

FUNDACIÓN RAMÓN ARECES

Legionella y legionelosis: virulencia, aspectos clínicos y su control

Gestión de Instalaciones de Riesgo



Vicente Catalán

14 Febrero

MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO

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.*

OBJETO

Prevención y control de la legionelosis mediante la adopción de medidas higiénico-sanitarias en aquellas instalaciones en las que *Legionella* es capaz de proliferar y diseminarse

- Ámbito de actuación
- Notificación de instalaciones
- Responsabilidades de titulares
- Registro de operaciones de mantenimiento
- Medidas preventivas
- Programas de mantenimiento
- Prevención de riesgo laborales
- Inspección sanitaria
- Actuaciones en las instalaciones
- Métodos de tratamiento
- Infracciones y sanciones
- ANEXO 3. Mantenimiento de instalaciones interiores de ACS y AFC
- ANEXO 4. Mantenimiento de torres de refrigeración y condensadores evaporativos
- ANEXO 5. Mantenimiento de bañeras y piscinas de hidromasaje de uso colectivo



Prevención y control de la proliferación y diseminación
de Legionella en instalaciones

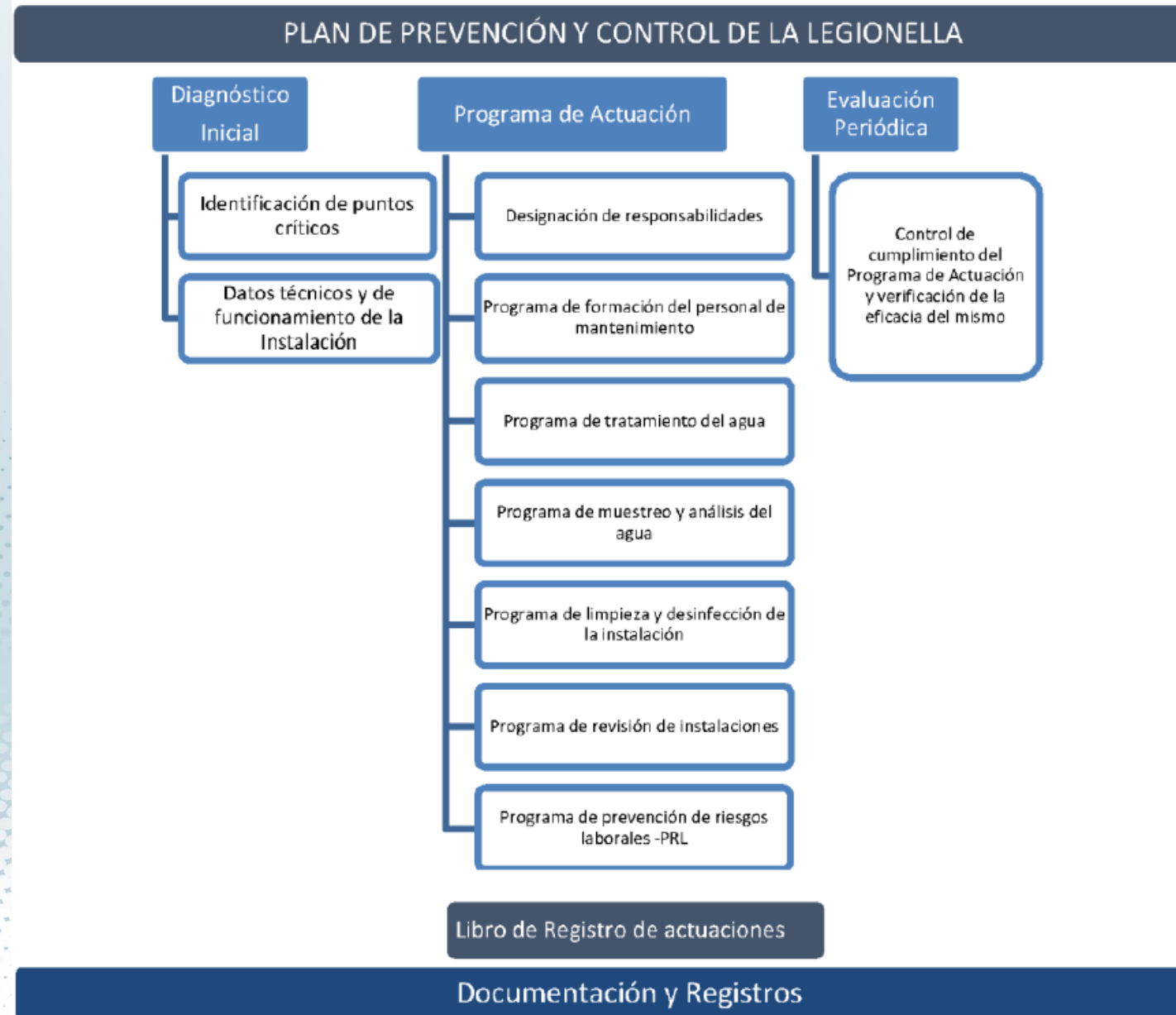
Esta norma ha sido elaborada por el comité técnico
CTN 100 Climatización, cuya secretaría desempeña
AFEC.



1. Objeto y campo de aplicación
2. Normas para consulta (12 referencias en el texto)
3. Definiciones (51)
4. Generalidades
5. Instalaciones implicadas (24 mencionadas, 17 de su ámbito y 14 desarrolladas)
6. Requisitos aplicables a las instalaciones: criterios generales con fase de diseño y montaje, fase de explotación y criterios específicos completos para 14 instalaciones
7. Actuaciones ante casos o brotes (autoridad sanitaria)
8. Bibliografía (104 referencias)

ANEXOS

- A. Prevención riesgos laborales (PRL) - Informativo
- B. Operaciones que pueden ser efectuadas por el personal propio de la instalación - Informativo
- C. Conocimientos mínimos del personal propio del titular de la instalación - Informativo
- D. Requisitos adicionales para las empresas de prevención y control de *Legionella* demuestren su solvencia técnica - Informativo
- E. Protocolo de actuación ante resultados microbiológicos no conformes en controles rutinarios en las instalaciones - Normativo
- F. Protocolo de toma y transporte de muestras de agua. Informe de ensayo - Normativo
- G. Eficacia del hipoclorito sódico en función del pH - Informativo
- H. Protocolo de limpieza y desinfección de instalaciones - Informativo
- I. Descripción de tecnologías de tratamiento y desinfección de agua - Informativo



NOVEDADES

1. Define y estructura un PPCL
2. Se definen nuevos criterios técnicos en fase diseño y explotación
3. Se detallan muchas tablas resumen de los Programas de Actuación por cada instalación desarrollada
4. Se definen conceptos hasta ahora no definidos claramente.
5. Se establece la solvencia técnica voluntaria de las empresas del sector
6. Se concretas pautas de actuación para positivos de *Legionella* para cada instalación desarrollada y una genérica para “otras instalaciones”
7. Se describen nuevos protocolos detallados de L+D y su correspondiente certificado
8. Se especifica muy bien el protocolo de toma de muestra de agua y torunda indicando claramente cuando es necesario. Complementario al anexo 6 del RD 865
9. Se menciona que el ensayo de *Legionella* debe ser acreditado y la toma de muestras acreditada o según Anexo F de la propia Norma. Para ensayos rutinarios y complementarios a los mínimos indicados en el RD 865, se abre la puerta a ensayos rápidos validados técnicamente y certificados por un organismo nacional o internacional
10. Se detalla muy bien toda la información que debe contener los Informes analíticos de *Legionella* y F/Q (neutralizante, hora, pre flush, post flush, limite de cuantificación, torunda, etc..)

Aplicación de la **Norma UNE 100030:2017** respecto a lo establecido en el **Real Decreto 865/2003**

Documento elaborado por
ANECPLA, AQUA ESPAÑA y FEDECAI
Asociaciones nacionales que representan al Sector
profesional de Prevención y Control de la Legionella
en España

Enero 2018

Marco normativo: UNE 100030

- Tabla 1. **Aspectos contradictorios** identificados en la Norma UNE 100030:2017 respecto al R.D. 865/2003
- Tabla 2. **Aspectos voluntarios** más estrictos identificados de la Norma UNE 100030:2017 respecto al R.D. 865/2003
- Anexo1. Aclaraciones sobre algunos **aspectos complementarios**
 1. Toma de muestras de agua para análisis de *Legionella*.
 2. Número de muestras de Autocontrol de las instalaciones de riesgo en torres de refrigeración y agua sanitaria.
 3. Método de análisis para la determinación de *Legionella*
 4. Instalaciones de Riesgo No desarrolladas en el Real Decreto
 5. Eficacia Separadores de gotas de torres de refrigeración
 - 6.- Posibles contradicciones entre la norma y legislaciones autonómicas.
 7. Guía Técnica de Prevención de legionelosis del Ministerio de Sanidad

Artículo 6. *Medidas preventivas: principios generales.*

Con carácter complementario se tendrá en cuenta lo establecido en la Norma UNE 100030 IN Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones.

R.D. 865:2003**Artículo 13. Métodos de tratamiento**

- 1.Desinfectantes autorizados por la DGSP
- 2.Físico: Equipos de filtración, UV, elevación T^a, etc.
- 3.Físico-químicos: Electroquímicos

ANEXOS 3, 4 y 5. Mantenimiento de instalaciones

Tratamientos químicos: Cloro
Tratamientos físicos: Elevación T^a

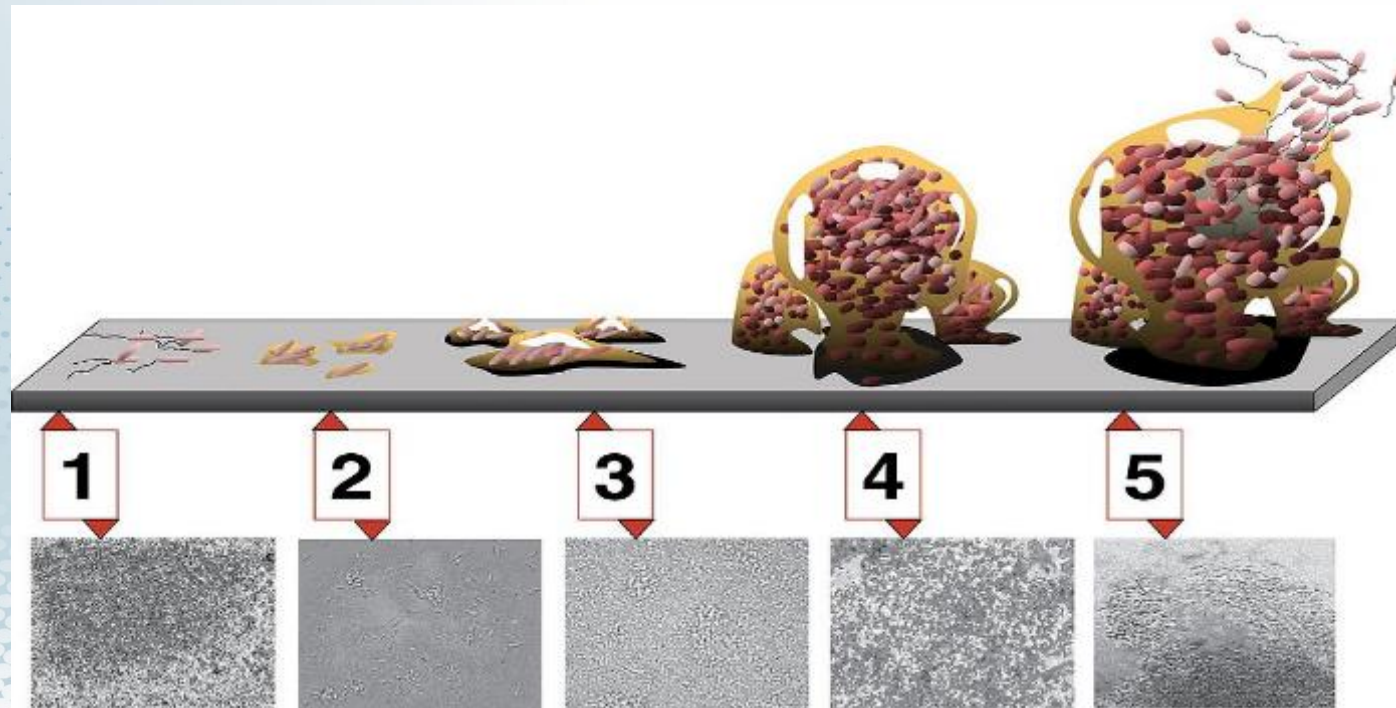
UNE 100030**ANEXO I. Tecnologías de tratamiento y desinfección**

Químicos (Biocidas oxidantes y no oxidantes)
Físicos (Filtración, UV, T^a)
Físico-químicos (Cu-Ag, Fotocatálisis, Ozono)

ANEXO H. Protocolos de limpieza y desinfección

Tratamientos químicos: Cloro
Tratamientos físicos: Elevación T^a

El biofilm juega un papel fundamental en la supervivencia y proliferación de *Legionella* en los sistemas de agua



Monitorización

- **Sensores** basados en ondas acústicas de superficie.



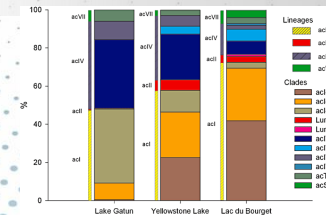
Prevención

- **Recubrimientos** para inhibir su crecimiento: Superficies lisas, nanopartículas...
- **Sistemas físicos** (ultrasonidos)...



Caracterización

- **Estudio Básico:** Rascado con Hisópo estéril y cultivo
- **Estudio avanzado:** Análisis estructurales, de densidad de bacterias y de actividad enzimática.
- **Metagenómica:** Análisis de poblaciones



Tratamiento

- Tecnologías de limpieza y desinfección **convencionales...**
- **Tecnologías avanzadas:** Air Bubbles, Ice Pigging...

COUPONS



- Mismo material de la instalación
- No necesario corte de suministro para el muestreo
- Permite el seguimiento temporal de la colonización.
- Área conocida y capacidad de cuantificación





AIR BUBBLES



Aumento de temperatura estable por encima de 70°C a flujo constante



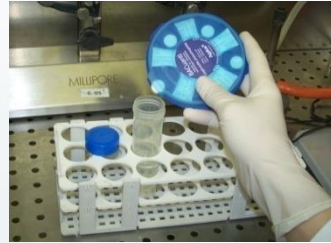
Inyección de burbujas de aire en agua que induce oscilaciones bruscas de presión en la matriz biofilm-pared



Residual estable de biocida autorizado efectivo contra el biofilm







Diagnóstico ambiental de *Legionella*

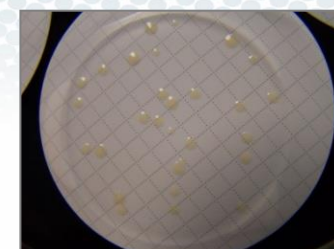
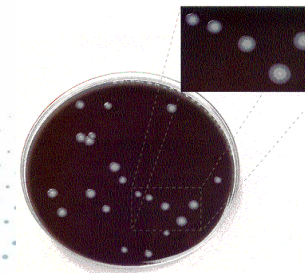
DETECCIÓN Y RECuento MEDIANTE CULTIVO (ISO 11731)

➤ ISO 11731:2017. Water quality – Enumeration of *Legionella*

Se contempla análisis de
swabs/biofilm.

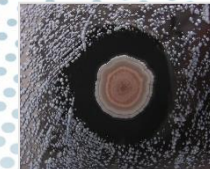
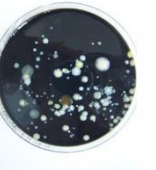
VENTAJAS DEL CULTIVO

- Metodología **normalizada, relativamente sencilla.**
- **Metodología de referencia** en legislaciones / Unidades de expresión de resultados
- Posibilidad de disponer de **biomasa** del microorganismo, para estudios posteriores (serogrupo, estudios epidemiológicos, etc.)



LIMITACIONES DEL CULTIVO

- **Tiempo** requerido para obtención de resultados: hasta 12 días
- Imposibilidad de detectar **viables no cultivables (VBNC)**
- Baja **especificidad** - Interferencia por **microbiota acompañante**
- Tasas de **recuperación** bajas



NECESIDAD
MÉTODOS
RÁPIDOS/ALTERNATIVOS

UNE 100030:2017 (Anexo E)

“Cuando con una determinación de *Legionella* spp por cultivo no se pueda obtener un resultado concluyente por flora interferente, se recomienda valorar la posibilidad de llevar a cabo un análisis de *Legionella* por un método validado y certificado alternativo al cultivo”

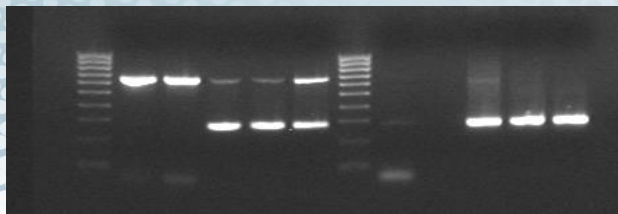
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

- Amplificación enzimática *in vitro* de regiones específicas de DNA mediante ciclos de desnaturalización, hibridación de oligonucleótidos cebadores y polimerización.

PCR convencional (cualitativa)



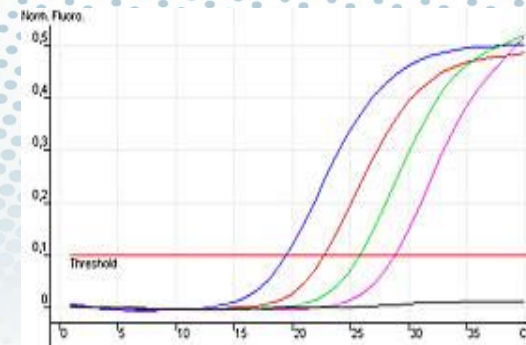
El resultado se analiza tras electroforesis en gel de garosa en presencia de EtBr/otros



Presencia/Ausencia
(DNA de *Legionella*)

PCR a tiempo real (qPCR)

La reacción se puede seguir a tiempo real, por aumento exponencial de la fluorescencia de la muestra



La ecuación de la regresión lineal de la recta de calibrado permite calcular el nº UG de la muestra

nº UG (unidades genómicas)

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, July 2005, p. 3433–3441
0099-2240/05/\$08.00+0 doi:10.1128/AEM.71.7.3433–3441.2005
Copyright © 2005, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 71, No. 7

Quantitative Detection of *Legionella pneumophila* in Water Samples by Immunomagnetic Purification and Real-Time PCR Amplification of the *dotA* Gene

M. A. Yáñez, C. Carrasco-Serrano, V. M. Barberá, and V. Catalán*

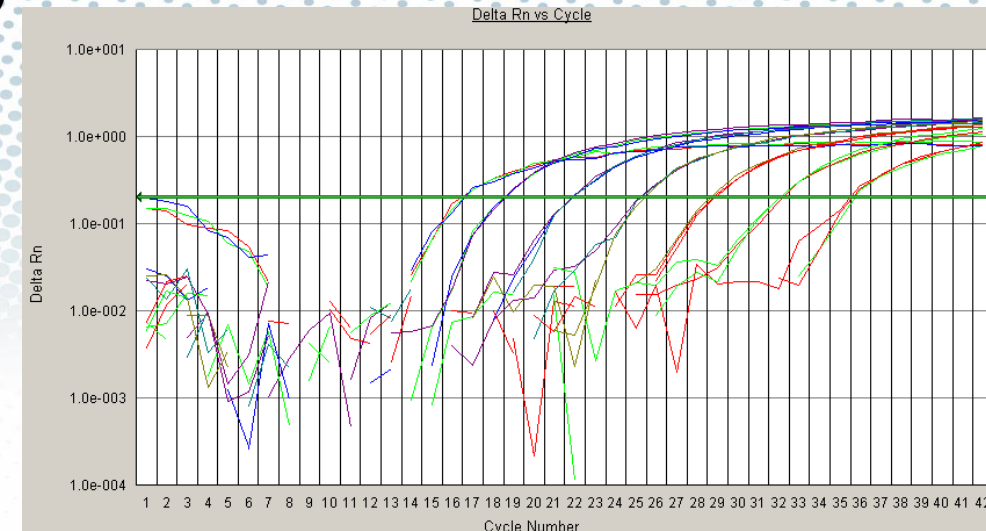
Labagua, Alicante, Spain

VENTAJAS qPCR:

- ✓ Rapidez (24-48 h)
- ✓ Especificidad
- ✓ Detección de células viables no cultivables (VBNC)
- ✓ Contemplada en normas internacionales (ISO/TS 12869) y en legislaciones de algunos países.
- ✓ No existe interferencia por microbiota acompañante.

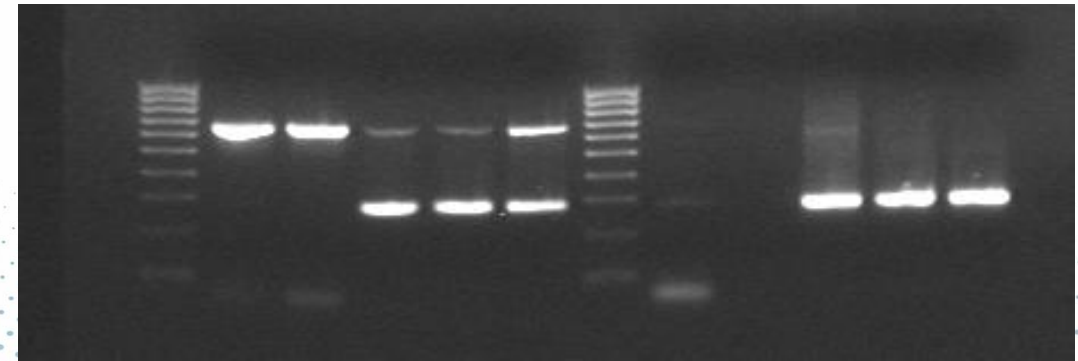
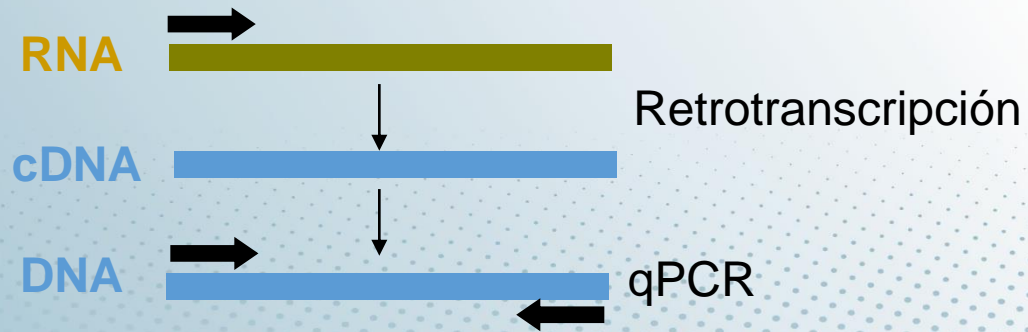
LIMITACIONES qPCR:

- ✓ Técnica laboriosa
- ✓ No considerado método de referencia (para controles oficiales).
- ✓ A veces el límite de detección es elevado (depende del método aplicado y la naturaleza de la muestra).
- ✓ Puede haber problemas de inhibición o interferencia por componentes de la muestra (metales, algún compuesto orgánico, etc.).
- ✓ Dificultad de establecer equivalencia entre UFC y UG
- ✓ Si se aplica qPCR se detectan células vivas y muertas (DNA)



REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

PCR viable



PRINCIPAL LIMITACIÓN DE LA vPCR

- Molécula diana muy lábil (RNA)
- Método cualitativo (P/A)

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Uso de **Monoazida de Propidio (PMA)** combinado con **qPCR**

Journal of Microbiological Methods 85 (2011) 124–130



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

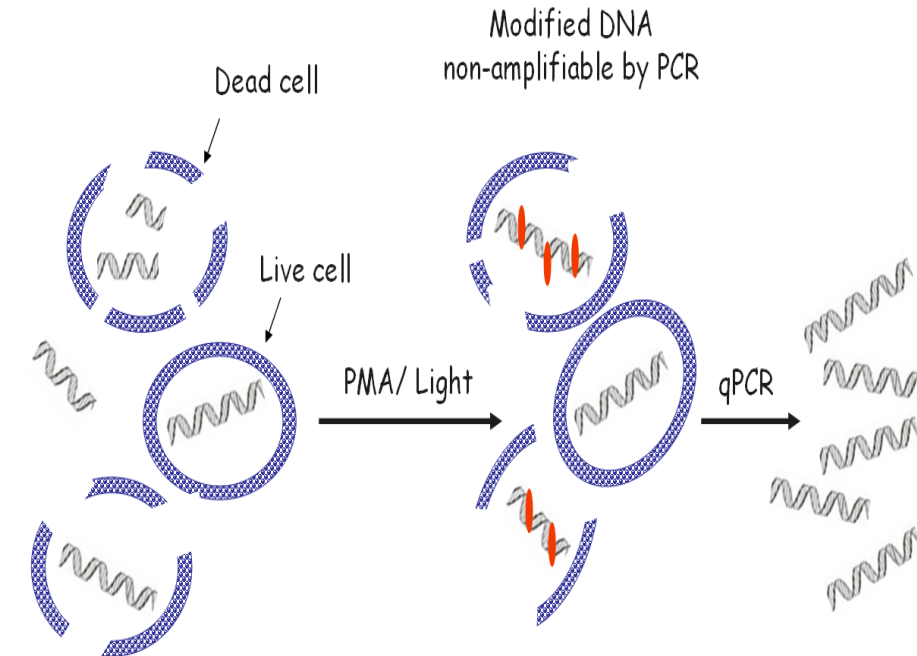


Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR

M. Adela Yáñez ^a, Andreas Nocker ^b, Elena Soria-Soria ^a, Raquel Múrtula ^a,
Lorena Martínez ^a, Vicente Catalán ^{a,*}

^a LABAQUA, S.A., c) Del Dracma, 16-18, 0314 Alicante, Spain

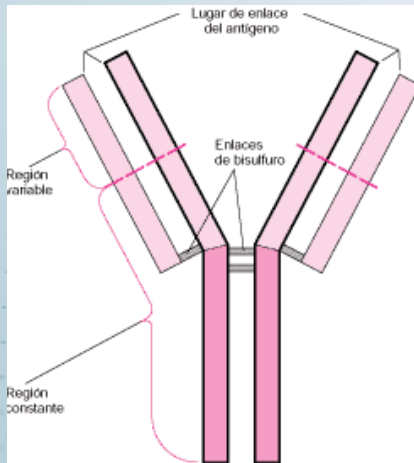
^b Water Sciences Institute, Cranfield University, Cranfield, Bedfordshire, MK43 0AL, UK



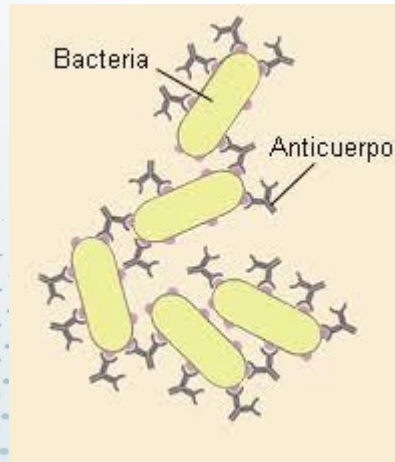
Características de los métodos basados en PCR vs. cultivo

Especificaciones	Cultivo	PCR	qPCR	vPCR (viable)	PMA-qPCR
Tiempo resultados	10-12 días	6 h	4 h	6 h	6 h
Interferencias con otra microbiota	Alta	Muy baja	Muy baja	Muy baja	Muy baja
Células viables pero no cultivables (VBNC)	No se detectan	Se detectan	Se detectan	Se detectan	Se detectan
Células cultivables	Se detectan	Se detectan	Se detectan	Se detectan	Se detectan
Células muertas	No se detectan	Se detectan	Se detectan	No se detectan	No se detectan
Especificidad	Baja	Alta	Alta	Alta	Alta
Método estándar	Sí	No	No	No	No
Coste	Bajo	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado
Expresión de resultados	UFC	Presencia/Ausencia	UG	Presencia/Ausencia	UG

DETECCIÓN INMUNOLÓGICA



ANTICUERPO



REACCIÓN ANTÍGENO- ANTICUERPO

MARCAJE DEL ANTICUERPO CON:

- molécula fluorescente
- enzima
- partícula magnética



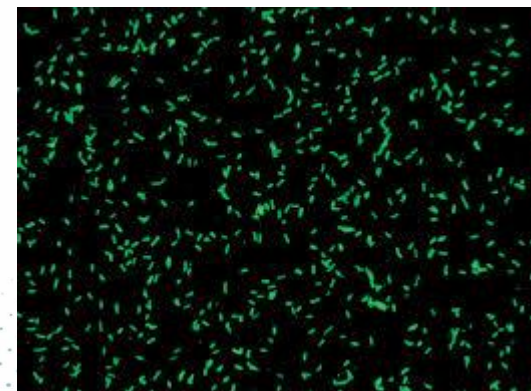
INFINITAS POSIBILIDADES PARA EL
DESARROLLO DE MÉTODOS DE
DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS

- Varios test en el mercado
- Lectura de resultados: colorimétrica (interpretación visual o espectrofotómetro), al microscopio, citometría, etc.
- Puede combinarse con separación magnética, para eliminación de interferentes

DETECCIÓN INMUNOLÓGICA

VENTAJAS:

- ✓ Rapidez
- ✓ Posibilidad de realizarlo *in situ* (en la instalación)
- ✓ Algunos test del mercado están validados y con certificación internacional



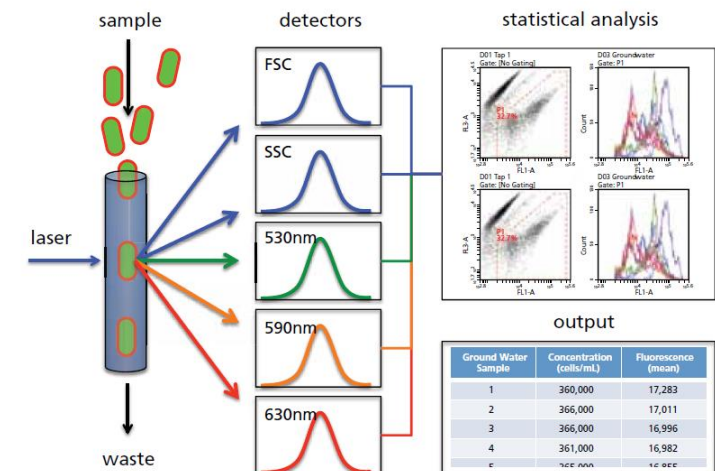
LIMITACIONES:

- ✓ No es un método normalizado
- ✓ Resultado: Presencia/Ausencia, con estimación de la población en UFC en base a estudios previos
- ✓ Resultados positivos deben confirmarse por cultivo
- ✓ Límite de detección elevado (depende del test)
- ✓ Especificidad dependiente del anticuerpo empleado
- ✓ La diana suele ser la especie *L. pneumophila* (vs. *Legionella* spp en legislaciones)
- ✓ Susceptible de interferencias por la matriz (pH, sales, etc.)

CITOMETRÍA DE FLUJO

- Detección de partículas o células contenidas en una muestra líquida, al pasar por un capilar donde incide un láser.
- Detectores ópticos recogen la luz transmitida y dispersada, y la emisión de fluorescencia (si se ha realizado marcaje de la muestra), y realiza análisis estadístico en el que se muestra el tamaño y complejidad de las partículas detectadas, la cuantificación, etc.

↓
Eventos/vol examinado



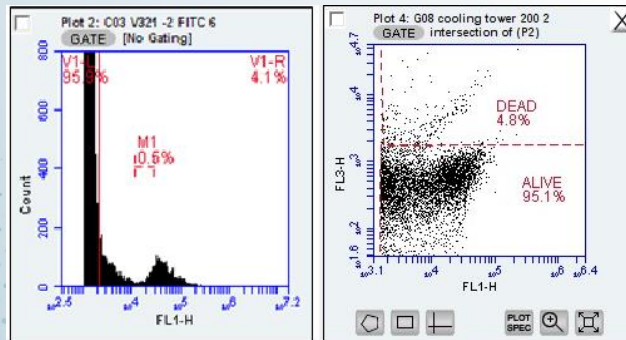
- Pueden detectarse microorganismos concretos, marcando previamente la muestra con un anticuerpo específico conjugado con un fluoróforo → técnica inmunológica (inmunodetección)

CITOMETRÍA DE FLUJO

Concentración de la muestra
(FM y elución o centrifugación)

30 min

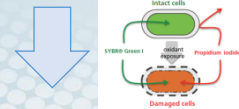
RECuento TOTAL



< 1 hora

Incubación con SYBR Green + IP

15 min

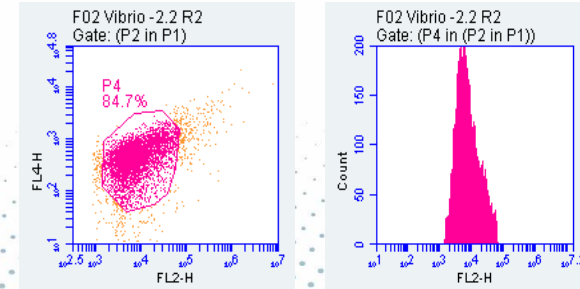


Citometría de flujo

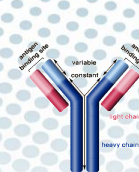
10 min

Resultado

DETECCIÓN ESPECÍFICA



Incubación con anticuerpo
específico + IP



1 h

Citometría de flujo

10 min

Resultado

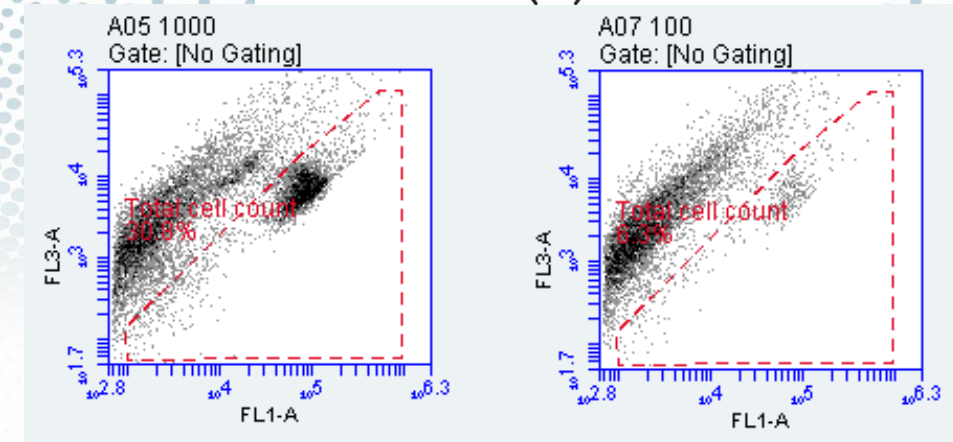
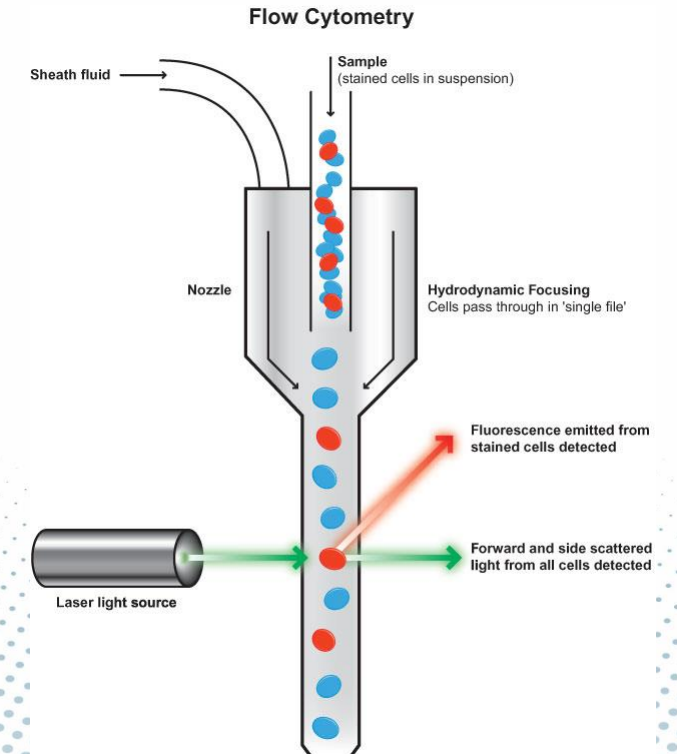
< 2 horas

VENTAJAS:

- ✓ Rapidez
- ✓ Si se usa IP ofrece información sobre la viabilidad de la población
- ✓ Buena correlación con cultivo (aunque habitualmente recuentos superiores)

LIMITACIONES:

- ✓ No es un método normalizado
- ✓ Límite de detección elevado
- ✓ Especificidad dependiente del anticuerpo empleado
- ✓ Se necesita experiencia en la interpretación de resultados





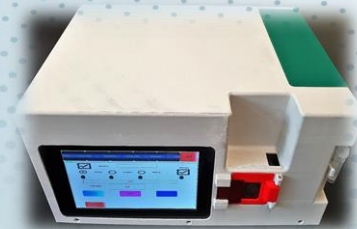
“Integrated and portable image cytometer for automatic on-site analysis of microorganisms in water”



Concentrador



Microfluidica



Lector



LABAQUA

MEM TEQ

bertin
TECHNOLOGIES

microTEC

ICFO



Dado de TODOS los métodos rápidos tienen ventajas y limitaciones, la selección de uno u otro depende del uso previsto:

¿Cuáles son los **usos más frecuentes** de los métodos rápidos?

- Verificación de la efectividad de una acción correctora y/o limpieza y desinfección.
- Mapeo de puntos críticos en la instalación de riesgo (*screening* inicial para identificación de positivos).
- Como parte del programa de autocontrol de la instalación (controles rutinarios)

Consideraciones a tener en cuenta a la hora de elegir un método rápido

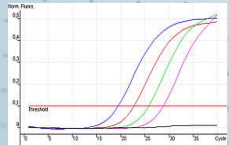
- ✓ Coste-beneficio
- ✓ Equivalencia con el método de referencia (Cultivo, UFC)
- ✓ Tipo de información que ofrece cada método
- ✓ Validación/Certificación. El método debe validarse en base a la norma ISO 16140.
- ✓ En el uso de test o kits comerciales, debe tenerse en cuenta el documento G-ENAC-20 “Guía para la selección y utilización de kits de ensayo por los laboratorios acreditados”



Laboratorios
acreditados ISO 17025

¿Como se recoge el uso de métodos rápidos en el Anexo E (Normativo); Protocolo de actuación ante resultados microbiológicos en controles rutinarios en las instalaciones?

Análisis de *Legionella*
mediante qPCR



Positivo (UG)

Acción correctiva o LyD
(teniendo en cuenta niveles recomendados
por la comunidad científica)

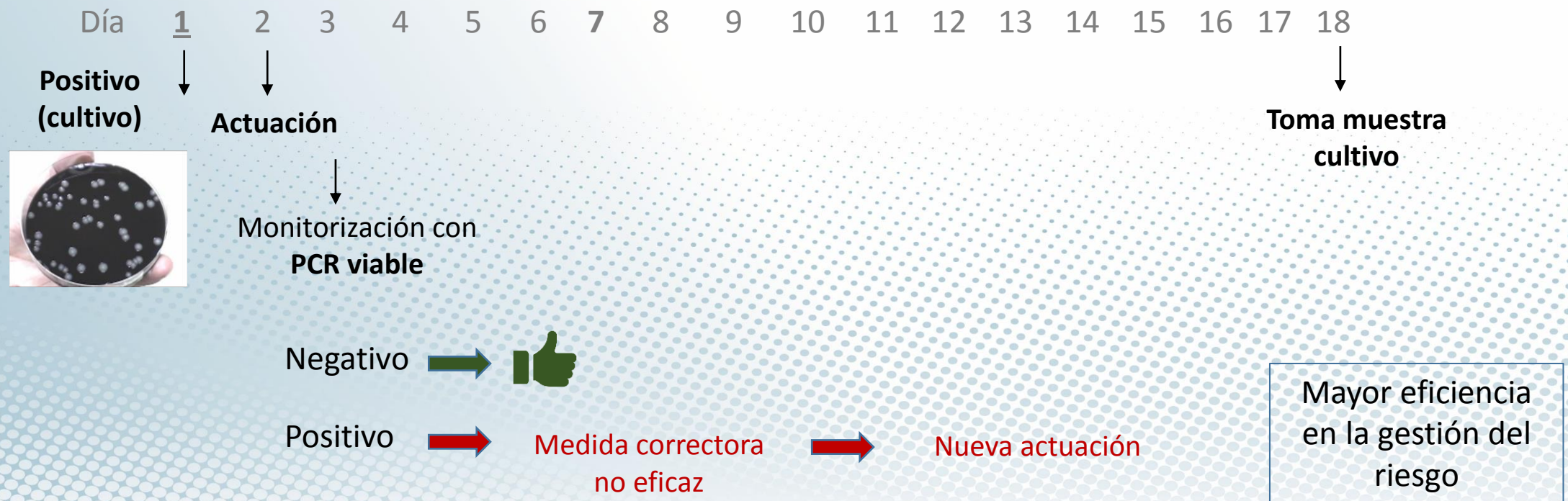
Negativo: No detectado

No se requiere análisis
posterior por cultivo

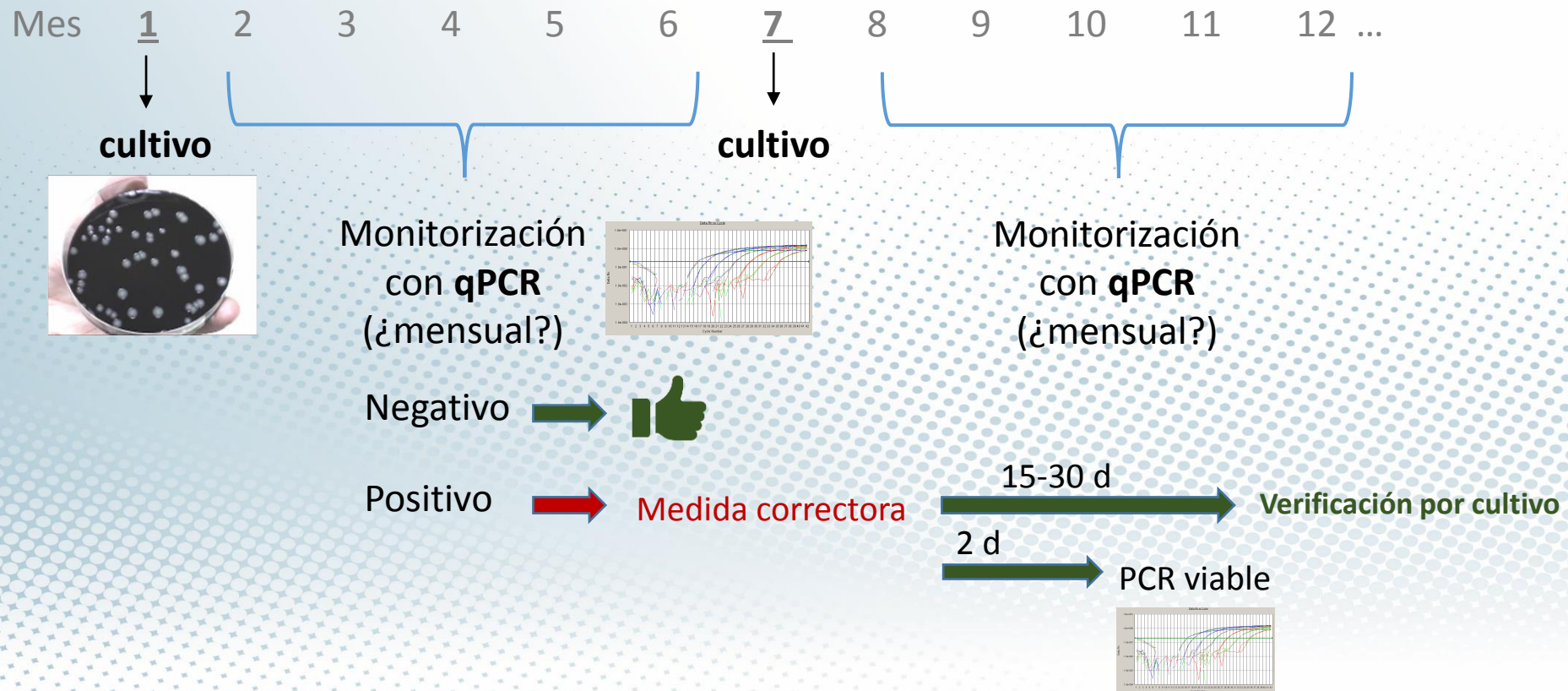
Confirmar la situación mediante
análisis por cultivo



Ejemplo 1: tras obtención de un positivo por cultivo



Ejemplo 2: Esquema de autocontrol de una instalación mediante qPCR



CONCLUSIONES

1. Importancia del biofilm en la prevención y control de *Legionella*
2. Necesidad de nuevas tecnologías de desinfección sostenibles y eficaces
3. Importancia de nuevos métodos rápidos en el diagnóstico medioambiental de *Legionella*

