 ml de la muestra concentrada (FST 500). Anotamos el volumen de muestra inoculada en las placas.
 - una placa de BCYE con 0,1 ml de la muestra concentrada (FST BCYE).

2. **Muestra concentrada Tratamiento con calor (FC):**

- Transferimos $1\pm 0,5$ ml de muestra a un epperdorf estéril.
- Incubamos en un baño a 50 ± 1 °C / 30 ± 2 min.
- Inoculamos:
 - una placa de GVPC con 0,1 ml de la muestra concentrada sometida a tratamiento con calor (FC GVPC).
 - una placa de BCYE con 0,1 ml de la muestra concentrada sometida a tratamiento con calor (FC BCYE).
- Inoculamos los medios de cultivo, tan pronto como fue posible después de su retirada del baño de calor.

3. **Muestra concentrada Tratamiento ácido (FA):**

- Transferimos 1 ml de muestra a un eppendorf estéril
- Centrifugamos 1 ml de muestra a 6000 g durante 10 ± 1 min.
- Eliminamos la mitad del sobrenadante (0,5 ml) con una pipeta estéril y agitamos el sedimento vigorosamente.
- Añadimos un volumen de tampón ácido igual al retirado (0.5 ml) hasta el volumen original mezclando suavemente.
- Dejamos en reposo a temperatura ambiente: 5 ± 0.5 min.
- Inoculamos:
 - una placa de GVPC con 0,1 ml de la muestra concentrada sometida a tratamiento con ácido (FA GVPC).
 - una placa de BCYE con 0,1 ml de la muestra concentrada sometida a tratamiento con ácido (FA BCYE).

4. Muestra filtrada diluida 1/10 sin pretratamiento:

En muestras con concentraciones elevadas de *Legionella* spp. ($>10^5$) se realizó la siembra de la muestra filtrada diluida 1:10.

- Preparamos una dilución 1/10 de la muestra filtrada e inoculamos:
 - una placa de GVPC con 0,1 ml de la muestra diluida 1/10 (DIL 1/10 GVPC).
 - una placa de BCYE con 0,1 ml de la muestra diluida 1/10 (DIL 1/10 BCYE).

7.4 CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Los inóculos se distribuyeron por toda la placa con ayuda de un asa bacteriológica estéril. Se dejó que el medio inoculado permaneciera en reposo hasta que se hubiera absorbido todo el inóculo y las placas de GVPC y BCYE inoculadas se incubaron invertidas a $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en aerobiosis y condiciones de humedad durante un mínimo de 10 días.

CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS CONCENTRADAS

El resto del concentrado de la muestra que no se utilizó para el cultivo se conservó a 6 ± 2 °C, durante un tiempo máximo de 3 meses.

7.5 EXAMEN DE LAS PLACAS

Las placas se examinaron periódicamente cada 2-4 días buscando colonias compatibles morfológicamente con *Legionella* spp. Al menos se revisaron tres veces durante el periodo de incubación.

Las colonias de *Legionella* spp. crecidas directamente sobre el medio de cultivo son lisas con un borde entero, tienen un aspecto granular, como “polvo de vidrio” y a veces presentan un brillo azul-verdoso o rosa-púrpura, con un aspecto cristalino característico.

7.6 IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS DE *LEGIONELLA*

Para la identificación bacteriana se seleccionaron para subcultivo hasta tres colonias con morfología característica de *Legionella* spp., provenientes de cada una de las placas con el medio GVPC y BCYE. De las muestra FST, solo se seleccionaran para subcultivo colonias de la placa GVPC inoculada con 0,5 mL, cuando en la placa inoculada con 0,1 mL no se obtenía crecimiento. Si hay crecimiento en las dos placas (la inoculada con 0,5mL y la inoculada con 0,1 mL), sólo se seleccionan colonias de la placa inoculada con 0,1mL.

Si en la muestra procesada, existían distintos tipos de colonias características de *Legionella* spp., se hicieron subcultivos de dos o tres colonias de cada tipo para realizar la identificación de serogrupos individuales de *Legionella* spp.:

- Cada colonia morfológicamente compatible con *Legionella* spp. seleccionada para subcultivar, se inoculó en BCYE y medio de BCYE sin cisteína (WCys).
- Incubamos los subcultivos de colonias como mínimo 2 días a 36 ± 2 ° C y humedad hasta que se produjo crecimiento confluyente o como pequeñas colonias aisladas.
- Se consideraron como *Legionella* spp. las colonias que crecieron en agar enriquecido (BCYE) y presentaron crecimiento nulo en agar BCYE sin cisteína (WCys).

8. CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Tras confirmación de las colonias como genero *Legionella* spp., contamos el nº de colonias características en cada una de las placas de GVPC y BCYE para estimar el recuento de colonias por placa.

Para la estimación del nº de UFC de *Legionella* spp. en muestra original seleccionamos la placa inoculada que contenga mayor número de colonias y calculamos aplicando siguiente fórmula:

$$C = \frac{N \times V}{J} \times \frac{I}{S}$$

Donde:

- C es el nº de ufc por litro de la muestra original
- N es el número de colonias en la placa con mayor número de colonias
- V es el volumen (mL) del concentrado utilizado
- J el volumen (mL) inoculado en la placa
- S el volumen (litros) que se ha usado de la muestra original.

El límite de detección se estableció en 100 UFC/L tras la validación del método según la UNE-EN ISO 17025.

La presencia de colonias se informó como el número de colonias de *Legionella* spp. estimado expresado en UFC/L, y la ausencia de colonias como *Legionella* spp. por debajo del límite de detección (100 UFC/L).

9. CONTROL DEL PROCEDIMIENTO

Un día cada semana, junto con la serie de muestras analizadas, se incluyó la realización de controles de proceso positivo y negativo que se trataran de igual modo que las muestras.

El laboratorio cuenta con un Programa de Aseguramiento de la Calidad de los Resultados de Ensayos que se aplica a los ensayos realizados para el cultivo de *Legionella* spp. en muestras de agua.

El programa de aseguramiento de la calidad de los resultados comprende:

1. El uso periódico rutinario durante la realización del ensayo de un control de calidad interno preparado con muestras naturales estériles con/sin inoculación de cepa/ material de referencia.
2. Análisis de Control externo: Participación en Intercomparaciones

DEFINICIONES

Repetibilidad (r): Grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones del mismo mesurando realizadas en las mismas condiciones de medición. Las mismas condiciones significa resultados obtenidos con el mismo método de ensayo, sobre el mismo material de ensayo, bajo las mismas condiciones (mismo operador, mismos equipos, mismo laboratorio y un corto intervalo de tiempo).

Reproducibilidad (R): Grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones del mismo mesurando realizadas en diferentes condiciones de medición. El ensayo se realiza sobre el mismo material de ensayo pero en diferentes condiciones. Esto es: resultados obtenidos con diferentes métodos de ensayo o equipos (reproducibilidad entre métodos), diferentes operadores o analistas (reproducibilidad entre analistas), diferentes laboratorios (reproducibilidad entre laboratorios) o diferente tiempo.

Valor verdadero convencional (de una magnitud): Valor atribuido a una magnitud particular, y aceptado a veces por convención, porque la representa, con una incertidumbre apropiada, para un fin dado.

Mensurando: Magnitud particular sometida a medición.

Incertidumbre de medida: Parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando.

Exactitud de una medición: Proximidad entre el resultado de una medición y el valor verdadero del mensurando.

9.1 CONTROL DE CALIDAD INTERNO DE LOS ENSAYOS

Como control interno negativo utilizamos un litro de agua procedente de la red de agua sanitaria fría esterilizada en autoclave. Como control interno positivo utilizamos un litro de agua

procedente de la red de agua sanitaria fría, esterilizada en autoclave para el control de exactitud y sin esterilizar para control de precisión, inoculada con 10 ml de una suspensión bacteriana preparada con una cepa de trabajo de *Legionella pneumophila* o *Legionella* spp. procedente de cepas de referencia de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

ESTIMACIÓN DEL VALOR TEÓRICO

Llevamos a cabo los ensayos de exactitud y precisión calculando el valor teórico del nº de UFC de *Legionella* spp. presentes en la muestra con el control interno positivo. El valor teórico es la estimación del nº de células de *Legionella* spp. viables en el material de control, es decir, el nº de UFC inoculadas en la muestra control positivo:

- Para el CI Positivo es el nº de UFC/100µl, obtenido de la inoculación de 100 µl de la suspensión bacteriana en el medio de cultivo (BCYE) multiplicado por 10 = nº de UFC de *Legionella* spp. presentes en 10 ml.

Este valor será el utilizado para cálculo del % de Recuperación del ensayo

CÁLCULO DEL RESULTADO DEL CONTROL INTERNO

- Para calcular el porcentaje de recuperación del ensayo del Control interno positivo utilizamos la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación del ensayo } \mathbf{CI \text{ Positivo}} = \\ [N^\circ \text{ de UFC/L} \div N^\circ \text{ UFC/10 mL}] \times 100$$

- Control interno negativo = ausencia de crecimiento de *Legionella* spp.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Para el Control de exactitud y precisión en recuento alto los valores teóricos deben estar dentro del intervalo de confianza del 95%.

Llevamos a cabo los ensayos de exactitud y precisión calculando el valor teórico del nº de UFC de *Legionella* spp. presentes en la muestra con el control interno positivo, obteniendo el

porcentaje de recuperación del ensayo para muestras con alta y baja cantidad de *Legionella* spp. a partir del nº de UFC/100 µL de los controles de calidad internos del cultivo efectuados.

El criterio de aceptación de la suspensión bacteriana de la cepa de trabajo (nº de UFC/10 mL) supone que tiene que estar dentro del intervalo de confianza del 95% establecido para el material de control preparado con cepas de *Legionella pneumophila* de la CECT a partir de la cepa de trabajo diluida a 10^{-4} y 10^{-5} (Leg CECT 10^{-4} y 10^{-5}).

El Intervalo de confianza del 95% del Nº de UFC en 100 µL de la suspensión bacteriana *L. pneumophila* (CECT 10^{-4}) se encontró entre los valores siguientes:

$$\text{- BCYE} = 205 - 487 \text{ ufc}/100\mu\text{L} \text{ (20500 - 48700 ufc}/10 \text{ mL)}^*$$

El Intervalo de confianza del 95% del Nº de UFC en 100 µL de la suspensión bacteriana *L. pneumophila* (CECT 10^{-5}) se encontró entre los valores siguientes:

$$\text{- BCYE} = 20 - 50 \text{ UFC}/100\mu\text{L} \text{ (2000 - 5000 UFC}/10 \text{ mL)}^*$$

*datos obtenidos de la calibración del procedimiento.

Los criterios de aceptación para los resultados del control de calidad interno son:

- Para el Control de exactitud:

$$\text{Recuperación del ensayo} > 20\%$$

- Para el Control de Precisión:

$$R \text{ relativa } \% \leq 1,2 \cdot \text{RSDPOISSON}$$

$$\text{RDS\% Poisson} = 1 / \sqrt{C} \cdot 100$$

(Siendo C el valor del recuento)

9.2 PARTICIPACIÓN EN ESTUDIOS INTERCOMPARACIÓN

Se estableció como criterio de calidad la participación anual en al menos un estudio de intercomparación para todas las matrices de ensayo.

El análisis consistió en comparar los resultados obtenidos por el laboratorio con los resultados esperados establecidos por la entidad organizadora del ensayo interlaboratorio a través de metodología estadística.

Los parámetros evaluados incluyen:

- la identificación de los aislados de *Legionella* spp. (especie y serogrupo de *Legionella* spp.);
- Z-SCORE: evalúa la eficacia de los participantes

$$Z\text{-SCORE} = \frac{x - X}{S}$$

x: media Log de los resultados de cada laboratorio

X: MEDIA Log. De los resultados de los laboratorios

S: Desviación estándar de todos los laboratorios

- Recuperación: Evalúa las reducciones logarítmicas experimentadas (recuperaciones) al someter la muestra preparada a distintas condiciones (sin tratamiento, tratamiento por el calor y tratamiento ácido). Se presenta como la reducción logarítmica obtenida por el laboratorio siendo esta la diferencia entre el valor logarítmico de las UFC/L que cada laboratorio obtiene en la muestra original (calculándose a partir de los resultados directos obtenido por cada laboratorio) y el valor logarítmico del resultado (UFC/L) obtenido por el laboratorio después de analizar la muestra, por aplicación del tratamiento habitualmente empleado. Dicho valor representa la pérdida de *Legionella* spp. en cada laboratorio al aplicar el método habitual de análisis.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Para evaluar el cumplimiento de lo establecido en la validación para la reproducibilidad interlaboratorios los criterios de desviación permitida para los parámetros analizados son:

1. Identificación del aislamiento:

Debe ser correcta a nivel de género para todos los cultivos positivos de *Legionella* spp.

2. Z-SCORE: evalúa la eficacia de los participantes

Criterio de valoración: Z-SCORE \pm 2 sigma

3. Recuperación: Criterio de valoración:

Valores de recuperación positivos= 2 sigma.

El valor negativo de la recuperación no es posible, puesto que no se puede recuperar más de lo que se encontró inicialmente.

9.3 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

La evaluación de los resultados se hizo de manera individual con cada resultado de cada control, aceptándolo o rechazándolo.

Con periodicidad anual comprobamos que el método, validado, sigue bajo control estadístico, sigue proporcionando resultados válidos. Para ello mediante el empleo de gráficos de control se realizó la determinación de LC (línea central) del grafico control y el análisis de tendencias (error sistemático y deriva).

10. IDENTIFICACIÓN DE SEROGRUPOS DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

Para identificación de los serogrupos de *Legionella* spp. se realizó inmunoaglutinación de hasta tres colonias de cada tipo identificado como *Legionella* spp. a partir de subcultivos de colonias de *Legionella* en medio de BCYE tras 48 horas de incubación a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Las colonias se aglutinaron siguiendo las instrucciones del fabricante (*Legionella* látex test OXOID®). Las partículas de látex azul sensibilizado con anticuerpos se aglutinan en presencia de antígenos de la pared celular específicos de *Legionella pneumophila* para formar grumos visibles. Permitiendo discriminar entre *Legionella pneumophila* sg 1, sg 2-14 y *Legionella* spp (*L. longbeachae*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanii*, *L. micdadei*, *L. anisa*).

MÉTODO DE PRUEBA DIRECTA

1. Dejar que los reactivos de látex alcancen la T^a ambiente y agitar vigorosamente las suspensiones de látex

2. Dispensar 1 gota del reactivo látex próximo al borde de los círculos de las tarjetas de reacción
3. Añadir 1 gota de tampón diluyente en los mismos pocillos en los que se ha dispensado reactivo
4. Recoger mediante asa una porción del subcultivo, de al menos 1mm de diámetro, y emulsionar en el tampón.
5. Mezclar con el mismo asa los reactivos látex y la suspensión
6. Rotar la tarjeta con movimiento circular suave durante 1 minuto y observar (sin utilizar lupa) la presencia de aglutinación. No rotar más de 1 minuto.
7. Desechar todos los materiales utilizados en los contenedores adecuados y devolver los reactivos a la nevera (4°C).

PROCEDIMIENTO DE CONTROL

Para el control de la reacción y del correcto funcionamiento de los reactivos látex utilizar como muestra las suspensiones control positivo y negativo cada día que se realice la prueba.

Suspensión control positivo: resultado correcto, presencia de aglutinación dentro de ≤ 1 minuto.

Suspensión control negativo: ausencia de aglutinación en 1 minuto.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Resultados positivos

- Presencia de aglutinación de las partículas de látex azul en ≤ 1 minuto, y
- Ausencia de aglutinación en el control negativo

Interpretación:

- la reacción positiva indica la presencia de antígenos del serogrupo que ha aglutinado en la muestra analizada

Los resultados se informarán según los criterios expuestos:

- a. Las colonias de *Legionella* positivas frente al:

- Reactivo de la prueba de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 como *Legionella pneumophila* serogrupo 1
 - Reactivo de la prueba de *Legionella pneumophila* serogrupos 2-14 como *Legionella pneumophila* serogrupos 2-14
 - Reactivo de la prueba de *Legionella* especies como *Legionella* spp.
- b. Resultados Negativos
- Ausencia de aglutinación y las partículas de látex permanecen en suspensión después de un minuto

b. Interpretación:

Una prueba de aglutinación con látex negativa indica que el cultivo no es *Legionella pneumophila* serogrupos 1-14, *L. longbeachae*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanii*, *L. micdadei* ni *L. anisa*.

Resultados ininterpretables: Si se observó presencia de aglutinación con el reactivo control de látex el cultivo se consideró autoaglutinable.

LIMITACIONES

Se puede producir reacción cruzada entre los serogrupos 1 y 9 debido a la presencia de antígenos comunes, sospechar ante la presencia de aglutinación positiva con el serogrupo 1 y con el 2-14.

Ocasionalmente se han detectado reacciones cruzadas con el reactivo de prueba y ciertos serotipos de *Legionella* (consultar *insert*).

Los aislados de *Legionella* spp. obtenidos se conservaron congelados en medio de congelación.

11. GENOTIPADO DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* MEDIANTE SBT (*SEQUENCE-BASED TYPING*)

Seleccionamos 65 cepas congeladas de *L. pneumophila* representativas de los puntos terminales de la red de agua sanitaria del hospital, aisladas durante el periodo 2011-2015 que fueron remitidas a la Unidad Mixta de Investigación de Infección y Salud Pública FISABIO/CSISP/Universitat de València.

El procedimiento de análisis fue:

1. Cultivo de las cepas y extracción de ADN,

2. Preparación de las librerías usando Nextera XT
3. Secuenciación mediante la plataforma Illumina MiSeq
4. Análisis de las secuencias: los ficheros con las lecturas crudas fueron evaluados con el programa ARIBA para obtener la secuencia tipo (ST) basándonos en los genes para *L. pneumophila* (*fliC*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*).

Analizamos los resultados obtenidos con el genotipado por SBT para conocer la diversidad genética de *Legionella pneumophila* presente en la red de agua hospitalaria del hospital a partir de las cepas aisladas durante el control rutinario de la misma y evaluar los cambios producidos tras los tratamientos de desinfección.

12. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *LEGIONELLA* SPP.

De las técnicas recomendadas en el anexo G de la UNE-EN ISO 11731:2017 para identificación de especies de *Legionella* spp. hemos utilizado MALDI-TOF-MS que es el medio disponible en nuestro laboratorio.

12.1 IDENTIFICACIÓN POR MALDI-TOF-MS

Para la identificación por MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) hemos utilizado MALDI Biotyper® (Bruker, Alemania). La tarjeta contiene 96 pocillos. El equipo se calibró siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez que calibrado el equipo, se procedió a la lectura del resto de muestras. El pocillo de calibración también sirve como control ya que nos dará un resultado de identificación al igual que para el resto de las muestras de esta tanda.

Las colonias compatibles se seleccionaron para estudio a partir de colonias crecidas en medio sólido (BCYE) y que no aglutinan o las que aglutinan como *Legionella* spp.

Transferimos las colonias a analizar a un pocillo de la placa de MALDI Biotyper® con un palillo de madera y añadimos 1 µL de matriz reconstituida. Dejamos secar a temperatura ambiente antes de introducir la placa en el espectrómetro.

El *software* Biotyper realiza la identificación automática de los resultados a medida que se van analizando. Este software tiene un código de colores para la interpretación de los scores (verde para score mayor de 2,0; amarillo para score entre 1,99 y 1,7 y rojo para valores inferiores a 1,7).

Scores mayores de 2,3 se interpretan como “resultados altamente fiables a nivel especie”; entre 2,3 y 2,0 como “identificación segura hasta el nivel de género y probable hasta el de especie”; entre 1,99 y 1,7 como “probable identificación a nivel de género” y por debajo de 1,7 se consideran resultados no fiables. Además, esta identificación se considera de “alta confianza” si su score es $\geq 1,8$ y de “baja confianza” cuando es $\geq 1,6$. Por debajo de este punto de corte se recomienda repetir el análisis con la misma muestra o preparar una nueva extracción de proteínas a partir de biomasa bacteriana.

La identificación se consideró aceptable hasta el nivel de especie si se obtuvo una identificación con un score ≥ 2.0 .

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La elaboración de la base de datos se ha realizado introduciendo los informes de los resultados de las muestras analizadas en una hoja Excel (MICROSOFT WINDOWS XP®) de forma manual. El número de variables registradas ha sido de 36 y el número de muestras analizadas ha sido de 2.137.

Las variables registradas se incluyen en la tabla 9, siendo el medio de máximo recuento el medio de cultivo con el pretratamiento determinado que obtiene el mayor número de UFC/L en cada muestra y es el utilizado para elaborar el informe definitivo.

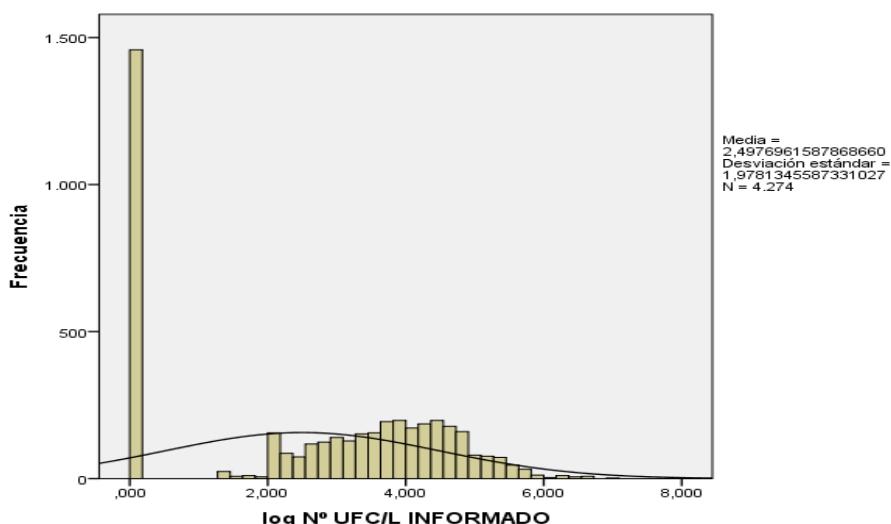
TABLA 9. Variables registradas para la realización de la base de datos utilizada para el estudio estadístico.

1	Procedencia
2	PUNTO DE RECOGIDA
3	COLORO LIBRE (ppm)
4	Temperatura
5	pH
6	AEROBIOS 22°C UFC/ml
7	Log AEROBIOS 22°C UFC/ml
8	AEROBIOS 33°C UFC/ml
9	Log AEROBIOS 33°C UFC/ml
10	FST 500 UFC/L
11	FST 500 Log UFC/L
12	FST BCYE UFC/L
13	FST BCYE Log UFC/L
14	FST GVPC UFC/L
15	FST GVPC Log UFC/L
16	FA BCYE UFC/L
17	FA BCYE Log UFC/L
18	FA GVPC UFC/L
19	FA GVPC Log UFC/L
20	FC BCYE UFC/L
21	FC BCYE Log UFC/L
22	FC GVPC UFC/L
23	FC GVPC Log UFC/L
24	DIL 1/10 BCYE UFC/L
25	DIL 1/10 BCYE Log UFC/L
26	DIL 1/10 GVPC UFC/L
27	DIL 1/10 GVPC Log UFC/L
28	Nº UFC/L INFORMADO
29	log Nº UFC/L INFORMADO
30	crecimiento si/no
31	MEDIO MÁXIMO RECUENTO
32	FLORA ACOMPAÑANTE
33	<i>L. pneumophila</i> ser. 1
34	<i>L. pneumophila</i> ser 2-14
35	<i>Legionella</i> spp.
36	especie de <i>Legionella</i>

ANÁLISIS DEL CULTIVO DE LOS PC VS PT

Para evaluar los PC, comparamos los datos del log del nº UFC/L de *Legionella* spp. recuperados de las muestras de agua sanitaria correspondientes al muestreo de los PT respecto al nº de UFC/L correspondientes al análisis de los PC. El análisis de los PT se realizó en el período 2006 a 2008, y a partir de 2009 hasta 2018 el análisis de la instalación se realizó mediante el muestreo trimestral de los PC.

Para valorar si el análisis de los PC es representativo de los PT comparamos los resultados del log del nº de UFC/L de *Legionella* spp. detectados en la instalación completa, por pabellones y por sectores (869 PT) respecto a los PC (99PC). En este análisis inicial se incluyeron los resultados de los primeros PC analizados. En un segundo análisis para valorar si los PC permiten evaluar el riesgo de la instalación se compararon el log del nº de UFC/L correspondientes al análisis trimestral de los PC con respecto al de los PT (período 2006-2018). Se dispone de una base de datos de 2.137 muestras, de las cuales 1.067 corresponden a determinaciones repetidas



en el tiempo de los PC.

FIGURA 20. Representación logarítmica del número de UFC/L informados frente a la frecuencia de los informes. La variable que recoge el número de UFC/L no es una variable normal ya que está truncada a cero.

En la figura 20 se muestra el análisis estadístico realizado para ver la distribución de la población de estudio. La variable que recoge el logaritmo del número de UFC/L no es una variable normal ya que está truncada a cero. Así pues, se aplicarán pruebas no paramétricas de comparación de distribuciones. Se ha utilizado la Prueba Mann-Whitney para muestras independientes para

Tesis Doctoral Universitat de València 2024 131

contrastar la igualdad de distribuciones en muestras independientes de tipo continuo y distribución no normal. El *nivel de significatividad* empleado en los análisis ha sido del 5% ($\alpha=0.05$).

ANÁLISIS DE LA ADICIÓN DE BCYE AL PROTOCOLO DE CULTIVO

Utilizamos los resultados del cultivo de las muestras de agua sanitaria durante el análisis rutinario de la instalación, correspondientes a los PC de la red en el período 2010-2015 (N=1304) y comparamos el nº de UFC/L de *Legionella* spp. detectados en ambos medios de cultivo (GVPC y BCYE). Para comprobar cuál es el medio donde se ha obtenido mayor número de colonias (medio de máximo recuento), agrupamos los datos en 2 categorías globales de medio empleado (BCYE vs GVPC) los distintos pretratamientos utilizados (FA, FC, FST).

Se dispone de una muestra inicial de 896 (69%) muestras positivas de agua procedentes de los puntos terminales de la red de agua sanitaria del hospital. En algunos de los puntos de recogida, se extraen muestras de agua en distintos períodos de tiempo. Estas muestras procedentes del mismo punto de recogida se consideran independientes entre sí para el análisis propuesto, pues la influencia que tienen las diferentes condiciones climatológicas y ambientales de cada momento de extracción sobre las características de la muestra de agua así lo permite.

El análisis bivalente engloba todos los contrastes estadísticos necesarios para comprobar las correlaciones entre parámetros, en este caso, si existen diferencias significativas en la sensibilidad del método al añadir BCYE respecto a GVPC. Utilizamos las siguientes pruebas:

- Pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov: Se han utilizado como prueba de ajuste a una distribución normal de las variables continuas. La aceptación de la normalidad permitirá la aplicación de pruebas de tipo paramétrico; mientras la no aceptación determinará el uso de no paramétricas ($p\text{-valor}>0.05$ acepta la hipótesis de normalidad).
- Prueba de Mann-Whitney para dos muestras independientes: Se utiliza para contrastar si la distribución de un parámetro, cuando menos ordinal, es o no la misma en dos muestras independientes. Por ejemplo, para analizar si el número de colonias informado difiere según si se aplica BCYE o no.
- Prueba χ^2 de Pearson: Se ha utilizado como prueba de asociación o dependencia entre dos variables categóricas, siempre que la frecuencia esperada de las celdas en la tabla de contingencia es superior a 5 casos. En caso contrario, y, sólo para variables dicotómicas, se usará la prueba exacta de Fisher. Por ejemplo, se ha utilizado para contrastar la dependencia entre la flora bacteriana acompañante y el tipo de medio utilizado.

El nivel de significatividad empleado en los análisis bivariantes ha sido del 5% ($\alpha=0.05$). En cuanto a la potencia del contraste, ésta se mide por la probabilidad de rechazar H_0 (hipótesis nula) cuando sea falsa, es decir, representa la probabilidad de observar en la muestra una determinada diferencia o efecto, si existe en la población. La potencia de un test es mayor cuanto más grande es la muestra. Suelen ser aceptables potencias entre el 80-90%, es decir, que la probabilidad de no detectar un efecto o diferencia cuando éstos existen, está entre el 10% y el 20%. En este estudio, los tamaños muestrales de los grupos son óptimos para que el test detecte diferencias pequeñas entre grupos.

La prueba de comprobación de la normalidad de K-S (p-valor $0.000 < 0.05$) indica que la distribución de los valores de la variable Nº UFC/L INFORMADO no sigue una distribución normal en ninguna de las 2 muestras determinadas por los medios seleccionados BCYE y GVPC por lo que para analizar la sensibilidad del método al añadir BCYE se aplicará una prueba no paramétrica de comparación de distribuciones de Mann-Whitney.

Para comprobar la influencia del método según el pretratamiento aplicado (FA, FC, FST) en el número de UFC/L detectadas en BCYE y GVPC se analizan tanto el número de veces que es informado el recuento máximo con cada pretratamiento como la comparación del número medio (o mediana) de colonias.

Para analizar la influencia de la temperatura, el pH y el cloro en la sensibilidad del método comparamos estos parámetros para cada uno de los métodos y los correlacionamos con el número medio (o mediana) de colonias. Ninguno de los 3 parámetros sigue una distribución normal para ningún método, por lo que utilizaremos la prueba de Mann-Whitney para contrastar las distribuciones.

RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE MUESTREO: VALIDEZ DEL USO DE PC REPRESENTATIVOS DE LOS PT

1.1 ANÁLISIS DE LOS PC VS PT DE LA INSTALACIÓN CON UNA SOLA DETERMINACIÓN POR CADA PT

En este apartado se compararán los recuentos de colonias entre las muestras más antiguas: 99 muestras para puntos críticos y 869 muestras para los puntos terminales, de manera que se analicen todos los puntos terminales de la instalación una sola vez y en el mismo período de tiempo.

A. INSTALACIÓN COMPLETA

Si comparamos la instalación completa, el recuento medio expresado en log del número UFC/L informados es de 2,116 en los PT y de 2,432 en los PC, con una mediana de 2,301 para los PT y de 2,600 en los PC (tabla 10).

TABLA 10. Parámetros estadísticos del análisis de la instalación completa, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

				TIPO DE PUNTO	
				Punto Terminal	Punto Crítico
log	Nº	UFC/L	N válido	869	99
INFORMADO					
			Media	2,116	2,432
			Desviación estándar	2,038	1,987
			Percentil 25	,000	,000
			Mediana	2,301	2,699
			Percentil 75	3,914	4,401

El p-valor de la prueba de Mann-Whitney es de 0.125 (>0.05), lo que indica que no existen diferencias significativas en el recuento de colonias entre puntos terminales y puntos críticos.

Tal como se observa en el diagrama de cajas de la figura 21, la amplitud de la caja en los PC es mayor que en los PT y la mediana también es superior en los PC con respecto a los PT, aunque no existe diferencia estadísticamente significativa, por lo que podemos afirmar que el análisis de los PC es representativo de la instalación completa.

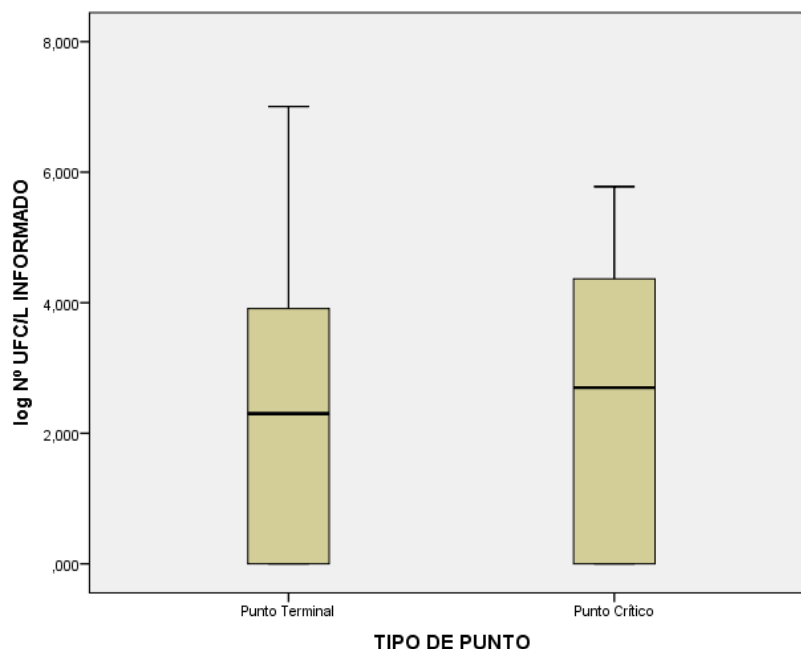


FIGURA 21. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella* spp. En los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar la instalación completa, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

B. POR PABELLONES

PABELLÓN A

En este apartado analizamos los datos del pabellón A en su conjunto, formado por los sectores 1, 2, 3 y 4. Se incluyeron en el estudio 326 PT y 33 PC. La media de los PT expresada como log del n° de UFC/L fue de 1,334 y la media de los PC de 2,328; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 3,146 (Tabla 11).

Observamos que el log del n° UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT siendo esta diferencia estadísticamente significativa al analizar el p valor M-W 0.002 (<0.05): en el pabellón A, el recuento de colonias es superior en los PC.

TABLA 11. PABELLÓN = A Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

	TIPO DE PUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log Nº UFC/L N válido	326	33
INFORMADO Media	1,334	2,328
Desviación estándar	1,737	1,954
Percentil 25	,000	,000
Mediana	,000	3,146
Percentil 75	3,146	3,892

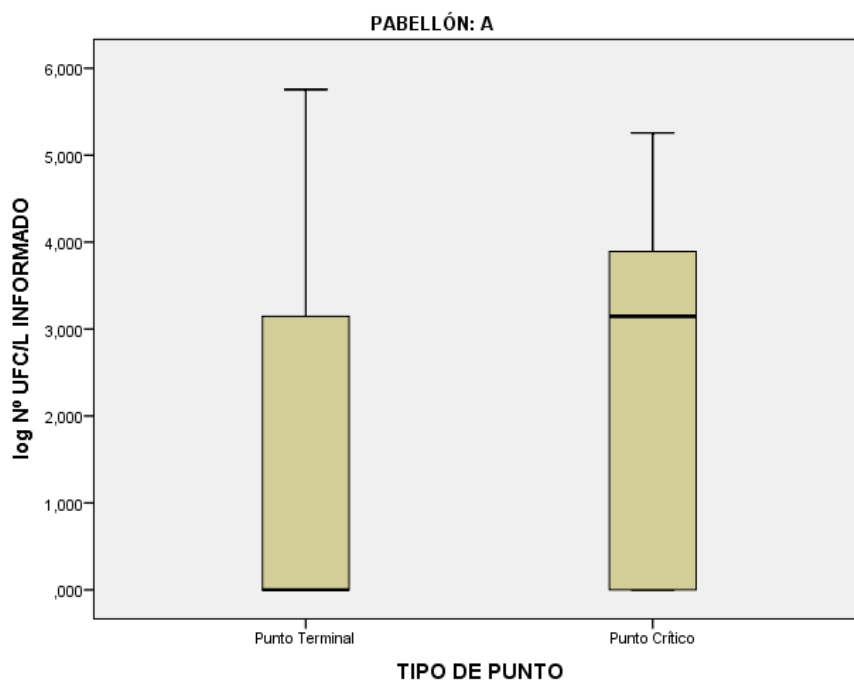


FIGURA 22. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella* spp. En los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el pabellón A, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

Tal como se observa en el diagrama de cajas de la figura 22, la amplitud de la caja en los PC es mayor que en los PT y la mediana también es superior en los PC con respecto a los PT, siendo esta diferencia estadísticamente significativa, por lo que podemos afirmar que el análisis de los PC consigue detectar más *Legionella* spp. que el análisis del total de los puntos de la instalación (PT), lo que podría verse como una mejora en la eficiencia del control de la instalación. Por los que el análisis de los PC sería de mayor utilidad para el control de la instalación frente al análisis de todos los puntos de la red.

PABELLÓN B

En este apartado analizamos los datos del pabellón B en su conjunto, formado por los sectores 1, 2 y 3. Se incluyeron en el estudio 293 PT y 35 PC. La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,800 y la media de los PC de 2,947; la mediana de los PT fue de 3,623 y la de los PC fue de 3,681 (Tabla 12).

TABLA 12. PABELLÓN = B. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

	TIPO DE PUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log Nº UFC/L N válido	293	35
INFORMADO Media	2,800	2,947
Desviación estándar	2,214	1,983
Percentil 25	,000	,000
Mediana	3,623	3,681
Percentil 75	4,768	4,565

Observamos que el log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa al analizar el p valor M-W = 0.923 (<0.05).

Tal como se observa en el diagrama de cajas de la figura 23, la amplitud de la caja en los PC es menor que en los PT y la mediana es similar en los PC con respecto a los PT, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa, por lo que podemos afirmar que en el pabellón B, el análisis de los PC es representativo de la instalación completa.

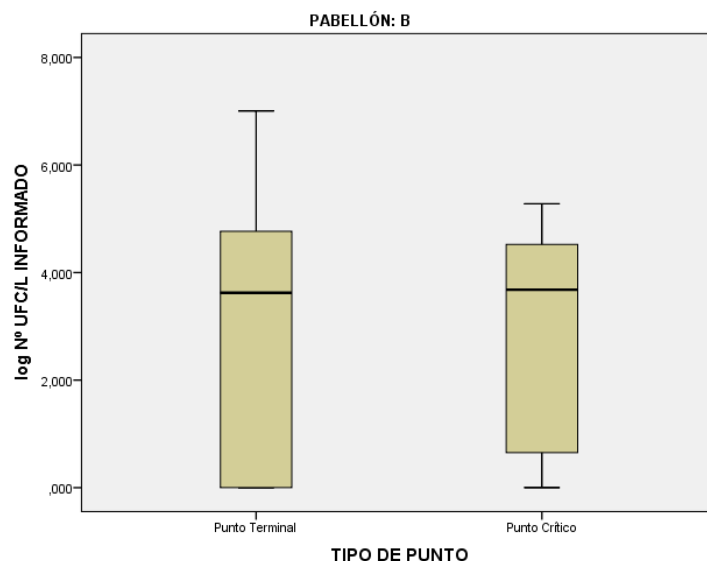


FIGURA 23. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella* spp. En los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el pabellón B, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

PABELLÓN C

En este apartado analizamos los datos del pabellón C en su conjunto, formado por los sectores 1 y 2. Se incluyeron en el estudio 140 PT y 15 PC. La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,383 y la media de los PC de 2,458; la mediana de los PT fue de 2,625 y la de los PC fue de 2,602 (Tabla 13).

TABLA 13. PABELLÓN = C. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón C, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

	TIPO DE PUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log Nº UFC/L N válido	140	15
INFORMADO Media	2,383	2,458
Desviación estándar	1,944	2,039
Percentil 25	,000	,000
Mediana	2,625	2,602
Percentil 75	3,977	4,431

Si comparamos los datos del pabellón C, observamos que el log del nº UFC/L informadas es algo menor en los PC que en los PT, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa al analizar el p valor M-W = 0.931 (>0.05).

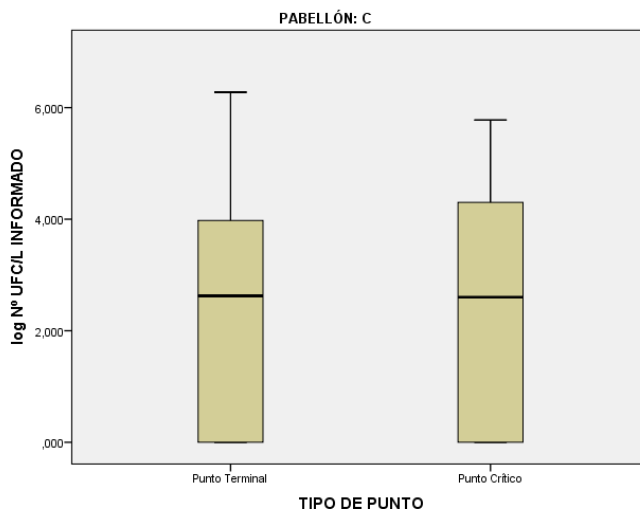


FIGURA 24. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella spp.* En los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el pabellón C, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

Tal como se observa en el diagrama de cajas de la figura 24, la amplitud de la caja en los PC es mayor que en los PT y la mediana es similar en los PC con respecto a los PT, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa, por lo que podemos afirmar que en el pabellón C, el análisis de los PC es representativo de la instalación completa.

PABELLÓN QUIRÚRGICO

En este apartado analizamos los datos del pabellón quirúrgico (QX) en su conjunto, formado por un único sector. Se incluyeron en el estudio 101 PT y 8 PC. La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,452 y la media de los PC de 3,107; la mediana de los PT fue de 2,845 y la de los PC fue de 3,155 (Tabla 14).

TABLA 14. PABELLON = QUIRÚRGICO. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón QX, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

	TIPOPUNTO		
	Punto Terminal	Punto Crítico	
log N° UFC/L INFORMADO	N válido	101	8
	Media	2,452	3,107
	Desviación estándar	1,690	1,602
	Percentil 25	,000	2,389
	Mediana	2,845	3,155
	Percentil 75	3,462	4,508

Si comparamos los datos del pabellón QX, observamos que el log del n° UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa al analizar el p valor M-W = 0.305 (>0.05). El resumen de contrastes de hipótesis se muestra en la figura 25.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de log N° UFC/L INFORMADO es la misma entre las categorías de TIPOPUNTO.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,305	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

FIGURA 25. Resumen de contraste de hipótesis del análisis de los datos del pabellón QX, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

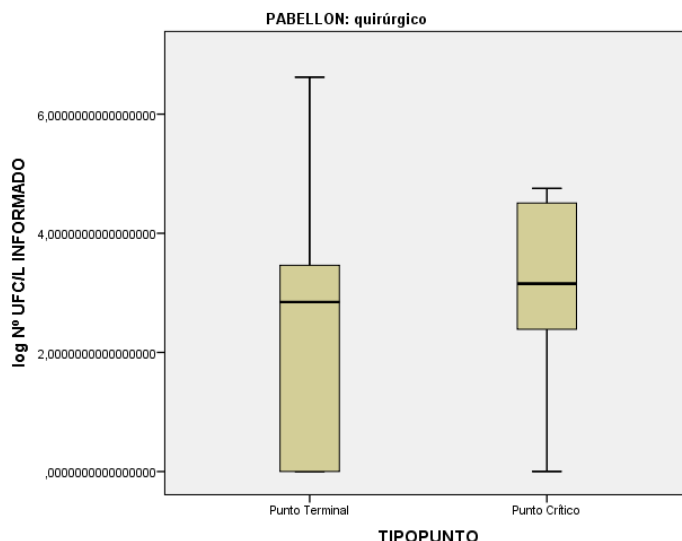


FIGURA 26. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella spp.* En los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el pabellón QX, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

Tal como se observa en el diagrama de cajas de la figura 26, la amplitud de la caja en los PC es menor que en los PT, aunque el rango superior de recuentos es superior en PC que en PT (tanto el percentil 25 como el percentil 75 son superiores en PC que en PT) y la mediana es similar en los PC con respecto a los PT, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa, por lo que podemos afirmar que en el pabellón QX, el análisis de los PC es representativo de la instalación completa.

C. POR PABELLÓN Y PLANTA

PABELLÓN A, PLANTA SÓTANO: AS

En este apartado analizamos los datos de la planta sótano del pabellón A. En esta área de la instalación se ubica vestuarios, lavandería, consultas y despachos. Se incluyeron en el estudio 8 PT y 1 PC. El PC corresponde a un grifo de las consultas de pacientes.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 1,392 y la media de los PC de 3,863; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 3,863 (Tabla 15).

TABLA 15. PABELLON A, PLANTA S. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A planta sótano, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

		TIPO DE PUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L INFORMADO	N válido	8	1
	Media	1,392	3,863
	Desviación estándar	1,936	.
	Percentil 25	,000	3,863
	Mediana	,000	3,863
	Percentil 75	3,534	3,863

a. pab+planta = AS

Si comparamos los datos del sótano del pabellón A, observamos que el log del n° UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa al analizar el p valor M-W = 0.444 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta sótano del pabellón A el análisis de los PC es representativo de los PT.

PABELLÓN A, PLANTA BAJA: AB

En este apartado analizamos los datos de la planta baja del pabellón A. En esta área de la instalación se ubica urgencias, laboratorio, radiología y quirófanos. Se incluyeron en el estudio 41 PT y 5 PC. Los PC se distribuyeron de la siguiente manera: 3 en puntos se atención a pacientes, uno en el laboratorio y otro en un aseo.

La media de los PT expresada como log del n° de UFC/L fue de 1,037 y la media de los PC de 1,686; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 0,000 (Tabla 16).

TABLA 16. PABELLON A, PLANTA BAJA. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A planta baja, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

	TIPO DE PUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L N válido	41	5
INFORMADO Media	1,037	1,686
Desviación estándar	1,688	2,343
Percentil 25	,000	,000
Mediana	,000	,000
Percentil 75	2,000	3,653

a. pab+planta = AB

Si comparamos los datos de la planta baja del pabellón A, observamos que la media del log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, siendo la mediana igual. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0.607 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta baja del pabellón A el análisis de los PC es representativo de los PT.

PABELLÓN, A PLANTA 1: A1

En este apartado analizamos los datos de la planta 1 del pabellón A. En este área de la instalación se ubican 15 habitaciones de pacientes, consultas externas de especialidades, despachos e instalaciones del laboratorio. Se incluyeron en el estudio 47 PT y 7 PC. Los PC se distribuyen de la siguiente manera: 3 en habitaciones de pacientes, 2 en el laboratorio y 2 en las consultas externas.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,360 y la media de los PC de 2,552; la mediana de los PT fue de 3,079 y la de los PC fue de 3,204 (Tabla 17).

TABLA 17. PABELLON A, PLANTA 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A planta 1, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

a		TIPO DE PUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	47	7
	Media	2,360	2,552
	Desviación estándar	1,913	1,920
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	3,079	3,204
	Percentil 75	4,104	4,325

a. pab+planta = A1

Si comparamos los datos de la planta 1 del pabellón A, observamos que el log del n° UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa al analizar el p valor M-W = 0.880 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta 1 del pabellón A el análisis de los PC es representativo de los PT.

PABELLÓN A, PLANTA 2: A2

En este apartado analizamos los datos de la planta 2 del pabellón A. Se incluyeron en el estudio 177 PT y 8 PC. Están ubicadas aquí 3 unidades de hospitalización de pacientes, quirófanos y varios aseos. Los PC pertenecen a 6 habitaciones de hospitalización, un punto en el quirófano y un aseo.

La media de los PT expresada como log del n° de UFC/L fue de 0,951 y la media de los PC de 2,132; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 2,500 (Tabla 18).

Si comparamos los datos de la planta 2 del pabellón A, observamos que el log del n° UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.049 (<0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta 2 del pabellón A la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es mayor que al analizar los PT, lo que podría verse como una mejora en la eficiencia del control de la instalación. Por lo tanto, el análisis de los PC sería de mayor utilidad para el control de la instalación que el análisis de todos los puntos de la red.

TABLA 18. PABELLON A, PLANTA 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A planta 2, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

	TIPO DE PUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L N válido	177	8
INFORMADO Media	,951	2,132
Desviación estándar	1,459	1,964
Percentil 25	,000	,000
Mediana	,000	2,500
Percentil 75	2,398	3,399

a. pab+planta = A2

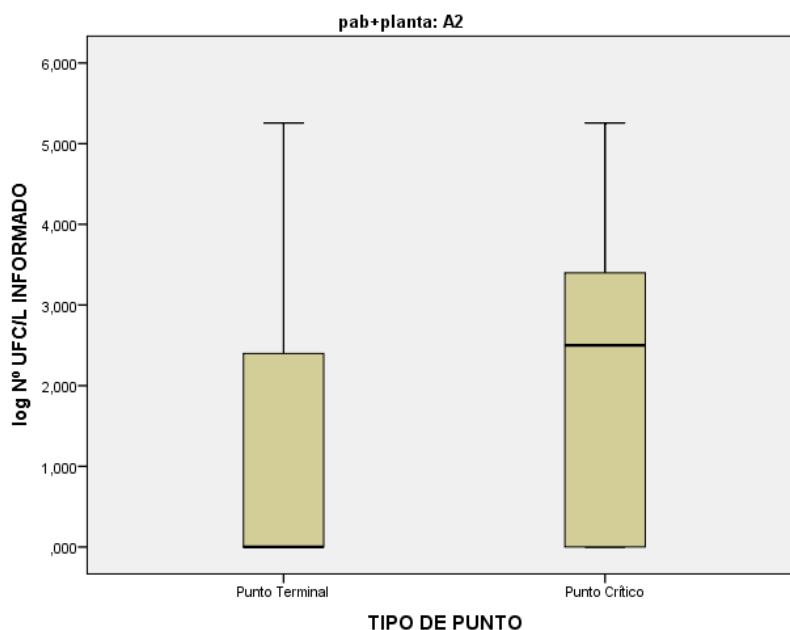


FIGURA 27. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella spp.* En los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el segundo piso del pabellón A, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

Estos resultados, se ven representados en el diagrama de cajas de la figura 27, siendo la amplitud de la caja en los PC mayor que en los PT, el rango superior de recuentos es superior en PC que en y la mediana también es mayor en los PC con respecto a los PT.

PABELLÓN A, PLANTA 3: A3

En este apartado analizamos los datos de la planta 3 del pabellón A. Se incluyeron en el estudio 53 PT y 12 PC. Están ubicadas aquí 2 unidades de hospitalización de pacientes con 16 habitaciones, laboratorio, un aseo y una consulta.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 1,926 y la media de los PC de 2,466; la mediana de los PT fue de 2,000 y la de los PC fue de 3,212 (Tabla 19).

TABLA 19. PABELLON A, PLANTA 3. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A planta 3, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

a		TIPO DE PUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	53	12
	Media	1,926	2,466
	Desviación estándar	1,959	2,040
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	2,000	3,212
	Percentil 75	3,892	4,247

a. pab+planta = A3

Si comparamos los datos de la planta 3 del pabellón A, observamos que el log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.376 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta 3 del pabellón A la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del control de la instalación.

PABELLÓN B, PLANTA BAJA:BB

En este apartado analizamos los datos de la planta baja del pabellón B. Se incluyeron en el estudio 9 PT y 5 PC. Están ubicadas varias consultas de especialidades. Los PC se definieron en 2 aseos de pacientes y 3 consultas.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 0,753 y la media de los PC de 1,356; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 0,000 (Tabla 20).

TABLA 20. PABELLÓN B, PLANTA B. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B planta baja, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

a	TIPO DE PUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L INFORMADO N válido	9	5
Media	,753	1,356
Desviación estándar	1,648	2,100
Percentil 25	,000	,000
Mediana	,000	,000
Percentil 75	,000	2,000

a. pab+planta = BB

Si comparamos los datos de la planta baja del pabellón B, observamos que si comparamos las medias el log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, y las medianas son iguales en ambos, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.606 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta baja del pabellón B la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del control de la instalación.

PABELLÓN B, PLANTA 1: B1

En este apartado analizamos los datos de la planta primera del pabellón B. Se incluyeron en el estudio 123 PT y 9 PC. Están ubicadas varias consultas de especialidades, 15 habitaciones de hospitalización y aseos. Los PC se definieron en 4 habitaciones de hospitalización y 5 consultas.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 3,401 y la media de los PC de 3,289; la mediana de los PT fue de 4,310 y la de los PC fue de 4,330 (Tabla 21).

TABLA 21. PABELLÓN B, PLANTA 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B planta primera, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

a		TIPO DE PUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L N válido	123	9
	INFORMADO Media	3,401	3,289
	Desviación estándar	2,046	1,967
	Percentil 25	2,000	2,778
	Mediana	4,310	4,330
	Percentil 75	5,079	4,565

a. pab+planta = B1

Si comparamos los datos de la primera planta del pabellón B, observamos que si comparamos las medias el log del nº UFC/L informadas es mayor en los PT que en los PC, y la mediana de los PC es ligeramente superior que la de los PT, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.534 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta primera del pabellón B la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del control de la instalación.

PABELLÓN B, PLANTA 2: B2

En este apartado analizamos los datos de la planta primera del pabellón B. Se incluyeron en el estudio 62 PT y 7 PC. Están ubicadas 12 habitaciones de hospitalización y un quirófano. Los PC se definieron en 7 habitaciones de hospitalización.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,767 y la media de los PC de 1,908; la mediana de los PT fue de 3,114 y la de los PC fue de 2,000 (Tabla 22).

TABLA 22. PABELLÓN B, PLANTA 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B planta segunda, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

	TIPO DE PUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L INFORMADO	62	7
N válido		
Media	2,767	1,908
Desviación estándar	2,194	1,945
Percentil 25	,000	,000
Mediana	3,114	2,000
Percentil 75	4,398	3,623

a. pab+planta = B2

Si comparamos los datos de la segunda planta del pabellón B, observamos que si comparamos las medias y las medianas el log del nº UFC/L informadas es mayor en los PT que en los PC, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.316 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta segunda del pabellón B la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del control de la instalación.

PABELLON B, PLANTA 3: B3

En este apartado analizamos los datos de la planta primera del pabellón B. Se incluyeron en el estudio 94 PT y 14 PC. Están ubicadas 24 habitaciones de hospitalización y varios quirófanos. Los PC se definieron en 13 puntos de las habitaciones de hospitalización y un quirófano.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,299 y la media de los PC de 3,815; la mediana de los PT fue de 2,690 y la de los PC fue de 4,365 (Tabla 23).

Si comparamos los datos de la tercera planta del pabellón B, observamos que las medias y las medianas del log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, mostrando el p

valor de Mann Whitney una diferencia estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.024 (<0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta tercera del pabellón B la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es mayor que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería más eficaz para la instalación que el análisis de todos los puntos terminales.

TABLA 23. PABELLÓN B, PLANTA 3. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B planta tercera, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

	TIPO DE PUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L N válido	94	14
INFORMADO Media	2,299	3,815
Desviación estándar	2,252	1,535
Percentil 25	,000	3,322
Mediana	2,690	4,365
Percentil 75	4,599	4,778

a. pab+planta = B3

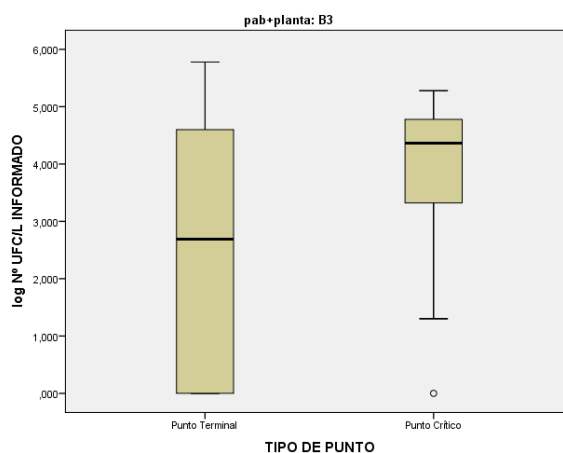


FIGURA 28. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella* spp. En los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el tercer piso del pabellón B, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

Estos resultados, se ven representados en el diagrama de cajas de la figura 28, donde el rango superior de recuentos es superior en PC que en PT y la mediana también es mayor en los PC con respecto a los PT.

PABELLÓN C, PLANTA SÓTANO: CS

En este apartado analizamos los datos de la planta sótano del pabellón C. Se incluyó en el estudio 1 PT y se estableció como PC. Están ubicadas aquí consultas externas de pacientes. La cantidad de *Legionella* spp. detectada en este punto en la primera determinación expresada como el log del nº de UFC/L fue de 2,602 (Tabla 24).

TABLA 24. PABELLON C, PLANTA SÓTANO. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A planta 3, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

	TIPO DE PUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log Nº UFC/L N válido	1	1
INFORMADO Media	2,602	2,602
Desviación estándar	.	.
Percentil 25	2,602	2,602
Mediana	2,602	2,602
Percentil 75	2,602	2,602

a. pab+planta = CS

PABELLÓN C, PLANTA BAJA: CB

En este apartado analizamos los datos de la planta baja del pabellón C. Se incluyeron en el estudio 2 PT y 2 PC. Están ubicadas una consulta de especialidades y un aseo. Los PC se definieron en estas ubicaciones.

No se detectó *Legionella* spp. en estos puntos. La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 0,000 y la media de los PC de 0,000; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 0,000 (Tabla 25).

TABLA 25. PABELLÓN C, PLANTA B. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B planta baja, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

a		TIPO DE PUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	2	2
	Media	,000	,000
	Desviación estándar	,000	,000
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	,000	,000
	Percentil 75	,000	,000

a. pab+planta = CB

Todos los PT son PC por lo que no se puede establecer una relación estadística entre ellos.

PABELLÓN C, PLANTA 1: C1

En este apartado analizamos los datos de la planta primera del pabellón C. Se incluyeron en el estudio 20 PT y 2 PC. Están ubicadas zonas de quirófanos y consultas de especialidades. Los PC se definieron en una consulta y en un quirófano.

La media de los PT expresada como log del n° de UFC/L fue de 1,949 y la media de los PC de 2,889; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 2,889 (Tabla 26).

TABLA 26. PABELLÓN B, PLANTA 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón C planta primera, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

a		TIPO DE PUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	20	2
	Media	1,949	2,889
	Desviación estándar	2,308	4,086
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	,000	2,889
	Percentil 75	3,960	5,778

a. pab+planta = C1

Si comparamos los datos de la primera planta del pabellón C, observamos que, si comparamos las medias y las medianas, el log del n° UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT,

mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.623 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta primera del pabellón C la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del control de la instalación.

PABELLÓN C, PLANTA 2: C2

En este apartado analizamos los datos de la planta segunda del pabellón C. Se incluyeron en el estudio 56 PT y 6 PC. Están ubicadas 16 habitaciones de hospitalización y despachos. Los PC se definieron en 6 habitaciones de hospitalización.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 1,801 y la media de los PC de 2,085; la mediana de los PT fue de 2,129 y la de los PC fue de 2,452 (Tabla 27).

TABLA 27. PABELLÓN C, PLANTA 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón C planta segunda, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

	TIPO DE PUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L N válido	56	6
INFORMADO Media	1,801	2,085
Desviación estándar	1,874	1,786
Percentil 25	,000	,000
Mediana	2,129	2,452
Percentil 75	3,040	3,079

a. pab+planta = C2

Si comparamos los datos de la segunda planta del pabellón C, observamos que si comparamos las medias y las medianas el log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.701 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta segunda del pabellón C la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Demostrando que el análisis de los PC es representativo del control de la instalación.

PABELLON C, PLANTA 3: C3.

En este apartado analizamos los datos de la planta tercera del pabellón C. Se incluyeron en el estudio 57 PT y 3 PC. Están ubicadas habitaciones de hospitalización.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 3,148 y la media de los PC de 3,937; la mediana de los PT fue de 3,447 y la de los PC fue de 4,431 (Tabla 28).

TABLA 28. PABELLÓN C, PLANTA 3. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón C planta tercera, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

a		TIPO DE PUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log Nº UFC/L INFORMADO N válido	57	3
	Media	3,148	3,937
	Desviación estándar	1,689	1,169
	Percentil 25	2,041	2,602
	Mediana	3,447	4,431
	Percentil 75	4,582	4,778

a. pab+planta = C3

Si comparamos los datos de la tercera planta del pabellón C, observamos que las medias y las medianas del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC que en los PT, no mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.496 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta tercera del pabellón C la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del análisis de todos los puntos terminales.

PABELLON C, PLANTA 4: C4.

En este apartado analizamos los datos de la planta cuarta del pabellón C. Se incluyeron en el estudio 4 PT y 1 PC, correspondientes a zonas quirúrgicas.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,939 y la media de los PC de 4,170; la mediana de los PT fue de 2,794 y la de los PC fue de 4,170 (Tabla 29).

TABLA 29. PABELLÓN C, PLANTA 4. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón C planta cuarta, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

a		TIPO DE PUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L N válido	4	1
	INFORMADO Media	2,939	4,170
	Desviación estándar	,908	.
	Percentil 25	2,331	4,170
	Mediana	2,794	4,170
	Percentil 75	3,547	4,170

a. pab+planta = C4

Si comparamos los datos de la cuarta planta del pabellón C, observamos que las medias y las medianas del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC que en los PT, no mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.400 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta cuarta del pabellón C la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del análisis de todos los puntos terminales.

PABELLÓN QX, PLANTA SÓTANO: QXS

En este apartado analizamos los datos de la planta sótano del pabellón quirúrgico (QX). Se incluyeron en el estudio 48 PT y 3 PC. Están ubicadas aquí los vestuarios y zonas de lavado.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 1,978 y la media de los PC de 2,103; la mediana de los PT fue de 2,675 y la de los PC fue de 2,602 (Tabla 30).

TABLA 30. PABELLON QX, PLANTA SÓTANO. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón QX planta sótano, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L INFORMADO	N válido	48	3
	Media	1,978	2,103
	Desviación estándar	1,613	1,903
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	2,675	2,602
	Percentil 75	3,290	3,708

a. pab+planta = QXS

Si comparamos los datos de la planta sótano del pabellón QX, observamos que si comparamos las medias el log del n° UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT y la mediana de los PT es mayor que la de los PC, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.667 (>0.05) (tabla 31). Por lo que podemos afirmar, que en la planta sótano del pabellón QX la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del control de la instalación.

TABLA 31. Resumen de contrastes de hipótesis de la prueba U de Mann Whitney para las muestras del sótano del pabellón QX.

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de log N° UFC/L INFORMADO es la misma entre las categorías de TIPOPUNTO.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,667 ¹	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

¹Se muestra la significación exacta para esta prueba.

PABELLÓN QX, PLANTA BAJA: QXB

En este apartado analizamos los datos de la planta baja del pabellón QX. Se incluyeron en el estudio 18 PT y 3 PC. Están ubicados los lavaderos, vertederos, control de enfermería y zona quirúrgica.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,536 y la media de los PC de 3,109; la mediana de los PT fue de 2,540 y la de los PC fue de 4,548 (Tabla 32).

TABLA 32. PABELLÓN QX, PLANTA B. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón QX planta baja, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log Nº UFC/L INFORMADO N válido	18	3
	Media	2,536	3,109
	Desviación estándar	1,335	1,249
	Percentil 25	2,000	2,301
	Mediana	2,540	2,477
	Percentil 75	2,954	4,548

a. pab+planta = QXB

Si comparamos los datos de la planta baja del pabellón QX, observamos que, la media del log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, y la mediana es mayor en PT que en PC, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.669 (>0.05) (tabla 33). Por lo que podemos afirmar, que en la planta baja del pabellón QX la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del control de la instalación.

TABLA 33. Resumen de contrastes de hipótesis de la prueba U de Mann Whitney para las muestras de la planta baja del pabellón QX.

Resumen de contrastes de hipótesis				
	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de log Nº UFC/L INFORMADO es la misma entre las categorías de TIPOPUNTO.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,669 ¹	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

¹Se muestra la significación exacta para esta prueba.

PABELLÓN QX, PLANTA 1: QX1

En este apartado analizamos los datos de la planta primera del pabellón quirúrgico. Se incluyeron en el estudio 11 PT y 1 PC. Están ubicadas zonas de consultas de especialidades y aseos. El PC está ubicado en una consulta.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,701 y la media de los PC de 4,468; la mediana de los PT fue de 3,996 y la de los PC fue de 4,468 (tabla 34).

TABLA 34. PABELLÓN QX, PLANTA 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón QX planta primera, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

a	TIPOPUNTO	TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log Nº UFC/L INFORMADO	N válido	11	1
	Media	2,701	4,468
	Desviación estándar	2,334	.
	Percentil 25	,000	4,468
	Mediana	3,996	4,468
	Percentil 75	4,526	4,468

a. pab+planta = QX1

Si comparamos los datos de la primera planta del pabellón QX, observamos que, al comparar las medias y las medianas, el log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.667 (>0.05) (tabla 35). Por lo que podemos afirmar, que en la planta primera del pabellón

quirúrgico la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del control de la instalación.

TABLA 35. Resumen de contrastes de hipótesis de la prueba U de Mann Whitney para las muestras de la primera planta del pabellón QX.

Resumen de contrastes de hipótesis			
Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1 La distribución de log N° UFC/L INFORMADO es la misma entre las categorías de TIPOPUNTO.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,667 ¹	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

¹Se muestra la significación exacta para esta prueba.

PABELLÓN QX, PLANTA 2: QX2

En este apartado analizamos los datos de la planta segunda del pabellón QX. Se incluyeron en el estudio 20 PT y 1 PC. Están ubicados los lavaderos y los vestuarios del personal.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,858 y la media de los PC de 4,754; la mediana de los PT fue de 3,217 y la de los PC fue de 4,754 (Tabla 36).

TABLA 36. PABELLÓN QX, PLANTA 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón quirúrgico planta segunda, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

a	TIPOPUNTO	TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L INFORMADO	N válido	20	1
	Media	2,858	4,754
	Desviación estándar	1,321	.
	Percentil 25	2,874	4,754
	Mediana	3,217	4,754
	Percentil 75	3,447	4,754

a. pab+planta = QX2

Si comparamos los datos de la segunda planta del pabellón QX, observamos que las medias y las medianas del log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.095

(>0.05) (tabla 37). Por lo que podemos afirmar, que en la planta segunda del pabellón QX la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Demostrando que el análisis de los PC es representativo del control de la instalación.

TABLA 37. Resumen de contrastes de hipótesis de la prueba U de Mann Whitney para las muestras de la segunda planta del pabellón QX.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de log N° UFC/L INFORMADO es la misma entre las categorías de TIPOPUNTO.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,095 ¹	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

¹Se muestra la significación exacta para esta prueba.

PABELLON QX PLANTA 4: QX4.

En este apartado analizamos los datos de la planta cuarta del pabellón QX. Se incluyeron en el estudio 2 PT siendo estos considerados como PC, correspondientes a zonas quirúrgicas.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 5,052 y la mediana fue de 4,606 (Tabla 38).

TABLA 38. PABELLÓN QX, PLANTA 4. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón QX planta cuarta, realizando una determinación por cada punto terminal en el mismo período de tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L INFORMADO	N válido	2	2
	Media	5,052	5,052
	Desviación estándar	1,058	1,058
	Percentil 25	4,420	4,420
	Mediana	4,606	4,606
	Percentil 75	5,684	5,684

a. pab+planta = QX4

Todos los PT son PC por lo que no se puede establecer una relación estadística entre ellos.

C. POR PABELLÓN, PLANTA Y UNIDAD

Los tamaños muestrales que se comparan en cada subárea, sobre todo para los puntos críticos, son muy pequeños, por lo que el test de M-W no tiene potencia suficiente para detectar ninguna diferencia significativa. Todos los p-valores son mayores de 0.05. Los datos obtenidos del análisis de este apartado se muestran en el anexo 3.

1.2 ANÁLISIS DEL USO DE PC VS PT DURANTE EL PERÍODO DE ESTUDIO

En este apartado se compararán los recuentos de colonias entre las 2.137 muestras de todos los puntos terminales analizados durante el periodo 2006-2018 y las 1067 determinaciones repetidas durante este período de tiempo correspondientes a los puntos críticos.

A. INSTALACIÓN COMPLETA

Si comparamos la instalación completa, el recuento medio expresado en log del número UFC/L informados es de 2,498 en los PT y de 2,805 en los PC, con una mediana de 3,00 para los PT y de 3,415 en los PC (tabla 39).

TABLA 39. Comparación de los parámetros estadísticos del análisis del log del número de UFC/L de *Legionella spp.* detectados en los puntos críticos y en los puntos terminales a lo largo del tiempo.

				TIPOPUNTO	
				Punto Terminal	Punto Crítico
log	Nº	UFC/L	N válido	2137	1067
INFORMADO					
		Media		2,498	2,805
		Desviación estándar		1,978	1,865
		Percentil 25		,000	,000
		Mediana		3,000	3,415
		Percentil 75		4,188	4,305

El p-valor de la prueba de Mann-Whitney es de 0.000 (<0.05), lo que indica que existen diferencias significativas en el recuento de colonias entre puntos terminales y puntos críticos, siendo mayor el recuento en los puntos críticos.

Tal como se observa en el diagrama de cajas de la figura 29, la amplitud de la caja en los PC es mayor que en los PT y la mediana también es superior en los PC con respecto a los PT, siendo esta diferencia estadísticamente significativa, por lo que podemos afirmar que el análisis de los PC es más eficiente que el análisis de todos los PT de la instalación completa.

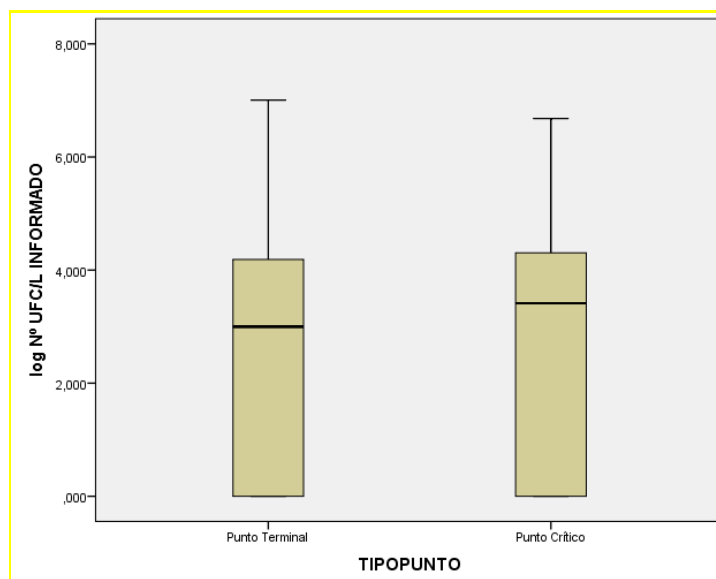


FIGURA 29. Distribución del log del número de UFC/L informados en los puntos críticos y los puntos terminales.

B. POR PABELLONES

PABELLÓN A

En este apartado analizamos los datos del pabellón A en su conjunto, formado por los sectores 1, 2, 3 y 4. Se incluyeron en el estudio 811 determinaciones de PT y 419 determinaciones correspondientes a 33 PC. La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 1,943 y la media de los PC de 2,476; la mediana de los PT fue de 2,000 y la de los PC fue de 3,041 (Tabla 40).

TABLA 40. Comparación de los parámetros estadísticos del análisis del log del número de UFC/L de *Legionella spp.* Detectados en los puntos críticos y en los puntos terminales a lo largo del tiempo en el pabellón A.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	811	419
	Media	1,943	2,476
	Desviación estándar	1,926	1,924
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	2,000	3,041
	Percentil 75	3,732	4,121

a. PABELLON = A

Observamos que el log del n° UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT siendo esta diferencia estadísticamente significativa al analizar el p valor M-W 0.000 (<0.05): en el pabellón A, el recuento de colonias es superior en los PC.

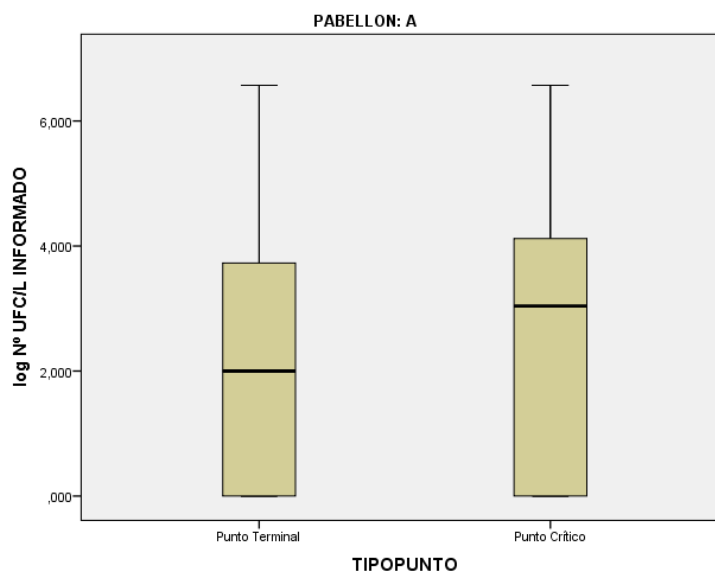


FIGURA 30. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella spp.* En los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el pabellón A, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

Tal como se observa en el diagrama de cajas de la figura 30, la amplitud de la caja en los PC es mayor que en los PT y la mediana también es superior en los PC con respecto a los PT, siendo esta diferencia estadísticamente significativa, por lo que podemos afirmar que el análisis de los PC consigue detectar más *Legionella* spp. que el análisis del total de los puntos de la instalación (PT), lo que podría verse como una mejora en la eficiencia del control de la instalación. Por los que el análisis de los PC sería de mayor utilidad para el control de la instalación (pabellón A) frente al análisis de todos los puntos de la red.

PABELLÓN B

En este apartado analizamos los datos del pabellón B en su conjunto, formado por los sectores 1, 2 y 3. Se incluyeron en el estudio 830 determinaciones de PT y 398 de PC. La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,907 y la media de los PC de 3,038; la mediana de los PT fue de 3,658 y la de los PC fue de 3,681 (Tabla 41).

TABLA 41. PABELLÓN = B. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a	TIPOPUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log Nº UFC/L INFORMADO	830	398
N válido		
Media	2,907	3,038
Desviación estándar	2,060	1,926
Percentil 25	,000	1,602
Mediana	3,658	3,681
Percentil 75	4,597	4,580

a. PABELLON = B

Observamos que el log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa al analizar el p valor M-W = 0.540 (>0.05).

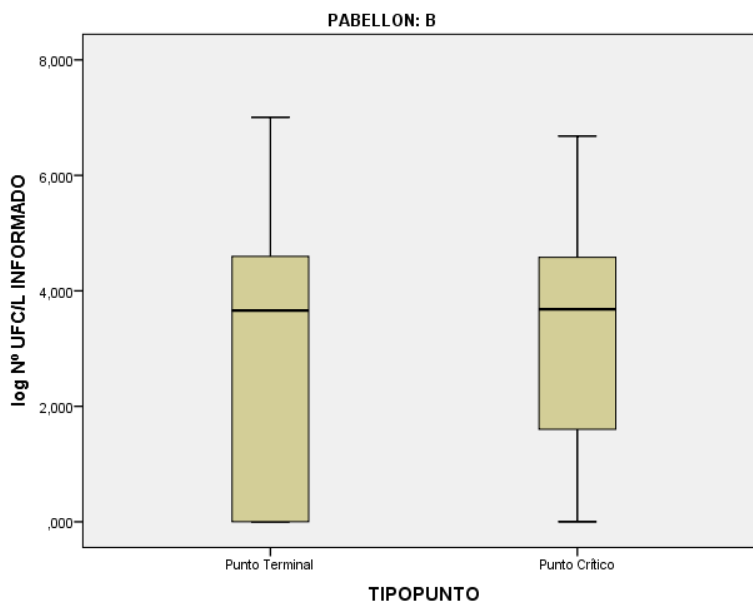


FIGURA 31. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella* spp. En los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el pabellón B, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

Tal como se observa en el diagrama de cajas de la figura 31, la amplitud de la caja en los PC es menor que en los PT y la mediana es similar en los PC con respecto a los PT, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa, por lo que podemos afirmar que en el pabellón B, el análisis de los PC es representativo de la instalación completa.

PABELLÓN C

En este apartado analizamos los datos del pabellón C en su conjunto, formado por los sectores 1 y 2. Se incluyeron en el estudio 352 determinaciones de los PT y 2017 de los PC. La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,849 y la media de los PC de 3,126; la mediana de los PT fue de 3,362 y la de los PC fue de 3,633 (Tabla 42).

TABLA 42. PABELLÓN = C. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón C, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a	TIPOPUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L INFORMADO N válido	352	207
Media	2,849	3,126
Desviación estándar	1,668	1,473
Percentil 25	2,000	2,699
Mediana	3,362	3,633
Percentil 75	4,029	4,104

a. PABELLON = C

Si comparamos los datos del pabellón C, observamos que el log del n° UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa al analizar el p valor M-W = 0.060 (>0.05).

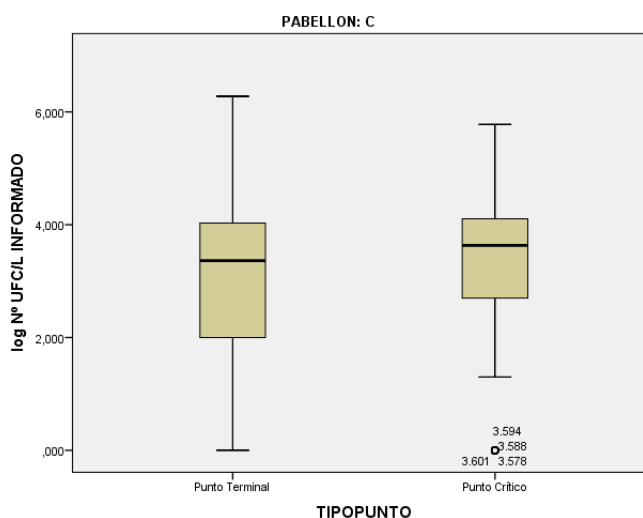


FIGURA 32. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella spp.* En los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el pabellón C, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

Tal como se observa en el diagrama de cajas de la figura 32, la amplitud de la caja en los PC es menor que en los PT siendo la mediana mayor en los PC con respecto a los PT, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa, por lo que podemos afirmar que en el pabellón C, el análisis de los PC es representativo de la instalación completa.

PABELLÓN QUIRÚRGICO

En este apartado analizamos los datos del pabellón quirúrgico (QX) en su conjunto, formado por un único sector. Se incluyeron en el estudio 144 determinaciones de los PT y 43 de los PC. La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,407 y la media de los PC de 2,318; la mediana de los PT fue de 2,778 y la de los PC fue de 2,477 (Tabla 43).

TABLA 43.PABELLON = QUIRÚRGICO. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón QX, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

	TIPOPUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L INFORMADO N válido	144	43
Media	2,407	2,318
Desviación estándar	1,728	1,846
Percentil 25	,000	,000
Mediana	2,778	2,477
Percentil 75	3,531	3,892

a. PABELLON = quirúrgico

Si comparamos los datos del pabellón QX, observamos que el log del nº UFC/L informadas es mayor en los PT que en los PC, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa al analizar el p valor M-W = 0.766 (>0.05).

Tal como se observa en el diagrama de cajas de la figura 33, la amplitud de la caja en los PC es mayor que en los PT, además el rango superior de recuentos es superior en PC que en PT (el percentil 75 es superior en PC que en PT) y la mediana es similar en los PC con respecto a los PT, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa, por lo que podemos afirmar que en el pabellón QX, el análisis de los PC es representativo de la instalación completa.

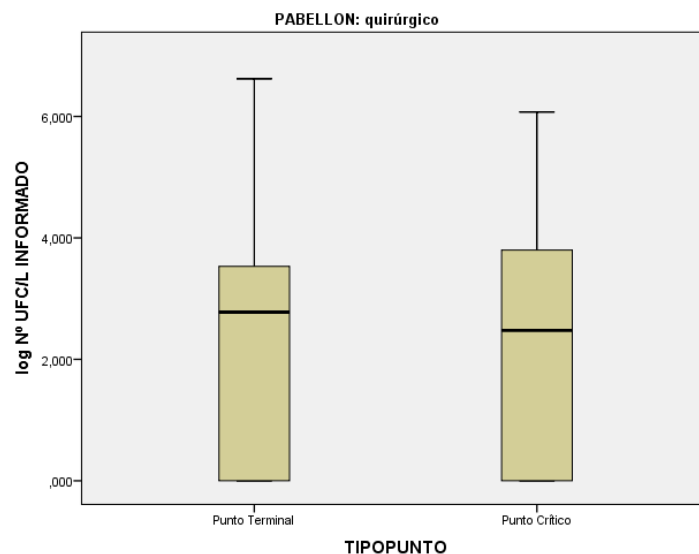


FIGURA 33. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella spp.* En los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el pabellón QX, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

C. POR PABELLÓN Y PLANTA.

PABELLÓN A, PLANTA SÓTANO: AS

En este apartado analizamos los datos de la planta sótano del pabellón A. En esta área de la instalación se ubica vestuarios, lavandería, consultas y despachos. Se incluyeron en el estudio 48 determinaciones de PT y 12 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 0,812 y la media de los PC de 2,412; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 2,540 (Tabla 44).

TABLA 44. PABELLON A, PLANTA S. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A planta sótano, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a	log N° UFC/L INFORMADO	TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	N válido	48	12
	Media	,812	2,412
	Desviación estándar	1,602	2,089
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	,000	2,540
	Percentil 75	,000	4,255

a. pab+planta = AS

Si comparamos los datos del sótano del pabellón A, observamos que el log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, siendo esta diferencia estadísticamente significativa al analizar el p valor M-W = 0.004 (<0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta sótano del pabellón A el análisis de los PC mejora el rendimiento del análisis del total de los PT. Analizando los PC mejoramos la eficacia del control de la instalación en el sótano del pabellón A.

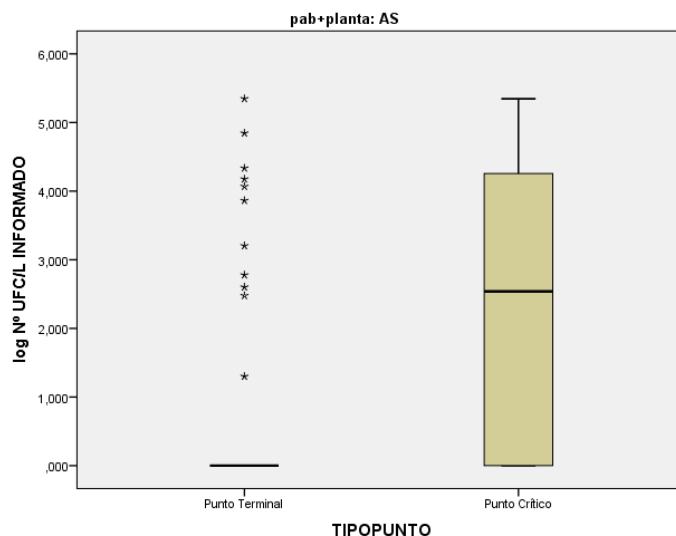


FIGURA 34. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella spp.* En los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el sótano del pabellón A, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

Tal como se observa en el diagrama de cajas de la figura 34, la amplitud de la caja en los PC es mayor que en los PT, y la mediana es mayor en los PC con respecto a los PT, siendo la diferencia estadísticamente significativa, por lo que podemos afirmar que en el sótano del pabellón A, el análisis de los PC mejora el control de la instalación.

PABELLÓN A, PLANTA BAJA: AB

En este apartado analizamos los datos de la planta baja del pabellón A. En esta área de la instalación se ubica urgencias, laboratorio, radiología y quirófanos. Se incluyeron en el estudio 102 determinaciones de PT y 64 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 1,685 y la media de los PC de 2,104; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 0,000 (Tabla 45).

Si comparamos los datos de la planta baja del pabellón A, observamos que la media del log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, siendo la mediana igual. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0.236 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta baja del pabellón A el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 45. PABELLON A, PLANTA BAJA. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A planta baja, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a	TIPOPUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log Nº UFC/L N válido	102	64
INFORMADO Media	1,685	2,104
Desviación estándar	2,186	2,381
Percentil 25	,000	,000
Mediana	,000	,000
Percentil 75	3,881	4,778

a. pab+planta = AB

PABELLÓN A, PLANTA 1: A1

En este apartado analizamos los datos de la planta 1 del pabellón A. En esta área de la instalación se ubican 15 habitaciones de pacientes, consultas externas de especialidades, despachos e instalaciones del laboratorio. Se incluyeron en el estudio 144 determinaciones de los PT y 81 de los PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,547 y la media de los PC de 2,744; la mediana de los PT fue de 3,212 y la de los PC fue de 3,230 (Tabla 46).

Si comparamos los datos de la planta 1 del pabellón A, observamos que el log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa al analizar el p valor M-W = 0.522 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta 1 del pabellón A el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 46. PABELLON A, PLANTA 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A planta 1, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	144	81
	Media	2,547	2,744
	Desviación estándar	1,840	1,748
	Percentil 25	,000	2,000
	Mediana	3,212	3,230
	Percentil 75	3,959	3,978

a. pab+planta = A1

PABELLÓN A, PLANTA 2: A2

En este apartado analizamos los datos de la planta 2 del pabellón A. Se incluyeron en el estudio 310 determinaciones de los PT y 112 de los PC. Están ubicadas aquí 3 unidades de hospitalización de pacientes, quirófanos y varios aseos.

La media de los PT expresada como log del n° de UFC/L fue de 1,454 y la media de los PC de 2,106; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 2,591 (Tabla 47).

TABLA 47. PABELLON A, PLANTA 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A planta 2, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	310	112
	Media	1,454	2,106
	Desviación estándar	1,665	1,687
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	,000	2,591
	Percentil 75	3,041	3,531

a. pab+planta = A2

Si comparamos los datos de la planta 2 del pabellón A, observamos que el log del n° UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, mostrando el p valor de Mann Whitney una

diferencia estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.001 (<0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta 2 del pabellón A la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es mayor que al analizar los PT, lo que podría verse como una mejora en la eficiencia del control de la instalación. Por lo tanto, el análisis de los PC sería de mayor utilidad para el control de la instalación que el análisis de todos los puntos de la red.

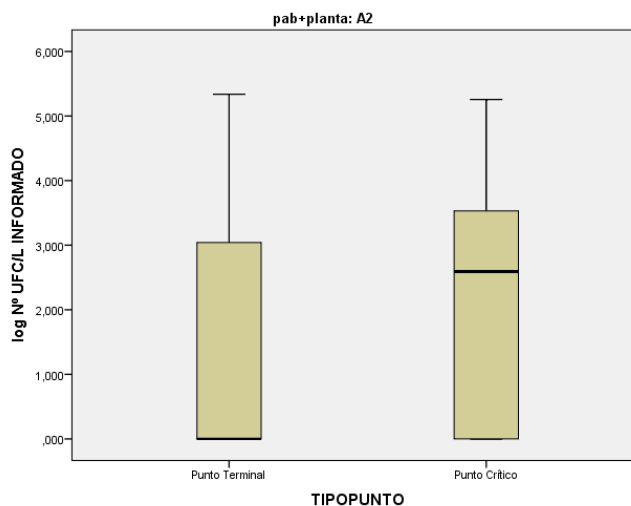


FIGURA 35. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella* spp. En los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el segundo piso del pabellón a, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

Estos resultados, se ven representados en el diagrama de cajas de la figura 35, siendo la amplitud de la caja en los PC mayor que en los PT, el rango superior de recuentos es superior en PC que en y la mediana también es mayor en los PC con respecto a los PT.

PABELLÓN A, PLANTA 3: A3

En este apartado analizamos los datos de la planta 3 del pabellón A. Se incluyeron en el estudio 207 determinaciones de PT y 150 de PC. Están ubicadas aquí 2 unidades de hospitalización de pacientes, laboratorio, un aseo y una consulta.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,644 y la media de los PC de 2,771; la mediana de los PT fue de 3,462 y la de los PC fue de 3,605 (Tabla 48).

Si comparamos los datos de la planta 3 del pabellón A, observamos que el log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.564 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta 3 del pabellón A la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del control de la instalación.

TABLA 48. PABELLON A, PLANTA 3. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A planta 3, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	207	150
	Media	2,644	2,771
	Desviación estándar	1,926	1,902
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	3,462	3,605
	Percentil 75	4,292	4,305

a. pab+planta = A3

PABELLÓN B, PLANTA BAJA: BB

En este apartado analizamos los datos de la planta baja del pabellón B. Se incluyeron en el estudio 44 determinaciones de PT y 36 de PC. Están ubicadas varias consultas de especialidades.

La media de los PT expresada como log del n° de UFC/L fue de 1,785 y la media de los PC de 2,181; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 2,403 (Tabla 49).

TABLA 49. PABELLÓN B, PLANTA B. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B planta baja, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	44	36
	Media	1,785	2,181
	Desviación estándar	2,076	2,099
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	,000	2,403
	Percentil 75	3,565	3,974

a. pab+planta = BB

Si comparamos los datos de la planta baja del pabellón B, observamos que la cantidad de *Legionella* spp. detectada expresada como el log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, siendo las medias y las medianas superiores en los PC, sin embargo, no se muestra una diferencia estadísticamente tal como indica el p valor de Mann Whitney: p valor M-W = 0.390 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta baja del pabellón B la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del control de la instalación.

PABELLÓN B, PLANTA 1: B1

En este apartado analizamos los datos de la planta primera del pabellón B. Se incluyeron en el estudio 279 determinaciones de PT y 105 de PC. Están ubicadas varias consultas de especialidades, 15 habitaciones de hospitalización y aseos.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 3,445 y la media de los PC de 3,393; la mediana de los PT fue de 4,041 y la de los PC fue de 3,934 (Tabla 50).

Si comparamos los datos de la primera planta del pabellón B, observamos que las mediana del log del nº UFC/L informadas es mayor en los PT que en los PC, y la media de los PC es mayor que la de los PT, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.626 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta primera del pabellón B la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del control de la instalación.

TABLA 50. PABELLÓN B, PLANTA 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B planta primera, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a	TIPOPUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log Nº UFC/L INFORMADO N válido	279	105
Media	3,445	3,393
Desviación estándar	1,828	1,774
Percentil 25	2,477	2,398
Mediana	4,041	3,934
Percentil 75	4,778	4,663

a. pab+planta = B1

PABELLÓN B, PLANTA 2: B2

En este apartado analizamos los datos de la planta primera del pabellón B. Se incluyeron en el estudio 130 determinaciones de PT y 63 de PC. Están ubicadas habitaciones de hospitalización y un quirófano.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,394 y la media de los PC de 1,896; la mediana de los PT fue de 2,874 y la de los PC fue de 2,000 (Tabla 51).

Si comparamos los datos de la segunda planta del pabellón B, observamos que las medias y las medianas el log del nº UFC/L informadas es mayor en los PT que en los PC, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.112 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta segunda del pabellón B la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del control de la instalación.

TABLA 51. PABELLÓN B, PLANTA 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B planta segunda, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	130	63
	Media	2,394	1,896
	Desviación estándar	2,062	1,799
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	2,874	2,000
	Percentil 75	4,000	3,587

a. pab+planta = B2

PABELLON B, PLANTA 3: B3

En este apartado analizamos los datos de la planta primera del pabellón B. Se incluyeron en el estudio 344 determinaciones de PT y 194 de PC. Están ubicadas 24 habitaciones de hospitalización y varios quirófanos.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,913 y la media de los PC de 3,375; la mediana de los PT fue de 3,785 y la de los PC fue de 4,039 (Tabla 52).

TABLA 52. PABELLÓN B, PLANTA 3. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B planta tercera, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	344	194
	Media	2,913	3,375
	Desviación estándar	2,105	1,830
	Percentil 25	,000	2,699
	Mediana	3,785	4,039
	Percentil 75	4,669	4,675

a. pab+planta = B3

Si comparamos los datos de la tercera planta del pabellón B, observamos que las medias y las medianas del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC que en los PT, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.051 (>0.05). Este valor está muy cercano a 0.05, de hecho, en el estudio de una sola determinación por punto, si se detecta una diferencia estadísticamente significativa (p=0.023).

Podemos afirmar, que en la planta tercera del pabellón B la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es representativa del control de la instalación.

PABELLÓN C, PLANTA SÓTANO: CS

En este apartado analizamos los datos de la planta sótano del pabellón C. Se incluyeron en el estudio 22 determinaciones de un único PT que estableció como PC. Están ubicadas aquí consultas externas de pacientes.

La cantidad de *Legionella* spp. detectada en este punto en la primera determinación expresada como el log del nº de UFC/L fue de 2,891 (Tabla 53).

Todos los PT son PC por lo que no se puede establecer una relación estadística entre ellos.

TABLA 53. PABELLON C, PLANTA SÓTANO. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A planta 3, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	22	22
	Media	2,891	2,891
	Desviación estándar	1,193	1,193
	Percentil 25	2,477	2,477
	Mediana	3,203	3,203
	Percentil 75	3,813	3,813

a. pab+planta = CS

PABELLÓN C, PLANTA BAJA: CB

En este apartado analizamos los datos de la planta baja del pabellón C. Se incluyeron en el estudio 39 determinaciones correspondientes a 2 PT que se seleccionaron como PC. Están ubicadas una consulta de especialidades y un aseo.

La media de los PT y PC expresada como log del n° de UFC/L fue de 3,429; la mediana de los PT y PC fue de 3,982 (Tabla 54).

Todos los PT son PC por lo que no se puede establecer una relación estadística entre ellos.

TABLA 54. PABELLÓN C, PLANTA B. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B planta baja, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	39	39
	Media	3,429	3,429
	Desviación estándar	1,368	1,368
	Percentil 25	2,954	2,954
	Mediana	3,982	3,982
	Percentil 75	4,236	4,236

a. pab+planta = CB

PABELLÓN C, PLANTA 1: C1

En este apartado analizamos los datos de la planta primera del pabellón C. Se incluyeron en el estudio 54 determinaciones en los PT y 36 en los PC. Están ubicadas zonas de quirófanos y consultas de especialidades. Los PC se definieron en una consulta y en un quirófano.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,238 y la media de los PC de 2,435; la mediana de los PT fue de 2,889 y la de los PC fue de 3,452 (Tabla 55).

Si comparamos los datos de la primera planta del pabellón C, observamos que, las medias y las medianas informadas como el log del nº UFC/L son mayores en los PC que en los PT, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.700 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta primera del pabellón C la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del control de la instalación.

TABLA 55. PABELLÓN B, PLANTA 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón C planta primera, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a	TIPOPUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log Nº UFC/L INFORMADO	54	36
N válido		
Media	2,238	2,435
Desviación estándar	2,104	2,055
Percentil 25	,000	,000
Mediana	2,889	3,452
Percentil 75	4,033	4,037

a. pab+planta = C1

PABELLÓN C, PLANTA 2: C2

En este apartado analizamos los datos de la planta segunda del pabellón C. Se incluyeron en el estudio 112 determinaciones en los PT y 51 en PC. Están ubicadas 16 habitaciones de hospitalización y despachos.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,617 y la media de los PC de 3,300; la mediana de los PT fue de 3,040 y la de los PC fue de 3,663 (Tabla 56).

TABLA 56. PABELLÓN C, PLANTA 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón C planta segunda, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log Nº UFC/L INFORMADO N válido	112	51
	Media	2,617	3,300
	Desviación estándar	1,758	1,407
	Percentil 25	,000	2,778
	Mediana	3,040	3,663
	Percentil 75	3,919	4,316

a. pab+planta = C2

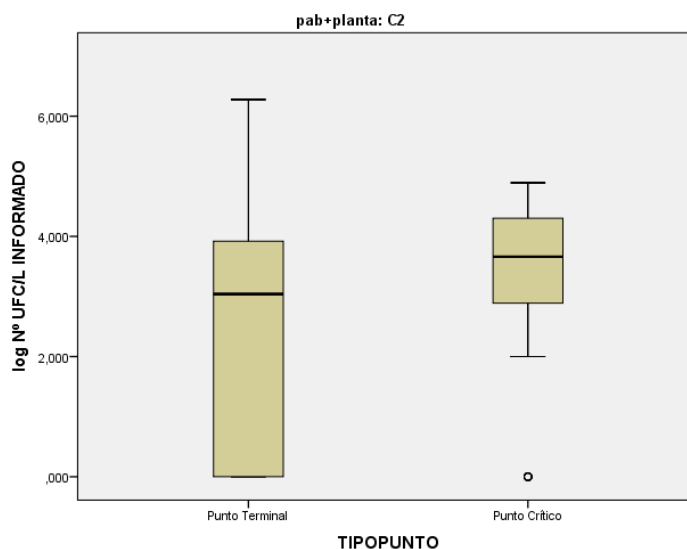


FIGURA 36. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella* spp. En los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el segundo piso del pabellón C, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

Si comparamos los datos de la segunda planta del pabellón C, observamos que las medias y las medianas expresadas como el log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC que en los PT, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.013 (<0.05). Podemos afirmar, que en la planta 2 del pabellón C la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es mayor que al analizar los PT, indicativo de una

mejora en la eficiencia del control de la instalación. Por lo tanto, el análisis de los PC sería de mayor utilidad para el control de la instalación que el análisis de todos los puntos de la red.

Estos resultados, se ven representados en el diagrama de cajas de la figura 36, siendo la amplitud de la caja en los PC menor que en los PT debido a que el rango inferior es menor en los PT (log nº UFC/L percentil 25= 0,000), aunque el rango superior de recuentos y la mediana son mayores en los PC con respecto a los PT.

PABELLON C, PLANTA 3: C3.

En este apartado analizamos los datos de la planta tercera del pabellón C. Se incluyeron en el estudio 100 determinaciones de PT y 38 de PC. Están ubicadas habitaciones de hospitalización.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 3,032 y la media de los PC de 3,019; la mediana de los PT fue de 3,301 y la de los PC fue de 3,278 (Tabla 57).

Si comparamos los datos de la tercera planta del pabellón C, observamos que las medias y las medianas del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC que en los PT, no mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.798 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta tercera del pabellón C la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del análisis de todos los puntos terminales.

TABLA 57. PABELLÓN C, PLANTA 3. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón C planta tercera, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	100	38
	Media	3,032	3,019
	Desviación estándar	1,509	1,237
	Percentil 25	2,477	2,602
	Mediana	3,301	3,278
	Percentil 75	4,077	3,724

a. pab+planta = C3

PABELLON C, PLANTA 4: C4.

En este apartado analizamos los datos de la planta cuarta del pabellón C. Se incluyeron en el estudio 25 determinaciones de PT y 21 de PC, correspondientes a zonas quirúrgicas.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 3,530 y la media de los PC de 3,765; la mediana de los PT fue de 3,716 y la de los PC fue de 3,869 (Tabla 58).

Si comparamos los datos de la cuarta planta del pabellón C, observamos que las medias y las medianas del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC que en los PT, no mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.420 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta cuarta del pabellón C la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del análisis de todos los puntos terminales.

TABLA 58. PABELLÓN C, PLANTA 4. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón C planta cuarta, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log Nº UFC/L INFORMADO N válido	25	21
	Media	3,530	3,765
	Desviación estándar	,875	,709
	Percentil 25	2,845	3,613
	Mediana	3,716	3,869
	Percentil 75	4,134	4,170

a. **pab+planta = C4**

PABELLÓN QX, PLANTA SÓTANO: QXS

En este apartado analizamos los datos de la planta sótano del pabellón quirúrgico (QX). Se incluyeron en el estudio 60 determinaciones de PT y 15 de PC. Están ubicadas aquí los vestuarios y zonas de lavado.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,070 y la media de los PC de 2,369; la mediana de los PT fue de 2,699 y la de los PC fue de 2,699 (Tabla 59).

TABLA 59. PABELLON QX, PLANTA SÓTANO. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón QX planta sótano, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	60	15
	Media	2,070	2,369
	Desviación estándar	1,690	1,924
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	2,699	2,699
	Percentil 75	3,404	4,310

a. pab+planta = QXS

El análisis de los datos de la planta sótano del pabellón QX, muestra que si comparamos las medias el log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT y la mediana de los PT es igual a la de los PC, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.533 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta sótano del pabellón QX la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del control de la instalación.

PABELLÓN QX, PLANTA BAJA: QXB

En este apartado analizamos los datos de la planta baja del pabellón QX. Se incluyeron en el estudio 30 determinaciones de PT y 15 de PC. Están ubicados los lavaderos, vertederos, control de enfermería y zona quirúrgica.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,452 y la media de los PC de 2,483; la mediana de los PT fue de 2,540 y la de los PC fue de 2,477 (Tabla 60).

TABLA 60. PABELLÓN QX, PLANTA B. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón QX planta baja, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	30	15
	Media	2,452	2,483
	Desviación estándar	1,730	2,084
	Percentil 25	2,000	,000
	Mediana	2,540	2,477
	Percentil 75	3,447	4,464

a. pab+planta = QXB

Si comparamos los datos de planta baja del pabellón QX, observamos que, la media expresada como el log del n° UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, y la mediana es mayor en PT que en PC, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.846 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta baja del pabellón QX la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del control de la instalación.

PABELLÓN QX, PLANTA 1: QX1

En este apartado analizamos los datos de la planta primera del pabellón quirúrgico. Se incluyeron en el estudio 17 determinaciones de PT y 7 de PC. Están ubicadas zonas de consultas de especialidades y aseos. El PC está ubicado en una consulta.

La media de los PT expresada como log del n° de UFC/L fue de 2,329 y la media de los PC de 2,051; la mediana de los PT fue de 2,602 y la de los PC fue de 2,602 (Tabla 61).

TABLA 61. PABELLÓN QX, PLANTA 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón QX planta primera, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	17	7
	Media	2,329	2,051
	Desviación estándar	2,075	1,679
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	2,602	2,602
	Percentil 75	4,274	3,079

a. pab+planta = QX1

Si comparamos los datos de la primera planta del pabellón QX, observamos que, al comparar las medias, el log del nº UFC/L informadas es mayor en los PT que en los PC, y las medianas son iguales, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.757 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta primera del pabellón quirúrgico la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Por lo tanto, el análisis de los PC sería representativo del control de la instalación.

PABELLÓN QX, PLANTA 2: QX2

En este apartado analizamos los datos de la planta segunda del pabellón QX. Se incluyeron en el estudio 29 determinaciones de PT y 6 de PC. Están ubicados los lavaderos y los vestuarios del personal.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,775 y la media de los PC de 2,089; la mediana de los PT fue de 3,114 y la de los PC fue de 2,000 (Tabla 62).

Si comparamos los datos de la segunda planta del pabellón QX, observamos que las medias y las medianas del log del nº UFC/L informadas es mayor en los PT que en los PC, mostrando el p valor de Mann Whitney una diferencia no estadísticamente significativa: p valor M-W = 0.146 (>0.05). Podemos afirmar, que en la planta segunda del pabellón QX la cantidad de *Legionella* spp. detectada al analizar los PC es igual que al analizar los PT. Demostrando que el análisis de los PC es representativo del control de la instalación.

TABLA 62. PABELLÓN QX, PLANTA 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón quirúrgico planta segunda, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	29	6
	Media	2,775	2,089
	Desviación estándar	1,369	1,566
	Percentil 25	2,477	1,301
	Mediana	3,114	2,000
	Percentil 75	3,462	2,477

a. pab+planta = QX2

PABELLON QX, PLANTA 4: QX4.

En este apartado analizamos los datos de la planta cuarta del pabellón QX. Se incluyeron en el estudio 7 determinaciones de PT perteneciendo todos a PC, correspondientes a zonas quirúrgicas.

La media expresada como log del n° de UFC/L fue de 4,119 y la mediana fue de 4,375 (Tabla 63). Todos los PT son PC por lo que no se puede establecer una relación estadística entre ellos.

TABLA 63. Pabellón qx, planta 4. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón QX planta cuarta, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L INFORMADO N válido	7	7
	Media	4,119	4,119
	Desviación estándar	1,471	1,471
	Percentil 25	2,892	2,892
	Mediana	4,375	4,375
	Percentil 75	4,746	4,746

a. pab+planta = QX4

C. POR PABELLÓN, PLANTA Y UNIDAD

PABELLÓN A, PLANTA SÓTANO: AS

El sótano del pabellón A está considerado como una unidad completa, por lo que los resultados son iguales a los desarrollados en el apartado 2.2.

PABELLÓN A, PLANTA BAJA, UNIDAD 2: AB2

En este apartado analizamos los datos de la planta baja del pabellón A, unidad 2: AB2. Se incluyeron en el estudio 52 determinaciones de PT y 48 de PC. La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 1,381 y la media de los PC de 1,346; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 0,000 (Tabla 64).

Si comparamos los datos de la planta baja del pabellón A, observamos que la media del log del nº UFC/L informadas es menor en los PC que en los PT, siendo la mediana igual. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0.917 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta baja del pabellón A el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 64. PABELLON A, PLANTA BAJA, UNIDAD 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A, planta baja, unidad 2, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L	N válido	52	48
INFORMAD	Media	1,381	1,346
O	Desviación estándar	2,057	2,072
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	,000	,000
	Percentil 75	2,802	2,239

a. UNIDAD = AB

PABELLÓN A, PLANTA BAJA, UNIDAD 3: AB3

En este apartado analizamos los datos de la planta baja del pabellón A, unidad 3: AB3. Se incluyeron en el estudio 30 determinaciones de PT y 16 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,699 y la media de los PC de 4,376; la mediana de los PT fue de 3,934 y la de los PC fue de 4,839 (Tabla 65).

Si comparamos los datos de la unidad 3 de planta baja del pabellón A, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT. Al analizar el p valor de M-W se detectó que la diferencia es estadísticamente significativa p valor M-W = 0.026 (<0.05). Por lo que podemos afirmar, que en unidad 3 de planta baja del pabellón A el análisis de los PC mejora el rendimiento del análisis del total de los PT. Analizando los PC mejoramos la eficacia del control de la instalación en el sótano del pabellón A.

TABLA 65. PABELLON A, PLANTA BAJA, UNIDAD 3. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A, planta baja, unidad 3, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
a	log N° UFC/L N válido	30	16
	INFORMAD		
	Media	2,699	4,376
	Desviación estándar	2,447	1,738
	Percentil 25	,000	4,637
	Mediana	3,934	4,839
	Percentil 75	4,845	5,257

a. UNIDAD = AB3

PABELLÓN A, PLANTA 1, UNIDAD 1: A11

En este apartado analizamos los datos de la primera planta del pabellón A, unidad 1: A11. Se incluyeron en el estudio 21 determinaciones de PT y 19 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,864 y la media de los PC de 2,944; la mediana de los PT fue de 3,886 y la de los PC fue de 3,886 (Tabla 66).

Si comparamos los datos de la unidad 1 de la primera planta del pabellón A, observamos que la media del log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, siendo la mediana igual. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0.957 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta baja del pabellón A el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 66. PABELLON A, PLANTA 1, UNIDAD 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A, planta primera, unidad 1, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L	N válido	21	19
INFORMAD	Media	2,864	2,944
O	Desviación estándar	1,894	1,850
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	3,886	3,886
	Percentil 75	4,210	4,281

a. UNIDAD = A11

PABELLÓN A, PLANTA 1, UNIDAD 2: A12

En este apartado analizamos los datos de la primera planta del pabellón A, unidad 2: A12. Se incluyeron en el estudio 2 determinaciones de PT y 1 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 3,662 y la media de los PC de 3,204; la mediana de los PT fue de 3,662 y la de los PC fue de 3,204 (Tabla 67).

Si comparamos los datos de la unidad 2 de la primera planta del pabellón A, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas es mayor en los PT que en los PC. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0.667 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta baja del pabellón A el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 67. PABELLON A, PLANTA 1, UNIDAD 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A, planta primera, unidad 2, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

	TIPO PUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log Nº N válido	2	1
UFC/L Media	3,662	3,204
INFORMA DO Desviación estándar	,648	.
Percentil 25	3,204	3,204
Mediana	3,662	3,204
Percentil 75	4,121	3,204

a. UNIDAD = A12

PABELLÓN A, PLANTA 1, UNIDAD 3: A13

En este apartado analizamos los datos de la primera planta del pabellón A, unidad 3: A13. Se incluyeron en el estudio 118 determinaciones de PT y 58 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,477 y la media de los PC de 2,692; la mediana de los PT fue de 3,041 y la de los PC fue de 3,078 (Tabla 68).

Si comparamos los datos de la unidad 3 de la primera planta del pabellón A, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0.596 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en la planta baja del pabellón A el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 68. PABELLON A, PLANTA 1, UNIDAD 3. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A, planta primera, unidad 3, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log Nº UFC/L	N válido	118	58
INFORMAD	Media	2,477	2,692
O	Desviación estándar	1,845	1,742
	Percentil 25	,000	2,000
	Mediana	3,041	3,078
	Percentil 75	3,813	3,820

a. UNIDAD = A13

PABELLÓN A, PLANTA 1, UNIDAD 4: A14

En este apartado analizamos los datos de la primera planta del pabellón A, unidad 4: A14. Se incluyeron en el estudio 3 determinaciones de PT que se correspondían con PC.

La media de los PT (=PC) expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,337 y la mediana fue de 3,255 (Tabla 69).

Todos los PT son PC por lo que no se puede establecer una relación estadística entre ellos.

TABLA 69. PABELLON A, PLANTA 1, UNIDAD 4. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A, planta primera, unidad 4, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log	Nº N válido	3	3
UFC/L	Media	2,337	2,337
INFORMA	Desviación		
DO	n	2,039	2,039
	estándar		
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	3,255	3,255
	Percentil 75	3,756	3,756

a. UNIDAD = A14

PABELLÓN A, PLANTA 2, UNIDAD 1: A21

En este apartado analizamos los datos de la segunda planta del pabellón A, unidad 1: A21. Se incluyeron en el estudio 26 determinaciones de PT y 16 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,538 y la media de los PC de 3,386; la mediana de los PT fue de 3,021 y la de los PC fue de 3,286 (Tabla 70).

Si comparamos los datos de la unidad 1 de la segunda planta del pabellón A, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0.105 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector A21 el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 70. PABELLON A, PLANTA 2, UNIDAD 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A, planta segunda, unidad 1, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L	N válido	26	16
INFORMAD	Media	2,538	3,386
O	Desviación estándar	1,533	,639
	Percentil 25	2,000	3,021
	Mediana	3,021	3,286
	Percentil 75	3,568	3,807

a. UNIDAD = A21

PABELLÓN A, PLANTA 2, UNIDAD 2: A22

En este apartado analizamos los datos de la segunda planta del pabellón A, unidad 2: A22. Se incluyeron en el estudio 200 determinaciones de PT y 46 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 1,325 y la media de los PC de 2,263; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 2,739 (Tabla 71).

Si comparamos los datos de la unidad 2 de la segunda planta del pabellón A, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT. Al analizar el p valor de M-W se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0.001 (<0.05). Por lo tanto, podemos afirmar, que en la unidad 2 de la segunda planta del pabellón A el análisis de los PC mejora el rendimiento del análisis del total de los PT. Analizando los PC mejoramos la eficacia del control de la instalación en el A22.

TABLA 71. PABELLON A, PLANTA 2, UNIDAD 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A, planta segunda, unidad 2, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log	Nº N válido	200	46
UFC/L	Media	1,325	2,263
INFORMA	Desviación estándar	1,638	1,808
DO	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	,000	2,739
	Percentil 75	2,874	3,781

a. UNIDAD = A22

Tal como se observa en el diagrama de cajas de la figura 37, la amplitud de la caja en los PC es mayor que en los PT, y la mediana es mayor en los PC con respecto a los PT, siendo la diferencia estadísticamente significativa, por lo que podemos afirmar que en el sector A22, el análisis de los PC mejora el control de la instalación.

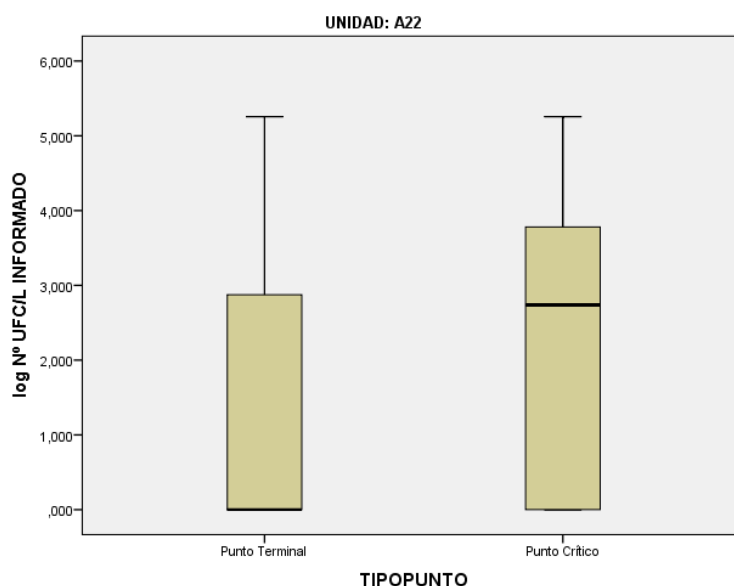


FIGURA 37. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella* spp. En los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el sector A22, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

PABELLÓN A, PLANTA 2, UNIDAD 3: A23

En este apartado analizamos los datos de la segunda planta del pabellón A, unidad 3: A23. Se incluyeron en el estudio 43 determinaciones de PT y 31 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 1,318 y la media de los PC de 1,208; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 0,000 (Tabla 72).

Si comparamos los datos de la unidad 3 de la segunda planta del pabellón A, observamos que la media del log del nº UFC/L informadas es mayor en los PT que en los PC y las medianas son iguales. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0.807 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector A23 el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 72. PABELLON A, PLANTA 2, UNIDAD 3. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A, planta segunda, unidad 3, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log Nº UFC/L	N válido	43	31
INFORMAD	Media	1,318	1,208
O	Desviación estándar	1,676	1,534
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	,000	,000
	Percentil 75	3,000	2,602

a. UNIDAD = A23

PABELLÓN A, PLANTA 2, UNIDAD 4: A24

En este apartado analizamos los datos de la segunda planta del pabellón A, unidad 4: A24. Se incluyeron en el estudio 41 determinaciones de PT y 19 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 1,538 y la media de los PC de 2,112; la mediana de los PT fue de 1,301 y la de los PC fue de 2,301 (Tabla 73).

TABLA 73. PABELLON A, PLANTA 2, UNIDAD 4. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A, planta segunda, unidad 4, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log	Nº N válido	41	19
UFC/L	Media	1,538	2,112
INFORMA	Desviación estándar	1,662	1,488
DO	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	1,301	2,301
	Percentil 75	2,716	2,845

a. UNIDAD = A24

Si comparamos los datos de la unidad 3 de la segunda planta del pabellón A, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC que en los PT. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0.224 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector A24 el análisis de los PC es representativo de los PT.

PABELLÓN A, PLANTA 3, UNIDAD 1: A31

En este apartado analizamos los datos de la tercera planta del pabellón A, unidad 1: A31. Se incluyeron en el estudio 25 determinaciones de PT y 22 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 4,289 y la media de los PC de 4,409; la mediana de los PT fue de 4,306 y la de los PC fue de 4,405 (Tabla 74).

TABLA 74. PABELLON A, PLANTA 3, UNIDAD 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A, planta tercera, unidad 1, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L	N válido	25	22
INFORMAD	Media	4,289	4,409
O	Desviación estándar	,624	,535
	Percentil 25	4,013	4,121
	Mediana	4,346	4,405
	Percentil 75	4,630	4,679

a. UNIDAD = A31

Si comparamos los datos de la unidad 1 de la tercera planta del pabellón A, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC que en los PT. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0.550 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector A31 el análisis de los PC es representativo de los PT.

PABELLÓN A, PLANTA 3, UNIDAD 2: A32

En este apartado analizamos los datos de la tercera planta del pabellón A, unidad 2: A32. Se incluyeron en el estudio 89 determinaciones de PT y 47 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,869 y la media de los PC de 3,204; la mediana de los PT fue de 3,740 y la de los PC fue de 3,892 (Tabla 75).

Si comparamos los datos de la unidad 2 de la tercera planta del pabellón A, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC que en los PT. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W =

0.387 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector A32 el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 75. PABELLON A, PLANTA 3, UNIDAD 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A, planta tercera, unidad 2, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

	TIPOPUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° N válido	89	47
UFC/L Media	2,869	3,204
INFORMA Desviación estándar	1,930	1,816
DO Percentil 25	,000	2,845
Mediana	3,740	3,892
Percentil 75	4,436	4,509

a. UNIDAD = A32

PABELLÓN A, PLANTA 3, UNIDAD 3: A33

En este apartado analizamos los datos de la tercera planta del pabellón A, unidad 3: A33. Se incluyeron en el estudio 65 determinaciones de PT y 53 de PC. La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,314 y la media de los PC de 2,523; la mediana de los PT fue de 2,903 y la de los PC fue de 3,215 (Tabla 76).

Si comparamos los datos de la unidad 3 de la tercera planta del pabellón A, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC que en los PT. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0.536 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector A33 el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 76. PABELLON A, PLANTA 3, UNIDAD 3. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A, planta tercera, unidad 3, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log Nº UFC/L	N válido	65	53
INFORMADO	Media	2,314	2,523
	Desviación estándar	1,795	1,744
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	2,903	3,215
	Percentil 75	3,892	3,968

a. UNIDAD = A33

PABELLÓN A, PLANTA 3, UNIDAD 4: A34

En este apartado analizamos los datos de la tercera planta del pabellón A, unidad 4: A34. Se incluyeron en el estudio 28 determinaciones de PT y 28 de PC.

Todos los PT son PC. La media de los PT (y de los PC) expresada como log del nº de UFC/L fue de 1,225; la mediana de los PT (y de los PC) fue de 0,0 (Tabla 77). Todos los PT son PC por lo que no se puede establecer una relación estadística entre ellos.

TABLA 77. PABELLON A, PLANTA 3, UNIDAD 4. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón A, planta tercera, unidad 4, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a	TIPOPUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° N válido	28	28
UFC/L Media	1,225	1,225
INFORMA Desviación estándar	1,774	1,774
DO Percentil 25	,000	,000
Mediana	,000	,000
Percentil 75	3,400	3,400

a. UNIDAD = A34

PABELLÓN B, PLANTA B, UNIDAD 1: BB1

En este apartado analizamos los datos de la planta baja del pabellón B, unidad 1: BB1. Se incluyeron en el estudio 3 determinaciones de PT y 1 de PC. La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 0,667 y la media de los PC de 2,000; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 2,000 (Tabla 78).

TABLA 78. PABELLON B, PLANTA B, UNIDAD 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, planta baja, unidad 1, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a	TIPOPUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L N válido	3	1
INFORMADO Media	,667	2,000
Desviación estándar	1,155	.
Percentil 25	,000	2,000
Mediana	,000	2,000
Percentil 75	2,000	2,000

a. UNIDAD = BB1

Si comparamos los datos de la unidad 1 de la planta baja del pabellón B, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC que en los PT. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0.500 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector BB1 el análisis de los PC es representativo de los PT.

PABELLÓN B, PLANTA B, UNIDAD 2: BB2

En este apartado analizamos los datos de la planta baja del pabellón B, unidad 2: BB2. Se incluyeron en el estudio 38 determinaciones de PT y 33 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 1,888 y la media de los PC de 2,174; la mediana de los PT fue de 0,651 y la de los PC fue de 2,602 (Tabla 79).

Si comparamos los datos de la unidad 2 de la planta baja del pabellón B, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC que en los PT. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0.564 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector BB2 el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 79. PABELLON B, PLANTA B, UNIDAD 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, planta baja, unidad 2, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPO PUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log	Nº N válido	38	33
UFC/L	Media	1,888	2,174
INFORMA	Desviación estándar	2,100	2,112
DO	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	,651	2,602
	Percentil 75	3,716	3,940

a. UNIDAD = BB

PABELLÓN B, PLANTA B, UNIDAD 3: BB3

En este apartado analizamos los datos de la planta baja del pabellón B, unidad 3: BB3. Se incluyeron en el estudio 2 determinaciones de PT y 1 de PC.

TABLA 80. PABELLON B, PLANTA B, UNIDAD 3. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, planta baja, unidad 3, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

			TIPOPUNTO	
			Punto Termin al	Punto Crític o
log	Nº N válido	2	1	
UFC/L	Media	2,389	4,778	
INFORMA DO	Desviación estándar	3,379	.	
	Percentil 25	,000	4,778	
	Mediana	2,389	4,778	
	Percentil 75	4,778	4,778	

a. UNIDAD = BB3

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,389 y la media de los PC de 4,778; la mediana de los PT fue de 2,389 y la de los PC fue de 4,778 (Tabla 80).

Si comparamos los datos de la unidad 3 de la planta baja del pabellón B, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC que en los PT. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 1.000 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector BB3 el análisis de los PC es representativo de los PT.

PABELLÓN B, PLANTA B, UNIDAD 4: BB4

En este apartado analizamos los datos de la planta baja del pabellón B, unidad 4: BB4. Se incluyeron en el estudio 1 determinaciones de PT y 1 de PC.

La media de los PT (y del PC) expresada como log del nº de UFC/L fue de 0,000 y la mediana de los PT (y del PC) fue de 0,000 (Tabla 81).

TABLA 81. PABELLON B, PLANTA B, UNIDAD 4. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, planta baja, unidad 4, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
a	log N° UFC/L N válido	1	1
INFORMAD	Media	,000	,000
O	Desviación estándar	.	.
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	,000	,000
	Percentil 75	,000	,000

a. UNIDAD = BB4

Solo hay una determinación en este sector de un PT que también es PC, por lo que por lo que no se puede establecer una relación estadística entre ellos.

PABELLÓN B, PLANTA 1, UNIDAD 1: B11

En este apartado analizamos los datos de la primera planta del pabellón B, unidad 1: B11. Se incluyeron en el estudio 24 determinaciones de PT y 23 de PC. La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,837 y la media de los PC de 2,853; la mediana de los PT fue de 3,468 y la de los PC fue de 3,505 (Tabla 82).

TABLA 82. PABELLON B, PLANTA 1, UNIDAD 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, planta primera, unidad 1, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

	TIPOPUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° N válido	24	23
UFC/L Media	2,837	2,853
INFORMA Desviación estándar	1,909	1,950
DO Percentil 25	,889	,000
Mediana	3,468	3,505
Percentil 75	4,447	4,481

a. UNIDAD = B11

Si comparamos los datos de la unidad 1 de la primera planta del pabellón B, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC que en los PT. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0,957 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector B11 el análisis de los PC es representativo de los PT.

PABELLÓN B, PLANTA 1, UNIDAD 2: B12

En este apartado analizamos los datos de la primera planta del pabellón B, unidad 2: B12. Se incluyeron en el estudio 134 determinaciones de PT y 37 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 4,316 y la media de los PC de 4,264; la mediana de los PT fue de 4,428 y la de los PC fue de 4,491 (Tabla 83).

Si comparamos los datos de la unidad 2 de la primera planta del pabellón B, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son muy parecidas en los PC que en los PT. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0,933 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector B12 el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 83. PABELLON B, PLANTA 1, UNIDAD 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, planta primera, unidad 2, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

	TIPOPUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L N válido	134	37
INFORMAD	4,316	4,264
O Media		
Desviación estándar	1,060	1,207
Percentil 25	3,820	3,839
Mediana	4,428	4,491
Percentil 75	5,114	4,929

a. UNIDAD = B12

PABELLÓN B, PLANTA 1, UNIDAD 3: B13

En este apartado analizamos los datos de la primera planta del pabellón B, unidad 3: B13. Se incluyeron en el estudio 77 determinaciones de PT y 25 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,867 y la media de los PC de 2,664; la mediana de los PT fue de 3,114 y la de los PC fue de 3,086 (Tabla 84).

Si comparamos los datos de la unidad 3 de la primera planta del pabellón B, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PT que en los PC. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0,642 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector B13 el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 84. PABELLON B, PLANTA 1, UNIDAD 3. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, planta primera, unidad 3, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a	TIPOPUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° N válido	77	25
UFC/L Media	2,867	2,664
INFORMA Desviación estándar	2,053	2,065
DO Percentil 25	,000	,000
Mediana	3,114	3,086
Percentil 75	4,602	4,364

a. UNIDAD = B13

PABELLÓN B, PLANTA 1, UNIDAD 4: B14

En este apartado analizamos los datos de la primera planta del pabellón B, unidad 4: B14. Se incluyeron en el estudio 43 determinaciones de PT y 20 de PC.

TABLA 85. PABELLON B, PLANTA 1, UNIDAD 4. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, planta primera, unidad 4, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a	TIPOPUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L N válido	43	20
INFORMAD Media	2,084	3,316
O Desviación estándar	1,940	1,465
Percentil 25	,000	2,739
Mediana	2,398	3,512
Percentil 75	3,731	4,534

a. UNIDAD = B14

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,084 y la media de los PC de 3,316; la mediana de los PT fue de 2,398 y la de los PC fue de 3,512 (Tabla 85). Si comparamos los datos de la unidad 4 de la primera planta del pabellón B, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC que en los PT. Al analizar el p valor de M-W se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0,025 (<0.05). Por lo tanto, podemos afirmar, que en la unidad 4 de la primera planta del pabellón B el análisis de los PC mejora el rendimiento del análisis del total de los PT. Analizando los PC mejoramos la eficacia del control de la instalación en el sector B14.

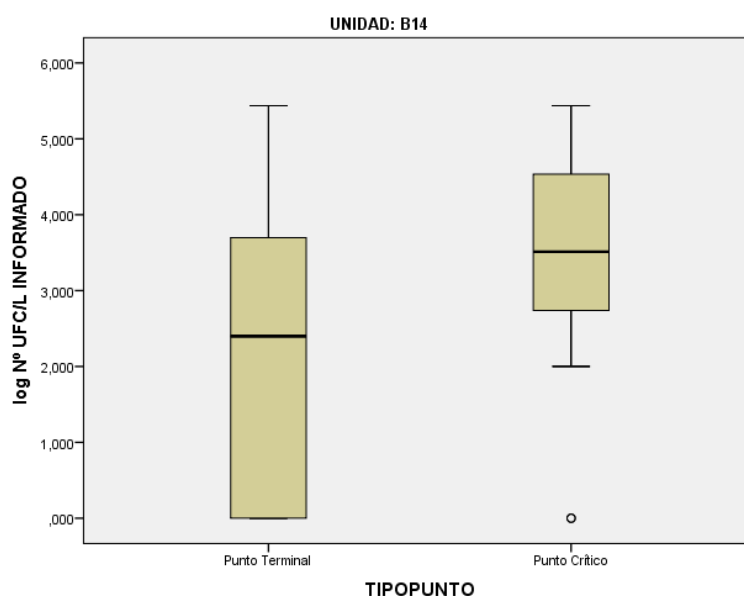


FIGURA 38. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella spp.* en los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el sector B14, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

Tal como se observa en el diagrama de cajas de la figura 38, la amplitud de la caja en los PC es menor que en los PT, aunque tanto el rango superior como el inferior son superiores en la caja de los PT, y la mediana es mayor en los PC con respecto a los PT, siendo la diferencia estadísticamente significativa, por lo tanto, podemos afirmar que en el sector B14, el análisis de los PC mejora el control de la instalación.

PABELLÓN B, PLANTA 2, UNIDAD 2: B22

En este apartado analizamos los datos de la unidad 2 de la segunda planta del pabellón B: B22. Se incluyeron en el estudio 31 determinaciones de PT y 21 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 3,312 y la media de los PC de 3,422; la mediana de los PT fue de 3,771 y la de los PC fue de 3,771 (Tabla 86).

Si comparamos los datos de la unidad 2 de la segunda planta del pabellón B, observamos que la media del log del nº UFC/L informadas es mayor en los PC que en los PT, y las medianas son iguales. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0,823 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector B22 el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 86. PABELLON B, PLANTA 2, UNIDAD 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, planta segunda, unidad 2, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log Nº UFC/L	N válido	31	21
INFORMAD	Media	3,312	3,422
O	Desviación estándar	1,450	1,365
	Percentil 25	3,114	3,114
	Mediana	3,771	3,771
	Percentil 75	4,294	4,318

a. UNIDAD = B22

PABELLÓN B, PLANTA 2, UNIDAD 3: B23

En este apartado analizamos los datos de la unidad 3 de la segunda planta del pabellón B: B23. Se incluyeron en el estudio 78 determinaciones de PT y 26 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,538 y la media de los PC de 1,703; la mediana de los PT fue de 2,841 y la de los PC fue de 2,151 (Tabla 87).

Si comparamos los datos de la unidad 3 de la segunda planta del pabellón B, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PT que en los PC. Al

analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0,062 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector B23 el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 87. PABELLON B, PLANTA 2, UNIDAD 3. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, planta segunda, unidad 3, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log	Nº N válido	78	26
UFC/L	Media	2,538	1,703
INFORMA	Desviación estándar	2,146	1,586
DO	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	2,841	2,151
	Percentil 75	4,064	3,079

a. UNIDAD = B23

PABELLÓN B, PLANTA 2, UNIDAD 4: B24

En este apartado analizamos los datos de la unidad 4 de la segunda planta del pabellón B: B24. Se incluyeron en el estudio 18 determinaciones de PT y 16 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 0,183 y la media de los PC de 0,206; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 0,000 (Tabla 88).

Si comparamos los datos de la unidad 4 de la segunda planta del pabellón B, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son similares en los PT y en los PC. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0,959 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector B24 el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 88. PABELLON B, PLANTA 2, UNIDAD 3. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, planta segunda, unidad 4, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

a		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
	log N° UFC/L N válido	18	16
	INFORMAD Media	,183	,206
	O Desviación estándar	,547	,578
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	,000	,000
	Percentil 75	,000	,000

a. UNIDAD = B24

PABELLÓN B, PLANTA 3, UNIDAD 1: B31

En este apartado analizamos los datos de la tercera planta del pabellón B, unidad 3: B33. Se incluyeron en el estudio 190 determinaciones de PT y 60 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 3,009 y la media de los PC de 4,517; la mediana de los PT fue de 4,193 y la de los PC fue de 4,585 (Tabla 89).

Si comparamos los datos de la unidad 1 de la tercera planta del pabellón B, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC que en los PT. Al analizar el p valor de M-W se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0,000 (<0.05). Por lo tanto, podemos afirmar, que en la unidad 1 de la tercera planta del pabellón B el análisis de los PC mejora el rendimiento del análisis del total de los PT. Analizando los PC mejoramos la eficacia del control de la instalación en el sector B31.

TABLA 89. PABELLON B, PLANTA 3, UNIDAD 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, planta tercera, unidad 1, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L	N válido	190	60
INFORMAD	Media	3,009	4,517
O	Desviación estándar	2,204	,870
	Percentil 25	,000	4,238
	Mediana	4,193	4,585
	Percentil 75	4,778	4,971

a. UNIDAD = B31

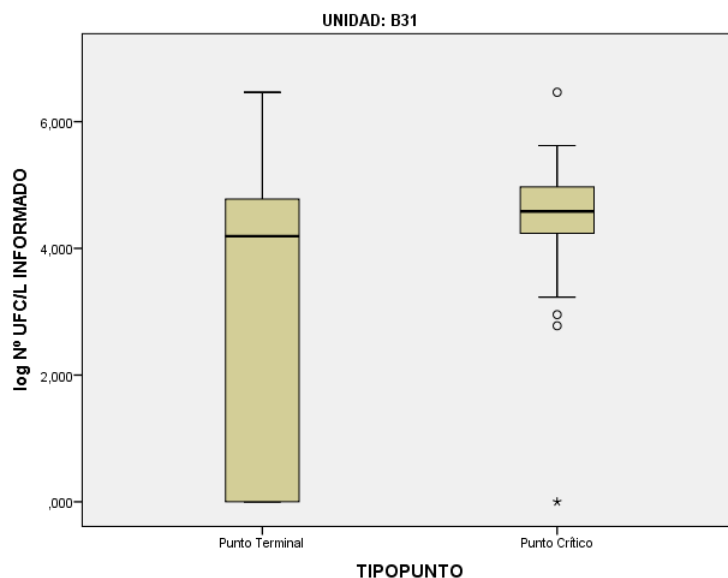


FIGURA 39. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella* spp. en los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el sector b31, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

Tal como se observa en el diagrama de cajas de la figura 39, la amplitud de la caja en los PC es menor que en los PT, aunque tanto el rango superior como el inferior son superiores en la caja de los PT, y la mediana es mayor en los PC con respecto a los PT, siendo la diferencia

estadísticamente significativa, por lo tanto, podemos afirmar que en el sector B31, el análisis de los PC mejora el control de la instalación.

PABELLÓN B, PLANTA 3, UNIDAD 2: B32

En este apartado analizamos los datos de la unidad 2 de la tercera planta del pabellón B: B32. Se incluyeron en el estudio 72 determinaciones de PT y 63 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,611 y la media de los PC de 2,796; la mediana de los PT fue de 3,398 y la de los PC fue de 3,462 (Tabla 90).

Si comparamos los datos de la unidad 2 de la tercera planta del pabellón B, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son similares en los PT y en los PC. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0,631 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector B32 el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 90. PABELLON B, PLANTA 3, UNIDAD 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, planta tercera, unidad 2, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log	Nº N válido	72	63
UFC/L	Media	2,611	2,796
INFORMA	Desviación estándar	1,921	1,853
DO	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	3,398	3,462
	Percentil 75	4,191	4,276

a. UNIDAD = B32

PABELLÓN B, PLANTA 3, UNIDAD 3: B33

En este apartado analizamos los datos de la unidad 3 de la tercera planta del pabellón B: B33. Se incluyeron en el estudio 40 determinaciones de PT y 33 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 4,377 y la media de los PC de 4,421; la mediana de los PT fue de 4,653 y la de los PC fue de 4,675 (Tabla 91).

TABLA 91. PABELLON B, PLANTA 3, UNIDAD 3. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, planta tercera, unidad 3, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L	N válido	40	33
INFORMAD	Media	4,377	4,421
O	Desviación estándar	1,411	1,251
	Percentil 25	4,248	4,338
	Mediana	4,653	4,675
	Percentil 75	5,060	5,000

a. UNIDAD = B33

Si comparamos los datos de la unidad 3 de la tercera planta del pabellón B, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son ligeramente mayores en los PC que en los PT. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0,872 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector B33 el análisis de los PC es representativo de los PT.

PABELLÓN B, PLANTA 3, UNIDAD 4: B34

En este apartado analizamos los datos de la unidad 4 de la tercera planta del pabellón B: B34. Se incluyeron en el estudio 41 determinaciones de PT y 38 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 1,642 y la media de los PC de 1,625; la mediana de los PT fue de 2,000 y la de los PC fue de 2,000 (Tabla 92).

TABLA 92. PABELLON B, PLANTA 3, UNIDAD 4. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón B, planta tercera, unidad 4, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log	Nº N válido	41	38
UFC/L	Media	1,642	1,625
INFORMA	Desviación estándar	1,521	1,535
DO	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	2,000	2,000
	Percentil 75	2,954	2,954

a. UNIDAD = B34

Si comparamos los datos de la unidad 4 de la tercera planta del pabellón B, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son similares en los PT y en los PC. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0,972 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector B34 el análisis de los PC es representativo de los PT.

PABELLÓN C, PLANTA SOTANO: CS

El sótano del pabellón C está considerado como una unidad completa, por lo que los resultados son iguales a los desarrollados en el apartado 2.3.

PABELLÓN C, PLANTA BAJA: CB

La planta baja del pabellón C está considerado como una unidad completa, por lo que los resultados son iguales a los desarrollados en el apartado 2.3.

PABELLÓN C, PLANTA 1, UNIDAD 1: C11

En este apartado analizamos los datos de la unidad 1 de la primera planta del pabellón C: C11. Se incluyeron en el estudio 35 determinaciones de PT y 17 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 1,507 y la media de los PC de 1,149; la mediana de los PT fue de 0,000 y la de los PC fue de 0,000 (Tabla 93).

TABLA 93. PABELLON C, PLANTA 1, UNIDAD 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón C, primera planta, unidad 1, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
a	log N° UFC/L N válido	35	17
	INFORMAD		
	Media	1,507	1,149
	Desviación estándar	2,077	1,935
	Percentil 25	,000	,000
	Mediana	,000	,000
	Percentil 75	3,732	2,477

a. UNIDAD = C11

Si comparamos los datos de la unidad 1 de la primera planta del pabellón C, observamos que la media del log del nº UFC/L informada es mayor en los PT y en los PC, la mediana es igual en PT y PC. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0,527 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector C11 el análisis de los PC es representativo de los PT.

PABELLÓN C, PLANTA 1, UNIDAD 2: C12

En este apartado analizamos los datos de unidad 2 de la primera planta del pabellón C. Se incluyeron en el estudio 19 determinaciones de PT que correspondían a PC. Están ubicadas una consulta de especialidades y un aseo.

La media de los PT y PC expresada como log del nº de UFC/L fue de 3,585; la mediana de los PT y PC fue de 3,898 (Tabla 94).

TABLA 94. PABELLÓN C, PLANTA 1, UNIDAD 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón C, primera planta, unidad 2, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log	Nº N válido	19	19
UFC/L	Media	3,585	3,585
INFORMA DO	Desviación estándar	1,388	1,388
	Percentil 25	3,602	3,602
	Mediana	3,898	3,898
	Percentil 75	4,352	4,352

a. UNIDAD = C12

Todos los PT son PC por lo que no se puede establecer una relación estadística entre ellos.

PABELLÓN C, PLANTA 2, UNIDAD 1: C21

En este apartado analizamos los datos de la unidad 1 de la segunda planta del pabellón C: C21. Se incluyeron en el estudio 64 determinaciones de PT y 24 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,611 y la media de los PC de 3,019; la mediana de los PT fue de 2,903 y la de los PC fue de 3,179 (Tabla 95).

Si comparamos los datos de la unidad 1 de la segunda planta del pabellón C, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC y en los PT. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W =

0,195 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector C21 el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 95. PABELLON C, PLANTA 2, UNIDAD 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón C, segunda planta, unidad 1, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

	TIPOPUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L N válido	64	24
INFORMAD Media	2,611	3,019
Desviación estándar	1,468	1,181
Percentil 25	2,268	2,452
Mediana	2,903	3,179
Percentil 75	3,597	3,755

a. UNIDAD = C21

PABELLÓN C, PLANTA 2, UNIDAD 2: C22

En este apartado analizamos los datos de la unidad 2 de la segunda planta del pabellón C: C22. Se incluyeron en el estudio 48 determinaciones de PT y 27 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,624 y la media de los PC de 3,551; la mediana de los PT fue de 3,621 y la de los PC fue de 4,146 (Tabla 96).

Si comparamos los datos de la unidad 2 de la segunda planta del pabellón C, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC y en los PT. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0,106 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector C22 el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 96. PABELLON C, PLANTA 2, UNIDAD 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón C, segunda planta, unidad 2, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

	TIPOPUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° N válido	48	27
UFC/L Media	2,624	3,551
INFORMA Desviación estándar	2,100	1,561
DO Percentil 25	,000	3,580
Mediana	3,621	4,146
Percentil 75	4,381	4,473

a. UNIDAD = C22

PABELLÓN C, PLANTA 3, UNIDAD 1: C31

En este apartado analizamos los datos de la unidad 1 de la tercera planta del pabellón C: C31. Se incluyeron en el estudio 55 determinaciones de PT y 19 de PC.

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 2,351 y la media de los PC de 3,743; la mediana de los PT fue de 2,602 y la de los PC fue de 3,000 (Tabla 97).

Si comparamos los datos de la unidad 1 de la tercera planta del pabellón C, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PC y en los PT. Al analizar el p valor de M-W no se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0,273 (>0.05). Por lo que podemos afirmar, que en el sector C31 el análisis de los PC es representativo de los PT.

TABLA 97. PABELLON C, PLANTA 3, UNIDAD 1. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón C, tercera planta, unidad 1, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

	TIPOPUNTO	
	Punto Terminal	Punto Crítico
log N° N válido	55	19
UFC/L Media	2,351	2,743
INFORMA Desviación estándar	1,500	1,410
DO Percentil 25	2,000	2,301
Mediana	2,602	3,000
Percentil 75	3,415	3,724

a. UNIDAD = C31

PABELLÓN C, PLANTA 3, UNIDAD 2: C32

En este apartado analizamos los datos de la tercera planta del pabellón C, unidad 2: C32. Se incluyeron en el estudio 43 determinaciones de PT y 19 determinaciones de PC (correspondientes a 1 PC).

La media de los PT expresada como log del nº de UFC/L fue de 3,938 y la media de los PC de 3,295; la mediana de los PT fue de 3,968 y la de los PC fue de 3,477 (Tabla 98).

Si comparamos los datos de la unidad 2 de la tercera planta del pabellón C, observamos que la media y la mediana del log del nº UFC/L informadas son mayores en los PT que en los PC. Al analizar el p valor de M-W se detectó diferencia estadísticamente significativa p valor M-W = 0,011 (<0.05). Por lo tanto, podemos afirmar, que en la unidad 2 de la tercera planta del pabellón C el análisis de los PC no es representativo del análisis del total de los PT. Analizando los PC no podemos manejar el control de la instalación en el sector C32.

Tal como se observa en el diagrama de cajas de la figura 40, la amplitud de la caja en los PC es menor que en los PT, y tanto el rango superior como el inferior son superiores en la caja de los PT, y la mediana es mayor en los PT con respecto a los PC, siendo la diferencia estadísticamente significativa, por lo tanto, podemos afirmar que en el sector C32, el análisis de los PC no es representativo del control de la instalación.

TABLA 98. PABELLON C, PLANTA 3, UNIDAD 2. Parámetros estadísticos del análisis del pabellón C, planta tercera, unidad 2, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

		TIPOPUNTO	
		Punto Terminal	Punto Crítico
log N° UFC/L INFORMADO O	N válido	43	19
	Media	3,938	3,295
	Desviación estándar	,997	,998
	Percentil 25	3,362	2,982
	Mediana	3,968	3,477
	Percentil 75	4,689	3,869

a. UNIDAD = C32

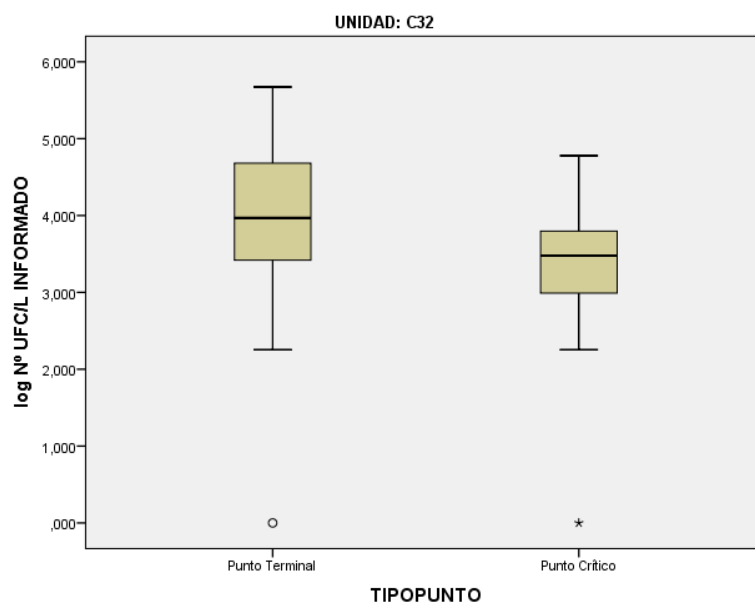


FIGURA 40. Distribución del log del número de UFC/L de *Legionella spp.* en los puntos terminales y en los puntos críticos al analizar el sector c32, realizando determinaciones repetidas de cada punto terminal a lo largo del tiempo.

PABELLÓN C, PLANTA 4: C4

La cuarta planta del pabellón C está considerada como una unidad completa, por lo que los resultados son iguales a los desarrollados en el apartado 2.3.

PABELLÓN QX:

Las diferentes plantas del pabellón QX no está dividido en unidades, por lo que los resultados son iguales a los desarrollados en el apartado 2.3.

1.3 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA INSTALACIÓN CON UNA SOLA DETERMINACIÓN POR CADA PT FRENTE AL SEGUIMIENTO DE LOS PC

Si comparamos los resultados del análisis de toda la instalación a lo largo del tiempo (2137 muestras) con la del análisis de la instalación completa con una sola determinación de cada punto terminal (869 muestras), con una muestra de 2137 casos una diferencia de medianas de 0.415 puntos resultó significativa, y, sin embargo, con una muestra más pequeña de 869 casos, una diferencia de medianas similar (0.398) no lo es.

En el análisis de toda la instalación a lo largo del tiempo (2137 muestras), dado el gran tamaño muestral, la potencia de los test es muy elevada y, por tanto, pequeñas diferencias en los recuentos entre puntos se detectan como significativas. Ahora bien, que sean estadísticamente significativas no implica necesariamente que haya una repercusión en el mantenimiento de la instalación en cuanto a la aplicación de medidas correctoras. De hecho, un log de 0.425 UFC/L implicaría una diferencia de unas 3 UFC/L en la mediana de recuentos de *Legionella* spp. diferencia despreciable a la hora de controlar la instalación.

En la tabla 99 se muestran los parámetros estadísticos obtenidos del estudio de la instalación en el período 2006-2018 y distribución de las medianas de los PC y PT de la instalación estudiada en el período 2006-2018; y los parámetros estadísticos obtenidos del estudio de la instalación completa en un momento determinado y distribución de las medianas de los PC y PT del estudio de la instalación completa en un momento determinado.

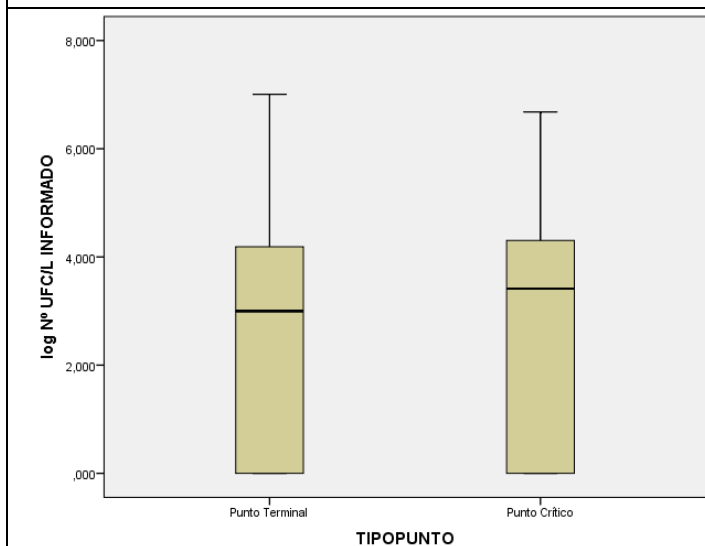
TABLA 99. (A) Parámetros estadísticos obtenidos del estudio de la instalación en el período 2006-2018 y distribución de las medianas de los PC y PT de la instalación estudiada en el período 2006-2018. (B) Parámetros estadísticos obtenidos del estudio de la instalación completa en un momento determinado y distribución de las medianas de los PC y PT del estudio de la instalación completa en un momento determinado.

				TIPOPUNTO	
				Punto Terminal	Punto Crítico
log	Nº	UFC/L	N válido	2137	1067
INFORMADO			Media	2,498	2,805
			Desviación estándar	1,978	1,865
			Percentil 25	,000	,000
			Mediana	3,000	3,415
			Percentil 75	4,188	4,305

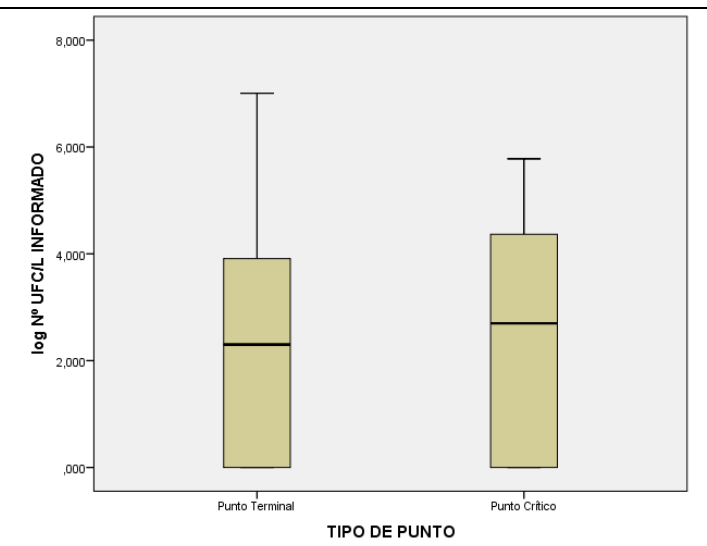
				TIPO DE PUNTO	
				Punto Terminal	Punto Crítico
log	Nº	UFC/L	N válido	869	99
INFORMADO			Media	2,116	2,432
			Desviación estándar	2,038	1,987
			Percentil 25	,000	,000
			Mediana	2,301	2,699
			Percentil 75	3,914	4,401

(A)

(B)



(A) Diferencias significativas



(B) No Diferencias significativas

2.COMPARACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE *LEGIONELLA* SPP. POR CULTIVO EN MEDIO BCYE Y GVPC EN MUESTRAS DE AGUA SANITARIA

2.1 MEJORA DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO AL AÑADIR EL BCYE

En este apartado se muestran los resultados de la evaluación de los métodos de cultivo para detección y recuento de *Legionella* spp. en muestras de agua sanitaria comparando la recuperación de *Legionella* spp. por cultivo en medio BCYE y GVPC. En la figura 41 se muestra la distribución global del nº de UFC/L informadas en el medio de máximo recuento.

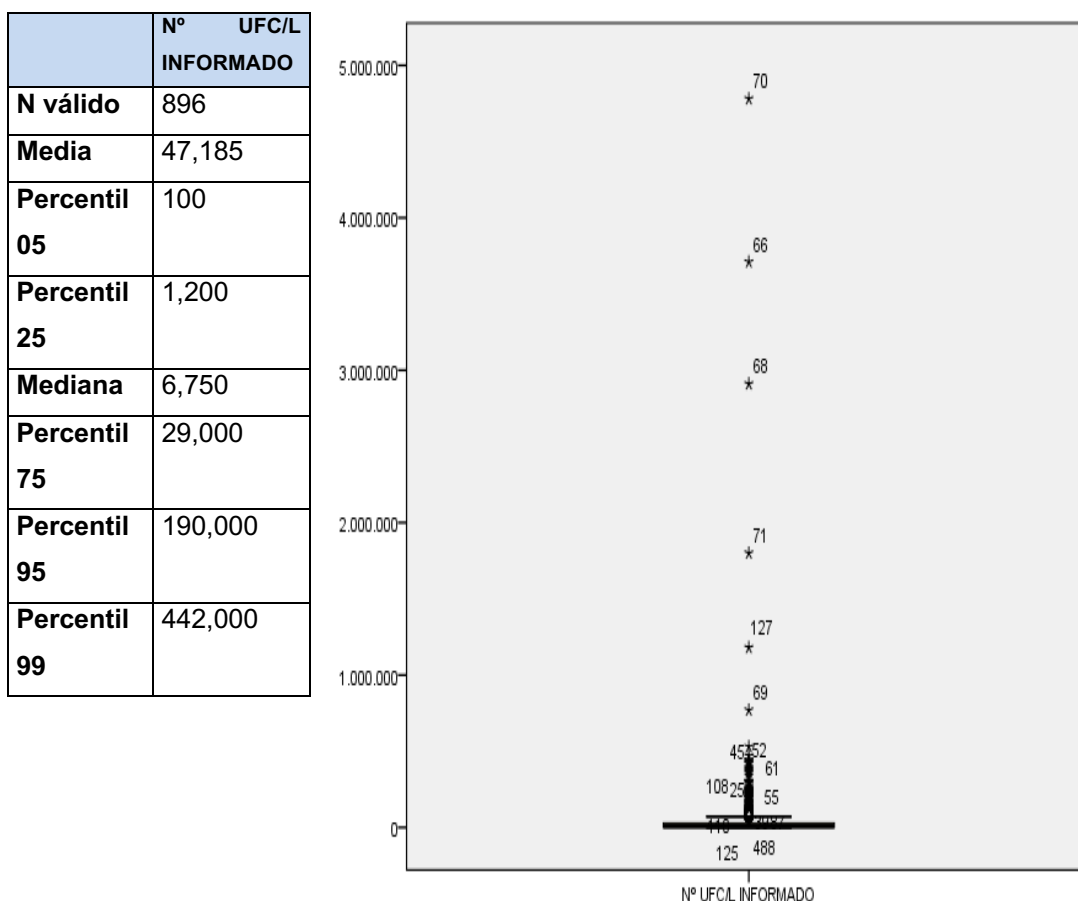


FIGURA 41. Distribución global del nº de UFC/L informadas en el medio de máximo recuento.

Al estudiar el medio de máximo recuento en relación con los distintos pretratamientos de las muestras obtenemos los resultados que se muestran en la tabla 100, en la que destaca que de las 869 muestras analizadas en 563 ocasiones se ha informado del mayor número de colonias

en el medio BCYE (63%) frente a las 333 con el medio GVPC (37%), es decir, 6 de cada 10 muestras informadas con el máximo recuento de colonias fueron en el medio BCYE lo que supone casi el doble de informes con medio BCYE que con medio GVPC. En la figura 42 se muestra el porcentaje de veces en que cada medio ha resultado ser óptimo.

TABLA 100. Influencia del medio de cultivo y del pretratamiento utilizado en la sensibilidad del método.

		MEDIO MÁXIMO RECUENTO					
		Total		medio máximo recuento BCYE		medio máximo recuento GVPC	
		Recuento	% del N de la columna	Recuento	% del N de la columna	Recuento	% del N de la columna
MEDIO MÁXIMO RECUENTO	Total	896	100,0%	563	100,0%	333	100,0%
	DIL 1/10 BCYE UFC/L	106	11,8%	106	18,8%		
	FA BCYE UFC/L	132	14,7%	132	23,4%		
	FC BCYE UFC/L	111	12,4%	111	19,7%		
	FST BCYE UFC/L	214	23,9%	214	38,0%		
	DIL 1/10 GVPC UFC/L	28	3,1%			28	8,4%
	FA GVPC UFC/L	30	3,3%			30	9,0%
	FC GVPC UFC/L	47	5,2%			47	14,1%
	FST 500 GVPC UFC/L	81	9,0%			81	24,3%
	FST GVPC UFC/L	147	16,4%			147	44,1%

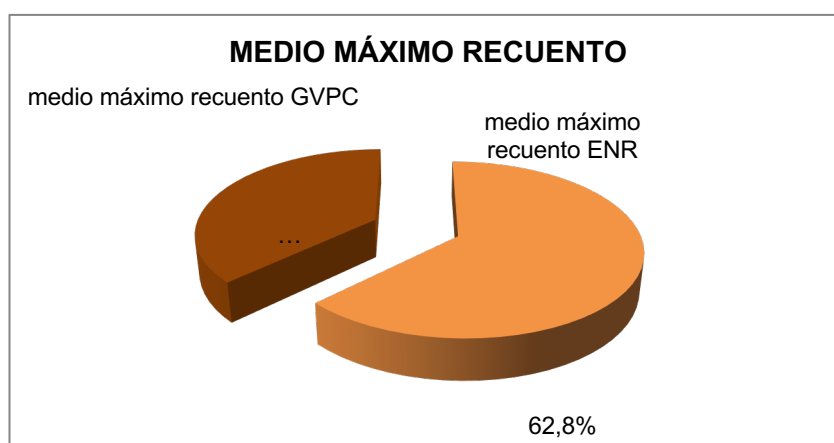


FIGURA 42. Porcentaje de veces en las que cada medio de cultivo ha resultado ser el óptimo (medio máximo recuento).

La prueba de Mann-Whitney indica que existen diferencias significativas en el nº de colonias informadas según el medio utilizado siendo la mediana en el medio BCYE un 35% superior que en el medio GVPC o análogamente la mediana del nº de colonias informado con el medio BCYE es 2000 unidades superior que con el medio GVPC (p-valor 0.000). Los datos se muestran en la tabla 101 y en la figura 43.

TABLA 101. Comparación de la mediana del nº de UFC/L informado en BCYE Y GVPC

		Análisis comparativo medio máximo recuento		
		Total	medio máximo recuento BCYE	medio máximo recuento GVPC
Nº UFC/L INFORMADO	N válido	896	563	333
	Media	47185	60392	24858
	Desviación típica	243475	300026	81448
	Mediana	6750	7700	5700

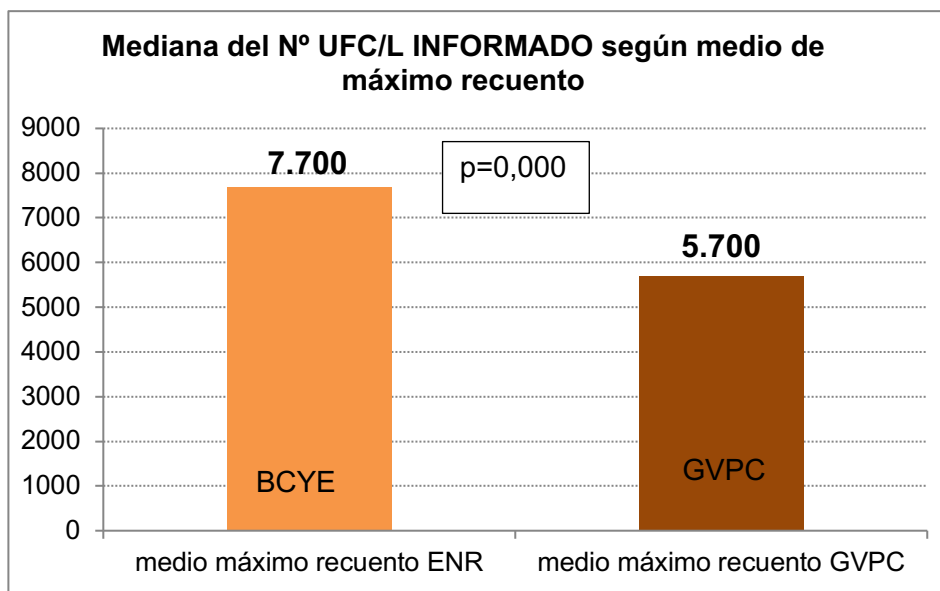


FIGURA 43. Mediana del nº UFC/L en BCYE (ENR) y GVPC cuando se utilizan para realizar el contaje al ser el medio de máximo recuento.

En la figura 44 podemos ver la comparación de las distribuciones del nº de colonias para ambos medios de cultivo. Si ampliamos la zona de la mediana (ver figura 45), se observa cómo para el medio BCYE la amplitud de la caja es mayor y la mediana está más alta, lo que indica cantidades de nº de colonias informadas mayores con el medio BCYE.

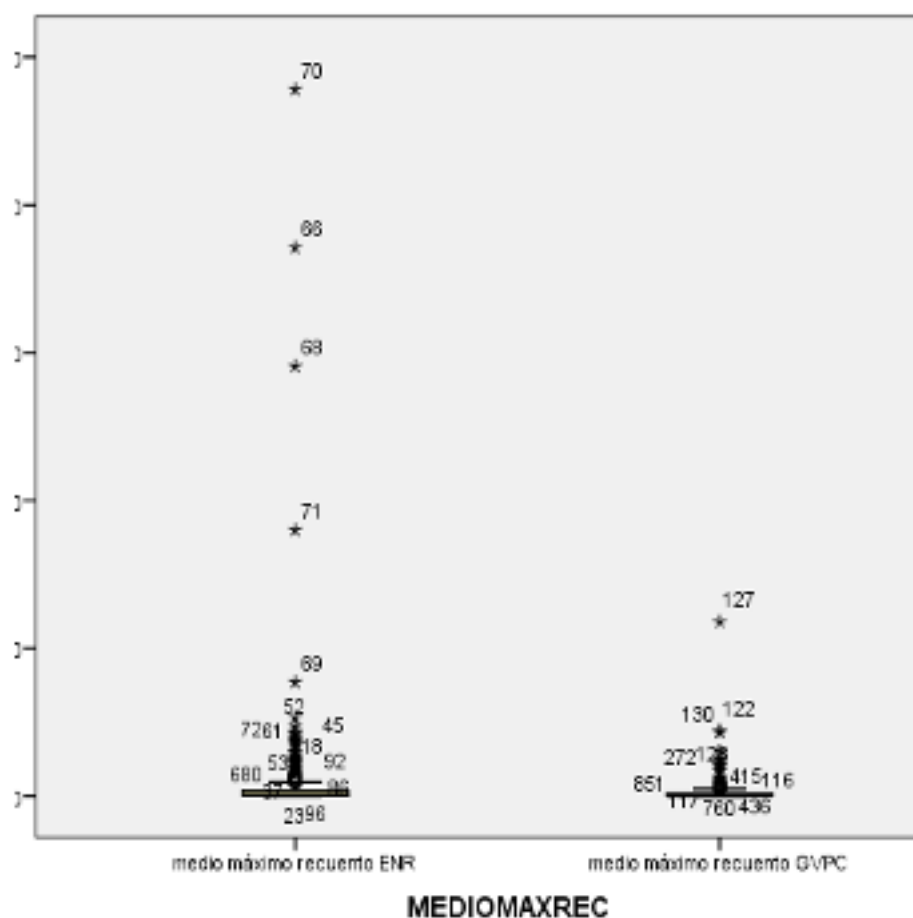


FIGURA 44. Comparación de las distribuciones del nº de colonias para ambos medios de cultivo.

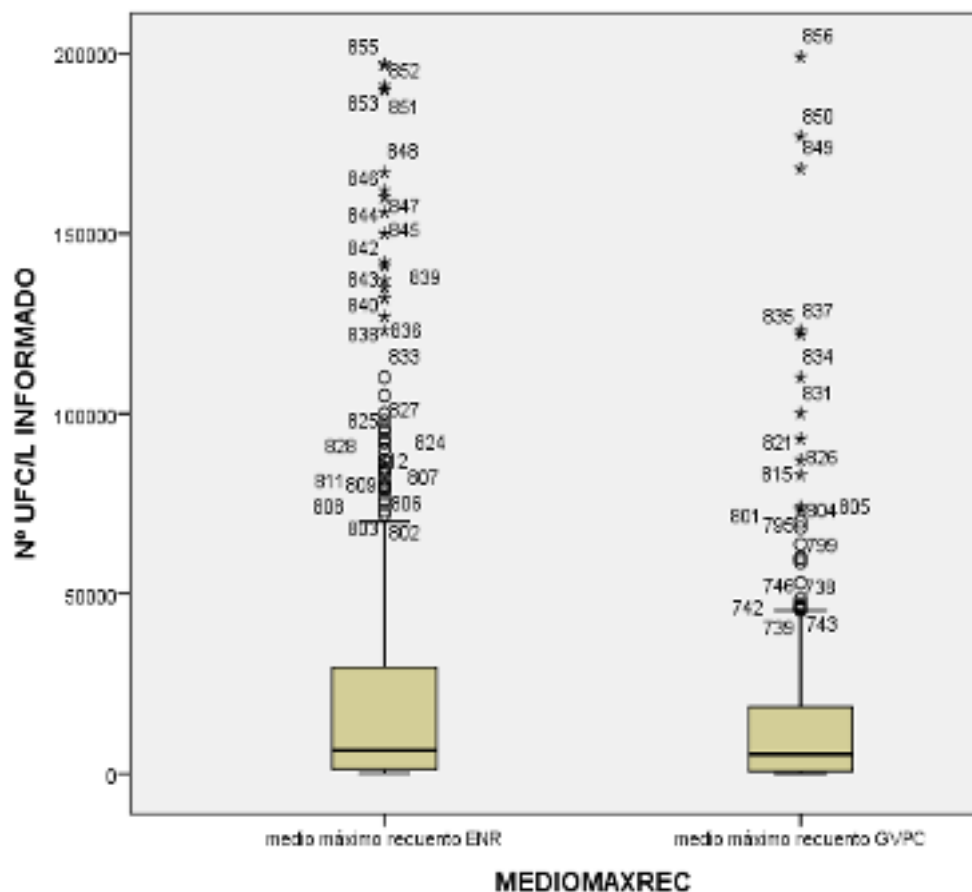


FIGURA 45. Comparación de las distribuciones del nº de colonias para ambos medios de cultivo ampliando la zona de la mediana (ENR=BCYE).

2.2 INFLUENCIA EN LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO SEGÚN PRETRATAMIENTO

En este apartado analizamos el medio más sensible en función del pretratamiento utilizado. Se comprobó si, para un mismo medio de cultivo (BCYE o GVPC), influye el pretratamiento FA (filtrado+ácido), FC (filtrado+calor) o FST (filtrado sin tratamiento) en la sensibilidad del medio, es decir, si se modifica el número de colonias según el pretratamiento.

Cuando se analizó el número de veces que es informado el recuento máximo con cada pretratamiento y la mediana de colonias, las pruebas Chi² (p-valor 0.000) de comparación de igualdad en el reparto de las proporciones en las categorías indican que existen diferencias significativas en el número de veces que se informa del recuento máximo de colonias según pretratamiento en ambos medios: se obtuvieron recuentos más altos en ausencia de pretratamiento (FST). El pretratamiento FST induce el mayor número de informaciones de

recuento máximo de colonias. En la tabla 102 y en la figura 46 se muestran los resultados del número de muestras informadas en BCYE con cada uno de los pretratamientos utilizados. En la tabla 103 y en la figura 47 se muestran los mismos resultados para el medio de cultivo GVPC.

TABLA 102 Influencia del pretratamiento de la muestra en medio BCYE. FA= tratamiento ácido; FC= tratamiento calor; FST= sin tratamiento.

medio máximo recuento BCYE		Recuento	% del N de la tabla
MEDIO MÁXIMO RECuento	Total	563	100,0%
	DIL 1/10 BCYE UFC/L	106	18,8%
	FA BCYE UFC/L	132	23,4%
	FC BCYE UFC/L	111	19,7%
	FST BCYE UFC/L	214	38,0%

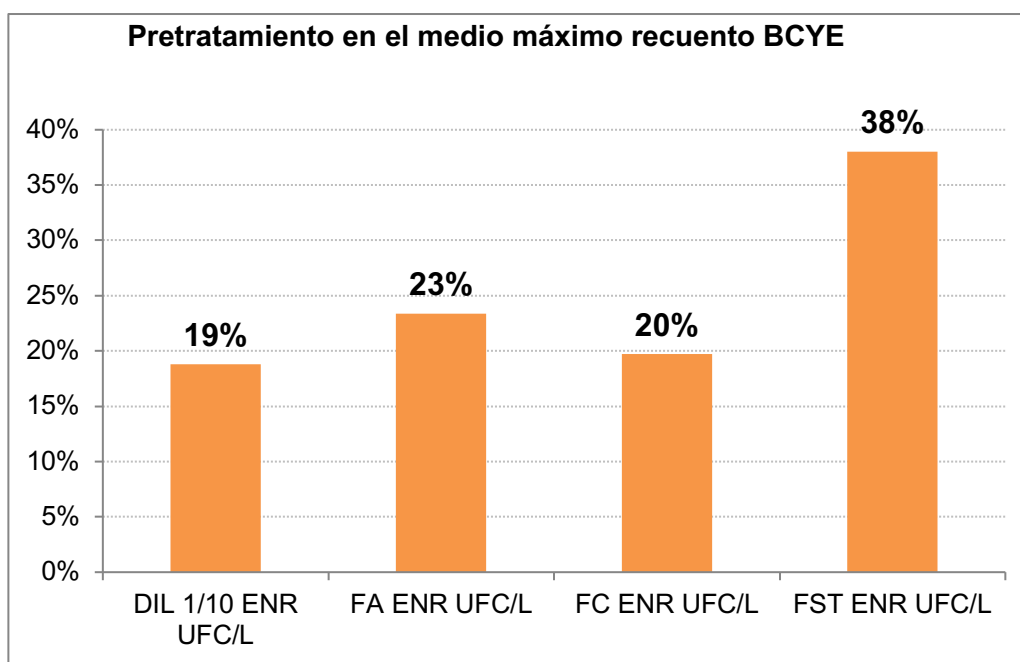


FIGURA 46. Porcentaje del número de muestras informadas en BCYE con cada uno de los pretratamientos utilizados (BCYE=ENR).

TABLA 103. Influencia del pretratamiento de la muestra en medio GVPC.

medio máximo recuento GVPC		Recuento	% del N de la tabla
MEDIO MÁXIMO RECUENTO	Total	333	100,0%
	DIL 1/10 GVPC UFC/L	28	8,4%
	FA GVPC UFC/L	30	9,0%
	FC GVPC UFC/L	47	14,1%
	FST 500 GVPC UFC/L	81	24,3%
	FST GVPC UFC/L	147	44,1%

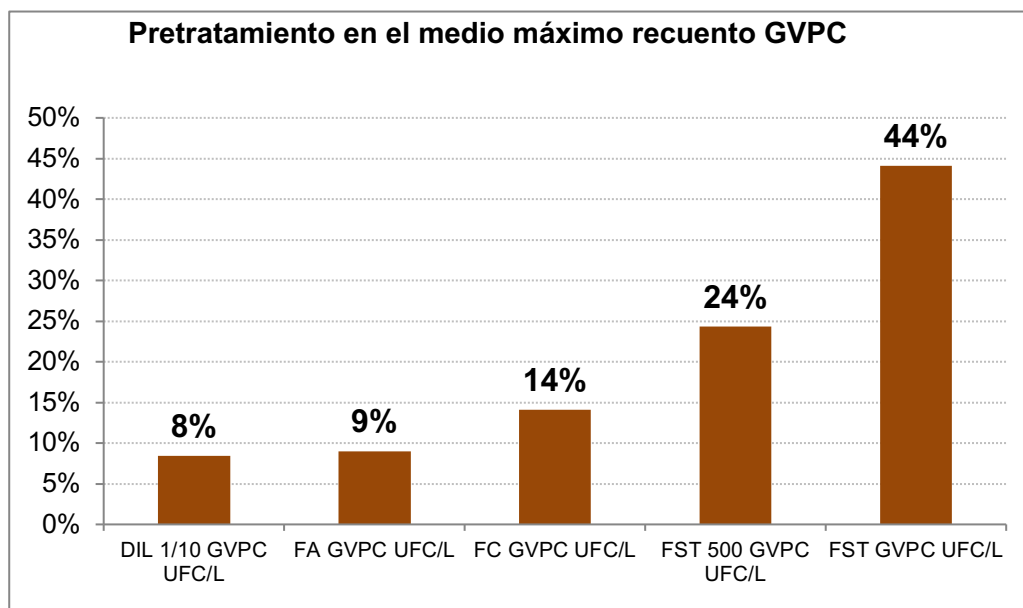


FIGURA 47. Porcentaje del número de muestras informadas en GVPC con cada uno de los pretratamientos utilizados.

Sin embargo, cuando se analizó el pretratamiento con el que se obtenían los máximos recuentos mediante la prueba de Mann-Whitney de comparación de distribuciones se obtuvo que, tanto en el medio BCYE como en el GVPC, la mediana del número de colonias al realizar una dilución del

filtrado de la muestra 1/10 (pretratamiento DIL) es significativamente superior que con el resto de los pretratamientos (p-valor<0.05). Los resultados se muestran en las tablas 104 y 105.

TABLA 104. Mediana del número de colonias informadas en función del pretratamiento utilizado en BCYE.

medio máximo recuento BCYE		MEDIO MÁXIMO RECUENTO				
		Total	DIL 1/10 BCYE UFC/L	FA BCYE UFC/L	FC BCYE UFC/L	FST BCYE UFC/L
N válido		563	106	132	111	214
Nº UFC/L	Media	60392	252600	11712	13028	19778
INFORMADO	Desviación típica	300026	654902	16030	14486	55957
	Mediana	7700	87000	4750	7200	3300

En la figura 48 se muestra la distribución del número de UFC/L informados en BCYE en función del pretratamiento utilizado.

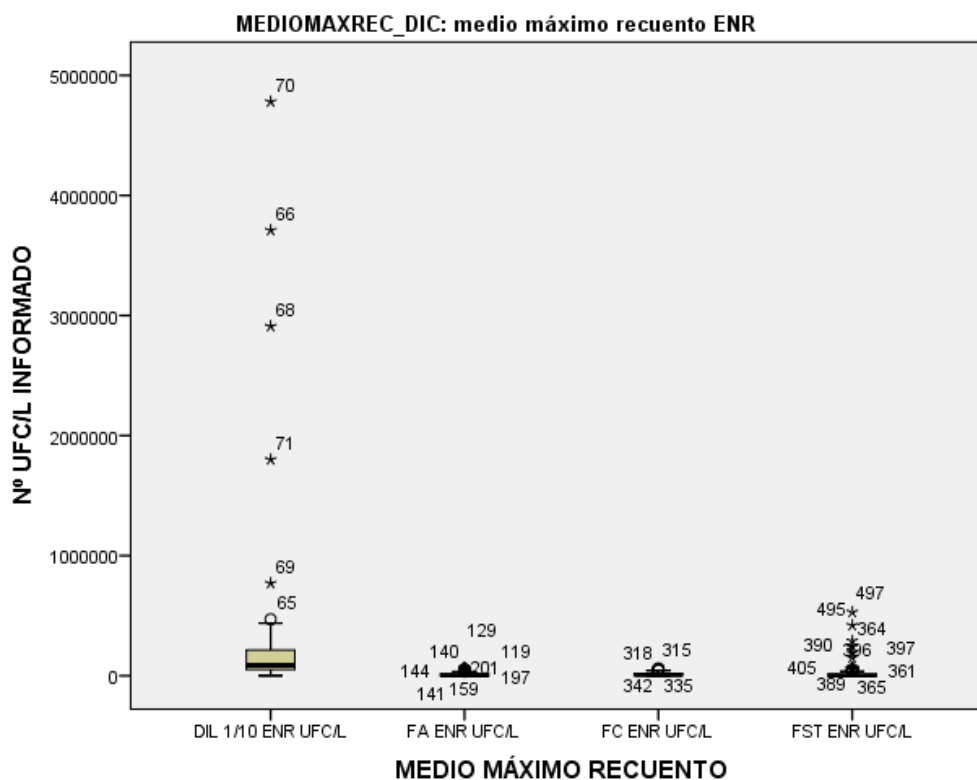


FIGURA 48. Distribución del número de UFC/L informados en BCYE en función del pretratamiento utilizado. (ENR=BCYE)

TABLA 105. Mediana del número de colonias informadas en función del pretratamiento utilizado en GVPC.

medio máximo recuento GVPC		MEDIO MÁXIMO RECuento					
		Total	DIL 1/10 GVPC UFC/L	FA GVPC UFC/L	FC GVPC UFC/L	FST 500 GVPC UFC/L	FST GVPC UFC/L
Nº UFC/L INFORMADO	N válido	333	28	30	47	81	147
	Media	24858	177536	11170	17282	3020	13024
	Desviación típica	81448	229658	15582	17198	8694	14678
	Mediana	5700	116000	3600	10900	520	7400

En la figura 49 se muestra la distribución del número de UFC/L informados en GVPC en función del pretratamiento utilizado.

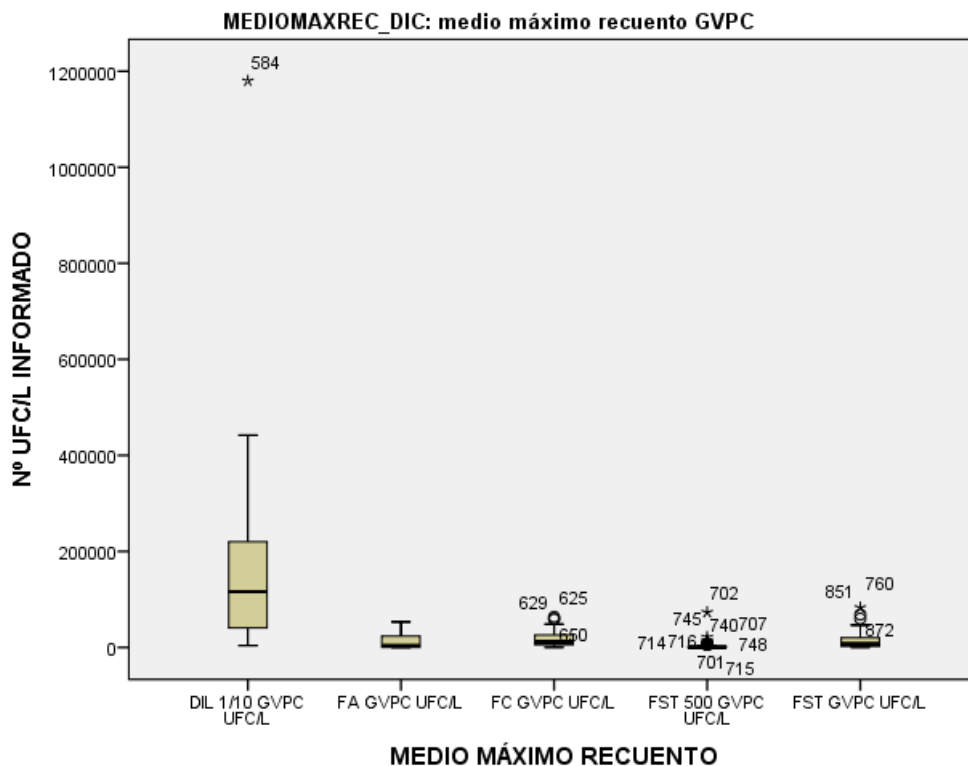


FIGURA 49. Distribución del número de UFC/L informados en GVPC en función del pretratamiento utilizado.

Se observó que la distribución de los resultados del cultivo de las muestras diluidas 1/10 (DIL) presentó varios valores extremos que podrían estar distorsionando los resultados. Sin embargo, al eliminarlos no se modificaron, de tal forma que la dilución 1/10 de la muestra filtrada sigue siendo el pretratamiento que más colonias detecta. Los resultados se muestran en la figura 50.

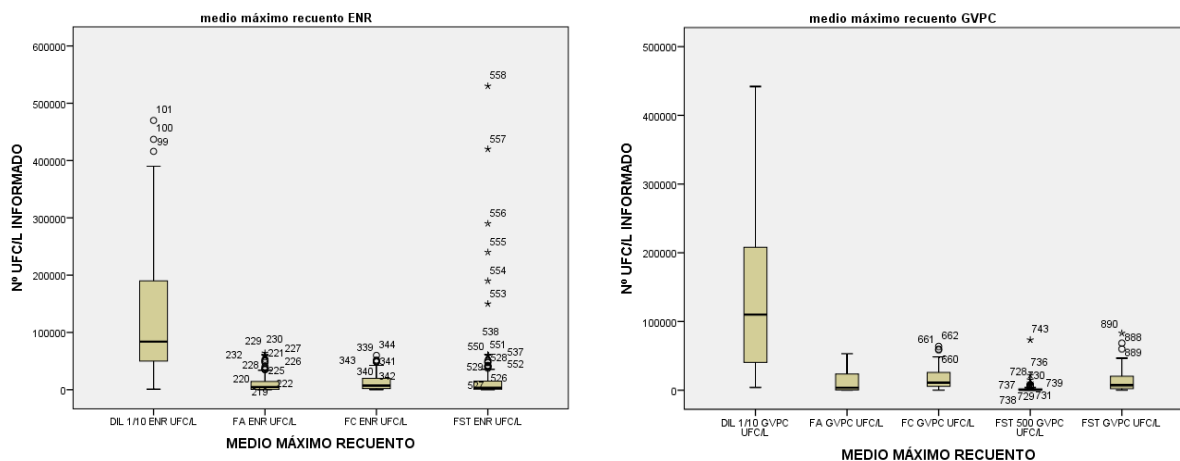


FIGURA 50. Distribución del número de UFC/L informados en GVPC en función del pretratamiento utilizado, eliminando los valores extremos.

Se analizaron los resultados sin tener en cuenta las muestras en las que se realizó siembra por dilución 1/10 y se obtuvo que para el medio BCYE no existen diferencias significativas en el número de colonias informadas según pretratamiento (p -valor >0.05). Los resultados se muestran en la tabla 106.

TABLA 106. Influencia del pretratamiento de la muestra en el número de UFC/L informados en el medio BCYE exceptuando el pretratamiento DIL 1/10.

medio máximo recuento BCYE	Total	FA BCYE UFC/L	FC BCYE UFC/L	FST BCYE UFC/L
N válido	457	132	111	214
Media	15809	11713	13028	19778
Desviación típica	40014	16030	14486	55957
Mediana	4500	4750	7200	3300

En la tabla 107 se muestra que el método con peor rendimiento del cultivo en medio GVPC fue el método de filtrado sin tratamiento y siembra de 0,5 mL (FST 500).

TABLA 107. Influencia del pretratamiento de la muestra en el número de UFC/L informados en el medio GVPC exceptuando el pretratamiento DIL 1/10.

medio máximo recuento GVPC		MEDIO MÁXIMO RECUESTO				
		Total	FA GVPC UFC/L	FC GVPC UFC/L	FST 500 GVPC UFC/L	FST GVPC UFC/L
Nº UFC/L INFORMADO	N válido	305	30	47	81	147
	Media	10841	11170	17283	3020	13025
	Desviación típica	14708	15583	17199	8694	14678
	Mediana	4800	3600	10900	520	7400

2.3 INFLUENCIA EN LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO DE LA PRESENCIA DE OTROS MICROORGANISMOS

En este apartado se comprobará cómo afecta la presencia de otros microorganismos en la sensibilidad del método. Este objetivo se alcanzará analizando tanto el número de veces que se informó el recuento máximo con cada método en presencia/ausencia de otros microorganismos como comparando el número medio (o mediana) de colonias.

Las pruebas Chi² (p -valor 0.000) de comparación de igualdad en el reparto de las proporciones en las categorías indican que existen diferencias significativas en el número de veces que se informa el recuento máximo de colonias según presencia o ausencia de microorganismos: en presencia de otros microorganismos, ambos métodos son similares; sin embargo, en ausencia de microorganismos, el medio BCYE es 4 veces más sensible que el GVPC (Chi² p -valor 0.000). En la figura 51 observamos los porcentajes de recuentos máximos en cada medio de cultivo en función de la presencia o ausencia de flora interferente.

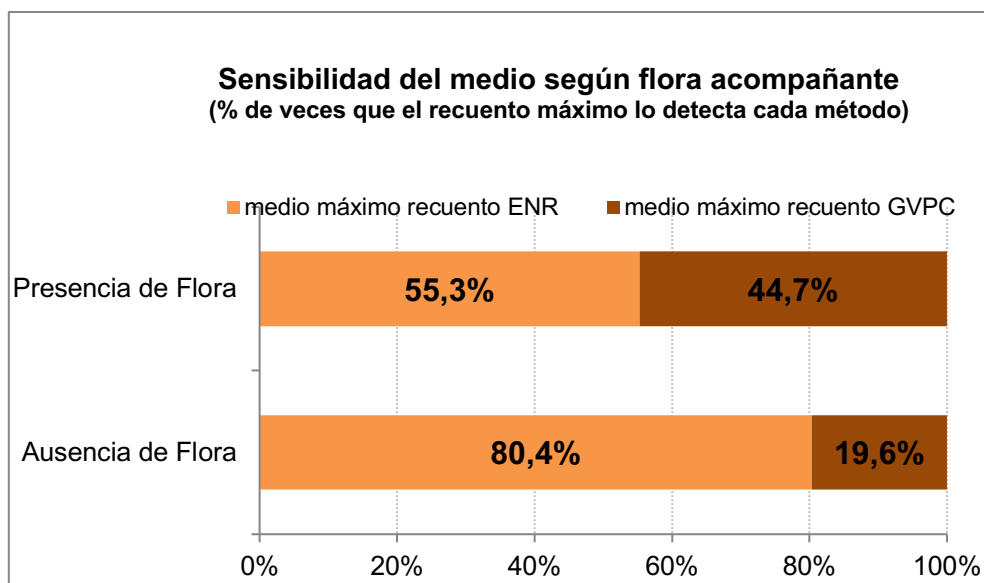


FIGURA 51. Porcentaje de veces que el recuento máximo lo detecta cada medio de cultivo (ENR= BCYE).

Si se comparan las distribuciones de las cantidades de colonias que se han informado en presencia y en ausencia de flora, la prueba de comparación de distribuciones de M-W indica que no existen diferencias significativas en las distribuciones del número de colonias informados según flora acompañante (p -valor 0.794). Este resultado lo muestran las cajas de la misma amplitud, las medianas al mismo nivel y, excepto por varios valores extremos, los valores se reparten análogamente en presencia y en ausencia de flora que se muestran en la figura 52.

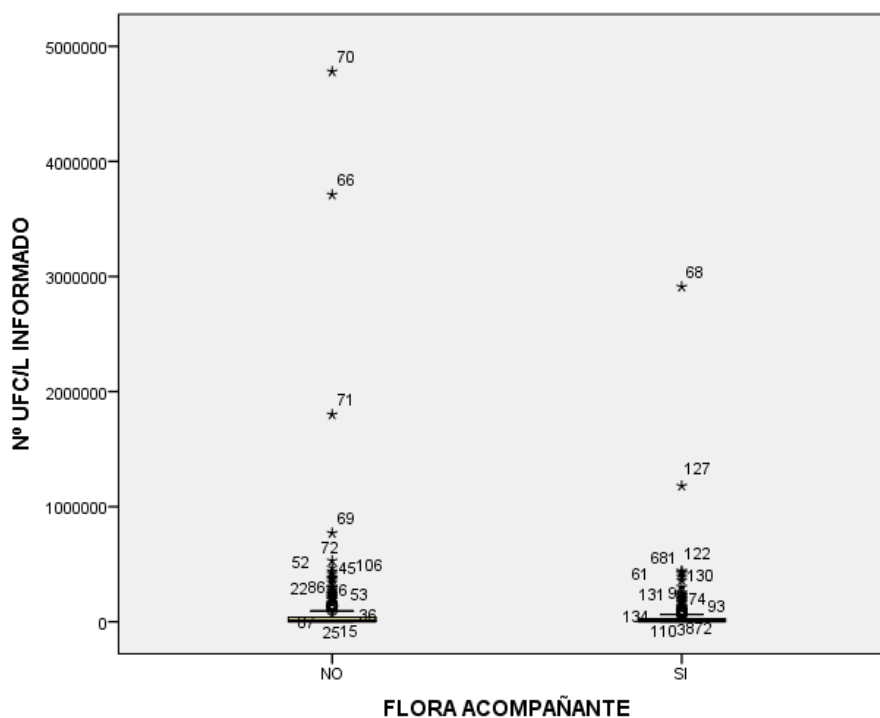


FIGURA 52. Distribuciones de las cantidades de colonias que se han informado en presencia y en ausencia de flora.

Sin embargo, si eliminamos el 5% de valores extremos (recuentos por encima de 190.000 que es el percentil 95 de la distribución), la prueba de M-W detecta una tendencia que la mediana de los recuentos sea algo superior si hay flora acompañante lo que supone una tendencia – que no diferencia significativa- a que los recuentos cuando hay flora sean algo superiores (mediana superior y caja algo más amplia) (p-valor= 0,069). De hecho, si eliminamos los valores de recuento extremos superiores a 190.000 UFC/L, esta tendencia se convierte en diferencia significativa tal como se muestra en la figura 53 (p<0,05).

Nº UFC/L INFORMADO	FLORA ACOMPAÑANTE	
	NO	SI
N válido	241	609
Media	18,930	17,739
Percentil 05	100	100
Percentil 25	700	1,200
Mediana	4,200	6,500
Percentil 75	20,800	23,900
Percentil 95	87,000	70,000
Percentil 99	156,000	122,000

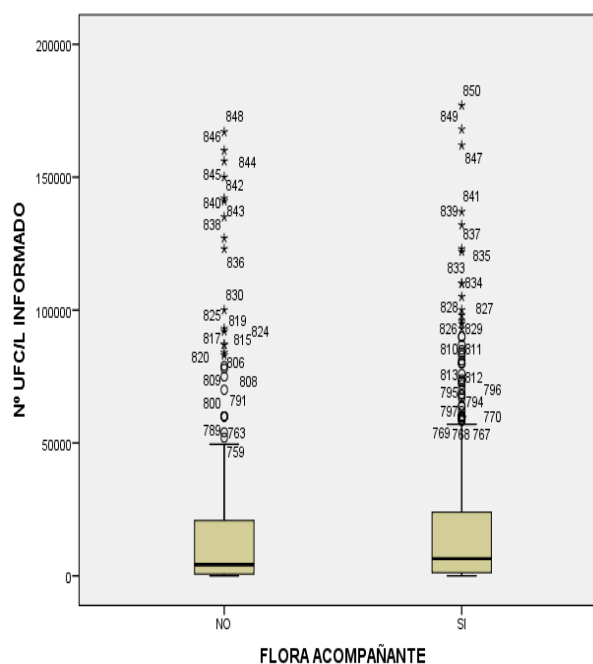


FIGURA 53. Distribuciones de las cantidades de colonias que se han informado en presencia y en ausencia de flora eliminando el 5% de valores extremos (recuentos por encima de 190.000 que es el percentil 95 de la distribución).

2.4 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, EL pH Y EL CLORO LIBRE EN LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO

En este apartado comprobamos cómo afectan la temperatura, el pH y el cloro en la sensibilidad de los métodos.

Los resultados de la influencia de estos parámetros en la mediana del nº de UFC/L informados en BCYE y GVPC se muestran en la tabla 108 donde podemos observar que las medianas son casi idénticas entre grupos. Las pruebas de comparación de distribuciones de M-W indican que no existen diferencias significativas ni en el pH, ni en el cloro ni en la temperatura según el método que haya informado el máximo recuento ($p > 0,05$) (Tabla 109).

TABLA 108. Influencia del cloro libre, temperatura y pH en la mediana del número de UFC/L informado en ambos medios de cultivo.

	MEDIOMAXREC	Total	medio máximo	medio máximo
			recuento BCYE	recuento GVPC
COLORO LIBRE ppm	N válido	622	352	270
	Media	,40	,40	,40
	Desviación típica	,36	,37	,34
	Mediana	,28	,28	,30
temperatura	N válido	887	556	331
	Media	39,24	39,46	38,87
	Desviación típica	7,11	6,72	7,70
	Mediana	39,90	39,95	39,60
pH	N válido	887	556	331
	Media	7,82	7,81	7,82
	Desviación típica	,31	,31	,31
	Mediana	7,81	7,81	7,81

TABLA 109. p- valor de las pruebas de comparación de distribuciones de M-W del análisis de la influencia de la temperatura, el pH y el cloro en la sensibilidad de los métodos.

Comparación con el método	p-valor M-W
Cloro	0.908
Temperatura	0.329
pH	0.329

En la tabla 110 se muestran los coeficientes de correlación de las distribuciones del número de colonias detectadas con cada uno de los parámetros. Sólo detectamos una correlación significativa e inversa entre la temperatura y el N° UFC/L INFORMADO: a mayor temperatura, menor número de colonias detectado y viceversa.

TABLA 110. Coeficiente de correlación de las distribuciones del número de colonias detectadas con cada uno de los parámetros (pH, temperatura y cloro).

		N° UFC/L INFORMADO	
	CLOROLIBRE ppm	Coeficiente de correlación	de -,001
		Sig. (bilateral)	,981
		N	622
	Temperatura	Coeficiente de correlación	de -,284**
		Sig. (bilateral)	,000
		N	887
	PH	Coeficiente de correlación	de -,026
		Sig. (bilateral)	,435
		N	887

En la figura 54 se observa como incluso eliminando el 5% de valores extremos superiores a 190.000, se mantiene esta correlación inversa, aunque leve.

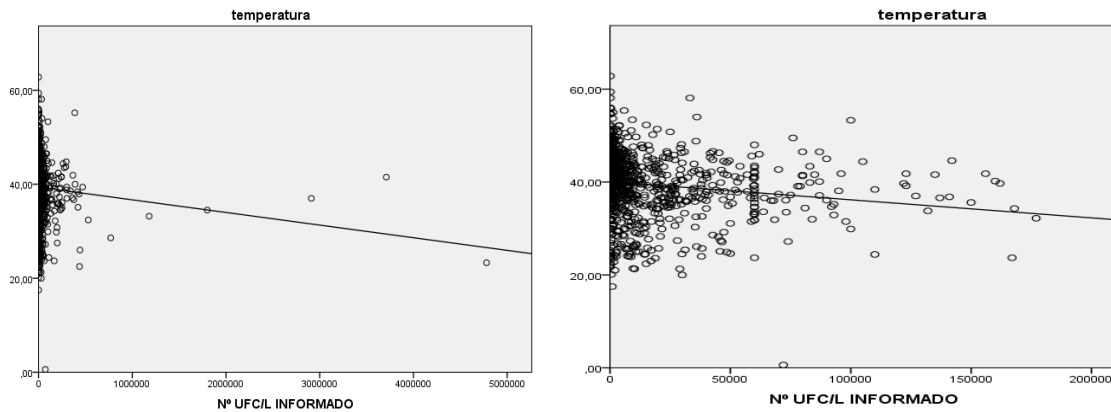


FIGURA 54. Correlación de la temperatura y el número de UFC/L informados.

3. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Del total de muestras analizadas en 896 (69%) se detectó crecimiento de *Legionella* spp. por cultivo.

Se identificaron por aglutinación en látex un total de 1002 cepas de *Legionella* spp. En 807 muestras se observó crecimiento de una sola especie y en 89 muestras se detectó más de una especie o serogrupo de *Legionella* spp. La especie mayoritaria fue *L. pneumophila* serogrupo 2-14 que se identificó en el 83,8% de las muestras, seguida de *Legionella* spp. en el 9,5% y por último *L. pneumophila* serogrupo 1 en el 6,7% (figuras 55 y 56).

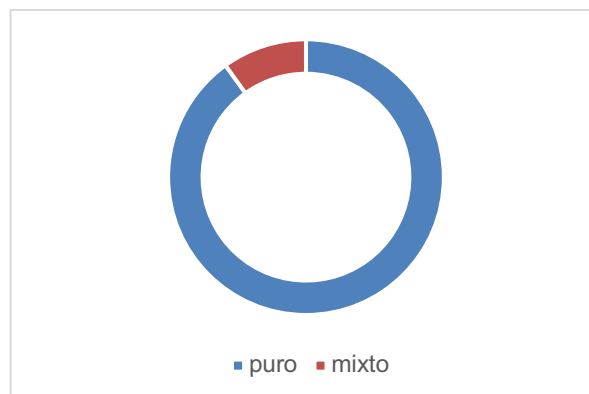


FIGURA 55. Distribución de cultivos puros y mixtos de *Legionella* spp. en el total de muestras positivas.

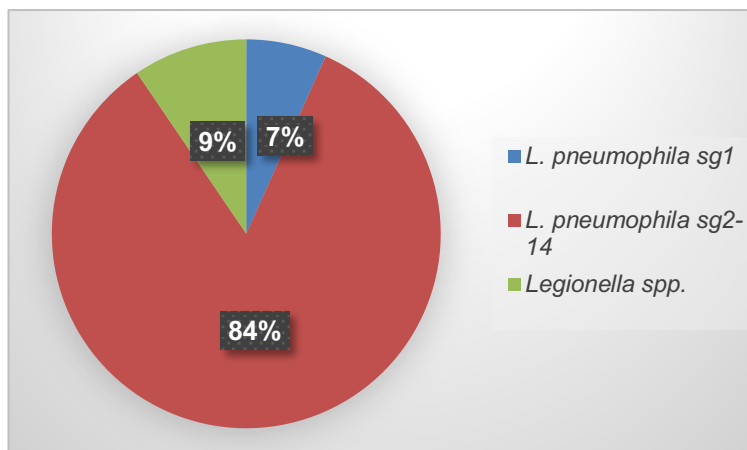


FIGURA 56. Distribución del porcentaje de especies de *Legionella* spp. identificadas por aglutinación en látex.

Una parte de los aislados de *Legionella* spp. (63%) se identificaron por MALDI-TOF-MS. En total se realizó MALDI-TOF-MS a 60 colonias identificadas como *Legionella* spp. mediante aglutinación o no aglutinables. Los microorganismos aislados fueron: 18 aislados de *Legionella anisa*, 28 aislados de *Legionella rubrilucens*, 10 aislados de *Legionella maceacherni*, 1 aislado de *Legionella bozemanii* y 1 aislado de *Legionella parisiensis*. En uno de los aislados no obtuvimos identificación fiable y otro lo identificó como *Legionella pneumophila* siendo la aglutinación negativa (PT716 de la unidad C31). La distribución de las especies identificadas se muestra en la figura 57 siendo la especie más frecuentemente aislada *L. rubrilucens*.

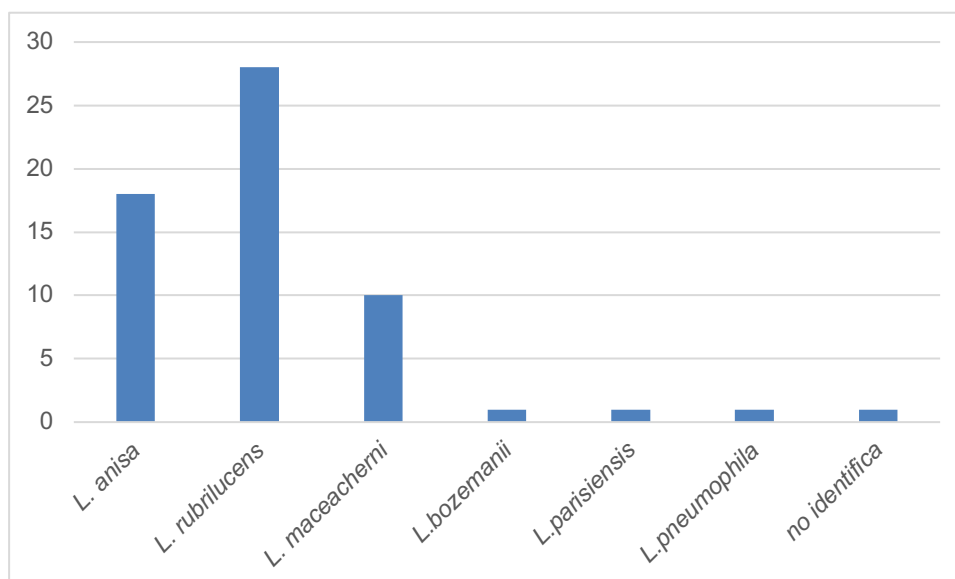


FIGURA 57. Distribución de las especies de *Legionella* spp. Identificadas por MALDI-TOF-MS.

En cuanto al genotipado por SBT, de las 65 cepas analizadas se ha podido asignar una ST específica a 61 cepas. En la figura 58 se muestra la distribución en el período de estudio. La ST mayoritaria es la 1362 (n=45), seguida de la ST1 (n=13), la ST1394 (n=2) y la ST52 (n=1). La ST1362 y la ST1 están presentes en todos los pabellones (figura 59).

También hemos secuenciado la cepa *naive* de la instalación obtenida del PT559 del B31 aislada en 2007, antes de someter la instalación a ningún tratamiento, y el resultado confirma que la secuencia tipo (ST) de la cepa *naive* coincide con la mayoritaria ST1362 hasta el año 2014, momento a partir de cual compite con la ST1. El genotipado por SBT confirma la identificación como *L. pneumophila* ST1394 de la cepa aislada en el PT716 de la unidad C31 por MALDI-TOF-MS como *L. pneumophila* siendo la aglutinación negativa.

En la tabla 111 se muestra la distribución de las ST por año de aislamiento y por pabellón. La ST1362 fue la más frecuente todos los años estudiados, excepto en 2014 que predomina la ST1. Las ST1394 y la ST52 sólo aparecen en 2011 y 2012, respectivamente. De las cepas estudiadas: 20 son del pabellón A (A+AB), 28 del pabellón B y 13 del pabellón C.

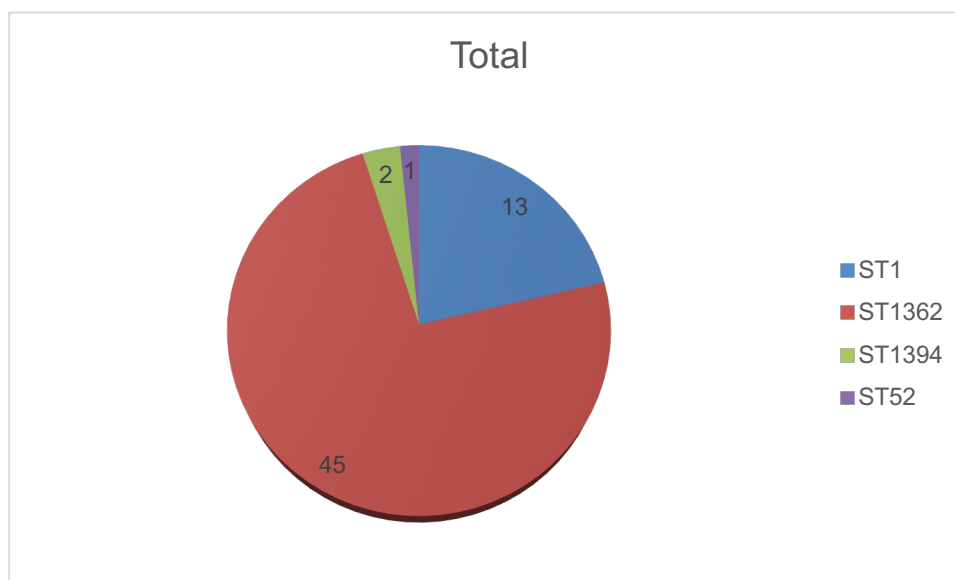


FIGURA 58. Distribución de las ST analizadas en el período de estudio.

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

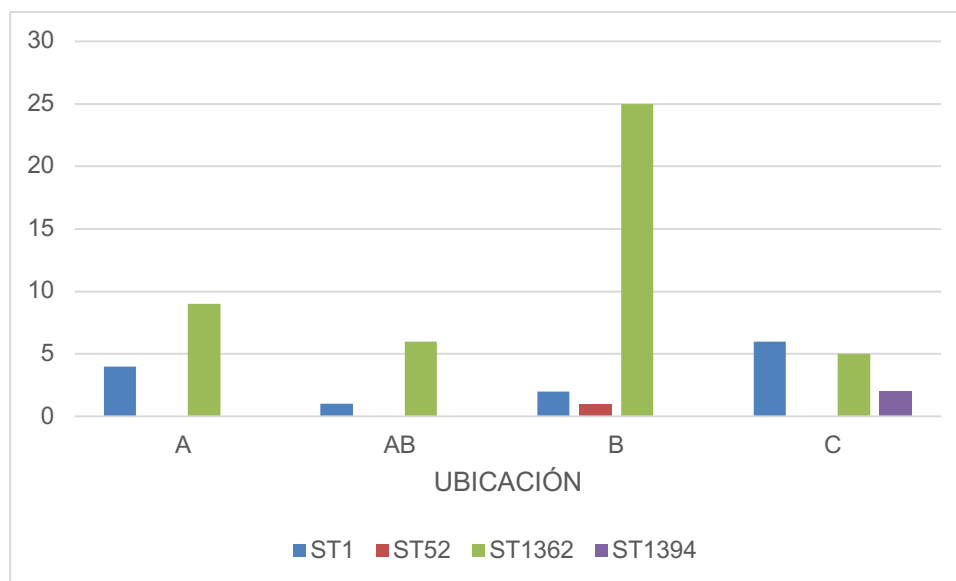


FIGURA 59. Distribución de ST por pabellones.

TABLA 111. Distribución de ST por año de estudio y pabellón.

ST POR AÑO/PAB	A	AB	B	C	Total
2011	8	5	10	7	30
ST1	2	1	1	1	5
ST1362	6	4	9	4	23
ST1394				2	2
2012	1	2	2	4	9
ST1				3	3
ST1362	1	2	1	1	5
ST52			1		1
2013			11		11
ST1362			11		11
2014	1			2	3
ST1	1			2	3
2015	3		4		7
ST1	1		1		2
ST1362	2		3		5
2007			1		1
ST1362			1		1
Total	13	7	28	13	61

TABLA 112. Distribución de las ST por pabellones y sectores en los pabellones A, B y C. (SC=sala de caldeas).

PABELLONES	ST1	ST1362	ST1394	ST52	Total
A	4	9			13
A11	1	1			2
A22	1	1			2
A23	1				1
A31		2			2
A32		1			1
A33		1			1
AB		3			3
AS	1				1
AB	1	6			7
SC	1	6			7
B	2	25		1	28
B11		1			1
B12	1	11			12
B13		1			1
B24		1			1
B31		2			2
B32		2			2
B33		2			2
BB		3			3
BS	1	2		1	4
C	6	5	2		13
C11			1		1
C31	3		1		4
C32	1				1
C4		3			3
CB	2	1			3
CS		1			1
Total	13	45	2	1	61

La tabla 112 muestra la distribución de las ST por pabellones y sectores durante todo el período de estudio. En el pabellón A las muestras analizadas pertenecen a cada planta y sector del pabellón. En la unidad AB se encuentra la sala de calderas. Los PT estudiados (PT868-872) corresponden con los puntos del anillo, los fotocatalizadores y acumuladores del sistema de agua sanitaria. En estos puntos se ha detectado mayoritariamente la ST1362. Los otros dos PT están definidos como PC y son puntos localizados en un baño de pacientes de una sala de espera y en el vestuario de personal. No hemos detectado ST1 en la unidad en la tercera planta del

paellón A. En el paellón B tenemos resultados de 10 muestras de 2011, 2 de 2012, 11 de 2014 y 3 de 2015. Todas las unidades están representadas y la ST mayoritaria en todo el paellón es la ST1362. La ST1 se ha detectado en el sótano y en la primera planta. En el paellón C predomina la ST1 detectándose en todas las plantas del paellón excepto la primera y la segunda. Como se observa en la figura 62 en el año 2014 la ST1 es el único genotipo detectado en el paellón. La ST1394 solo se detectó en las unidades C11 y C31 en el año 2011.

Los tratamientos físico-químicos realizados para erradicar *Legionella* spp. han cambiado a lo largo del tiempo y sus resultados, también. Tras choques térmicos e hipercloración, la instalación no sufrió variaciones en la distribución de las ST. Sin embargo, con el dióxido de cloro disminuyó la ST1362, apareciendo en su lugar la ST1 que ha estado presente en la instalación de forma mantenida. Las muestras analizadas en 2015 son del primer semestre del año, previas al siguiente tratamiento con dióxido de cloro, y se observa como vuelve a prevalecer la ST1362 sobre la ST1. Los datos de la distribución de las ST por año y tratamientos de descontaminación (choque térmico, hipercloración y dióxido de cloro) de la instalación se muestran en la figura 60.

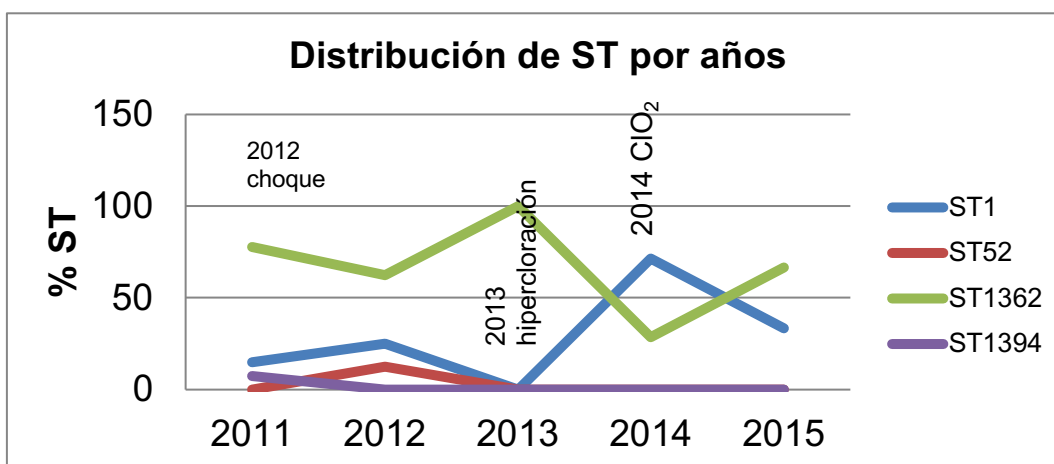


FIGURA 60. Distribución de ST por años en toda la red de agua estudiada.

Analizamos los resultados obtenidos en cada paellón del hospital por cada año de estudio. La ST1362 y la ST1 están presentes en todos los paellones (figura 60 y tabla 112).

En las figuras 61 a 63 se muestran las distribución de las ST por paellones y por año. En los paellones A y B predomina siempre la ST1362, excepto en 2014, en que se igualan los porcentajes de ST1 y ST1362. En la figura 63 observamos que en el paellón C, detectamos una mayoría de ST1 frente a ST1362. Así, la inversión en la prevalencia de las ST en 2014 se debería a un aumento de ST1 en los paellones A y B, unida a la predominancia de ST1 en el paellón C.

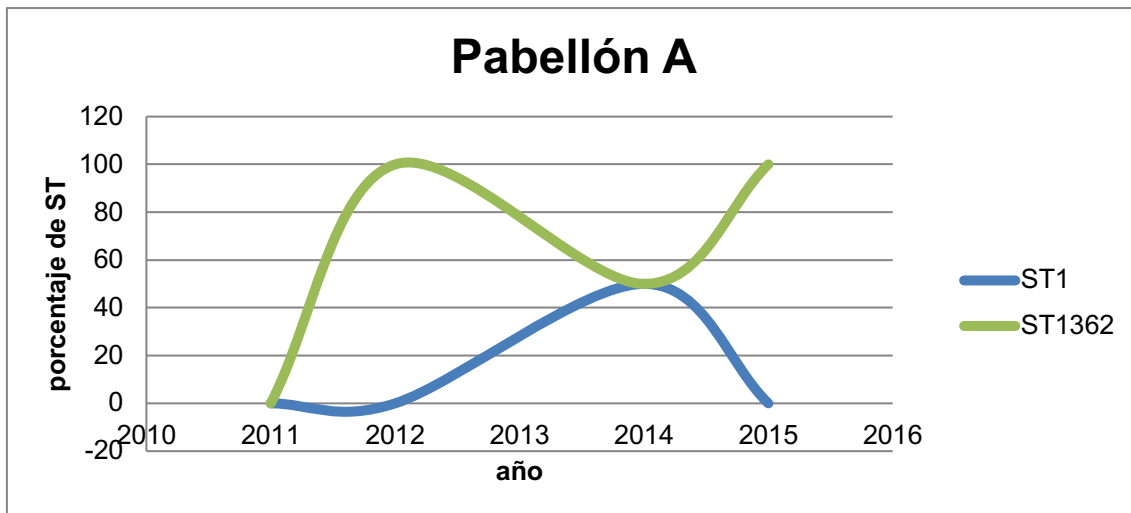


FIGURA 61. Distribución de ST por años en el pabellón A.

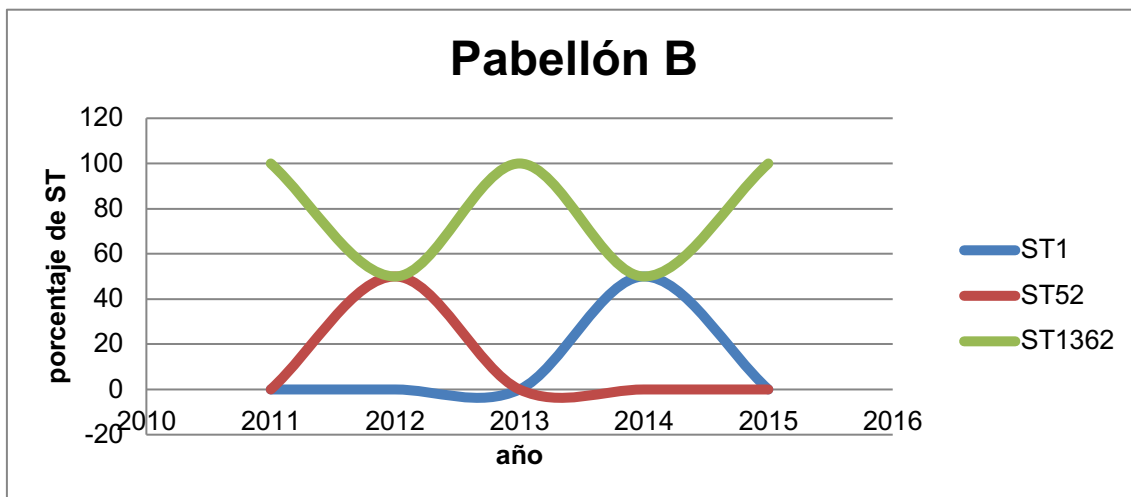


FIGURA 62. Distribución de ST por años en el pabellón B.

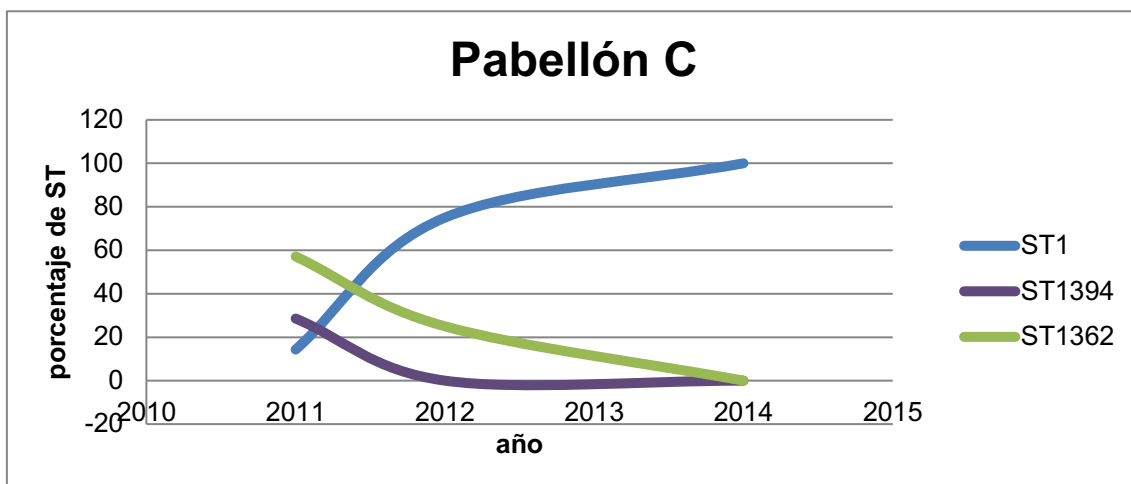


FIGURA 63. Distribución de ST por años en el pabellón C.

DISCUSIÓN

El control de *Legionella* spp. en instalaciones de uso sanitario es una prioridad para los hospitales. Comprende el diseño de la toma de muestras, la detección, el recuento y la identificación de *Legionella* spp. en las muestras de agua sanitaria. El método propuesto para optimizar la toma de muestras está basado en la identificación y monitorización de puntos críticos (PC), definidos como el inicio y el final de cada tramo de la instalación, un punto intermedio de la misma, zonas con pacientes susceptibles y zonas con recuentos altos de *Legionella* spp., que sean representativos del total de PT con el objetivo de realizar un seguimiento que nos permita tener un control periódico de la instalación.

No hemos encontrado publicaciones científicas analizando el uso de los puntos críticos para el control de instalaciones de riesgo por legionelosis, la única referencia que tenemos es la actualización del RD 487/2022 que deroga el 865/2003 (22,23).

El RD 865/2003, en base a las recomendaciones de la UNE-EN ISO 100030 IN: 2005 establecía como criterios para la prevención y el control de *Legionella* spp. en las instalaciones de ACS y AFCH realizar la determinación de *Legionella* spp. en la instalación completa con una periodicidad anual, y como mínimo, anualmente realizar una determinación de *Legionella* en muestras de agua de puntos representativos de la instalación(22,215). Para realizar el control de la instalación completa se asumían las recomendaciones para el control del estado de conservación y limpieza de los puntos terminales de la instalación, siendo estos el control mensual en un número representativo, rotatorio a lo largo del año, de los puntos terminales de la red interior (grifos y duchas), de forma que al final del año se hayan revisado todos los puntos terminales de la instalación.

Por lo tanto, no estaba establecida la metodología de muestreo basada en puntos críticos de los sistemas de distribución de agua sanitaria en los hospitales para que las muestras analizadas fueran una muestra representativa de las tasas de contaminación real.

Con La actualización de la UNE-EN ISO 100030:2017 se estableció el PPCL con el objetivo de identificar el riesgo de la instalación en base al establecimiento de puntos críticos. Además, indica una periodicidad trimestral para la frecuencia de muestreo y que el número de muestras para el análisis de *Legionella* spp. depende del tipo de establecimiento, así como de la complejidad y número de terminales que tenga la instalación e incluye siempre los puntos críticos determinados en el diagnóstico de situación. En todo caso se debe muestrear un número suficiente de puntos para que se pueda determinar un porcentaje de resultados positivos que permita valorar el riesgo de la instalación. Para calcular el número de muestras mínimas a tomar en las instalaciones se debería utilizar los criterios de la figura 10.

La versión actual del RD 487/2022 asume las recomendaciones de la UNE-EN ISO 100030:2017 el número mínimo de puntos de muestreo (ver figura 10) y establece la elección de los puntos de

muestreo como cada uno de los puntos terminales identificados (denominados PC en nuestro trabajo), dos puntos medios de la instalación, el control rutinario del depósito, los acumuladores y el circuito de retorno. En relación con los puntos terminales identificados establece que el muestreo debe ser representativo en función del objetivo concreto del muestreo según la UNE-EN ISO 100030:2017) y además, debe comprender los diferentes sectores de la instalación atendiendo al número de plantas del edificio o a la extensión horizontal de la red interior de distribución, priorizando los muestreos en duchas por tratarse de puntos de mayor exposición (anexo V apartados A y B) (23).

En consecuencia, los criterios que establecimos para identificar los puntos críticos de nuestra instalación pueden ser equiparables a las recomendaciones del nuevo RD y podrían ser guía para la implantación del nuevo RD en hospitales ya que se han tenido en cuenta no solo la selección de los puntos críticos para valorar el riesgo de la instalación sino también la estructura del edificio.

Nuestro trabajo ofrece un diseño basado en el control de PC, que sigue siendo válido con la nueva legislación (22,210). En la instalación estudiada hemos seleccionado 99 PC de un total de 869 PT, siendo el número mínimo indicado por la norma de 15 PC. No obstante, debido a las características estructurales de la instalación, así como a las tasas de contaminación por *Legionella* spp. y la presencia de zonas sensibles del hospital, como habitaciones de neumología y otras áreas con pacientes críticos más susceptibles de adquirir una infección, nuestro criterio ha sido el de incluir más PC de los mínimos establecidos. El control de instalaciones de agua sanitaria mediante la elección de PC permite obtener datos representativos de la instalación completa y detecta zonas en las que puede ser necesario aumentar los PC mejorando el diseño de puntos rotativos recomendado en el RD 865/2003, siendo especialmente notorio en edificios con menor tasa de contaminación por *Legionella* spp. como el pabellón A de nuestra instalación.

El diseño propuesto en esta tesis mediante la elección de los PC para el control de la instalación a estudio mejora el control de *Legionella* spp. con respecto al uso de puntos rotativos a lo largo del año, optimizando el número de puntos de muestreo controlados y asegurándonos la eficacia del procedimiento empleado ya que nos permite seleccionar y controlar con más frecuencia los puntos con más riesgo de diseminación de la bacteria. El criterio utilizado para la elección de los PC está respaldado por las directrices del nuevo RD 486/2022.

Una de las limitaciones del estudio es no haber valorado si el análisis del número mínimo de puntos críticos establecido en el RD 486/2022 es suficiente para el control de la instalación. Para optimizar el control de una instalación, podríamos plantear el estudio estadístico evaluando tan solo el mínimo de puntos críticos y comprobando si son representativos de la instalación completa.

Nuestro estudio difiere del nuevo RD para la prevención y control de la legionelosis en la sistemática de toma de muestras. Las muestras analizadas en este estudio se recogieron durante el período 2006-2018 siguiendo la normativa vigente en ese momento(22). La metodología de la toma de muestras realizada en nuestro estudio difiere de la del RD 487/2022 en que no incluye la recogida con torunda al mismo tiempo que la muestra de agua, sino que indica que de manera rutinaria se debe recoger la muestra de ACS con o sin purga, y en caso de que se requiera un mayor conocimiento de la contaminación por *Legionella* spp. de la instalación, se recomienda investigar su presencia en la biocapa de la instalación mediante raspado con torunda, introduciendo la torunda en un tubo estéril (209).

El otro pilar fundamental para el control de la legionelosis hospitalaria es el método de detección de *Legionella* spp. en agua sanitaria. El cultivo es el método de referencia y hasta 2017 la UNE-EN ISO 11731 solo incluía el uso de GVPC un medio altamente selectivo para la recuperación de *Legionella* spp.(209,230). Para mejorar el rendimiento en nuestro procedimiento se incluyó el medio de cultivo BCYE al protocolo de siembra.

Los métodos de recuperación de *Legionella* spp. dan resultados que dependen de la concentración de *Legionella* spp. y de la presencia de flora interferente. Nuestro procedimiento de trabajo incluía el uso de un medio selectivo (GVPC) indicado en la norma y la adición de un medio no selectivo (BCYE). Nos planteamos evaluar el rendimiento en la recuperación de *Legionella* spp. del empleo de un medio no selectivo (BCYE).

Al comparar los resultados del cultivo en BCYE y GVPC en 869 muestras positivas, nuestros resultados mostraron una mejora significativa en la recuperación de *Legionella* spp. al añadir un medio no enriquecido al análisis de agua. El medio BCYE es 1.7 veces más sensible que GVPC, y la mediana del número de colonias informadas es 2000 unidades superior ($p < 0.000$). El análisis de nuestros datos muestra que, en muestras contaminadas, ambos métodos tienen sensibilidades parecidas; aunque, en ausencia de microorganismos, el medio BCYE es 4 veces más sensible que el GVPC ($p < 0.000$).

Diversos autores han comparado la capacidad de los medios enriquecidos y selectivos para recuperar *Legionella* spp. a partir de muestras de agua. Clásicamente, los estudios publicados han mostrado que los medios selectivos como GVPC, DGVP y MWY mejoran el aislamiento de *Legionella pneumophila*, principalmente en muestras con presencia de otros microorganismos(291–293). Sin embargo, GVPC contiene glicina que puede inhibir el crecimiento de otras especies de *Legionella* spp, razón por la cual el medio BCYE se propone como mejora en el rendimiento para su recuperación(292,294,295).

Diversos estudios evalúan el cultivo de *Legionella* spp. en muestras de agua en medio BCYE y GVPC, pero la mayoría valoran la tasa de recuperación de especies distintas de *Legionella pneumophila*. Solo Ditommaso *et al.* y Scaturro *et al.* analizan el resultado de los recuentos

comparativos en medios no selectivos (BCYE) y medios selectivos (GVPC/MWY). El resto de autores encuentran que el medio BCYE mejora la recuperación de especies distintas *Legionella pneumophila* principalmente incorporando pretratamiento ácido, elevación del pH o la temperatura de incubación, o bien utilizándolo para el cultivo de muestras sin microorganismos interferentes(233,234,292,295–297).

Ditommaso *et al.* en 2011 demuestran la superioridad de BCYE en muestras sin microorganismos interferentes al utilizar BCYE para informar el recuento de *Legionella* spp. en el 93% de muestras positivas, siendo el número de UFC/L informadas mayor en BCYE que en MWY ($p < 0.001$)(295). Nuestros resultados en muestras con presencia de flora interferente mostraron que BCYE fue 4 veces superior al GVPC.

Los mismos autores corroboran los resultados en 2022, encontrando en aquellos cultivos que contienen solo *Legionella* spp. una mayor frecuencia de muestras positivas con BCYE (94,8%) en comparación con MWY (85,1%)(233).

Scaturro *et al.* también detectaron medianas de UFC/L en las placas de BCYE superiores a las detectadas en GVPC (2500 y 1350, respectivamente) ($p < 0,0001$), aunque obtienen mayor porcentaje de muestras positivas con GVPC(234). En línea con lo expresado por Ditommaso *et al.* la discordancia en los resultados podría estar relacionada en diferencias y/o errores metodológicos(233).

Nuestros resultados muestran que el rendimiento del BCYE respecto a GVPC no mejora en muestras contaminadas ($p > 0,05$), en el mismo sentido otros autores constatan el beneficio del uso de medios selectivos para el cultivo de muestras con microbiota interferente. Ditommaso *et al.* encuentran dificultad para interpretar los cultivos en BCYE en presencia de flora contaminante, situación en la que ven beneficioso el uso de MWY(233,295). TA *et al.* encuentran que el medio con mayor recuento de *Legionella pneumophila* es un medio selectivo: el DGVP (Dyes, glycine, vancomycin, and polymyxin B) ($p < 0.05$). El uso de BCYE previo tratamiento ácido muestra unos recuentos similares al DGVP, pero el BCYE no inhibe la flora interferente, por lo que en muestras contaminadas su rendimiento es inferior(292).

Está descrito por varios autores la capacidad de la glicina para inhibir especies de *Legionella non-pneumophila* y la superioridad de BCYE con pretratamiento ácido o elevación del pH y la temperatura de incubación para recuperarlas (292,294,297). Ditommaso *et al.* describen que el medio BCYE mejora la recuperación de *Legionella non-pneumophila* que crece mal en MWY, excepto cuando hay flora contaminante y dificulta la lectura en BCYE(295). TA *et al.* sostienen una mejora en la sensibilidad del BCYE previo tratamiento ácido para recuperar especies de *Legionella non-pneumophila* con respecto al resto de medios selectivos(292,294). Sin embargo, Scaturro *et al.* no encuentran beneficio en el aislamiento de especies distintas de *L. pneumophila* en BCYE(234).

Nosotros no hemos analizado las diferencias en la recuperación de las distintas especies de *Legionella* spp. en función de la flora interferente ya que nuestros datos muestran que no hay diferencia en la recuperación de *Legionella* spp. entre ambos medios en muestras con otros microorganismos.

Ditomaso *et al.* informan que MWY permitió detectar *Legionella* spp. en el 89,2% de las muestras positivas, pero en el 10,8% se encontró *Legionella* spp. únicamente en placas BCYE, siendo los recuentos generales de *Legionella* spp. significativamente mayores en BCYE ($p=0,0029$). La adición de BCYE aumentó casi un 11% los puntos terminales positivos en su serie de datos(233). En nuestra serie de datos, a diferencia de Dittomaso *et al.*, no encontramos diferencias en la recuperación de *Legionella* spp. entre BCYE y GVPC probablemente debido a las tasas de contaminación de especies de *Legionella no-pneumophila* (62,3%) en su serie, mientras que la especie más frecuentemente identificada en nuestra instalación fue *Legionella pneumophila* sg 2-14.

Sin embargo, Scaturro *et al.* ponen en duda la necesidad de añadir un medio enriquecido y afirman que GVPC fue más eficiente que BCYE al analizar muestras de agua potable. Informan que, de las 556 muestras de agua que se analizaron mediante cultivo, en 151 (27,1%) se detectó *Legionella* spp., de las cuales 65 (43%) crecieron sólo en GVPC, 85 (56,3%) crecieron tanto en GVPC como en BCYE, y una (0,7%) creció sólo en BCYE. Aunque la media de UFC/L detectadas fue superior en BCYE, la diferencia no superó un logaritmo; por lo tanto, no lo consideraron relevante para la evaluación del riesgo de *Legionella* spp., cuestionando la necesidad de utilizar placas de agar BCYE para analizar muestras de agua potable(298). Nuestros resultados muestran que la mediana en BCYE es 2000 UFC/L (más de tres logaritmos) superior a la obtenida en GVPC (p -valor 0.000). Además, el 63% de las muestras fueron informadas con el máximo recuento de colonias en el medio BCYE, lo que supone casi el doble de informes con medio BCYE que con medio GVPC, dato que consideramos relevante para el control de la instalación.

En nuestro estudio además hemos encontrado que es la siembra siguiendo el procedimiento DIL 1/10 la que muestra una mediana del número de colonias significativamente superior que con el resto de los pretratamientos (p -valor<0.05). Por lo tanto, es una opción de pretratamiento útil para instalaciones con niveles elevados de contaminación por *Legionella* spp.

Nuestro estudio muestra la utilidad del empleo del medio BCYE junto con medios selectivos para el control de las instalaciones de riesgo de contaminación por *Legionella* spp. Y eso se ha corroborado con la publicación de la última versión de la norma UNE-EN ISO 11731:2017 en la que se incluye el uso de medios selectivos y no selectivos (209).

La elección del procedimiento a seguir y de los medios de cultivo necesarios para optimizar el cultivo de *Legionella* spp. en agua sanitaria va a depender de la matriz de origen. Es necesario

conocer bien la instalación a estudio y adaptar los análisis a sus características. Los datos analizados en nuestro estudio proceden de una instalación de agua sanitaria que se abastece de la red de agua potable que se clasificaría como Matriz A según la clasificación de la UNE-EN ISO 11731:2017 (baja concentración de microorganismos interferentes). La metodología utilizada para el cultivo es la UNE-EN ISO 11731:2007 (procedimiento acreditado por ENAC) mejorada con el empleo de un medio no selectivo (BCYE) junto al indicado por la norma (GVPC). El método de cultivo de *Legionella* en aguas que desarrollamos es un procedimiento operativo similar al descrito en el apartado 8.4.3 de la nueva edición de la norma (UNE-EN ISO 11731:2017). Algunos puntos de la red tienen recuentos altos de *Legionella* spp. y/o hay presencia de microbiota interferente, y la siembra directa del filtro, a pesar de ser un método sencillo no permite realizar el recuento de *Legionella* spp. en todos los puntos de la instalación. Las muestras de este estudio fueron analizadas mediante inoculación tras filtración por membrana seguida de un proceso de elución (procedimiento similar al descrito en el apartado 8.4.3.2 de la norma UNE-EN ISO 11731:2017). La antigüedad de la instalación junto con su distribución en varios edificios favorece que en algunos puntos observemos una alta tasa de contaminación por *Legionella* spp., (identificada mayoritariamente *L. pneumophila* serogrupo 2-14) y otros microorganismos. A pesar de abastecerse de agua potable, en el 14,4% se trabajó con una muestra concentrada diluida 1/10 para que nos permitiera informar el recuento de las UFC/L de *Legionella* spp. aisladas. Además, el RD 487/2022 establece que los laboratorios de análisis de *Legionella* spp. deben acreditarse según la ISO 17025:2017 haciéndose cargo de la toma de muestras y de su cultivo según la normativa vigente. Tras la publicación de la última edición de la norma UNE-EN ISO 11731:2017, los laboratorios que analizan la presencia de *Legionella* spp. en muestras de agua deben adaptarse a los nuevos procedimientos. Nuestro estudio muestra la utilidad del empleo del medio BCYE junto con los medios selectivos para el control de las instalaciones de riesgo de contaminación por *Legionella* spp. Y eso se ha corroborado con la publicación de la última versión de la norma UNE-EN ISO 11731:2017 en la que se incluye el uso de medios selectivos y no selectivos (209).

La inclusión del medio BCYE en el análisis de agua sanitaria, tal como indica la norma UNE-EN ISO 11731:2017, está avalada por los resultados expuestos en este trabajo y por los publicados por otros autores ya mencionados(233,295). La finalidad de estos análisis es mejorar la detección de la bacteria en la instalación, por lo que deben optimizarse todos los pasos del procedimiento. La adaptación del análisis del agua de nuestra red de agua sanitaria a las nuevas directrices de la norma UNE-EN ISO 11731:2017, si se realiza mediante siembra tras filtración y elución debe emplearse un medio de cultivo no selectivo BCYE junto con un medio selectivo como GVPC.

La identificación de la especie de *Legionella* es el último paso necesario para completar el control de las instalaciones de agua sanitaria. Conocer la especie y el serogrupo es importante para valorar el riesgo de exposición ya que determinadas especies y serogrupos, como *L. pneumophila* sg 1 y *L. anisa*, están relacionados con mayor riesgo (299–302). La norma UNE-
Tesis Doctoral Universitat de València 2024

EN ISO 11731 describe un método basado en la confirmación de presuntas colonias mediante subcultivo de las mismas en agar BCYE y BCYE-cys (agar BCYE sin L-cisteína). Además, algunos autores han detectado un porcentaje de falsos positivos por encima del 2% al comparar la identificación exclusiva en función de factores nutricionales con los ensayos de aglutinación en látex y la PCR, con la consecuencia del aumento del coste de desinfección(236).

En nuestro estudio se realizó la identificación por aglutinación en látex a un total de 1002 cepas de *Legionella* spp. La especie mayoritaria fue *L. pneumophila* serogrupo 2-14 que se identificó en el 83,8% de las muestras, seguida de *Legionella* spp. en el 9,5% y por último *L. pneumophila* serogrupo 1 en el 6,7%. Una parte de los aislados identificados como *Legionella* spp. o no aglutinables (63%) se identificaron por MALDI-TOF-MS.

Existen diferentes métodos para la identificación de especies y serogrupos de *Legionella* spp. siendo el más usado la aglutinación con partículas de látex(148). En los últimos años la espectrometría de masas por MALDI-TOF-MS se ha generalizado en los laboratorios clínicos de diagnóstico microbiológico y estudios recientes utilizan la PCR y la secuenciación por SBT para el control de instalaciones hospitalarias(237).

Aunque la identificación mediante MALDI-TOF-MS no estaba incluida en la ISO 11731:2007, la última actualización de 2017 ha incluido el MALDI-TOF-MS como método de identificación. La combinación de aglutinación en látex con MALDI-TOF-MS se muestra como una buena herramienta para la identificación de cepas de *Legionella* spp. En nuestra serie de datos, la identificación por MALDI-TOF-MS de las cepas identificadas como *Legionella no-pneumophila* nos permite identificar más de 98% de las cepas estudiadas. Varios estudios confirman el uso de MALDI-TOF-MS como una buena herramienta para la identificación de especies de *Legionella* spp. citando la importancia de tener una base de datos robusta con la que compararnos(163,165,240).

Hay autores que proponen la identificación directa con MALDI-TOF-MS de las colonias sospechosas, sin comprobar la necesidad de cisteína como factor nutricional, para mejorar el tiempo de respuesta y proponen la inclusión de la identificación MALDI-TOF-MS a la ISO11731 como método de identificación alternativo(239).

No obstante, no hay que olvidar la importancia de la identificación del serogrupo y que esta información no puede obtenerse de la espectrometría de masas. Por lo que sería posible plantear un nuevo algoritmo diagnóstico basado en pruebas rápidas de identificación bacteriana a partir del cultivo que permitan adelantar los resultados como podría ser la identificación de colonias sospechosas mediante MALDI-TOF-MS seguida del serotipado de *L. pneumophila* mediante aglutinación en látex. La implantación de este procedimiento requeriría una modificación de la norma si se realiza con un procedimiento acreditado tal y como requiere el RD 487/2022.

L. pneumophila serogrupo 1 es la más implicada en infección humana y también es la más distribuida en el ambiente, por lo que la identidad de especie y serogrupo no será suficiente para implicar una cepa aislada de agua /ambiente como causante de un brote de legionelosis. Por ello, resulta imprescindible tipificar las cepas procedentes de los pacientes y las ambientales, mediante su estudio genotípico(4). La epidemiología molecular es, en estos casos, de gran interés para corroborar la hipótesis establecida inicialmente y adoptar medidas de prevención eficaces.

El genotipado por SBT es el método de referencia, y a pesar de sus limitaciones, se utiliza en el análisis de brotes y casos de legionelosis para identificar la fuente de infección en estudios epidemiológicos y además podría ser útil para caracterizar con detalle la dinámica de *Legionella* spp. en instalaciones con riesgo de diseminación de la bacteria con el objetivo de apoyar el control de infecciones nosocomiales y facilitar una respuesta rápida durante la investigación epidemiológica mediante la comparación genómica con casos clínicos(237).

En la serie de datos analizada en la instalación de estudio la ST1362 fue la más frecuente todos los años estudiados, excepto en 2014 que predomina la ST1. La ST1 está presente en todos los edificios, principalmente en el pabellón C, donde es la única ST aislada en el año 2014.

Los datos del esquema de tipado basado en secuencia (SBT) de la base de datos de ESGLI revela que un pequeño subconjunto de ST representa un número desproporcionadamente alto de casos clínicos. En particular, cinco ST (1, 23, 37, 47 y 62) han representado casi la mitad de todos los casos de legionelosis sin relación epidemiológica en el noroeste de Europa informados a la base de datos SBT(272).

Durante el periodo analizado no se ha detectado ningún caso de legionelosis nosocomial a pesar de detectar la ST1 en las muestras de agua sanitaria analizadas. Posiblemente se deba al bajo número de puntos positivos (13/61). Los resultados obtenidos con el genotipado nos ayudan en el control de la instalación. Conocer la presencia y la ubicación de las ST más virulentas nos indica los puntos sobre los que debemos ejercer más control (aumentar los puntos de muestreo o acortar el tiempo entre cultivos) e intensificar los tratamientos de desinfección.

Los resultados de las cepas analizadas mostraron que en la instalación estudiada, los tratamientos de descontaminación realizados aunque disminuyen la cantidad de *Legionella* spp. detectada y alteran la diversidad genética de las cepas de *L.pneumophila* no lo hacen de forma mantenida en el tiempo. Se ha descrito la efectividad del dióxido de cloro como desinfectante eficaz y seguro y también, su capacidad para inactivar *Legionella* spp(303,304). Es destacable el hecho de que el tratamiento con dióxido de cloro haya propiciado la prevalencia de la ST1

sobre la ST1362. Parece que el uso de desinfectantes permite detectar la ST1 al disminuir la cantidad de *Legionella no-pneumophila* y de otras bacterias contaminantes. Recientemente *Ji et al.* no encuentran variaciones estadísticamente significativas en la microbiota de la red de agua estudiada tras tratamiento con choque térmico de la misma. Si observan una disminución en la cantidad de *Legionella* spp. presente pero no se mantiene en el tiempo. Sin embargo la disminución de la cantidad de *Legionella* spp. si se mantiene al aumentar de manera constante la temperatura del agua a 60°C(305). *Casini et al.* analizaron procedimientos de desinfección que incluían cloración continua con dióxido de cloro reforzada por filtración de punto final en áreas críticas y un tratamiento de agua a base de monoclóramina. Después de 9 años, a pesar de la disminución del porcentaje de puntos de muestreo positivo, la aparición de un clon tolerante al cloro perteneciente a *Legionella pneumophila* ST269 les hizo probar un nuevo desinfectante. El cambio a monoclóramina permitió eliminar la *Legionella* spp. planctónica y no requirió filtración de punto final adicional; sin embargo, detectaron con mayor frecuencia micobacterias no tuberculosas se aislaron lo que hizo que aumentaran la concentración hasta 3 mg/L(306).

Diferentes autores abogan por extender el uso del genotipado para investigar la posible incidencia cambiante de las ST y la virulencia de las cepas emergentes o grupos clonales en las cepas ambientales(307).

Recientemente *Girolamini et al.* aplican un enfoque de genotipo basado en SBT durante la vigilancia rutinaria de la *Legionella* spp. en un sistema de distribución de agua caliente del hospital para evaluar la contaminación de *Legionella* spp. durante un período de siete años tratando con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y sales de plata (Ag⁺) (H₂O₂/Ag⁺). Los autores observan una disminución de la contaminación por *Legionella* spp. tras aplicar tratamiento con sales de plata, pero no hay cambios en las ST detectadas. Concluyen que el conocimiento adquirido les permite crear un mapa de riesgo de *Legionella* spp. para cada edificio, que podría apoyar el control de infecciones nosocomiales, el mantenimiento y las estrategias de desinfección de los sistemas de distribución de agua, así como facilitar una respuesta rápida durante la investigación epidemiológica mediante la comparación genómica con casos clínicos(237).

CONCLUSIONES GENERALES

1. El criterio de elección de puntos críticos propuesto en nuestro estudio para el control de instalaciones de agua sanitaria, basado en el uso de los puntos de inicio y fin de cada tramo de tubería, puntos intermedios, zonas con pacientes de riesgo y con determinaciones de *Legionella* spp. positivas previas, se ha mostrado muy útil para establecer los criterios de selección de los puntos a muestrear y permite que los resultados obtenidos sean representativos de las tasas de contaminación real de la instalación.
2. La utilización de muestras de los puntos críticos permite mejorar o igualar la recuperación de *Legionella* spp. con respecto a los puntos terminales. El análisis comparativo de una determinación por instalación completa (puntos terminales) a lo largo del tiempo de estudio (puntos críticos), es representativo de la instalación completa (incluyendo su estructura) y nos permite conocer la distribución de *Legionella* spp. en la instalación. Por lo que la selección de los puntos críticos tal y como hemos planteado en este estudio, en comparación con los puntos terminales, es muy útil para valorar el riesgo de legionelosis en las instalaciones hospitalarias, en línea con los requisitos establecidos en el RD 486/2022.
3. El medio BCYE resultó ser más sensible que el medio GVPC, proporcionando una alta tasa de recuperación en muestras positivas. La adición de un medio enriquecido (BCYE) mejora la detección de *Legionella* spp. en muestras de agua potable con baja contaminación. No encontramos diferencias significativas entre ambos medios en muestras con presencia elevada de microbiota interferente.
4. La especie mayoritariamente aislada en las muestras de nuestro estudio ha sido *Legionella pneumophila* (90,5%), siendo el serogrupo mayoritario el 2-14 (83,8%).
5. La identificación de las colonias bacterianas en función de sus requerimientos nutricionales mediante la selección tras cultivo en medios sin cisteína, permite hacer una identificación presuntiva de *Legionella* spp. La confirmación y clasificación mediante aglutinación en látex es un método fácil y cómodo que permite detectar las cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1. Sin embargo, MALDI-TOF-MS permitió identificar los aislados de *L. pneumophila* no serotipables mediante inmunoaglutinación, así como otras especies de *Legionella* no-*pneumophila*. Por lo que concluimos que, los métodos rápidos de identificación bacteriana como el MALDI-TOF-MS deben estar presentes en el algoritmo diagnóstico en los laboratorios de microbiología que realicen análisis de *Legionella* spp.
6. El estudio genotípico de instalaciones hospitalarias mediante *sequence-based-typing* (SBT), permite mejorar el conocimiento y el control de la instalación estudiada con el objetivo de mejorar el control de infecciones nosocomiales y facilitar una respuesta rápida durante la investigación epidemiológica, mediante la comparación genómica de las cepas ambientales con las procedentes de los casos clínicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Edelstein P, Roy C. Enfermedad de los legionarios y fiebre de Pontiac. In: Bennett J, editor. Enfermedades infecciosas Principios y prácticas. 9th ed. Barcelona: Elsevier; 2020. p. 2807–17.
2. McDade, J.E., C.C. Shepard, D. W. Fraser, t. R. Tsai, M.A. Redus WRDowdle. Legionnaires' disease: Isolation of a bacterium and demonstration of its role on other respiratory disease. N Engl J Med. 1977;297:1197-1203.
3. Osterholm MT, Chin TD, Osborne DO, Dull HB, Dean AG, Fraser DW, et al. A 1957 outbreak of Legionnaires' disease associated with a meat packing plant. Am J Epidemiol. 1983;117(1):60–7.
4. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and legionnaires' disease: 25 Years of investigation. Vol. 15, Clin Microbiol Rev. 2002. p. 506–26.
5. Drozanski W. Fatal bacterial infection in soil amoebae. Acta Microbiol Pol . 1956;5:315–7.
6. Hookey J V., Saunders NA, Fry NK, Birtles RJ, Harrison TG. Phylogeny of *Legionellaceae* Based on Small-Subunit Ribosomal DNA Sequences and Proposal of *Legionella lytica* comb. nov. for *Legionella*-Like Amoebal Pathogens. Int J Syst Bacteriol [Internet]. 1996 Apr 1;46(2):526–31. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-46-2-526>
7. Van Steenberghe JE, Slijkerman FAN, Speelman P. The first 48 hours of investigation and intervention of an outbreak of legionellosis in the Netherlands. Eurosurveillance [Internet]. 1999 Nov 1;4(11):111–5. Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/esm.04.11.00059-en>
8. Greig JE, Carnie JA, Tallis GF, Zwolak B, Hart WG, Guest CS, et al. An outbreak of Legionnaires' disease at the Melbourne Aquarium, April 2000: investigation and case-control studies. Medical Journal of Australia [Internet]. 2004 Jun 7;180(11):566–72. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.5694/j.1326-5377.2004.tb06093.x>
9. Outbreak of Legionnaires' disease in the Lisbon area. 13 November 2014. Stockholm. European Centre for Disease Prevention and Control [Internet]. 2014 Nov 13 [cited 2024 Jan 25]; Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/legionnaires-disease-portugal-RRA-14-nov-2014.pdf>
10. Russo A, Gouveia CM, Soares PMM, Cardoso RM, Mendes MT, Trigo RM. The unprecedented 2014 Legionnaires' disease outbreak in Portugal: atmospheric driving mechanisms. Int J Biometeorol. 2018 Jul 1;62(7):1167–79.
11. Cebrián F, Montero JC, Fernández PJ. New approach to environmental investigation of an explosive legionnaires' disease outbreak in Spain: Early identification of potential risk sources by rapid *Legionella* spp immunosensing technique. BMC Infect Dis. 2018 Dec 27;18(1).
12. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014 –Respiratory tract infections. Stockholm. ECDC [Internet]. 2014 [cited 2024 Jan 25]; Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/Respiratory-tract-infections-annual-epidemiological-report-2014.pdf>
13. Surveillance Atlas of Infectious Diseases - Legionnaires disease [Internet]. [cited 2020 May 23]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/legionnaires-disease/surveillance/atlas>
14. Panic M, Ford JD. A Review of National-Level Adaptation Planning with Regards to the Risks Posed by Climate Change on Infectious Diseases in 14 OECD Nations. Int J Environ Res Public Health. 2013;10:7083–109.
15. Cissé G. Food-borne and water-borne diseases under climate change in low- and middle-income countries: Further efforts needed for reducing environmental health exposure risks. Acta Trop [Internet]. 2019 Jun [cited 2020 May 23];194:181–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X18309525>

16. Boyd JF, Buchanan WM, MacLeod TI, Dunn RI, Weir WP. Pathology of five Scottish deaths from pneumonic illnesses acquired in Spain due to Legionnaires' disease agent. *J Clin Pathol* [Internet]. 1978 Sep 1;31(9):809–16. Available from: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.31.9.809>
17. Brote de neumonía por *Legionella* en Almuñecar. *Bol Microbiol Sem.* 1991;48:2–4.
18. Informe del brote de neumonía por *Legionella* de Alcalá de Henares. Vol. 14, *Bol. Epidemiol. Sem.* . 1997.
19. Jansà JM, Caylà JA, Ferrer D, Gracia J, Pelaz C, Salvador M, et al. An outbreak of Legionnaires' disease in an inner city district: importance of the first 24 hours in the investigation. *Int J Tuberc Lung Dis* [Internet]. 2002 Sep;6(9):831–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12234140>
20. García-Fulgueiras A, Navarro C, Fenoll D, García J, González-Diego P, Jiménez-Buñuales T, et al. Legionnaires' Disease Outbreak in Murcia, Spain. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2003 Aug;9(8):915–21. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/9/8/03-0337_article.htm
21. Real Decreto 909/2001, de 27 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. [Internet]. Boletín Oficial del Estado «BOE» núm. 180 España: Boletín Oficial de Estado; Jul 28, 2001 p. 27750–9. Available from: <https://www.boe.es/eli/es/rd/2001/07/27/909>
22. 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 [Internet]. BOE España: Ministerio de Sanidad y Consumo; Jul 4, 2003 p. 21. Available from: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2003/BOE-A-2003-14408-consolidado.pdf>
23. Real Decreto 487/2022, de 21 de junio, por el que se establecen los requisitos sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis. Ministerio de Sanidad; Jun 22, 2022.
24. ECDC [Internet]. [cited 2024 Jan 25]. European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet). Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/eldsnet>
25. European Centre for Disease Prevention and Control, European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet). Operating procedures for the surveillance of travel-associated Legionnaires' disease in the EU/EEA. ECDC. Stockholm; 2017.
26. Brenner DJ. Classification of the Legionnaires' Disease Bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the Family *Legionellaceae*, familia nova. *Ann Intern Med* [Internet]. 1979 Apr 1;90(4):656. Available from: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-90-4-656>
27. Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. Approved Lists of Bacterial Names. *Int J Syst Bacteriol.* 1980;30:225–420.
28. Garrity GM, Brown A, Vickers RM. Tatlockia and Fluoribacter: Two New Genera of Organisms Resembling *Legionella pneumophila*. *Int J Syst Bacteriol* [Internet]. 1980 Oct 1;30(4):609–14. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-30-4-609>
29. Brown A, Garrity GM, Vickers RM. Fluoribacter dumoffii (Brenner et al.) comb. nov. and Fluoribacter gormanii (Morris et al.) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* [Internet]. 1981 Apr 1;31(2):111–5. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-31-2-111>
30. Fry NK, Warwick S, Saunders NA, Embley TM. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. *J Gen Microbiol* [Internet]. 1991 May 1;137(5):1215–22. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-137-5-1215>
31. Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, et al. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet* [Internet]. 2004 Nov 3;36(11):1165–73. Available from: <https://www.nature.com/articles/ng1447>
32. Cazalet C, Jarraud S, Ghavi-Helm Y, Kunst F, Glaser P, Etienne J, et al. Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. *Genome Res* [Internet]. 2008 Mar;18(3):431–41. Available from: <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.7229808>

33. Gress FM, Myerowitz RL, Pasculle AW, Rinaldo CR, Dowling JN. The ultrastructural morphologic features of Pittsburgh pneumonia agent. *Am J Pathol* [Internet]. 1980 Oct;101(1):63–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7446702>
34. Greer PW, Chandler FW, Hicklin MD. Rapid Demonstration of *Legionella pneumophila* in Unembedded Tissue: An Adaptation of the Giménez Stain. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1980 Jun 1;73(6):788–90. Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1093/ajcp/73.6.788>
35. Van Orden A GP. Modification of the Dieterle spirochete strain. . *Histio technology* . 1977;1:51–3.
36. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2002 Jul [cited 2020 May 23];15(3):506–26. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.15.3.506-526.2002>
37. Priest PC, Slow S, Chambers ST, Cameron CM, Balm MN, Beale MW, et al. The burden of Legionnaires' disease in New Zealand (LegiNZ): a national surveillance study. *Lancet Infect Dis*. 2019 Jul 1;19(7):770–7.
38. Chambers ST, Slow S, Scott-thomas A, Murdoch DR. Legionellosis Caused by Non-*Legionella pneumophila* Species, with a Focus on *Legionella longbeachae*. *Microorganisms* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2023 Dec 5];9(2):1–18. Available from: </pmc/articles/PMC7910863/>
39. Ruehle SA CGR. Panic in the potting shed: the association between *Legionella longbeache* serogroup 1 and potting soils in Australia. . *Infect Immun*. 1996;164:36–8.
40. Katz SM, Hammel JM. The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Ann Clin Lab Sci* [Internet]. 1987;17(3):150–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3606021>
41. Borges V, Nunes A, Sampaio DA, Vieira L, Machado J, Simões MJ, et al. *Legionella pneumophila* strain associated with the first evidence of person-to-person transmission of Legionnaires' disease: A unique mosaic genetic backbone. *Sci Rep*. 2016 May 19;6.
42. Fields BS. The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol* [Internet]. 1996 Jul;4(7):286–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0966842X9610041X>
43. Boamah DK, Zhou G, Ensminger AW, O'Connor TJ. From many hosts, one accidental pathogen: The diverse protozoan hosts of *Legionella*. Vol. 7, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
44. Cano Portero R, Martín Mesonero C, Pelaz Antolín C. Brote de legionelosis notificados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Años 1999 a 2011. *Boletín Epidemiológico Semanal* [Internet]. 2010 Oct 10 [cited 2024 Jan 26];Vol. 18 Núm. 17.(semanas 38-39). Available from: <https://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/240>
45. Muder RR, Yu VL. Infection due to *Legionella* species other than *Legionella pneumophila*. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2002 Oct 15 [cited 2023 Dec 7];35(8):990–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12355387/>
46. Proctor CR, Rhoads WJ, Keane T, Salehi M, Hamilton K, Pieper KJ, et al. Considerations for large building water quality after extended stagnation. *AWWA Water Sci* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2023 Dec 7];2(4). Available from: </pmc/articles/PMC7323006/>
47. Rhoads WJ, Sindelar M, Margot C, Graf N, Hammes F. Variable *Legionella* Response to Building Occupancy Patterns and Precautionary Flushing. *Microorganisms* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2023 Dec 7];10(3). Available from: </pmc/articles/PMC8950775/>
48. Llewellyn AC, Lucas CE, Roberts SE, Brown EW, Nayak BS, Raphael BH, et al. Distribution of *Legionella* and bacterial community composition among regionally diverse US cooling towers. *PLoS One* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2023 Dec 7];12(12). Available from: </pmc/articles/PMC5738086/>
49. Logan-Jackson AR, Rose JB. Water Age Effects on the Occurrence and Concentration of *Legionella* Species in the Distribution System, Premise Plumbing, and the Cooling Towers. *Microorganisms* [Internet]. 2021 Dec 31 [cited 2023 Dec 7];10(1):81. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/1/81>
50. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and legionnaires' disease: 25 Years of investigation. Vol. 15, *Clinical Microbiology Reviews*. 2002. p. 506–26.
51. Hahn MW, Håffle MG. Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*. 2001 Apr;35(2):113–21.

52. Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, Abu Kwaik Y. Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Jan;71(1):20–8.
53. Greub G, Raoult D. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clin Microbiol Rev*. 2004 Apr;17(2):413–33.
54. Rowbotham TJ. Preliminary report on pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Clin Pathol*. 1980;33:1179–83.
55. Hagele S, Kohler R, Merkert H, Schleicher M, Hacker J, Steinert M. Dictyostelium discoideum: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cell Microbiol* [Internet]. 2000 Apr;2(2):165–71. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1462-5822.2000.00044.x>
56. Fields BS. The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol*. 1996;4:286–90.
57. Hugenholtz P, Tyson GW. Microbiology: metagenomics. *Nature*. 2008 Sep 24;455(7212):481–3.
58. Gomez-Alvarez V, Teal TK, Schmidt TM. Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. *ISME J*. 2009 Nov 9;3(11):1314–7.
59. Hojo F, Sato D, Matsuo J, Miyake M, Nakamura S, Kunichika M, et al. Ciliates Expel Environmental *Legionella*-Laden Pellets To Stockpile Food. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Aug 1;78(15):5247–57.
60. Denoncourt AM, Paquet VE, Charette SJ. Potential role of bacteria packaging by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria. *Front Microbiol*. 2014 May 21;5.
61. Rowbotham TJ. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J Clin Pathol* [Internet]. 1983 Sep 1;36(9):978–86. Available from: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.36.9.978>
62. Rowbotham TJ. Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr J Med Sci*. 1986;22:678–89.
63. Amaro F, Wang W, Gilbert JA, Roger Anderson O, Shuman HA. Diverse protist grazers select for virulence-related traits in *Legionella*. *ISME Journal*. 2015 Jul 24;9(7):1607–18.
64. Berk SG, Ting RS, Turner GW, Ashburn RJ. Production of Respirable Vesicles Containing Live *Legionella pneumophila* Cells by Two *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1998 Jan [cited 2020 May 26];64(1):279–86. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.64.1.279-286.1998>
65. Barker J, Lambert PA, Brown MR. Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*. 1993 Aug;61(8):3503–10.
66. Rowbotham TJ. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J Clin Pathol*. 1983 Sep 1;36(9):978–86.
67. Rowbotham TJ. Pontiac Fever, amoebae an Legionellae. *The Lancet* [Internet]. 1981 Jan 3 [cited 2020 May 27];317(8210):40–1. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673681901410>
68. Newsome AL, Farone MB, Berk SG, Gunderson JH. Free Living Amoebae as Opportunistic Hosts for Intracellular Bacterial Parasites. *Journal of Eukaryotic Microbiology* [Internet]. 2001 Jun 11 [cited 2020 May 27];48(s1):13s–4s. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00436.x>
69. Skinner AR, Anand CM, Malic A, Kurtz JB. Acanthamoebae and environmental spread of *Legionella pneumophila*. *The Lancet* [Internet]. 1983 Jul 30 [cited 2020 May 27];322(8344):289–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673683902775>
70. Taylor M, Ross K, Bentham R. *Legionella*, protozoa, and biofilms: Interactions within complex microbial systems. Vol. 58, *Microbial Ecology*. *Microb Ecol*; 2009. p. 538–47.
71. Valster RM, Wullings BA, Van Der Kooij D. Detection of protozoan hosts for *Legionella pneumophila* in engineered water systems by using a biofilm batch test. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Nov;76(21):7144–53.
72. Liu R, Yu Z, Guo H, Liu M, Zhang H, Yang M. Pyrosequencing analysis of eukaryotic and bacterial communities in faucet biofilms. *Science of the Total Environment*. 2012 Oct 1;435–436:124–31.
73. Declerck P, Behets J, Van Hoef V, Ollevier F. Replication of *Legionella pneumophila* in floating biofilms. *Curr Microbiol*. 2007 Nov;55(5):435–40.

74. Hsu BM, Huang CC, Chen JS, Chen NH, Huang J Te. Comparison of potentially pathogenic free-living amoeba hosts by *Legionella* spp. in substrate-associated biofilms and floating biofilms from spring environments. *Water Res.* 2011;45(16):5171–83.
75. Mraz AL, Weir MH. Knowledge to Predict Pathogens: *Legionella pneumophila* Lifecycle Systematic Review Part II Growth within and Egress from a Host Cell. *Microorganisms* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2023 Dec 12];10(1). Available from: /pmc/articles/PMC8780890/
76. Hemmerling C, Labrosse A, Ruess L, Steinert M. *Legionella pneumophila* and Free-Living Nematodes: Environmental Co-Occurrence and Trophic Link. *Microorganisms* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2023 Dec 12];11(3). Available from: /pmc/articles/PMC10056204/
77. Stewart CR, Muthye V, Cianciotto NP. *Legionella pneumophila* Persists within Biofilms Formed by *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium* sp., and *Pseudomonas fluorescens* under Dynamic Flow Conditions. *PLoS One.* 2012 Nov 21;7(11).
78. Watnick P, Kolter R. Biofilm, City of Microbes. *J Bacteriol.* 2000 May 15;182(10):2675–9.
79. Temmerman R, Vervaeren H, Nosedá B, Boon N, Verstraete W. Necrotrophic Growth of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2006 Jun;72(6):4323–8. Available from: <https://AEM.asm.org/content/72/6/4323>
80. Allison DG. The Biofilm Matrix. *Biofouling* [Internet]. 2003 Apr;19(2):139–50. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0892701031000072190>
81. Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms: Table 1. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2000 Dec;24(5):661–71. Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00565.x>
82. Abu Khweek A, Amer AO. Factors mediating environmental biofilm formation by *Legionella pneumophila*. Vol. 8, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
83. Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee J V., Keevil CW. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(5):1585–92.
84. Declerck P. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol.* 2010 Mar;12(3):557–66.
85. Rowbotham TJ. Preliminary report on pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Clin Pathol* . 1980;33:1179–83.
86. Chaabna Z, Forey F, Reyrolle M, Jarraud S, Atlan D, Fontvieille D, et al. Molecular diversity and high virulence of *Legionella pneumophila* strains isolated from biofilms developed within a warm spring of a thermal spa. *BMC Microbiol.* 2013;13.
87. Abu Khweek A, Fernández Dávila NS, Caution K, Akhter A, Abdulrahman BA, Tazi M, et al. Biofilm-derived *Legionella pneumophila* evades the innate immune response in macrophages. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:18.
88. Atlas RM. *Legionella*: From environmental habitats to disease pathology, detection and control. Vol. 1, *Environmental Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd.; 1999. p. 283–93.
89. Hoffman PS. Invasion of eukaryotic cells by *Legionella pneumophila*: A common strategy for all hosts? *The Canadian Journal of Infectious Diseases.* 1997;8(3):139.
90. Storey M V., Winięcka-Krusnell J, Ashbolt NJ, Stenström TA. The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant Acanthamoebae and Legionellae. *Scand J Infect Dis.* 2004;36(9):656–62.
91. Wéry N, Bru-Adan V, Minervini C, Delgènes JP, Garrelly L, Godon JJ. Dynamics of *Legionella* spp. and bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in a cooling tower facility. *Appl Environ Microbiol.* 2008 May;74(10):3030–7.
92. Murga R, Forster TS, Brown E, Pruckler JM, Fields BS, Donlan RM. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology (N Y).* 2001;147(11):3121–6.
93. Moritz MM, Flemming HC, Wingender J. Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *Int J Hyg Environ Health.* 2010 Jun;213(3):190–7.
94. Mampel J, Spirig T, Weber SS, Haagensen JAJ, Molin S, Hilbi H. Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Apr;72(4):2885–95.

95. Declerck P, Behets J, Delaedt Y, Margineanu A, Lammertyn E, Ollevier F. Impact of non-*Legionella* bacteria on the uptake and intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *Microb Ecol.* 2005 Nov;50(4):536–49.
96. Shrout JD, Nerenberg R. Monitoring Bacterial Twitter: Does Quorum Sensing Determine the Behavior of Water and Wastewater Treatment Biofilms? *Environ Sci Technol* [Internet]. 2012 Feb 21;46(4):1995–2005. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es203933h>
97. Andreozzi E, Di Cesare A, Sabatini L, Chessa E, Sisti D, Rocchi M, et al. Role of Biofilm in Protection of the Replicative Form of *Legionella pneumophila*. *Curr Microbiol* [Internet]. 2014 Dec 15;69(6):769–74. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-014-0648-y>
98. Laganà P, Facciola A, Palermo R, Delia S. Environmental surveillance of legionellosis within an Italian university hospital—results of 15 years of analysis. *Int J Environ Res Public Health.* 2019 Apr 1;16(7).
99. Sabria M, Yu VL. Hospital-acquired legionellosis: Solutions for a preventable infection. Vol. 2, *Lancet Infectious Diseases*. Lancet Publishing Group; 2002. p. 368–73.
100. Sánchez-Busó L, Guiral S, Crespi S, Moya V, Camaró ML, Olmos MP, et al. Genomic investigation of a legionellosis outbreak in a persistently colonized hotel. *Front Microbiol.* 2016;6(JAN).
101. Götz HM, Tegnell A, De Jong B, Broholm KA, Kuusi M, Kallings I, et al. A whirlpool associated outbreak of Pontiac fever at a hotel in Northern Sweden. *Epidemiol Infect.* 2001 Apr;126(2):241–7.
102. Horwitz MA. Formation of a novel phagosome by the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *Journal of Experimental Medicine.* 1983 Oct 1;158(4):1319–31.
103. Cirillo JD, Cirillo SLG, Yan L, Bermudez LE, Falkow S, Tompkins LS. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* 1999;67(9):4427–34.
104. Garduño RA. Life Cycle, Growth Cycles and Developmental Cycle of *Legionella pneumophila*. In: *Legionella pneumophila*. Springer US; 2007. p. 65–84.
105. Garduño RA, Chong A. The *Legionella pneumophila* Chaperonin 60 and the Art of Keeping Several Moonlighting Jobs. In 2013. p. 143–60.
106. Garduño RA, Chong A, Faulkner G, Heuner Klaus, Swanson Michele. Developmental cycle—differentiation of *Legionella pneumophila*. In: *Legionella : molecular microbiology*. Caister Academic Press; 2008. p. 55–73.
107. Garduño RA, Garduño E, Hiltz M, Hoffman PS. Intracellular Growth of *Legionella pneumophila* Gives Rise to a Differentiated Form Dissimilar to Stationary-Phase Forms. *Infect Immun.* 2002 Nov;70(11):6273–83.
108. Garduño RA, Quinn FD, Hoffman PS. HeLa cells as a model to study the invasiveness and biology of *Legionella pneumophila*. *Can J Microbiol.* 1998 May 1;44(5):430–40.
109. Al-Bana BH, Haddad MT, Garduño RA. Stationary phase and mature infectious forms of *Legionella pneumophila* produce distinct viable but non-culturable cells. *Environ Microbiol.* 2014 Feb;16(2):382–95.
110. Robertson P, Abdelhady H, Garduño RA. The many forms of a pleomorphic bacterial pathogen—the developmental network of *Legionella pneumophila*. Vol. 5, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2014. p. 670.
111. Abdelhady H, Garduño RA. The progeny of *Legionella pneumophila* in human macrophages shows unique developmental traits. *FEMS Microbiol Lett.* 2013 Dec;349(2):99–107.
112. Oliva G, Sahr T, Buchrieser C. The life cycle of *L. pneumophila*: Cellular differentiation is linked to virulence and metabolism. Vol. 8, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
113. Molofsky AB, Swanson MS. Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol.* 2004 Jun 4;53(1):29–40.
114. Bruggemann H, Hagman A, Jules M, Sismeiro O, Dillies MA, Gouyette C, et al. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol.* 2006 Aug;8(8):1228–40.

115. Steinert M, Heuner K, Buchrieser C, Albert-Weissenberger C, Glöckner G. *Legionella* pathogenicity: Genome structure, regulatory networks and the host cell response. *International Journal of Medical Microbiology*. 2007 Nov;297(7–8):577–87.
116. Steinert M, Emödy L, Amann R, Hacker J. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol*. 1997 May;63(5):2047–53.
117. Hilbi H, Hoffmann C, Harrison CF. *Legionella* spp. outdoors: colonization, communication and persistence. *Environ Microbiol Rep*. 2011 Jun;3(3):286–96.
118. Cazalet C, Gomez-Valero L, Rusniok C, Lomma M, Dervins-Ravault D, Newton HJ, et al. Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. *PLoS Genet*. 2010;6(2).
119. Faucher SP, Mueller CA, Shuman HA. *Legionella Pneumophila* Transcriptome during Intracellular Multiplication in Human Macrophages. *Front Microbiol*. 2011;2.
120. Misch EA. *Legionella* virulence factors and host response. *Curr Opin Infect Dis*. 2016;29(3):280–6.
121. Cianciotto NP. Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology*. 2001;291(5):331–43.
122. Bellinger-Kawahara C, Horwitz MA. Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 1990 Oct 1;172(4):1201–10.
123. Weissgerber P, Faigle M, Northoff H, Neumeister B. Investigation of mechanisms involved in phagocytosis of *Legionella pneumophila* by human cells. *FEMS Microbiol Lett*. 2003 Feb 28;219(2):173–9.
124. Cianciotto NP, Fields BS. *Legionella pneumophila* mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(11):5188–91.
125. Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Toews GB, Engleberg NC. A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect Immun*. 1989;57(4):1255–62.
126. Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene. *J Clin Microbiol*. 1998 Jun;36(6):1560–7.
127. Cirillo SLG, Yan L, Littman M, Samrakandi MM, Cirillo JD. Role of the *Legionella pneumophila* rtxA gene in amoebae. *Microbiology (N Y)*. 2002;148(6):1667–77.
128. D'Auria G, Jiménez N, Peris-Bondia F, Pelaz C, Latorre A, Moya A. Virulence factor rtx in *Legionella pneumophila*, evidence suggesting it is a modular multifunctional protein. *BMC Genomics*. 2008 Jan 14;9(1):14.
129. Boshuizen HC, Neppelenbroek SE, van Vliet H, Schellekens JFP, Boer JW den, Peeters MF, et al. Subclinical *Legionella* Infection in Workers Near the Source of a Large Outbreak of Legionnaires Disease . *J Infect Dis*. 2001 Aug 15;184(4):515–8.
130. Rudbeck M, Mølbak K, Uldum S. High prevalence of antibodies to *Legionella* spp. in Danish blood donors. A study in areas with high and average incidence of Legionnaires' disease. *Epidemiol Infect*. 2008 Feb;136(2):257–62.
131. Borella P, Bargellini A, Marchesi I, Rovesti S, Stancanelli G, Scaltriti S, et al. Prevalence of anti-*Legionella* antibodies among Italian hospital workers. *Journal of Hospital Infection*. 2008 Jun;69(2):148–55.
132. Modi A, Gardner J, Lighton L, Coetzee N. Pontiac fever outbreak associated with a spa-pool, United Kingdom, April 2008. *Euro Surveill*. 2008 Jul 24;13(30):18934.
133. Luttichau HR, Vinther C, Uldum SA, Moller J, Faber M, Jensen JS. An Outbreak of Pontiac Fever Among Children Following Use of a Whirlpool. *Clinical Infectious Diseases*. 1998 Jun;26(6):1374–8.
134. Kaufmann AF, Mcdade JE, Patton CM, Bennett J V., Skaliy P, Feeley JC, et al. Pontiac fever: Isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. *Am J Epidemiol*. 1981;114(3):337–47.
135. Euser SM, Pelgrim M, Den Boer JW. Legionnaires' disease and Pontiac fever after using a private outdoor whirlpool spa. *Scand J Infect Dis*. 2010 Dec;42(11–12):910–6.
136. Ward M, Boland M, Nicolay N, Murphy H, McElhiney J, Collins C, et al. A Cluster of Legionnaires' Disease and Associated Pontiac Fever Morbidity in Office Workers, Dublin,

- June-July 2008. J Environ Public Health [Internet]. 2010 [cited 2020 May 27];2010:1–5. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jep/2010/463926/>
137. Cordes LG, Fraser DW. Legionellosis. Legionnaires' disease; Pontiac fever. Medical Clinics of North America. 1980;64(3):395–416.
 138. Götz HM, Tegnell A, De Jong B, Broholm KA, Kuusi M, Kallings I, et al. A whirlpool associated outbreak of Pontiac fever at a hotel in Northern Sweden. Epidemiol Infect. 2001 Apr;126(2):241–7.
 139. Huhn GD, Adam B, Ruden R, Hilliard L, Kirkpatrick P, Todd J, et al. Outbreak of Travel-Related Pontiac Fever among Hotel Guests Illustrating the Need for Better Diagnostic Tests. J Travel Med. 2006 Mar 8;12(4):173–9.
 140. Fields BS, Haupt T, Davis JP, Arduino MJ, Miller PH, Butler JC. Pontiac Fever Due to *Legionella micdadei* from a Whirlpool Spa: Possible Role of Bacterial Endotoxin. J Infect Dis. 2001 Nov 15;184(10):1289–92.
 141. Jones TF, Benson RF, Brown EW, Rowland JR, Crosier SC, Schaffner W. Epidemiologic Investigation of a Restaurant-Associated Outbreak of Pontiac Fever. Clinical Infectious Diseases. 2003 Nov 15;37(10):1292–7.
 142. Fenstersheib MD, Miller M, Diggins C, Liska S, Detwiler L, Werner SB, et al. Outbreak of Pontiac fever due to *Legionella anisa*. The Lancet. 1990 Jul 7;336(8706):35–7.
 143. Victor L. Yu; M. Luisa Pedro-Botet; Yusen E. Lin. Harrison. Principios de Medicina Interna. [cited 2020 May 27]. p. 117–22 Infección por *Legionella* | Harrison. Principios de Medicina Interna, 19e | AccessMedicina | McGraw-Hill Medical. Available from: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1717§ionid=114920990>
 144. Pedro-Botet ML, Sabrià M, Sopena N, García-Núñez M, Jesús Dominguez M, Reynaga E, et al. Legionnaires disease and HIV infection. Chest. 2003 Aug 1;124(2):543–7.
 145. Kirby BD, Snyder KM, Meyer RD, Finegold SM. Legionnaires' disease: report of sixty-five nosocomially acquired cases of review of the literature. Medicine [Internet]. 1980 May [cited 2020 May 27];59(3):188–205. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6997673>
 146. Garcia-Vidal C, Labori M, Viasus D, Simonetti A, Garcia-Somoza D, Dorca J, et al. Rainfall Is a Risk Factor for Sporadic Cases of *Legionella pneumophila* Pneumonia. PLoS One [Internet]. 2013 Apr 16 [cited 2023 Dec 18];8(4):61036. Available from: </pmc/articles/PMC3628787/>
 147. Protocolo de vigilancia de Legionelosis [Internet]. 2016 Sep [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/PROTOCOLOS/Protocolo%20de%20Vigilancia%20de%20Legionelosis.pdf>
 148. Pelaz C, Ausina V, Catalán V, Cercenado E, Antolín CP. Diagnóstico microbiológico y control de la legionelosis. Recomendaciones de la Sociedad Española de Microbiología Clínica [Internet]. 2005 [cited 2020 May 27]. (Procedimientos en Microbiología Clínica). Available from: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia20.pdf>
 149. Edelstein PH. The laboratory diagnosis of Legionnaires' disease. Semin Respir Infect. 1987 Dec 1;2(4):235–41.
 150. Maiwald M, Helbig JH, Lück PC. Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella* infections. J Microbiol Methods. 1998 Jun 1;33(1):59–79.
 151. Rowbotham TJ. Isolation of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 from Human Feces with Use of Amebic Cocultures. Clinical Infectious Diseases. 1998 Feb;26(2):502–3.
 152. Dournon E., Howard AJ. Isolation of *Legionella* from clinical specimens. A laboratory manual for *Legionella*. Vol. 14, Journal of Hospital Infection. Elsevier BV; 1989. 13–30 p.
 153. Edelstein PH, Barbaree JME, Breiman RFE, Dufour APE. Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease: an update from 1984. In: *Legionella*: current status and emerging perspectives: 4th International symposium: Papers. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1993. 7–11 p.
 154. Feeley JC, Gorman GW, Weaver RE, Mackel DC, Smith HW. Primary isolation media for legionnaires disease bacterium. J Clin Microbiol. 1978;8(3):320–5.

155. Edelstein PH. Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. *J Clin Microbiol*. 1982;16(4):697–9.
156. Edelstein PH. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *J Clin Microbiol*. 1981;14(3):298–303.
157. Pasculle AW FJGR et al. *J Infect Dis*. 1980 [cited 2020 May 31]. p. 727–32 Pittsburgh Pneumonia Agent: Direct Isolation From Human Lung Tissue - PubMed. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7391615/>
158. Morrill WE, Barbaree JM, Fields BS, Sanden GN, Martin WT. Increased recovery of *Legionella micdadei* and *Legionella bozemanii* on buffered charcoal yeast extract agar supplemented with albumin. *J Clin Microbiol*. 1990 Mar 1;28(3):616–8.
159. Mohammadi A, Chambers ST, Scott-Thomas A, Lewis JG, Anderson T, Podmore R, et al. Enhancement of Culture of *Legionella longbeachae* from Respiratory Samples by Use of Immunomagnetic Separation and Antimicrobial Decontamination. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2023 Dec 18];58(11). Available from: </pmc/articles/PMC7587110/>
160. He Y, Chang TC, Li H, Shi G, Tang YW. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and database for identification of *Legionella* species. *Can J Microbiol*. 2011 Jul;57(7):533–8.
161. Moliner C, Ginevra C, Jarraud S, Flaudrops C, Bedotto M, Couderc C, et al. Rapid identification of *Legionella* species by mass spectrometry. *J Med Microbiol* [Internet]. 2010 Mar [cited 2023 Dec 19];59(Pt 3):273–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19926729/>
162. Bai L, Yang W, Li Y. Clinical and Laboratory Diagnosis of *Legionella* Pneumonia. *Diagnostics (Basel)* [Internet]. 2023 Jan 12 [cited 2023 Dec 18];13(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36673091>
163. Pascale MR, Mazzotta M, Salaris S, Girolamini L, Grottola A, Simone ML, et al. Evaluation of MALDI–TOF Mass Spectrometry in Diagnostic and Environmental Surveillance of *Legionella* Species: A Comparison With Culture and Mip-Gene Sequencing Technique. *Front Microbiol* [Internet]. 2020 Dec 15 [cited 2023 Dec 19];11. Available from: </pmc/articles/PMC7771186/>
164. Kyritsi MA, Kristo I, Hadjichristodoulou C. Serotyping and detection of pathogenicity loci of environmental isolates of *Legionella pneumophila* using MALDI-TOF MS. *Int J Hyg Environ Health*. 2020 Mar 1;224.
165. García MO, Oviaño M, Belén G, Sánchez R, De Dios J, Pérez C, et al. Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica. [Internet]. 2019 [cited 2023 Dec 19]. Available from: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia65.pdf>
166. Wilkinson HW, Fikes BJ, Cruce DD. Indirect immunofluorescence test for serodiagnosis of Legionnaires disease: evidence for serogroup diversity of Legionnaires disease bacterial antigens and for multiple specificity of human antibodies. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1979 [cited 2023 Dec 19];9(3):379. Available from: </pmc/articles/PMC273034/?report=abstract>
167. Saladi L, Zaidi B, Toolsie O, Vakde T, Adrish M. A case report of *Legionella* and *Mycoplasma pneumoniae*: Co-incidence or co-infection? *Medicine* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2023 Dec 19];97(40). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30290642/>
168. Wilkinson HW, Reingold AL, Brake BJ, McGiboney DL, Gorman GW, Broome C V. Reactivity of serum from patients with suspected legionellosis against 29 antigens of *Legionellaceae* and *Legionella*-like organisms by indirect immunofluorescence assay. *J Infect Dis* [Internet]. 1983 [cited 2023 Dec 19];147(1):23–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6185598/>
169. Sun H, Ma H, Liu L, Cao X, Yang Z. A new ELISA method for serological diagnosis of *Legionella pneumophila*: use of five purified proteins, FLA, MOMP, MIP, IP, and PILE, as diagnostic antigen. *Clin Lab* [Internet]. 2015 [cited 2023 Dec 19];61(3–4):275–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25974993/>
170. P.H. Edelstein NPC. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. 2711–2721 p.

171. Hackman BA, Plouffe JF, Benson RF, Fields BS, Breiman RF. Comparison of Binax *Legionella* Urinary Antigen EIA kit with Binax RIA Urinary Antigen kit for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen. *J Clin Microbiol*. 1996;34(6):1579–80.
172. Ito A, Yamamoto Y, Ishii Y, Okazaki A, Ishiura Y, Kawagishi Y, et al. Evaluation of a novel urinary antigen test kit for diagnosing *Legionella* pneumonia. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2023 Dec 19];103:42–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33176204/>
173. Helbig JH, Uldum SA, Lück PC, Harrison TG. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax *Legionella* Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest *Legionella* Urin Antigen EIA. *J Med Microbiol*. 2001;50(6):509–16.
174. Harrison T, Uldum S, Alexiou-Daniel S, Bangsberg J, Bernander S, Drasar V, et al. A multicenter evaluation of the Biotest *Legionella* urinary antigen EIA. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 1998 [cited 2024 Jan 9];4(7):359–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11864350/>
175. Ballard AL, Fry NK, Chan L, Surman SB, Lee J V, Harrison TG, et al. Detection of *Legionella pneumophila* using a real-time PCR hybridization assay. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2000 Nov [cited 2020 May 27];38(11):4215–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060093>
176. Wilson DA, Yen-Lieberman B, Reischl U, Gordon SM, Procop GW. Detection of *Legionella pneumophila* by Real-Time PCR for the mip Gene. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2024 Jan 9];41(7):3327. Available from: </pmc/articles/PMC165371/>
177. Portillo ME, Reina G, Fernández-Alonso M, Leiva J. Detección precoz y monitorización de *Legionella pneumophila* en muestras clínicas por PCR en tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2024 Jan 9];28(8):562–3. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-deteccion-precoz-monitorizacion-Legionella-pneumophila-S0213005X10000042>
178. Hayden RT, Uhl JR, Qian X, Hopkins MK, Aubry MC, Limper AH, et al. Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: Comparison of lightcycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. *J Clin Microbiol*. 2001;39(7):2618–26.
179. Templeton KE, Scheltinga SA, Sillekens P, Crielaard JW, Van Dam AP, Goossens H, et al. Development and Clinical Evaluation of an Internally Controlled, Single-Tube Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* Species. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2024 Jan 8];41(9):4016. Available from: </pmc/articles/PMC193800/>
180. Bagheri H, Khaledi A, Ghanizadeh G, Esmaeili D. Efficacy of PCR Analysis of Mip, Doth and Gspd Genes with Culture in Detection of *Legionella pneumophila*. *Iran J Public Health* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2024 Jan 9];50(5):1079. Available from: </pmc/articles/PMC8223580/>
181. Pelaz C, Autores A, Ausina V, Catalán V, Cercenado E, Antolín CP. Diagnóstico microbiológico y control de la legionelosis. Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón Coordinador.
182. Thurman KA, Warner AK, Cowart KC, Benitez AJ, Winchell JM. Detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella* spp. in clinical specimens using a single-tube multiplex real-time PCR assay. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 May;70(1):1–9.
183. Diederer BMW, Kluytmans JAJW, Vandenbroucke-Grauls CM, Peeters MF. Utility of real-time PCR for diagnosis of legionnaires' disease in routine clinical practice. *J Clin Microbiol*. 2008 Feb;46(2):671–7.
184. Bradley BT, Bryan A. Emerging respiratory infections: The infectious disease pathology of SARS, MERS, pandemic influenza, and *Legionella*. Vol. 36, *Seminars in Diagnostic Pathology*. W.B. Saunders; 2019. p. 152–9.
185. Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry ML, Warnock D. *Legionella*. *Manual of Clinical Microbiology*. Paul H. Tenover, Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry ML, Warnock D, editors. American Society for Microbiology ; 2011.
186. Garrido RMB, Parra FJE, Frances LA, Guevara RMR, Sanchez-Nieto JM, Hernandez MS, et al. Antimicrobial Chemotherapy for Legionnaires Disease: Levofloxacin versus Macrolides. *Clinical Infectious Diseases*. 2005 Mar 15;40(6):800–6.

187. Sabrià M, Pedro-Botet ML, Gómez J, Roig J, Vilaseca B, Sopena N, et al. Fluoroquinolones vs macrolides in the treatment of Legionnaires disease. *Chest*. 2005;128(3):1401–5.
188. Nagel JL, Rarus RE, Crowley AW, Alaniz C. Retrospective analysis of azithromycin versus fluoroquinolones for the treatment of *Legionella* pneumonia. *P and T*. 2014;39(3):203–5.
189. Gershengorn HB, Keene A, Dzierba AL, Wunsch H. The Association of Antibiotic Treatment Regimen and Hospital Mortality in Patients Hospitalized With *Legionella* Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*. 2015 Jun 1;60(11):e66–79.
190. Jasper AS, Musuuza JS, Tischendorf JS, Stevens VW, Gamage SD, Osman F, et al. Are Fluoroquinolones or Macrolides Better for Treating *Legionella* Pneumonia? A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2023 Dec 15];72(11):1979–89. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa441>
191. Viasus D, Gaia V, Manzur-Barbur C, Carratalà J. Legionnaires' Disease: Update on Diagnosis and Treatment. *Infect Dis Ther* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2024 Feb 3];11(3):973. Available from: [/pmc/articles/PMC9124264/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39124264/)
192. Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File TM, Musher DM, Fine MJ. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. *Infectious Diseases Society of America*. *Clin Infect Dis*. 2000;31(2):347–82.
193. Heath CH, Grove DI, Looke DFM. Delay in appropriate therapy of *Legionella* pneumonia associated with increased mortality. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1996;15(4):286–90.
194. Martínez D, Alvarez Rodríguez V, Ortiz de Zárate MM, Rivas M, Giménez MJ, Aguilar L, et al. Management in the emergency room of patients requiring hospital treatment of community-acquired pneumonia. *Rev Esp Quimioter* [Internet]. 2009 Mar [cited 2020 May 30];22(1):4–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19308740>
195. Soriano Viladomiu A, Mensa Pueyo J. Guía de terapéutica antimicrobiana 2023. 2023;
196. Dillon C, Guarascio AJ, Covvey JR. Lefamulin: a promising new pleuromutilin antibiotic in the pipeline. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2019 Jan 2;17(1):5–15.
197. Lee YR, Jacobs KL. Leave it to Lefamulin: A Pleuromutilin Treatment Option in Community-Acquired Bacterial Pneumonia. Vol. 79, *Drugs*. Adis; 2019. p. 1867–76.
198. Powell D, Donato A. In community-acquired bacterial pneumonia, lefamulin was noninferior to moxifloxacin at 96 h after the first dose. Vol. 172, *Annals of Internal Medicine*. American College of Physicians; 2020. p. JC22.
199. Paukner S, Riedl R. Pleuromutilins: Potent Drugs for Resistant Bugs-Mode of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017 Jan 3;7(1).
200. Perry W, Golan Y. Therapeutic potential of lefamulin in the treatment of community-acquired pneumonia. *Future Microbiol*. 2019;14(11):927–39.
201. European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. Annual Epidemiological Report for 2017. Stockholm; 2017.
202. Cissé G. Food-borne and water-borne diseases under climate change in low-and middle-income countries: Further efforts needed for reducing environmental health exposure risks. 2019;
203. European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. Annual Epidemiological Report for 2021. Stockholm; 2023 Jun.
204. Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la red nacional de vigilancia epidemiológica. [Internet]. BOE-A-1996-1502, 2210/1995 España: BOE núm.21 ; Jan 24, 1996 p. 2153–8. Available from: <https://www.boe.es/eli/es/rd/1995/12/28/2210/con>
205. Datos de la enfermedad del ECDC Surveillance Atlas - Legionnaires disease [Internet]. [cited 2020 May 23]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/legionnaires-disease/surveillance/atlas>
206. Outbreak of travel-associated Legionnaires' disease – Palmanova, Mallorca (Spain). Stockholm; 2017 Oct.
207. ECDC. Surveillance Atlas of Infectious Diseases [Internet]. [cited 2020 Jun 1]. Available from: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
208. Informe epidemiológico sobre la situación de legionelosis en España. Año 2021. [Internet]. 2023 [cited 2024 Jan 9]. Available from: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/Enfermedad>

- desTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/Legionelosis/INFORME_RENAVE_LEGIONELOSIS_2021.pdf
209. International Organization for Standardization. ISO 11731:2017 Water quality — Enumeration of *Legionella*. 2017.
 210. UNE 100030:2017 Prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones. Asociación Española de Normalización España: Comité técnico CTN 100 Climatización; Apr 12, 2017.
 211. Coscollá M, Fenollar J, Escribano I, González-Candelas F. Legionellosis outbreak associated with asphalt paving machine, Spain, 2009. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(9):1381–7.
 212. «BOE» núm. 21, de 24 de enero de 1996 páginas 2153 a 2158 (6 págs.). Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la red nacional de vigilancia epidemiológica.
 213. «BOE» núm. 180, de 28 de julio de 2001 páginas 27750 a 27759 (10 págs.). Real Decreto 909/2001, de 27 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis.
 214. Hernández Calleja A. NTP 691 : Legionelosis : revisión de las normas reglamentarias (I). Aspectos generales. Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo. 2000;(I).
 215. UNE 100030:2005 IN Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de legionela en instalaciones. 2005.
 216. UNE 100030:2023 Prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones. Asociación Española de Normalización 2023.
 217. Buchrieser, Shaheen, Stout, Muñoz, Gimeno, Cano, et al. *Legionella* y legionelosis. In: Centro de Estudios Ramón Areces S.A, editor. Fundación Ramón Areces; 2021.
 218. DECRETO 173/2000 de 5 de diciembre, del Gobierno Valenciano, por el que se establecen las condiciones higiénico-sanitarias que deben reunir los equipos de transferencia de masa de agua en corriente de aire con producción de aerosoles, para la prevención de la legionelosis. DOGV España; Dec 7, 2000.
 219. Orden Conjunta de 22 de Febrero de 2001 de las Consellerias de Medio Ambiente y Sanidad. Corrección de errores de la Ley 12/2000, de 28 de diciembre [Internet]. DOGV Dec 28, 2001. Available from: <https://www.sp.san.gva.es/DgspPortal/docs/OrdenConjunta22febrero2001.pdf>
 220. ISO/IEC 17025:2017, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración [Internet]. 2017. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v2:es>
 221. UNE-EN ISO 16140-2:2016. Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 2: Protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) frente a los métodos de referencia. [Internet]. Normas AENOR 2016. Available from: <https://en.tienda.aenor.com/norma-une-en-iso-16140-2-2016-n0057738>
 222. Sabria M, Yu VL. Hospital-acquired legionellosis: Solutions for a preventable infection. Vol. 2, *Lancet Infectious Diseases*. Lancet Publishing Group; 2002. p. 368–73.
 223. Montagna MT, De Giglio O, Napoli C, Diella G, Rutigliano S, Agodi A, et al. Control and prevention measures for legionellosis in hospitals: A cross-sectional survey in Italy. *Environ Res.* 2018 Oct 1;166:55–60.
 224. David S, Afshar B, Mentasti M, Ginevra C, Podglajen I, Harris SR, et al. Seeding and Establishment of *Legionella pneumophila* in Hospitals: Implications for Genomic Investigations of Nosocomial Legionnaires' Disease. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2020 Jun 2];64(9):1251–9. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cix153>
 225. O'Neill E, Humphreys H. Surveillance of hospital water and primary prevention of nosocomial legionellosis: What is the evidence? *Journal of Hospital Infection.* 2005 Apr;59(4):273–9.
 226. Carratala J, Gudiol F, Pallares R, Dorca J, Verdaguer R, Ariza J, et al. Risk factors for nosocomial *Legionella pneumophila* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149(3 I):625–9.
 227. Decker BK, Palmore TN. Hospital Water and Opportunities for Infection Prevention. Vol. 16, *Current Infectious Disease Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2014. p. 432.

228. Barna Z, Antmann K, Pászti J, Bánfi R, Kádár M, Szax A, et al. Infection control by point-of-use water filtration in an intensive care unit - A Hungarian case study. *J Water Health*. 2014;12(4):858–67.
229. Wei SH, Chou P, Tseng LR, Lin HC, Wang JH, Sheu JN, et al. Nosocomial Neonatal Legionellosis Associated with Water In Infant Formula, Taiwan. *Emerg Infect Dis*. 2014 Nov 1;20(11):1921–4.
230. International Organization for Standardization. ISO 11731: 2007 Water Quality— Enumeration of *Legionella*. 2007.
231. International Organization for Standardization (1998) ISO 11731: 1998 Water Quality— Enumeration of *Legionella*.
232. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Memoli G, Garlasco J, Zotti CM. Comparison of BCYE α +AB agar and MWY agar for detection and enumeration of *Legionella* spp. in hospital water samples. *BMC Microbiol* [Internet]. 2021;21(1):48. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02109-1>
233. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Memoli G, Garlasco J, Zotti CM. The use of BCYE medium for the detection of *Legionella* in environmental water samples: an appropriate update to ISO 11731:2017 standard. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2022 Feb 1;102(2):115593.
234. Scaturro M, Poznanski E, Mupo M, Blasior P, Seeber M, Prast AM, et al. Evaluation of GVPC and BCYE Media for *Legionella* Detection and Enumeration in Water Samples by ISO 11731: Does Plating on BCYE Medium Really Improve Yield? *Pathogens* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2023 Jan 17];9(9):1–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32948082/>
235. Technical Committee : ISO/TC 147/SC 4 Microbiological methods. ISO - ISO 11731:2017 - Water quality — Enumeration of *Legionella* [Internet]. 2017 [cited 2020 May 27]. Available from: <https://www.iso.org/standard/61782.html>
236. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Memoli G, Garlasco J, Zotti CM. Confirmation of presumptive *Legionella* colonies on culture media according to ISO 11731:2017: principles, problems, and practice. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2023 Jun 1 [cited 2023 Dec 22];134(6). Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/jambio/lxad100>
237. Girolamini L, Salaris S, Lizzadro J, Mazzotta M, Pascale MR, Pellati T, et al. How Molecular Typing Can Support *Legionella* Environmental Surveillance in Hot Water Distribution Systems: A Hospital Experience. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2020 Nov 21 [cited 2024 Jan 26];17(22):8662. Available from: <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/22/8662>
238. Kyritsi MA, Kristo I, Hadjichristodoulou C. Serotyping and detection of pathogenicity loci of environmental isolates of *Legionella pneumophila* using MALDI-TOF MS. *Int J Hyg Environ Health*. 2020 Mar 1;224.
239. Dilger T, Melzl H, Gessner A. Rapid and reliable identification of waterborne *Legionella* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods*. 2016;127.
240. Trnková K, Kotrbancová M, Špaleková M, Fulová M, Boledovičová J, Vesteg M. MALDI-TOF MS analysis as a useful tool for an identification of *Legionella pneumophila*, a facultatively pathogenic bacterium interacting with free-living amoebae: A case study from water supply system of hospitals in Bratislava (Slovakia). *Exp Parasitol*. 2018 Jan 1;184:97–102.
241. Delgado-Viscogliosi P, Salignac L, Delattre JM. Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cells in environmental water samples. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2009 Jun [cited 2024 Jan 12];75(11):3502–12. Available from: <https://journals.asm.org/journal/aem>
242. Yin X, Chen YZ, Ye QQ, Liao LJ, Cai ZR, Lin M, et al. Detection performance of PCR for *Legionella pneumophila* in environmental samples: a systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Jan 12];21(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35303873/>
243. Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1998 Jun [cited 2020 May 27];36(6):1560–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620377>
244. Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T. Comparison of Detection Methods for *Legionella* Species in Environmental Water by Colony Isolation, Fluorescent Antibody Staining, and Polymerase Chain Reaction. *Microbiol Immunol*. 1993;37(8):617–22.

245. Trnková K, Kotrbancová M, Špaleková M, Fulová M, Boledovičová J, Vesteg M. MALDI-TOF MS analysis as a useful tool for an identification of *Legionella pneumophila*, a facultatively pathogenic bacterium interacting with free-living amoebae: A case study from water supply system of hospitals in Bratislava (Slovakia). *Exp Parasitol*. 2018 Jan 1;184:97–102.
246. Ballard AL, Fry NK, Chan L, Surman SB, Lee J V, Harrison TG, et al. Detection of *Legionella pneumophila* using a real-time PCR hybridization assay. *J Clin Microbiol*. 2000 Nov;38(11):4215–8.
247. Ishimatsu S, Miyamoto H, Hori H, Tanaka I, Yoshida S. Sampling and detection of *Legionella pneumophila*; aerosols generated from an industrial cooling tower. *Ann Occup Hyg* [Internet]. 2001 Aug;421–7. Available from: <https://academic.oup.com/annweh/article/45/6/421/187885/Sampling-and-detection-of-Legionella-pneumophila>
248. Declerck P, Verelst L, Duvivier L, Van Damme A, Ollevier F. PCR as a test for the presence or absence of *Legionella* in (cooling) water. *Water Sci Technol* [Internet]. 2003 [cited 2020 May 27];47(3):103–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12639013>
249. Wellinghausen N, Frost C, Marre R. Detection of Legionellae in Hospital Water Samples by Quantitative Real-Time LightCycler PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Sep;67(9):3985–93.
250. Collins S, Stevenson D, Walker J, Bennett A. Evaluation of *Legionella* real-time PCR against traditional culture for routine and public health testing of water samples. *J Appl Microbiol*. 2017 Jun;122(6):1692–703.
251. Yang G, Benson R, Pelish T, Brown E, Winchell JM, Fields B. Dual detection of *Legionella pneumophila* and *Legionella* species by real-time PCR targeting the 23S-5S rRNA gene spacer region. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 2010 [cited 2024 Jan 9];16(3):255. Available from: </pmc/articles/PMC7129662/>
252. Fisher KE, Wickenberg LP, Leonidas LF, Ranz AA, Habib MA, Buford RM, et al. Next Day *Legionella* PCR: a highly reliable negative screen for *Legionella* in the built environment. *J Water Health* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2024 Jan 12];18(3):345–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32589620/>
253. Taylor MJ, Bentham RH, Ross KE. Limitations of Using Propidium Monoazide with qPCR to Discriminate between Live and Dead *Legionella* in Biofilm Samples. *Microbiol Insights*. 2014 Jan 4;7:MBI.S17723.
254. Ditommaso S, Ricciardi E, Giacomuzzi M, Arauco Rivera SR, Zotti CM. *Legionella* in water samples: How can you interpret the results obtained by quantitative PCR? *Mol Cell Probes*. 2015 Feb 1;29(1):7–12.
255. Schoenmakers T, Van Bussel BCT, Gorissen SHM, Van Loo IHM, Van Rosmalen F, Verboeket-Van De Venne WPHG, et al. Protocol: Validating a clinical laboratory parameter-based deisolation algorithm for patients with COVID-19 in the intensive care unit using viability PCR: the CoLaIC multicentre cohort study protocol. *BMJ Open* [Internet]. 2023 Feb 28 [cited 2024 Jan 12];13(2):69455. Available from: </pmc/articles/PMC9979582/>
256. Janssen KJH, Wolffs P, Lucchesi M, Dukers-Muijrers NHTM, Hoebe CJPA. Assessment of rectal Chlamydia trachomatis viable load in women by viability-PCR. *Sex Transm Infect* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2024 Jan 12];96(2):85–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31383780/>
257. Elizaquível P, Aznar R, Sánchez G. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2014 [cited 2024 Jan 12];116(1):1–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24119073/>
258. García MT, Jones S, Pelaz C, Millar RD, Abu Kwaik Y. Acanthamoeba polyphaga resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ Microbiol*. 2007 May;9(5):1267–77.
259. Hussong D, Hussong D, O'Brien M, Weiss E, Pearson AD, Weiner RM, et al. Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media. *Bio/Technology*. 1987;5(9):947–50.
260. Chang CW, Hwang YH, Cheng WY, Chang CP. Effects of chlorination and heat disinfection on long-term starved *Legionella pneumophila* in warm water. *J Appl Microbiol*. 2007 Jun;102(6):1636–44.

261. Edagawa A, Kimura A, Miyamoto H. Investigations on contamination of environmental water samples by *Legionella* using real-time quantitative PCR combined with amoebic co-culturing. *Biocontrol Sci.* 2019;24(4):213–20.
262. Joly P, Falconnet PA, André J, Weill N, Reyrolle M, Vandenesch F, et al. Quantitative Real-Time *Legionella* PCR for Environmental Water Samples: Data Interpretation. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2006 [cited 2024 Jan 12];72(4):2801. Available from: /pmc/articles/PMC1449029/
263. Whiley H, Taylor M. *Legionella* detection by culture and qPCR: Comparing apples and oranges. Vol. 42, *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor and Francis Ltd; 2016. p. 65–74.
264. Allegra S, Berger F, Berthelot P, Grattard F, Pozzetto B, Riffard S. Use of Flow Cytometry To Monitor *Legionella* Viability. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2008 [cited 2024 Jan 12];74(24):7813. Available from: /pmc/articles/PMC2607165/
265. Tyndall RL, Hand RE, Mann RC, Evans C, Jernigan R. Application of flow cytometry to detection and characterization of *Legionella* spp. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1985 [cited 2024 Jan 12];49(4):852. Available from: /pmc/articles/PMC238457/?report=abstract
266. Tiaden AN, Kessler A, Hilbi H. Analysis of *Legionella* infection by flow cytometry. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2013 [cited 2024 Jan 12];954:233–49. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23150400/
267. Ingram M, Cleary TJ, Price BJ, Price RL, Castro A. Rapid detection of *Legionella pneumophila* by flow cytometry. *Cytometry* [Internet]. 1982 [cited 2024 Jan 12];3(2):134–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6754293/
268. Nisar MA, Ross KE, Brown MH, Bentham R, Best G, Whiley H. Detection and quantification of viable but non-culturable *Legionella pneumophila* from water samples using flow cytometry-cell sorting and quantitative PCR. *Front Microbiol* [Internet]. 2023 Jan 30 [cited 2024 Jan 12];14. Available from: /pmc/articles/PMC9922708/
269. Nederbragt AJ, Balasingham A, Sirevåg R, Utkilen H, Jakobsen KS, Anderson-Glenna MJ. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Legionella pneumophila* using multi-colored capillary electrophoresis. *J Microbiol Methods.* 2008 May;73(2):111–7.
270. Vergnes M, Ginevra C, Kay E, Normand P, Thioulouse J, Jarraud S, et al. Insertion Sequences as Highly Resolutive Genomic Markers for Sequence Type 1 *Legionella pneumophila* Paris. *J Clin Microbiol.* 2011 Jan 1;49(1):315–24.
271. Gomgnimbou MK, Ginevra C, Peron-Cane C, Versapuech M, Refrégier G, Jacotin N, et al. Validation of a microbead-based format for spoligotyping of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(7):2410–5.
272. European Study Group for. *Legionella* Infections (ESGLI). The ESGLI SBT database for the typing of *Legionella pneumophila* 2015.
273. David S, Rusniok C, Mentasti M, Gomez-Valero L, Harris SR, Lechat P, et al. Multiple major disease-associated clones of *Legionella pneumophila* have emerged recently and independently. *Genome Res.* 2016 Nov 1;26(11):1555–64.
274. Ginevra C, Jacotin N, Diancourt L, Guigon G, Arquilliere R, Meugnier H, et al. *Legionella pneumophila* sequence type 1/Paris pulsotype subtyping by spoligotyping. *J Clin Microbiol.* 2012 Mar;50(3):696–701.
275. Lévesque S, Plante PL, Mendis N, Cantin P, Marchand G, Charest H, et al. Genomic Characterization of a Large Outbreak of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Strains in Quebec City, 2012. *PLoS One.* 2014 Aug 8;9(8):e103852.
276. McAdam PR, Vander Broek CW, Lindsay DS, Ward MJ, Hanson MF, Gillies M, et al. Gene flow in environmental *Legionella pneumophila* leads to genetic and pathogenic heterogeneity within a Legionnaires' disease outbreak. *Genome Biol.* 2014 Nov 3;15(11):504.
277. Moran-Gilad J, Prior K, Yakunin E, Harrison TG, Underwood A, Lazarovitch T, et al. Design and application of a core genome multilocus sequence typing scheme for investigation of Legionnaires' disease incidents. *Eurosurveillance.* 2015 Jul 16;20(28).
278. Raphael BH, Baker DJ, Nazarian E, Lapierre P, Bopp D, Kozak-Muiznieks NA, et al. Genomic Resolution of Outbreak-Associated *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates from New York State. *Appl Environ Microbiol.* 2016 Jun 15;82(12):3582–90.

279. Reuter S, Harrison TG, Köser CU, Ellington MJ, Smith GP, Parkhill J, et al. A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a *Legionella* outbreak. *BMJ Open*. 2013 Jan 9;3(1):e002175.
280. Graham RMA, Doyle CJ, Jennison A V. Real-time investigation of a *Legionella pneumophila* outbreak using whole genome sequencing. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2014 Nov 27;142(11):2347–51. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0950268814000375/type/journal_article
281. Maiden MCJ, van Rensburg MJJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol*. 2013 Oct 2;11(10):728–36.
282. Burckhardt F, Brion A, Lahm J, Koch HU, Prior K, Petzold M, et al. Confirming Legionnaires' Disease Outbreak by Genome-Based Method, Germany, 2012. *Emerg Infect Dis*. 2016 Jul;22(7):1303–4.
283. Petzold M, Ehricht R, Slickers P, Pleischl S, Brockmann A, Exner M, et al. Rapid genotyping of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains by a novel DNA microarray-based assay during the outbreak investigation in Warstein, Germany 2013. *Int J Hyg Environ Health*. 2017 Jun;220(4):673–8.
284. Petzold M, Prior K, Moran-Gilad J, Harmsen D, Lück C. Epidemiological information is key when interpreting whole genome sequence data – lessons learned from a large *Legionella pneumophila* outbreak in Warstein, Germany, 2013. *Eurosurveillance*. 2017 Nov 9;22(45).
285. David S, Mentasti M, Tewolde R, Aslett M, Harris SR, Afshar B, et al. Evaluation of an optimal epidemiological typing scheme for *Legionella pneumophila* with whole-genome sequence data using validation guidelines. *J Clin Microbiol*. 2016 Aug 1;54(8):2135–48.
286. Amato A, de Jong B, Derrough T, Johansson K, Heuer O, Diaz Högberg L, et al. ECDC strategic framework for the integration of molecular and genomic typing into European surveillance and multi-country outbreak investigations – 2019–2021. 2019;
287. ECDC. European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet) [Internet]. [cited 2020 Jun 2]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/eldsnet>
288. Fry NK, Alexiou-Daniel S, Bangsberg JM, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, et al. 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*. 1999;5(8):462–77.
289. Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, et al. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol*. 2005 May;43(5):2047–52.
290. Lück PC, Helbig JH, Günter U, Assmann M, Blau R, Koch H, et al. Epidemiologic investigation by macrorestriction analysis and by using monoclonal antibodies of nosocomial pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 10. *J Clin Microbiol*. 1994 Nov;32(11):2692–7.
291. Edelstein PH. Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1982 [cited 2024 Feb 5];16(4):697–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7153316/>
292. Ta AC, Stout JE, Yu VL, Wagener MM. Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. *J Clin Microbiol*. 1995;33(8):2118–23.
293. Leoni E, Legnani PP. Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of *Legionella* species from hot water systems. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2001 Jan 1 [cited 2020 Jun 8];90(1):27–33. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2001.01178.x>
294. Lück PC, Igel L, Helbig JH, Kuhlisch E, Jatzwauk L. Comparison of commercially available media for the recovery of *Legionella* species. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. 2004 [cited 2024 Feb 5];207(6):589–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15729841/>
295. Ditommaso S, Gentile M, Giacomuzzi M, Zotti CM. Recovery of *Legionella* species from water samples using an internal method based on ISO 11731: Suggestions for revision and implementation. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2011;70(2):200–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.01.013>

296. Kusnetsov JM, Jousimies-Somer HR, Nevalainen AI, Martikainen PJ. Isolation of *Legionella* from water samples using various culture methods. *J Appl Bacteriol* [Internet]. 1994 [cited 2024 Feb 5];76(2):155–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8144417/>
297. Veenendaal HR, Brouwer-Hanzens AJ, van der Kooij D. Incubation of premise plumbing water samples on Buffered Charcoal Yeast Extract agar at elevated temperature and pH selects for *Legionella pneumophila*. *Water Res* [Internet]. 2017 [cited 2024 Feb 5];123:439–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28689128/>
298. Scaturro M, Poznanski E, Mupo M, Blasior P, Seeber M, Prast AM, et al. Evaluation of GVPC and BCYE Media for *Legionella* Detection and Enumeration in Water Samples by ISO 11731: Does Plating on BCYE Medium Really Improve Yield? *Pathogens*. 2020 Sep 1;9(9):1–6.
299. Kozak-Muiznieks NA, Lucas CE, Brown E, Pondo T, Taylor TH, Frace M, et al. Prevalence of sequence types among clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in the United States from 1982 to 2012. *J Clin Microbiol*. 2014 Jan;52(1):201–11.
300. Raphael BH, Baker DJ, Nazarian E, Lapierre P, Bopp D, Kozak-Muiznieks NA, et al. Genomic Resolution of Outbreak-Associated *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Isolates from New York State. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2016 Jun 15;82(12):3582–90. Available from: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.00362-16>
301. Lévesque S, Plante PL, Mendis N, Cantin P, Marchand G, Charest H, et al. Genomic Characterization of a Large Outbreak of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Strains in Quebec City, 2012. *PLoS One* [Internet]. 2014 Aug 8;9(8):e103852. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103852>
302. Fenstersheib MD, Miller M, Diggins C, Liska S, Detwiler L, Werner SB, et al. Outbreak of Pontiac fever due to *Legionella anisa*. *The Lancet*. 1990 Jul 7;336(8706):35–7.
303. Mustapha P, Epalle T, Allegra S, Girardot F, Garraud O, Riffard S. Monitoring of *Legionella pneumophila* viability after chlorine dioxide treatment using flow cytometry. *Res Microbiol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2024 Jan 27];166(3):215–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250815000297>
304. Haida Nadia Mohamed Jefri U, Khan A, Chee Lim Y, Seng Lee K, Bin Liew K, Walid Kassab Y, et al. A systematic review on chlorine dioxide as a disinfectant. *J Med Life* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2024 Jan 27];15(3):313–8. Available from: <https://medandlife.org/wp-content/uploads/JMedLife-15-313.pdf>
305. Ji P, Rhoads WJ, Edwards MA, Pruden A. Effect of heat shock on hot water plumbing microbiota and *Legionella pneumophila* control. *Microbiome*. 2018 Dec 9;6(1):30.
306. Casini B, Buzzigoli A, Cristina ML, Spagnolo AM, Giudice P Del, Brusaferrero S, et al. Long-term effects of hospital water network disinfection on *Legionella* and other waterborne bacteria in an Italian university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 2014 Mar [cited 2024 Jan 27];35(3):293–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24521596/>
307. Iatta R, Cuna T, De Giglio O, Montagna MT, Napoli C. Sequence based typing of *Legionella pneumophila* sg 1 isolated in nosocomial acquired infections in Apulia, Southern Italy. *J Prev Med Hyg* [Internet]. 2013 Sep [cited 2024 Jan 27];54(3):167–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24783896>

ANEXOS

ANEXO 1. DISTRIBUCIÓN DE LOS PC EN LA INSTALACIÓN A PARTIR DE 2018

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

Unidad	Habitación	Servicio	Punto	Posición
AB	Observación / Clínica	Urgencias	Grifo	
AB	Servicio Mujeres	TAC	Grifo	
AB	Vestuario Hombres	Análisis Clínicos	Ducha	final
A11	Banco de Sangre	Hematología	Grifo	final
A13	HAB 1	Oncología	Ducha	Inicio
A13	HAB 15-AISLAMIENTO	Oncología	Ducha	Final
A13	HAB 9	Oncología	Ducha	Final
A21	Servicio Pacientes	C. Externas Cardiología	Grifo	inicio
A22	HAB 1	Cardiología	Ducha	Inicio
A22	HAB 5	Cardiología	Ducha	
A22	HAB 9	Cardiología	Ducha	Final
A22	Electrofisiología	Cardiología	Ducha	centro
A23	Pila observacion 2	Observacion 2	Grifo	
A23	Lavabo Central Enfermos	Unidad Coronaria	Grifo	Final
A23	HAB 4	Cirugía Cardíaca	Ducha	inicio
A31	Hemocultivos	Microbiología	Grifo	final
A32	HAB 1	Cirugía General	Ducha	
A32	HAB 5	Cirugía General	Ducha	
A32	HAB 9	Cirugía General	Ducha	Inicio
A33	HAB 14	Digestivo	Ducha	
A33	HAB 1	Digestivo	Ducha	Final
A33	HAB 9	Digestivo	Ducha	inicio
A33	HAB 12	Digestivo	Ducha	
A34	Crónicos izquierda	Diálisis	Grifo	Final
A34	Crónicos derecha	Diálisis	Grifo	Inicio
A34	Dialisis Peritoneal 1	Diálisis	Grifo	Inicio
A34	Dialisis Peritoneal 2	Diálisis	Grifo	final
BB	Servicio Pacientes	C. Externas OTRL	Grifo	centro
BB	Clínica	C. Externas Trauma	Grifo	inicio
BB	Aseo	Cirugía vascular	Grifo	Inicio
BB	Aseo	Oftalmología	Grifo	final
B11	Última Consulta	C. Externas Neurología	Grifo	final
B12	HAB 1	Pluripatológicos	Ducha	inicio
B12	HAB 8	Pluripatológicos	Ducha	
B12	HAB 15	Pluripatológicos	Ducha	final
B13	HAB 1	Medicina Interna	Ducha	inicio
B13	HAB 9	Medicina Interna	Ducha	
B13	HAB 14	Medicina Interna	Ducha	final
B14	Consulta Enfermería/Clínica	C. Externas Endocrino	Grifo	final
B22	HAB 1	Urología	Grifo	
B22	HAB 8	Urología	Grifo	final
B22	HAB 14	Urología	Grifo	
B23	HAB 1	Traumatología	Ducha	inicio
B23	HAB 5	Traumatología	Ducha	
B23	HAB 12	Traumatología	Ducha	
B24	HAB 3	Cirugía Torácica	Ducha	final
B31	HAB 8	Neumología	Ducha	

Control de *Legionella* en instalaciones de red de agua hospitalaria

B31	HAB 14	Neumología	Ducha	Inicio
B31	HAB 5	Neumología	Ducha	Final
B32	HAB 1	Neurología	Grifo	inicio
B32	HAB 5	Neurología	Grifo	
B32	HAB 9	Neurología	Grifo	final
B32	HAB 15	Neurología	Grifo	
B33	HAB 1	Neurocirugía/OTRL/Derma	Grifo	Inicio
B33	HAB 9	Neurocirugía/OTRL/Derma	Grifo	
B33	HAB 13	Neurocirugía/OTRL/Derma	Ducha	
B34	HAB 1	Psiquiatría	Grifo	Final
B34	HAB 5	Psiquiatría	Grifo	
B34	HAB 9	Psiquiatría	Grifo	
CS	Servicio Pacientes	Alergias y Psiquiatría Infantil	Grifo	final
CB	Clínica Enfermería	Hospital Día Pediátrico	Grifo	final
CB	Servicio Pacientes	C. Externas Tocoginecología	Grifo	inicio
C11	Reproducción asistida	Aseo mujeres	Grifo	
C12	Clínica Enfermería	Hospital Día Polivalentes	Grifo	final
C21	HAB. 5	Ginecología	Ducha	Inicio
C21	HAB. 10	Ginecología	Ducha	Final
C22	HAB. 1	Pediatría	Ducha	
C22	HAB. 5	Pediatría	Ducha	final
C31	HAB. 1	Maternidad	Ducha	
C31	HAB. 6	Maternidad	Ducha	final
C32	BOX 3	Neonatos	Grifo	final
C4	Sala de Estar	Paritorio	Grifo	inicio
QXS	Vestuario Hombres	Vestuario Personal	Ducha	Inicio
QXS	Vestuario Mujeres	Vestuario Personal	Ducha	Inicio
QXS	Zona Lavado Qx 19-20-21	Quirófanos	Grifo	Medio
QXS	Vertedero	Vertedero	Grifo	Final
QXB	Control Enfermería	Pre-Post Qx	Grifo	Inicio
QXB	Servicio Entrada	Pre-Post Qx	Grifo	Final
QXB	Vertedero		Grifo	Final
QXB	Zona Lavado	Quirófano	Grifo	Inicio
QX1	Consulta Enfermería	Pre- Anestesia	Grifo	Inicio
QX1	Consulta Médica		Grifo	Final
QX2	Control Enfermería	Pre-Post Qx	Grifo	Inicio
QX2	Zona Lavado	Quirófano	Grifo	Inicio
QX2	Vertedero		Grifo	Final
QX4	Clínica Enfermería	REA	Grifo	Inicio
QX4	Aislamiento	REA	Grifo	
QX4	Clínica Enfermería Final	REA	Grifo	final

ANEXO 2. TABLA F5 UNE 100030:2017

Tabla F.5 - Frecuencia mínima recomendada de muestreos para estudio de *Legionella* spp en instalaciones

TIPO DE INSTALACIÓN	FRECUENCIA MÍNIMA	OBSERVACIONES
Instalaciones en edificios y medios de transporte:		
Sistemas de agua caliente sanitaria con acumulación y retorno	SEMESTRAL	Alojamientos turísticos (hoteles, hostales, apart-hoteles, campings, cruceros, etc.), establecimientos penitenciarios, colegios y residencias con internado, áreas de deporte y recreo, turismo rural...
Sistemas de agua caliente sanitaria con acumulación y retorno	TRIMESTRAL	Establecimientos sensibles: Hospitales, residencias de personas mayores, hospitales de larga estancia (psiquiátricos, discapacitados,...) o con otras patologías crónicas
Sistemas de agua caliente sanitaria sin acumulación y con retorno	SEMESTRAL	Trimestral en establecimientos sensibles (Hospitales, residencias de personas mayores, hospitales de larga estancia (psiquiátricos, discapacitados,...) o con otras patologías crónicas)
Sistemas de agua caliente sanitaria sin acumulación sin retorno	ANUAL	
Sistemas de agua caliente sanitaria con acumulación y sin retorno	ANUAL	
Sistemas de agua fría de consumo.	ANUAL	Trimestral en establecimientos sensibles (Hospitales, residencias de personas mayores, hospitales de larga estancia (psiquiátricos, discapacitados,...) o con otras patologías crónicas)
Sistemas contra incendios	ANUAL	
Instalaciones de refrigeración:		
Torres de refrigeración y condensadores evaporativos.	MENSUAL	
Centrales humidificadoras industriales.	TRIMESTRAL MENSUAL	Mensual si hay recirculación
Humidificadores.	SEMESTRAL	
Equipos de enfriamiento evaporativo	SEMESTRAL	
Instalaciones recreativas:		
Sistemas de agua climatizada con agitación constante y recirculación a través de chorros de alta velocidad o la inyección de aire (spas, jacuzzis, otras)	MENSUAL	
Bañeras de hidromasaje, tratamientos con chorros a presión,... con agua de un solo uso	SEMESTRAL	Según la tabla F.4
Instalaciones en espacios urbanos:		
Fuentes ornamentales con difusión de aerosoles.	SEMESTRAL	
Sistemas de riego por aspersión en el medio urbano o en campos de golf o deportes	ANUAL	Sólo si tienen depósito Se excluye el riego agrícola
Elementos de refrigeración por aerosolización (nebulizadores)	SEMESTRAL	
Sistemas manuales a presión de lavado de vehículos	SEMESTRAL	
Sistemas automáticos de trenes/túneles de lavado de vehículos.	ANUAL	
Máquinas de asfaltado en vías públicas.	ANUAL	
Máquinas de riego de vías públicas.	SEMESTRAL	
Instalaciones sanitarias:		
Sistemas de agua a presión en tratamientos dentales	SEMESTRAL	

ANEXO 3. MEDIOS DE CULTIVO. NORMA UNE-EN-ISO 11731:2017

Anexo B (Normativo)

Medios de cultivo

Extraído de la norma UNE-EN ISO 11731:2017 (páginas 23-29)

B.1 Agar tamponado de extracto de levadura y carbón activo (BCYE)

B.1.1 Composición

Extracto de levadura (calidad bacteriológica)		10,0 g
Agar		12,0 g
Carbón activo		2,0 g
α -cetoglutarato, sal monopotásica	(CAS nº 58485-42-0)	1,0 g
Tampón ACES (ácido aminoetanosulfónico)	N-2-acetamido-2- (CAS nº 7365-82-4)	10,0 g
Hidróxido potásico (KOH) (lentejas)	(CAS nº 1310-58-3)	2,8 g
Clorhidrato de L-cisteína monohidratado	(CAS nº 7048-04-6)	0,4 g
Pirofosfato de hierro (III) [Fe ₄ (P ₂ O ₇) ₃]	(CAS nº 10058-44-3)	0,25 g
Agua (véase el capítulo 6)		hasta 1 000 ml

B.2 Medio de agar tamponado de extracto de levadura y carbón activo sin L-cisteína (BCYE-cys)

Este medio de cultivo se prepara de la misma forma que el agar BCYE (véase el capítulo B.1) pero omitiendo la adición de L-cisteína.

Se deja secar el exceso de humedad en las placas y se almacenan a (5 ± 3) °C, en recipientes herméticos, en la oscuridad, por un período máximo de 3 meses.

B.3 Medio de cultivo selectivo: Agar tamponado de extracto de levadura y carbón activo con suplementos selectivos (medio BCYE+AB)

B.3.1 Suplementos selectivos

Las concentraciones finales de los suplementos selectivos en el agar BCYE+AB deben ser las siguientes:

Sulfato de polimixina B	(CAS n° 1405-20-5)	80 000 UI/l
Cefazolina de sodio	(CAS n° 27164-46-1)	0,009 g/l
Pimaricina (sin. de natamicina)	(CAS n° 7681-93-8)	0,07 g/l

NOTA Este medio de cultivo es idéntico al agar BCYE (véase el capítulo B.1) excepto en que se añaden tres antibióticos suplementarios al agar BCYE.

B.4 Medio de cultivo de alta selectividad: agar glicina, vancomicina, polimixina B y cicloheximida (GVPC)

B.4.1 Suplementos selectivos

Las concentraciones finales de los suplementos selectivos en al agar GVPC deben ser:

Glicina exenta de amonio	(N°CAS 56-40-6)	3 g/l
Sulfato de polimixina B	(N° CAS 1405-20-5)	80 000 UI/l
Clorhidrato de vancomicina	(N° CAS 1404-93-9)	0,001 g/l

Cicloheximida	(N° CAS 66–81–9)	0,08 g/l
---------------	------------------	----------

NOTA Este medio de cultivo es idéntico al agar BCYE (véase el capítulo B.1), excepto en que se han añadido tres suplementos antibióticos y glicina al agar BCYE.

B.5 Preparación del medio de cultivo de alta selectividad: agar de Wadowsky Yee modificado (MWY)

B.5.1 Suplementos selectivos

Las concentraciones finales de suplementos selectivos en el agar MWY deben ser las siguientes:

Glicina exenta de amonio	(N° CAS 56–40–6)	3 g/l
Sulfato de polimixina B	(N° CAS 1405–20–5)	50 000 UI/l
Clorhidrato de vancomicina	(N° CAS 1404–93–9)	0,001 g/l
Anisomicina	(CAS n° 22862–76–6)	0,08 g/l
Azul de bromotimol	(CAS n° 76–59–5)	0,01 g/l
Púrpura de bromocresol	(CAS n° 115–40–2)	0,01 g/l

NOTA Este medio de cultivo es idéntico al agar BCYE (véase el capítulo B.1), excepto en que se han añadido al agar BCYE tres suplementos antibióticos, dos indicadores y glicina.

ANEXO 4. PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN BACTERIANA
(LPN CECT 10⁻⁴)

Descongelar un vial de cepa de trabajo control de *Legionella pneumophila* CECT.

Inocular en medio de *Legionella* enriquecido (ENR=BCYE) e incubar 48 horas a 36 ± 2 °C en aerobiosis y condiciones de humedad.

A partir del cultivo fresco (48 horas de incubación) en medio de ENR de la cepa trabajo control se preparan 3 ml de una suspensión bacteriana en agua destilada estéril, de densidad 0.5 McFarland, de ella se prepara la dilución de trabajo 10^{-4} (*):

- Preparación dilución 10^{-1} : 1 ml de la suspensión McFarland 0.5 y 9 ml de agua destilada estéril
- A partir de la dilución 10^{-1} se prepara, mediante el método de dilución seriada, la dilución de trabajo establecida: 10^{-4} , de la siguiente forma:
 - En tubo Falcon con 5 ml de agua destilada estéril añadir 5 ml de la dilución 10^{-1} , homogeneizar (dilución 10^{-2}).
 - En tubo Falcon con 5 ml de agua destilada estéril añadir 5 ml de la dilución 10^{-2} , homogeneizar (dilución 10^{-4})

ANEXO 5. MATERIAL DE CONTROL PREPARADO CON CEPAS DE TRABAJO
PROCEDENTES DE COLECCIONES DE CULTIVO TIPO: (CI POSITIVO LG CECT 10⁻⁴ Y 10⁻⁵)

A. Preparación suspensión bacteriana:

1. Descongelar un vial de cepa de trabajo control de *Legionella pneumophila* CECT y/o *Legionella* spp. de acuerdo con el CCI.
2. Inocular en medio de *Legionella* enriquecido (ENR= BCYE) e incubar 48 horas a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ en aerobiosis y condiciones de humedad.
3. A partir del cultivo fresco (48 horas de incubación) en medio de ENR (BCYE) de la cepa trabajo control se preparan 3 ml de una suspensión bacteriana en agua destilada estéril, de densidad 0.5 McFarland; de ella se prepara la dilución de trabajo.

1. Control de Exactitud muestra dopada con recuento elevado: Mc Farland 0.5 dilución 10^{-4} (*)
2. Control de Exactitud muestra dopada con recuento elevado: Mc Farland 0.5 dilución 10^{-5} (*)
3. Control de Precisión muestra dopada con recuento elevado: Mc Farland 0.5 dilución 10^{-4} (*)
4. Control de Precisión muestra dopada con recuento elevado: Mc Farland 0.5 dilución 10^{-5} (*)

- Preparación de las diluciones de trabajo para dopar las muestras control:

- Preparación dilución 10^{-1} : 1 ml de la suspensión McFarland 0.5 y 9 ml de agua destilada estéril

- A partir de la dilución 10^{-1} se prepara, mediante el método de dilución seriada, la dilución de trabajo establecida: 10^{-4} , de la siguiente forma:

- En tubo Falcon con 5 ml de agua destilada estéril añadir 5 ml de la dilución 10^{-1} , homogeneizar (dilución 10^{-2}).
 - En tubo Falcon con 5 ml de agua destilada estéril añadir 5 ml de la dilución 10^{-2} , homogeneizar (dilución 10^{-3}); repetir lo mismo una vez para obtener la dilución 10^{-4} y dos veces para la dilución 10^{-5} .

(*) el valor de la dilución (10^{-4}) se ha establecido a partir de los resultados del Estudio de Validación previo.

B. Siembra de la suspensión bacteriana de las cepas de referencia para estimación del valor teórico

Inocular 100 µl de la suspensión bacteriana (dilución de trabajo 10^{-4} y 10^{-5}) en medio BCYE y GVPC. Incubar en las mismas condiciones que la muestra control interno y realizar el recuento de UFC/placa. Este nº de UFC se utiliza para estimación del valor teórico.

C.Preparación muestra control positivo

1. Control de Exactitud:

La muestra a inocular es una muestra de agua sanitaria esterilizada en autoclave.

Para calcular el Control de exactitud con concentraciones elevadas de *Legionella* inoculamos 1 Litro de agua esterilizada con 10 de una suspensión de *Legionella* 10^{-4} .

Para calcular el Control de exactitud con concentraciones bajas de *Legionella* inoculamos 1 Litro de agua esterilizada con 10 de una suspensión de *Legionella* 10^{-5} .

2. Control de Precisión:

La muestra a inocular es una muestra de agua sanitaria sin esterilizar.

Para calcular el Control de precisión con concentraciones elevadas de *Legionella* inoculamos 1 Litro de agua esterilizada con 10 de una suspensión de *Legionella* 10^{-4} .

Para calcular el Control de precisión con concentraciones bajas de *Legionella* inoculamos 1 Litro de agua esterilizada con 10 de una suspensión de *Legionella* 10^{-5} .

Procesamos en paralelo una muestra de la misma agua dopada y sin dopar

Inocular 10 ml de una suspensión bacteriana al 1/10000, dilución 10^{-4} , en un litro de agua procedente de la red de agua sanitaria fría esterilizada en autoclave.

ANEXO 6. PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DEL RECuento DEL LOG DEL Nº UFC/L
OBTENIDO DE LOS CULTIVOS DE AS POR PABELLÓN, PLANTA Y UNIDAD, REALIZANDO
UNA DETERMINACIÓN POR CADA PT EN EL MISMO PERÍODO DE TIEMPO

			log Nº UFC/L INFORMADO					
			N válido	Media	Desviación estándar	Percentil 25	Mediana	Percentil 75
UNIDAD								
A11	PT	3	2,845	2,464	,000	4,210	4,325	
	PC	2	4,552	,320	4,325	4,552	4,778	
A12	PT	1	4,121	.	4,121	4,121	4,121	
	PC	1	3,204	.	3,204	3,204	3,204	
A13	PT	42	2,262	1,920	,000	2,933	3,785	
	PC	3	,767	1,329	,000	,000	2,301	
A14	PT	1	3,255	.	3,255	3,255	3,255	
	PC	1	3,255	.	3,255	3,255	3,255	
A21	PT	11	1,367	1,630	,000	,000	3,000	
	PC	1	3,230	.	3,230	3,230	3,230	
A22	PT	139	,932	1,430	,000	,000	2,398	
	PC	4	1,989	2,522	,000	1,349	3,977	
A23	PT	9	1,576	1,875	,000	,000	3,568	
	PC	2	1,784	2,523	,000	1,784	3,568	
A24	PT	18	,531	1,310	,000	,000	,000	
	PC	1	2,301	.	2,301	2,301	2,301	
A31	PT	4	3,702	,754	3,160	3,735	4,244	
	PC	1	4,574	.	4,574	4,574	4,574	
A32	PT	31	2,011	2,072	,000	2,000	3,903	
	PC	3	2,869	2,519	,000	3,892	4,716	
A33	PT	14	1,184	1,731	,000	,000	3,176	
	PC	4	2,012	2,402	,000	1,639	4,024	
A34	PT	4	2,092	1,775	,651	2,224	3,533	
	PC	4	2,092	1,775	,651	2,224	3,533	
AB	PT	41	1,037	1,688	,000	,000	2,000	
	PC	5	1,686	2,343	,000	,000	3,653	
AS	PT	7	1,591	2,001	,000	,000	3,863	
	PC	1	3,863	.	3,863	3,863	3,863	
B1	PT	1	4,301	.	4,301	4,301	4,301	

	PC	0
B11	PT	3	3,595	1,022	2,477	3,826	4,481
	PC	2	4,154	,463	3,826	4,154	4,481
B12	PT	50	4,716	,927	4,378	5,048	5,206
	PC	3	3,021	2,624	,000	4,330	4,732
B13	PT	47	3,007	2,100	,000	3,732	4,885
	PC	3	3,150	2,733	,000	4,565	4,885
B14	PT	22	1,184	1,703	,000	,000	2,778
	PC	1	2,778	.	2,778	2,778	2,778
B2 QX	PT	1	,000	.	,000	,000	,000
	PC	0
B21	PT	1	2,845	.	2,845	2,845	2,845
	PC	0
B22	PT	5	2,695	1,528	3,114	3,114	3,623
	PC	3	2,246	1,961	,000	3,114	3,623
B23	PT	51	2,957	2,233	,000	3,431	4,527
	PC	3	2,207	2,318	,000	2,000	4,622
B24	PT	3	,000	,000	,000	,000	,000
	PC	1	,000	.	,000	,000	,000
B2QX	PT	1	4,398	.	4,398	4,398	4,398
	PC	0
B3	PT	1	,000	.	,000	,000	,000
	PC	0
B31	PT	70	2,265	2,327	,000	2,000	4,724
	PC	3	4,696	,510	4,328	4,483	5,279
B32	PT	14	2,507	2,309	,000	3,572	4,699
	PC	5	4,651	,619	4,477	4,778	5,041
B33	PT	4	3,858	,552	3,385	3,854	4,331
	PC	3	3,995	,587	3,322	4,260	4,401
B34	PT	5	1,407	1,436	,000	1,301	2,778
	PC	3	1,360	1,390	,000	1,301	2,778
BB	PT	5	,000	,000	,000	,000	,000
	PC	2	,000	,000	,000	,000	,000
BB1	PT	1	2,000	.	2,000	2,000	2,000
	PC	1	2,000	.	2,000	2,000	2,000

BB3	PT	2	2,389	3,379	,000	2,389	4,778
	PC	1	4,778	.	4,778	4,778	4,778
BB4	PT	1	,000	.	,000	,000	,000
	PC	1	,000	.	,000	,000	,000
BS	PT	4	1,181	2,362	,000	,000	2,362
	PC	0
C11	PT	19	2,051	2,324	,000	,000	4,087
	PC	1	5,778	.	5,778	5,778	5,778
C12	PT	1	,000	.	,000	,000	,000
	PC	1	,000	.	,000	,000	,000
C21	PT	34	2,153	1,624	,000	2,581	3,000
	PC	3	2,661	,392	2,301	2,602	3,079
C22	PT	22	1,256	2,132	,000	,000	3,447
	PC	3	1,509	2,613	,000	,000	4,526
C31	PT	34	2,237	1,561	,000	2,602	3,415
	PC	2	3,517	1,294	2,602	3,517	4,431
C32	PT	23	4,493	,658	4,076	4,674	4,778
	PC	1	4,778	.	4,778	4,778	4,778
C4	PT	4	2,939	,908	2,331	2,794	3,547
	PC	1	4,170	.	4,170	4,170	4,170
CB	PT	2	,000	,000	,000	,000	,000
	PC	2	,000	,000	,000	,000	,000
CS	PT	1	2,602	.	2,602	2,602	2,602
	PC	1	2,602	.	2,602	2,602	2,602

ANEXO 7. COMUNICACIONES A CONGRESOS

1. Comparación del cultivo y la PCR a tiempo real en la detección de *Legionella* spp. M.D. Ocete, J.L. Alfonso, G. Marcaida, G. Sáez, M. Jiménez, R. Llucián, S. Donderis. *Microbiol Clin*. Vol 26 (Esp Congr). 2008. ISSN: 0213-005X.

417

DETECCIÓN DE PORTADORES NASALES DE SARM MEDIANTE UNA TÉCNICA DE PCR A TIEMPO REAL (RT-PCR)

C. Morales¹, A. González¹, A. Calderón², C. Gallés³, P. Pérez⁴, G. Sauca⁵, R. Vidal⁶ y M. Salvadó⁷

¹Servicio de Microbiología LRC-H. Mar, Laboratori de Referència de Catalunya -H. Mar. ²Microbiología Hospital Municipal de Badalona. ³S. Microbiología Corporació de Salut del Maresme i la Selva. ⁴S. Microbiología Consorci Hospitalari de Terrassa. ⁵S. Microbiología Hospital de Mollet. ⁶S. Microbiología Consorci Sanitari del Maresme.

Introducción: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) se ha diseminado por todo el mundo, fundamentalmente en las últimas dos décadas, siendo responsable de una significativa morbilidad y mortalidad. La estrategia de control pasa por la detección rápida de los portadores de SARM. Los cultivos tradicionales son lentos (2-3 días) por lo que sería de gran utilidad la implantación de técnicas moleculares que permitan un diagnóstico en pocas horas.

Métodos: Se estudió la eficacia de un método de PCR a tiempo real (RT-PCR) (Light Cycler RocheTM) en un estudio de cribaje en portadores nasales comparado con el cultivo. A un total de 150 muestras nasales pertenecientes a 132 pacientes con riesgo de estar colonizados, se les aplicaron dos métodos de detección; por RT-PCR y por cultivo en CNA agar sangre y en medio cromogénico MRSA ID (Biomerieux). La extracción del DNA a partir del escobillón nasal se realizó mediante High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche diagnostics). La RT-PCR detectó simultáneamente la especie de *Staphylococcus* (LightCycler *Staphylococcus* Kit M^{GRADE}) y el gen *mecA* (LightCycler MRSA Detection Kit) mediante curvas de fusión. La identificación de las especies de *Staphylococcus* aisladas en los cultivos y las pruebas de sensibilidad fueron realizadas por los métodos convencionales.

Resultados: De las 150 muestras, 31 fueron positivas por ambos métodos y 97 negativas. La RT-PCR detectó la presencia de gen *mecA* en 6 muestras negativas por cultivo, mientras que se obtuvo crecimiento de SARM en 3 muestras que fueron negativas por PCR y 13 mostraron un resultado indeterminado (presencia de gen *mecA*, *S. aureus* y *Staphylococcus plasmacoagulasa* negativos en la misma muestra). La RT-PCR presentó una sensibilidad del 91,18% y una especificidad del 94,17%. Se obtuvo un valor predictivo positivo de 83,78% y un valor predictivo negativo de 97%. El tiempo de detección por RT-PCR fue inferior a 2 horas, significativamente más reducido que el tiempo medio obtenido por cultivo (55,64 horas).

Conclusiones: A pesar de los resultados indeterminados (la utilización de técnicas que detectan el cassette cromosómico SCC_{mecA} resuelven este problema) se demuestra que los portadores de SARM pueden ser identificados mediante métodos moleculares y que su uso puede ayudar a los programas de control de la infección nosocomial. El coste más elevado de estas técnicas puede estar compensado por la disminución de recursos en aislamientos preventivos y en tratamientos antibióticos innecesarios.

418

COMPARACIÓN DEL CULTIVO Y LA PCR A TIEMPO REAL EN LA DETECCIÓN DE LEGIONELLA SPP

M.D. Ocete, J.L. Alfonso, G. Marcaida, G. Sáez, M. Jiménez, R. Llucián y S. Donderis

Unidad de Microbiología, Servicio de Análisis Clínicos. Hospital General Universitario de Valencia.

Objetivo: Comparar el cultivo (método de referencia) y la PCR a tiempo real (PCR-RT) para la detección de *Legionella* spp. en muestras de agua.

Material y métodos: Se analizaron 140 muestras de agua procedentes de la red de distribución de agua sanitaria (fría y caliente) mediante cultivo (Norma UNE-ISO 11731:1998) que demuestra la presencia o ausencia de *Legionella* spp y estima el número de unidades formadoras de colonias (ufc) en volumen de muestra original; y mediante PCR-RT para la amplificación de un fragmento específico del genoma de la bacteria, que consta de las siguientes partes: concentración de las muestras de agua por filtración, lisis bacteriana, extracción y purificación de los ácidos nucleicos ("High Pure Template Preparation Kit" (Roche®)), detección y cuantificación de *Legionella* spp mediante LightCycler 2.0 (Roche®) utilizando para la mezcla de reacción el kit LightCycler Fast-Start DNA Master Plus Hybridation Probes (Roche®) y un control interno de inhibición (LightCycler kit DNA (Roche®)). Se utilizan cebadores que amplifican un fragmento de 386 pb del gen 16S rRNA de *Legionella* spp. Los productos de amplificación se detectan mediante el empleo de sondas de hibridación marcadas con fluorocromos. Los resultados se expresan en número de copias de DNA/Litro. Se realizó el análisis estadístico mediante el test Chi-Cuadrado para los resultados cualitativos y regresión lineal para los cuantitativos.

Resultados: Del total de muestras analizadas el resultado del análisis fue positivo en el 30% de los cultivos y en el 38,6% por PCR-RT. Se observó asociación, estadísticamente significativa ($p < 0,01$), entre los resultados positivos y negativos obtenidos por ambos métodos. El análisis de correlación entre los resultados cuantitativos obtenidos por cultivo (log ufc/L) y por PCR-RT (log n° copias DNA/L) de las muestras analizadas, demuestra la existencia de relación estadísticamente significativa ($p < 0,01$) entre ambos resultados (ecuación: log n° copias DNA/L = 0,7009+0,7416° log ufc/L). El coeficiente de correlación lineal entre ambos resultados es de 0,655.

Conclusiones: Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las muestras estudiadas, podemos concluir que el valor, positivo o negativo, observado por cultivo tiene relación con el resultado positivo o negativo obtenido por PCR-RT. Existe una correlación significativa entre el log ufc/L (cultivo) y el log n° copias DNA/L (PCR-RT).

419

UTILIZACIÓN DE GENOTYPE MTDR PLUS PARA CONOCER LA SENSIBILIDAD DE M. TUBERCULOSIS EN MUESTRAS CLÍNICAS DIRECTAMENTE

M.J. Unzaga, R. Blanco, L. García, A. Isabel Morla, I. Gerediaga, B. Ameza, M. Sánchez, C. Expeleta, J.A. Alava y R. Cisterna

Servicio de Microbiología, Hospital de Basurto.

Objetivo: El objetivo del estudio fue conocer las posibilidades de una detección rápida en muestra directa, según las recomendaciones del fabricante, de la sensibilidad de *M. tuberculosis* a isoniacida (INH) y Rifampicina (RIF) respectivamente.

Métodos: Un total de 18 muestras de esputo, tratadas con Na OH-N acetil cisteína y almacenadas a -20°C hasta el análisis, fueron seleccionadas por haberse aislado *M. tuberculosis* previamente de ellas. El resultado de la baciloscopia en 16 de ellas fue positivo y mientras que dos de ellas habían sido negativas. Las pruebas de sensibilidad se realizaron mediante el sistema BACTEC 960 Becton Dickinson. La prueba molecular de sensibilidad Genotype MYDR plus se realizó a partir de un alícuota de 500 µl de la muestra pretratada, se centrifugó a 10.000 x g, 15 min. El pellet se suspendió en TE (100 µl) y se inactivó por calor (95 °C, 15 min.). El DNA se extrajo mediante ultrasonificado a temperatura ambiente 15 min, seguido por una centrifugación a 10.000 x g 15 min.) La amplificación se realizó con 5 µL del DNA extraído, desnaturalización (95 °C 5 min.); 10 ciclos de (95°C, 30s y 58 °C 2 min.); 30 ciclos de (95 °C 25 s; 53 °C 40s y 70 °C 40s) y una extensión final a 70 °C durante 8 min.

Resultados: Las 18 muestras eran sensibles a los dos antibióticos testados INH y RIF mediante el sistema Bactec 960.

2. Eficacia del tratamiento con dióxido de cloro para la prevención de *Legionella* sp. de la red de agua sanitaria de un hospital. M. Jiménez Mayordomo, M.D. Ocete, M.D.C. Bresó, I. Micó, J.L. Alfonso, I. Valero, M. Torrecillas, R. Medina, F. Grosson, C. Gimeno. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Vol 34, S1:374-427. 2016. ISSN: 0213-005X. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-X0213005X16538364>

edad media 63,68 años (DE 21), 58,7% mujeres, de los cuales 70 (13,75%) presentaban dependencia grave o total en el índice de Barthel (< 35). La media de índice de Charlson de 4,44 (DE: 5,4). 44 (8,6%) portaban sonda vesical permanente. 27 ingresaron en UCI. Reingresaron en 30 días 12 pacientes (2,4%) y fallecieron 24 (4,7%). En 290 (56%) pacientes se obtuvo un cultivo de orina positivo y en 88 hemocultivo positivo. Cuando había discordancia entre el urocultivo y el hemocultivo se consideró como microorganismo responsable el identificado en el hemocultivo. Se calcularon las PTI de los antibióticos más comunes en ITU y de los microorganismos que causaron el 94% de las ITU utilizando los datos del antibiograma de estos pacientes. Las PTI ITU-específicas calculadas para los siguientes antibióticos se presentan en la tabla. De forma que por cada 99 pacientes con ITU tratados con meropenem habría 1 paciente erróneamente tratado, por cada 78 tratados con amikacina habría 1 mal tratado, y así sucesivamente con el resto de antibióticos.

Antibiótico	PTI ITU-específica
Meropenem	99,99
Amikacina	78,04
Fosfomicina	73,54
Ertapenem	49,35
Piperacilina/Tazobactam	28,54
Gentamicina	17,10
Amoxicilina-Clav	16,53
Tobramicina	13,89
Cefotaxima	10,59
Cefuroxima	10,34
TMZ-SMZ	8,31
Ciprofloxacino	7,48

Conclusiones: La PTI es una herramienta que podría ser de utilidad para integrar la información microbiológica en una infección concreta con múltiples agentes etiológicos para predecir cuál es el antibiótico empírico con mayor actividad desde el punto de vista microbiológico. No hay que olvidar las otras consideraciones que hay que tener en cuenta en la terapia antibiótica: alergias, función renal, farmacocinética y por supuesto la necesidad de realizar un uso adecuado de los antimicrobianos, acorde a la situación clínica del paciente.

785. EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON DIÓXIDO DE CLORO PARA LA PREVENCIÓN DE *LEGIONELLA* SP. DE LA RED DE AGUA SANITARIA DE UN HOSPITAL

M. Jiménez Mayordomo¹, M.D. Ocete², M.D.C. Bresó², I. Micó², J.L. Alfonso², I. Valero², M. Torrecillas², R. Medina², F. Grossón² y C. Gimeno²

¹Hospital de Manises, Valencia. ²Consortio Hospital General Universitario de Valencia.

Introducción y objetivos: *Legionella* sp coloniza frecuentemente la red de agua caliente de los hospitales y su erradicación es difícil. Los tratamientos de descontaminación comúnmente usados son ineficaces para su eliminación, ya que para la prevención de *Legionella* sp. es imprescindible prevenir las biopelículas en las tuberías y éstas son extremadamente resistentes a los desinfectantes químicos usados habitualmente. Los procedimientos orientados exclusivamente a la destrucción directa de *Legionella* sp. no son duraderos. El dióxido de cloro actúa como gas disuelto en el agua, que penetra en la biopelícula, inhibiendo su crecimiento y eliminándola progresiva de los sistemas antiguos. El objetivo de este trabajo es estudiar la eficacia de aplicar un tratamiento con dióxido de cloro en la red de agua sanitaria de nuestro hospital.

Material y métodos: En septiembre de 2014 se instaló un generador de dióxido de cloro que suministra dióxido de cloro de gran pureza

en cantidades siempre reproducibles. Tanto la concentración de dióxido de cloro como la de clorito como producto derivado del tratamiento, se miden permanentemente. Garantizando el cumplimiento del reglamento sobre agua potable. Se han comparado los resultados de los cultivos cuantitativos de *Legionella* sp. en muestras de agua recogidas antes y después del tratamiento entre 2011 y 2015. Se ha valorado la eficacia de descontaminación mediante el porcentaje de reducción del nº ufc/l de *Legionella* sp. y las diferencias entre las medias del nº de ufc/l y del logaritmo en base 10 del nº de ufc/L, mediante análisis de regresión lineal empleando el paquete estadístico SPSS 9.0.

Resultados: Entre 2011 y 2013, se observa disminución del nº ufc/L de *Legionella* sp. en la toma posterior a un tratamiento de desinfección de la instalación con poca estabilidad en el tiempo, ya que en la siguiente medición el nº ufc/L de *Legionella* sp. vuelve a valores anteriores. Tras la instalación del generador de dióxido de cloro, se observa una disminución del 68% en el nº ufc/L de *Legionella* sp. que se mantiene hasta el momento actual. La media del log ufc/l pre-tratamiento fue de 4,41 mientras que la post-tratamiento fue de 3,92. El análisis individual de los puntos terminales de red, mostró valores elevados (> 10.000 ufc/l) del nº ufc/L de *Legionella* sp. en ciertos puntos de la instalación, que se correspondían con puntos de poco uso en los que se acantona la bacteria.

Descontaminación con dióxido de cloro	Nº ufc/L	Log ufc/L	Nº ufc/L	Log ufc/L
	Pre-ito	Pre-ito	Post-ito	Post-ito
Media	26.069	4,4	8319	3,9

Conclusiones: Con el tratamiento continuo de la instalación de agua sanitaria con dióxido de cloro se ha conseguido una disminución del nº ufc/L de *Legionella* sp. superior al obtenido con otros métodos de desinfección como la apertura de grifos (SEIMC 2011), que se mantiene en el tiempo con tendencia a la baja. En nuestro caso, nos ha permitido reducir casi 1 log (10.000 UFC/L). Aún así, en puntos de la instalación con poco uso, en los que se acantona la bacteria, quizás sea necesario el uso combinado con otros métodos de desinfección.

786. ADAPTACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN DEL SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA ANTE LA FUSIÓN DE LABORATORIOS DE DIFERENTES NIVELES ASISTENCIALES: NUESTRA EXPERIENCIA EN EL PROCESO DE DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES GASTROINTESTINALES (BACTERIAS Y VIRUS)

G. Roig Carbajosa, V. Rodríguez Garrido, A. Andreu Domingo y R.M. Juvé Saumell

Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona.

Introducción y objetivos: El proceso de unificación entre un Servicio de Microbiología Hospitalario de tercer nivel y los laboratorios multidisciplinares de la Xarxa d'Atenció Primària de la región metropolitana de Barcelona Centro, provoca necesariamente un impacto en la organización previamente establecida. El objetivo de este trabajo es presentar como se ha objetivado y cuantificado este cambio organizativo, mediante el estudio de las solicitudes recibidas durante 2013, antes de la unificación, 2014 año de la unificación y 2015, año de la consolidación, así como presentar los cambios de flujos de trabajo, concretamente en el diagnóstico de las infecciones gastrointestinales (GI).

Material y métodos: Las previsiones estimadas para la unificación se cifraban en un incremento del 200% en el proceso diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales por bacterias y virus. Era necesario actuar en diversos temas clave para conseguir la integración organizativa: modificaciones adaptativas del Sistema Informático del Laboratorio. Cambios de sistema manual a automatizado

- Evaluación de métodos de cultivo para detección y recuento de *Legionella* en muestras de agua sanitaria. M. Jiménez, M.D. Ocete, M.D.C Bresó, I. Micó, J.L. Alfonso, I. Valero, M. Torrecillas, B. Fuster, R. Medina, F Grossón y C. Gimeno. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Vol 35, 2017. ISSN: 0213-005X. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas>

[microbiologia-clinica-28-pdf-X0213005X17615120](#)

Grupo	Edad mediana (rango)	N	Positivo	Negativo	Indeterminado
Grupo 0	55 (48-89)	63	53 (84,12%)	9 (14,28%)	1 (1,58%)
Grupo 1	35 (32-48)	1.184	1.027 (86,96%)	82 (6,94%)	72 (6,09%)
Grupo 2	29 (26-32)	891	711 (79,79%)	64 (7,18%)	116 (13,01%)
Grupo 3	23 (6-26)	510	396 (77,64%)	40 (7,84%)	74 (14,50%)
Todos	32 (6-89)	2645	2187 (82,68%)	195 (7,37%)	263 (9,94%)

Conclusiones: La gran mayoría de la población femenina (83%) presenta inmunidad frente a la rubeola en nuestra área. El grado de inmunización fue similar en los grupos que habían recibido dos dosis, tanto temprana como tardía. El grupo de pacientes no vacunados presentó el mayor número de no inmunizados, como era de esperar. El número de casos con resultado indeterminado fue inversamente proporcional a la edad del paciente.

859. INFECCIONES HUMANAS POR *CORYNEBACTERIUM TUBERCULOESTEIRICUM*; UNA ESPECIE INFRECUENTEMENTE AISLADA DE MUESTRAS CLÍNICAS

I. Fernández Natal¹, M. Arias Temprano¹, T. Marrodán Ciordia¹, H. Rodríguez Pollán¹, A. Álvarez Justel¹, B. González Carracedo¹ y F. Soriano²

¹Complejo Asistencial Universitario de León-Sacyl, Complejo Asistencial Universitario de León, León. ²Escuela de Fisioterapia de la ONCE, Salud Pública, Madrid, ONCE-Escuela de Fisioterapia, Madrid.

Introducción: *Corynebacterium tuberculoesteiricum* es una corinebacteria raramente descrita como responsable de infecciones humanas. En nuestro conocimiento solo 25 casos asociados a infecciones humanas han sido descritos. No hay datos en España, América, Asia y África. **Objetivos:** Descripción de los aspectos microbiológicos de 19 cepas de *C. tuberculoesteiricum* así como del posible significado clínico en los pacientes de los que procedían.

Material y métodos: Durante los últimos 3 años (2014-2016) *C. tuberculoesteiricum* fue aislado en nuestro laboratorio a partir de 22 muestras clínicas procedentes de 19 pacientes: exudado de herida (5), orina (5), catéter vascular (5), sangre (4), catéter telescópico (1), biopsia cutánea (1) y semen (1). Para su identificación se utilizaron técnicas convencionales así como API-Coryne™ V2.0 y MALDI TOF MS Biotyper-Bruker. El estudio de sensibilidad a los antimicrobianos se realizó en placas de agar sangre con tiras de Etest incubadas en aerobiosis a 35-37 °C. Los resultados fueron interpretados siguiendo los documentos de EUCAST-2016-v.6.0 y del CLSI-2016-M45-A42. El significado clínico de los aislamientos fue definido de acuerdo con criterios previamente establecidos (Funke y Bernard).

Resultados: Todas las cepas se recuperaron de agar sangre a las 24h en aerobiosis. Los diferentes perfiles arrojados por API-Coryne™ V2.0 no permitieron la identificación de la especie. Utilizando MALDI TOF MS se obtuvieron scores superiores a 1,77 con todos los aislados lo que permitió identificación a nivel de especie. Todas las cepas fueron sensibles a vancomicina y linezolid. Las tasas de resistencia al resto de los antibióticos fueron: penicilina (84,2%), cefotaxima (57,9%), meropenem (52,6%), ciprofloxacino (68,4%), moxifloxacino (68,4%), gentamicina (73,7%), eritromicina (89,5%), clindamicina (89,5%), tetraciclina (36,8%), rifampicina (31,6%), quinupristina/dalfopristina (15,9%) y cotrimoxazol (63,1%). Resistencia a 3 o más antibióticos no relacionados se observó en el 63,1% de las cepas. En 14 de los 19 (73,7%) casos el organismo se aisló en cultivo puro. De los 19 casos se consideró que el microorganismo aislado tenía un significado relevante en 8 (42,1%), probable en 6, posible en 1 y no asociado en 4. La edad de los pacientes osciló entre 41-84 años (media 73,4) y con casi la misma distribución respecto al sexo (M/F = 10/9). Considerando solo los 8 casos clasificados como relevantes la distribución por edad osciló entre 41-83 años (media 71,3) con una tasa M/F = 2/5. Las principales infecciones en que éstas estuvieron asociadas fueron infecciones urina-

rias (2), de heridas (2), respiratorias (1), bacteriemia (1), infección de catéter (1) y prostatitis crónica (1).

Conclusiones: La base de datos de API Coryne™ V2.0 no incluye *C. tuberculoesteiricum* por lo que no es un procedimiento definitivo para la identificación de este organismo. Por el contrario MALDI TOF MS es una herramienta muy útil para su identificación. La resistencia a los antibióticos es frecuente en esta especie en donde solo vancomicina y linezolid fueron uniformemente activas, habiéndose detectado un 63,1% de cepas con resistencia múltiple. De los 19 casos se consideró que el microorganismo aislado tenía un significado clínico relevante en 8 (42,1%), probable en 6, posible en 1 y no asociado en 4.

860. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE CULTIVO PARA DETECCIÓN Y RECuento DE *LEGIONELLA* EN MUESTRAS DE AGUA SANITARIA

M. Jiménez¹, M.D. Ocete², M.D.C. Bresó¹, I. Micó², J.L. Alfonso², I. Valero², M. Torrecillas², M. Belda², B. Fuster², R. Medina², F. Grossón² y C. Gimeno²

¹Hospital de Manises, Manises. ²Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Valencia.

Introducción: El cultivo convencional con medios selectivos es la única técnica aprobada para la detección y cuantificación de *Legionella* en muestras de agua (ISO 11731: 2007). No obstante, los resultados definitivos de los cultivos necesitan diez días hasta su finalización y pueden tener una sensibilidad baja debido a las características de crecimiento de *Legionella*, especialmente cuando la muestra contiene otros microorganismos, distintos de *Legionella*, que pueden inhibir su crecimiento, o bien por la presencia de células de *Legionella* en estado viable pero que no se pueden detectar por el cultivo convencional, *Legionella* viable no cultivable (LVNC) pero que son potencialmente patógenas.

Objetivos: El objetivo de este estudio es evaluar la recuperación de *Legionella* viable siguiendo la metodología de la Norma UNE 11731 pero empleando dos medios de cultivo, el de la norma GVPC (ISO 11731: 2007) y el medio no selectivo BCYE α .

Material y métodos: Estudio retrospectivo del resultado de los análisis de 896 muestras de agua procedentes de todos los puntos terminales de la red de agua caliente sanitaria de un hospital de 500 camas. Las muestras se han recogido a lo largo de 5 años. El cultivo de las muestras se ha realizado según el procedimiento de trabajo de la Norma UNE-ISO 11731:2007 en un laboratorio acreditado (Acreditación nº 633/LE1222), mediante el cual se detecta la presencia o ausencia de *Legionella* sp. y se estima el número de unidades formadoras de colonias en un volumen (1L) de muestra original (UFC/L).

Resultados: En 563 ocasiones el medio en el que se aisló el mayor número de colonias fue BCYE α (63% de las veces) frente a las 333 con el medio GVPC (37%) (p-valor 0,000 < 0,05). Existen diferencias significativas en el nº de colonias informadas según el medio utilizado, siendo la mediana en BCYE α un 35% superior que en GVPC. En presencia de otros microorganismos (flora interferente), ambos métodos son similares, siendo los porcentajes de recuperación máxima de ambos medios, GVPC y BCYE α , 44,7% y 55,3% respectivamente; sin embargo, en ausencia de microorganismos, los porcentajes fueron 19,6% y 80,4%, siendo el medio BCYE α más sensible que el GVPC (p-valor 0,000 < 0,05). No existen diferencias significativas en las distribuciones del nº de colonias informadas según flora acompañante (media con/sin flora acompañante: 17.739 UFC/L/18.930 UFC/L).

Nº UFC/L	N válido informado	MEDIOMAXREC_DIC		
		Total	Medio máximo recuento BCYE	Medio máximo recuento GVPC
Media	896	60,391,58081705	24,85780180180	
Desviación típica	243,674,54599175	300,026,21553872	81,448,35080639	
Mediana	6,790,00000000	7,700,00000000	5,700,00000000	

Conclusiones: Es recomendable el uso de un medio no selectivo para el análisis de *Legionella* en la red de ACS con el objeto de aumentar la recuperación de cepas de *Legionella* viables. Añadir el medio no selectivo BCYE α al protocolo de análisis de aguas para la búsqueda de *Legionella* aumenta la probabilidad de dar un informe positivo y el nº de UFC/L informado es mayor. Esto podría implicar un cambio en las acciones correctoras a aplicar en la instalación según el RD 865/2003 sobre todo, en puntos de la instalación con recuentos bajos de *Legionella* en GVPC.

861. EVALUACIÓN DE TRES TÉCNICAS SEROLÓGICAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IGG FASE II FRENTE A COXIELLA BURNETII

M. Fernández Torres, M.A. Rodríguez Feijóo, I. Angulo, C. Herrera, G. Bartolomé

Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.

Introducción y objetivos: En los pacientes con síntomas sugestivos de Fiebre Q, la serología constituye la técnica diagnóstica de primera línea. El método de referencia para el diagnóstico serológico es la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la cual permite confirmar el diagnóstico de fiebre Q aguda y crónica y la evolución de la enfermedad. Cuando la demanda diagnóstica es elevada, otros métodos serológicos como ensayo inmunoenzimático (EIA) y quimioluminiscencia (QL) presentan las ventajas de facilidad de lectura de resultados y automatización del proceso. El objetivo de este trabajo es valorar, mediante un estudio prospectivo, la utilidad de tres técnicas automatizadas para el cribado de anticuerpos IgG Fase II frente a *Coxiella burnetii* (dos EIA y una QL), utilizando como método de referencia la IFI.

Material y métodos: Estudio prospectivo de 60 muestras de suero obtenidas consecutivamente durante el periodo de agosto y septiembre de 2016 que fueron remitidas al Servicio de Microbiología de nuestro centro para el diagnóstico de fiebre Q. Todos los sueros se procesaron siguiendo las recomendaciones del fabricante, por *Coxiella burnetii* ELISA IgG de Vircell (EIA 1) y *Coxiella burnetii* ELISA IgG de Panbio (EIA 2) en el sistema automático D52, por quimioluminiscencia de Vircell en el sistema VirCia (QL) y como método de referencia, *Coxiella burnetii* IFA IgG de Vircell (IFI) considerando positivos los títulos mayores o iguales a 1/80. Los resultados no concluyentes (indeterminados) de EIA 1, EIA 2 y QL se consideraron positivos.

Resultados: De las 60 muestras analizadas por IFI, 46 (76,7%) resultaron negativas y 14 (23,3%) positivas (títulos \geq 1/80). Por EIA 1 se obtuvieron 48 resultados negativos (80%) y 12 (20%) positivos. El EIA 2 mostró 42 (70%) resultados negativos y 18 (30%) positivos. Mediante QL se detectaron 42 (70%) muestras negativas y 18 (30%) positivas. La sensibilidad (S), especificidad (ESP), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de las técnicas ensayadas, se muestran en la tabla.

	S (%)	ESP (%)	VPP (%)	VPN (%)
EIA 1	64,3	93,5	75	89,6
EIA 2	92,9	89,1	72,2	97,6
QL	92,9	89,1	72,2	97,6

Conclusiones: La técnica de EIA 1 evaluada, presenta una baja sensibilidad para la detección de anticuerpos IgG fase II por lo que no sería un método idóneo de cribado serológico de fiebre Q. La alta sensibilidad de las técnicas de QL y EIA 2, permite utilizarlas como método de cribado de anticuerpos IgG y posterior titulación por IFI de los resultados positivos, no obstante, sería conveniente estudiar series más amplias que incluyan mayor número de resultados positivos sobre los que realizar estudios estadísticos.

862. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LEISHMANIA SPP. EN EL NOROESTE DE LA COMUNIDAD DE MADRID: 2009-2016

G. Arán-Tobá, R. Millán, M. García-Moreno, V. Zamora, R. Martínez-Ruiz y M.F. Portero

Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda.

Introducción y objetivos: La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria endémica en España causada por protozoos del género *Leishmania* y transmitida por insectos del género *Phlebotomus*. Se han descrito varias formas clínicas de esta patología, siendo las formas cutánea y visceral las más frecuentes en nuestro país. Nuestro objetivo fue conocer la incidencia de leishmaniosis en nuestra área sanitaria basándonos en estudios serológicos.

Material y métodos: Se realizó un estudio descriptivo y retrospectivo de los pacientes a los que les fue solicitada una serología de *Leishmania* entre 2009 y 2016 en nuestro centro, un hospital universitario terciario ubicado en el noroeste de la Comunidad de Madrid, que atiende a una población de 400.000 habitantes aproximadamente. La técnica utilizada fue la detección de anticuerpos frente a *Leishmania* spp. en suero mediante una inmunofluorescencia indirecta comercial (MarDx Diagnostics, EE.UU.).

Resultados: Se realizaron 1.314 determinaciones de anticuerpos frente a *Leishmania* spp. en un periodo de 8 años. De ellas, 32 (2,4%) fueron positivas, con títulos \geq 1/160, y 1.282 (97,6%) fueron negativas. Tras la revisión de las 32 serologías positivas, 14 pacientes fueron confirmados y tratados como casos de leishmaniosis, 12 de ellos con la forma visceral y 2 con la forma cutánea. Diez de estos pacientes eran hombres (uno pediátrico) y 4 mujeres. La media de edad se situó en 47,3 años (rango 1-85). No hubo diferencias en el número de casos por año, pero sí en la distribución mensual, con un predominio de positivos entre los meses de febrero y junio, con 10 de los 14 casos positivos. En cuanto a la confirmación del resultado, en 10 casos se realizó mediante cultivo o PCR de médula ósea, 3 casos fueron confirmados mediante el reconocimiento de amastigotes de *Leishmania* sp. en frotis de médula ósea por el Servicio de Hematología y 1 caso había sido diagnosticado previamente mediante PCR en una biopsia de piel. Los 18 resultados positivos restantes fueron considerados falsos positivos por diferentes motivos: 10 casos fueron resultados positivos límite, con un título de 1/160, de los que 6 fueron descartados por ausencia de clínica compatible y 4 fueron descartados mediante cultivo y/o PCR, 4 casos fueron falsos positivos por reacción cruzada en pacientes diagnosticados de enfermedad de Chagas. 2 casos con título de 1/640 fueron descartados, uno mediante PCR y otro por ausencia de signos clínicos. 2 casos con título de 1/320 fueron descartados mediante PCR, y uno de ellos además mediante el uso del antígeno recombinante rK39.

Conclusiones: Nuestro paciente tipo con serología de *Leishmania* spp. positiva es un varón de mediana edad que presenta la forma visceral de la enfermedad. La mayoría de los casos se detectaron de febrero a junio. Por el alto porcentaje de falsos positivos obtenidos con la serología es necesario confirmar todas las serologías positivas con otras técnicas.

863. FACTORES CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS Y SOCIODEMGRÁFICOS DE LA INFECCIÓN POR COXIELLA BURNETII EN UN HOSPITAL DE 2.º NIVEL

A.I. Peláez Ballesta, I. Fernández Romero, M. Ruiz Campuzano, C. Peláez Ballesta, R. Mateo Paredes y E. Mene Fenor

Hospital Universitario Rafael Méndez, Lorca.

Objetivos: El objetivo del estudio fue analizar los casos con serología positiva para *Coxiella burnetii* (C.B.), valorando los factores epidemiológicos, y sociodemográficos asociados, formas clínicas de presentación, así como el seguimiento y el tratamiento.

4. Diversidad genética de *Legionella pneumophila* presente en la red de agua hospitalaria de un hospital de diseño horizontal. M. Jiménez, M.D. Ocete, M.D.C Bresó, M. Torres, P. Haenel, I. Valero, M. Torrecillas, B. Fuster, M. Belda, R. Medina, F. Gonzalez-Candelas y C. Gimeno. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Vol 35, 2017. ISSN: 0213-005X. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-X0213005X17615120>

mediana de edad fue 62 años (IQR: 47-73,5 años) y la mediana de duración de tratamiento de 14 días (IRQ: 7,5-19 días). 40/43 (93%) lo recibieron como primer tratamiento domiciliario mientras que 3/43 (7%) lo recibieron tras un tratamiento domiciliario previo. Las infecciones más frecuentes fueron: ITUs (20,9%; 3 casos de pielonefritis y 5 de ITU complicada), infecciones intraabdominales (20,9%), infecciones de material protésico y osteomielitis (18,6%) e infecciones respiratorias (16,3%). Solo 6/43 casos (14%) se consideraron infecciones comunitarias, siendo el resto nosocomiales, o relacionadas con la asistencia sanitaria. La incidencia de eventos adversos fue baja, observándose únicamente reacciones cutáneas en 2 pacientes (4,7%). 13/43 pacientes (31%) presentaron complicaciones relacionadas con el acceso vascular (8 flebitis químicas y 5 pérdida de acceso venoso), no encontrándose diferencias con el resto de la serie (35,1%; $p=0,584$). La tasa de curación clínica fue muy elevada (83,7%), sólo 2 pacientes reingresaron por agravamiento clínico, respondiendo al tratamiento hospitalario. No se produjo ningún exitus relacionado. El ahorro estimado fue de 7.511 €/paciente (IQR: 4.232-15.457€). **Conclusiones:** La administración de meropenem en un programa de TADE bajo este régimen es posible y parece efectiva y segura.

740. DIVERSIDAD GENÉTICA DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* PRESENTE EN LA RED DE AGUA HOSPITALARIA DE UN HOSPITAL DE DISEÑO HORIZONTAL

M. Jiménez¹, M.D. Ocete², M.D.C. Bresó², M. Torres³, P. Haene¹, I. Valero⁴, M. Torrecillas⁵, B. Fuster⁶, M. Belda⁶, R. Medina⁶, F. González-Candelas⁷ y C. Gimeno³

¹Hospital Manises, Valencia. ²Consortio Hospital General Universitario de Valencia, Valencia. ³Unidad Mixta Infección y Salud Pública, FISABIO/CSISP/Universidad de Valencia, Valencia.

Introducción: *Legionella* sp. es considerada una bacteria ambiental que puede pasar a colonizar los sistemas de abastecimiento de las ciudades y así incorporarse a los sistemas e instalaciones que requieran agua para su funcionamiento. La prevención de la legionelosis nosocomial es uno de los objetivos prioritarios de los hospitales. *Legionella pneumophila* presenta una elevada diversidad genética debido a sus altas tasas de recombinación. Se han descrito más de 2.000 secuencias tipo (ST) y presenta una distribución mundial muy heterogénea.

Objetivos: El objetivo de nuestro trabajo es conocer la diversidad genética de *Legionella pneumophila* presente en la red de agua hospitalaria de un hospital de diseño horizontal distribuido en tres pabellones (A, B, C) a partir de las cepas aisladas durante el control rutinario de la misma.

Material y métodos: Se analizaron 98 cepas congeladas de *L. pneumophila* representativas de los puntos terminales de la red de agua caliente sanitaria (ACS) del hospital, aisladas durante el periodo 2011-2015. Tras su cultivo se procedió a la extracción de DNA y secuenciación, amplificando los loci del esquema SBT para *L. pneumophila* (*flaC*, *oif*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*) usando una PCR estándar.

Resultados: Se ha podido asignar una ST específica a 61 cepas de *L. pneumophila* de las 98 cepas de *Legionella* sp. La ST mayoritaria es la 1362 ($n=45$), seguida de la ST1 ($n=13$), la ST1394 ($n=2$) y la ST52 ($n=1$). La ST1362 fue la más frecuente todos los años estudiados, excepto en 2014 que predomina la ST1. Las ST1394 y la ST52 sólo aparecen en 2011 y 2012, respectivamente. Analizamos los resultados obtenidos en cada pabellón del hospital. En los pabellones A y B predomina siempre la ST1362, excepto en 2014, en que se igualan los porcentajes de ST1 y ST1362. En el pabellón C se observa una mayoría de ST1 frente a ST1362. Así, la inversión en la prevalencia de las ST en 2014 se debería a un aumento de ST1 en los pabellones A y B, unida a la predominancia de ST1 en el pabellón C. Los tratamientos físico-químicos realizados para erradicar *Legionella* sp. han cambiado a lo largo del tiempo y sus resultados, también. Tras choques térmicos e hipercloración, la instalación no sufrió variaciones en la distribución

de las ST y la disminución en la cantidad de *Legionella* sp. en la instalación no era duradera. Sin embargo, con el dióxido de cloro disminuyó la ST1362, apareciendo en su lugar la ST1 y se obtuvo una disminución en la cantidad de *Legionella* sp. presente en la instalación de forma mantenida. Las muestras analizadas en 2015 son del primer semestre del año, previas al siguiente tratamiento con dióxido de cloro, y se observa como vuelve a prevalecer la ST1362 sobre la ST1. **Conclusiones:** En la instalación estudiada, los tratamientos de descontaminación realizados no alteran la diversidad genética de las cepas de *L. pneumophila*. El tratamiento con dióxido de cloro disminuye la cantidad de *Legionella* sp. y especialmente la ST1362.

741. ANÁLISIS DE UNA COHORTE DE PACIENTES CON MEDIASTITIS AGUDA EN UN HOSPITAL TERCIARIO DURANTE LA ÚLTIMA DÉCADA

S. Otálora Valderrama, J.A. Encarnación Navarro, A.F. Rojas Gutiérrez, B. Robles Rabasco, A. Castillo Navarro, J.A. Herrero Martínez, A. Hernández Torres, J. Gómez Gómez y E. García Vázquez

Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia.

Introducción y objetivos: Las mediastinitis agudas más frecuentes son las secundarias a esternotomías para cirugía cardíaca, seguidas de las secundarias a perforación esofágica y de la necrotizante, con origen en focos odontógenos. Analizamos una cohorte de pacientes con mediastinitis diagnosticados y tratados en la última década en un hospital de referencia y alta complejidad en el sureste de España (Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca), con el objetivo de analizar las características clínico-epidemiológicas, factores de riesgo y pronóstico.

Material y métodos: Estudio descriptivo observacional retrospectivo de enfermos diagnósticos de mediastinitis aguda entre enero de 2006 y diciembre de 2016. El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS.21.

Resultados: Se incluyeron 81 casos (54 hombres y 27 mujeres), con una edad media de 55 años (rango 1-83). La mediastinitis fue de origen bucofaringeo en 20 pacientes (25%) (absceso dentario ($n=7$), absceso periamigdalino ($n=12$) y dentario y periamigdalino ($n=1$)); de origen esofágico en 19 pacientes (23,4%) (posquirúrgico ($n=4$), perforación iatrogénica ($n=7$), perforación tumoral ($n=3$), perforación espontánea ($n=1$), perforación por ingesta de cáusticos ($n=2$) y por cuerpo extraño ($n=2$)); y secundaria a esternotomía media en 42 pacientes (51,9%). El diagnóstico se confirmó en la totalidad de los casos mediante TAC, observando en la mayoría de los enfermos colecciones y/o aire en mediastino. Los microorganismos más frecuentes en la mediastinitis postesternotomía fueron *Staphylococcus aureus* ($n=18$, 44%) y *Staphylococcus epidermidis* ($n=16$, 39%), con 68% de hemocultivos positivos y 13% de cultivos de tejidos polimicrobianos. En la etiología esofágica, en 26% el cultivo fue positivo para *Candida albicans* seguido de *Streptococcus beta-hemolítico* (21%) (67% hemocultivos positivos y 11% cultivos de tejidos positivos). En los casos de etiología bucofaringea, predominaron los cultivos positivos para *S. beta-hemolítico* (35%) seguido de *Enterococcus faecium* (20%). En cuanto a las comorbilidades, 27% eran diabéticos y no se disponía de información sobre el IMC en las postquirúrgicas pero 13,6% se describen como obesos. El tratamiento incluyó limpieza quirúrgica en 94%, que se realizó en las primeras 48 horas y 72 horas en el 74% y 92,5%, respectivamente. La estancia media hospitalaria fue de 36 días. El 80% ($n=65$) precisó manejo en la UCI, con una estancia media de 12 días. Fallecieron 14 pacientes (17%), 5 casos de etiología bucofaringea, 3 de etiología esofágica y 6 postesternotomía. En el análisis bivariado se asociaron de forma estadísticamente significativa al fallecimiento, la edad > 65 años, el antecedente de diabetes mellitus (DM), el hemocultivo positivo y haber sido sometido a más de una intervención quirúrgica en el ingreso, antes del diagnóstico de mediastinitis.

Conclusiones: En nuestra cohorte, la mitad de los casos de mediastinitis aparecen como una complicación de esternotomías medias en

5. Evaluación de métodos de cultivo para detección y recuento de *Legionella* en muestras de agua sanitaria. Adaptación de la norma UNE-EN ISO 11731:2017. M. Jiménez, M.D. Ocete, M.D.C Bresó, C. Salvador, I. Valero, M. Torrecillas, F. Grosson y C. Gimeno. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 37 (Espec Congr). 2019. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-sumario-vol-37-num-sc1-X0213005X19X4407>.

altamente transmisible, especialmente a partir de las manos del personal sanitario. La exposición antibiótica, la hospitalización prolongada y la edad avanzada (mayores de 65 años), son los principales factores de riesgo que se han asociado con esta infección. El diagnóstico de laboratorio debe realizarse solamente en pacientes sintomáticos o en casos de sospecha de íleon paraltico o megacolon tóxico. El objetivo del estudio ha sido realizar una aproximación epidemiológica de los casos de ICD en la Comunidad Valenciana (CV).

Material y métodos: Se ha realizado un estudio descriptivo y retrospectivo de los pacientes con solicitud de toxina de CD o detección molecular de los genes de las toxinas A o B (PCR-CD) en heces durante el periodo 2010-2017, seleccionándose la primera determinación de cada paciente. Como fuente de información se utilizaron los datos procedentes de la RedMIVA. Se trata de una aplicación informática, integrada en la Dirección General de Salud Pública, que recoge diariamente los resultados de las determinaciones microbiológicas realizadas en todos los hospitales públicos de la CV. Para cada determinación se estudiaron las variables tiempo, lugar (provincia) y persona (sexo, edad, ingreso).

Resultados: Se han analizado un total de 6.435 determinaciones para CD durante el periodo de estudio, detectándose diferencias significativas en cada anualidad. El 54,1% de las solicitudes procedían de la provincia de Valencia, el 38,2% de Alicante y el 7,7% de Castellón. El 54,2% de los pacientes eran mujeres. En la tabla se dispone la distribución de casos por año.

Año	Total	Toxina-CD	PCR-CD	Ingresados (%)	Meda edad
2010	419	419 (100%)	0 (0%)	75	83
2011	435	433 (99,5%)	2 (0,5%)	83	63
2012	488	464 (95,1%)	24 (4,9%)	78	81
2013	652	483 (74,1%)	169 (25,9%)	75	77
2014	872	611 (70,1%)	261 (29,9%)	73	86
2015	1.195	891 (74,6%)	304 (25,4%)	68	82
2016	1.148	742 (64,6%)	406 (35,4%)	71	69
2017	1.226	802 (65,4%)	424 (34,6%)	69	82
Total	6.435	4.845	1.590		

Conclusiones: En la CV, la infección por *C. difficile* muestra una tendencia ascendente, presentando variaciones inter-año e inter-provincias, con mayor prevalencia en pacientes > 60 años. Además el diagnóstico mediante PCR-CD ha mostrado un notable incremento en dicho periodo (de 0% a 34,6%) debido a su mayor sensibilidad y especificidad. Así mismo, se observa un incremento del número de casos de infecciones asociadas o adquiridas en la comunidad, llegando a constituir en torno al 25% del total de casos de ICD. Ante la actual situación es recomendable una rápida información del resultado positivo/negativo para conseguir un adecuado tratamiento y aplicar las medidas de aislamiento necesarias para evitar la transmisión de la infección.

0991. COLECISTECTOMÍA: INCIDENCIA DE LA INFECCIÓN DE LOCALIZACIÓN QUIRÚRGICA (ILQ) EN CATALUÑA 2008-2017

J. Vilarió Pujals¹, P. Barrufet Barqu², À. García Flores³, R. Vázquez Sáez⁴, E. Limón Cáceres⁵, M. Pujol Rojo⁶ y Grupo de estudio del VINCat⁶

¹Hospital Universitari de Vic, ²Hospital de Mataró, Mataró.

³Hospital de Blanes, Blanes. ⁴Hospital de Granollers, Granollers.

⁵Programa VINCat, I'Hospitalet de Llobregat.

Introducción y objetivos: La colecistectomía es uno de los procedimientos más frecuentes en cirugía digestiva y uno de los principales procedimientos de cirugía mayor ambulatoria. Las tasas de ILQ publicadas oscilan entre 1,1-8,4% en cirugía abierta y 0,3% al 3,4% en cirugía laparoscópica. El objetivo de nuestro estudio es establecer la tasa de ILQ en colecistectomía durante un período de 10 años en Cataluña. **Material y métodos:** El VINCat es el programa de vigilancia de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria en Cataluña. La colecistectomía es un procedimiento de vigilancia opcional. Los hos-

pitales participantes incluyen prospectivamente los pacientes sometidos a colecistectomía electiva o diferida durante todo el año o bien hasta un mínimo de 100 procedimientos. Se excluye la cirugía urgente y la infectada y la vigilancia incluye un periodo de 30 días. Se han seguido las definiciones de ILQ propuestos por el NHSN.

Resultados: Han participado 32 hospitales y se han seguido 15.781 procedimientos. La edad media ha sido de 56,6 ± 15,9 años y el 64,8% mujeres. Se ha realizado cirugía laparoscópica en el 91,7%. Se consideró que profilaxis quirúrgica antibiótica adecuada n el 84,5% (IC95%: 83,9-85,0%) de los procedimientos. Se han producido 426 ILQ (2,7%; IC95%: 2,4-3,0%), de las que un 17,1% han sido de órgano/espacio con una incidencia del 0,7%; IC95%: (0,5-0,8%). Los factores de riesgo independientes de ILQ (tabla) fueron: género (varón), edad > 57 años (percentil 50), riesgo NISS de 2 puntos, duración de la IQ ≥ 74 minutos (percentil 75) y cirugía abierta. Los microorganismos más frecuentes han sido *E. coli* (25,8%), *E. cloacae* (9,6%) y *E. faecalis* (7,5%).

		ILQ	p	HR (IC95%) univariante	RR (IC95%) multivariante
Género	Mujer	229 (2,2%)	< 0,001	1	1
	Hombre	197 (3,5%)		1,58 (1,31-1,91)	1,35 (1,10-1,65)
Profilaxis antibiótica	Adecuada	370 (2,8%)	0,2	-	-
	Inadecuada	56 (2,3%)		-	-
Cirugía	Electiva	424 (2,7%)	0,038	-	-
	Urgente	3 (2,1%)		-	-
Técnica quirúrgica	Laparoscópica	344 (2,4%)	< 0,001	1	1
	Laparotomía	75 (7,9)		3,33 (2,62-4,24)	2,62 (1,99-3,43)
Riesgo NISS	-1	242 (2,1%)	< 0,001	1	1
	0	121 (3,6%)		1,47 (1,20-1,81)	-
1	47 (7,5%)		2,99 (2,24-4,01)	-	
	2	16 (17,4%)		6,65 (4,22-10,49)	2,54 (1,22-5,28)
Percentil 75 (74 minutos)	< P75	217 (1,9%)	< 0,001	1	1
	≥ P75	209 (4,6%)		1,87 (1,50-2,34)	1,87 (1,50-2,34)
Implante prótesis	Si	4 (2,6%)	0,851	-	-
	No	391 (2,8%)		-	-
Edad	≤ 57 años	163 (2,1%)	< 0,001	1	1
	> 57 años	263 (3,3%)		1,61 (1,33-1,95)	1,38 (1,12-1,70)

Conclusiones: La incidencia de ILQ en colecistectomía limpia-contaminada ha sido del 2,7% y la de órgano/espacio del 0,7%. La incidencia de infección en cirugía abierta ha sido muy superior a la cirugía laparoscópica del 7,9% frente a 2,4%.

0992. EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE CULTIVO PARA DETECCIÓN Y RECuento DE LEGIONELLA EN MUESTRAS DE AGUA SANITARIA. ADAPTACIÓN A LA NORMA UNE-EN ISO 11731:2017

M. Jiménez¹, M.D. Ocete², M.D.C. Bresó³, C. Salvador⁴, I. Valero⁵, M. Torrecillas⁶, F. Grosson⁷ y C. Gimeno⁸

¹Hospital de Manises, Valencia. ²Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Valencia.

Introducción: La prevención de la legionelosis nosocomial es uno de los objetivos prioritarios de los hospitales y en España está regulada por el Real Decreto 865/2003. En noviembre de 2017 se publicó la actualización de la norma UNE-EN ISO 11731-2017 (Calidad del agua. Recuento de *Legionella*) que incluye además del GVPC (ISO 11731:2007) nuevos medios de cultivo para el aislamiento de *Legionella*: BCYE, BCYE + AB y MWY.

Objetivos: Describir la experiencia de nuestro laboratorio (acreditado por ENAC, Acreditación n.º: 633/1222) en el uso de BCYE y GVPC para el aislamiento de *Legionella sp* en muestras de agua caliente sanitaria, y analizar las recomendaciones de la nueva edición de la norma para el aislamiento de *Legionella sp* por cultivo.

Material y métodos: Realizamos el cultivo de las muestras según procedimiento interno de trabajo, mediante el cual se demuestra la presencia o ausencia de *Legionella sp*. y se estima el número de UFC

en 1L. Analizamos 1.304 muestras de agua caliente sanitaria durante 5 años. La instalación estudiada se abastece de la red de agua potable, y debe analizarse según el procedimiento operativo descrito en el apartado 8.4.3.2, por presentar concentración baja de *Legionella* y de microorganismos interferentes en la mayoría de los puntos. Los datos han sido analizados mediante análisis bivariable.

Resultados: Detectamos la especie *Legionella pneumophila* en el 90,5% de las muestras positivas, siendo el serogrupo mayoritario el 2-14 (83,8%). El 29% (n = 377) de las muestras tienen recuentos > 10⁴ UFC/l, en el 65% el medio de máximo recuento fue BCYE. Casi en el 70% de las muestras positivas detectamos crecimiento de flora acompañante, 37 de estas con una alta concentración de microorganismos interferentes, utilizamos GVPC para informar el recuento en la mitad de los casos. Comparando los recuentos obtenidos utilizando solo GVPC frente a GVPC+BCYE, detectamos recuentos entre 0 y ≤ 100 UFC/l en 602 frente a 474 muestras, > 100 y ≤ 1.000 en 164 frente a 149 muestras y ≥ 1.000 en 540 frente a 683 muestras. El BCYE es 1.7 veces más sensible que GVPC, y la mediana del número de colonias informadas es 2.000 unidades superior (p-valor 0,000 < 0,05).

Conclusiones: Los resultados obtenidos muestran una mejora significativa en la recuperación de *Legionella* sp al añadir BCYE. En muestras con recuentos > 10⁴ UFC/l el medio de máximo recuento es BCYE la mayoría de las ocasiones. Incluso en muestras muy contaminadas, utilizamos BCYE la mitad de las veces. Usando GVPC+BCYE, se deben aplicar acciones correctoras en el 63,7% de puntos analizados frente al 53,9% si solo usamos GVPC. Además, este aumento es superior en el rango de ≥ 1.000 UFC/l, lo que implica revisar el programa de actuación, determinar las medidas correctoras a tomar, realizar un tratamiento de limpieza y desinfección preventiva (> 100 y ≤ 1000 UFC/l) o de choque (> 1.000 UFC/l), y muestrear de nuevo a los 15-30 días tras la realización del tratamiento y de las posibles medidas correctoras. Nuestros resultados avalan la inclusión de BCYE en el análisis de agua caliente sanitaria, como indica la norma UNE ISO 11731:2017.

0993. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE UN PROTOCOLO DE PREVENCIÓN DE INFECCIÓN URINARIA ASOCIADA A SONDAGE VESICAL (ITU) EN UNA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS (UCI)

A. Abella Álvarez¹, D. Janeiro Lumbreras¹, A. Naharro Abellán¹, C. Hermosa Gelbard¹, D. Varillas Delgado¹, V. Enciso Calderón¹, M. Homez Guzmán¹, I. Salinas Gabiña¹, L. López de la Oliva Calvo¹, M. García Arias¹ y F. Gordo Vidal¹

¹Hospital Universitario del Henares, Coslada. ²Universidad Francisco de Vitoria, Puzuelo de Alarcón.

Introducción y objetivos: La ITU es la primera causa de infección adquirida en UCI según el Estudio Nacional de Vigilancia de la Infección Nosocomial del 2017 y se asocia a un importante impacto sobre la morbilidad de los pacientes y sobre los costes. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de un protocolo de prevención de ITU-SV sobre las tasas de infección y evolución clínica.

Material y métodos: Estudio before-after en una UCI polivalente evaluando la tasa de ITU en ambos periodos, años 2016 y 2017. Se incluyeron todos los pacientes ingresados de forma consecutiva. Se realizó formación del personal en la prevención de ITU basado en las recomendaciones del Center of Diseases Control (CDC). La formación se realizó mediante sesiones y visualización de vídeos al menos dos veces al mes durante el periodo after. Las variables cuantitativas se expresaron mediante media y desviación estándar y las variables cualitativas en frecuencia y porcentaje. Se llevó a cabo inferencia estadística mediante test chi-cuadrado para la comparativa de variables cualitativas y test t-Student para cuantitativas. Se consideraron valores estadísticamente significativos aquellos con valor p < 0,05.

Resultados: Se incluyeron 1.107 pacientes, 526 pacientes en el grupo before y 581 pacientes en el grupo after. No hubo diferencias signifi-

cativas en cuanto a edad (63 ± 15,57 frente a 62,9 ± 15,15; p = 0,902), sexo (hombres 313 (59,5%) frente a 342 (58,9%); p = 0,828) ni en las comorbilidades, excepto en la comorbilidad renal (69 (13,1%) frente a 46 (7,9%); p = 0,005) y en la comorbilidad endocrina (159 (30,2%) frente a 209 (36,0%); p = 0,043). La supervivencia en UCI fue similar en ambos grupos (502 (95,4%) frente a 560 (96,4%); p = 0,425) con una tendencia no significativa a menor estancia en días en UCI (4,60 ± 6,48 frente a 3,90 ± 5,26; p = 0,050). Se encontró una disminución significativa de la densidad de incidencia de ITU por mil días de sondaje vesical (2,73 frente a 0,54; p < 0,001). La tasa de utilización de sonda vesical por estancia fue similar (0,87 frente a 0,84; p = 0,853), aunque el número de pacientes con sondaje vesical fue significativamente inferior (76,8% frente a 69,7%; p 0,008).

Conclusiones: La implantación de un protocolo específico de prevención de ITU se asoció a una disminución de la tasa de ITU y una tendencia a menor estancia en UCI, con un descenso en el número de pacientes con sondaje vesical.

0994. ¿POR QUÉ ES TAN DIFÍCIL MEJORAR LA ADHERENCIA A LA HIGIENE DE MANOS? IMPLEMENTACIÓN DE LA LÍNEA ESTRATÉGICA 2015-2018 EN UN HOSPITAL GENERAL

D. Maldonado López, D. Roldán Rubio, E. Santos Serradilla, M. Zorneño Vallmana, R.M. Sabater Raga y A. Aloy Duch

Fundació Hospital Asil de Granollers, Granollers.

Introducción y objetivos: Está demostrado que el principal medio de transmisión de microorganismos son las manos de los profesionales sanitarios. La "higiene de manos"(HM) es la medida más eficaz para el control de las infecciones. A pesar de las guías publicadas y los esfuerzos para mejorarla, la adherencia al cumplimiento de la HM sigue siendo inaceptablemente baja (< 50%). Como objetivo, se presenta la evolución de los resultados obtenidos entre 2015-2018 a partir de la implementación de la línea estratégica sobre HM basada en: 1) creación de un grupo de trabajo interdisciplinario, 2) el consumo y la estructura de "Puntos de Solución Alcohólica (PSA)", 3) los estudios de prevalencia cuantitativos-cualitativos, 4) las encuestas a usuarios- profesionales, 5) la formación, 6) la comisión de infecciones, y 7) la evaluación de indicadores y acciones de mejora.

Material y métodos: En 2015 se creó un "Grupo de Trabajo de Auxiliares de Enfermería (GTAE)" expertas en HM, para realizar los estudios de prevalencia semestrales de observación en los 5 momentos de HM, según la OMS, cuali-cuantitativos; lideradas por la comisión de infecciones, se realizan cursos de formación online y presencial propia; el GTAE se reúne 4 veces/año, planifican los estudios de observación, los realizan, y difunden los resultados y la estrategia de mejora. Se evalúan y revisan el número de PSA, y el consumo anual de litros. Se realizan encuestas tanto a usuarios como a profesionales. Se forma periódicamente a los profesionales del centro en la HM. Se registran los indicadores y se proponen las acciones de mejora.

Resultados: El GTAE está constituido por 22 auxiliares de enfermería. El centro dispone del 100% de los puntos de atención al paciente con solución alcohólica, con un consumo anual desde 2015 al 2018 de 1.588, 1.619, 1.602 y 1.679 litros, respectivamente. Entre 2015-2018, las oportunidades observadas totales de HM fueron 1.319, 933, 1.439 y 1.397, siendo la tasa de adherencia cuantitativa del 53%, 59%, 75% y 40%. El análisis cualitativo de la HM (manos impregnadas con fluoresceína) ha mostrado una mejora del 28% de adecuación en 2016, al 50% en 2018. En las encuestas realizadas a los usuarios, éstos refieren lavarse las manos en su entorno en un 78%; su buena percepción de los profesionales sorprende, pues suponen que éstos realizan la HM en su práctica diaria en el hospital en un 84%; y solo el 10% se atrevería a solicitarle que se las lavasen. Por otro lado, el 88% de los profesionales reconocen que las manos son el principal vehículo de transmisión de infecciones nosocomiales. Se realizan anualmente 8 cursos de formación con 145 participantes.

