



Universidad
**Católica de
Valencia**
San Vicente Mártir

Tesis Doctoral

**Evaluación del riesgo asociado a los factores
determinantes de la colonización por *Legionella* en
centros sanitarios**

Eugenio Luciano

Director y tutor de la tesis:
Dr. Rafael Manuel Ortí Lucas

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud
Escuela de Doctorado
Valencia, 2023

A tutta la mia famiglia

Agradecimientos

Quiero agradecer este trabajo a todas las personas que se han cruzado en mi camino durante estos años de investigación. En primer lugar, a mi director y tutor, el Dr. Rafael Manuel Ortí Lucas que ha sido una referencia tanto en el campo de la investigación como en el campo de la Medicina Preventiva.

También quiero dar las gracias a los investigadores y responsables del proyecto Legipid® por haber tenido tanta paciencia durante el período de la pandemia y creer en este proyecto de investigación.

A mis amigos Daniel y Miquel, con los cuales he pasado un “buen rato” durante estos años.

Agradezco la ayuda y el apoyo, tanto moral como logístico, de parte de Eusebio y Rafaela (mi familia española) y el apoyo moral de mis padres y mi hermano Domenico.

Un agradecimiento especial va a aquellas personas cuyo trabajo ha sido fundamental para poder yo desarrollar el mío: mi familia. Mi pareja Alba, que me ha estado apoyando especialmente en los momentos más difíciles. Mis hijos Luca y Andrés, ya que gracias a sus momentos de juego y diversión me han hecho viajar a un mundo tan diferente del mío, lleno de colores e imaginación. Han sido y son un pilar fundamental para mí.

TABLA DE CONTENIDO

Lista de figuras	I
Lista de tablas	II
Índice de abreviaturas y acrónimos	III
Resumen	- 1 -
1. Introducción	- 5 -
1.1 <i>La bacteria Legionella</i>	- 7 -
1.2 <i>Ecología</i>	- 18 -
1.3 <i>Clínica</i>	- 25 -
1.4 <i>Epidemiología y vigilancia de legionelosis en Salud Pública</i>	- 30 -
1.5 <i>Prevención y control</i>	- 35 -
1.6 <i>Toma de muestras</i>	- 46 -
1.7 <i>Métodos de desinfección</i>	- 53 -
1.8 <i>Marco teórico, antecedentes y estado actual del tema</i>	- 61 -
2. Justificación y propósito	- 67 -
3. Hipótesis	- 73 -
3.1 <i>Hipótesis</i>	- 75 -
4. Objetivos	- 77 -
5. Material y métodos	- 81 -
5.1 <i>Características del centro sanitario</i>	- 83 -
5.2 <i>La red de agua sanitaria</i>	- 87 -
5.3 <i>Diseño del estudio</i>	- 89 -
5.4 <i>Metodología</i>	- 90 -
5.5 <i>Toma de muestras y análisis microbiológico</i>	- 94 -
5.6 <i>Variables a estudio</i>	- 101 -
5.7 <i>análisis Estadístico</i>	- 107 -
6. Resultados	- 111 -
6.1 <i>Evaluación de las pruebas diagnósticas (cultivo y pruebas rápidas)</i>	- 113 -
6.2 <i>Factores de riesgo asociados a la colonización por legionella</i>	- 117 -
7. Discusión	- 129 -
7.1 <i>Consideraciones generales</i>	- 131 -

<i>7.2 Evaluación del cultivo y propuesta de un nuevo estándar diagnóstico para el diagnóstico de Legionella en el agua.....</i>	<i>- 132 -</i>
<i>7.3 Factores de riesgo asociados a la colonización por Legionella en el agua de una estructura sanitaria.....</i>	<i>- 136 -</i>
<i>7.4 Elaboración y propuesta de un modelo predictor del riesgo de colonización del agua por Legionella en un ambiente hospitalario</i>	<i>- 140 -</i>
<i>7.5 Trasferencia de los resultados</i>	<i>- 143 -</i>
<i>7.6 Limitaciones del estudio</i>	<i>- 144 -</i>
<i>7.7 Futuras investigaciones.....</i>	<i>- 145 -</i>
8. Conclusiones	- 147 -
Bibliografía	- 151 -
Anexo I. Artículo publicado en una revista internacional perteneciente al primer cuartil (Q1).....	- 173 -
Anexo II. Relación de muestras positivas y negativas para Legionella con las variables consideradas. ...	- 175 -
Anexo III. Relación de muestras con respectivos parámetros medidos para contestar a los objetivos específicos 3 y 4.....	- 177 -

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía del hotel Bellevue Stratford (Filadelfia)	- 9 -
Figura 2. Fotografía de <i>L. pneumophila</i> vista al microscopio.	- 10 -
Figura 3. Placa BCYE para el cultivo selectivo de <i>Legionella</i>	- 11 -
Figura 4. Patogénesis intracelular de la <i>Legionella</i>	- 12 -
Figura 5. Visión esquemática de los estados morfológicos de <i>L. pneumophila</i> durante su ciclo de crecimiento..	- 13 -
Figura 6. Principales fuentes de transmisión de <i>Legionella</i> para el ser humano.	- 16 -
Figura 7. Representación gráfica de las diferentes fases de un biofilm	- 21 -
Figura 8. Tasa estandarizada por edad de legionelosis en la Comunidad Europea en 2020	- 30 -
Figura 9. Evolución de la tasa de legionelosis en España.	- 32 -
Figura 10. Esquema de funcionamiento del método de la SIM	- 50 -
Figura 11. Fotos del Hospital Clínico Universitario de Valencia	- 85 -
Figura 12. Esquema del Hospital Clínico Universitario de Valencia.	- 86 -
Figura 13. Vista aérea del hospital Clínico Universitario de Valencia.	- 86 -
Figura 14. Sistema de pasteurización del ACS instalado en el HCUV.	- 88 -
Figura 15. Rango de temperatura del agua caliente en diferentes puntos terminales.....	- 126 -

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Puntos terminales de toma de muestras en instalaciones de uso colectivo..	- 52 -
Tabla 2. Datos de hospitalización del HCUV.....	- 84 -
Tabla 3. Clasificación de los resultados de un estudio de evaluación sobre pruebas diagnósticas.....	- 91 -
Tabla 4. Comparación entre laboratorios y métodos.....	- 114 -
Tabla 5. Comparación del nuevo estándar con el cultivo y la SIM	- 114 -
Tabla 6. Análisis de la SIM comparada con el cultivo	- 116 -
Tabla 7. Descripción de las muestras en el estudio.	- 117 -
Tabla 8. Análisis bivariante de los factores asociados con la colonización por <i>Legionella</i> en agua fría	- 118 -
Tabla 9. Análisis bivariante de los factores asociados con la colonización por <i>Legionella</i> en agua caliente	- 119 -
Tabla 10. Análisis bivariante de los factores asociados con la colonización por <i>Legionella</i>	- 120 -
Tabla 11. Regresión logística múltiple de los factores de riesgo asociados con la contaminación por <i>Legionella</i>	- 124 -

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ACS	Agua caliente sanitaria
AF	Agua fría
AFCH	Agua fría de consumo humano
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
E	Especificidad
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EEUU	Estados Unidos
ELDSNET	European Legionnaire's disease Surveillance Network
ESGLI	European Study Group for <i>Legionella</i> Infections
EWGLI	European Working Group of <i>Legionella</i> Infections
IC 95%	Intervalo de confianza al 95%
L	Litros
LD	Enfermedad del legionario
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
mg	Miligramos
mL	Mililitros
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds Ratio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

RENAVE	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
S	Sensibilidad
SIM	Separación inmunomagnética
<i>P</i>	Probabilidad estadística
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
VG	Valor global
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
°C	Grados centígrados
>	Mayor
<	Menor

RESUMEN

Introducción. La *Legionella* es una bacteria que causa una enfermedad respiratoria tanto en la comunidad (relacionada también con el turismo y los viajes) como a nivel sanitario. La legionelosis nosocomial es un problema muy importante que conlleva una elevada mortalidad, especialmente a causa de la tipología de pacientes afectados, entre ellos inmunodeprimidos y con comorbilidad. El control y la prevención de la legionelosis en el agua de un centro sanitario es un reto para la salud pública. La legislación se acaba de actualizar a través de un nuevo Real Decreto, desde 2013 estaba en vigor una ley antigua que estaba quedando desfasada respecto a los numerosos avances tecnológicos. El control de la *Legionella* se sigue haciendo principalmente a través del cultivo microbiológico, método que da resultados con tiempos de respuesta lentos, no ofreciendo una representación del estado real de colonización de las tuberías de un centro sanitario. Además, un hospital es estructural y funcionalmente diferente de un centro residencial o de turismo. Por tal razón los factores de riesgo de colonización por *Legionella* tienen que ser estudiados en ese entorno.

Objetivos. El Objetivo general de esta tesis es conocer los factores que condicionan la colonización por *Legionella* en los centros sanitarios teniendo en cuenta la efectividad de las pruebas diagnósticas disponibles. Los objetivos específicos son: evaluar la validez del cultivo como estándar diagnóstico para la determinación de *Legionella* en el agua; evaluar la efectividad diagnóstica de los métodos rápidos de detección; conocer el riesgo asociado a las distintas variables directas e indirectas presentes en un centro sanitario y elaborar un indicador predictor del riesgo de colonización del agua por *Legionella* en el ambiente hospitalario.

Material y métodos. Se ha elegido el Hospital Clínico Universitario (HCUV) de Valencia por ser un hospital de alta complejidad y con las características ideales para estudiar diferentes factores de riesgo para su colonización por *Legionella*. Se diseñó un estudio transversal para utilizar técnicas de evaluación de pruebas diagnósticas y un estudio de tipo observacional de casos y controles para poder contestar a los objetivos antes mencionados. Se tomaron muestras microbiológicas de los puntos terminales analizados tanto con el cultivo microbiológico como con un nuevo método rápido de diagnóstico de *Legionella* basado en la separación inmunomagnética (SIM). Se escogieron diferentes variables a estudio que pudiesen representar un riesgo de positividad por *Legionella*. Se han utilizado los resultados del cultivo y de la SIM comparados por dos laboratorios y más de un microbiólogo para elaborar un nuevo estándar diagnóstico de positividad para *Legionella* con el cual se han estudiado las diferentes variables. Para el estudio de los factores de riesgo se realizó un análisis bivariante, seguido de un análisis multivariante para ajustar el riesgo por los diferentes factores.

Resultados. Se ha visto que el nuevo estándar tenía una prevalencia de positividad mayor que el cultivo y la SIM. No se observaron diferencias significativas entre los dos métodos ni entre los laboratorios. La SIM se reveló más sensible en agua caliente y más específica en agua fría. Se observó una asociación positiva del uso poco frecuente de un punto terminal, mientras que la correcta cloración del agua se mostró como un factor protector. No hubo diferencias significativas según la longitud de la tubería o el tipo de agua.

Conclusiones. 1. Los principales factores de riesgo de colonización por *Legionella* son la poca cloración del agua fría, el estancamiento del agua en la red de distribución y el uso poco frecuente de un punto terminal, mientras que la temperatura alta en agua caliente

supone un factor protector. 2. El cultivo sigue siendo considerado el método de referencia. No obstante, la SIM puede generar resultados más sensibles en condiciones específicas, como por ejemplo en temperaturas altas donde hay mayor presencia de formas viables pero no cultivables. Además, su rapidez (resultados en el mismo día) puede ser clave a la hora de aplicar medidas correctoras. 3. Nuestro estudio proporciona un nuevo índice para evaluar mejor la colonización de *Legionella* en el sistema de agua de un hospital, que es esencial para identificar factores de riesgo relevantes asociados con la colonización de *Legionella*. Su uso: (i) podría anticipar la necesidad de un tratamiento de limpieza y desinfección, y (ii) permitiría evaluar su efectividad. 4. Si consideramos cada factor y evaluamos su riesgo podemos obtener que una asistencia ambulatoria, un uso poco frecuente del punto terminal y el agua estancada se revelaron factores de riesgo. Mientras que una correcta cloración en agua fría de consumo humano y una correcta temperatura en agua caliente sanitaria demostraron ser factores protectores. 5. Considerando todas las variables juntas y ajustadas, se ha establecido una ecuación predictora de riesgo de colonización.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA BACTERIA *LEGIONELLA*

Las bacterias del género *Legionella* están presentes de forma habitual en muchos ambientes naturales y colonizan una gran variedad de sistemas. Crecen de manera óptima dentro de los huéspedes protozoarios, como las amebas de vida libre presentes en los biofilms que recubren las superficies húmedas (1–3). La *Legionella* se puede transmitir desde fuentes ambientales a través del agua contaminada que se aerosoliza con posterior inhalación en el tracto respiratorio de las personas cercanas y susceptibles (4). Los pacientes infectados por *Legionella* pueden desarrollar una afección similar a la gripe, de carácter más leve, llamada fiebre de Pontiac, o una neumonía conocida como enfermedad del legionario (LD); ambas condiciones se conocen como legionelosis. La mortalidad de la LD puede alcanzar entre el 3 y el 33 por ciento de las infecciones (5,6). Las personas con mayor riesgo de desarrollar LD son los ancianos, los hombres, los fumadores y, especialmente, los inmunodeprimidos, en los cuales la tasa de letalidad puede alcanzar el 80%, incluso con el tratamiento antibiótico adecuado (5).

Las tasas de LD han aumentado en los Estados Unidos y Europa durante los últimos 20 años, lo que sugiere pocos avances en la disminución del riesgo de *Legionella* (5,7,8). La excesiva dependencia de la prueba de antígeno urinario, que solo detecta el serogrupo 1 de *L. pneumophila*, junto con la baja tasa de pruebas diagnósticas, contribuye a subestimar el número de casos de LD (2,9–13). Aunque *L. pneumophila* es la especie de *Legionella* más predominantemente aislada en pacientes en América del Norte y Europa (9,13–16), otras especies pueden provocar enfermedades, como *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffi* y *L. longbeachae* (6,17).

La *Legionella* es una bacteria ubicuitaria a nivel acuático (18). Está presente en ríos, lagos y agua estancada, siendo en estos lugares parte de la flora microbiana ambiental.

Varios estudios describen también cómo en otros lugares naturales, como aguas subterráneas o de lluvia, es detectable dicha bacteria (19). Otros estudios también la han aislado en agua de mar (20). Como característica ecológica cabe mencionar que dicha bacteria puede tolerar los medios ácidos.

1.1.1 Historia

Se sospecha que los primeros casos de legionelosis pudieron existir antes de su descubrimiento oficial; como puede ser el brote de Austin, en Minnesota (EEUU) en 1957, con 78 casos de neumonía (21). O, por ejemplo, el brote de Benidorm en España en el año 1973 (22), pero todavía no se conocía la bacteria y por tanto no era posible su diagnóstico.

La legionelosis es una enfermedad que se describió por primera vez en 1976 en un hotel de Filadelfia (Bellevue Stratford) donde se estaba celebrando una convención anual de legionarios americanos. En este brote se produjeron 182 afectados y 29 fallecidos, teniendo un gran impacto mediático (23). Los primeros estudios microbiológicos no consiguieron describir el patógeno que se identificó por Joseph McDad y Charles Shepard solo seis meses más tarde (24). Su nombre deriva del hecho de que se aisló la bacteria de muestras de tejido pulmonar de algunos de los legionarios fallecidos. Posteriormente, mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta, se demostró su

relación con los pacientes del brote. Dada la dificultad para su crecimiento en los medios de cultivo clásicos se desarrolló un nuevo medio llamado “Buffered Charcoal Yeast Extract” (BCYE), actualmente en uso (25). Algunos años más tarde se creó una nueva familia bacteriana.



FIGURA 1. FOTOGRAFÍA DEL HOTEL BELLEVUE STRATFORD (FILADELFIA)

Fuente: <https://sah-archipedia.org/buildings/pa-02-ph56> (26)

1.1.2 Caracteres generales

Legionella pneumophila es una bacteria de la familia de Legionellaceae. Esta familia comprende 56 especies y más de 70 serogrupos (27). De todas las especies, solo algunas

causan enfermedad en el ser humano. Los serotipos que más se han aislado son el 1 y 6, siendo el 1 el que causa el 80% de los casos de legionelosis (28).

Las diferentes especies se diferencian en base a la homología del ADN y de los ácidos grasos de la pared celular. Su identificación se hace a través de pruebas bioquímicas y pruebas serológicas.

La familia Legionellaceae tiene como características microbiológicas una coloración gramnegativa a la tinción Gram, ser acapsulados y asporígenos. Son móviles y flagelados (figura 2). Presentan un tamaño y forma variables: pueden pasar de una longitud de 100 micrómetros en cultivo hasta 1,5 micrómetros en las muestras clínicas respiratorias.

Desde un punto de vista metabólico estas bacterias son aerobias estrictas. Necesitan hierro para su replicación y utilizan enzimas como la oxidasa y la catalasa para defenderse. Para producir la energía necesaria para su supervivencia utilizan aminoácidos (en vez de hidratos de carbono). Por lo descrito anteriormente, para su crecimiento en cultivo es necesario un medio que tenga dichas sales minerales y proteínas, como es el BCYE anteriormente mencionado (figura 3).

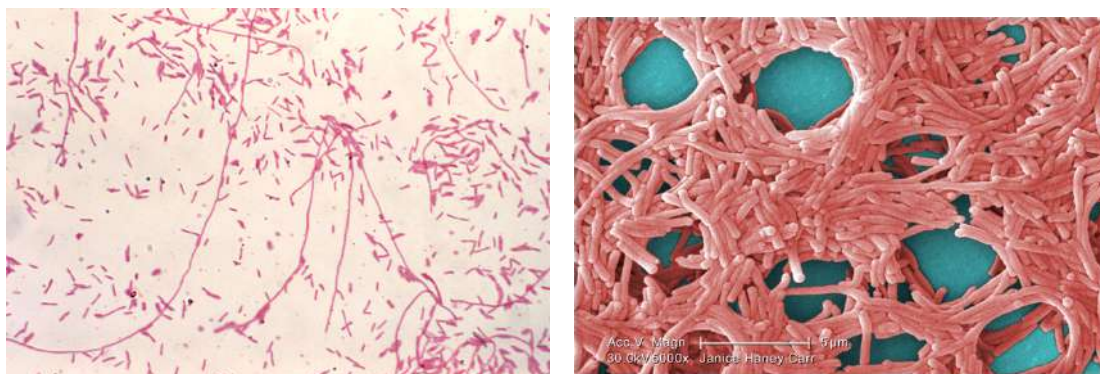


FIGURA 2. FOTOGRAFÍA DE *L. PNEUMOPHILA* VISTA AL MICROSCOPIO.

A la izquierda: fotografía de una colonia de *L. pneumophila* coloreada con la tinción de Gram y vista a través de un microscopio óptico (29). A la derecha: colonia de *L. pneumophila* al microscopio electrónico (30).



FIGURA 3. PLACA BCYE PARA EL CULTIVO SELECTIVO DE *LEGIONELLA* (31).

1.1.3 Patogénesis y factores de virulencia

La *Legionella* tiene diferentes factores de virulencia. Por un lado, destaca la capacidad replicativa intracelular en el interior de protozoos cuando se encuentra en el ambiente. Por otro lado, en el momento que infecta a humanos se replica en los macrófagos alveolares.

Otros aspectos importantes son la adherencia intercelular para poder entrar en la célula huésped a través de flagelos y pili de tipo IV, la secreción de citotoxinas y proteasas (32), o el bloqueo de la fusión fagosoma-lisosoma (33).

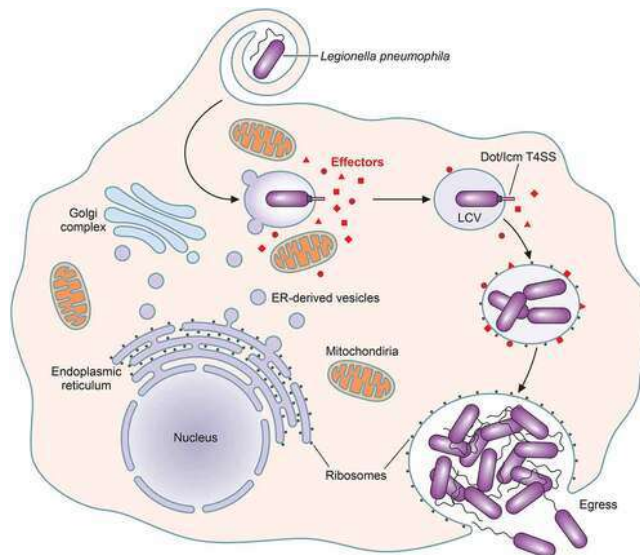


FIGURA 4. PATOGÉNESIS INTRACELULAR DE LA LEGIONELLA. (34).

La patogenicidad bacteriana también está relacionada con el nivel de contaminación en la fuente de agua y/o la intensidad de la exposición. No hay datos para confirmar que se necesite de una cierta carga bacteriana para generar infección. Algunos autores informan que existe una mayor probabilidad de contraer la enfermedad del legionario cuando aumenta el tiempo de exposición a la fuente de infección (35,36).

Reservorio y Transmisión

La bacteria se puede encontrar en todos los ambientes acuáticos donde crece formando un biofilm y se replica dentro de algunos protozoos, sobretodo amebas y ciliates (37).

La figura resume el ciclo de reproducción y crecimiento.

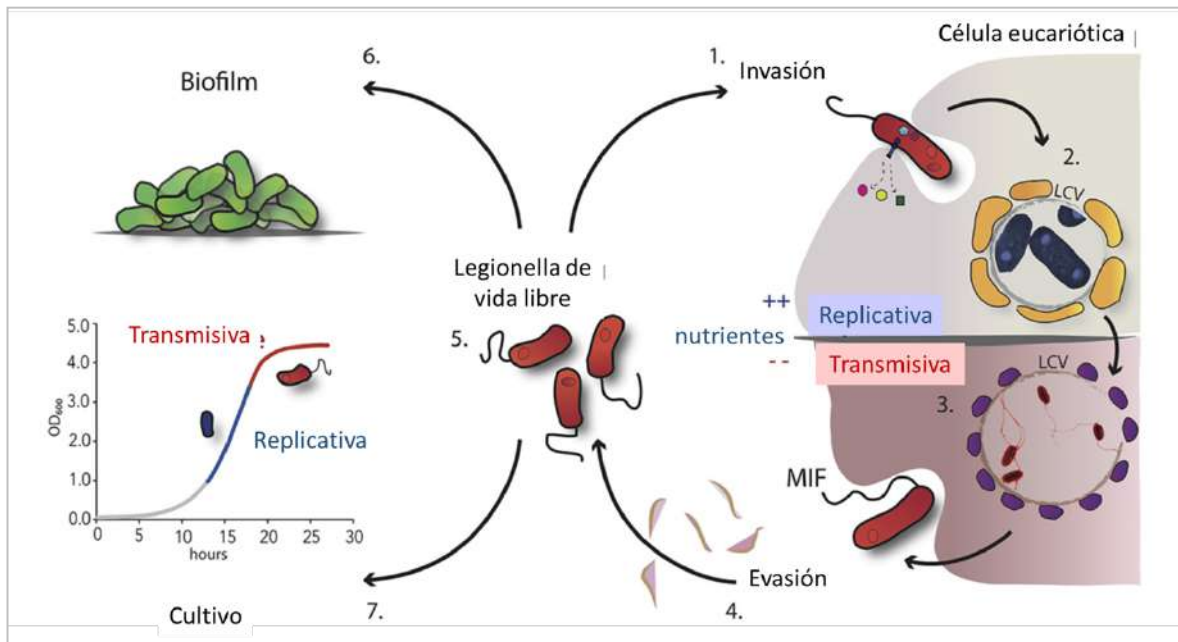


FIGURA 5. VISIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS ESTADOS MORFOLÓGICOS DE *L. PNEUMOPHILA* DURANTE SU CICLO DE CRECIMIENTO. (38).

1. Toma de *L. pneumophila* virulenta por la célula huésped, como protozoos o macrófagos a través de la fagocitosis. 2. Después de la internalización, las bacterias evaden la fusión fagosoma-lisosoma e inician la multiplicación celular dentro de vacuolas (LCV), que están rodeadas 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 (flagella) y se vuelven citotóxicas. 4. Estas bacterias infecciosas son capaces de cargar la membrana vacuolar y se liberan en el ambiente extracelular. 5. Las bacterias transmisivas de vida libre pueden iniciar un nuevo ciclo o persistir en el ambiente extracelular como forma planctónica. 6. Alternativamente, *L. pneumophila* puede estar asociada dentro de biopelículas, ya sea en hábitats naturales de agua dulce o artificiales. 7. En un caldo de cultivo, *L. pneumophila* muestra también un ciclo de vida esencialmente bifásico, con formas intracelulares replicativas y transmisivas, similares pero distintas de las encontradas en el agua.

La Legionella tiene como reservorio principal el entorno acuático como ríos o pozos.

A partir de estos reservorios naturales, la bacteria puede llegar a infectar a los seres humanos previa colonización de sistemas de abastecimiento de agua de consumo humano. La principal causa de casos de infección es debida a aquellas instalaciones que

generan aerosoles, como las torres de refrigeración, humidificadores, piscinas, condensadores evaporativos, fuentes ornamentales o duchas de hoteles.

Tienen especial importancia las torres de refrigeración, en particular en la incidencia de casos esporádicos de legionelosis. Se ha visto una asociación entre los casos esporádicos y la proximidad del lugar de residencia a una torre de refrigeración (39). En particular, se ha visto que los brotes pueden ocurrir con mayor frecuencia en las estaciones cálidas y afectan a individuos que residen hasta 12 kilómetros de distancia de una torre de refrigeración (40).

Las fuentes de infección por *Legionella* pueden ser cualquier fuente capaz de generar aerosoles. En general son muy comunes los sistemas artificiales de agua fría y caliente. Los lugares considerados puntos de origen de la infección por *Legionella* pueden ser muy variados. Entre ellos podemos mencionar los hospitales, hoteles, campamentos, instalaciones recreativas, spa, jardines, cruceros... (41–44). Entre los diferentes lugares capaces de originar aerosoles podemos mencionar los jacuzzis y piscinas, las salidas de agua como duchas o grifos, los sistemas de riego, las fuentes ornamentales, los sistemas de aire acondicionado, los humidificadores de habitaciones o los humidificadores de alimentos (45).

En el entorno hospitalario el mayor riesgo lo encontramos en el agua sanitaria, sea esta agua fría de consumo humano (AFCH) como agua caliente sanitaria (ACS). Cabe destacar que a fecha actual no hay suficientes pruebas para afirmar una transmisión interhumana de *Legionella* (46,47).

A nivel sanitario hay que tener cuidado con los humidificadores de incubadoras, endoscopios, herramientas dentales, ventiladores mecánicos, equipos médicos,

aparatos de aerosol y oxigenoterapia (48). Incluso se ha descrito la posibilidad de infección por enfermedad del legionario a través de las máquinas de cubitos de hielo (49,50).

La primera vía de entrada de la bacteria en el ser humano es a través del tracto respiratorio. En particular, a través de la inhalación de aerosoles de entre 1 μm - y 5 μm . Una vez alcanzado los pulmones la bacteria entra en los macrófagos.

Los aerosoles de fuentes contaminadas por *Legionella* pueden llegar hasta 200 metros y en algunos casos, según determinadas condiciones del viento, hasta 3 kilómetros de distancia (51). Por el contrario, no se ha demostrado la transmisión a largas distancias mediante gotículas.

Por otra parte, la cantidad de *Legionella* que se puede liberar en el ambiente es baja si consideramos los cabezales de duchas contaminadas y por lo tanto no alcanza largas distancias (51).

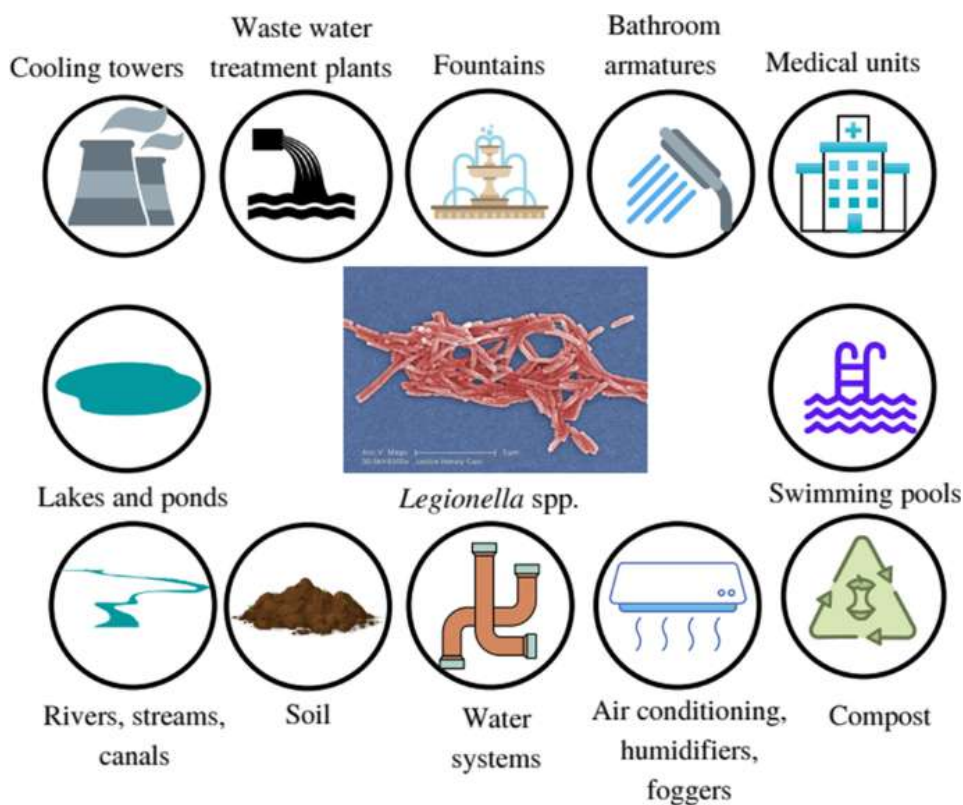


FIGURA 6. PRINCIPALES FUENTES DE TRANSMISIÓN DE *LEGIONELLA* PARA EL SER HUMANO (52).

Es importante tener en cuenta el papel de la microaspiración como factor de transmisión (53), lo cual puede ser muy relevante en el ambiente hospitalario. Aquí los procedimientos como la intubación, la cirugía de cabeza y cuello o la propia patología del paciente hacen que sea más probable la microaspiración. (54,55).

En un centro sanitario, visto el tipo de uso que se haga, sería necesario disponer de normativas específicas para el uso del agua de la red de distribución, tanto fría como caliente.

Cabe destacar que se han evidenciado como reservorios de *Legionella* lugares muy diferentes y que están asociados con la aparición de casos clínicos (45).

Finalmente, se puede mencionar la tierra para macetas o el compost como otras posibles fuentes de contagio donde se ha identificado a la bacteria de *L. longbeachae*

(47,56). El motivo de su presencia no está claro, se piensa que sea debido a la capacidad del compost para liberar bioaerosoles (57).

Esta variedad de reservorios húmedos hace que sea aún más complejo identificar el origen de los casos, especialmente en los casos esporádicos.

1.2 ECOLOGÍA

La *Legionella* es un microorganismo de vida acuática. Principalmente se puede encontrar en la interfaz aire-agua como ríos, lagos o arroyos. No obstante, se han encontrado bacterias de *Legionella* en charcos de agua de lluvia, suelos naturales (18,58,59), en aguas subterráneas (19,60,61), agua salada marina o derivante de fuentes artificiales (20,62,63).

Para su crecimiento ideal, la *Legionella* necesita unas temperaturas que varían entre 25 y 45 °C, aunque pueden vivir en un rango de temperatura más amplio (18,64,65). La temperatura máxima sobre la cual la bacteria se destruye casi instantáneamente es de 70°C (66). Como particularidad se puede decir que se ha llegado a aislar la bacteria desde fuentes acuáticas cerca de volcanes, a estanques, manantiales termales y ríos congelados (67,68).

Aunque la bacteria de la *Legionella* está presente en entornos acuáticos naturales en bajas concentraciones, cabe la posibilidad de que llegue a las diferentes estructuras sanitarias u otro tipo de construcciones cuyas condiciones físicas y químicas favorezcan su crecimiento. Algunos de los factores relacionados con los sistemas de agua que contribuyen a la colonización por *Legionella* son la temperatura del agua, la configuración y la antigüedad del sistema de agua caliente, los materiales de las tuberías, el tipo de flujo dentro de ellas, el estancamiento, la corrosión de las tuberías y si están presentes sedimentos/nutrientes (69,70). A tener en cuenta son también las formas viables pero no cultivables (VBNC), la presencia de biofilms y de otros microorganismos como protozoo o amebas (71,72).

1.2.1 Factores de riesgo del sistema de agua

Aunque hemos visto que el rango de temperatura a la cual se ha aislado la *Legionella* es muy amplio, solo es capaz de multiplicarse y tener un crecimiento óptimo en un intervalo de temperatura que va desde los 25 hasta los 45°C (6,73). Por ello se recomienda que la temperatura del agua caliente sea mayor de 60°C (por tener un efecto bactericida) de manera que llegue al grifo al menos a 50°C, aunque recientes estudios han demostrado que es mejor que la temperatura en los puntos terminales sea mayor de 55°C (74). Mientras que para el agua fría la distribución tiene que ser inferior a 20°C.

Con respecto a los factores de supervivencia y crecimiento de *L. pneumophila* relacionados con las infraestructuras, cabe destacar que la corrosión puede destruir la tubería, consumir oxidantes y desinfectantes en el agua, y crear incrustaciones que favorecen la formación del biofilm. Otros factores mencionados anteriormente como el tipo de flujo en las tuberías, los cambios de temperatura que varían en las diferentes estaciones, la actividad microbiológica y el tratamiento del agua (aplicando por ejemplo inhibidores de corrosión), pueden influir en la formación de corrosión (75).

Es conocido que el hierro juega un papel importante en la colonización por *Legionella* (76,77). Además de este último, se ha demostrado una asociación entre el calcio y el magnesio y la contaminación de las tuberías, aunque no se ha demostrado su asociación con la presencia de *Legionella* (78,79). Otros estudios han evidenciado que concentraciones de cobre > 50 µg/L se relacionan inversamente con la colonización por especies de *Legionella*, mientras que concentraciones de manganeso > 3 µg/L estaban directamente relacionadas con un aumento del riesgo de aparición de *Legionella* (80).

El material de las tuberías también puede influir sobre el crecimiento de *Legionella*. Las superficies de cobre están poco colonizadas por bacterias, mientras que materiales como el plástico y el caucho ofrecen un sustrato rico en nutrientes (81). Incluso las tuberías de acero inoxidable pueden tener unas concentraciones de *Legionella* hasta diez veces mayores de aquellas con cobre (82).

1.2.2 Biofilm

Para conocer la ecología de la bacteria es importante conocer la relación con la formación del biofilm. Este está formado por bacterias que se agregan entre ellas formando una comunidad (83). Se crea una matriz capaz de almacenar materiales y nutrientes a través de canales presentes entre las bacterias. Esta estructura es resistente a muchos tratamientos de desinfección (84) y proporciona más probabilidades de supervivencia a las bacterias que la componen.

Los microorganismos que forman parte de biofilms difieren de aquellos que están en forma planctónica. De hecho, el biofilm está compuesto por bacterias organizadas de manera coordinada, utilizando mensajes químicos para comunicarse entre ellas (“quorum sensing”), parecidos a las células de organismos pluricelulares (85).

Las diversas fases del ciclo vital del biofilm se pueden resumir en adherencia bacteriana al sustrato, maduración del biofilm, desprendimiento y difusión en el medio (86).

El biofilm formado por *Legionella* ha sido estudiado solo recientemente (86,87). En la Figura 8 se pueden ver las fases anteriormente citadas.

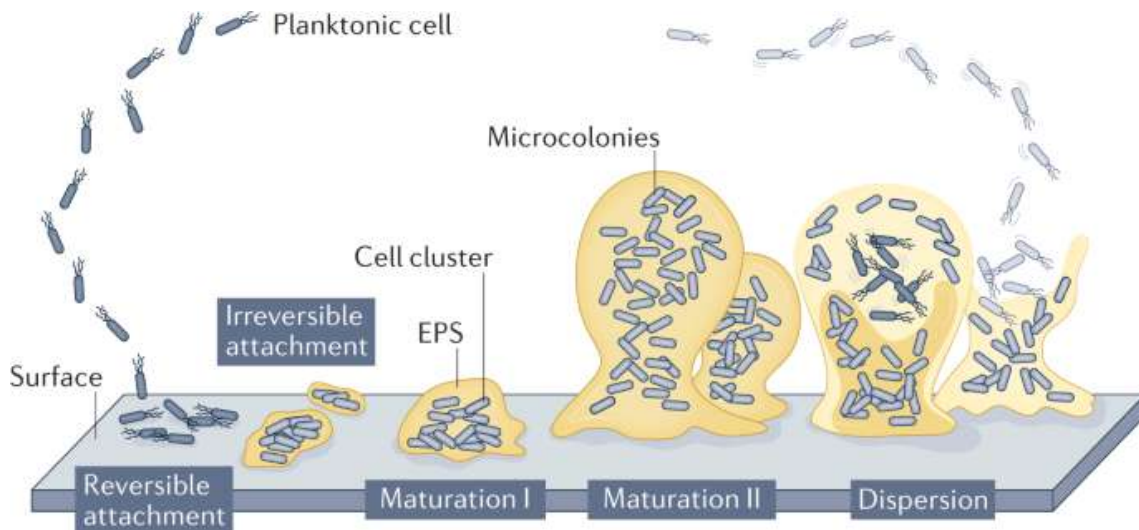


FIGURA 7. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS DIFERENTES FASES DE UN BIOFILM

Fuente: The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation, Sauer et al. 2022. (88)

También hay que tener en cuenta que la temperatura afecta a la viabilidad de la *Legionella* y a la expresión de los flagelos (89).

A parte del rol de la temperatura en influenciar el crecimiento de *Legionella*, también tiene relación con el biofilm. De hecho, un biofilm que se haya formado a 25°C presenta la clásica formación con canales de agua internos y la forma de la *Legionella* alargada clásica. Mientras que, si el biofilm se forma entre 37°C y 42°C se presentará más denso, amplio y no se crearán los canales de paso. En este último tipo de biofilm, la *Legionella*

presenta una forma filamentosa, es posible que pueda dispersarse en mayor cantidad y que la biomasa se incremente de forma más rápida (90).

Se han publicado estudios que analizan también el cambio en la formación del biofilm relacionado con parámetros del agua como cationes, pH o carbono.(87).

Un factor muy relevante para la formación del biofilm es el bajo flujo o el agua estancada (91,92). Aunque recientemente se han publicado artículos donde se evidencia la presencia de biofilm también en aguas con flujo turbulento (93). Este tipo de flujo puede además desprender grandes cantidades de biofilm y movilizar así la *Legionella* en la fase acuosa.

Existen pocos estudios controlados sobre el papel de la composición de las tuberías con la adherencia de *L. pneumophila*.

1.2.3 Papel de los protozoos

La *Legionella* puede replicarse dentro de protozoos que se convierten en huéspedes ambientales de esta bacteria. Existen al menos 20 especies de amebas a las que *Legionella* es capaz de parasitar y residir (94). Algunas de ellas son por ejemplo *Acanthamoeba*, *Naegleria*, protozoos ciliados y otros.

Esta capacidad de replicarse intracelularmente hace que la *Legionella* pueda sobrevivir a los tratamientos de desinfección o térmicos permitiendo una rápida recolonización de las estructuras de tuberías de agua (95). Además, su capacidad de replicarse dentro de

un protozoo ha permitido a la bacteria poder replicarse intracelularmente en las células de los mamíferos (95).

Diferentes estudios demuestran que la bacteria *Legionella* que se replica dentro de las amebas tiene características fenotípicas diferentes a las que crecen en un laboratorio. De hecho, han demostrado ser más resistentes a las condiciones ambientales como cambios de temperatura, pH o agentes oxidantes (96). Son menos sensibles a los desinfectantes (97) y son más resistentes a los fármacos (98).

1.2.4 Formas viables pero no cultivables (VBNC)

Una característica relevante para la colonización de las estructuras de agua es la capacidad que tiene *Legionella* para pasar a una forma viable pero no cultivable (en inglés VBNC: Viable But Non-Culturable).

Después de condiciones estresantes o no favorables para su crecimiento óptimo (como por ejemplo presión de antibióticos, temperatura alta/baja, inanición, desinfección del agua, cloración, pH no óptimo, estrés por oxígeno...), la *Legionella* es capaz de pasar a este estado antes de morir (99).

Sucesivamente dichas bacterias son capaces de volver a su estado originario para continuar su replicación. En la forma VBNC *Legionella* no se puede detectar con los métodos clásicos de diagnóstico como el cultivo, aunque sigue estando presente en las redes de agua y conserva la integridad de la membrana y su integridad metabólica (100). Existen métodos rápidos e innovadores que sí permiten su detección, aunque estén en dicho estado.

Después de décadas de estudio, se ha dicho que este tipo de estatus es un factor relevante para la supervivencia de la bacteria y al mismo tiempo un factor de virulencia de la *Legionella* frente a su huésped (101).

1.3 CLÍNICA

El espectro clínico con el cual se puede presentar una infección por *Legionella* es muy variable. Se puede manifestar desde formas leves hasta graves, como fracaso multiorgánico e insuficiencia respiratoria.

Las formas clásicas que se conocen son dos y ambas cursan con afectación respiratoria. La primera es la llamada fiebre de Pontiac, mientras que la más grave es la neumonía por *Legionella*. Aunque muy raramente, se han descrito formas extrapulmonares debido a la diseminación hematógena de la bacteria, pudiendo causar pancreatitis o pielonefritis. Una forma aún más rara y de pertenencia al ámbito hospitalario es la secundaria a la penetración de la *Legionella* en la piel dañada (102).

La fiebre de Pontiac está caracterizada por una clínica símil gripal (fiebre, mialgias localizadas, escalofríos...). Es una enfermedad autolimitada con un período de incubación de 24 – 48 horas. Por sus características pasa muchas veces desapercibida.

La clínica más grave e importante es la que se presenta en la neumonía por *Legionella*. Esta es comúnmente conocida como la enfermedad del legionario (en inglés Legionaries diseases, LD). Sus formas clínicas pueden ser variables pasando desde una neumonía típica hasta una neumonía atípica. La enfermedad del legionario suele tener un periodo de incubación más largo (2-10 días) que la fiebre de Pontiac. Después aparecen el malestar general, la fiebre, la cefalea, los escalofríos y las mialgias. Como en otros procesos neumónicos se pueden generar infiltrados pulmonares. Otros hallazgos clínicos que pueden detectarse son la aparición de hiponatremia, diarrea, o la alteración de la conciencia como la confusión. De especial atención es su presentación clínica en el

paciente inmunodeprimido. En este último suele ser más grave, pudiendo manifestarse con afectación extrapulmonar o incluso creando cavitaciones (103).

Los típicos factores de riesgo que se asocian a la LD son el sexo masculino, la edad avanzada, el tabaquismo, enfermedades respiratorias crónicas y la inmunodepresión. En este último caso la clínica suele ser más grave y esto supone un mayor riesgo. En este grupo de inmunodeprimidos hay que considerar también los pacientes que toman corticoides (54,104,105), quimioterapia (103), trasplantados de órganos sólidos (106,107) y los que están recibiendo las recientes terapias biológicas (108).

También hay que tener en cuenta que la legionelosis comunitaria suele contener casos menos graves donde los pacientes son generalmente más jóvenes, sin enfermedades de base, pero presentando el hábito tabáquico (13,109). La enfermedad del legionario suele afectar a los niños que presentan comorbilidades de base, siendo poco frecuente en la población sana. (110).

La principal causa de mortalidad es la insuficiencia respiratoria, siendo también su complicación más importante. Se estima una letalidad que varía del 3% hasta el 33%. Esta variación depende de varios factores, entre ellos el tipo de inóculo y especie, el serogrupo o el tratamiento basal (111,112). Finalmente, el pronóstico de la LD depende de la situación clínica de base del paciente, el retraso en el inicio de la terapia específica y la forma clínica de presentación.

1.3.1 Diagnóstico y tratamiento

Diagnóstico

Es importante la presencia de síntomas o signos clínicos como la bradicardia relativa, la fiebre elevada o la cefalea para poder sospechar la enfermedad del legionario. Al contrario, respecto a otras neumonías, la expectoración es escasa. Mientras las manifestaciones gastrointestinales son poco frecuentes (entre un 20 y 40%), una característica de la LD es la hiponatremia con aumento de la enzima creatinasa. También es frecuente la afectación unilateral en la radiografía.

El cultivo microbiológico todavía sigue siendo de referencia para el diagnóstico de *Legionella*. Esta metodología es el paso previo para estudios epidemiológicos en salud pública. Su sensibilidad (entre el 50-80%) y especificidad (100%) son variables (113) dependiendo de la carga bacteriana en la muestra clínica. Por tal razón, pacientes ingresados en centros sanitarios y con formas severas de la enfermedad tienen una sensibilidad mayor (114).

Teniendo un crecimiento lento, son necesarios entre dos y tres días para apreciar colonias entre 0,5mm y 1-2mm. Las condiciones de cultivo óptimas en el laboratorio son la temperatura de 37°C con microaerofilia, es decir CO₂ al 5%.

La *Legionella* puede aislarse en diferentes muestras, aunque las mejores son las del tracto respiratorio inferior, como el esputo y las muestras obtenidas por broncoscopia (115).

La principal ventaja del cultivo para el diagnóstico es que todas las especies de *Legionella* pueden detectarse con este método. Las colonias que se obtienen por este método se

utilizan para la tipificación epidemiológica adicional o para pruebas de susceptibilidad (48). Sin embargo, existen problemas inherentes con el cultivo de *Legionella*. Por un lado, porque los pacientes a menudo no producen esputo suficiente y, por otra parte, porque el cultivo para el diagnóstico requiere medios especiales, un procesamiento adecuado de las muestras y experiencia técnica. Además, se pueden requerir hasta 10 días para obtener un resultado positivo (116).

Para el diagnóstico clínico la prueba que más se utiliza es el antígeno urinario por su sencillez, su sensibilidad y especificidad elevadas y también por el hecho de que el antígeno de *Legionella* se inicia a eliminar en orina desde los primeros días de aparición de los síntomas y perdura meses después de la resolución del cuadro clínico. Por lo anteriormente expuesto, se piensa que en casi un 90% de los casos clínicos de Estados Unidos y Europa se utiliza esta metodología (10). Técnicamente la prueba está basada en ensayos inmunocromatográficos o en tecnología de radioinmunoanálisis hasta enzimoimmunoanálisis (EIA) (117), no requiriendo ningún tipo de equipamiento específico.

Otra técnica de diagnóstico es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permite amplificar pequeños fragmentos de ADN de *Legionella*. Se revela útil en aquellos pacientes que no expectoran porque se pueden utilizar muestras clínicas de suero u orina, por ejemplo. Para obtener resultados en menor tiempo, se ha introducido una variante llamada PCR en tiempo real, que utiliza fluorescencia.

Aunque los métodos de diagnóstico han mejorado desde que *L. pneumophila* se describió por primera vez en 1976, actualmente ninguna prueba disponible puede

diagnosticar todas las especies de *Legionella* de manera óptima y con una elevada sensibilidad y especificidad (116).

Tratamiento

Actualmente, los antibióticos de elección son la azitromicina o el levofloxacino, porque presentan menores efectos secundarios respecto a otros antibióticos eficaces en este tipo de clínica, como por ejemplo la eritromicina (118–120). El tratamiento depende también de la enfermedad de base del paciente. Por ejemplo, en pacientes trasplantados se recomienda el uso de quinolonas por su incapacidad de interferir con los fármacos inmunosupresores, además de acortar los días de estancia hospitalaria (121).

En las formas clínicas más graves se suele utilizar una terapia combinada, aunque su uso no se ha respaldado por la evidencia científica respecto al utilizar un solo fármaco (122).

También el tiempo de tratamiento es variable y depende de cómo responden los pacientes y la mejoría de los marcadores analíticos, recomendando un tiempo mínimo de 5 hasta 14 días de tratamiento. En los pacientes inmunodeprimidos se puede alargar hasta los 21 días (122).

notificados en aquel año los notificaron solo cuatro países: Francia, Alemania, Italia y España (125). En España, los casos declarados en 2019 sumaron un total de 1.408 con una tasa de 3,0 por 100.000 habitantes (126). Mientras tanto, en los Estados Unidos, la incidencia de LD se multiplicó por más de seis entre 2000 y 2018 (127).

La neumonía por *Legionella* representa una de las neumonías de origen infeccioso más frecuentes del mundo occidental. Aunque la mayoría de los casos son esporádicos, es importante su vigilancia para poder controlar posibles brotes relacionados con instalaciones presentes en el ambiente laboral, por ejemplo (128). Como se ha comentado anteriormente, la mayoría de los casos son esporádicos, pero también pueden presentarse en forma de brotes. Estos pueden ir asociados a algún tipo de instalación y/o edificio.

Para adaptarse a la Unión Europea, en España se ha fundado un sistema de vigilancia epidemiológica donde se intercambia información tanto epidemiológica como microbiológica (10). En el caso de la legionelosis se comunica a la RENAVE datos sobre casos, brotes y defunciones. Todo esto es muy importante para prevenir y controlar la enfermedad, además de ser una herramienta útil para el estudio de su evolución temporal (129–131).

Entre los datos que podemos destacar, vemos que la incidencia en España tiene una tendencia creciente desde 1997 al 2002, con una tasa anual de 52,5% de crecimiento. Sucesivamente hasta el 2009 la tendencia tiende a ser conservadora (123) y en el año 2020 se ve un leve descenso (132), probablemente también debido a la situación pandémica de SARS-CoV-2.

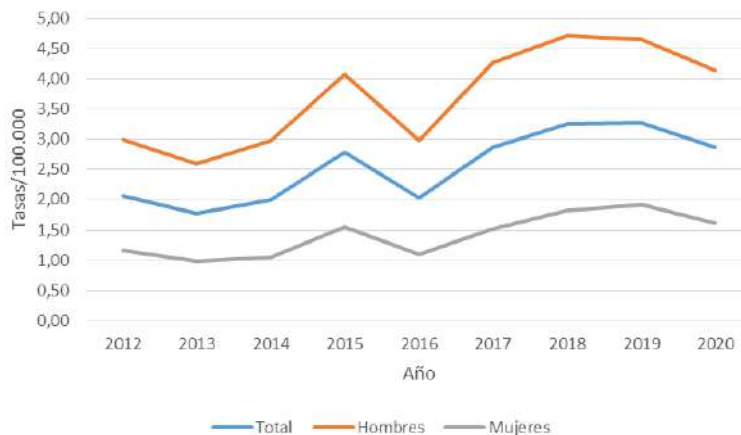


FIGURA 9. EVOLUCIÓN DE LA TASA DE LEGIONELOSIS EN ESPAÑA.
Fuente: boletín epidemiológico Instituto Carlos III (132).

La *Legionella* tiene una incidencia global de difícil valoración debido a la diferencia que hay entre los diferentes países. En muchos países la legionelosis es una enfermedad de declaración obligatoria. No obstante, su magnitud puede estar infravalorada a nivel mundial. Esto es debido al hecho de que no todos los países tienen accesibilidad a pruebas diagnósticas y sus sistemas de vigilancia (cuando los hay) no siempre son exhaustivos.

Los países que presentan un sistema de vigilancia eficiente tienen unas tasas de incidencia y una letalidad muy variable (11). Generalmente se puede apreciar una distribución similar por sexo y edad. Como se ha comentado anteriormente, la legionelosis resulta ser más frecuente en hombres y en personas mayores de 50 años. En los países que tienen un clima templado se verifican picos de casos a final de verano y principios de otoño (132).

La clasificación de los casos de legionelosis puede ser en casos esporádicos o asociados a brotes. También se pueden clasificar en casos comunitarios o nosocomiales. Otra

clasificación es si estos casos son relacionados con viajes nacionales o con viajes al extranjero.

1.4.2 Brotes epidémicos

Si analizamos por ejemplo el periodo 1999-2011, el número de brotes de legionelosis declarados fue 597. Afectaron a un total de 3.785 personas y un 83% de ellas requirieron hospitalización. De los brotes declarados, 408 se produjeron en la comunidad. 153 brotes se asociaron a viajes y solo 36 fueron nosocomiales. Estos últimos han afectado a un total de 164 pacientes causando 37 exitus. Si los comparamos con los brotes que se generaron en la comunidad se vio que su letalidad fue más de 7 veces mayor.

De todos los brotes que se identificaron en España y en Europa, se ha podido investigar e identificar la fuente de infección solo en un pequeño porcentaje. Por ejemplo, en España, según RENAVE, se ha podido investigar menos del 50% de los brotes comunitarios y, en Europa, el 16% de los brotes nosocomiales (768 sobre 4523 casos) (133). Una posible causa puede ser el reducido número de muestras clínicas obtenidas.

La Comunidad Valenciana en el año 1997 desarrolló una Orden (4 de marzo) que incluye la legionelosis como enfermedad de declaración obligatoria (EDO) (134).

La Comunidad Valenciana ha declarado un total de 236 casos de legionelosis en el año 2017. La tasa fue de 4,7 casos por 100.000 habitantes (135). La Comunidad Valenciana se sitúa dentro de aquellas comunidades con tasas declaradas que están por encima de la tasa media de España.

Los casos en cuestión fueron casi la mayoría hombres con una edad media de 66,8 años, teniendo una razón de tasas hombres/mujeres de 2,4. Se declararon casi todos casos

graves, de hecho, el 98,2% de ellos tuvo que ingresar, teniendo 9,2 días de estancia hospitalaria media. Fallecieron 18 personas, siendo la letalidad del 7,6% (en el 2016 la letalidad fue del 5,5%).

1.4.3 Legionelosis Nosocomial

La fuente más importante para los pacientes ingresados sigue siendo el agua y sus diversos usos clínicos, a pesar de algunos casos descritos donde los pacientes se infectaron a causa de aerosoles contaminados desde las torres de refrigeración.

Generalmente los pacientes se contaminan aspirando microaerosoles desde grifos o duchas. No obstante, también se puede producir infección tras la colonización de la orofaringe.

No hay que olvidar que en el agua sanitaria también se pueden encontrar bacterias multirresistentes como el caso de la *Klebsiella spp* o la *Pseudomonas aeruginosa* (136,137). Por todo ello es importante el control de la calidad del agua en los hospitales para que sea segura, tanto para los usuarios como para los trabajadores.

1.5 PREVENCIÓN Y CONTROL

1.5.1 Características de las instalaciones hospitalarias

A nivel sanitario los hospitales son entornos complejos en cuanto a instalaciones de red de distribución del agua. En ellos podemos distinguir: agua fría (AF), que es la que se usa en las instalaciones y no se ha procedido a calentar para ninguna finalidad. En este grupo podemos incluir el agua fría que no es apta para el consumo humano y el agua fría utilizada para el consumo humano (AFCH). Esta última pasa por la red de distribución. Por otro lado, tenemos el agua caliente sanitaria (ACS). Se trata de agua que ha sido sometida a un calentamiento para poderse usar en el ámbito sanitario e higiénico.

En los hospitales, para garantizar una correcta ACS, es necesario calentar el agua que tiene su origen de la red de agua fría y distribuirla a través de un sistema de circulación en toda la estructura. El sistema más común es un sistema de retorno que permite una circulación continua del agua caliente, de manera que se pueda disponer de ella de manera casi instantánea en los puntos terminales y se pueda ahorrar energía en calentar grandes cantidades de agua para luego desechar.

En general el AFCH entra en el edificio sanitario a través de una acometida, luego se almacena en un aljibe de AF para su uso como AFCH. Una parte de esta agua fría se incorpora en el sistema de ACS pasando por un generador de calor (como por ejemplo intercambiadores de calor utilizando calderas. Son placas de acero que permiten un calentamiento muy rápido del agua a través de su estructura estampada y enrollada en espiral).

El ACS que no se utiliza circula continuamente en el sistema central de tuberías de aguas calientes. Sucesivamente, puede almacenarse en acumuladores de ACS o seguir

circulando, evitando estos acumuladores. En este último caso se puede utilizar un Pastormaster, es decir, un sistema que permite un aumento de temperatura considerable del agua hasta los 70°C para poder ser letal para *Legionella*. Pasteurizando de manera instantánea el agua no es necesario mantener un acumulador de ACS.

Los sistemas que se ocupan de distribuir el agua fría en los centros sanitarios son independientes de los que se ocupan de distribuir el agua caliente, aunque ambos parten de la misma acometida.

Hasta su punto de uso final, las dos distribuciones de agua (ACS y AFCH) viajan paralelamente dentro del centro sanitario.

Normalmente las tuberías circulan por un falso techo para que sea de fácil acceso. El ACS está continuamente circulando como se ha comentado anteriormente. Esta circulación se verifica en las líneas de distribución vertical y horizontal, pero no en el ramal final que llega al punto de consumo.

1.5.2 Control Microbiológico

El control microbiológico de legionelosis es una herramienta importante para la salud pública.

Actualmente el cultivo continúa siendo el método de referencia y el más utilizado por los laboratorios ambientales. Para ayudar al diagnóstico microbiológico se publicó en 1998 la norma ISO11731:1998 que define la correcta cuantificación de *Legionella* en la muestra ambiental. Normalmente, como no es posible establecer el nivel de

contaminación de esta última, se siembra de manera doble. Una siembra directa (si las concentraciones en la muestra son altas) y otra siembra después de que la muestra haya sido concentrada por filtración o centrifugación (si las concentraciones son bajas). La siembra se hace en el mismo medio de cultivo de las muestras clínicas. Como ya se ha comentado anteriormente, cuando se hablaba de las formas viables pero no cultivables, el cultivo solo puede detectar las células vivas y que estén en un estado activo de replicación. Aquellas células bacterianas muertas o que sí están vivas pero no se replican, no se pueden detectar a través del cultivo.

Es necesario mencionar que recientemente se han descrito diferentes metodologías útiles para detectar la *Legionella* a partir de muestras ambientales. La mayoría de ellas están basadas en la PCR. Por ejemplo, la técnica de separación inmunomagnética (SIM) es una nueva tecnología que permite una cuantificación de la bacteria viva, parecida al cultivo. Mientras que la PCR detecta todo el DNA no diferenciando si la célula está viva o muerta.

La microbiología juega un rol relevante para la vigilancia y control de *Legionella* dentro de los hospitales (138). La prevención primaria consiste en establecer planes de autocontrol, donde los centros hospitalarios que no hayan tenido ninguna infección documentada de legionelosis efectúan controles periódicos dentro sus instalaciones. La prevención secundaria consiste en tomas de muestras para investigar brotes ocurridos con la finalidad de que no vuelvan a presentarse nuevos contagios.

Aunque con el tiempo se ha dudado de la importancia de la vigilancia y el control microbiológico, se ha visto en varios estudios que los hospitales con una elevada colonización por *Legionella* generaban con más frecuencia brotes nosocomiales

(55,139). Se concluyó que la mejor forma para saber en qué estado de transmisión se encontraba un centro sanitario era una monitorización del ambiente y una vigilancia escrupulosa (140).

El uso en el tiempo de la vigilancia microbiológica ha hecho que se plantee cómo interpretar esta información para gestionar el riesgo ambiental en una estructura sanitaria para evitar la generación de casos. Hoy en día se han propuesto varios criterios.

Uno es relativo a la concentración de *Legionella* en las muestras positivas.

Muchas guías técnicas de otros países europeos contemplan aplicar acciones correctoras cuando se alcancen niveles de *Legionella* por encima de 1.000 o 10.000 UFC/L. Aunque hay trabajos que indican que los puntos que superan estas concentraciones son pocos (20%), por lo que el riesgo de legionelosis es insignificante (141). Además, se ha visto que este criterio sigue aplicándose basado en estimaciones que no son empíricas (142).

El segundo criterio propuesto es la prevalencia de *Legionella* en las tuberías. Si un hospital presentara un 30% o más de puntos de muestreo positivos para dicha bacteria es necesario activar todas las medidas correctoras (143). Desde 1983 se aplicó este criterio y finalmente, en un estudio del 2012 (144), se ha visto como solo este criterio no es suficiente. Según los autores habría que utilizar tanto el primer como el segundo criterio, es decir, tener un enfoque mixto donde se tenga en cuenta tanto los puntos positivos como la concentración de *Legionella* obtenida.

A estos dos criterios, más recientemente se añaden estudios que sugieren también utilizar como ulterior apoyo el serogrupo o la virulencia de *Legionella* encontrada en las muestras positivas (145).

1.5.3 Vigilancia epidemiológica en hospitales

Hasta inicios de los años 90 no era muy común investigar cómo la *Legionella* podía colonizar una estructura sanitaria. Incluso hoy, los diferentes estudios llevados a cabo no han establecido cuáles son las causas relevantes para dicha colonización, y ponen en discusión la vigilancia diaria y rutinaria de la legionelosis.

La introducción de metodologías diagnósticas de tipaje molecular ha permitido un avance en el control de la colonización por parte de esta bacteria (140). Muchos estudios muestran cómo la *Legionella* puede persistir a lo largo de los años en un mismo hospital. Esta presencia se manifiesta en forma de variabilidad genómica diferente. El aspecto más interesante es que parece que cada hospital tenga su patrón de subtipos (como si fuese una huella digital). Estos patrones, de hecho, no suelen ser compartidos entre diferentes hospitales y pueden persistir por mucho tiempo en el mismo hospital. Además, se ha visto que un mismo patrón coincide también en el paciente que se ha enfermado por legionelosis nosocomial. Varios estudios internacionales parecen sugerir esta hipótesis: Alemania (146), Polonia (147), Italia (148) o Grecia (149). Un cambio de patrón en un mismo centro sanitario puede que sea debido a una desinfección del agua que, destruyendo al subtipo dominante, haya seleccionado algún subtipo menor (150).

1.5.4 Legislación

Cuando se diseñó nuestro estudio y durante toda su ejecución estaba en vigor en España el 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 (151).

Podemos resumir las medidas más importantes para el control de la legionelosis en el ámbito hospitalario. En este sentido este documento legisla que las tuberías deben tener una correcta circulación evitando que el agua se quede estancada durante el trayecto, también es importante poder purgar completamente la instalación a través de puntos de purga. Hay que disponer de puntos de acceso para la inspección y toma de muestras que sean accesibles. La red de distribución tiene que contar con materiales de fabricación que puedan resistir a los normales procedimientos de desinfección del agua y al mismo tiempo que no faciliten la formación del biofilm.

Por lo que concierne a la temperatura del agua, se establece que el agua fría debería tener la menor temperatura posible, siendo ideal inferior a 20°C. Para el ACS se recomienda una temperatura mayor de 50°C en los puntos más lejanos, pudiendo el agua alcanzar los 70°C.

En cuanto al mantenimiento de las instalaciones (artículo 8) es importante decir que se tienen que efectuar revisiones periódicas y establecer puntos críticos de la estructura sanitaria. Hay que planificar y detallar qué parámetros se van a medir y cómo se efectuará tal medición junto con su frecuencia. Es importante redactar un plan de tratamiento del agua para garantizar su calidad. Además, para las revisiones hay que detallar y establecer un plan de limpieza y desinfección al fin de conocer los productos

que se utilizarán, así como qué procedimiento, qué frecuencia y qué metodología se va a emplear.

Nuevo Real Decreto 487/2022

Recientemente ha salido un nuevo **Real Decreto, el RD 487/2022**, que ha derogado el precedente RD de 2003 y ha entrado en vigor el 2 de enero de 2023 (152), aunque se ha establecido un periodo de tiempo para que los titulares de las instalaciones se adapten a los cambios legislados en dicho decreto.

Este cambio ha sido necesario después de varios años en los cuales se han visto avances en el diagnóstico, control y prevención de la *Legionella*. Entre dichos avances destaca la publicación de la norma UNE 100030:2017, que aporta mejoras técnicas e innovaciones en la toma de muestras y métodos analíticos (153). Actualmente, los avances científicos y los nuevos métodos alternativos al cultivo microbiológico han puesto en evidencia la necesidad de introducir el análisis de riesgo.

El análisis de los brotes y los estudios epidemiológicos junto con la experiencia de las normativas precedentes han comportado la necesidad de introducir cambios útiles para el control de las instalaciones susceptibles de colonizarse por *Legionella*. También cabe destacar los nuevos requisitos en la formación del personal que han llevado a actualizar la capacitación y formación de estos

Varios artículos y conceptos se han mantenido iguales al RD precedente. Pero dentro de los cambios que se han anunciado, algunos relevantes sobre los requisitos de las instalaciones y calidad del agua son:

- En agua sanitaria utilizar preferentemente difusores de baja aerosolización.
- Para el AFCH, que los depósitos sean equipados de un sistema para la determinación de la temperatura del agua en su interior.
- Para el ACS, los acumuladores deben tener un sistema de acceso con diámetro mínimo de 400 mm para un volumen de 750 litros; si el volumen es menor de 750 litros se ha de seguir la norma UNE-EN 12897:2017+A1:2020.
- Siempre en el ACS, el agua de retorno no puede volver al circuito de distribución sin pasar por un sistema de desinfección térmica (intercambiador o depósito si es un interacumulador) y la temperatura mínima es de 70°C; hay que garantizar 60°C en el acumulador final.
- Donde hay pacientes inmunocomprometidos, este nuevo RD recomienda el uso de filtros de alta eficacia en los puntos terminales, constituyendo una barrera física frente a la *Legionella*.

Para los programas de mantenimiento:

- Revisión anual sin que se superen los 12 meses entre una desinfección y otra.
- Realizar una revisión, limpieza y desinfección en los depósitos de AFCH cada año.
- Se tiene que comprobar todos los días que los niveles de desinfectante sean correctos. Si es necesario también hay que medir el pH. Se ha de tener en cuenta

que el número de puntos a examinar tiene que ser representativo de la estructura sanitaria.

Para los programas de tratamiento:

- Debe constar un certificado tanto del personal propio como el de una empresa contratada.
- Se hace referencia a desinfectante en general, no a cloro con un procedimiento secuencial.

Por lo que concierne a los puntos de muestreo en agua sanitaria, una de las grandes mejoras del nuevo Real Decreto 487/2022 es la concreción y mejora en el número de muestras que hay que tomar y dónde hay que realizarlas en las instalaciones de agua sanitaria, desarrollándose en el Anexo V “Programa de muestreo”, el cual se basa en buena parte en la Norma UNE 100030 (153). Se especifica que hay que tomar muestras de algunos puntos mínimos teniendo en cuenta la posibilidad de aumentar el número de muestras en función del tamaño de la instalación y de sus características.

Este nuevo Real Decreto distingue las tomas de muestras si se efectúan en instalaciones sin circuito de retorno o con circuito de retorno. En las primeras se detalla que la toma de muestras será representativa. Mientras que, en el segundo caso, hay que tomar un mínimo de puntos concretos especificados en dicho Anexo, para luego ir aumentando el número de muestras en base a la estructura sanitaria. Dichos puntos en concretos son:

- Un punto en el depósito.

- Un punto en el acumulador.
- Un punto en el circuito de retorno.
- Dos puntos medios de la instalación.
- Cada uno de los puntos terminales identificados. (152)

Otros aspectos nuevos que hay que desarrollar son los expuestos en el artículo 8, donde se habla del “plan de Prevención y Control de *Legionella*” (PPCL), y en el artículo 9, que explica el “plan Sanitario frente a *Legionella*” (PSL). Este último recomendado para las estructuras sanitarias.

En cuanto a la parte del diagnóstico, el nuevo Real Decreto menciona la posibilidad de utilizar métodos rápidos para la detección de *Legionella*. Se detalla en el texto que se pueden utilizar dichos métodos rápidos para controlar el estado de las instalaciones, es decir, para un enfoque preventivo. Por otra parte, se explica que estas técnicas rápidas se pueden utilizar, pero con carácter complementario. Las situaciones detalladas en el texto del RD donde se puede utilizar métodos rápidos de detección son:

- 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 (152).

Se recuerda que, aunque existe la posibilidad de utilizar métodos rápidos, estos serán complementarios al cultivo.

1.6 TOMA DE MUESTRAS

1.6.1 Diagnóstico ambiental de *Legionella*

Hoy en día la herramienta principal para la identificación y cuantificación de la *Legionella* sigue siendo el cultivo. Para detectar la fuente de infección es importante el aislamiento para posteriormente contar las cepas de las instalaciones que están epidemiológicamente relacionadas entre ellas mismas, y finalmente tipificar molecularmente dichas cepas.

Últimamente se han ido desarrollando técnicas de PCR para muestras ambientales. Según algunos estudios se ha visto que en muestras ambientales la sensibilidad es muy elevada, incluso mayor que la del cultivo (154).

Más recientemente se están estudiando otras técnicas para la detección rápida de *Legionella* en el agua. Una de ellas es el sistema inmunomagnético (SIM). Este se basa en una combinación de técnicas inmunológicas parecida a un ELISA. Se trata de anticuerpos contra proteínas de superficie de *Legionella* que están ligados a material magnético. Una vez que los anticuerpos se ligan a la bacteria son separados por atracción magnética. Es un método rápido que permite hacer una cuantificación de la carga bacteriana (como el cultivo) pero sin esperar el crecimiento de las placas. Visto que la técnica es muy reciente, no se disponen de muchos artículos ni de muchos datos relativos a sus características intrínsecas y comparación respecto al cultivo (155).

Dado que la *Legionella* está presente en poca cantidad respecto a la flora microbiana ambiental es importante recoger al menos 1 litro y hasta 5 litros para poder así concentrar la muestra por centrifugación o filtración por membrana y aumentar la

sensibilidad. Una vez recogidas las muestras tienen que llegar al laboratorio para poder ser analizadas en un plazo máximo de 24 horas.

1.6.2 Cultivo

Es actualmente la técnica estándar y más utilizada para la vigilancia ambiental de la legionelosis. Como para el cultivo en muestras clínicas, el medio estándar utilizado es el BCYE (Extracto de levadura de carbón tamponado). La característica principal de este medio de cultivo es el uso de un tampón de ACES/hidróxido de potasio, carbón activado, pirofosfato férrico soluble, L-cisteína y α -cetoglutarato. Este tiene la finalidad de mantener un pH de 6,9 que es óptimo para el crecimiento de la *Legionella*. Los otros elementos sirven para estimular el crecimiento bacteriano y anular los productos metabólicos tóxicos. Si hay crecimiento excesivo de bacterias contaminantes, se puede aumentar la selectividad a través de suplementos como polimixina B, vancomicina o MWY (Modified Wadowsky and Yee).

Las limitaciones de ese método son que resulta ser laborioso y lento. Se puede llegar a tardar de 3 a 10 días de incubación (a 37°C en una atmósfera húmeda enriquecida con 2,5% de CO₂) y esto hace que no sea el mejor método para dar respuestas rápidas a situaciones de emergencia o para acciones preventivas (156). Además, cabe destacar que si hay una presencia excesiva de microorganismos contaminantes estos pueden enmascarar la presencia de *Legionella* en el cultivo (157). Por tal motivo, es recomendable utilizar medios selectivos para la identificación de *Legionella* spp cuando hay flora contaminante, pero luego utilizar el medio BCYE para definir la especie de

Legionella (158). Otra dificultad relativa al cultivo es que a menudo falla en el aislamiento de bacterias VBNC (159). Se ha demostrado que las bacterias VBNC se pueden resucitar mediante el cocultivo dentro de la ameba; sin embargo, esto agrega más tiempo al proceso de aislamiento y, en el mejor de los casos, solo permite una evaluación cualitativa de presencia/ausencia de *Legionella* en una muestra (160).

1.6.3 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) es una técnica de diagnóstico rápido donde se puede establecer una cantidad de ADN en tiempo real (61). Con este método se puede obtener un número de unidades de genoma (GU) por litro de agua (161). Sin embargo, no se ha podido establecer una equivalencia exacta con el número de UFC por litro y los resultados porque depende del método utilizado y de la composición de la muestra. Como dificultad añadida encontramos la posible aparición de inhibidores de PCR en las muestras de agua ambiental que pueden afectar a las lecturas de qPCR dando resultados falsos negativos (162). Para obviar este último punto, existen sistemas como diluciones de extracto de ADN o el uso de kits específicos donde están presentes eliminadores de inhibidores.

Otra característica es que la PCR puede detectar las formas viables pero no cultivables (VBNC) porque detecta el ADN bacteriano (145). Esta característica también juega en contra de la qPCR porque muchas veces los resultados se tienden a sobreestimar (identificando tanto bacterias vivas como muertas) respecto al cultivo (donde solo se identifican las células vivas) (160).

1.6.4 Viabilidad-qPCR

Cabe mencionar una técnica reciente que se ha desarrollado para intentar resolver el problema de las PCR visto anteriormente, es decir, que no distinguen las células vivas de las muertas. La Viability-qPCR utiliza el criterio de la integridad de la membrana celular para diferenciar una célula viva de una muerta. Una célula con membrana dañada se considera muerta, pero no necesariamente vale lo contrario (163). Para diferenciar las células con la membrana dañada de las que no la tienen se utilizan colorantes (PMA - monoazida de propidio- o EMA -bromuro de monoazida de etidio-) que penetran en las células con la membrana no íntegra (164), reaccionan con el ADN bacteriano de manera que se inactiva y no es posible amplificarlo en la reacción PCR. También esta técnica tiene sus limitaciones, como falsos positivos debido a la presencia de niveles altos de suspensión de sólidos en la muestra de agua o que el colorante no pueda penetrar en las células sobrestimando el número de células vivas (165).

1.6.5 Separación inmunomagnética (SIM)

La separación inmunomagnética (SIM) es una prueba rápida para la detección de *Legionella pneumophila* en el agua. Su nombre comercial es Legipid®. Esta técnica permite obtener resultados en una hora. Está basada en la combinación de la inmunocaptura magnética y el ensayo inmunoenzimático (CEIA) (166,167).

Su funcionamiento se basa en la presencia de anticuerpos anti *L. pneumophila* inmovilizados sobre microesferas magnéticas. La separación inmunomagnética se genera a partir de muestras de agua preconcentrada con un volumen final de 9 mL. Sucesivamente estas microesferas acopladas con anticuerpos anti-*Legionella* (LPMB) se ligan a la bacteria viva (168). A estas esferas se acopla un sistema de detección colorimétrica ligada a enzimas. Si en la muestra hay células de *L. pneumophila*, se unirán a los anticuerpos presentes superficialmente en las microesferas magnéticas generando complejos bacterias/microesferas (Figura 9). Estos complejos se pueden separar con un imán, lavar y resuspender. Posteriormente, los complejos se incuban con un anticuerpo anti-*Legionella* conjugado con peroxidasa de rábano (PHR) para formar complejos marcados (169). Después de los pasos de lavado descritos anteriormente, los complejos de perlas magnéticas/*L. pneumophila* se visualizan mediante la reacción colorimétrica que se desarrolla cuando se agregan los sustratos de HRP.

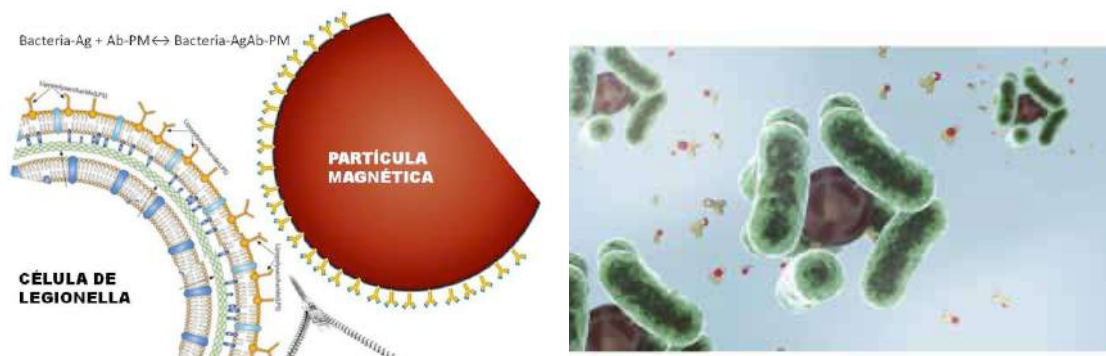


FIGURA 10. ESQUEMA DE FUNCIONAMIENTO DEL MÉTODO DE LA SIM

Fuente: Arnau Ripollés et al. 2015, Tecnoaqua (169).

1.6.6 Criterios de muestreo en instalaciones sanitarias

Como ya se ha explicado en el apartado anterior relativo a la normativa, el nuevo Real Decreto, con su Anexo V, se basa en la Norma UNE 100030 (153). En ella se indica que las muestras que se tomen tienen que ser representativas de la estructura, con un número mínimo que puede aumentar en función del tamaño de la estructura sanitaria y de sus características. Además, en el texto se detallan algunos puntos concretos donde hay que tomar muestras en el caso de instalaciones con circuito de retorno. Dichos puntos son:

- Un punto en el depósito.
- Un punto en el acumulador.
- Un punto en el circuito de retorno.
- Dos puntos medios de la instalación.
- Cada uno de los puntos terminales identificados (152).

1.6.7 Número de muestras

Según el nuevo RD487/2022 se establecen también un número de muestras (152) que varía en función del número de puntos terminales de una estructura.

TABLA 1. PUNTOS TERMINALES DE TOMA DE MUESTRAS EN INSTALACIONES DE USO COLECTIVO

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 (cada 50, 1 punto)	Aumentar proporcionalmente (cada 100, 1 punto)

FUENTE: RD486/2022 (152).

1.6.8 Método de la toma de muestras

Fundamentalmente se pueden tomar las muestras de dos maneras diferentes. Una es el método “preflushing”. Este consiste en recoger el primer flujo de agua. Es útil cuando se quiere establecer el riesgo que se tiene usando este punto terminal.

El segundo método se llama “postflushing”. Consiste en dejar que el agua fluya durante unos minutos al fin de poder recolectar el agua originaria de la tubería principal. Cuando se quiere recoger el ACS con este método, se considera que sea de las tuberías cuando ha alcanzado el límite máximo de temperatura. El “postflushing” es utilizado para analizar el estado de las tuberías o para comprobar si un determinado tratamiento de desinfección ha sido eficaz. Se puede además incluir el muestreo del biofilm obtenido mediante escobillones.

1.7 MÉTODOS DE DESINFECCIÓN

Existen varios procedimientos de desinfección para controlar la *Legionella*. Con este término se define el proceso de destrucción de los microorganismos excepto las esporas. Existen diferentes métodos de desinfección. Algunos utilizan medios físicos (temperatura, filtros en punto de uso, rayos UV), químicos (iones cobre-plata, agentes oxidantes como el cloro y no oxidantes). El diferente uso de cada uno de estos métodos hace que se puedan clasificar en base al lugar de actuación (sistémicos, focales) o al tiempo de actuación (continuos o de choque).

Cada método de desinfección es diferente en su aplicación y diseño. Por ello, es necesario un análisis del entorno y una adecuada planificación. Aunque se sabe que la desinfección puede favorecer la corrosión de las tuberías, los resultados que se encuentran en la literatura son contradictorios (170).

1.7.1 Efecto de la temperatura

Se trata de un método de desinfección muy utilizado, así como el control de los niveles de cloro. Es un método que se suele aplicar en el agua caliente sanitaria (ACS). Esta práctica es de uso común tanto en hospitales como en hoteles y otros edificios. Se ha demostrado (81) que la *Legionella* es capaz de sobrevivir en las tuberías a temperaturas entre 20 y 50 °C. Diferentes autores han podido averiguar que a más temperatura del agua es necesario un menor tiempo para destruir la bacteria. Muraca et al. (1987) (171) erradicaron completamente *L. pneumophila* a 60 °C en menos de 3 horas en un sistema de tuberías sin el efecto de turbidez (172) . Indicaron que el tiempo requerido para obtener una reducción del 90% a 45°C, 50°C, 60°C y 70°C fue de 2500, 380, menos de 5

y menos de 1 minutos, respectivamente. Todos ellos estaban de acuerdo en que era necesaria una temperatura por encima de 60°C para la destrucción de la bacteria. En caso de brotes se pueden aplicar tratamientos de choque térmicos donde la temperatura puede llegar a los 70°C permitiendo un alcance de al menos 65°C en los puntos terminales.

Nuevos estudios han demostrado que es necesaria una temperatura mayor de 55°C para poder tener un efecto bactericida, cuando en muchos hospitales la temperatura que se tiende a mantener es de 50°C (no suficiente para una correcta desinfección de *Legionella*) (74,173).

1.7.2 Sistemas de ionización cobre-plata

El sistema de ionización cobre-plata utiliza el efecto sinérgico de los iones de cobre y de plata para tener un efecto bactericida sobre la *Legionella*. Los iones de cobre permeabilizan la membrana celular permitiendo a los iones de plata entrar en las células causando su muerte a través del bloqueo enzimático(174). Para tener capacidad bactericida se recomiendan concentraciones de iones de cobre de 0,2-0,8 mg/L y concentraciones de iones de plata de 0,02-0,08 mg/L. Hasta la fecha, estos sistemas únicamente han demostrado ser eficaces en un entorno hospitalario durante períodos de tiempo prolongados (175).

Este tipo de sistema tiene la ventaja de ser fácil de instalar y la temperatura del agua no interfiere con su eficacia (respecto al cloro donde una temperatura elevada reduce las

concentraciones de cloro). Tienen además un efecto remanente que dura entre 6 y 12 meses en el caso de que el sistema dejase de funcionar (176).

Como desventaja encontramos la necesaria monitorización para evitar formaciones calcáreas. La eficacia de la desinfección se puede comprometer a causa de excesivos valores de pH del agua (177,178), por eso es necesario un análisis de compatibilidad especialmente en los centros donde el agua es alcalina (179).

1.7.3 Dióxido de cloro

Se trata de un método de desinfección compuesto por un gas que se descompone in situ. Presenta riesgo de toxicidad cuando está almacenado. Su mecanismo bactericida es el de interrumpir la síntesis de proteínas de las bacterias. Este compuesto tiene una mayor eficacia frente al biofilm generado por la *Legionella* respecto al cloro. Para que se manifieste su eficacia es necesario un periodo de tiempo largo, entre uno y tres años (178,180) y con la problemática de que se generen bacterias resistentes a dicho tratamiento. Sin embargo, el dióxido de cloro no se ve afectado por los cambios pH. Por otro lado, hay que tener cuidado en mantener una concentración residual efectiva que ronda entre 0,3 y 0,5 mg/L en toda la red de distribución. En los centros sanitarios esta medida es muy compleja y costosa.

1.7.4 Monocloramina

El cloro cuando reacciona con el amoníaco en el agua forma tres compuestos: la monocloramina, la dicloramina y el tricloruro de nitrógeno. La monocloramina es inestable pero efectiva frente a la *Legionella* tanto libre como en el biofilm. Varios estudios han demostrado su eficacia en reducir la legionelosis en el agua de los centros sanitarios (181), aunque no hay mucha experiencia a largo plazo como para otros sistemas de desinfección. Este producto presenta la ventaja de no verse afectado por los cambios de pH. Las concentraciones de *Legionella* se reducen al cabo de pocas semanas junto a la presencia de otros patógenos (182).

1.7.5 Sistema de cloración

El uso de cloro como agente desinfectante del agua fría es muy común y utilizado en los centros sanitarios. Su control a nivel de las instalaciones sanitarias es relativamente fácil en comparación a otros sistemas de desinfección. Actúa sobre las células como agente oxidante, interfiriendo con las actividades respiratorias y de transporte de ácidos nucleicos de las bacterias, aunque su actividad se ve afectada por la temperatura, pH del agua y tiempo de acción.

Para su control óptimo se necesitan concentraciones de cloro entre 4 y 6 mg/mL (171) lo que supondría una hipercloración. Hoy en día se tiende a hiperclorar solo por un tiempo limitado (choque de cloro) debido a su elevada corrosividad hacia las tuberías y el riesgo para los pacientes. Actualmente se prefiere el uso de concentraciones de cloro libre ente 0,2 y 0,8 ppm por no tener peligro para la salud humana. Cabe destacar que

este método no es eficaz al 100% debido a la resistencia de la bacteria al cloro y a la poca penetración en el biofilm (183).

1.7.6 Desinfección por choques puntuales

Son métodos de uso puntuales. Los más utilizados son el choque térmico y el choque de cloro.

El choque térmico se caracteriza por un aumento de la temperatura de los acumuladores hasta los 80°C para luego dejar correr el agua a través de los puntos terminales (duchas, grifos...). De esta manera se intenta eliminar la *Legionella* desde estos puntos terminales. Para conseguir la muerte de la bacteria es importante que a nivel más distal se logre alcanzar por lo menos 60°C. Siendo el método más utilizado en casos de brotes en centros sanitarios, se cuenta con una amplia experiencia clínica. Varios estudios confirman que este método es eficaz a corto plazo, pero que la *Legionella* es capaz de recolonizar las tuberías en poco tiempo (aproximadamente 15 días) (184,185). Esto se debe probablemente al hecho de que una temperatura elevada actúa frente a la *Legionella* libre en el medio acuoso, pero no en el biofilm (186) que es de donde la bacteria vuelve a colonizar la tubería. También se ha visto que las instalaciones que utilizan el choque térmico como método de desinfección tienen menor presencia de amebas en el agua. A pesar de tener como ventaja el no requerir ningún equipamiento especial y de poderse utilizar en casos de urgencia en tiempos rápidos, tiene como desventajas la necesidad de utilizar personal entrenado y de poder producir quemaduras en los pacientes o usuarios. Por todo lo anteriormente comentado, es mejor que sea un método complementario a otros de eficacia continuada.

El choque de cloro consiste en una hipercloración de los circuitos de agua. Se lleva a cabo utilizando agua fría, por lo tanto, también en el caso de los circuitos de ACS se tendrá que enfriar el agua manteniéndola por debajo de 30°C y luego añadir cloro al agua hasta alcanzar los 20-30 ppm y un pH entre 7 y 8. Es importante que en los puntos terminales llegue agua con una concentración de cloro de 1-2 ppm y por al menos 3 horas, después de reestablecer las condiciones normales del circuito. Exactamente como para el choque térmico, también con este método se ha visto una rápida recolonización por parte de *Legionella* al cabo de pocos días (187,188). Esto no ha causado que las bacterias sean más resistentes al desinfectante, pero se ha visto un aumento de amebas en el agua. Además, el sistema de choque de cloro puede dañar las instalaciones al ser corrosivo.

1.7.7 Desinfección y control del riesgo en puntos terminales

Como complemento al control de *Legionella* se pueden utilizar métodos de desinfección terminales que tienen como objetivo el de tratar las partes.

Luz ultravioleta (UV)

Este método tiene efectos biocidas porque es capaz de generar dímeros de timina y citosina en el ADN o de uracilo y citosina en el ARN. Su uso está limitado porque no tiene efectos residuales (189). De hecho, se tiene que poner muy cerca del punto que se quiere tratar. Por el contrario, tiene la ventaja de no alterar las características del agua y no producir compuestos secundarios tóxicos. La luz UV puede tener un rol importante

si se instala en puntos terminales como grifos o cabezales de ducha, o se limitan a un área de desinfección limitada.

Su eficacia ha sido demostrada a través de un estudio de 13 años de duración donde se instaló el sistema de desinfección en las tuberías de un hospital de nuevo uso, es decir, en el que todavía no se había formado el biofilm o forma de *Legionella* intracelular donde parece que la eficacia de la luz UV sea menor. Se tomaron 930 muestras y el cultivo en todas fue negativo, sin encontrarse casos nosocomiales.

Filtración en el punto de uso

La filtración en el punto de uso consiste en la aplicación en los puntos terminales de grifos o duchas de filtros bacterianos de unos 0,2 mm de diámetro de los poros. Son una herramienta muy eficaz, puesto que generan una barrera física al paso de la *Legionella* (190,191). Tienen como desventajas el alto coste, por lo cual no es posible instalarlo en todo el hospital sino solo en áreas concretas (177).

Generalmente se suelen instalar para controlar el ambiente en servicios de alto riesgo donde pueden estar pacientes inmunodeprimidos (190). Es importante la educación y capacitación regular del personal y de los pacientes para evitar contaminaciones retrógradas de la membrana de filtración (192). Dado que su tiempo de uso es limitado, sería útil establecer un correcto método que pueda trazar el proceso.

1.7.8 Otros métodos de desinfección

Los mencionados anteriormente constituyen los métodos de desinfección para el control de legionelosis más frecuentes. Cabe mencionar algunos menos frecuentes que están en fase de estudio.

Ozono

El ozono inactiva la *Legionella* gracias a su capacidad para producir radicales libres de hidróxilo y superóxido. Actúa sobre la permeabilidad, la actividad enzimática y el ADN de las células bacterianas. Su capacidad bactericida no se ha visto afectada por el pH o la temperatura del agua (193,194). El ozono es más efectivo respecto al cloro o al peróxido de hidrógeno. Pero al ser un fuerte oxidante tiene como principal desventaja la falta de acción residual, es corrosivo para los metales y degrada el caucho.

Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno es otro agente oxidante. Tiene la característica de ser insípido, no mutagénico, completamente biodegradable, no tóxico y estable al calor. Se suele utilizar solo o junto a otros sistemas como por ejemplo los iones plata, el ácido peracético o el ozono. Se ha demostrado su eficacia también frente al biofilm de *Legionella* cuando se utiliza junto con el ácido peracético (195). A pesar de su eficacia, se ha objetivado una recuperación de las concentraciones de *Legionella* a los pocos días después del tratamiento (196) aunque no hay muchos estudios de campo. La combinación que parece ser más prometedora es la de peróxido de hidrógeno junto con iones de plata que fue reportada en varios estudios (197,198).

1.8 MARCO TEÓRICO, ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Como ya hemos visto en páginas anteriores, la enfermedad por *Legionella* presenta una tasa de letalidad que puede llegar hasta el 80% especialmente en pacientes con comorbidades, ingresados e inmunodeprimidos (199,200).

Inicialmente se asoció esta patología prevalentemente al turismo y a los viajes. Años más tarde se ha objetivado el problema que esta bacteria puede generar en las estructuras sanitarias. En estas últimas se ha visto que la principal fuente de contagio consiste en el agua sanitaria. Durante muchos años las únicas herramientas disponibles eran el cultivo para el diagnóstico y el control del cloro y la temperatura para su prevención y desinfección.

La *Legionella* representa un reto para los hospitales, especialmente aquellos cuyas instalaciones son antiguas. Aunque la incidencia de las infecciones nosocomiales es baja (201), estas tienen una mayor letalidad a causa de una mayor proporción de individuos con factores de riesgo asociados.

La correcta gestión de la calidad del agua, incluyendo la limpieza y métodos rápidos de análisis de la *Legionella*, son un punto fundamental para prevenir brotes de LD (202,203); pero los resultados actuales dejan bastante que desear. Con el tiempo, la mayoría de los hospitales acabará teniendo las tuberías colonizadas por *Legionella*. Esto puede llegar a afectar directamente a los pacientes ingresados generando casos de legionelosis nosocomial que pueden llegar a difundirse causando brotes. Estos últimos son un claro indicador del mal control del agua (199). La reciente evolución del conocimiento científico sobre la transmisión de la *Legionella* en los centros sanitarios

hace necesario modificar las medidas para responder a la colonización de las redes de distribución del agua de consumo sanitario.

La aparición de nuevas técnicas diagnósticas rápidas debería aumentar la eficiencia en la respuesta preventiva y correctora de la colonización, lo cual obliga a rediseñar las recomendaciones actuales.

La normativa precedente a la actual, el Real Decreto 865/2003, estaba quedando desfasada (204). La nueva norma UNE 100030:2017 (153) ha intentado paliar esa antigüedad del Real Decreto incorporando nuevos requisitos técnicos en la prevención y control de la *Legionella*. Desde enero de 2023 se ha hecho efectivo el nuevo Real Decreto con novedades como el reconocimiento de técnicas diagnósticas alternativas al cultivo para la detección de *Legionella*, el establecimiento de un número de muestras dependiendo del número de puntos terminales de la estructura, o la creación de un PPCL y un PSL (este último especialmente recomendado para estructuras sanitarias).

Desde el punto de vista diagnóstico, el cultivo, primer método utilizado para la detección de *Legionella* y considerado actualmente el método de referencia, tiene tiempos de respuesta muy largos llegando a tardar hasta 8-10 días. Además, hay que tener en cuenta, como se ha explicado en detalle anteriormente, las limitaciones de este método como la infraestimación del nivel de *Legionella* en presencia de flora interferente o por la presencia de formas viables pero no cultivables, a parte de ser un método que requiere precauciones especiales dado el material potencialmente infeccioso que se manipula.

Esta lentitud en el resultado del cultivo hace muy difícil poder detectar variaciones en la carga de *Legionella* en la red de distribución del agua sanitaria que se producen en pocos días, siendo este un problema para la salud de los usuarios.

Las instalaciones de muchos hospitales son viejas, y este factor hace que el material fruto de la corrosión tenga el efecto de inactivar ciertos biocidas y servir como nutriente para la *Legionella*. Esto hace que haya un aumento del riesgo de legionelosis por aumento del número de bacterias en la tubería, junto a una pérdida de detectabilidad de la *Legionella* a causa del efecto enmascarador de la microbiota interferente.

Por todo esto se ve claramente cómo la prueba diagnóstica de la *Legionella* juega un papel esencial en la evaluación del riesgo y en el control del agua en un centro sanitario. El cultivo imposibilita una gestión eficaz del riesgo por todo lo anteriormente expuesto.

El método de separación inmunomagnética (SIM) mejora la recuperación y detectabilidad de la *Legionella* en matrices ambientales, sugiriendo la posibilidad de utilizar este método como un valioso indicador de riesgo. Por lo tanto, puede mejorar significativamente nuestro conocimiento sobre el riesgo de exposición a estas bacterias, lo que nos permitiría implementar estrategias de monitorización y desinfección basadas en la evidencia. A esto se añade el hecho de poder utilizar dicha técnica en un sistema automatizado, denominado Legiolab®, que permite resultados in situ y en línea, pudiendo en todo momento controlar el nivel de contaminación de la red de agua sanitaria por *Legionella*.

El crecimiento de *Legionella* depende de varios factores como, por ejemplo, una dureza y un pH del agua determinados, tuberías antiguas, agua estancada, dificultad de mantener una temperatura elevada adecuada, formación del biofilm, o la distancia de

las tuberías como factor indirecto (205). En particular, las estructuras sanitarias, incluyendo los hospitales, centros de salud, residencias o centros de diálisis, pueden presentar un ambiente de riesgo para el crecimiento de la *Legionella* y, en consecuencia, para la aparición de casos de legionelosis (206,207). La colonización y persistencia de *Legionella* en diferentes ambientes (como sistemas de agua dulce) se ven favorecidas gracias al desarrollo de biofilms. En este sentido, se ha demostrado la relación de brotes de legionelosis con la presencia de estos biofilms en la red de distribución. Por lo tanto, prevenir la formación de biofilms en estos espacios es un factor clave para el control de la presencia de *Legionella* y evitar posibles casos de legionelosis.

Visto la importancia de detectar la presencia de *Legionella* y conocer los factores que determinan su colonización de forma rápida, es necesario que se defina un nuevo estándar de medición no basado en el cultivo y que se desarrollen nuevos métodos diagnósticos que tengan en cuenta los factores de riesgo determinantes de la colonización

Uno de los motivos de esta situación es la dificultad de realizar un número suficiente de cultivos microbiológicos, tanto por la dificultad de la recogida de muestras y coste, como por la complejidad de analizar simultáneamente todos los factores de riesgo. En este contexto la posibilidad de disponer de métodos rápidos como el método de separación inmunomagnética, SIM (Legipid®) y de un sistema automatizado para el análisis en línea de las muestras de agua (Legiolab®) nos brinda la oportunidad para responder a la pregunta planteada: ¿Qué factores independientes y en qué medida son los responsables de la colonización de las redes del agua? De hecho, la evidencia científica disponible hace referencia a unos pocos factores de riesgo, siendo pocos los estudios

que analizan más de cuatro factores de riesgo simultáneamente y ninguno el que los analiza todos.

2. JUSTIFICACIÓN Y PROPÓSITO

La prevención de la legionelosis a nivel nosocomial es un reto para las instituciones. Las consecuencias de su adquisición por parte de la población de alto riesgo en la que se puede agravar su enfermedad de base nos hacen destacarla como prioridad en la prevención hospitalaria y un reto importante para la salud pública.

Existe una gran preocupación por la enfermedad del legionario adquirida en los hospitales como entornos donde poblaciones importantes con mayor riesgo, debido a la edad y / o estado de salud del usuario, pueden estar expuestas, lo que puede resultar en una mortalidad considerable (208).

Para su control es necesario conocer las características de las instalaciones y también los posibles factores de riesgo. Actualmente las medidas universalmente aceptadas para controlar la colonización de la bacteria en las tuberías consisten en utilizar agua caliente sanitaria (ACS) con temperatura de más de 50 °C y en algunos países más de 55°C. Otra medida de uso común es la cloración del agua fría de consumo humano (AFCH).

Además de estas medidas existen otros factores que pueden influir en la presencia de *Legionella* en el agua. Entre ellos se pueden mencionar, por ejemplo, la longitud de la tubería, el período del año, la presencia del biofilm o la presencia de hierro o metales en las tuberías.

Los estudios que analizan dichos factores de riesgo se focalizan en solo algunos de ellos y la mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en estructuras de uso común, es decir, no sanitarias.

De hecho, la complejidad inherente en los sistemas de agua de los grandes edificios, como los hospitales, dificulta la identificación de los factores precisos que desencadenan

la contaminación por *Legionella*, lo que implica efectos interactivos de la temperatura del agua y la frecuencia del flujo (209).

Son escasos los estudios que integran los aspectos de seguimiento de parámetros de control de la bacteria con las características de ingeniería de las instalaciones, que nos remiten en este hospital Clínico Universitario a tuberías muy longevas y a cambios en la adecuación de la temperatura en el agua más recientemente implementados, recogida detallada de puntos de toma de muestras y registro puntual de cloración. La comprensión y estudio de las medidas básicas adoptadas para evitar la proliferación del microorganismo nos permitirá redundar en medidas preventivas basadas en una mejor evidencia científica con conocimiento de los factores de riesgo y los determinantes de colonización por esta bacteria.

La mitigación de la colonización por *Legionella* y la desinfección de los sistemas de agua utilizados en entornos hospitalarios es un factor clave para controlar y prevenir las infecciones asociadas a *Legionella* (11,210). Sin embargo, la monitorización ambiental de *Legionella* también está plagada de dificultades en estos entornos, incluido qué métodos de detección usar y cómo interpretar los datos. Los sistemas de agua se han monitorizado tradicionalmente utilizando métodos basados en cultivos como *gold standard*, que pueden tardar muchos días para detectar el crecimiento, lo que hace imposible tomar decisiones rápidas y puede estar sesgado hacia *L. pneumophila* y algunas otras *Legionella* spp. (211). Además, se sabe que las estrategias de control como por ejemplo la alta temperatura, la cloración o la ionización cobre – plata, provocan que *L. pneumophila* se proteja entrando en un estado viable pero no cultivable (28,29), que no forma colonias visibles en placas, pero pueden infectar diferentes tipos de

macrófagos humanos y amebas (208). Estos inconvenientes también dificultan la identificación de las fuentes de los brotes de LD, que no son infrecuentes a pesar de las regulaciones y directrices que abordan la contaminación por *Legionella* en los sistemas de agua (212,213). Existen métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero su capacidad para diferenciar entre organismos viables y no viables aún está en desarrollo (214). Por lo tanto, es probable que en el futuro se utilicen combinaciones de métodos basados en cultivos con métodos rápidos, no basados en el crecimiento, para ayudar a desarrollar estimaciones de riesgo.

Según los estudios publicados sobre la dinámica y la plasticidad fenotípica de la superficie celular de *Legionella*, la capacidad de *Legionella* para causar LD depende predominantemente de su membrana celular (215). Entre estos hallazgos destacan la importancia de detectar células de *Legionella* en su entorno al considerar su membrana celular como un objetivo analítico. Por lo tanto, utilizamos una técnica de separación inmunomagnética (SIM) basada en la interacción antígeno-anticuerpo a nivel de la membrana celular, lo que hace que este enfoque tenga un alto valor diagnóstico con fines preventivos (155) .

En este estudio se propone un novedoso índice de positividad para *Legionella* basado en la combinación de tres técnicas diferentes (cultivo, PCR e SIM). A partir de este índice se evaluaron diferentes factores asociados a la colonización por *Legionella* en un hospital.

Finalmente cabe destacar que el control de la presencia de la bacteria *Legionella* se continúa haciendo de manera prevalente con la técnica del cultivo microbiológico. Esta

metodología es considerada como *gold standard* para la detección de *Legionella* a pesar de poder contar con otras técnicas de diagnóstico rápido.

Hoy en día no hay estudios que integren todos los posibles factores de riesgo de colonización por *Legionella* en una estructura sanitaria teniendo en cuenta también una posible alternativa diagnóstica al cultivo tradicional.

Todo lo anteriormente expuesto ha llevado a plantear como pregunta genérica de investigación qué factores condicionan la colonización por *Legionella* en los centros sanitarios. A esta pregunta genérica, siguen otras preguntas específicas:

1. ¿Es posible definir un estándar diagnóstico para la determinación de *Legionella* en el agua?
2. ¿Cuál es la efectividad diagnóstica de los métodos rápidos de detección de *Legionella*?
3. ¿Cuál es el riesgo asociado a las distintas variables directas e indirectas en un centro sanitario?
4. ¿Es posible elaborar un indicador predictor del riesgo de colonización del agua por *Legionella* en el ambiente hospitalario?

3. HIPÓTESIS

3.1 HIPÓTESIS

Esta tesis se basa en las siguientes hipótesis:

- Los centros sanitarios tienen riesgo de colonización por *Legionella* y dada la complejidad de las estructuras sanitarias, dicho riesgo depende de múltiples factores.
- El riesgo asociado a la colonización por *Legionella* en un centro hospitalario difiere dependiendo de las distintas variables directas o indirectas de su presencia.
- El estándar diagnóstico actual basado únicamente en el cultivo no es suficiente para definir correctamente el riesgo de colonización por *Legionella*, por lo cual se define un nuevo tipo de estándar diagnóstico basado en un consenso entre resultados de cultivo, prueba rápida y molecular (PCR).
- El método rápido de detección de *Legionella* es efectivo y representa una herramienta valiosa para anticipar actuaciones en caso de colonización de las tuberías por *Legionella*.
- La valoración simultánea de las diferentes variables puede sugerir un nivel de riesgo futuro de colonización del sistema de agua hospitalaria por *Legionella*.

4. OBJETIVOS

El Objetivo general de esta tesis es conocer los factores que condicionan la colonización por *Legionella* en los centros sanitarios teniendo en cuenta la efectividad de las pruebas diagnósticas disponibles.

Los objetivos específicos son:

1. Evaluar la validez del cultivo como estándar diagnóstico para la determinación de *Legionella* en el agua.
2. Evaluar la efectividad diagnóstica de los métodos rápidos de detección.
3. Conocer el riesgo asociado a las distintas variables directas e indirectas presentes en un centro sanitario.
4. Elaborar un indicador predictor del riesgo de colonización del agua por *Legionella* en el ambiente hospitalario.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio de los objetivos de esta tesis, se requiere el análisis de diferentes parámetros en un centro con características especiales. Se considera de interés realizar el estudio en un hospital de tercer nivel, con una población asignada mayor de 200.000 habitantes, que tenga más de 500 camas y una distribución en diferentes pabellones. Además, es importante que en el centro estén presentes todas las especialidades médicas y quirúrgicas. También se ha buscado un centro con una red de distribución del agua antigua para poder estudiar varios factores de riesgo en distintas condiciones.

5.1 CARACTERÍSTICAS DEL CENTRO SANITARIO

Teniendo en cuenta estas consideraciones se plantea el estudio en el hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV). El Hospital Clínico Universitario de Valencia es un centro hospitalario y docente universitario del Sistema Valenciano Público de Salud que pertenece a la Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública (GVA). Es uno de los mayores hospitales de la ciudad de Valencia, capital de la Comunidad Valenciana. Además, es un centro acreditado de tercer nivel de alta especialidad y máxima complejidad, disponiendo de todas las especialidades médico-quirúrgicas. Dispone de un total de 586 camas de hospitalización. El HCUV es el hospital de referencia del departamento de salud Clínico-Malvarrosa.

El Departamento Clínico-Malvarrosa presta asistencia sanitaria a más de 300.000 habitantes, lo que lo convierte en uno de los departamentos con más población de la Comunidad Valenciana. Pertenece a dicho departamento la zona noreste de la ciudad de Valencia, así como varios pueblos de la zona norte de esta ciudad (216).

Según la última memoria disponible, la del año 2020, se efectuaron 22.815 ingresos totales (entre urgentes y programados), con una estancia de 151.777 días totales y una estancia media de 6,7 días. Su índice de ocupación es del 70,9%.

TABLA 2. DATOS DE HOSPITALIZACIÓN DEL HCUV.

Camas dotación	Camas funcionantes	Ingresos Programados	Ingresos Urgentes	Ingresos totales	Estancias	Estancia Media	Índice de ocupación
591	586	7021	15794	22815	151777	6,7	70,9 %

Fuente: memoria del departamento Clínico-Malvarrosa 2020 (217).

El Hospital Clínico Universitario de Valencia es un hospital con 587 camas con una unidad de cuidados intensivos (UCI) médica de 16 camas, que consta de una gran estructura distribuida en 4 pabellones indicados por las letras del alfabeto (A, B, C, D).

Este hospital está relacionado con las primeras etapas de la enseñanza de la medicina proporcionada por la Universidad de Valencia, donde se creó la “Cátedra de Medicina Práctica”. El inicio de su construcción se sitúa en el año 1913, pero es en los años sesenta cuando se empezó a utilizar de manera continua como hospital. Después del incendio del verano de 1986, que destruyó los almacenes del hospital y las Unidades de Hospitalización, se ha acometido una profunda remodelación que acabó en el año 1994. Sus pabellones están distribuidos en dos edificios, en el primero y más cercano a la Universidad de Valencia están los pabellones B y C. En el segundo, los pabellones A y D. El pabellón B cuenta con 6 plantas, el pabellón C con 5 plantas, y los pabellones A y D con 8 plantas cada uno.

En el edificio que comprende los pabellones B y C están los servicios de hospitalización, urgencias, gerencia y dirección médica, UCI, quirófanos, documentación clínica y admisión, medicina preventiva, oncología, cardiocirugía, traumatología, cirugía general, cardiología, medicina interna, psiquiatría, unidad de media-corta estancia (UMCE) y cirugía torácica.

El edificio que comprende los pabellones A y D se divide de esta forma: el pabellón D es de consultas externas, mientras que el pabellón A comprende el laboratorio de análisis clínicos y otras plantas de hospitalización (neumología, pediatría, neurología, neurocirugía, ginecología y obstetricia, y oncología pediátrica) junto con el hospital de día (Figura 12 y 13).

Cabe destacar que cada uno de los dos edificios se extiende también dos pisos por debajo del suelo (teniendo un sótano 1 y un sótano 2), donde se sitúa el servicio de mantenimiento, limpieza, almacén general, aljibes de AFCH, calderas y Pastormaster de ACS.

El servicio de microbiología, farmacia, personal, medicina del trabajo e ingeniería están situados en el edificio de la Universidad de Valencia, que es contiguo al HCUV.



FIGURA 11. FOTOS DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA

Fuente: página web del departamento Clínico-Malvarrosa (218).

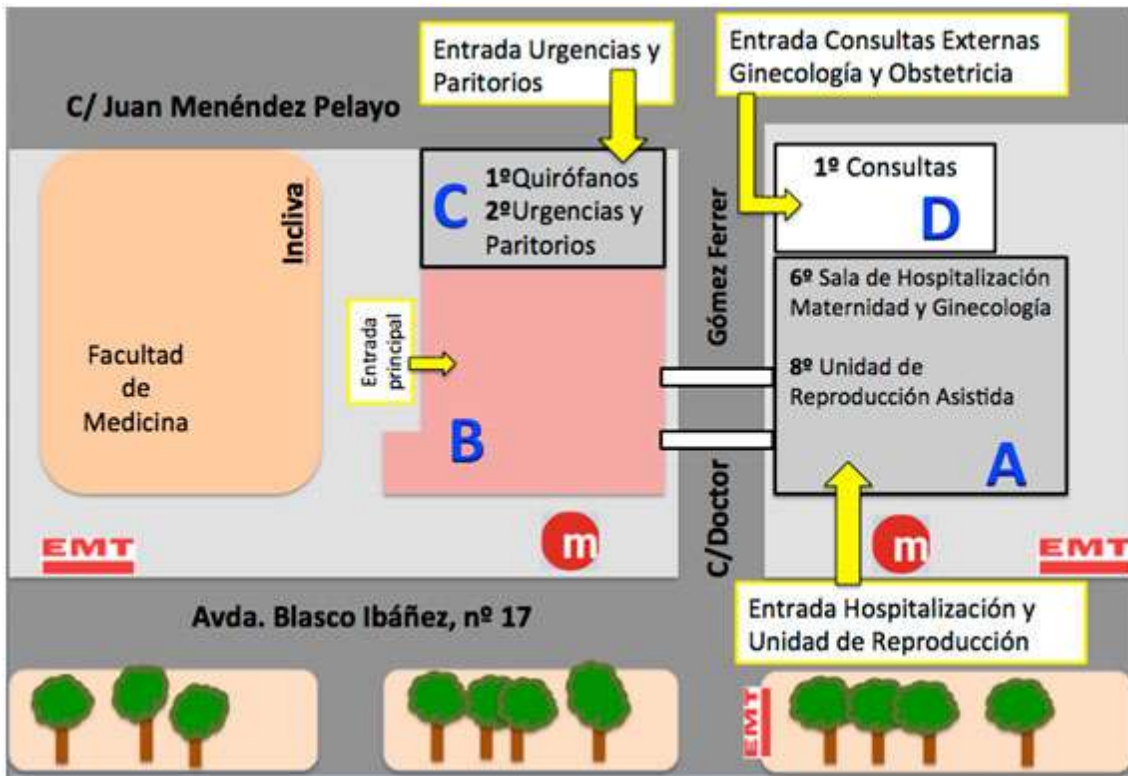


FIGURA 12. ESQUEMA DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA. (219)

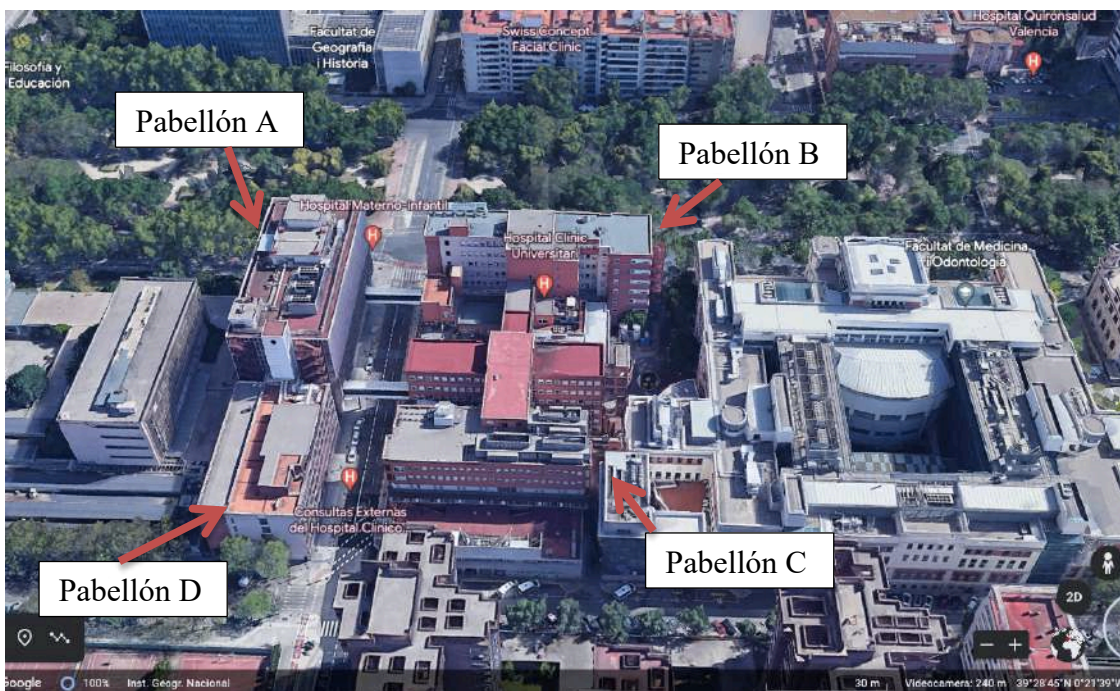


FIGURA 13. VISTA AÉREA DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA.

Fuente: Inst. Geogr. Nacional. (2023). Valencia, España. [Imagen satelital]. Google Earth.
<https://earth.google.com/web/@39.47935832,-0.36166947,18.64593553a,305.4083991d,35y,-161.2706007h,43.50081762t,0r>.

5.2 LA RED DE AGUA SANITARIA

Inicialmente, en los años previos al estudio, en el hospital Clínico se utilizaban acumuladores para almacenar el agua caliente sanitaria. Estos han dado varios problemas de acúmulo de residuos de hierro y posible fuente de colonización y dispersión de *Legionella*. Por lo tanto, se decidió eliminarlos y utilizar un circuito continuo de ACS donde el agua caliente sale de las calderas, pasa a través de un sistema de pasteurización en continuo, recorre todas las tuberías principales del hospital y luego vuelve a las zonas de las calderas para volver a ser calentada. Es decir, hay una constante circulación de ACS en las tuberías principales. Y desde allí el ACS va a los ramales terminales para ser utilizada.

Cabe destacar que hay dos puntos de almacenaje de AFCH y de ACS, uno por cada edificio. Los pabellones A y D tienen un aljibe, calderas y una red de distribución de agua diferentes a los pabellones B y C. Tanto los aljibes como las calderas están situados en los sótanos de cada edificio. En cada edificio hay dos circuitos, uno para el agua fría y el otro para el agua caliente. Estos circuitos tienen como punto de partida los sótanos, suben hasta la última planta de sus respectivos edificios y luego bajan. El circuito de ACS vuelve otra vez al punto de partida para garantizar una circulación constante del agua y evitar que esta se enfríe. El agua fría por el contrario no vuelve al interior de los aljibes y no hay circulación constante. Simplemente sale de los aljibes para su uso.

El agua fría procede de la red de distribución municipal y se acumula en los aljibes. Estos últimos no solamente funcionan da acumulador de agua, sino que tienen un sensor de pH y de cloro. Este sensor funciona de manera que mientras que el agua se está acumulando viene corregida llevando el pH cercano a 7 y corrigiendo el nivel de cloro.

El HCUV cuenta también con un sistema de pasteurización en continuo del agua caliente sanitaria, Figura 14. Necesita una conexión con el sistema de calderas para alcanzar la temperatura de pasteurización del agua que es de aproximadamente 150°C. El sistema permite al agua alcanzar una temperatura de 70°C y mantener esta temperatura durante un mínimo de tres minutos.



FIGURA 14. SISTEMA DE PASTEURIZACIÓN DEL ACS INSTALADO EN EL HCUV.

Pastormaster® (Physis Development, S.L.)

5.3 DISEÑO DEL ESTUDIO

5.3.1 Evaluación de la validez del cultivo como estándar diagnóstico para la determinación de Legionella en el agua y evaluación de la efectividad diagnóstica de los métodos rápidos de detección.

Para responder a los objetivos específicos 1 y 2 se usó un diseño transversal para utilizar técnicas de evaluación de pruebas diagnósticas.

5.3.2 Conocer el riesgo asociado a las distintas variables directas e indirectas presentes en un centro sanitario y elaboración de un indicador predictor del riesgo de colonización del agua por Legionella en el ambiente hospitalario.

Para responder a los objetivos específicos 3 y 4 se ha diseñado un estudio de tipo observacional de casos y controles.

Definición de caso: puntos de la red de distribución del agua que presenten una carga de *Legionella* > 99 UFC/L (unidades formadoras de colonias/ litro).

Definición de control: puntos de la red con una carga de *Legionella* < 100 UFC/L.

5.4 METODOLOGIA

5.4.1 Evaluación de pruebas diagnósticas

Para esta parte del estudio que comprende los objetivos 1 y 2 se ha procedido a la toma de muestras de agua de los puntos terminales como grifos y duchas.

Se ha procedido al análisis de cada muestra con el método de cultivo y con el método rápido de la SIM. Además, se utilizó la PCR para discriminar los resultados que eran dudosos. Estas muestras fueron analizadas por dos laboratorios y evaluadas por parte de tres microbiólogos. Esto ha permitido la propuesta de un nuevo estándar diagnóstico. Los resultados del cultivo y la SIM se han utilizado para determinar la efectividad de los métodos rápidos en términos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

El criterio para definir una positividad o negatividad frente a *Legionella* en el nuevo estándar fue el resultado del consenso de tres microbiólogos considerando conjuntamente los datos de todas las muestras analizadas por cultivo, PCR y SIM. Una muestra de agua se consideraba positiva para *Legionella* spp. si cumplía al menos uno de los siguientes criterios: (i) recuento de cultivo, no menos de $100 \text{ UFC} \cdot \text{L}^{-1}$ informado por al menos un laboratorio; (ii) resultado de SIM, no menos de $300 \text{ UFC}_{\text{eq}} \cdot \text{L}^{-1}$ informado por al menos un laboratorio; (iii) resultado positivo de SIM informado por todos los laboratorios; (iv) resultado positivo de SIM informado por al menos un laboratorio, si la PCR es positiva.

La muestra de agua se consideraba negativa para *Legionella* spp. cuando se cumplía al menos uno de los siguientes criterios: (i) recuento de cultivo menor a $100 \text{ UFC} \cdot \text{L}^{-1}$

informado por al menos un laboratorio, incluso si la PCR fue positiva; (ii) un recuento de cultivo inferior a $100 \text{ UFC} \cdot \text{L}^{-1}$ informado por todos los laboratorios.

La sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) se calcularon comparando el método SIM con el método de cultivo (método de referencia actual). Además, estas medidas también se obtuvieron comparando la SIM y el método de cultivo con el índice de positividad de *Legionella* como nuevo *gold standard*. Estos resultados se han reflejado mediante el uso de una tabla 2x2

TABLA 3. CLASIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS DE UN ESTUDIO DE EVALUACIÓN SOBRE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Resultado prueba diagnóstica	Resultado según prueba diagnóstica de referencia		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	a	b	a+b
Negativa	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	N

Se recogieron un total de 204 muestras de agua en 68 puntos de muestreo diferentes (suelos y pabellones) del Hospital Clínico Universitario de Valencia, en enero, mayo y octubre de 2017. De estas, 102 (50%) eran agua fría y 102 (50%) eran agua caliente. Los lugares muestreados incluyeron agua fría y caliente del grifo, la entrada de agua potable al edificio, tanques de almacenamiento, puntos de distribución y puntos de uso (regaderas, grifos de baño) que están cerca y lejos de los puntos de distribución. Las muestras de agua se recolectaron en áreas donde los pacientes podrían estar expuestos al contagio, excluyendo áreas como reservorios y acumuladores de agua en el sótano

del hospital. Los sitios de muestreo fueron seleccionados al azar de entre aquellos que habían tenido colonización por *Legionella* en los últimos tres años (Anexo II).

5.4.2 *Análisis de los factores de riesgo*

Para realizar el estudio se ha procedido a la toma de muestras de agua en los puntos críticos de un hospital de referencia, de manera que se hayan considerado las diferentes condiciones de la red de distribución del agua, espaciales y temporales. Se analizaron tanto los puntos terminales como el circuito principal. Las muestras se analizaron microbiológicamente mediante cultivo y métodos rápidos. En todos los puntos de muestreo se ha analizado la presencia de *Legionella* en la red y se ha cuantificado los niveles de cada variable incluida en el estudio, lo que ha permitido estimar el riesgo relativo (OR) simple y ajustado mediante análisis multivariante, asociado a cada variable del estudio.

Se recogieron un total de 136 muestras de agua en 42 puntos de muestreo diferentes del HCUV en el periodo febrero 2020 - abril 2021. De estas, 79 (58,1%) eran de agua fría y 57 (41,9%) de agua caliente sanitaria. Se muestrearon puntos terminales (pilas y duchas) y puntos de las tuberías centrales que aportan el agua a estos puntos terminales (Anexo II y Anexo III). También para esta segunda fase se seleccionaron los puntos al azar entre aquellos que habían tenido una colonización por *Legionella* más elevada en los últimos años.

Se analizó si las diferentes variables a estudio tenían diferencias en positividad por *Legionella*, pudiéndose de esta manera considerar como factores de riesgo o como

factores protectores. Para ello se utilizaron test estadísticos conformes al tipo de variables (cualitativa vs cualitativa, cualitativa vs cuantitativa, si es paramétrica o no paramétrica) y que se ha detallado en el capítulo correspondiente (análisis estadístico). Por último, los factores de riesgo de colonización por *Legionella* se ajustaron mediante análisis de regresión logística sobre variables dicotómicas.

5. 5. TOMA DE MUESTRAS Y ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Para contestar a los objetivos específicos 1 y 2 (“Evaluar la validez del cultivo como estándar diagnóstico para la determinación de *Legionella* en el agua” y “Evaluar la efectividad diagnóstica de los métodos rápidos de detección”), se recogieron muestras en botellas estériles de 3 litros directamente de la salida del punto terminal. Antes del muestreo, se insertó un hisopo estéril en las salidas de los grifos y se giró presionando la superficie interior dos veces en el sentido de las agujas del reloj y hacia arriba y hacia abajo dos veces para desalojar el sedimento.

La recolección de agua se diseñó para proporcionar simultáneamente: (i) muestras de agua que fueran representativas en la medida de lo posible del estado global del sistema de agua, incluido el sedimento extraído para compensar al menos parcialmente el efecto de dilución, y (ii) un volumen de muestra de agua suficiente para aplicar diferentes técnicas para la determinación de *Legionella* en porciones de agua lo más equivalente posible para cada punto de muestreo.

La temperatura de cada muestra de agua se registró en el momento de la recolección de la muestra. Cada muestra de 3 litros se dividió inmediatamente en porciones iguales de 1 litro y se distribuyeron al laboratorio 1 y al laboratorio 2, ambos laboratorios acreditados por la Entidad Nacional de Acreditación Española (ENAC) según la norma UNE-EN ISO/IEC 17025. Las porciones se distribuyeron a temperatura ambiente en botellas de plástico de polipropileno con tapón de rosca de boca ancha estériles de 1 litro que contenían tiosulfato de sodio, protegidas de la luz solar, dentro de las 4 horas posteriores al momento de la recolección.

El análisis de *Legionella* se realizó dentro de las 24 horas posteriores a la recolección. Cada laboratorio analizó una porción de 1 litro para *Legionella spp.* utilizando tanto un

cultivo estándar realizado de acuerdo con las recomendaciones del método estándar internacional ISO 11731:1998 (Calidad del agua - Detección y enumeración de *Legionella*) (220) como la SIM (Legipid® *Legionella* Fast Detection Test, Biótica, España). El laboratorio 2 analizó otra porción de 1 litro de agua para *Legionella spp*, utilizando, además de las dos anteriores, la técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (IELAB, Alicante, España).

Para contestar a los objetivos específicos 3 y 4 (“Conocer el riesgo asociado a las distintas variables directas e indirectas presentes en un centro sanitario” y “Elaborar un indicador predictor del riesgo de colonización del agua por *Legionella* en el ambiente hospitalario”), se ha mantenido invariado el procedimiento de toma de muestra y análisis. Los cambios en esta fase han sido que solo se ha recogido 1 litro de agua para cada punto terminal. Se recogió más de una muestra de agua tanto fría como caliente por cada punto terminal para estudiar diferencias en las varias horas del día.

Otro aspecto diferente es que solo se han enviado las muestras para ser analizadas a un laboratorio.

Para el análisis del circuito en un principio se ha procedido a instalar *in situ* el sistema Legiolab®, una máquina automatizada que permite un análisis rápido de la presencia de *Legionella* basado en la tecnología de la separación inmunomagnética (Legipid®) con la finalidad de obtener un resultado y detección de *Legionella* en tiempo real. Sucesivamente, a causa de la pandemia de SARS-CoV-2 que afectó a esta segunda fase del estudio, no se ha podido cambiar de ubicación la máquina para que pudiese medir en tiempo real los varios puntos del hospital. Por tal razón, se ha procedido a la recogida

de muestras de un litro de agua con metodología post-flush aplicando de todas formas la misma tecnología rápida que la máquina.

Los tipos de puntos de recogida de muestras fueron:

Puntos terminales y tubería

Para tomar la muestra, se tomó como referencia lo definido por la norma UNE 100030:2017 como “pre-flush”, es decir, sin dejar correr el agua (153). Esto consiste en recoger el primer flujo de agua. Es útil cuando se quiere establecer el riesgo que se tiene al usar este punto terminal.

Circuito

Para tomar la muestra, se tomó como referencia lo definido por la norma UNE 100030:2017 como post-flush (dejando correr el agua) (153). Consiste en dejar que el agua fluya durante unos minutos al fin de poder recolectar el agua originaria de la tubería principal. Cuando se quiere recoger el ACS con este método, se considera que sea de las tuberías cuando ha alcanzado el límite máximo de temperatura. El “post-flushing” viene utilizado para analizar el estado de las tuberías o para comprobar si un determinado tratamiento de desinfección ha sido eficaz.

En cada muestra se ha procedido a la identificación y registro del número identificativo del punto terminal muestreado, tipo de instalación, fecha y hora de la toma de muestras, temperatura del agua, temperatura ambiente y humedad relativa del ambiente.

Las muestras se enviaron al laboratorio para su análisis en las primeras 48 horas tras su recogida. Las muestras que llegaron el mismo día de la toma se han transportado a

temperatura ambiente protegidas de la luz solar y evitando temperaturas extremas, en caso contrario, se han conservado refrigeradas (entre 2 y 8 °C). Las muestras de agua caliente se han refrigerado inmediatamente después de ser tomadas.

5.5.1 Cultivo

El tratamiento de las muestras y el cultivo estándar de *Legionella* se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del método estándar internacional ISO 11731:1998 (Calidad del agua - Detección y enumeración de *Legionella*) (220), basado en el procedimiento de filtración y cultivo de bacterias en medios selectivos. Brevemente, se filtró un litro de cada muestra a través de un filtro de membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 0,4 µm (Millipore, Madrid, España); este tamaño de poro es conveniente para retener las células de *Legionella* presentes en las muestras ambientales y evita la obstrucción del filtro. A continuación, el filtro se retiró asépticamente y se colocó en un tubo de 100 mL que contenía 15 mL de diluyente estéril (Biótica, Castellón, España). Posteriormente, las bacterias se resuspendieron mediante agitación tipo vórtex durante 2 minutos.

Las muestras concentradas se sembraron directamente en placas (100 µL) en medios BCYE α + GVPC que contenían antibióticos (agar *Legionella* GVPC, código 43032; Biomerieux, Francia) para enumerar las colonias de *Legionella* (CFU). Todas las placas se incubaron a 36 ± 2 °C hasta 10 días en condiciones aerobias y atmósfera humidificada. Las colonias se contaron después de 1, 3, 5, 7, 8, 9 y 10 días. Las colonias lisas que mostraban un color amarillento o, a veces, amarillo verdoso o blanco grisáceo se contaron como legionelas sospechosas a confirmar. Se subcultivaron entre 5 y 7 colonias

sospechosas de ser positivas para *Legionella* en agar BCYE (sin antibióticos) (Biomérieux) y agar sangre (alternativamente podemos usar agar BCYE sin L-cisteína) para su confirmación (agar Columbia + 5% sangre de caballo, código 43050; Biomérieux, Francia). Las colonias aisladas que crecen solo en agar BCYE pero no en agar sangre se consideraron colonias de *Legionella*. Los resultados se expresaron en UFC·L⁻¹ y el límite de cuantificación del procedimiento fue de 50 UFC·L⁻¹. No se realizaron más pruebas confirmatorias, como inmunofluorescencia directa o indirecta y aglutinación en látex, para colonias dependientes de cisteína.

5.5.2 SIM

Nueve mililitros de cada muestra concentrada como se describió anteriormente se agregaron a una cubeta para ser analizada por el método SIM (Legipid[®] *Legionella* Fast Detection Test; Biótica, España). Brevemente, se añade una suspensión de microesferas magnéticas que llevan anticuerpos anti-*Legionella*. Si en las muestras a analizar está presente la bacteria, las microesferas se unirán a ella a través de los anticuerpos formando así un complejo *Legionella*/microesferas. Sucesivamente, dichos complejos se separan a través de un imán (separación inmunomagnética), se lavan y se resuspenden. Finalmente, estos complejos se incuban con un anticuerpo frente a *Legionella* conjugado con un enzima en grado de ser marcado. Los complejos bacteria/microesferas se visualizan colorimétricamente después de un lavado y tras añadir los sustratos enzimáticos.

5.5.3 PCR

Cada muestra de agua de 1 litro se mezcló agitándola y se filtró a través de un filtro de membrana de policarbonato de 0,2 μm de diámetro de poro (Millipore). A continuación, se retiró el filtro de membrana y se colocó en 10 mL de solución estéril libre de RNasa y DNasa y se usó 1 mL para la extracción de ADN con un kit comercialmente disponible (DNeasy Blood & Tissue Kit, código 69504; Qiagen, Hilden, Alemania). El ADN se eluyó en 200 μL de tampón de elución (suministrado en el kit). Los ensayos de PCR se llevaron a cabo con un kit comercialmente disponible (*Legionella* spp. qPCR Quantitative Detection Kit, código 992402; ielab, Alicante, España). La mezcla comercial contenía cebadores específicos para *Legionella* spp. TaqMan Universal Master Mix, sondas fluorescentes, IPC (control positivo interno: ADN plasmídico). A 15 μL de la mezcla de reacción se añadieron: 10 μL de matriz de ADN; 10 μL de agua libre de nucleasas (control negativo); 10 μL de control positivo: 6 diluciones sucesivas de control positivo (una cepa de *Legionella pneumophila*) a la concentración inicial de 1×10^6 unidades de genoma/ μL . Todas las muestras se ensayaron mediante repeticiones de 3 veces. Los resultados se leyeron con el uso de la pendiente estándar proporcionada por el productor (los puntos de pendiente fueron: 100.000, 10.000, 1.000, 100, 10, 1). La amplificación comprendió: 50°C, 2 minutos; 95°C, 10 minutos; 42 ciclos, cada uno compuesto por: 95 °C, 15 s y 60 °C, 1 min. La cuantificación el límite era 480 GU·l⁻¹.

5.5.4 Análisis físicos y químicos

Todos los análisis físicos y químicos del agua se determinaron en el momento de la toma de muestras.

Se analizó la temperatura del agua y el cloro libre residual (método DPD, colorimétrico), la conductividad, la humedad relativa y la dureza total como estará especificado en el apartado correspondiente a continuación y en el Anexo III.

5.6 VARIABLES A ESTUDIO

5.6.1 Selección de las variables a estudiar y preparación de recogida de información

Tras revisar la literatura (221–226) se identificaron los factores de riesgo conocidos o que potencialmente pueden condicionar la presencia de *Legionella* en el agua, se seleccionaron los factores de riesgo en función del grado de recomendación y nivel de evidencia científica(227).

Tras identificar los factores de riesgo que condicionan la colonización por *Legionella* se seleccionaron las variables a estudiar en función de la evidencia y factibilidad de recogida y la posibilidad de recoger la información de las variables en el mismo momento o que requieran varios muestreos en un mismo punto.

5.6.2 Selección de puntos de muestreo.

Se seleccionaron los puntos de mayor riesgo teniendo en cuenta:

- a) La experiencia de muestras microbiológicas recogidas en el hospital durante los 5 años anteriores.
- b) La inclusión de los diferentes factores a estudiar.
- c) Características de las variables que obliguen a modificar los puntos de muestreo para su registro. Mientras que hay variables que se pueden medir en todos los puntos (cloro, temperatura), otras requieren cambios de los equipos para la medición en línea; es el caso del tipo de agua (ACS o AFCS), o del punto de muestreo (ducha o pila).

5.6.3 Variables de resultado o de respuesta:

- **Presencia de Legionella** detectada mediante cultivo y Legipid[®].

Para cultivos: la muestra de agua es recogida en una botella de 1 litro y llevada al laboratorio.

Para Legipid[®]: como para el cultivo o directamente de la máquina en el punto donde estará instalada.

La carga de *Legionella pneumophila* se analizará utilizando dos tipos requeridos según los diferentes estudios y test:

- De tipo continuo, con resultado en Unidad Formadora de Colonias/ litro (UFC / L).
- Dicotómica (presencia de *Legionella* sí/no). Donde por presencia se entiende un valor de UFC >100 (con valores inferiores no se considera colonización, aunque para considerar los controles los resultados deberán ser totalmente negativos).
- Cualitativa: carga de *Legionella* baja (<100 UFC/L), media (>100 - <1000 UFC/L), alta (>1000 UFC/L).

5.6.4 Variables explicativas

Variables estructurales:

- Tipo de agua: se define como la diferencia entre agua caliente sanitaria (ACS) y agua fría de consumo humano (AFCH).

Variable cualitativa dicotómica (ACS / AFCH). Se eligieron puntos terminales de agua fría de consumo humano y de agua caliente sanitaria representativos de la situación del hospital.

- Punto de muestreo: se define como la selección de puntos terminales elegidos para el estudio.

Variable de tipo cualitativa politómica (varios puntos). Se midieron seleccionando aquellos puntos con un riesgo de tener *Legionella* con carga más elevada, teniendo en cuenta las muestras de los años anteriores.

- Distancia: se define como la longitud de la tubería medida en metros.

Variables cuantitativas (metros de longitud por cada punto de muestreo). Se midió la distancia en metros a partir del punto inicial (aljibe para el AFCH, acumulador/Pastormaster para ACS) hasta el punto terminal de recogida de muestras. Se hará uso de planos de las tuberías del hospital proporcionados por el servicio de Ingeniería.

- Planta: se define como la planta del hospital donde está situado el punto terminal.

Variable cuantitativa ordinal (1ª, 2ª, 3ª, etc.). Se consideró la planta del hospital Clínico Universitario donde estará ubicado el punto terminal.

- Estancamiento: se define como agua estancada en un determinado punto del recorrido de la tubería.

Variable de tipo cualitativa dicotómica (agua estancada sí /no). Se consideró si el agua recogida desde los puntos terminales tiene un recorrido tal para producir estancamiento en algún punto de las tuberías. Se contó con el apoyo del servicio de Ingeniería del hospital.

Métodos de desinfección

- Biocidas (cloro): presencia de la sustancia de cloro en el agua de los puntos terminales.

Variable cuantitativa. Niveles de cloro medidos en partes por millón (ppm) o mg/L por cada muestra tomada. Se utilizó los niveles de cloro medidos diariamente por el servicio de mantenimiento y se añadieron mediciones de cloro por cada toma de muestra del mismo punto en el mismo día.

- Temperatura: temperatura del agua en los puntos de muestreo terminales.

Variable cuantitativa (grados centígrados por cada muestra tomada). Se utilizó los valores de temperatura medidos diariamente por el servicio de mantenimiento y se añadieron mediciones por cada toma de muestra del mismo punto en el mismo día.

- PH: valor del pH del agua.

Variable cuantitativa (valor de pH por cada punto de muestra tomado). Se utilizó los valores de pH medidos diariamente por el servicio de mantenimiento y se añadieron mediciones de este por cada toma de muestra del mismo punto en el mismo día.

Variables ambientales:

- Hora del día: hora del día en el cual se toma la muestra.

Variable de tipo cualitativo (hora definida en hora y minutos por cada muestra).

Se consideró un número de cuatro muestras por cada día en los siguientes horarios: 8.00, 12.00, 16.00, 20.00.

- Período del año: el período del año en el cual se toman las muestras

Variable de tipo cualitativo (estaciones del año). Se registró el período del año diferenciando entre invierno, primavera, verano y otoño.

- Temperatura ambiente: variable cuantitativa medida en grados centígrados. Se trata de la temperatura del ambiente donde se toma la muestra de un determinado punto terminal en el momento de la toma.
- Humedad relativa: variable cuantitativa (expresada en %). Se trata del valor de humedad relativa del ambiente donde se toma la muestra de un determinado punto terminal en el momento de la toma.

Otras variables:

- Tipo de recogida: se define como el tipo de recogida de la muestra de agua desde el punto de muestreo terminal, manual o con la máquina.

Variable dicotómica cualitativa:

Recogida manual: llenar una botella de 1 litro de agua directamente del punto de muestreo deseado.

Recogida con la máquina: la máquina recoge y filtra el agua. El agua filtrada puede ser utilizada directamente para el test Legipid® en la misma máquina y de forma automática. También es posible recoger dicha agua filtrada y llevarla a un laboratorio donde se puede hacer el Legipid®, cultivo, PCR, etc. (esto ahorraría el proceso de filtración del agua en el laboratorio).

- Frecuencia de uso: se expresa como variable dicotómica (frecuente/ no frecuente) en base al uso diario /semanal del punto. Para que se considere un punto de uso frecuente tiene que ser utilizado con una frecuencia de más de 5 minutos al día o de más de 35 minutos a la semana.
- Conductividad: variable cuantitativa (expresada en μS). Se trata del valor de conductividad del agua del punto terminal donde se toma la muestra en el momento de la toma.
- Dureza total: variable cuantitativa (expresada en FR°). Se trata del parámetro de dureza total del agua del punto terminal donde se toma la muestra en el momento de la toma.
- Material de la tubería: variable cualitativa (PPR/hierro galvanizado). Se trata del material del que está compuesta la tubería de la red de distribución final que lleva al punto terminal de la toma de muestra.

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para las muestras de agua, temperatura, puntos de muestreo y resultados de cultivo se hizo un estudio descriptivo. Para ello, las variables cualitativas se expresaron como porcentaje mientras que las variables cuantitativas se expresaron mediante la media aritmética más desviación estándar (si la distribución fue normal), el uso de la mediana más los percentiles 25 y 75 para distribuciones no normales.

Para contestar a los objetivos específicos (de 1 a 4), se utilizó el software IBM SPSS Statistics 21.0 y el software R statistics versión 4.2.1. Se realizó un análisis estadístico univariado, bivariado y multivariado. Se calcularon las razones de probabilidad (OR) y los intervalos de confianza (IC) considerando estadísticamente significativa la probabilidad (p) menor de 0,05, es decir con un nivel de confianza del 95%, para evaluar las variables de riesgo categóricas asociadas con la positividad de *Legionella*. Para llevar a cabo el análisis bivariado se utilizó la prueba de Chi-cuadrado y/o la prueba exacta de Fisher para variables cualitativas. La prueba exacta de Fisher se utilizó como alternativa a la prueba de independencia de Chi-cuadrado cuando no se tenía una distribución normal o uno o más de los recuentos de celdas en una tabla de 2×2 era menor que 5. Para variables cualitativas versus cuantitativas se comprobó inicialmente si la distribución era normal o no paramétrica a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnoff. Sucesivamente se utilizó la prueba t de Student, considerando el análisis de varianza según la prueba de Levene, para variables continuas. Si las variables no tenían distribución normal se utilizó la prueba correspondiente para variables con distribución no paramétrica (test de Mann-Whitney).

Finalmente, se aplicó la regresión logística binaria para realizar el ajuste multivariado de los factores de riesgo.

5.7.1 Análisis aplicado para los objetivos específicos.

Para el objetivo específico 1 (Evaluar la validez del cultivo como estándar diagnóstico para la determinación de *Legionella* en el agua) se utilizó la técnica diagnóstica clásica (cultivo) y una rápida (Legipid®). La comparación entre ambas técnicas se hizo mediante la prueba Chi-cuadrado y/o la prueba exacta de Fisher. De igual manera se consideró también la comparación de dichas técnicas con el nuevo estándar propuesto.

Para el objetivo específico 2 (Evaluar la efectividad diagnóstica de los métodos rápidos de detección) se utilizaron técnicas de evaluación de pruebas diagnósticas. Cada prueba ha sido evaluada en términos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. Sucesivamente se compararon los resultados de cada método diagnóstico.

Para el objetivo específico 3 (Conocer el riesgo asociado a las distintas variables directas e indirectas presentes en un centro sanitario) se estudiaron las diferencias de resultados en término de presencia o ausencia de *Legionella* en función de cada variable y se realizó un análisis bivariante y multivariante donde el riesgo de obtener una carga determinada bacteriana en función de un factor se ajustó por los potenciales factores de confusión (regresión logística).

Para el objetivo específico 4 (Elaborar un indicador predictor del riesgo de colonización del agua por *Legionella* en el ambiente hospitalario) se realizó un análisis de regresión logística que permitió establecer la relación de diferentes factores de riesgo analizados

con los resultados obtenidos (UFC). A partir de la regresión logística multivariante se creó un indicador predictor de riesgo, utilizando como valor constante el valor de la regresión logística. A cada factor de riesgo se le ha asignado un valor numérico. Las variables cualitativas se definieron con numeración 0 en caso de un evento, 1 en caso del sucesivo...Por ejemplo, en caso del uso frecuente del punto se le dio un 0 al uso poco frecuente y 1 al uso frecuente. Sucesivamente cada variable se multiplica por un factor que es el correspondiente que ha resultado del modelo multivariante de regresión logística. Finalmente, se obtiene una fórmula predictora de riesgo de colonización por *Legionella* en las tuberías de un centro sanitario.

Tanto para el objetivo 3 como para el objetivo 4 se estudiaron las variables en agua fría y en agua caliente por separado. Sucesivamente se estudiaron conjuntamente.

6. RESULTADOS

6.1 EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS (CULTIVO Y PRUEBAS RÁPIDAS)

Para contestar a los objetivos 1 y 2 se recogieron un total de 204 muestras de agua en 68 puntos de muestreo diferentes (suelos y pabellones) del Hospital Clínico Universitario de Valencia, en enero, mayo y octubre de 2017. De estas, 102 (50%) eran de agua fría y 102 (50%) eran de agua caliente.

6.1.2 Elaboración del patrón de referencia (gold standard)

En primer lugar, se analizó la existencia de posibles diferencias en términos de resultados entre los distintos laboratorios. Sucesivamente se pasó a averiguar si hubo diferencias entre el método del cultivo y la SIM en cuanto a ofrecer más o menos resultados positivos frente a *Legionella* comparados con un nuevo estándar (véase apartado sucesivo). Los resultados no mostraron diferencias significativas ni entre los dos laboratorios ni entre el cultivo y el método SIM (Tabla 4), lo que indica que estos métodos fueron equivalentes en términos de positividad para *Legionella* y también de acuerdo con los resultados de la validación informada (228). Los laboratorios 1 y 2 reportaron tasas de positividad de 33,82 % y 32,35 %, respectivamente.

TABLA 4. COMPARACIÓN ENTRE LABORATORIOS Y MÉTODOS

	n (%)	Test exacto de Fisher	<i>p</i>
Laboratorio			
Ambientalys	70 (34,3)		
Iproma	134 (65,7)		0.417
Método			
Cultivo	116 (56.9)		
SIM	88 (43.1)		0.463

TABLA 5. COMPARACIÓN DEL NUEVO ESTÁNDAR CON EL CULTIVO Y LA SIM

Muestra de agua	Método diagnóstico	Prev + Mét (%)	Prev + N. Est (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VVP (%)	VPN (%)
			55				
Total	SIM	35		61,4	91,1	89,7	65,1
	Cultivo	33		78,9	100	100	68,3
			32				
Fría	SIM	17		40,9	93,9	75,0	77,5
	Cultivo	18		50,0	100	100	80,7
			76				
Caliente	SIM	51		69,0	83,3	93,5	43,5
	Cultivo	48		63,8	100,0	100,0	46,8

Prev+ Mét: prevalencia de resultados positivos en cada método; Prev+ N.Est: prevalencia de resultados positivos en el nuevo estándar; VG: valor global; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Analizando en detalle tanto el cultivo como la SIM en comparación con el nuevo estándar propuesto (Tabla 5), vemos que la prevalencia de resultados positivos fue del 55% en el nuevo estándar, mientras que fue del 35% en la SIM y del 33% en el cultivo. La SIM obtuvo una sensibilidad del 61,4%, una especificidad del 91,1%, un valor predictivo positivo del 89,7% y un valor predictivo negativo del 65,1%. El cultivo obtuvo una sensibilidad del 78,9%, una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo del 68,3%.

En agua fría la prevalencia de resultados positivos fue del 32% con el nuevo estándar mientras que fue del 17% con la SIM y del 18% con el cultivo. La SIM obtuvo una sensibilidad del 40,9%, una especificidad del 93,9%, un valor predictivo positivo del 75% y un valor predictivo negativo del 77,5%. El cultivo obtuvo una sensibilidad del 50%, una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo del 80,7%.

En agua caliente sanitaria la prevalencia de resultados positivos fue del 76% con el nuevo estándar mientras que fue del 51% con la SIM y del 38% con el cultivo. La SIM obtuvo una sensibilidad del 69,0%, una especificidad del 83,3%, un valor predictivo positivo del 93,2% y un valor predictivo negativo del 43,5%. El cultivo obtuvo una sensibilidad del 63,8%, una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo del 46,8%.

La SIM y el cultivo se compararon con el índice de positividad de *Legionella* como un nuevo estándar diagnóstico para muestras de agua fría y caliente (Tabla 5). En general, encontramos una sensibilidad similar para estos dos métodos, aunque más alta para el método SIM en agua caliente. En comparación con el cultivo, la menor especificidad de la SIM probablemente se deba a bacterias *Legionella viables pero no cultivables* en el agua. El rendimiento de la SIM como método de rutina para la determinación rápida de *Legionella* spp en aguas era aceptable.

6.1.3 Evaluación de la prueba rápida (SIM)

TABLA 6. ANÁLISIS DE LA SIM COMPARADA CON EL CULTIVO

Método de referencia	Método diagnóstico	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VVP (%)	VPN (%)
Cultivo	SIM				
	Total	70,8	73,9	55,6	82,9
	Agua Fría	40	87,8	25	93,5
	Agua caliente	78,9	51,2	41,7	84,6

Los resultados al evaluar la efectividad del método rápido (SIM) en comparación con el cultivo (actualmente considerado de referencia) se pueden ver en la tabla 6. Esta muestra que la sensibilidad de la SIM en comparación con el cultivo (gold standard actual) fue del 70,8 %, la especificidad del 73,9 %, el valor predictivo positivo (VPP) del 55,6 % y el valor predictivo negativo (VPN) del 82,9 %. Si segregamos los resultados por tipo de agua, vemos que en el agua fría la sensibilidad es del 40%, la especificidad del 87,8%, el valor predictivo positivo del 25%, el valor predictivo negativo del 93,5%. Por otra parte, en agua caliente tenemos una sensibilidad del 78,9%, una especificidad del 51,2%, un valor predictivo positivo del 41,7% y un valor predictivo negativo del 84,6%. Resumiendo, en este estudio la sensibilidad aumentó en agua caliente (78,9 %) mientras que la especificidad aumentó en agua fría (87,8 %).

6.2 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA COLONIZACIÓN POR *LEGIONELLA*

6.2.1 Estudio descriptivo

Para contestar a los objetivos específicos 3 y 4 se recogieron un total de 136 muestras de agua en 42 puntos de muestreo diferentes del HCUV en el periodo febrero 2020 - abril 2021. De estas, 79 (58,1%) eran de agua fría y 57 (41,9%) de agua caliente sanitaria.

TABLA 7. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS EN EL ESTUDIO.

<i>Objetivos específicos</i>	<i>N. muestras tomadas</i>	<i>AFCH</i>	<i>ACS</i>
1 y 2	204	102 (50%)	102 (50%)
3 y 4	136	79 (58,1%)	57 (41,9%)
Totales muestras	340	181 (53,24%)	159 (46,76%)

6.2.2 Análisis bivariante

TABLA 8. ANÁLISIS BIVARIANTE DE LOS FACTORES ASOCIADOS CON LA COLONIZACIÓN POR *LEGIONELLA* EN AGUA FRÍA

	n (%)	OR	95% CI		p
Período del año					
Otoño	40 (50,64)	1			
Invierno	18 (22,78)	2,692	0,668	10,847	0,164
Primavera	9 (11,39)	5,600	1,114	28,143	0,036
Verano	12 (15,19)	2,333	0,467	11,649	0,302
Frecuencia de uso					
Frecuente	20 (40)	1			
No Frecuente	30 (60)	21,714	2,568	183,634	0,005
Distancia (longitud)					
		1,000	0,980	1,020	0,983
Cloro en AFCH					
		0,066	0,015	0,281	0,000
Temperatura					
		0,954	0,867	1,049	0,327
Estancamiento					
Estancada	24 (30,38)	1			
No estancada	55 (69,62)	0,041	0,010	0,170	0,000
Hora del día					
20 h	24 (30,38)	1			
8 h	20 (25,32)	1,041	0,284	3,818	0,952
12 h	11 (13,92)	0,911	0,185	4,476	0,908
16 h	24 (30,38)	0,106	0,012	0,941	0,044
pH					
		8,343	0,586	118,746	0,117
T. ambiente					
		0,945	0,677	1,317	0,737
Humedad relativa					
		0,996	0,941	1,054	0,883
Conductividad					
		0,994	0,982	1,006	0,332
Dureza total					
		1,079	0,970	1,200	0,161
Material tubería					
PPR	12 (15,19)	1			
Hierro	67 (84,81)	0,481	0,126	1,847	0,287
Galvanizado					

TABLA 9. ANÁLISIS BIVARIANTE DE LOS FACTORES ASOCIADOS CON LA COLONIZACIÓN POR *LEGIONELLA* EN AGUA CALIENTE

	n (%)	OR	95% CI		p
Período del año					
Otoño	28 (49,12)	1			
Invierno	21 (36,84)	0,66	0,183	2,372	0,524
Primavera	8 (14,04)	0,704	0,118	4,198	0,700
Distancia (longitud)		1,008	0,988	1,029	0,432
Temperatura		0,942	0,892	0,995	0,034
Estancamiento					
Estancada	22 (38,60)	1			
No estancada	35 (61,40)	0,014	0,002	0,122	0,000
Hora del día					
20 h	16 (28,07)	1			
8 h	5 (8,77)	4,667	0,457	47,629	0,194
12 h	18 (31,58)	5,600	0,974	32,198	0,054
16 h	18 (31,58)	2,000	0,314	12,745	0,463
pH		0,874	0,010	75,082	0,953
T. ambiente		0,932	0,546	1,591	0,797
Humedad relativa		1,094	0,983	1,217	0,099
Conductividad		1,009	0,988	1,032	0,396
Dureza total		0,969	0,871	1,078	0,564

TABLA 10. ANÁLISIS BIVARIANTE DE LOS FACTORES ASOCIADOS CON LA COLONIZACIÓN POR *LEGIONELLA*

	n (%)	OR	95% CI		p
Período del año					
Invierno	39 (28,676)	1			
Primavera	17 (12,5)	1,582	0,448	5,382	0,464
Verano	12 (8,824)	0,967	0,187	4,032	0,964
Otoño	68 (50)	0,752	0,298	1,942	0,547
Pabellón					
A	27 (19,9)	1			
B	31 (22,78)	0,833	0,229	3,028	0,782
C	66 (48,52)	0,939	0,365	2,638	0,900
D	12 (8,8)	0,571	0,076	2,915	0,530
Tipo de asistencia					
Hospitalaria	102 (75)	1			
Ambulatoria	34(25)	3,949	0,990	15,754	0,052
Planta					
-2	48 (35,3)	1			
1	17 (12,5)	1,325	0,392	4,227	0,639
2	15 (11)	0,607	0,125	2,277	0,488
4	12 (8,8)	0,486	0,069	2,154	0,388
5	17 (12,5)	0,152	0,008	0,860	0,081
7	12 (8,8)	0,221	0,012	1,304	0,166
8	15 (11)	1,619	0,467	5,389	0,434
Punto de muestreo					
Ducha	33 (24,3)	1			
Pila	53 (39)	1,212	0,491	3,079	0,679
Máquina	50 (36,8)	0,833	0,012	0,343	0,002
Frecuencia de uso					
Frecuente	57 (66,3)	1			
No Frecuente	29 (33,7)	7,933	2,047	30,752	0,003
Tipo de agua					
Agua caliente	57 (41,9)	1			
Agua fría	79 (58,1)	0,703	0,318	1,554	0,380
Rango de Temperatura					
<25	76 (55,9)	1			
25-50	46 (33,8)	2,520	0,822	7,729	0,106
>50	14 (10,3)	7,8	1,786	34,070	0,006
Distancia (longitud)		1,002	0,988	1,017	0,733
Cloro		0,219	0,075	0,555	0,003
Cloro en AFCH		0,066	0,134	0,257	0

TABLA 10. ANÁLISIS BIVARIANTE DE LOS FACTORES ASOCIADOS CON LA COLONIZACIÓN POR *LEGIONELLA*

	n (%)	OR	95% CI	<i>p</i>	
Temperatura		0,966	0,924	1,003	0,093
Temperatura ACS		0,942	0,887	0,992	0,034
Estancamiento					
No estancada	90 (66,2)	1			
Estancada	46 (33,8)	36,676	12,565	136,287	0,000
Hora del día					
8 h	25 (18,4)	1			
12 h	29 (21,3)	1,299	0,423	4,103	0,649
16 h	42 (30,9)	0,287	0,077	0,987	0,052
20 h	40 (29,4)	0,617	0,199	1,920	0,399
pH		2,992	0,351	24,913	0,309
T. ambiente		0,966	0,734	1,268	0,801
Humedad relativa		1,012	0,965	1,060	0,609
Conductividad		0,997	0,990	1,004	0,395
Dureza total		1,027	0,952	1,106	0,487
Material tubería					
PPR	69 (50,7)	1			
Hierro Galvanizado	67 (49,3)	0,590	0,261	1,299	0,195

Elementos estructurales como plantas, pabellón y longitud de las tuberías

Se analizaron las diferentes plantas y la longitud de las tuberías como posibles factores determinantes para la colonización por *Legionella*. En nuestros análisis no se ha visto asociación significativa entre las diferentes plantas ni las diferentes longitudes de las tuberías que tenían los puntos terminales. La longitud de la tubería se consideró como una variable de ajuste. Tampoco se ha visto una correlación significativa entre los diferentes pabellones del hospital (Tabla 11).

Analizando el diferente material de la tubería no se ha visto tampoco diferencias en aumentar o disminuir de manera significativa el riesgo de colonización.

Variabilidad horaria/temporal

Se registró la **estación del año** (primavera, verano, otoño e invierno) y tampoco se vio una diferencia significativa (Tabla 11).

También se registró la **hora del día** en la que se tomaron las muestras. En ninguna hora se ha visto una diferencia estadísticamente significativa ($P > 0,05$), aunque la hora 16 se asoció con un menor riesgo de colonización por *Legionella* (OR=0,287, IC de 95% = 0,077 a 0,987, $P = 0,052$).

La asistencia sanitaria ambulatoria se asoció significativamente con un mayor riesgo de colonización por *Legionella* (OR = 3,949, IC del 95% = 0,990 a 15,754, $P = 0,052$).

Analizando los **puntos de muestreo**, no se encontró diferencias entre la pila y la ducha. Por el contrario, las muestras de agua recogidas directamente desde la tubería central se asociaron a una disminución del riesgo de colonización por *Legionella* respecto al agua recogida desde la ducha o la pila (Tabla 11).

El uso poco frecuente de los puntos terminales supone un riesgo de colonización por *Legionella* (OR= 7,933, IC 95% = 2,047 a 30,752, $P < 0,05$). De manera que el uso frecuente del punto terminal supone una protección frente a la *Legionella* (Tabla 11).

Elementos físicos-químicos.

La **temperatura** es un factor protector por cada grado de aumento de temperatura en el agua, especialmente en ACS ($P < 0,05$).

De la misma manera, el **cloro** supone un factor protector frente a la colonización por *Legionella*, especialmente en AFCH ($P < 0,05$).

Una temperatura del agua > 50°C se asoció positivamente con un riesgo de colonización por *Legionella* (Tabla 11).

Durante la fase 2 se hizo un estudio del factor de riesgo “estancamiento”. El agua que ha estado estancada en punto de su recorrido antes de salir por el punto terminal donde se tomó la muestra, tiene un riesgo de hasta 36 veces de colonización por *Legionella*.

Por último, el análisis de los factores pH, temperatura ambiente, humedad relativa, dureza total y conductividad no se han relacionado con un cambio estadísticamente significativo en el riesgo de colonización por *Legionella*.

Considerando por separado el agua fría y el agua caliente, podemos ver cómo en AFCH el cloro es un factor protector mientras que el uso poco frecuente del punto terminal sigue siendo un factor de riesgo. También son factores de riesgo la estación primaveral, el agua estancada y la hora de recogida por la tarde (16H).

Considerando el agua caliente sanitaria vemos cómo tiene una mayor importancia el punto de muestreo (tanto la pila como la ducha son factores de riesgo respecto a la tubería central donde el agua está constantemente circulando), el estancamiento y la temperatura (cada grado de aumento de temperatura supone una mayor protección frente a *Legionella*).

6.2.3 Análisis multivariante

TABLA 11. REGRESIÓN LOGÍSTICA MÚLTIPLE DE LOS FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON LA CONTAMINACIÓN POR LEGIONELLA.

	OR	95% CI		p
Cloro	0,030	0,002	0,419	0,009
Distancia	0,969	0,918	1,016	0,209
Frecuencia Uso				
Frecuente	1			
No frecuente	11,822	1,386	100,844	0,024
Hora del día				
8 h	1			
12 h	0,160	0,007	2,151	0,200
16 h	0,0395	0,001	0,516	0,027
20 h	0,064	0,002	0,946	0,076
Material tubería				
PPR	1			
Hierro galvanizado	7,992	1,896	15,547	0,028
Período del año				
Invierno	1			
Primavera	0,0676	0,001	2,3	0,162
Verano	0,0419	0,00039	1,781	0,13
Otoño	1,127	0,157	8,566	0,904
Punto muestreo				
Ducha	1			
Pila	4,181	0,748	3,065	0,123
Máquina	XXX	XXX	XXX	XXX
Rango temperatura				
<25°C	1			
25-50°C	0,112	0,013	0,66	0,025
>50°C	0,615	0,037	10,1	0,734
Tipo de agua				
Agua caliente	1			
Agua fría	0,806	0,078	9,525	0,856

Los factores de riesgo incluidos en el modelo de regresión fueron cloro, distancia, frecuencia de uso, hora del día, material de la tubería, período del año, punto de muestreo, rango de temperatura y tipo de agua.

El cloro (OR = 0,030, IC = 0,002 a 0,419, P <0,05) se comporta como factor protector. El estudio indicó que el uso poco frecuente del punto terminal (OR = 11,822, IC = 1,386 a 100,844, P <0,05) se asoció con un mayor riesgo de colonización por *Legionella*.

La distancia no se relacionó significativamente con un aumento del riesgo de positividad, así como las diferentes estaciones del año en las cuales se ha tomado muestras. Sin embargo, la diferencia de material de la tubería se correlaciona con un aumento de riesgo de positividad: una tubería de hierro galvanizado es más probable que se llegue a colonizar por *Legionella* respecto a una de PPR.

Con las variables ajustadas en un único modelo, se ha visto diferencias significativas entre pila y duchas en términos de riesgo de colonización por *Legionella* (Tabla 14).

Las 16 horas del día fue un factor protector frente a positividad por *Legionella* (OR= 0,0395, IC= 0,001 a 0,516, P= 0,027).

En el ajuste del modelo, el tener una tubería de hierro galvanizado supone un riesgo muy elevado de colonización por *Legionella* en las tuberías.

La temperatura del agua, tanto fría como caliente, supone un factor de protección si se sitúa entre 25 y 50 grados (OR= 0,112, IC= 0,013 a 0,66, P= 0,025), mientras que no hay diferencia en el tipo de agua fría o caliente.

El análisis multivariado mostró que, si los suministros de agua caliente no se usaban diariamente, el riesgo de colonización por *Legionella* era más de once veces mayor (OR: 11,822, IC del 95% = 1,386 a 100,844).

No ha sido posible calcular el modelo de análisis multivariante por separado para el AFCH y para el ACS debido al escaso tamaño muestral de cada una de estas variables.

Se analizaron los puntos de ACS de uso frecuente comparados con la temperatura del agua de estos. Se ha visto que los puntos terminales de uso poco frecuente (NFU) presentaron un mayor porcentaje de temperatura del agua inferior a 50 °C que los puntos de uso frecuente (FU). Ninguno de estos puntos NFU presentó una temperatura superior a 55°C, a diferencia de los puntos terminales FU (fig. 15). La temperatura promedio en los puntos terminales de poco uso fue de 41,92 °C, mientras que en los de uso frecuente fue de 48,06 °C.

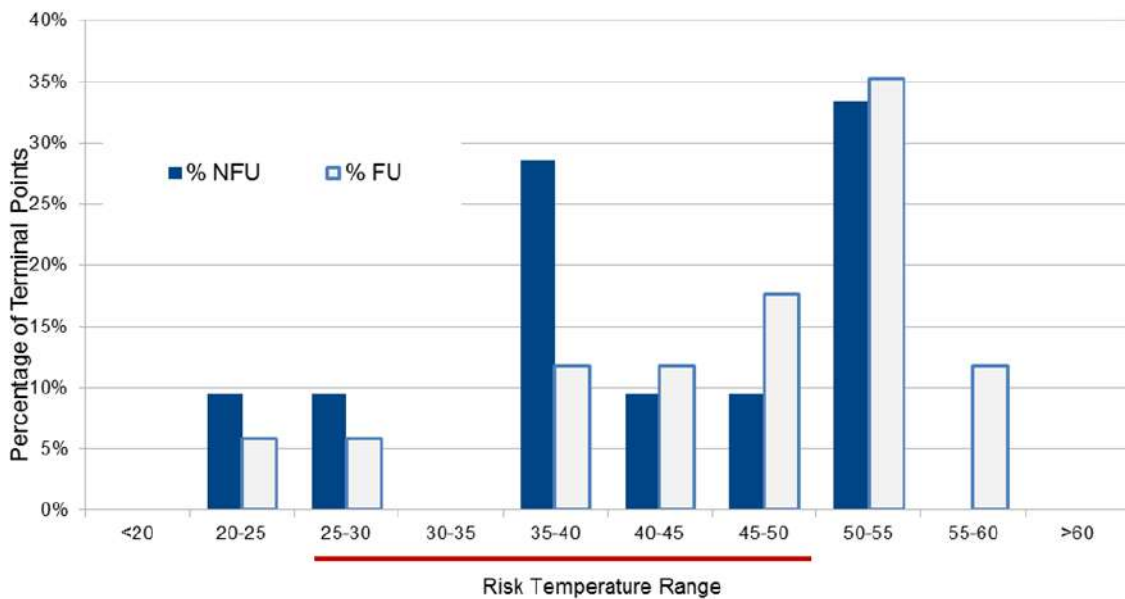


FIGURA 15. RANGO DE TEMPERATURA DEL AGUA CALIENTE EN DIFERENTES PUNTOS TERMINALES.

Porcentaje de puntos terminales en un rango de temperatura determinado (NFU: no se usa con frecuencia, FU: se usa con frecuencia)

6.2.4 Indicador predictor de riesgo

Después de analizar los factores de riesgo de colonización por *Legionella* conjuntamente a través de una regresión logística, se propuso una ecuación predictora de riesgo en la instalación.

Puntuación de riesgo (PR) = 5,358 + (-7,707x(Cloro libre))+(-5,754x(Frecuencia de uso))+(-3,232x(16horas del día))+(-2,191x(rango temperatura 25-50°C)).

La predicción de riesgo (PrR) se obtuvo de la siguiente forma:

$$\text{PrP} = \text{Exp}(\text{PR}) / (1 + \text{exp}(\text{PR})).$$

7. DISCUSIÓN

7.1 CONSIDERACIONES GENERALES

Hasta la fecha, este estudio es el primero que evalúa diferentes factores de riesgo de colonización del agua en un centro sanitario por parte de *Legionella*. Muchos estudios evaluaron algunos factores de riesgo, pero casi todos en ambiente doméstico, privado o de hostelería. Una estructura sanitaria es, por una parte, semejante a un complejo turístico, pero por otra parte tiene muchas peculiaridades que imposibilitan su comparación con este. Por ejemplo, el hecho de tener pacientes ingresados, entre ellos personas inmunodeprimidas, que a menudo pueden necesitar de intervenciones invasivas con liberación de aerosoles que hace que aumente el riesgo de posibles infecciones por *Legionella* si las tuberías están contaminadas. Hay que tener en cuenta también que muchas veces estos pacientes están ingresados por un número elevado de días.

Otra característica peculiar de este estudio es que se ha querido evaluar la eficacia del cultivo como método estándar de diagnóstico de *Legionella* en el agua. El avance de la tecnología también en el campo del diagnóstico de laboratorio ha hecho que se hayan desarrollado metodologías innovadoras y rápidas. Una de ellas es la SIM. Con este estudio se ha querido proponer y valorar un nuevo estándar diagnóstico basado en este método rápido, comparando este último con el clásico método de cultivo microbiológico.

Todo ello ha llevado a desarrollar un indicador predictor del riesgo de colonización por *Legionella* en el agua de un centro sanitario.

7.2 EVALUACIÓN DEL CULTIVO Y PROPUESTA DE UN NUEVO ESTÁNDAR DIAGNÓSTICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE *LEGIONELLA* EN EL AGUA

Hasta donde sabemos, este estudio es el primero en presentar pruebas hospitalarias para *Legionella* para examinar los factores de riesgo asociados con la colonización de esta bacteria mediante la definición de un índice de positividad de *Legionella* que combina tres técnicas analíticas diferentes (cultivo, PCR y SIM). Analizar el agua para detectar la presencia de *Legionella* puede ser un componente importante de la gestión del riesgo de enfermedad del legionario en un hospital (139,229). Estudios previos han descrito una baja sensibilidad (59 %) y especificidad (74 %) frente a *Legionella* cuando se utilizaba el método de la prevalencia del 30% de puntos positivos (230). Las técnicas basadas solo en la medición de resultados positivos para *Legionella* por cultivo pueden no corresponder con la situación de riesgo real de los sistemas de tuberías porque las condiciones estresantes para el crecimiento de *Legionella* en las mismas pueden influir en su no detección por dichos métodos. La *Legionella* en un estado viable pero no cultivable no debe descuidarse al evaluar el riesgo de *Legionella* durante la vigilancia ambiental nosocomial (231).

El análisis de la tasa de positividad entre el nuevo índice proporcionado y el cultivo ha evidenciado resultados interesantes. Considerando la temperatura del agua que está en el rango entre 20 y 50°C, se ha visto cómo el nuevo índice proporcionó más tasas de positividad de *Legionella* (51,56 %) respecto al cultivo (26,56 %). Un resultado similar se obtuvo analizando las temperaturas más elevadas (> 50°C), donde se encontró una tasa de positividad del 88,00 % con el nuevo índice respecto a un valor del 54,15 % proporcionado con el cultivo (Figura 15). Estos hallazgos sugieren la presencia de células de *Legionella* viables pero no cultivables (232,233), cuya detección mediante este nuevo

índice permitiría anticipar la necesidad de un adecuado tratamiento de limpieza y desinfección. Esto es debido a que la técnica de la separación inmunomagnética (SIM) es más sensible en detectar estas formas viables pero no cultivables. Estas, como ya se ha comentado, no se pueden aislar por cultivo clásico, pero son todavía capaces de causar enfermedad.

Demostramos que la positividad de *Legionella* se estima mejor con el nuevo índice de positividad de *Legionella* (tasa de positividad del 55%) que solo con los datos de cultivo (tasa de positividad del 33 %). Para cualquier punto de muestreo dado, el índice es positivo si el cultivo es positivo (31,09 % de los puntos de muestreo) o si es negativo pero la SIM y la PCR son positivas (23,94 % de los puntos de muestreo). El índice se utilizó para ayudar a resolver dos deficiencias en la evaluación de la positividad de *Legionella*, a saber: (1) subestimación de la presencia y concentración de *Legionella spp.* por el método basado en cultivo porque la mayoría de las células de *Legionella* podrían permanecer en un estado viable pero no cultivable (VBNC), y (2) del mismo modo, las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) no pueden diferenciar células vivas versus muertas (no viables) o ADN libre, por lo que el número de *Legionella* podría estar sobreestimado (234). De particular interés es que los altos porcentajes de las poblaciones de *Legionella* en los sistemas de agua no pueden crecer en un medio de cultivo convencional (235).

Estos hallazgos sugieren que el verdadero nivel de colonización de *Legionella* probablemente puede ser subestimado por cultivo y sobreestimado por qPCR. Además, no hay consenso en cuanto a la concentración que causará LD (231). Por lo tanto, se implementó una técnica de SIM basada en la interacción antígeno-anticuerpo a nivel de la membrana celular. Como los antígenos relacionados con la virulencia residen

principalmente en la membrana celular, esta interacción permite incorporar el efecto de integridad de la membrana, ya demostrado al examinar el efecto de biocidas sobre *Legionella* en otros estudios (229).

De acuerdo con otros estudios (236), nuestras observaciones sugieren que se debe considerar el uso de métodos que no conlleven la realización de un cultivo a la hora de examinar los factores de riesgo como determinantes de la colonización por *Legionella* en el agua hospitalaria, para reducir la exposición potencial de los pacientes a estas bacterias. Nuestro índice puede ayudar a evitar que muchos hospitales pasen por alto la existencia de un riesgo real o que asignen recursos innecesarios para hacer frente a un riesgo insignificante.

Especialmente después de reconocer a la *Legionella* como un posible patógeno que causa la coinfección entre los pacientes con COVID-19 (237) se debe recomendar una monitorización más sensible de *Legionella* y un lavado de los puntos terminales como estrategia de descolonización de *Legionella*.

Los resultados obtenidos sugieren que el método de la separación inmunomagnética puede ser utilizado como prueba de rutina, de acuerdo con estudios previos (74). El método de la SIM se centra en capturar aquellas bacterias que presentan antígenos accesibles, muchos de ellos relacionados con la virulencia, en la membrana exterior (4,155). Esto permite un enfoque de alto valor diagnóstico porque la SIM no puede detectar ADN de células muertas y puede detectar estados viables pero no cultivables (VBNC), que podrían ser potencialmente infecciosos. Por lo tanto, los resultados de este estudio y de estudios previos (238) sugieren que la SIM puede ser útil para prevenir casos y brotes de enfermedad del legionario. Además, su tecnología puede ser utilizada

también en el seguimiento de brotes especialmente por su rapidez en ofrecer los resultados.

7.3 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA COLONIZACIÓN POR *LEGIONELLA* EN EL AGUA DE UNA ESTRUCTURA SANITARIA

Durante todo el trabajo de esta tesis se analizaron diferentes posibles factores de riesgo de colonización por *Legionella* del agua sanitaria tanto fría como caliente.

Como ya se ha visto en estudios previos realizados en instalaciones residenciales, la erradicación completa de *Legionella* spp. parece improbable (9,239). Los factores que contribuyen en la permanencia de la bacteria en el agua, especialmente en el entorno sanitario, son las redes y tuberías grandes, muchas veces antiguas y complejas, caracterizadas en varios puntos de su recorrido por la presencia de ramales sin salida, materiales inadecuados y, a veces, tuberías corroídas. Estos factores pueden contribuir a promover la colonización por *Legionella* en los puntos críticos donde el desinfectante no alcanza una concentración efectiva contra la bacteria. Muchos estudios también llegan a nuestro mismo resultado al considerar la estacionalidad como un factor de riesgo no significativo para la colonización por *Legionella* en un hospital (240). Además, no se ha asociado un riesgo considerando los meses del año o las estaciones. Estas observaciones sugieren que la colonización por *Legionella* probablemente sea constante durante todo el año, lo que indica la importancia de la higiene del agua en las instalaciones hospitalarias.

A nivel de la estructura hospitalaria en nuestro estudio no se ha visto una asociación directa con un mayor riesgo de colonización. Tener el punto terminal en un piso más o menos alto, estar en un pabellón u otro, o tener una distancia de la tubería mayor respecto a otros puntos terminales no se ha visto que incremente el riesgo de positividad por *Legionella*. Por el contrario, hay estudios realizados en entornos residenciales que observan cómo la distancia, es decir, la longitud de la tubería se

comporta como un factor de riesgo para la colonización por *Legionella* (241). El hecho de utilizar un entorno residencial hace que las condiciones de base sean distintas. Un ambiente hospitalario tiene dinámicas y variables que se desarrollan de manera distinta respecto a un edificio residencial, por lo tanto, difícilmente comparables.

Un factor importante a tener en cuenta en un entorno sanitario es la frecuencia de uso de cada punto terminal. Previamente se informó de una alta colonización por *Legionella* en el punto de uso que no se usa a diario (210). De acuerdo con este hallazgo, encontramos que el uso poco frecuente de puntos terminales se asoció positivamente con la colonización de *Legionella* en agua caliente. Por lo tanto, el uso menos frecuente de puntos terminales puede desempeñar un papel en la colonización persistente y el desarrollo de casos clínicos. Nuestros resultados indican que todos los puntos terminales dentro del edificio del hospital, como grifos y cabezales de ducha, deben abrirse regularmente para evitar la colonización por *Legionella*, probablemente debido al estancamiento del agua y la consiguiente formación del biofilm.

De hecho, se ha visto cómo el agua estancada sea un factor de riesgo para el crecimiento de la bacteria (242,243). No obstante, hasta la fecha no se había contextualizado este factor de riesgo en la práctica diaria de un centro sanitario.

Todos los factores de riesgo estudiados que conllevan una reducción del flujo de agua, simulando casi un estancamiento, aumentaron el riesgo de que el resultado dé positivo para *Legionella*.

En nuestro estudio, en el análisis bivariado, hemos visto cómo el factor de riesgo estancamiento está significativamente relacionado a una positividad para la bacteria en el agua. Pero al ajustar todas las variables en un análisis multivariante a través de la

regresión logística se ha visto cómo el estancamiento pueda actuar como factor de confusión por presentarse junto con la frecuencia de uso y el tipo de punto de muestreo. De hecho, un punto que se use poco frecuentemente conlleva que el agua en el interior de las tuberías se quede estancada y aumente el riesgo de colonización por *Legionella*. Al mismo tiempo, el riesgo de colonización por *Legionella* aumenta en la pila y ducha que son puntos donde el agua no fluye si se quedan cerrados. Este hallazgo pone en evidencia que las muestras de agua tomadas directamente desde la tubería central que tiene un flujo más constante tienen menos riesgo de favorecer la colonización por *Legionella* en su interior (244).

Nuestro estudio ha intentado averiguar si también existen cambios en las diferentes horas del día en un mismo día. El hecho de tener un menor riesgo de colonización a las 16h puede sugerir que después de una mañana entera el agua ha ido circulando, evitando estancarse o reducir su flujo en las tuberías.

La circulación del agua es un factor muy importante a tener en cuenta. Este último supone que el agua fría que circule con frecuencia también reduce su temperatura en la red de distribución y especialmente en épocas cálidas. El agua caliente tiene su sistema de circulación en la red de distribución principal, pero es importante un uso frecuente del punto terminal para garantizar que el ramal terminal no sufra un enfriamiento del agua (233).

En este escenario, la frecuencia de uso de puntos terminales debe considerarse como uno de los determinantes más importantes para la colonización por *Legionella* en los centros de salud.

Los protocolos de desinfección del agua utilizados en el hospital incluyen control térmico, cloración y muestreo de *Legionella*.

Un resultado importante se ha visto también en la temperatura del agua como parámetro importante de monitorización y factor de riesgo que puede favorecer el crecimiento de *Legionella*. De hecho, hay estudios previos que han evaluado la temperatura del agua caliente sanitaria en un hospital (74,173). Según los autores, una temperatura del ACS superior a 50°C no es suficiente para reducir el riesgo de colonización por *Legionella*. Ellos afirman que es importante intentar mantener una temperatura mayor de 55°C. Nuestros hallazgos respaldan la importancia de mantener el agua caliente sanitaria a una temperatura superior a 50 °C (74,173). Además, en el análisis bivalente para el ACS se ha visto como cada aumento de un grado de temperatura del agua supone una protección frente a *Legionella*.

7.4 ELABORACIÓN Y PROPUESTA DE UN MODELO PREDICTOR DEL RIESGO DE COLONIZACIÓN DEL AGUA POR *LEGIONELLA* EN UN AMBIENTE HOSPITALARIO

Después de considerar y analizar todos los posibles factores de riesgo y comparar el método del cultivo con un nuevo estándar basado también en una nueva metodología (SIM), se ha querido elaborar un modelo que pudiera predecir el riesgo de colonización por *Legionella* del agua sanitaria.

El análisis multivariado de los factores de riesgo relevantes para la colonización de la red de distribución del agua sanitaria por *Legionella* ha demostrado que cuando los factores de riesgo se ajustan entre ellos el peso de cada uno difiere respecto a considerarlos por separado.

En la literatura existen estudios que analizan diferentes factores de riesgo de positividad a *Legionella* en el agua sanitaria y en edificios de uso residencial (205,245). Hasta la fecha no se ha encontrado un estudio que analizara posibles factores de riesgo conjuntamente en un solo modelo como en nuestra investigación.

Dependiendo del diseño del estudio y de los ajustes de varios factores hay estudios que han mostrado resultados que no coinciden con los nuestros, como por ejemplo el hecho de considerar el agua caliente como factor de riesgo de positividad por *Legionella* (246), aunque están de acuerdo en considerar hospitales antiguos como fuentes más frecuentes de *Legionella* en las tuberías.

El factor que tiene más peso en reducir el riesgo de colonización es la cloración del agua (especialmente en agua fría). Mientras que el uso poco frecuente de un punto terminal es el que más riesgo conlleva.

Según nuestra investigación, en una estructura sanitaria es importante que el agua esté bien clorada, que se use frecuentemente el punto terminal y que las tuberías sean controladas y se usen materiales nuevos.

Por cada unidad de cloro que baja respecto a los valores de normalidad, el riesgo aumenta 33,34 veces. El uso poco frecuente de los puntos terminales aumenta el riesgo 11,822 veces. El uso de una tubería de hierro aumenta el riesgo casi 8 veces.

Un dato interesante es el aumento de riesgo según el material de la tubería. El Ministerio de Sanidad y varios artículos (247–255) han estudiado el tipo de material de las tuberías para establecer una posible relación con el aumento de *Legionella*. El acero tiene la ventaja de una simple y sencilla instalación permitiendo tuberías de grandes diámetros, pero tiene al mismo tiempo la desventaja de una posible pérdida de carga en la red al producirse la corrosión de la misma o calcáreos en el depósito interior además de una mayor facilidad para la corrosión galvánica que conlleva a un aumento de proliferación y formación del biofilm (256).

En la tubería de agua fría que se queda estancada puede que aumente la temperatura, especialmente en los períodos más cálidos del año llevando a una situación favorable para el crecimiento y colonización por parte de *Legionella* de ese tracto de tubería. Con un uso frecuente del punto terminal esto no ocurriría porque el continuo flujo del agua enfriaría otra vez la tubería.

El mismo concepto se puede aplicar al ACS. De hecho, solo en la red de tuberías centrales el agua caliente está en circulación, garantizando una temperatura superior a los 50º constantemente. Pero esto no ocurre en los tramos finales antes del punto terminal suponiendo un riesgo de positividad. De la misma manera que con el AFCH, un uso frecuente del punto terminal garantiza que en el ramal final el agua esté por un tiempo

mayor a una temperatura superior a 50º y ralentiza el proceso de colonización de las tuberías.

Hay que considerar que este indicador está diseñado para considerar el riesgo de colonización teniendo en cuenta el nuevo estándar.

De todos modos, es interesante cómo este estudio, aunque considere muchos posibles factores de riesgo, tenga implicación en la práctica de mantenimiento y prevención rutinaria aplicando sencillas medidas y controlando finalmente unos pocos factores de riesgo. Estos factores de riesgo mencionados anteriormente son los que tienen más importancia en predecir una posible colonización de las tuberías por *Legionella*.

La ecuación que se ha generado a partir del análisis multivariante de los factores de riesgo puede constituir una herramienta de gran utilidad a la hora de establecer el riesgo de colonización de un determinado punto terminal por *Legionella*.

7.5 TRASFERENCIA DE LOS RESULTADOS

Este estudio tiene implicaciones prácticas directas. Los resultados obtenidos sugieren que, en un centro sanitario, en particular en un hospital, es importante mantener los parámetros químico-físicos correctos (cloro, temperatura), utilizar materiales para las tuberías adecuados y usar frecuentemente los puntos terminales. De esta manera se reduciría el riesgo de colonización por *Legionella*. Esta conclusión es práctica y de inmediata aplicación en un centro hospitalario, ayudando a reducir la incidencia de legionelosis nosocomial y el gasto en intervenciones a posteriori.

Cabe destacar que los resultados se han analizado también con un nuevo método rápido y en diferentes horas del día. Visto la efectividad del método SIM, se podría utilizar un sistema de control del agua en tiempo real utilizando este método en un sistema automatizado y conectado a una red con la posibilidad de controlar el nivel de contaminación por *Legionella* y actuar en tiempos muy rápidos. De esta forma se podría intervenir de manera preventiva cuando todavía no se hayan producido los efectos, como posibles casos nosocomiales.

Una parte de los resultados de este estudio se publicaron en un artículo de una revista científica (grupo Nature) en febrero del 2022 (ver anexo). Algunas propuestas de esta publicación coinciden con novedades aportadas por el nuevo Real Decreto donde por primera vez se habla de métodos rápidos y alternativos como complemento y ayuda al cultivo microbiológico para el control de la *Legionella*. Creemos que este hecho refuerza aún más nuestra posición en el estudio de los factores de riesgo junto con las nuevas metodologías rápidas para poder actuar con celeridad en momentos tempranos.

7.6 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El nuevo índice utilizado en este estudio aumentó la sensibilidad de detección de *Legionella spp.* en agua con respecto a los métodos basados en cultivo, cuyo valor diagnóstico ambiental en la prevención se ve comprometido. Sin embargo, se recomienda realizar más estudios en profundidad para definir un estándar validado internacionalmente en un futuro próximo.

La situación pandémica y la falta de financiación provocó la imposibilidad para el desarrollo de algunas partes del proyecto inicial, como el estudio del biofilm.

El nuevo índice predictor de riesgo tiene una validez interna al estudio es decir en el HCUV.

7.7 FUTURAS INVESTIGACIONES

A partir de este estudio se plantean diferentes investigaciones futuras.

Visto que el estudio evalúa el riesgo de colonización por *Legionella* considerando diferentes factores y el uso de nuevas técnicas de diagnóstico, son necesarios más estudios que vinculen las mejoras en la validez interna de las pruebas diagnósticas y la detección temprana de este patógeno en tuberías de agua con cambios en la efectividad de las prácticas correctivas y con una potencial reducción de casos de legionelosis. Vista la característica novedosa de esta metodología rápida son necesarios más estudios para que sea validada.

Por otra parte, sería necesario investigar otros parámetros que pudieran contribuir al riesgo de colonización por *Legionella*, como por ejemplo parámetros químico-físicos del agua que no se han podido investigar en el presente estudio como el hierro, el calcio o el oxígeno disuelto.

Son necesarios más estudios que evalúen en detalle tanto el impacto de la edad de las tuberías como su corrosión.

También sería interesante definir el papel del biofilm y de otras bacterias y protozoos como posibles factores de riesgo para establecer la utilidad de una evaluación rápida de los mismos mediante el uso de métodos rápidos. De hecho, en el presente estudio estaba contemplado inicialmente el análisis del biofilm en las tuberías para poder evaluarlo junto con los otros factores de riesgo de colonización del agua por *Legionella*.

8. CONCLUSIONES

1. Los principales factores que condicionan la colonización por *Legionella* son la baja cloración del agua fría, el estancamiento del agua en la red de distribución y el uso poco frecuente de un punto terminal. La temperatura alta en agua caliente supone un factor protector.
2. El cultivo sigue siendo considerado el método de referencia. No obstante, el nuevo índice permite evaluar mejor la colonización de *Legionella* en el sistema de agua de un hospital. Su uso: (i) podría anticipar la necesidad de un tratamiento de limpieza y desinfección, y (ii) permitiría evaluar su efectividad.
3. El método rápido SIM puede generar resultados más sensibles en condiciones específicas, como en temperaturas altas donde hay mayor presencia de formas viables pero no cultivables. Además, su rapidez puede ser clave a la hora de aplicar medidas correctoras.
4. El riesgo asociado para la asistencia ambulatoria es de casi 4 veces, para un uso poco frecuente del punto terminal es de casi 12 veces y para el agua estancada es de casi 37 veces. Una correcta cloración para el agua fría de consumo humano y una correcta temperatura para el agua caliente sanitaria han demostrado ser factores protectores.
5. Se ha elaborado un indicador predictor de riesgo de colonización del agua por *Legionella* en el ambiente hospitalario.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kuiper MW, Wullings BA, Akkermans ADL, Beumer RR, van der Kooij D. Intracellular Proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in Aquatic Biofilms Grown on Plasticized Polyvinyl Chloride. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2004 [citado 27 de octubre de 2020];70(11):6826-33. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC525122/pdf/0336-04.pdf>
2. Buse HY, Schoen ME, Ashbolt NJ. Legionellae in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure. *Water Res* [Internet]. 15 de marzo de 2012 [citado 28 de octubre de 2020];46(4):921-33. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22209280>
3. Hellinga JR, Garduño RA, Kormish JD, Tanner JR, Khan D, Buchko K, et al. Identification of vacuoles containing extraintestinal differentiated forms of *Legionella pneumophila* in colonized *Caenorhabditis elegans* soil nematodes. *Microbiologyopen* [Internet]. 2015 [citado 27 de octubre de 2020];4(4):660-81. Disponible en: <https://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC4554460&blobtype=pdf>
4. Alleron L, Khemiri A, Koubar M, Lacombe C, Coquet L, Cosette P, et al. VBNC *Legionella pneumophila* cells are still able to produce virulence proteins. *Water Res* [Internet]. 2013;47(17):6606-17. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24064547>
5. Burillo A, Pedro-Botet ML, Bouza E. Microbiology and Epidemiology of Legionnaire's Disease. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. marzo de 2017 [citado 13 de abril de 2020];31(1):7-27. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552016300885>
6. Cunha BA, Burillo A, Bouza E. Legionnaires' disease. En: *The Lancet* [Internet]. Elsevier; 2016 [citado 13 de abril de 2020]. p. 376-85. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26231463>
7. Beauté J, The European Legionnaires' Disease Surveillance Network on behalf of the ELDS. Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. *Euro Surveill* [Internet]. 2017 [citado 28 de octubre de 2020];22(27). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28703097>
8. Neil K, Berkelman R. Increasing incidence of legionellosis in the United States, 1990-2005: changing epidemiologic trends. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 1 de septiembre de 2008 [citado 28 de octubre de 2020];47(5):591-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18665818>
9. Dooling KL, Toews KA, Hicks LA, Garrison LE, Bachaus B, Zansky S, et al. Active Bacterial Core Surveillance for Legionellosis - United States, 2011-2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 30 de octubre de 2015 [citado 28 de octubre de 2020];64(42):1190-3. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26513329>
10. Mercante JW, Winchell JM. Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. enero de 2015 [citado 28 de octubre de 2020];28(1):95-133. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25567224>
11. Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, Stagg HR, Zhang N, Kumar K, et al. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 1 de octubre de 2014 [citado 8 de marzo de 2019];14(10):1011-21. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24970283>
12. St-Martin G, Uldum S, Mølbak K. Incidence and Prognostic Factors for Legionnaires' Disease in Denmark 1993–2006. *ISRN Epidemiology* [Internet]. 2013 [citado 28 de octubre de 2020];2013:1-8. Disponible en: <https://www.hindawi.com/archive/2013/847283/>

13. von Baum H, Ewig S, Marre R, Suttorp N, Gonschior S, Welte T, et al. Community-acquired Legionella pneumonia: new insights from the German competence network for community acquired pneumonia. Clin Infect Dis [Internet]. 1 de mayo de 2008 [citado 28 de octubre de 2020];46(9). Disponible en: <http://www.cap>
14. Beauté Julien, Zucs P, de Jong B. Legionnaires disease in Europe, 2009-2010. [Internet]. Vol. 18, Euro Surveill. 2013 [citado 28 de octubre de 2020]. Disponible en: www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20417. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20417>
15. Cross KE, Mercante JW, Benitez AJ, Brown EW, Diaz MH, Winchell JM. Simultaneous detection of Legionella species and L. anisa, L. bozemanii, L. longbeachae and L. micdadei using conserved primers and multiple probes in a multiplex real-time PCR assay. Diagn Microbiol Infect Dis [Internet]. julio de 2016 [citado 28 de octubre de 2020];85(3):295-301. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27107536>
16. Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, et al. Distribution of Legionella Species and Serogroups Isolated by Culture in Patients with Sporadic Community-Acquired Legionellosis: An International Collaborative Survey. J Infect Dis [Internet]. 1 de julio de 2002 [citado 28 de octubre de 2020];186(1). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12089674>
17. Rucinski SL, Murphy MP, Kies KD, Cunningham SA, Schuetz AN, Patel R. Eight Years of Clinical Legionella PCR Testing Illustrates a Seasonal Pattern. J Infect Dis [Internet]. 13 de julio de 2018 [citado 28 de octubre de 2020];218(4):669-70. Disponible en: <https://academic.oup.com/jid/article/218/4/669/4967571>
18. Fliermans, CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope3 DH. Ecological Distribution of Legionella pneumophila [Internet]. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 1981 [citado 25 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC243633/pdf/aem00194-0029.pdf>
19. Riffard S, Douglass S, Brooks T, Springthorpe S, Filion LG, Sattar SA. Occurrence of Legionella in groundwater: an ecological study. Water Science and Technology. 1 de junio de 2001;43(12):99-102.
20. Ortiz-Roque CM, Hazen TC. Abundance and distribution of Legionellaceae in Puerto Rican waters. Appl Environ Microbiol [Internet]. 1987 [citado 8 de enero de 2023];53(9):2231-6. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.53.9.2231-2236.1987>
21. 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. enero de 1983;117(1):60-7.
22. GRIST NR. Legionnaires' Disease and the Traveller. Ann Intern Med. 1 de abril de 1979;90(4):563.
23. TERRANOVA W. 1974 OUTBREAK OF LEGIONNAIRES' DISEASE DIAGNOSED IN 1977 Clinical and Epidemiological Features. The Lancet. julio de 1978;312(8081):122-4.
24. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2002 [citado 14 de enero de 2023];15(3):506. Disponible en: [/pmc/articles/PMC118082/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC118082/)
25. Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC, et al. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for Legionella pneumophila. J Clin Microbiol [Internet]. 1979 [citado 14 de enero de 2023];10(4):437-41. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.10.4.437-441.1979>

26. The Bellevue (Bellevue-Stratford Hotel) | SAH ARCHIPEDIA [Internet]. [citado 10 de enero de 2023]. Disponible en: <https://sah-archipedia.org/buildings/PA-02-PH56>
27. LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [Internet]. [citado 8 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.bacterio.net/>
28. Stout JE, Yu VL. Legionellosis. <https://doi.org/10.1056/NEJM199709043371006> [Internet]. 4 de septiembre de 1997 [citado 8 de enero de 2023];337(10):682-7. Disponible en: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199709043371006>
29. Details - Public Health Image Library(PHIL) [Internet]. [citado 14 de enero de 2023]. Disponible en: <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=6642>
30. Details - Public Health Image Library(PHIL) [Internet]. [citado 14 de enero de 2023]. Disponible en: <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=11148>
31. Public Domain Picture | This image depicts a Petri dish containing a buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar medium, which had been inoculated with Gram-negativ | ID: 13546366216262 | PublicDomainFiles.com [Internet]. [citado 14 de enero de 2023]. Disponible en: http://www.publicdomainfiles.com/show_file.php?id=13546366216262
32. Aragon V, Kurtz S, Flieger A, Neumeister B, Cianciotto NP. Secreted Enzymatic Activities of Wild-Type and pilD-Deficient Legionella pneumophila [Internet]. Infection and Immunity abr 1, 2000 p. 1855-63. Disponible en: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.68.4.1855-1863.2000>
33. Brüggemann H, Cazalet C, Buchrieser C. Adaptation of Legionella pneumophila to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. Curr Opin Microbiol [Internet]. 1 de febrero de 2006 [citado 25 de junio de 2019];9(1):86-94. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527405002031?via%3Dihub>
34. Chauhan D, Shames SR. Pathogenicity and Virulence of Legionella: Intracellular replication and host response. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1903199> [Internet]. 2021 [citado 14 de enero de 2023];12(1):1122-44. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21505594.2021.1903199>
35. Bornstein N, Marmet D, Surgot M, Nowicki M, Arslan A, Esteve J, et al. Exposure to Legionellaceae at a hot spring spa: a prospective clinical and serological study. Epidemiol Infect [Internet]. 1989 [citado 8 de enero de 2023];102(1):31. Disponible en: </pmc/articles/PMC2249314/?report=abstract>
36. 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 [Internet]. 2005 [citado 23 de enero de 2023];12(4):173-9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16086890/>
37. Eisenreich W, Heuner K. The life stage-specific pathometabolism of Legionella pneumophila. FEBS Lett. 2016;590(21):3868-86.
38. Oliva G, Sahr T, Buchrieser C. The life cycle of L. pneumophila: Cellular differentiation is linked to virulence and metabolism. Front Cell Infect Microbiol. 19 de enero de 2018;8(JAN):3.
39. Ricketts KD, Joseph CA, Lee J v., Wilkinson P. Wet cooling systems as a source of sporadic Legionnaires' disease: a geographical analysis of data for England and Wales, 1996–2006. J Epidemiol Community Health [Internet]. 1 de julio de 2012 [citado 9 de enero de 2023];66(7):618-23. Disponible en: <https://jech.bmj.com/content/66/7/618>
40. Walser SM, Gerstner DG, Brenner B, Höller C, Liebl B, Herr CEW. Assessing the environmental health relevance of cooling towers – A systematic review of legionellosis outbreaks. Int J Hyg Environ Health. 1 de marzo de 2014;217(2-3):145-54.

41. Osawa K, Shigemura K, Abe Y, Jikimoto T, Yoshida H, Fujisawa M, et al. A case of nosocomial Legionella pneumonia associated with a contaminated hospital cooling tower. *Journal of Infection and Chemotherapy* [Internet]. 1 de enero de 2014 [citado 9 de enero de 2023];20(1):68-70. Disponible en: <http://www.jiac-j.com/article/S1341321X13000135/fulltext>
42. Vanaclocha H, Guiral S, Morera V, Calatayud MA, Castellanos M, Moya V, et al. Preliminary report: Outbreak of Legionnaires' disease in a hotel in Calp, Spain, update on 22 February 2012. *Eurosurveillance* [Internet]. 23 de febrero de 2012 [citado 9 de enero de 2023];17(8):1-3. Disponible en: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.17.08.20093-en>
43. Chikte UME, Khondowe O, Gildenhuis I. A case study of a dental receptionist diagnosed with Legionnaires' disease. *SADJ*. julio de 2011;66(6):284-7.
44. Goutziana G, Mouchtouri VA, Karanika M, Kavagias A, Stathakis NE, Gourgoulisanis K, et al. Legionella species colonization of water distribution systems, pools and air conditioning systems in cruise ships and ferries. *BMC Public Health* [Internet]. 24 de noviembre de 2008 [citado 9 de enero de 2023];8(1):1-7. Disponible en: <https://bmcpubhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2458-8-390>
45. van Heijnsbergen E, Schalk JAC, Euser SM, Brandsema PS, den Boer JW, de Roda Husman AM. Confirmed and potential sources of Legionella reviewed. *Environ Sci Technol* [Internet]. 21 de abril de 2015 [citado 8 de enero de 2023];49(8):4797-815. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.5b00142>
46. Amodeo MR, Murdoch DR, Pithie AD. Legionnaires' disease caused by Legionella longbeachae and Legionella pneumophila: Comparison of clinical features, host-related risk factors, and outcomes. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 1 de septiembre de 2010 [citado 8 de enero de 2023];16(9):1405-7. Disponible en: <http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X14606844/fulltext>
47. Lindsay DSJ, Brown AW, Brown DJ, Pravinkumar SJ, Anderson E, Edwards GFS. Legionella longbeachae serogroup 1 infections linked to potting compost. *J Med Microbiol* [Internet]. 1 de febrero de 2012 [citado 9 de enero de 2023];61(2):218-22. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.035857-0>
48. Ferranti G, Marchesi I, Favale M, Borella P, Bargellini A. Aetiology, source and prevention of waterborne healthcare-associated infections: A review. *J Med Microbiol* [Internet]. 1 de octubre de 2014 [citado 8 de enero de 2023];63(10):1247-59. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.075713-0>
49. Schuetz AN, Hughes RL, Howard RM, Williams TC, Nolte FS, Jackson D, et al. Pseudo-outbreak of Legionella pneumophila serogroup 8 infection associated with a contaminated ice machine in a bronchoscopy suite. *Infect Control Hosp Epidemiol*. mayo de 2009;30(5):461-6.
50. Bencini MA, Yzerman EPF, Koornstra RHT, Nolte CCM, den Boer JW, Bruin JP. A Case of Legionnaires' Disease Caused by Aspiration of Ice Water. <http://dx.doi.org/10.3200/AEOH606302-306> [Internet]. 2010 [citado 9 de enero de 2023];60(6):302-6. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3200/AEOH.60.6.302-306>
51. Schoen ME, Ashbolt NJ. An in-premise model for Legionella exposure during showering events. *Water Res*. 2011;45(18):5826-36.
52. Kanarek P, Bogiel T, Breza-Boruta B. Legionellosis risk—an overview of Legionella spp. habitats in Europe. *Environmental Science and Pollution Research* [Internet]. 1 de noviembre de 2022 [citado 14 de enero de 2023];29(51):76532-42. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-022-22950-9>

53. Sabria M, Yu VL. Hospital-acquired legionellosis: solutions for a preventable infection. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 1 de junio de 2002 [citado 8 de enero de 2023];2(6):368-73. Disponible en: <http://www.thelancet.com/article/S1473309902002918/fulltext>
54. Kool JL, Fiore AE, Kioski CM, Brown EW, Benson RF, Pruckler JM, et al. More than 10 years of unrecognized nosocomial transmission of legionnaires' disease among transplant patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. diciembre de 1998 [citado 25 de junio de 2019];19(12):898-904. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872525>
55. Johnson JT, Best MG, Goetz A, Wicker H, Yu VL, Vickers RM, et al. NOSOCOMIAL LEGIONELLOSIS IN SURGICAL PATIENTS WITH HEAD-AND-NECK CANCER: IMPLICATIONS FOR EPIDEMIOLOGICAL RESERVOIR AND MODE OF TRANSMISSION. *The Lancet* [Internet]. 10 de agosto de 1985 [citado 8 de enero de 2023];326(8450):298-300. Disponible en: <http://www.thelancet.com/article/S0140673685903496/fulltext>
56. Boer J den, Yzerman E, Jansen R, al. et. Legionnaires' disease and gardening. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:88-91.
57. Conza L, Pagani SC, Gaia V. Presence of Legionella and Free-Living Amoebae in Composts and Bioaerosols from Composting Facilities. *PLoS One* [Internet]. 2013 [citado 9 de enero de 2023];8(7):68244. Disponible en: www.plosone.org
58. van Heijnsbergen E, de Roda Husman AM, Lodder WJ, Bouwknecht M, Docters van Leeuwen AE, Bruin JP, et al. Viable Legionella pneumophila bacteria in natural soil and rainwater puddles. *J Appl Microbiol* [Internet]. 1 de septiembre de 2014 [citado 9 de enero de 2023];117(3):882-90. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.12559>
59. Falkinham JO, Hilborn ED, Arduino MJ, Pruden A, Edwards MA. Epidemiology and Ecology of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: Legionella pneumophila, Mycobacterium avium, and Pseudomonas aeruginosa. *Environ Health Perspect* [Internet]. 4 de agosto de 2015 [citado 9 de enero de 2023];123(8):749. Disponible en: [/pmc/articles/PMC4529011/](http://pmc/articles/PMC4529011/)
60. Brooks T, Osicki RA, Springthorpe VS, Sattar SA, Filion L, Abrial D, et al. Detection and identification of Legionella species from groundwaters. *J Toxicol Environ Health A* [Internet]. 2004 [citado 9 de enero de 2023];67(20-22):1845-59. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15371220/>
61. Wójcik-Fatla A, Stojek NM, Dutkiewicz J. Efficacy of the detection of Legionella in hot and cold water samples by culture and PCR. I. Standardization of methods. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. julio de 2012;19(2):289-93.
62. Palmer CJ, Tsai YL, Paszko-Kolva C, Mayer C, Sangermano LR. Detection of Legionella species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1993 [citado 9 de enero de 2023];59(11):3618. Disponible en: [/pmc/articles/PMC182507/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC182507/?report=abstract)
63. Heller R, Hö C, Sü R, Gundermann KO, Höllner C, Höllner H, et al. Effect of salt concentration and temperature on survival of Legionella pneumophila. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 1 de enero de 1998 [citado 9 de enero de 2023];26(1):64-8. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1472-765X.1998.00273.x>
64. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and legionnaires' disease: 25 Years of investigation. Vol. 15, *Clinical Microbiology Reviews*. 2002. p. 506-26.
65. Ji WT, Hsu BM, Chang TY, Hsu TK, Kao PM, Huang KH, et al. Surveillance and evaluation of the infection risk of free-living amoebae and Legionella in different aquatic environments. *Science of The Total Environment*. 15 de noviembre de 2014;499:212-9.

66. Dennis PJ, Green D, Jones BPC. A note on the temperature tolerance of Legionella. *Journal of Applied Bacteriology* [Internet]. 1 de abril de 1984 [citado 9 de enero de 2023];56(2):349-50. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.1984.tb01359.x>
67. Fliermans CB. Autecology of Legionella pneumophila. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene 1 Abt Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie = International journal of microbiology and hygiene A, Medical microbiology, infectious*. julio de 1983;255(1):58-63.
68. Campbell J, Bibb WF, Lambert MA, Eng S, Steigerwalt AG, Allard J, et al. Legionella sainthelensi: a new species of Legionella isolated from water near Mt. St. Helens. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1984 [citado 9 de enero de 2023];47(2):369-73. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.47.2.369-373.1984>
69. Lin YS, Stout JE, Yu VL, Vidic RD. Disinfection of water distribution systems for Legionella. *Semin Respir Infect* [Internet]. junio de 1998 [citado 27 de junio de 2019];13(2):147-59. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9643393>
70. Serrano-Suárez A, Dellundé J, Salvadó H, Cervero-Aragó S, Méndez J, Canals O, et al. Microbial and physicochemical parameters associated with Legionella contamination in hot water recirculation systems. *Environmental Science and Pollution Research* [Internet]. 23 de agosto de 2013 [citado 9 de enero de 2023];20(8):5534-44. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-013-1557-5>
71. Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M, Messi P. Water ecology of Legionella and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev*. 1 de enero de 2005;11(SUPPL.):355-80.
72. Taylor M, Ross K, Bentham R. Legionella, protozoa, and biofilms: Interactions within complex microbial systems. *Microb Ecol* [Internet]. 14 de abril de 2009 [citado 9 de enero de 2023];58(3):538-47. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-009-9514-z>
73. Yee RB, Wadowsky RM. Multiplication of Legionella pneumophila in unsterilized tap water. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1982 [citado 9 de enero de 2023];43(6):1330-4. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.43.6.1330-1334.1982>
74. Quero S, Párraga-Niño N, Garcia-Núñez M, Pedro-Botet ML, Gavaldà L, Mateu L, et al. The impact of pipeline changes and temperature increase in a hospital historically colonised with Legionella. *Sci Rep*. 1 de diciembre de 2021;11(1).
75. Sarin P, Snoeyink VL, Lytle DA, Kriven WM. Iron Corrosion Scales: Model for Scale Growth, Iron Release, and Colored Water Formation. *Journal of Environmental Engineering* [Internet]. 1 de abril de 2004 [citado 9 de enero de 2023];130(4):364-73. Disponible en: <https://ascelibrary.org/doi/abs/10.1061/%28ASCE%290733-9372%282004%29130%3A4%28364%29>
76. Zhang Z, Stout JE, Yu VL, Vidic R. Effect of pipe corrosion scales on chlorine dioxide consumption in drinking water distribution systems. *Water Res*. 1 de enero de 2008;42(1-2):129-36.
77. Rakić A, Perić J, Foglar L. Influence of temperature, chlorine residual and heavy metals on the presence of Legionella pneumophila in hot water distribution systems. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* [Internet]. 20 de septiembre de 2012 [citado 9 de enero de 2023];19(3):431-6. Disponible en: <https://www.aaem.pl/Influence-of-temperature-chlorine-residual-and-heavy-metals-on-the-presence-of-Legionella,71799,0,2.html>
78. Vickers RM, Yu VL, Hanna SS, Muraca P, Diven W, Carmen N, et al. Determinants of Legionella pneumophila Contamination of Water Distribution Systems: 15-Hospital Prospective Study. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 1987 [citado 9 de enero de 2023];8(9):357-63. Disponible en: <https://www.cambridge.org/core/journals/infection-control-and-hospital>

- epidemiology/article/abs/determinants-of-legionella-pneumophila-contamination-of-water-distribution-systems-15hospital-prospective-study/873659740AAE77AABA23DA2FC296BDCD
79. Stout JE, Yu VL, Yee YC, Vaccarello S, Diven W, Lee TC. Legionella pneumophila in residential water supplies: environmental surveillance with clinical assessment for Legionnaires' disease. *Epidemiol Infect* [Internet]. agosto de 1992 [citado 9 de enero de 2023];109(1):49. Disponible en: [/pmc/articles/PMC2272241/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1128/PMC2272241/?report=abstract)
 80. Borella P, Montagna MT, Stampi S, Stancanelli G, Romano-Spica V, Triassi M, et al. Legionella contamination in hot water of Italian hotels. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. octubre de 2005 [citado 9 de enero de 2023];71(10):5805-13. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.71.10.5805-5813.2005>
 81. Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee J v., Keevil CW. Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of Legionella pneumophila in Potable Water Systems. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1994 [citado 9 de enero de 2023];60(6):1842-51. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.60.6.1842-1851.1994>
 82. van der Kooij D, Veenendaal HR, Scheffer WJH. Biofilm formation and multiplication of Legionella in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Res.* 1 de agosto de 2005;39(13):2789-98.
 83. Lindsay D, Holy A von. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection* [Internet]. 1 de diciembre de 2006 [citado 25 de junio de 2019];64(4):313-25. Disponible en: [https://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701\(06\)00335-5/fulltext](https://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195-6701(06)00335-5/fulltext)
 84. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. abril de 2002 [citado 25 de junio de 2019];15(2):167-93. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932229>
 85. Davey ME, O'toole GA. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics [Internet]. Vol. 64, MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS. 1092 [citado 25 de junio de 2019]. Disponible en: <http://mibr.asm.org/>
 86. Declerck P. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* [Internet]. marzo de 2010 [citado 25 de junio de 2019];12(3):557-66. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19678829>
 87. Abdel-Nour M, Duncan C, Low DE, Guyard C. Biofilms: The Stronghold of Legionella pneumophila. *OPEN ACCESS Int J Mol Sci* [Internet]. 2013 [citado 25 de junio de 2019];14:14. Disponible en: www.mdpi.com/journal/ijms
 88. Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, Hall-Stoodley L, Burmølle M, Stewart PS, et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology* 2022 20:10 [Internet]. 3 de agosto de 2022 [citado 14 de enero de 2023];20(10):608-20. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41579-022-00767-0>
 89. Ott M, Messner P, Heesemann J, Marre R, Hacker J. Temperature-dependent expression of flagella in Legionella. *J Gen Microbiol* [Internet]. 1 de agosto de 1991 [citado 9 de enero de 2023];137(8):1955-61. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-137-8-1955>
 90. Piao Z, Sze CC, Barysheva O, Iida KI, Yoshida SI. Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by Legionella pneumophila. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. febrero de 2006 [citado 9 de enero de 2023];72(2):1613-22. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.72.2.1613-1622.2006>

91. Harper D. Legionnaires' disease outbreaks--the engineering implications. *J Hosp Infect* [Internet]. 1 de febrero de 1988 [citado 25 de junio de 2019];11 Suppl A:201-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2896707>
92. Ciesielski CA, Blaser MJ, Wang W, Shands KN, Ho JL, Gorman GW, et al. Role of Stagnation and Obstruction of Water Flow in Isolation of *Legionella pneumophila* from Hospital Plumbing [Internet]. Vol. 48, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 1984 [citado 25 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC241662/pdf/aem00156-0084.pdf>
93. Storey M, Ashbolt J, Stenström TA. Biofilms, thermophilic amoebae and *Legionella pneumophila*--a quantitative risk assessment for distributed water. *Water Sci Technol*. 2004;50(1):77-82.
94. Hoffmann C, Harrison CF, Hilbi H. The natural alternative: protozoa as cellular models for *Legionella* infection. *Cell Microbiol* [Internet]. 1 de enero de 2014 [citado 9 de enero de 2023];16(1):15-26. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cmi.12235>
95. Shin S, Roy CR. Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* [Internet]. 1 de junio de 2008 [citado 9 de enero de 2023];10(6):1209-20. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-5822.2008.01145.x>
96. Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, Kwaik YA. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. enero de 2005 [citado 9 de enero de 2023];71(1):20-8. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.71.1.20-28.2005>
97. Ji WT, Hsu BM, Chang TY, Hsu TK, Kao PM, Huang KH, et al. Surveillance and evaluation of the infection risk of free-living amoebae and *Legionella* in different aquatic environments. *Science of The Total Environment*. 15 de noviembre de 2014;499:212-9.
98. Barker J, Scaife H, Brown MRW. Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1995 [citado 9 de enero de 2023];39(12):2684-8. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.39.12.2684>
99. Ducret A, Chabaliere M, Dukan S. Characterization and resuscitation of «non-culturable» cells of *Legionella pneumophila*. *BMC Microbiol* [Internet]. 2 de enero de 2014 [citado 9 de enero de 2023];14(1):1-10. Disponible en: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-14-3>
100. Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP, Shinoda S. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Front Public Health*. 31 de julio de 2014;2(JUL):103.
101. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol*. 2 de junio de 2014;5(JUN):1-1.
102. Lowry PW, Blankenship RJ, Gridley W, Troup NJ, Tompkins LS. A Cluster of *Legionella* Sternal-Wound Infections Due to Postoperative Topical Exposure to Contaminated Tap Water. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199101103240207> [Internet]. 14 de enero de 2010 [citado 8 de enero de 2023];324(2):109-13. Disponible en: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199101103240207>
103. Jacobson KL, Miceli MH, Tarrand JJ, Kontoyiannis DP. *Legionella* pneumonia in cancer patients. *Medicine* [Internet]. mayo de 2008 [citado 8 de enero de 2023];87(3):152-9. Disponible en: https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2008/05000/Legionella_Pneumonia_in_Cancer_Patients.3.aspx

104. Carratala J, Gudiol F, Pallares R, Dorca J, Verdaguer R, Ariza J, et al. Risk factors for nosocomial *Legionella pneumophila* pneumonia. <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.14938118629> [Internet]. 20 de diciembre de 2012 [citado 25 de junio de 2019]; Disponible en: <https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.149.3.8118629>
105. Lepine LA, Jernigan DB, Butler JC, Pruckler JM, Benson RF, Kim G, et al. A recurrent outbreak of nosocomial legionnaires' disease detected by urinary antigen testing: evidence for long-term colonization of a hospital plumbing system. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. diciembre de 1998 [citado 25 de junio de 2019];19(12):905-10. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872526>
106. Chow JW1 YV. Legionella: a major opportunistic pathogen in transplant recipients. - PubMed - NCBI. *Semin Respir Infect* [Internet]. 1998 [citado 25 de junio de 2019];13(2):132-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9643391>
107. Mathys W, Deng MC, Meyer J, Junge-Mathys E. Fatal nosocomial Legionnaires' disease after heart transplantation: Clinical course, epidemiology and prevention strategies for the highly immunocompromized host. *Journal of Hospital Infection* [Internet]. 1 de noviembre de 1999 [citado 8 de enero de 2023];43(3):242-6. Disponible en: <http://www.journalofhospitalinfection.com/article/S019567019990628X/fulltext>
108. Bodro M, Carratalà J, Paterson DL. Legionellosis and biologic therapies. *Respir Med* [Internet]. 2014 [citado 25 de junio de 2019];108:1223-8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmed.2014.04.017>
109. de Olalla PG, Gracia J, Rius C, Caylà JA, Pañella H, Villabí JR, et al. [Community outbreak of pneumonia due to *Legionella pneumophila*: importance of monitoring hospital cooling towers]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. enero de 2008 [citado 25 de junio de 2019];26(1):15-22. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18208761>
110. Greenberg D, Chiou CC, Famigilletti R, Lee TC, Yu VL. Problem pathogens: paediatric legionellosis-implications for improved diagnosis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 1 de agosto de 2006 [citado 28 de octubre de 2020];6(8):529-35. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16870531>
111. Chidiac C, Che D, Pires-Cronenberger S, Jarraud S, Campèse C, Bissery A, et al. Factors associated with hospital mortality in community-acquired legionellosis in France. *EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL* [Internet]. 2012 [citado 25 de junio de 2019];39(4):963-70. Disponible en: www.erj.ersjournals.com
112. Mykietiuik A, Carratalà J, Fernández-Sabé N, Dorca J, Verdaguer R, Manresa F, et al. Clinical outcomes for hospitalized patients with *Legionella* pneumonia in the antigenuria era: the influence of levofloxacin therapy. *Clin Infect Dis* [Internet]. 15 de marzo de 2005 [citado 27 de octubre de 2020];40(6):794-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15736010>
113. Mentasti M, Fry NK, Afshar B, Palepou-Foxley C, Naik FC, Harrison TG. Application of *Legionella pneumophila*-specific quantitative real-time PCR combined with direct amplification and sequence-based typing in the diagnosis and epidemiological investigation of Legionnaires' disease. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* [Internet]. 26 de agosto de 2012 [citado 8 de enero de 2023];31(8):2017-28. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-011-1535-0>
114. Blyth A CC, Nicholas Adams DA, A Chen A SC. Diagnostic and typing methods for investigating *Legionella* infection. 2009 [citado 25 de junio de 2019];20(9). Disponible en: <http://www.publish.csiro.au/nb/pdf/NB08062>
115. Edelstein PH. Laboratory diagnosis of infections caused by Legionellae. *Eur J Clin Microbiol.* febrero de 1987;6(1):4-10.

116. Diederer BMW. Legionella spp. and Legionnaires' disease. *Journal of Infection* [Internet]. 1 de enero de 2008 [citado 8 de enero de 2023];56(1):1-12. Disponible en: <http://www.journalofinfection.com/article/S0163445307007657/fulltext>
117. de Ory F, Minguito T. Comparación de cinco ensayos comerciales para la detección de antígenos de *Legionella pneumophila* en orina. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1 de febrero de 2009;27(2):81-4.
118. File TM, Segreti J, Dunbar L, Player R, Kohler R, Williams RR, et al. A Multicenter, Randomized Study Comparing the Efficacy and Safety of Intravenous and/or Oral Levofloxacin versus Ceftriaxone and/or Cefuroxime Axetil in Treatment of Adults with Community-Acquired Pneumonia [Internet]. Vol. 41. 1997 [citado 25 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC164046/pdf/411965.pdf>
119. Pedro-Botet L, Yu VL. Legionella: Macrolides or quinolones? *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. 1 de enero de 2006 [citado 9 de enero de 2023];12(SUPPL. 3):25-30. Disponible en: <http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X14613197/fulltext>
120. Vergis EN, Indorf A, File TM, Phillips J, Bates J, Tan J, et al. Azithromycin vs Cefuroxime Plus Erythromycin for Empirical Treatment of Community-Acquired Pneumonia in Hospitalized Patients: A Prospective, Randomized, Multicenter Trial. *Arch Intern Med* [Internet]. 8 de mayo de 2000 [citado 9 de enero de 2023];160(9):1294-300. Disponible en: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/485303>
121. 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* [Internet]. 1 de septiembre de 2005 [citado 9 de enero de 2023];128(3):1401-5. Disponible en: <http://journal.chestnet.org/article/S001236921552165X/fulltext>
122. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Douglas Campbell G, Dean NC, et al. IDSA/ATS Guidelines for CAP in Adults • CID 2007;44 (Suppl 2) • S27 Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. [citado 10 de julio de 2019];9. Disponible en: https://academic.oup.com/cid/article-abstract/44/Supplement_2/S27/372079
123. Gea-Izquierdo E, Mezones-Holguín E, Haro-García L. ACCIONES DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA LEGIONELOSIS: UN RETO PARA LA SALUD PÚBLICA ESPAÑOLA ACTIONS FOR LEGIONELLOSIS PREVENTION AND CONTROL: A CHALLENGE FOR PUBLIC HEALTH IN SPAIN. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2012;29(2):272-6.
124. Ecdc. Legionnaires' disease - Annual Epidemiological Report for 2020.
125. Ecdc. Legionnaires' disease Annual Epidemiological Report for 2018 [Internet]. [citado 10 de octubre de 2020]. Disponible en: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2018_Legionnaires.pdf
126. III I de SC. Weekly epidemiological bulletin (No. 4) [Internet]. 2020. Disponible en: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Boletines/Paginas/BoletinEpidemiologicoSemanal.aspx>
127. National Academies of Sciences E and M. Management of Legionella in Water Systems [Internet]. Washington, D.C.: National Academies Press; 2019 [citado 31 de octubre de 2020]. Disponible en: <https://www.nap.edu/catalog/25474>
128. 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* [Internet]. enero de 2014 [citado 9 de enero de 2023];52(1):201. Disponible en: [/pmc/articles/PMC3911437/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24711437/)

129. NNDSS Annual Report Working Group. Australia's notifiable disease status, 2014: Annual report of the National Notifiable Diseases Surveillance System. *Commun Dis Intell Q Rep*. 31 de marzo de 2016;40(1):E48-145.
130. Maini R, Naik F, Harrison TG, Mentasti M, Spala G, Velonakis E, et al. Travel-associated Legionnaires' disease in residents from England and Wales travelling to Corfu, Greece, August to October 2011. *Eurosurveillance* [Internet]. 9 de agosto de 2012 [citado 9 de enero de 2023];17(32):20240. Disponible en: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.17.32.20240-en>
131. Lee S. An Overview of the European Technical Guidelines for the Prevention, Control and Investigation of Infections Caused by Legionella species . *Perspect Public Health*. 2018;
132. Cano Portero R, Mesonero CM, Amillategui R, Santos D. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA LEGIONELOSIS EN ESPAÑA INFORME DE LA RED NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA. AÑOS. 2019;29:78.
133. European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2016. Stockholm: ECDC; 2018. [Internet]. 2016. Disponible en: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report.pdf>
134. Ficha disposición [Internet]. [citado 16 de enero de 2023]. Disponible en: https://dogv.gva.es/portal/ficha_disposicion_pc.jsp?sig=1107/1997&L=1
135. Servicio de Vigilancia y Control Epidemiológico. Sudirección General de Epidemiología V de la S y SA. Informes Legionelosis Comunitat Valenciana del año 2017. Pública C de SU i SPúblicaDG de S, editor. 2017.
136. Decker BK, Palmore TN. The role of water in healthcare-associated infections [Internet]. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2013. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5583640/pdf/nihms890400.pdf>
137. Loveday HP, Wilson JA, Kerr K, Pitchers R, Walker JT, Browne J. Association between healthcare water systems and Pseudomonas aeruginosa infections: a rapid systematic review. *Journal of Hospital Infection* [Internet]. 2014 [citado 10 de julio de 2019];86:7-15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2013.09.010>
138. O'Neill E, Humphreys H. Surveillance of hospital water and primary prevention of nosocomial legionellosis: What is the evidence? *Journal of Hospital Infection* [Internet]. 1 de abril de 2005 [citado 9 de enero de 2023];59(4):273-9. Disponible en: <http://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195670104004633/fulltext>
139. Stout JE, Muder RR, Mietzner S, Wagener MM, Perri MB, DeRoos K, et al. Role of environmental surveillance in determining the risk of hospital-acquired legionellosis: a national surveillance study with clinical correlations. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. julio de 2007 [citado 5 de octubre de 2020];28(7):818-24. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17564984>
140. Sabrià M, García-Nuñez M, Pedro-Botet ML, Sopena N, Gimeno JM, Reynaga E, et al. Presence and chromosomal subtyping of Legionella species in potable water systems in 20 hospitals of Catalonia, Spain. *Infect Control Hosp Epidemiol*. noviembre de 2001;22(11):673-6.
141. Boccia S, Laurenti P, Borella P, Moscato U, Capalbo G, Cambieri A, et al. Prospective 3-year surveillance for nosocomial and environmental Legionella pneumophila: implications for infection control. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. mayo de 2006 [citado 5 de octubre de 2020];27(5):459-65. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16671026>

142. Whiley H, Keegan A, Fallowfield H, Ross K. Uncertainties associated with assessing the public health risk from Legionella. *Front Microbiol.* 24 de septiembre de 2014;5(SEP):501.
143. Best M, Yu VL, Stout J, Goetz A, Muder RR, Taylor F. Legionellaceae in the hospital water-supply. Epidemiological link with disease and evaluation of a method for control of nosocomial legionnaires' disease and Pittsburgh pneumonia. *Lancet* [Internet]. 6 de agosto de 1983 [citado 27 de junio de 2019];2(8345):307-10. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6135832>
144. Allen JG, Myatt TA, MacIntosh DL, Ludwig JF, Minegishi T, Stewart JH, et al. Assessing risk of health care-acquired Legionnaires' disease from environmental sampling: The limits of using a strict percent positivity approach. *Am J Infect Control.* 2012;40(10):917-21.
145. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Rivera SRA, Raso R, Ferrero P, Zotti CM. Virulence of Legionella pneumophila strains isolated from hospital water system and healthcare-associated Legionnaires' disease in Northern Italy between 2004 and 2009. *BMC Infect Dis* [Internet]. 5 de septiembre de 2014 [citado 9 de enero de 2023];14(1):1-8. Disponible en: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-14-483>
146. Oberdorfer K, Müssigbrodt G, Wendt C. Genetic diversity of Legionella pneumophila in hospital water systems. *Int J Hyg Environ Health.* 12 de marzo de 2008;211(1-2):172-8.
147. Pancer K, Matuszewska R, Bartosik M, Kacperski K, Krogulska B. Persistent colonization of 2 hospital water supplies by L. pneumophila strains through 7 years--sequence-based typing and serotyping as useful tools for a complex risk analysis. *Ann Agric Environ Med.* 2013;20(4):687-94.
148. Iatta R, Cuna T, Napoli C, de Giglio O, Montagna MT. Environmental surveillance and molecular investigation of Legionella spp. in Apulia, in the years 2008-2011. *Ann Ig* [Internet]. [citado 25 de junio de 2019];25(5):435-41. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048182>
149. Alexandropoulou IG, Ntougias S, Konstantinidis TG, Parasidis TA, Panopoulou M, Constantinidis TC. Environmental surveillance and molecular epidemiology of waterborne pathogen Legionella pneumophila in health-care facilities of Northeastern Greece: a 4-year survey. *Environmental Science and Pollution Research* [Internet]. 25 de mayo de 2015 [citado 25 de junio de 2019];22(10):7628-40. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-014-3740-8>
150. Triassi M, di Popolo A, D'Alcalà GR, Albanese Z, Cuccurullo S, Montegrosso S, et al. Clinical and environmental distribution of Legionella pneumophila in a university hospital in Italy: Efficacy of ultraviolet disinfection. *Journal of Hospital Infection* [Internet]. 1 de abril de 2006 [citado 9 de enero de 2023];62(4):494-501. Disponible en: <http://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195670105004299/fulltext>
151. BOE.es - BOE-A-2003-14408 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]. 2003 [citado 14 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2003-14408>
152. BOE.es - BOE-A-2022-10297 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. [Internet]. 2022 [citado 14 de enero de 2023]. Disponible en: https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2022-10297
153. Norma UNE 100030. Prevención y control de la proliferación y diseminación de Legionella en instalaciones. 2017.
154. Levi K, Smedley J, Towner KJ. Evaluation of a real-time PCR hybridization assay for rapid detection of Legionella pneumophila in hospital and environmental water samples [Internet]. Vol. 9, *European Society of Clinical Infectious Diseases.* 2003 [citado 25 de junio de 2019].

Disponible en: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)63975-6/pdf](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)63975-6/pdf)

155. Díaz-Flores Á, Montero JC, Castro FJ, Alejandres EM, Bayón C, Solís I, et al. Comparing methods of determining *Legionella* spp. in complex water matrices. *BMC Microbiol* [Internet]. 12 de diciembre de 2015;15(1):1-9. Disponible en: ???
156. Delgado-Viscogliosi P, Solignac 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*. junio de 2009;75(11):3502-12.
157. Leoni E, Legnani PP, Sabattini MAB, Righi F. PREVALENCE OF LEGIONELLA SPP. IN SWIMMING POOL ENVIRONMENT. Vol. 35, *Wat. Res.* 2001.
158. 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.* 2011;
159. Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2010 [citado 9 de enero de 2023];34(4):415-25. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20059548/>
160. Whiley H, Taylor M. *Legionella* detection by culture and qPCR: Comparing apples and oranges. <https://doi.org/10.3109/1040841X2014885930> [Internet]. 2 de enero de 2014 [citado 9 de enero de 2023];42(1):65-74. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/1040841X.2014.885930>
161. 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*. septiembre de 2003;41(9):4016-21.
162. Parthuisot N, West NJ, Lebaron P, Baudart J. High diversity and abundance of *Legionella* spp. in a pristine river and impact of seasonal and anthropogenic effects. *Appl Environ Microbiol*. diciembre de 2010;76(24):8201-10.
163. Lizana X, López A, Benito S, Agustí G, Ríos M, Piqué N, et al. Viability qPCR, a new tool for *Legionella* risk management. *Int J Hyg Environ Health*. noviembre de 2017;220(8):1318-24.
164. Pan Y, Breidt F. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Appl Environ Microbiol*. diciembre de 2007;73(24):8028-31.
165. Fittipaldi M, Codony F, Adrados B, Camper AK, Morató J. Viable real-time PCR in environmental samples: can all data be interpreted directly? *Microb Ecol*. enero de 2011;61(1):7-12.
166. Albalat GR, Broch BB, Bono MJ. Method Modification of the Legipid® *Legionella* Fast Detection Test Kit. *J AOAC Int* [Internet]. 1 de septiembre de 2014;97(5):1403-9. Disponible en: <https://academic.oup.com/jaoac/article/97/5/1403-1409/5654778>
167. Rodríguez Albalat G, Bedrina Broch B, Jiménez Bono M. Validation of the Legipid® Bioalarm *Legionella* assay. *J AOAC Int*. 2012;95(5):1440-51.
168. Albalat GR. Investigación y cuantificación de *Legionella* sp. mediante separación inmunomagnética. *Rev salud ambient*. 2017;17:51-5.
169. Ripollés Arnau A, Solís I, Ferrer C, Jiménez M, Rodríguez G. Sistema de detección y cuantificación on line de *Legionella* viable en aguas [Internet]. 2015. Disponible en: www.tecnoaqua.es

170. Marchesi I, Ferranti G, Mansi A, Marcelloni AM, Proietto AR, Saini N, et al. Control of Legionella contamination and risk of corrosion in hospital water networks following various disinfection procedures. *Appl Environ Microbiol.* 2016;
171. Muraca P, Stout JE, Yu VL. Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing Legionella pneumophila within a model plumbing system. *Appl Environ Microbiol.* febrero de 1987;53(2):447-53.
172. Lin YS, Stout JE, Yu VL, Vidic RD. Disinfection of water distribution systems for Legionella. *Semin Respir Infect.* junio de 1998;13(2):147-59.
173. Gavalda L, Garcia-Nuñez M, Quero S, Gutierrez-Milla C, Sabrià M. Role of hot water temperature and water system use on Legionella control in a tertiary hospital: An 8-year longitudinal study. *Water Res.* 1 de febrero de 2019;460-6.
174. Landeen LK, Yahya MT, Gerba CP. Efficacy of copper and silver ions and reduced levels of free chlorine in inactivation of Legionella pneumophila. *Appl Environ Microbiol.* diciembre de 1989;55(12):3045-50.
175. Stout JE, Yu VL. Experiences of the first 16 hospitals using copper-silver ionization for Legionella control: implications for the evaluation of other disinfection modalities. *Infect Control Hosp Epidemiol.* agosto de 2003;24(8):563-8.
176. Liu Z, Stout JE, Tedesco L, Boldin M, Hwang C, Diven WF, et al. Controlled evaluation of copper-silver ionization in eradicating Legionella pneumophila from a hospital water distribution system. *J Infect Dis.* abril de 1994;169(4):919-22.
177. Marchesi I, Marchegiano P, Bargellini A, Cencetti S, Frezza G, Miselli M, et al. Effectiveness of different methods to control legionella in the water supply: ten-year experience in an Italian university hospital. *Journal of Hospital Infection [Internet].* 2011;77:47-51. Disponible en: www.sciencedirect.com
178. Casini B, Valentini P, Baggiani A, Torracca F, Frateschi S, Nelli LC, et al. Molecular epidemiology of Legionella pneumophila serogroup 1 isolates following long-term chlorine dioxide treatment in a university hospital water system. *J Hosp Infect.* junio de 2008;69(2):141-7.
179. Dziejwski DM, Ingles E, Codru N, Strepelis J, Schoonmaker-Bopp D. Use of copper-silver ionization for the control of legionellae in alkaline environments at health care facilities. *Am J Infect Control.* 1 de septiembre de 2015;43(9):971-6.
180. Casini B, Buzzigoli A, Cristina ML, Spagnolo AM, Giudice P del, Brusaferrò 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.* 2014;
181. Marchesi I, Cencetti S, Marchegiano P, Frezza G, Borella P, Bargellini A. Control of Legionella contamination in a hospital water distribution system by monochloramine. *Am J Infect Control.* abril de 2012;40(3):279-81.
182. Mancini B, Scurti M, Dormi A, Grottola A, Zanotti A, Cristino S. Effect of monochloramine treatment on colonization of a hospital water distribution system by legionella spp.: A 1 year experience study. *Environ Sci Technol.* 2015;
183. Cooper IR, Hanlon GW. Resistance of Legionella pneumophila serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. *J Hosp Infect.* febrero de 2010;74(2):152-9.
184. Stout JE, Lin YS, Goetz AM, Muder RR. Controlling Legionella in hospital water systems: experience with the superheat-and-flush method and copper-silver ionization. *Infect Control Hosp Epidemiol [Internet].* diciembre de 1998 [citado 27 de junio de 2019];19(12):911-4. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872527>

185. Sydnor ERM, Bova G, Gimburg A, Cosgrove SE, Perl TM, Maragakis LL. Electronic-eye faucets: *Legionella* species contamination in healthcare settings. *Infect Control Hosp Epidemiol*. marzo de 2012;33(3):235-40.
186. Farhat M, Trouilhé MC, Briand E, Moletta-Denat M, Robine E, Frère J. Development of a pilot-scale 1 for *Legionella* elimination in biofilm in hot water network: heat shock treatment evaluation. *J Appl Microbiol*. marzo de 2010;108(3):1073-82.
187. García MT, Baladrón B, Gil V, Tarancon ML, Vilasau A, Ibañez A, et al. Persistence of chlorine-sensitive *Legionella pneumophila* in hyperchlorinated installations. *J Appl Microbiol*. septiembre de 2008;105(3):837-47.
188. Biurrún A, Caballero L, Pelaz C, León E, Gago A. Treatment of a *Legionella pneumophila*-colonized water distribution system using copper-silver ionization and continuous chlorination. *Infect Control Hosp Epidemiol*. junio de 1999;20(6):426-8.
189. Franzin L, Cabodi D, Fantino C. Evaluation of the efficacy of ultraviolet irradiation for disinfection of hospital water contaminated by *Legionella*. *J Hosp Infect*. agosto de 2002;51(4):269.
190. Sheffer PJ, Stout JE, Wagener MM, Muder RR. Efficacy of new point-of-use water filter for preventing exposure to *Legionella* and waterborne bacteria. *Am J Infect Control*. junio de 2005;33(5 Suppl 1):S20-5.
191. Baron JL, Peters T, Shafer R, MacMurray B, Stout JE. Field evaluation of a new point-of-use faucet filter for preventing exposure to *Legionella* and other waterborne pathogens in health care facilities. *Am J Infect Control*. noviembre de 2014;42(11):1193-6.
192. Vonberg RP, Eckmanns T, Bruderek J, Rüdén H, Gastmeier P. Use of terminal tap water filter systems for prevention of nosocomial legionellosis. *J Hosp Infect*. junio de 2005;60(2):159-62.
193. Domingue EL, Tyndall RL, Mayberry WR, Pancorbo OC. Effects of three oxidizing biocides on *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Appl Environ Microbiol*. marzo de 1988;54(3):741-7.
194. Blanc DS, Carrara P, Zanetti G, Francioli P. Water disinfection with ozone, copper and silver ions, and temperature increase to control *Legionella*: seven years of experience in a university teaching hospital. *J Hosp Infect*. mayo de 2005;60(1):69-72.
195. Farhat M, Trouilhé MC, Forêt C, Hater W, Moletta-Denat M, Robine E, et al. Chemical disinfection of *Legionella* in hot water systems biofilm: a pilot-scale 1 study. *Water Sci Technol*. 2011;64(3):708-14.
196. Saby S, Vidal A, Suty H. Resistance of *Legionella* to disinfection in hot water distribution systems. *Water Sci Technol*. 2005;52(8):15-28.
197. Ricci ML, Dell'Eva I, Scaturro M, Baruchelli P, Ponte G de, Losardo M, et al. Six-Month Experience of Silver-Hydrogen Peroxide Treatment for *Legionella* Control in Two Nursing Home Water Systems. En: *Legionella*. Washington, DC, USA: ASM Press; 2014. p. 505-8.
198. Cristino S, Legnani PP, Leoni E. Plan for the control of *Legionella* infections in long-term care facilities: role of environmental monitoring. *Int J Hyg Environ Health*. abril de 2012;215(3):279-85.
199. Burillo A, Pedro-Botet ML, Bouza E. Microbiology and Epidemiology of Legionnaire's Disease. *Infect Dis Clin North Am*. 2017;31(1):7-27.
200. Hashmi HRT, Saladi L, Petersen F, Khaja M, Diaz-Fuentes G. Legionnaires' Disease: Clinoradiological Comparison of Sporadic Versus Outbreak Cases. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med*. 2017;

201. SEMPSPH. ESTUDIO EPINE-EPPS 2017. Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España (EPINE). 2017.
202. De Giglio O, Napoli C, Lovero G, Diella G, Rutigliano S, Caggiano G, et al. Antibiotic susceptibility of Legionella pneumophila strains isolated from hospital water systems in Southern Italy. *Environ Res*. 2015;
203. Fontana S, Scaturro M, Rota MC, Caporali MG, Ricci ML. Molecular typing of Legionella pneumophila serogroup 1 clinical strains isolated in Italy. *International Journal of Medical Microbiology*. 2014;304(5-6):597-602.
204. 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. BOE núm. 171, de 18 de julio. 2003.
205. Völker S, Schreiber C, Kistemann T. Modelling characteristics to predict Legionella contamination risk - Surveillance of drinking water plumbing systems and identification of risk areas. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. enero de 2016;219(1):101-9. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438463915001248>
206. Cristina ML, Spagnolo AM, Sartini M, Dallera M, Ottria G, Perdelli F, et al. Investigation of organizational and hygiene features in dentistry: a pilot study. *J Prev Med Hyg*. 2009;50(3):175-80.
207. Montagna MT, De Giglio O, Cristina ML, Napoli C, Pacifico C, Agodi A, et al. Evaluation of Legionella air contamination in healthcare facilities by different sampling methods: An Italian multicenter study. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;
208. Montagna MT, de Giglio O, Agodi A, Pasquarella C. Response to Comments on Montagna et al. «Evaluation of Legionella Air Contamination in Healthcare Facilities by Different Sampling Methods: An Italian Multicenter Study» *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2017, 14, 670. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2017;14(8). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28800078>
209. Rhoads WJ, Ji P, Pruden A, Edwards MA. Water heater temperature set point and water use patterns influence Legionella pneumophila and associated microorganisms at the tap. *Microbiome* [Internet]. 1 de diciembre de 2015 [citado 31 de octubre de 2020];3(1):67. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26627188>
210. Soda EA, Barskey AE, Shah PP, Schrag S, Whitney CG, Arduino MJ, et al. Vital Signs: Health Care-Associated Legionnaires' Disease Surveillance Data From 20 States and a Large Metropolitan Area-United States, 2015. [Internet]. Vol. 17(8), *Am J Transplant*. 2017. p. 2215-20. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28724206>
211. Lee TC, Vickers RM, Yu VL, Wagener MM. Growth of 28 Legionella species on selective culture media: a comparative study. *J Clin Microbiol* [Internet]. octubre de 1993 [citado 28 de octubre de 2020];31(10):2764-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8253978>
212. Bentham R, Whiley H, Bentham R, Whiley H. Quantitative Microbial Risk Assessment and Opportunist Waterborne Infections—Are There Too Many Gaps to Fill? *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 1 de junio de 2018 [citado 26 de junio de 2019];15(6):1150. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1660-4601/15/6/1150>
213. van Kenhove E, Dinne K, Janssens A, Laverge J. Overview and comparison of Legionella regulations worldwide. *Am J Infect Control* [Internet]. 1 de agosto de 2019 [citado 31 de octubre de 2020];47(8):968-78. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30638676>
214. Codony F, Dinh-Thanh M, Agustí G. Key Factors for Removing Bias in Viability PCR-Based Methods: A Review. *Curr Microbiol* [Internet]. 6 de abril de 2020 [citado 31 de octubre de 2020];77(4):682-7. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-019-01829-y>

215. Shevchuk O, Jäger J, Steinert M. Virulence properties of the legionella pneumophila cell envelope. *Front Microbiol* [Internet]. 2011 [citado 31 de octubre de 2020];2:74. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21747794>
216. Información institucional del Departamento Valencia Clínico - Malvarrosa - Hospital Clínico Universitario de Valencia: Departamento Clínico-Malvarrosa [Internet]. [citado 17 de enero de 2023]. Disponible en: <https://clinicomalvarrosa.san.gva.es/institucional>
217. departamento Clínico Malvarrosa. MEMORIA 2020. 2020;
218. Galeria d'Images - Hospital Clínico Universitario de Valencia: Departamento Clínico-Malvarrosa [Internet]. [citado 15 de enero de 2023]. Disponible en: <https://clinicomalvarrosa.san.gva.es/galeria-de-imagenes>
219. CONTACTO - Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico de Valencia [Internet]. [citado 27 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://saludmujerclinico.es/contacto/>
220. ISO 11731:2017 - Water quality -- Enumeration of Legionella [Internet]. 2017 [citado 26 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/61782.html>
221. Sharaby Y, Rodríguez-Martínez S, Höfle MG, Brettar I, Halpern M. Quantitative microbial risk assessment of Legionella pneumophila in a drinking water supply system in Israel. *Science of the Total Environment*. 25 de junio de 2019;671:404-10.
222. Ji P, Rhoads WJ, Edwards MA, Pruden A. Impact of water heater temperature setting and water use frequency on the building plumbing microbiome. *ISME Journal*. 1 de junio de 2017;11(6):1318-30.
223. König L, Wentrup C, Schulz F, Wascher F, Escola S, Swanson MS, et al. Symbiont-Mediated Defense against Legionella pneumophila in Amoebae. 2019; Disponible en: <https://doi.org/10.1128/mBio>
224. Proctor CR, Reimann M, Vriens B, Hammes F. Biofilms in shower hoses. *Water Res*. 15 de marzo de 2018;131:274-86.
225. Messi P, de Niederhäusern S, Anacarso I, Iseppi R, Sabia C, Bondi M. Legionella pneumophila in healthcare settings: sensitivity to biocidal treatments in mono- and multi-species biofilms. Vol. 97, *Journal of Hospital Infection*. W.B. Saunders Ltd; 2017. p. 200-1.
226. Abu Khweek A, Amer AO. Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by Legionella pneumophila. *Front Cell Infect Microbiol*. 27 de febrero de 2018;8.
227. Sousa M, Navas Z, Laborde M, Alfaro B, José J, Carrascosa U, et al. Niveles de Evidencia Clínica y Grados de Recomendación Levels of scientific evidence and degrees of recommendation. 2012;
228. Albalat GR, Broch BB, Bono MJ. Method Modification of the Legipid[®] Legionella Fast Detection Test Kit. *J AOAC Int*. septiembre de 2014;97(5):1403-9.
229. Stout JE, Yu VL. Environmental culturing for Legionella: Can we build a better mouse trap? *Am J Infect Control* [Internet]. 2010 [citado 5 de octubre de 2020];38:341-3. Disponible en: www.ajicjournal.org
230. Allen JG, Myatt TA, MacIntosh DL, Ludwig JF, Minegishi T, Stewart JH, et al. Assessing risk of health care-acquired Legionnaires' disease from environmental sampling: The limits of using a strict percent positivity approach. *Am J Infect Control*. 2012;40(10):917-21.
231. Hamilton KA, Haas CN. Critical review of mathematical approaches for quantitative microbial risk assessment (QMRA) of Legionella in engineered water systems: Research gaps and a new framework. Vol. 2, *Environmental Science: Water Research and Technology*. Royal Society of Chemistry; 2016. p. 599-613.

232. Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, et al. A PCR-Based Method for Monitoring *Legionella pneumophila* in Water Samples Detects Viable but Noncultivable Legionellae That Can Recover Their Cultivability. *Appl Environ Microbiol.* agosto de 2008;74(15):4817-24.
233. Ortí-Lucas RM, Luciano E. New immunomagnetic separation method to analyze risk factors for Legionella colonization in health care centres. *J Expo Sci Environ Epidemiol* [Internet]. 1 de septiembre de 2022 [citado 13 de enero de 2023];32(5):744-50. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35264765/>
234. Whiley H, Taylor M. *Critical Reviews in Microbiology Legionella detection by culture and qPCR: Comparing apples and oranges.* 2014;
235. Dietersdorfer E, Kirschner A, Schrammel B, Ohradanova-Repic A, Stockinger H, Sommer R, et al. Starved viable but non-culturable (VBNC) Legionella strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. *Water Res.* 15 de septiembre de 2018;141:428-38.
236. Shamsizadeh, Z., Ehrampoush, M. H., Nikaeen, M., Ebrahimi, A. A., & Asghari FB. Investigation of hospital water systems contamination to bacterial agents of nosocomial infections. *Int J Environ Health Eng.* 2020;9:10.
237. Lai CC, Wang CY, Hsueh PR. Co-infections among patients with COVID-19: The need for combination therapy with non-anti-SARS-CoV-2 agents? *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 1 de agosto de 2020;53(4):505-12.
238. 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;
239. Totaro M, Mariotti T, Bisordi C, De Vita E, Valentini P, Costa AL, et al. Evaluation of legionella pneumophila decrease in hot water network of four hospital buildings after installation of electron time flow taps. *Water (Switzerland).* 1 de enero de 2020;12(1).
240. Nakamura I, Amemura-Maekawa J, Kura F, Kobayashi T, Sato A, Watanabe H, et al. Persistent Legionella contamination of water faucets in a tertiary hospital in Japan. *International Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 1 de abril de 2020 [citado 31 de octubre de 2020];93:300-4. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.002>
241. Quero S, Párraga-Niño N, García-Núñez M, Pedro-Botet ML, Gavalda L, Mateu L, et al. The impact of pipeline changes and temperature increase in a hospital historically colonised with Legionella. *Scientific Reports* 2021 11:1 [Internet]. 21 de enero de 2021 [citado 13 de enero de 2023];11(1):1-7. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-81625-6>
242. Nisar MA, Ross KE, Brown MH, Bentham R, Whiley H. Water Stagnation and Flow Obstruction Reduces the Quality of Potable Water and Increases the Risk of Legionellosis. *Front Environ Sci.* 14 de diciembre de 2020;8:260.
243. Martin RL, Strom OR, Pruden A, Edwards MA. Interactive Effects of Copper Pipe, Stagnation, Corrosion Control, and Disinfectant Residual Influenced Reduction of Legionella pneumophila during Simulations of the Flint Water Crisis. *Pathogens* 2020, Vol 9, Page 730 [Internet]. 4 de septiembre de 2020 [citado 13 de enero de 2023];9(9):730. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-0817/9/9/730/htm>
244. Hozalski RM, Lapara TM, Zhao X, Kim T, Waak MB, Burch T, et al. Flushing of Stagnant Premise Water Systems after the COVID-19 Shutdown Can Reduce Infection Risk by Legionella and Mycobacterium spp. *Environ Sci Technol* [Internet]. 15 de diciembre de 2020 [citado 13 de enero de 2023];54(24):15914-24. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.0c06357>

245. Gamage SD, Jinadatha C, Coppin JD, Kralovic SM, Bender A, Ambrose M, et al. Factors That Affect Legionella Positivity in Healthcare Building Water Systems from a Large, National Environmental Surveillance Initiative. *Environ Sci Technol* [Internet]. 16 de agosto de 2022 [citado 20 de enero de 2023];56(16):11363-73. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.2c02194>
246. Kermani M, Chegini Z, Mirkalantari S, Norzaee S. Assessment of the risk of Legionella pneumophila in water distribution systems in hospitals of Tehran city. *Environ Monit Assess* [Internet]. 1 de noviembre de 2022 [citado 20 de enero de 2023];194(11):1-11. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10661-022-10469-y>
247. Ministerio de Sanidad - Ciudadanos - Ciudadanos - Agentes biológicos [Internet]. [citado 27 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.sanidad.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/agenBiologicos/guia.htm>
248. Macías M, Broche C, García B, Ignacio M. Efecto del cambio de las tuberías de suministro de agua del Hospital Juan Ramón Jiménez en la proliferación de Legionella. 2020 [citado 27 de mayo de 2023];7-10. Disponible en: <http://dspace.aeipro.com/xmlui/handle/123456789/2562>
249. Cullom AC, Martin RL, Song Y, Williams K, Williams A, Pruden A, et al. Critical Review: Propensity of Premise Plumbing Pipe Materials to Enhance or Diminish Growth of Legionella and Other Opportunistic Pathogens. *Pathogens* 2020, Vol 9, Page 957 [Internet]. 17 de noviembre de 2020 [citado 27 de mayo de 2023];9(11):957. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-0817/9/11/957/htm>
250. Wang H, Masters S, Hong Y, Stallings J, Falkinham JO, Edwards MA, et al. Effect of disinfectant, water age, and pipe material on occurrence and persistence of legionella, mycobacteria, pseudomonas aeruginosa, and two amoebas. *Environ Sci Technol* [Internet]. 6 de noviembre de 2012 [citado 27 de mayo de 2023];46(21):11566-74. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es303212a>
251. Proctor CR, Dai D, Edwards MA, Pruden A. Interactive effects of temperature, organic carbon, and pipe material on microbiota composition and Legionella pneumophila in hot water plumbing systems. *Microbiome* [Internet]. 4 de octubre de 2017 [citado 27 de mayo de 2023];5(1):130. Disponible en: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s40168-017-0348-5>
252. Van Der Kooij D, Veenendaal HR, Scheffer WJH. Biofilm formation and multiplication of Legionella in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Res.* 1 de agosto de 2005;39(13):2789-98.
253. Almeria S, Rakić AR, Vukić D, Lušićlušić V, Jurčev A, Savičević S. Influence of Metal Concentration and Plumbing Materials on Legionella Contamination. *Microorganisms* 2022, Vol 10, Page 1051 [Internet]. 19 de mayo de 2022 [citado 27 de mayo de 2023];10(5):1051. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/5/1051/htm>
254. Pongratz A, Schwarzkopf A, Hahn H, Heesemann J, Karch H, Döll W. [The effect of the pipe material of the drinking water system on the frequency of Legionella in a hospital]. *Zentralbl Hyg Umweltmed* [Internet]. 1 de junio de 1994 [citado 27 de mayo de 2023];195(5-6):483-8. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/7916876>
255. Coniglio A, Yassin MH, Gea-Izquierdo E, Gil-De-Miguel Á, Rodríguez-Caravaca G. Legionella pneumophila Risk from Air–Water Cooling Units Regarding Pipe Material and Type of Water. *Microorganisms* 2023, Vol 11, Page 638 [Internet]. 2 de marzo de 2023 [citado 27 de mayo de 2023];11(3):638. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/3/638/htm>
256. Ministerio de Sanidad - Ciudadanos - Ciudadanos - Agentes biológicos [Internet]. [citado 15 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.sanidad.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/agenBiologicos/guia.htm>

ANEXO I. ARTÍCULO PUBLICADO EN UNA REVISTA INTERNACIONAL PERTENECIENTE AL PRIMER QUARTIL (Q1).

Este estudio ha generado varias comunicaciones a congresos y un artículo publicado en una revista científica de alto impacto (Q1 según la escala JCR).

www.nature.com/jes

Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology

ARTICLE

 Check for updates

New immunomagnetic separation method to analyze risk factors for *Legionella* colonization in health care centres

Rafael Manuel Orti-Lucas^{1,2} and Eugenio Luciano^{2,3}

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature America, Inc. 2022

BACKGROUND: It's pivotal to control the presence of legionella in sanitary structures. So, it's important to determine the risk factors associated with *Legionella* colonization in health care centres. In recent years that is why new diagnostic techniques have been developed.

OBJECTIVE: To evaluate risks factors for *Legionella* colonization using a novel and more sensitive *Legionella* positivity index.

METHODS: A total of 204 one-litre water samples (102 cold water samples and 102 hot water samples), were collected from 68 different sampling sites of the hospital water system and tested for *Legionella* spp. by two laboratories using culture, polymerase chain reaction and a method based on immunomagnetic separation (IMS). A *Legionella* positivity index was defined to evaluate *Legionella* colonization and associated risk factors in the 68 water samples sites. We performed bivariate analyses and then logistic regression analysis with adjustment of potentially confounding variables. We compared the performance of culture and IMS methods using this index as a new gold standard to determine if rapid IMS method is an acceptable alternative to the use of slower culture method.

RESULTS: Based on the new *Legionella* positivity index, no statistically significant differences were found neither between laboratories nor between methods (culture, IMS). Positivity was significantly correlated with ambulatory health assistance ($p = 0.05$) and frequency of use of the terminal points. The logistic regression model revealed that chlorine ($p = 0.009$) and the frequency of use of the terminal points ($p = 0.001$) are predictors of *Legionella* colonization. Regarding this index, the IMS method proved more sensitive (69%) than culture method (65.4%) in hot water samples.

SIGNIFICANCE: We showed that the frequency of use of terminal points should be considered when examining environmental *Legionella* colonization, which can be better evaluated using the provided *Legionella* positivity index. This study has implications for the prevention of Legionnaires' disease in hospital settings.

Keywords: Legionella; Legionnaires' disease; water distribution systems; colonization; rapid techniques; risk factors

Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology (2022) 32:744–750; <https://doi.org/10.1038/s41370-022-00421-0>

ANEXO II. RELACIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS Y NEGATIVAS PARA *LEGIONELLA* CON LAS VARIABLES CONSIDERADAS.

	Obj. 1 y 2	Obj. 3 y 4	Totales
Muestras			
Totales	204	136	340
Positivas Legionella	111	33	144
Negativas Legionella	93	103	196
AFCH	102	79	181
ACS	102	57	159
Laboratorio 1	70	///	70
Laboratorio 2	134	///	134
Método cultivo	116	136	252
Método SIM	88	136	224
pabellón A	54	27	81
pabellón B	60	31	91
pabellón C	60	66	126
pabellón D	30	12	42
hospitalaria	162	102	264
ambulatoria	42	34	76
ducha	123	33	156
pila	81	53	134
máquina	///	50	50
uso frecuente	144	57	201
uso no frecuente	60	29	89
<25 Cº	84	76	160
25-50 Cº	72	46	118
>50 Cº	48	14	62
agua no estancada	///	90	90
agua estancada	///	46	46
8h	///	25	25
12h	///	29	29
16h	///	42	42
20h	///	40	40
PPR	///	69	69
Hierro galvanizado	///	67	67

Obj. 1 y 2: muestras utilizadas para contestar a los objetivos específicos 1 y 2.

Obj. 3 y4: muestras utilizadas para contestar a los objetivos especí 3 y 4

ANEXO III. RELACIÓN DE MUESTRAS CON RESPECTIVOS PARÁMETROS MEDIDOS PARA CONTESTAR A LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS 3 Y 4.

Nº	Fecha	Temp_amb	Hum_relat	Dist	Temp_agua	PH	Conduct_µS	Cl_libre_mg/L	Dur_total_(FRº)
1	5/2/20	24,3	40,5	45	47,5	7,47	1026	0,45	14,1
2	5/2/20	24,3	40,5	43	51,3	7,46	1022	0,09	23,9
3	5/2/20	24,4	46,5	44	49,8	7,52	1022	0,08	14,5
4	4/2/20	23,9	40,5	45	39,1	7,63	1034	0,07	24,5
5	4/2/20	23,9	40,5	43	49,8	7,5	1042	0,02	11,8
6	4/2/20	25	42	44	51,3	7,55	1036	0	23,5
7	4/2/20	24,3	41,6	45	41,3	7,46	1040	0,12	24,3
8	4/2/20	24,3	41,6	43	47,7	7,41	1051	0,12	23,2
9	4/2/20	24,6	47,6	44	50,1	7,39	1047	0,11	24,9
10	4/2/20	23,7	40,4	45	47,7	7,42	1057	0,3	24,4
11	4/2/20	23,7	40,4	43	49,7	7,41	1044	0,43	24,4
12	4/2/20	24,2	46	44	50,2	7,41	1030	0,04	24,5
13	4/3/20	21,5	57,2	75	17,8	7,52	1149	0,28	24
14	4/3/20	21,5	57,2	73	17,5	7,58	1144	1,33	22,1
15	4/3/20	20,9	63	74	17,7	7,56	1147	1,32	23
16	3/3/20	21,7	31,7	75	18,7	7,58	1094	1,14	26,3
17	3/3/20	21,7	31,7	73	17,2	7,55	1092	0,97	20,5
18	3/3/20	21,8	45	74	17,1	7,56	1092	1,2	16,3
19	3/3/20	22,2	43,7	75	18,2	7,57	1092	1,29	22
20	3/3/20	22,2	43,7	73	17,8	7,48	1097	0,8	20,1
21	3/3/20	21,6	53	74	17,7	7,55	1084	1,22	19,6
22	3/3/20	21,6	43	75	18,2	7,6	1162	0,56	22
23	3/3/20	21,6	43	73	17,9	7,58	1164	0,44	16,3
24	3/3/20	21,4	52,6	74	18,6	7,6	1155	0,91	21,8
25	21/7/20	24,1	58,4	75	25,3	7,7	1143	0,43	14
26	21/7/20	24,1	58,4	73	25,1	7,84	1127	0,73	13,2
27	21/7/20	23,3	62,8	74	24,7	7,9	1120	0,84	16,3

Nº	Fecha	Temp_amb	Hum_rel	Dist	Temp_agua	PH	Conduct_µS	Cl_libre_mg/L	Dur_total_(FRº)
28	20/7/20	23	60	75	25,5	7,82	1145	0,37	14,3
29	20/7/20	23	60	73	24	7,81	1147	0,36	15
30	20/7/20	24	61	74	24,7	7,85	1147	0,39	13,2
31	20/7/20	24	62	75	26	7,82	1145	0,37	15
32	20/7/20	24	62	73	25	7,81	1147	0,36	14
33	20/7/20	25	62,5	74	25	7,85	1147	0,39	16,3
34	20/7/20	24,3	61,8	75	25,6	7,7	1143	0,43	14,3
35	20/7/20	24,3	61,8	73	25,7	7,84	1127	0,73	15
36	20/7/20	24,2	62,6	74	25,4	7,9	1120	0,84	13,2
37	14/10/20	22,9	51,2	45	51,8	7,47	1026	0,45	10
38	14/10/20	22,9	51,2	43	30,7	7,46	1022	0,09	9,6
39	14/10/20	22,9	51,2	44	56,2	7,52	1022	0,08	11,5
40	13/10/20	23,2	37	45	23,7	7,63	1034	0,07	12
41	13/10/20	23,2	37	43	34,1	7,5	1042	0,02	11,6
42	13/10/20	23,2	37	44	55	7,55	1036	0	12,3
43	13/10/20	25,1	37,1	45	31,5	7,6	1040	0,45	12
44	13/10/20	25,1	37,1	43	28,7	7,6	1051	0,09	11,6
45	13/10/20	25,1	37,1	44	50,8	7,6	1047	0,08	12,3
46	13/10/20	24,2	38,5	45	24,8	7,6	1057	0,07	12
47	13/10/20	24,2	38,5	43	27,4	7,6	1044	0,02	11,6
48	13/10/20	24,2	38,5	44	50,1	7,6	1030	0	12,3
49	21/10/20	24,6	51,6	60,66	22,7	7,46	1026	0,12	14
50	21/10/20	24,6	51,6	60,66	44,7	7,54	1022	0,12	13,7
51	21/10/20	26,1	48,8	60,66	23,8	7,37	1022	0,3	15,2
52	21/10/20	26,1	48,8	60,66	45,7	7,37	1040	0,43	14
53	21/10/20	27,3	48	60,66	22,2	7,37	1051	0,3	14
54	21/10/20	27,3	48	60,66	37,3	7,37	1047	0,43	13,7
55	21/10/20	26,1	47,6	60,66	22,9	7,46	1057	0,12	15,2
56	21/10/20	26,1	47,6	60,66	24,2	7,54	1044	0,12	14

Nº	Fecha	Temp_amb	Hum_rel	Dist	Temp_agua	PH	Conduct_µS	Cl_libre_mg/L	Dur_total_(FRº)
57	21/10/20	24,6	51,6	60,66	22,7	7,45	1100	1,18	14
58	21/10/20	26,1	48,8	60,66	23,6	7,4	1149	0,55	13,7
59	21/10/20	26,1	48,8	60,66	23,8	7,4	1144	1,18	15,2
60	21/10/20	27,3	48	60,66	22,7	7,37	1153	1,25	14
61	21/10/20	27,3	48	60,66	23,4	7,37	1124	1,25	13,7
62	21/10/20	26,1	47,6	60,66	23,2	7,37	1149	1,18	15,2
63	21/10/20	26,1	47,6	60,66	24,2	7,41	1144	1,18	14
64	5/11/20	23,3	47,7	57,66	25,8	7,7	930	0,07	14
65	5/11/20	23,3	47,7	57,66	27	7,7	930	0,02	13,6
66	4/11/20	25,5	40,2	57,66	25,6	7,4	997	0	12,8
67	4/11/20	25,5	40,2	57,66	30,4	7,4	997	0,07	12
68	4/11/20	24,2	42,4	57,66	25,7	7,5	930	0,02	11,9
69	4/11/20	24,2	42,4	57,66	38,5	7,5	930	0	12,4
70	5/11/20	23,3	47,7	57,66	24,7	7,39	1149	1,1	14
71	5/11/20	23,3	47,7	57,66	24,7	7,39	1144	1,1	13,6
72	4/11/20	25,5	40,2	57,66	25,5	7,4	1153	1	12,8
73	4/11/20	25,5	40,2	57,66	25,3	7,4	1124	1	12
74	4/11/20	24,2	42,4	57,66	25,6	7,4	1149	1	11,9
75	4/11/20	24,2	42,4	57,66	25,7	7,4	1144	1	12,4
76	11/11/20	23,3	46,2	97,56	22,6	7,04	1057	0,07	9,6
77	11/11/20	23,3	46,2	97,56	52,7	7,04	1044	0,09	10
78	10/11/20	23,6	51,6	97,56	22	7,29	997	0,08	11,3
79	10/11/20	23,6	51,6	97,56	54	7,29	997	0,45	14,2
80	10/11/20	23,5	51,8	97,56	22,7	7,29	1057	0,09	10
81	10/11/20	23,5	51,8	97,56	53,9	7,29	1044	0,08	9,6
82	11/11/20	23,3	46,2	97,56	22,2	7,04	1153	1,06	11,3
83	11/11/20	23,3	46,2	97,56	22	7,04	1124	1,06	14,2
84	10/11/20	23,6	51,6	97,56	24,4	7,29	1116	1,1	10
85	10/11/20	23,6	51,6	97,56	21,4	7,29	1122	1,1	9,6

Nº	Fecha	Temp_amb	Hum_rel	Dist	Temp_agua	PH	Conduct_µS	Cl_libre_mg/L	Dur_total_(FRº)
86	10/11/20	23,5	51,8	97,56	21,9	7,33	1153	1,06	9,6
87	10/11/20	23,5	51,8	97,56	21,4	7,33	1124	1,06	10
88	16/12/20	24,7	32,7	21	42,8	7,2	1057	0,07	11,5
89	16/12/20	24,7	32,7	21	38,4	7,2	1044	0,09	12
90	16/12/20	24,7	32,7	21	61	7,2	1030	0,08	10,4
91	15/12/20	25,1	35,8	21	40,7	7,29	1057	0,07	16,5
92	15/12/20	25,1	35,8	21	39,7	7,29	1044	0,02	14
93	15/12/20	25,1	35,8	21	62,6	7,29	1030	0	13,2
94	15/12/20	25,8	33,4	21	42	7,24	1057	0,09	14,1
95	15/12/20	25,8	33,4	21	40	7,24	1044	0,08	13,5
96	16/12/20	24,7	32,7	24	21,2	7,2	1149	1,16	11,5
97	16/12/20	24,7	32,7	24	22,6	7,2	1144	1,16	12
98	16/12/20	24,7	32,7	24	18,3	7,2	1147	1,16	10,4
99	15/12/20	25,1	35,8	24	20,5	7,24	1100	1,23	16,5
100	15/12/20	25,1	35,8	24	21,2	7,24	1149	1,23	14
101	15/12/20	25,1	35,8	24	18,5	7,24	1144	1,23	13,2
102	15/12/20	25,8	33,4	24	21,4	7,29	1100	1,23	14,3
103	15/12/20	25,8	33,4	24	23,6	7,29	1167	1,23	13,6
104	15/12/20	25,8	33,4	24	20,6	7,29	1148	1,23	11,8
105	2/2/21	23,7	36,8	12	20,7	7,35	1057	0,07	24
106	2/2/21	23,7	36,8	12	22,1	7,35	1044	0,02	22,3
107	2/2/21	23,7	36,8	12	38,8	7,35	1030	0	21,5
108	2/2/21	23,7	36,8	12	20,7	7,26	1057	0,07	25,6
109	2/2/21	23,7	36,8	12	22,1	7,26	1044	0,09	24
110	2/2/21	23,7	36,8	12	38,8	7,26	1030	0,08	23,6
111	2/2/21	24,5	35	12	21,2	7,32	1057	0,07	24
112	2/2/21	24,5	35	12	22,7	7,32	1044	0,02	22,3
113	2/2/21	24,5	35	12	37,2	7,32	1036	0	21,5
114	2/2/21	23,7	36,8	15	20,5	7,26	1162	1,21	24

Nº	Fecha	Temp_amb	Hum_rel	Dist	Temp_agua	PH	Conduct_µS	Cl_libre_mg/L	Dur_total_(FRº)
115	2/2/21	23,7	36,8	15	18,7	7,26	1164	1,21	25,3
116	2/2/21	23,7	36,8	15	17,7	7,26	1155	1,21	22,8
117	2/2/21	24,5	35	15	20,4	7,35	1155	1,24	26,1
118	2/2/21	24,5	35	15	20,6	7,35	1165	1,24	24
119	2/2/21	24,5	35	15	18,2	7,35	1143	1,24	22
120	6/4/21	25,8	45,1	9	23,6	7,3	1065	0,07	24
121	6/4/21	25,8	45,1	9	20,9	7,3	1033	0,09	25,3
122	6/4/21	25,8	45,1	9	28,8	7,3	1022	0,08	16,3
123	6/4/21	25,8	45,1	9	23,6	7,31	1065	0,07	21
124	6/4/21	25,8	45,1	9	20,9	7,31	1033	0,02	22
125	6/4/21	25,8	45,1	9	28,8	7,31	1022	0	23,1
126	6/4/21	27,1	38,3	9	23	7,3	1044	0,09	23,8
127	6/4/21	27,1	38,3	9	21,7	7,3	1055	0,08	24,1
128	6/4/21	27,1	38,3	12	23,1	7,32	1149	0,56	24,6
129	6/4/21	27,1	38,3	12	20,7	7,32	1144	0,55	23,5
130	6/4/21	27,1	38,3	12	18,7	7,32	1147	1	21
131	6/4/21	25,8	45,1	12	23,7	7,31	1100	1,2	20
132	6/4/21	25,8	45,1	12	20	7,31	1149	1,2	24
133	6/4/21	25,8	45,1	12	18,5	7,31	1144	1,2	23,6
134	6/4/21	27,1	38,3	12	23,1	7,3	1100	0,44	25,4
135	6/4/21	27,1	38,3	12	20,7	7,3	1167	0,35	22
136	6/4/21	27,1	38,3	12	18,7	7,3	1148	1,1	20

N: n. de muestra; fecha: fecha de recogida de la muestra; Temp_amb: temperatura ambiente al momento de recogida de la muestra; Hum_rel: humedad relativa del ambiente en porcentaje al momento de recogida de la muestra; Dist: distancia en metros; Temp_agua: temperatura del agua; Conduct_µS: conductividad; Cl_libre: cloro libre; Dur_total: dureza total del agua.