



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Evaluación de los factores que determinan la proliferación de la bacteria *Legionella pneumophila* en circuitos de agua caliente sanitaria y agua fría de consumo humano

D. Miguel Ángel Redondo Cadenas

2024



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Evaluación de los factores que determinan la proliferación de la bacteria *Legionella pneumophila* en circuitos de agua caliente sanitaria y agua fría de consumo humano

Autor: D. Miguel Ángel Redondo Cadenas

Directores: D. Carlos Gutiérrez Ortega
D. José Manuel Viñuela Martínez

Tutora: D.^a Laura del Río Alonso



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D. MIGUEL ÁNGEL REDONDO CADENAS

doctorando del Programa de Doctorado en

CIENCIAS VETERINARIAS

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Evaluación de los factores que determinan la proliferación de la bacteria *Legionella pneumophila* en circuitos de agua caliente sanitaria y agua fría de consumo humano

y dirigida por,

D. CARLOS GUTIÉRREZ ORTEGA

D. JOSÉ MANUEL VIÑUELA MARTÍNEZ

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 21 de septiembre de 2024

**REDONDO
CADENAS
MIGUEL ÁNGEL**

Firmado
digitalmente por
**REDONDO
CADENAS MIGUEL
ÁNGEL**

Fdo.: Miguel Ángel Redondo Cadenas

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

DEDICATORIA:

Me gustaría en estas líneas, tener una especial atención con todas aquellas personas, que no siguen su camino en la vida al son de estándares marcados previamente, sino que han tenido y siguen teniendo el interés por establecer criterio propio, que han decidido que su existencia debe ser diferente, creativa y lo más intensa posible. Personas que construyen su vida basándose en su esfuerzo personal, con el escaso reconocimiento que ello supone, teniendo claro que la felicidad tampoco está en lo que otros dicen, sino en todo aquello por lo que de verdad alguna vez se siente satisfacción, y saben que, en algún momento, darán un ejemplo de avance y superación que siempre será recompensado.

Quiero también acordarme de aquellos que, como yo, han tenido la suerte de nacer y crecer en un pequeño pueblo de la geografía española. Esos valores adquiridos en estos entornos rurales pequeños son a día de hoy un tesoro y tienen con toda seguridad un encaje especial en esta España del siglo XXI.

AGRADECIMIENTOS:

Los años de ejercicio de la inspección de salud pública en el ámbito de la sanidad ambiental por parte del autor, llevan a la conclusión de que la adecuación de las instalaciones dentro de los programas de mantenimiento preventivo de la proliferación de *Legionella* en muestras ambientales, en lo que se refiere a determinadas situaciones, como por ejemplo el filtrado del agua de aporte en los circuitos de acceso a los edificios de uso humano, el mantenimiento de un nivel estable a lo largo del tiempo y en la franja alta, del nivel permitido por la legislación del biocida añadido al agua, así como las características de los materiales de las conducciones de agua potable, son determinantes en la prevención de la proliferación de la bacteria *Legionella*.

En este apartado, quiero expresar mis personales agradecimientos: a mis padres, por haber hecho lo imposible para que sus hijos avanzaran en la vida, a mis hermanos por comprenderme siempre, a mi mujer y a mi hija por ilusionarse con mis proyectos, a los directores D. José Manuel Viñuela por apoyarme siempre en el estudio llevado a cabo, y D. Carlos Gutiérrez Ortega por sus precisas indicaciones y directrices, a la tutora del proyecto Doña Laura del Río Alonso por su paciencia y perseverancia en el cumplimiento de las directrices establecidas para que el proyecto saliese adelante y a D. José Galián por ayudarme de forma desinteresada y no dejar de creer que este proyecto algún día sería finalizado.

ÍNDICE GENERAL

	Página
PARTE PRELIMINAR	
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE GENERAL	V
PALABRAS CLAVE.....	VII
LISTADO DE TABLAS	VII
LISTADO DE FIGURAS.....	IX
LISTADO DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS Y SÍMBOLOS	XIII
RESUMEN	XVII
ABSTRACT	XIX
1.-INTRODUCCIÓN	
1.1.- Estado de conocimiento del tema	1
1.1.1.- Antecedentes históricos	2
1.1.2.- Características del género <i>Legionella</i>	4
1.1.2.1.- Taxonomía, características morfológicas y fisiológicas, factores de virulencia.....	7
1.1.2.2.- Ecología y parámetros fisicoquímicos determinantes de la presencia de <i>Legionella</i>	9
1.1.3.- Legionelosis	16
1.1.3.1.- Aspectos clínicos, factores de riesgo, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad	26
1.1.3.2.- Epidemiología	48
1.1.4.- Prevención y control de la legionelosis.....	56
V	
1.1.4.1.- Evolución del enfoque en la prevención y control de la proliferación	

de <i>Legionella</i> y su reflejo en los aspectos históricos de las normativas higiénico-sanitarias, hasta la actualidad	69
1.1.4.2.- Instalaciones de riesgo.....	77
1.1.5.- Presencia de <i>Legionella</i> en instalaciones de agua sanitaria	86
1.1.5.1.- Diseño y características estructurales de las instalaciones	94
1.1.5.2.- Medidas preventivas y de control	101
1.1.6.- Desinfección de agua sanitaria	105
1.1.6.1.- Métodos de desinfección.....	113
1.1.6.2.- Controversias ante la colonización y persistencia de la bacteria en las instalaciones.....	116
1.2.- Justificación del estudio	122
1.3.- Hipótesis y objetivos propuestos	131
 2.- MATERIAL Y MÉTODOS	
2.1.- Diseño experimental del estudio. Selección de muestras y método de detección y recuento de <i>Legionella</i> spp. Metodología	133
2.2.- Estudio estadístico	138
 3.- RESULTADOS	
3.1.- Análisis descriptivo general de la prevalencia de <i>Legionella</i> en instalaciones de riesgo	139
3.2.- Efectividad de los tratamientos de desinfección en instalaciones de agua sanitaria	151
 4.- DISCUSIÓN	157
 5.- CONCLUSIONES.....	165
 6.- BIBLIOGRAFÍA.....	167
 7.-ANEXO LEGISLATIVO	203

PALABRAS CLAVE: *Legionella pneumophila*, legionelosis, hipercloración

LISTADO DE TABLAS:

<i>TABLA 1: Medidas para instalaciones de agua caliente sanitaria y agua fría de consumo humano en función de los resultados analíticos de Legionella spp</i>	<i>92</i>
<i>TABLA 2: Registro de datos de la toma de muestra de Legionella spp. según el Real Decreto 487/2022</i>	<i>93</i>
<i>TABLA 3: Análisis descriptivo. Desglose de la procedencia de las muestras entre los circuitos de ACS y de AFCH</i>	<i>139</i>
<i>TABLA 4: Análisis descriptivo en función del serogrupo obtenido en el resultado</i>	<i>140</i>
<i>TABLA 5: Análisis descriptivo. Número y porcentaje de muestras recogidas en cada mes del año.....</i>	<i>141</i>
<i>TABLA 6: Análisis descriptivo en función de tipo de instalación de procedencia de la muestra.....</i>	<i>142</i>
<i>TABLA 7: Análisis descriptivo y comparativo del resultado de la prueba según la procedencia de ACS o de AFCH</i>	<i>143</i>
<i>TABLA 8: Análisis descriptivo y comparativo del resultado de la prueba de muestras procedentes de agua sanitaria o de equipos de enfriamiento y humectación</i>	<i>143</i>
<i>TABLA 9: Análisis descriptivo y comparativo del resultado de la prueba según instalación de procedencia, almacenes de ACS, almacenes de agua fría, puntos terminales de red de ACS y puntos terminales de red de AFCH....</i>	<i>145</i>
<i>TABLA 10: Análisis descriptivo y comparativo del resultado de la prueba según periodo térmico en el que se toman las muestras</i>	<i>147</i>
<i>TABLA 11: Descriptivo y comparativo del resultado de la prueba según el nivel de biocida cloro libre residual de la instalación de procedencia de las muestras</i>	<i>148</i>

<i>TABLA 12: Descriptivo y comparativo del resultado de la prueba según temperatura del agua de la instalación de donde procede la muestra</i>	<i>149</i>
<i>TABLA 13: Prevalencia de serogrupos de L. pneumophila en las muestras positivas de AFCH</i>	<i>150</i>
<i>TABLA 14: Prevalencia de serogrupos de L. pneumophila en las muestras positivas de ACS</i>	<i>151</i>
<i>TABLA 15: Estudio descriptivo y comparativo del resultado de la prueba según la procedencia de los resultados de grupo A o grupo B, de las instalaciones de ACS.....</i>	<i>152</i>
<i>TABLA 16: Estudio descriptivo y comparativo del serogrupo según la procedencia de la instalación de ACS en el grupo A o en el grupo B</i>	<i>153</i>
<i>TABLA 17: Estudio descriptivo y comparativo del resultado de la prueba según la procedencia de los resultados de grupo A o grupo B, de las instalaciones de AFCH.....</i>	<i>154</i>
<i>TABLA 18: Estudio descriptivo y comparativo del serogrupo según la procedencia de la instalación de AFCH en el grupo A o en el grupo B</i>	<i>155</i>

LISTADO DE FIGURAS:

<i>FIGURA 1: Tasas de notificación de legionelosis por 100 000 habitantes según el año de inicio síntomas y el sexo en España. Años 2012 a 2022</i>	<i>3</i>
<i>FIGURA 2: Imagen recreativa tridimensional de la bacteria Legionella. Visión mediante microscopio electrónico</i>	<i>5</i>
<i>FIGURA 3: Tasas de notificación de legionelosis por 100000 habitantes según la comunidad autónoma. Año 2022</i>	<i>19</i>
<i>FIGURA 4: Evolución de la mediana de casos comunicados de legionelosis comparativa 2017-2021/2022</i>	<i>20</i>
<i>FIGURA 5: Tasas de notificación de legionelosis en España según la edad en hombres. Años 2012 a 2022</i>	<i>21</i>
<i>FIGURA 6: Tasas de notificación de legionelosis en España según la edad en mujeres. Años 2012 a 2022.....</i>	<i>21</i>
<i>FIGURA 7: Tasas de notificación de legionelosis en España según la edad y el sexo en España. Año 2022</i>	<i>22</i>
<i>FIGURA8: Esquema de abordaje de Legionella a los macrófagos alveolares.....</i>	<i>27</i>
<i>FIGURA 9: Esquema de recepción de aerosoles por las vías respiratorias.....</i>	<i>28</i>
<i>FIGURA 10: Casos en viajeros nacionales y extranjeros asociados a viajar a España. Años 2012 a 2022</i>	<i>28</i>
<i>FIGURA 11: Imagen de microscopía fluorescente de Legionella</i>	<i>32</i>
<i>FIGURA 12: Esquema de invasión alveolar de Legionella.....</i>	<i>36</i>
<i>FIGURA 13: Tasas de mortalidad por legionelosis por grupo de edad en hombres. España. Años 2012 a 2022.....</i>	<i>38</i>
<i>FIGURA 14: Tasas de mortalidad por legionelosis por grupo de edad en mujeres. España. Años 2012 a 2022</i>	<i>39</i>
<i>FIGURA 15: Distribución de los casos de legionelosis por cada 100000 habitantes en países de Europa</i>	<i>48</i>

<i>Figura 16. Vigilancia epidemiológica de la legionelosis. Tasas de incidencia (1997-2018).....</i>	<i>51</i>
<i>FIGURA 17: Esquema de un sistema de ACS.....</i>	<i>58</i>
<i>FIGURA 18: Sistema de distribución de agua caliente.....</i>	<i>59</i>
<i>FIGURA 19: Sistema de distribución de AFCH con ETAP intermedia.....</i>	<i>60</i>
<i>FIGURA 20: Estación de tratamiento de agua potable.....</i>	<i>64</i>
<i>FIGURA 21: Sistema tipo de cloración automática a base de hipoclorito sódico</i>	<i>66</i>
<i>FIGURA 22: Procedimiento de limpieza y desinfección de acumulador de agua caliente sanitaria según Real Decreto 487/2022.....</i>	<i>72</i>
<i>FIGURA 23: Procedimiento de limpieza y desinfección de una ETAP según Real Decreto 487/2022</i>	<i>73</i>
<i>FIGURA 24: Modelo normalizado de acumulador de ACS según lo establecido en el Real Decreto 487/2022.....</i>	<i>80</i>
<i>FIGURA 25: Purga de acumulador de Agua Caliente Sanitaria</i>	<i>81</i>
<i>FIGURA 26: Modelo de ETAP integrado según lo establecido en el Real Decreto 487/2022</i>	<i>85</i>
<i>FIGURA 27: Procedimiento de hipercloración directo a la red en un circuito de AFCH</i>	<i>94</i>
<i>FIGURA 28: Estructura de mezclado final de ACS y AFCH.....</i>	<i>99</i>
<i>FIGURA 29: Calderas de circuito primario.....</i>	<i>117</i>
<i>FIGURA 30: Procedimiento de filtrado de partículas según la norma UNE-EN 13443-1:2003+A1:2009</i>	<i>136</i>
<i>FIGURA31: Positividad a Legionella spp. en muestras ambientales procedentes de ACS y de AFCH</i>	<i>140</i>
<i>FIGURA 32: Recreación gráfica de los resultados del estudio desglosados por serogrupos 1 y 2-14 de Legionella pneumophila.....</i>	<i>141</i>

<i>FIGURA 33: Recreación gráfica de los resultados del estudio desglosados por instalación de procedencia, equipos de refrigeración y humectación y agua de consumo humano.....</i>	<i>144</i>
<i>FIGURA 34: Recreación gráfica de los resultados del estudio desglosados por instalación de procedencia, almacenes de ACS, almacenes de AFCH, puntos terminales de red de ACS y puntos terminales de red de AFCH</i>	<i>146</i>
<i>FIGURA 35: Recreación gráfica de los resultados del estudio desglosados por periodo térmico en el que fueron tomadas</i>	<i>147</i>
<i>FIGURA 36: Recreación gráfica de los resultados del estudio desglosados por procedencia de la instalación con cloración estable e inestable</i>	<i>148</i>
<i>FIGURA 37: Recreación gráfica de los resultados del estudio desglosados por procedencia de la instalación en función de la temperatura de la misma .</i>	<i>150</i>
<i>FIGURA38: Recreación gráfica de los resultados del estudio desglosados por procedencia de la instalación de ACS en función del grupo al que pertenece A o B</i>	<i>152</i>
<i>FIGURA 39: Recreación gráfica del estudio descriptivo y comparativo del serogrupo según la procedencia de la instalación de ACS en el grupo A o en el grupo B.....</i>	<i>153</i>
<i>FIGURA 40: Recreación gráfica de los resultados del estudio desglosados por procedencia de la instalación de AFCH en función del grupo al que pertenece A o B</i>	<i>154</i>
<i>FIGURA 41: Recreación gráfica del estudio descriptivo y comparativo del serogrupo según la procedencia de la instalación de AFCH en el grupo A o en el grupo B.....</i>	<i>155</i>

LISTADO DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS Y SÍMBOLOS.

ACS: Agua Caliente Sanitaria.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AENOR: Asociación Española de Normalización.

AFCH: Agua Fría de Consumo Humano.

Ag: Antígeno.

ALT: Alanina Aminotransferasa.

AOC: Carbono Orgánico Asimilable.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ART: Artículo.

AST: Aspartato Aminotransferasa.

AWWA: American Water Works Association.

BAC: Carbón Activado Biológicamente.

BDOC: Carbono Orgánico Disuelto Biodegradable.

CALD: Enfermedad del Legionario Adquirida en la Comunidad.

CAP: Community-Acquired Pneumonía.

CC.AA.: Comunidad Autónoma.

CE: Comunidad Europea.

CK: Creatina Quinasa.

CLR: Cloro Libre Residual.

CPD: Pirimidina Ciclobutano.

CPVC: Cloruro de Polivinilo Clorado.

CTE: Código Técnico de la Edificación.

CTN: Comité Técnico de Normalización.

DBP: Subproducto de Desinfección.

DCs: Células Dendríticas.

DOC: Carbono Orgánico Disuelto.

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control.

EEE: Espacio Económico Europeo.

EIA: Inmunoensayos Enzimáticos.

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

EPA: Agencia de Protección Ambiental de los EE. UU.

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

ETAP: Estación de Tratamiento de Agua Potable.

EWGLI: European Working Group for *Legionella* Infections.

EWGLINET: Esquema Europeo de Vigilancia de la Enfermedad de los Legionarios Asociados a los Viajes.

FDS: Ficha de Datos de Seguridad.

GTP: Transaminasa Glutámico Pirúvica.

HALD: Enfermedad del Legionario Asociada a Atención Médica.

IDSA: Infectious Diseases Society of América.

LAMP: Amplificación Isotérmica Medida por Bucle.

LCV: Vacuola Containing *Legionella*.

LD: Enfermedad del legionario.

LED: Diodo Emisor de luz.

LES: Lupus Eritematoso Sistémico.

LPS: Lipopolisacárido.

LRT: Tracto Respiratorio Inferior.

LRV: Valor de Reflectancia Lumínica.

L+D : Limpieza y Desinfección.

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

Mip. Proteína de Potenciación de Infectividad de Macrófagos.

MOMP: Proteína Mayor de la Membrana Externa.

NASEM: National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine.

OM: Membrana Externa.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OMP: Prodcuto Microcontaminante Orgánico.

PAL: Proteína Asociada al Peptidoglicano.

PAMPs:Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PE: Fosfatidiletanolamina.

PEX: Polietileno Reticulado.

POU: Point of Use.

PPCL: Plan de Prevención y Control de *Legionella*.

PPM: Parte por Millón.

PPr: Polipropileno Random.

PTAFCH: Punto terminal de Agua Fría de Consumo Humano.

PTACS: Punto terminal de Agua Caliente Sanitaria.

PSL: Plan Sanitario de *Legionella*.

RENAVE: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

RITE: Reglamento de Instalaciones Térmicas en los Edificios.

SDS-PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico.

SIRS: Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.

SPC: Recuento de Placa Standard.

TALD: Enfermedad del Legionario Asociado a Viajes.

TFN α : Factor Necrosis Tumoral Alfa.

TLR: Receptores Tipo Toll.

TOC: Carbono Orgánico Total.

UAT: Antígeno Urinario de *Legionella*.

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.

UE: Unión Europea.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

UNE: Una Norma Española.

UV: Luz Ultravioleta.

VBNC: Viable No Cultivable.

WMP: Programa de Mantenimiento del Agua.

WSG: Grupo Sanitario de Trabajo.

WSP: Plan de Seguridad del Agua.

RESUMEN:

La inspección de salud pública ha desplegado una ingente cantidad de medios humanos y económicos a través de las administraciones responsables, desarrollando una fuerte potencia inspectora, que en todos los casos va orientada a identificar y describir las instalaciones a través de actas realizadas al efecto, así como detallados programas de muestreo, que pretenden orientar al particular responsable de la instalaciones sobre la elaboración de un libro de mantenimiento sanitario consecuente, contemplado en el Plan de Prevención y Control de *Legionella* (PPCL) o en el Plan Sanitario de *Legionella* (PSL), y dirigido a prevenir el desarrollo y la proliferación de la bacteria, apoyándose en una legislación que prevé en todo caso sanciones para los establecimientos incumplidores y que solamente establece obligaciones para establecimientos de uso público(Real Decreto487/2022).

La legionelosis está incluida desde el año 1996 entre las enfermedades de declaración obligatoria (Real Decreto 2210/95).

La declaración corresponde siempre a los profesionales médicos, en caso de sospecha. La notificación es semanal y se acompaña de los datos relativos al caso (identificación, epidemiológicos y microbiológicos), recogidos de acuerdo con los protocolos de las enfermedades de declaración obligatoria. Es un buen ejemplo de enfermedad infecciosa emergente, que se presenta como dos entidades clínicas distintas: una neumónica, asociada a una importante morbilidad y mortalidad y que comprende la mayoría de los casos

diagnosticados actualmente, denominada en la literatura científica, especialmente americana, como enfermedad del legionario (LD), y una forma sin afectación pulmonar, de resolución espontánea y rápida que cursa de manera inespecífica o pseudogripal - fiebre de Pontiac (Hubert *et al.*,2011).

En este trabajo se observa la influencia de las elevaciones del nivel de biocida (molécula de cloro libre residual) en el control y la reducción del proceso de amplificación de la bacteria, que se realiza en las desinfecciones puntuales de las conducciones de agua potable, y su posible repercusión en la elaboración de los planes de mantenimiento sanitario de prevención de legionelosis.

ABSTRACT:

The public health inspection has deployed a huge amount of human and economic resources through the responsible administrations, developing a strong inspection power, which in all cases is aimed at identifying and describing the installations through reports carried out for this purpose, as well as detailed sampling programmes, which aim to guide the individual responsible for the installations on the preparation of a consistent sanitary maintenance book, contemplated in the *Legionella* Prevention and Control Plan (PPCL) or in the *Legionella* health Plan (PSL), and aimed at preventing the development and proliferation of the bacteria, based on legislation that in any case provides for sanctions for non-compliant establishments and only establishes obligations for establishments for public use (Royal Decree 487/2022).

Legionellosis has been included since 1996 as a notifiable disease (Royal Decree 2210/95).

Notification is always the responsibility of medical professionals, in the event of suspicion. Notification is weekly and is accompanied by data on the case (identification, epidemiological and microbiological), collected in accordance with the protocols for notifiable diseases. It is a good example of an emerging infectious disease, which presents as two distinct clinical entities: a pneumonic form, associated with significant morbidity and mortality and comprising the majority of currently diagnosed cases, referred to in the scientific literature, especially American, as Legionnaires' disease (LD), and a form without pulmonary involvement, with spontaneous and rapid resolution and a non-specific or pseudo-flu-like course - Pontiac fever (Hubert *et al.*, 2011).

In this work, the influence of elevations in the level of biocide (free residual chlorine molecule) on the control and reduction of the amplification process of the bacteria, which is carried out in the punctual disinfection of drinking water pipes, and its possible repercussion on the elaboration of sanitary maintenance plans for the prevention of legionellosis, is observed.

1.- INTRODUCCIÓN:

1.1.- Estado de conocimiento del tema:

Legionella es una bacteria de reciente aislamiento e identificación en el campo de la microbiología. Incluida desde el año 1996 entre las enfermedades de declaración obligatoria, se conocen 65 especies (Gómez Valero *et al.*, 2009), - con más de setenta serogrupos conocidos - de las que al menos 26 tienen una alguna cepa patógena para el organismo humano, siendo la *Legionella pneumophila* con 16 serogrupos diferentes la que tiene más repercusión clínica. Los 16 serogrupos de la especie *L. pneumophilla* tienen importancia epidemiológica siendo el serogrupo 1 es el que más se relaciona con la aparición de brotes de legionelosis en el hombre, puesto que aparece en un 85% de los casos, seguido de los serogrupos 4 y 6 (Gómez Valero *et al.*, 2009). Otras nueve especies pueden subtiparse, al menos, en dos serogrupos distintos. De las 61 especies, 21 están relacionadas con infecciones humanas de forma directa, siendo agentes patógenos en mayor o menor grado, y otras tres lo están presuntamente, sin existir confirmación definitiva en la actualidad. En cuanto al resto de las especies descritas, queda descartada su participación en los procesos morbosos pues no ha existido aislamiento en pacientes. Han aparecido nuevas especies en los últimos años por lo que el género continúa ampliándose en la actualidad (Gómez Valero *et al.*, 2009).

Estas elevadas tasas de incidencia del serogrupo 1 presentan un sesgo estadístico elevado, puesto que el procedimiento habitual en la identificación de la bacteria en individuos enfermos es la detección del antígeno en orina que solo identifica *Legionella pneumophila* serogrupo 1, y se desprecia por lo tanto la contribución al proceso del resto de serogrupos y de especies. Para evitar este sesgo sería preciso hacer cultivo en placa y poder comparar los resultados en muestras ambientales y en enfermos.

Los casos clínicos se clasifican en tres tipos (Gómez Valero *et al.*, 2009):

- 1.- Casos esporádicos aislados.

2.- Infecciones nosocomiales (ámbito hospitalario). Suelen presentar una mortalidad elevada, debido que afecta a personas más vulnerables e inmunocomprometidas.

3.- Brotes comunitarios. Son los relacionados con personal alojado en edificios públicos (hoteles, residencias, balnearios, barcos, etc.) o que, sin pernoctar en ningún lugar común, habitan en una misma localidad.

Estos últimos son los más habituales, siendo los elementos amplificadores las torres de refrigeración y sistemas de humidificación, así como las redes de agua sanitaria tanto fría como caliente, contaminados por *Legionella*. Ha quedado acreditado en los últimos años que cualquier instalación de agua sanitaria es susceptible de favorecer la amplificación y la proliferación de la bacteria y que las clasificaciones entre primer y segundo nivel de riesgo han quedado claramente superadas. En estas instalaciones la bacteria sufre un proceso de amplificación por multiplicación que le permite alcanzar los puntos del sistema en los que exista un elemento generador de aerosoles (Vaqué Rafart *et al.*, 2002)

1.1.1.- Antecedentes históricos:

El descubrimiento de la bacteria es relativamente reciente, siendo el primer brote documentado en 1976 en Filadelfia, que provocó la muerte de treinta y cuatro personas. Un año después en el Centro de Enfermedades Infecciosas de Atlanta se descubrió que el agente causal era una bacteria a la que se denominó *Legionella pneumophila*, siendo identificado como legionelosis el proceso neumónico generado. Estudios retrospectivos realizados a continuación demostraron que esta bacteria era la causante de brotes anteriores. Se considera que el primer brote epidémico conocido e identificado como tal tuvo lugar en 1965 en un hospital psiquiátrico de Washington DC. (Vaqué Rafart *et al.*, 2002)

En 1968 apareció otro brote en el Condado de Pontiac, asociado al mismo agente etiológico, en el que los afectados presentaban sintomatología diferente y desarrollaron una variante no neumónica de la enfermedad, que cursa con fiebre, conocido posteriormente como fiebre de Pontiac (Kaufmann *et al.*, 1981).

La mayor incidencia de la legionelosis a nivel mundial se ha producido en los países de la cuenca mediterránea en particular España, Italia y Francia, si bien es cierto que es en el mundo denominado desarrollado donde se realiza un seguimiento riguroso y estricto de presencia de la bacteria (datos del Centro Europeo de Control y Prevención de Enfermedades, -ECDC-, 2010)

A nivel de España la idea que cobra más fuerza, igualmente mediante estudios retrospectivos, es que el primer brote de legionelosis fue en Benidorm en 1973.

En la figura 1 puede verse la evolución de la comunicación de casos de legionelosis en España en la última década, y como, con alguna oscilación, esta tasa ha ido aumentando.

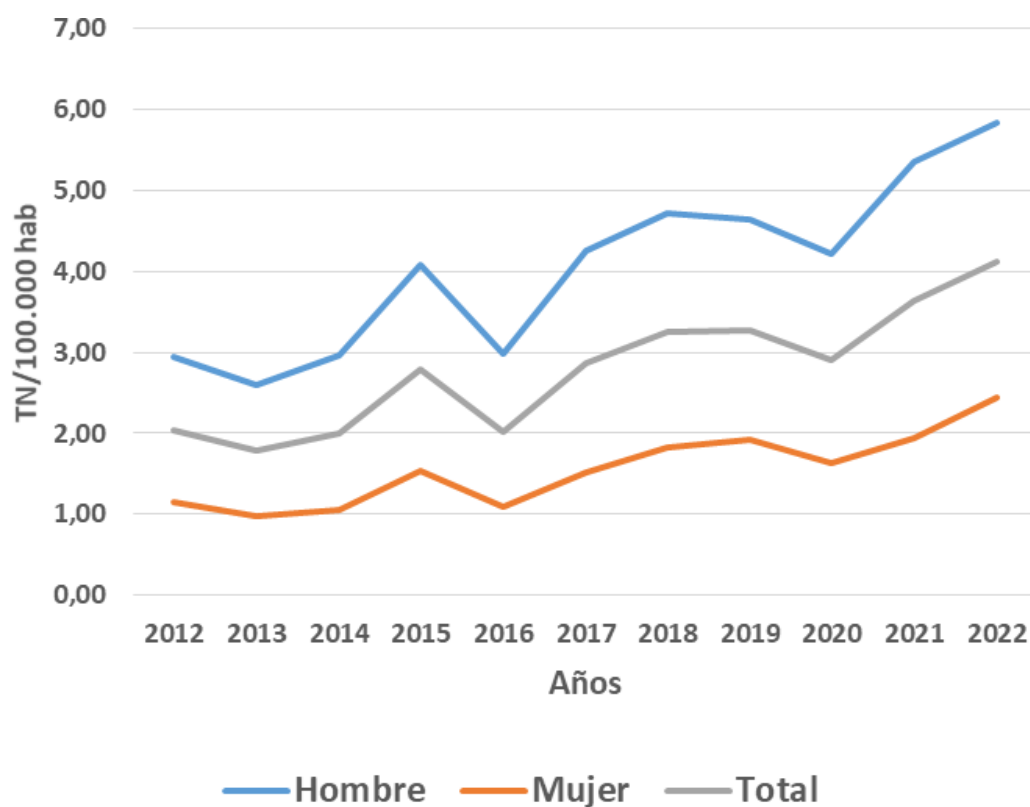


Figura 1: Tasas de notificación de legionelosis por 100000 habitantes según el año de inicio síntomas y el sexo en España, años 2012 a 2022. Fuente: RENAVE.

En 1986 se creó el European Working Group for *Legionella* Infections (EWGLI), que fija la colaboración internacional en toda Europa con respecto a la legionelosis. EWGLI creó el Esquema Europeo de Vigilancia de la

Enfermedad de los Legionarios Asociados a los Viajes, conocido como EWGLINET. Desde abril de 2010 es coordinado por el ECDC con sede en Estocolmo. Trata de identificar casos de infección por *Legionella* en viajeros que regresan y brotes, a la vez que colabora en el control y la prevención de otros casos.

La mayor parte de los estudios realizados hasta la fecha, así como los trabajos de investigación, abarcan mayoritariamente la parte médica del proceso, es decir todo el desarrollo de la bacteria una vez que ha llegado al organismo infectado y se desarrolla el proceso morboso. Los agentes de inspección de salud pública tienen su campo de actuación en la fase anterior, cuando comienza el crecimiento exponencial de la bacteria en los edificios construidos y habitados por el hombre.

1.1.2.- Características del género *Legionella*:

Legionella es una bacteria aerobia heterótrofa. Bacilo gramnegativo, no esporulado, se comporta como "parásito" de protozoos de agua dulce, generalmente amebas (huéspedes naturales) o de forma menos significativa de otros protozoos y algas donde se reproduce endocelularmente formando quistes a veces con un número elevado de bacterias, o como patógeno humano oportunista que causa el proceso clínico de la legionelosis, en sus dos vertientes tanto la forma neumónica como en la fiebre de Pontiac, desarrollándose intracelularmente en las células del hospedador.

No presenta formas de resistencia (esporas) pero es capaz de reproducirse también de forma libre y sobrevivir en un amplio rango de condiciones fisicoquímicas (Busch *et al.*, 2018). Estas características la convierten en un microorganismo con una fuerte capacidad de desarrollo en ambientes propios de edificios de hábitats humanos.

En la figura 2 aparece una recreación tridimensional del aspecto de la bacteria en microscopía electrónica.



Figura 2: Imagen recreativa tridimensional de la bacteria Legionella. Visión mediante microscopio electrónico. Fuente: www.sistemabio.com.

Es un microorganismo muy ubicuo cuyo nicho ecológico son los ambientes acuáticos naturales, se ha aislado en ríos, lagos, aguas estancadas, aguas termales, fangos, e incluso en aguas cloradas (observándose siempre mayor proliferación cuando la cloración no es continuada en el tiempo). En aguas saladas no se observa presencia si bien se pueden aislar colonias en aguas salobres. Los factores que contribuyen de forma activa al proceso de amplificación de la bacteria son, por orden de influencia:

- El grado de estancamiento del agua (existencia de zonas muertas, baja velocidad de circulación).
- La presencia de limo, sedimentos, desechos de corrosión.

La existencia de biofilms que contienen diferentes microorganismos parasitados por *Legionella* que a su vez actúan como biocapa (protozoos, algas y bacterias).

La presencia de esta biocapa es importante en la protección de la bacteria, proporcionando además una fuente de nutrientes, y un soporte para su

multiplicación y supervivencia, que se ve favorecida por la presencia de depósitos sólidos en suspensión y temperaturas entre 25°C y 45°C.

La patogenicidad de la bacteria comienza tras el proceso de amplificación que se produce en los circuitos de conducción de agua, cuando se dan estas condiciones fisicoquímicas que favorecen su desarrollo. A través de instalaciones que generan aerosoles, puede llegar a los alveolos pulmonares mediante aspiración cuando es transportada en microgotas inferiores a 5 μm , provocando neumonía o el referido proceso febril agudo que cursa con ausencia de neumonía llamado fiebre de Pontiac (Vaqué Rafart *et al.*, 2002).

Estudios recientes han tratado de reproducir las condiciones de crecimiento de la bacteria en el agua extraída de las conducciones, antes de ser enviadas las muestras al laboratorio, en ambientes generados de forma artificial mediante filtros isotérmicos (Farag *et al.*, 2017), cuyo objetivo era obtener un método rápido sensible y eficaz de detección de las unidades formadores de colonias (UFC) de la bacteria, sin necesidad de realizar el transporte al laboratorio. Estos estudios demuestran la facilidad que tiene esta bacteria para desarrollarse y permanecer tiempo largo, incluso en condiciones adversas, aumentando su potencialidad infectante, reforzada por esta doble capacidad de desarrollarse tanto de forma libre como en el interior de otros microorganismos.

La bacteria pasa desde los reservorios naturales, donde se encuentra en bajas concentraciones, a los sistemas de abastecimiento de agua de las ciudades, y se incorpora a las instalaciones de agua doméstica u otras instalaciones que requieren la utilización de esta agua para su funcionamiento.

En condiciones normales no es patógena, y convive de forma natural en espacios de desarrollo humano sin provocar ningún tipo de alteraciones. Se desarrolla en medio acuático de forma discreta, por lo que las redes de aprovisionamiento de agua potable la introducen constantemente en los edificios a los que abastecen.

Además de sobrevivir en el interior de las amebas, las bacterias *Legionella* de vida libre pueden llegar a adoptar un estado de necesidades metabólicas reducidas, denominado *viable pero no cultivable* (VBNC), que dificulta la

recuperación de la bacteria del ambiente y la hace más resistente a los biocidas (Vaqué Rafart *et al.*, 2002).

No aparece por lo tanto en los criterios de potabilidad del agua de consumo humano establecido en la legislación vigente (Real Decreto 3/2023), puesto que, no es patógena por ingestión y además de que por su escaso desarrollo en el medio acuático tampoco lo sería por inhalación de forma inicial.

1.1.2.1.- Taxonomía, características morfológicas y fisiológicas, factores de virulencia:

La clasificación taxonómica de la bacteria sería la siguiente:

REINO: Bacteria.

FILO: Pseudomonadota.

CLASE: Gammaproteobacteria.

ORDEN: legionellales.

FAMILIA: *Legionellaceae*.

GÉNERO: *Legionella*.

ESPECIE: *L. pneumophila*.

Coxiella burnetii es la especie filogenéticamente más próxima a *Legionella*, ya que poseen en común el carácter de patógeno intracelular. La homología de ADN entre cepas de una misma especie del género *Legionella* es igual o superior al 70%, mientras que entre cepas de diferentes especies es inferior al 70% (Sánchez Serrano, 2013).

El riesgo de que se produzca infección mediante la aspiración de las bacterias que se hallan en el medio ambiente, y que posteriormente, se desarrolle la enfermedad, depende de la intensidad y duración de la exposición, la concentración de la bacteria en el aerosol y la susceptibilidad de las personas expuestas (edad avanzada, fumador, enfermedades crónicas, inmunodeprimidos...). Además de por inhalación de aerosoles o aspiración de agua contaminada, se han comunicado casos de infección tras el lavado de heridas con agua contaminada.

El hombre es un hospedador ocasional de la bacteria ya que no es necesario para la replicación ni la supervivencia del microorganismo. No se ha demostrado la transmisión de persona a persona. No se ha documentado la existencia de reservorios animales (OMS, 2007).

Legionella tiene un tamaño que oscila entre 0,3 y 0,9 μm de ancho por 1,5-5 μm de largo. En los tejidos se pueden presentar en forma cocoide o bacilar y en algunos cultivos son pleomórficos y pueden presentar formas muy alargadas. Son móviles (excepto *L. oakridgensis*) gracias a uno o más flagelos polares o subpolares y se ha podido demostrar la existencia de fimbrias y de una estructura polisacárida ácida extracelular.

El lipopolisacárido de la membrana externa de la pared presenta características diferenciales con respecto a las enterobacterias, tanto en aspectos bioquímicos, ya que es muy rico en ácidos grasos ramificados, inusuales en las bacterias gramnegativas, como en la actividad endotóxica. Se desconoce hasta qué punto estos aspectos estructurales que hacen referencia al lipopolisacárido pueden tener relación con las propiedades tintoriales y la notable resistencia al calor y a los ácidos de estos microorganismos.

La coloración de Gram es tenue, sobre todo cuando el colorante de contraste es la safranina. Se tiñe bien (de color rojo) por el método Giménez y las técnicas de plata (impregnación con plata Dieterle modificado). No son ácido alcohol resistentes, aunque la especie *L. micdadei* se tiñe débilmente con la coloración de Ziehl-Neelsen, perdiendo esta característica en resiembras posteriores.

La legionelosis como proceso morboso se inicia tras la inhalación y probablemente microaspiración de microorganismos del género *Legionella*.

A pesar de que la presencia en el medio sea masiva, deben confluír algunos factores de forma simultánea para que aparezca la enfermedad, la cantidad de inóculo bacteriano que llega a los alvéolos pulmonares del paciente, la susceptibilidad de éste y la patogenicidad y virulencia de la bacteria (Cianciotto., 2001).

La susceptibilidad individual la determina la alteración de la vía respiratoria (ser fumador, padecer una enfermedad pulmonar crónica, etc) y

la afectación de la inmunidad celular como recibir tratamiento con inmunosupresores o corticoides. También es un factor de susceptibilidad la edad de la persona (ancianos y niños son más susceptibles) (Cianciotto., 2001).

El inóculo bacteriano que se precisa para causar legionelosis se desconoce. En estudios de experimentación con cobayas se desarrolla una infección asintomática con inóculos de 10-100 microorganismos liberados por aerosolización, enfermedad con 1000 bacterias y la muerte con 10000 bacterias. Un quiste amebiano contiene fácilmente 1000 bacterias lo cual explicaría que la inhalación de un único quiste amebiano fragmentado de biofilm podría causar enfermedad

Una vez que la bacteria entra en los pulmones es fagocitada por los macrófagos alveolares y quizás también interiorizada por las células epiteliales. *Legionella* genera factores de virulencia que favorecen la fagocitosis, lo que posibilita la supervivencia y el crecimiento intracelular. Tras un crecimiento intracelular suficiente, la bacteria destruye al macrófago, que es re-fagocitado por otros macrófagos.

A partir de esta multiplicación intracelular, neutrófilos, nuevos macrófagos y eritrocitos infiltran los alveolos y se origina edema. Las quimiocinas y citosinas liberadas por los macrófagos infectados dan lugar a una respuesta inflamatoria intensa. La respuesta de los linfocitos T colaboradores y sus citoquinas es fundamental para la eliminación de *Legionella* (EWGLI, 2015).

1.1.2.2.- Ecología y parámetros fisicoquímicos determinantes de la presencia de *Legionella*:

Legionella es un patógeno ambiental, y comprender su ecología puede contribuir decididamente a establecer métodos para prevenir su diseminación ambiental y por lo tanto la transmisión de la legionelosis como enfermedad.

Aunque ha habido avances significativos en la comprensión de la formación y colonización de biofilms por parte de *Legionella* en los últimos años, aún hay muchas partes que siguen siendo desconocidas, a saber:

- El papel de algunas especies bacterianas en la producción de biofilms de *Legionella*, y el mecanismo con el que estas especies promueven su crecimiento mientras que otras especies lo inhiben.

- Los parámetros fisicoquímicos del agua en sistemas de agua sanitaria que podrían limitar el crecimiento de *Legionella* y que por lo tanto pueden ser útiles para la prevención de la legionelosis.

- La regulación génica de *L. pneumophila*.

- El estilo de vida intracelular contribuye a la resistencia del biofilm de *Legionella* a la desinfección *in situ*, pero no parece que esta resistencia sea lineal en función de mayor o menor presencia de protozoos hospedadores.

Los factores endógenos que *Legionella* utiliza para facilitar la formación de biofilms, también es un tema no del todo resuelto en la actualidad.

Por lo tanto, dentro de la ecología y los habitats naturales de desarrollo de *Legionella* es fundamental considerar la presencia de los biofilms en los que esta se desarrolla y su composición, que determinan en muchos casos las estrategias de saneamiento de las conducciones de agua sanitaria.

In vitro, *Legionella* se reproduce en biofilms de una sola especie de microorganismos o en biofilms multiespecie (de muchas especies). De estos microorganismos, son los protozoos los que determinan la persistencia de *Legionella*, ya que con frecuencia los utiliza para replicarse intracelularmente, dentro de ellos (Rowbotham, 1981).

Los protozoos desempeñan un papel importante en el ciclo de vida de las especies de *Legionella*, ya que proporcionan un hábitat para su supervivencia y replicación ambiental. En los biofilms, se han encontrado varias especies de amebas asociadas con *Legionella* (Taylor *et al.*, 2009). Estas amebas se alimentan de bacterias presentes en biofilms multiespecie, lo que permite una mejor replicación de *Legionella*. De esta manera podemos relacionar la cantidad de *Legionella* presente en biofilms con la masa de protozoos que exista en el biofilm (Liu *et al.*, 2012), toda vez que también es capaz de crecer y multiplicarse a partir de los restos de amebas muertas (Temmerman *et al.*, 2006).

Se ha detectado al mismo tiempo la presencia de biofilms flotantes que albergan protozoos asociados con *Legionella*, en ausencia de superficies abióticas disponibles (Declerck *et al.*, 2007).

Se puede afirmar entonces que los protozoos, y particularmente las amebas son un medio de replicación de la bacteria en el interior de los mismos, así como un nicho protector que ralentiza la acción lesiva de los factores ambientales estresantes, incluidos los biocidas utilizados para desinfectar los sistemas de agua (Donland *et al.*, 2005), o la temperatura, ya que las amebas termotolerantes permiten que *L. pneumophila* persista después del tratamiento térmico (Storey *et al.*, 2004).

Colonización de biofilms por parte de *L. pneumophila*

El proceso de propagación y persistencia posterior de la bacteria dentro de una nueva área de conducción de agua se define como colonización. Podemos distinguir dos etapas claramente diferenciadas. Una primera etapa en la que se forma el biofilm ligado a la superficie de las conducciones de agua sanitaria, y, una segunda etapa posterior en la que se produce la unión de *Legionella* al sustrato, tanto en superficies bióticas como abióticas.

El material de las superficies al que se adhieren las colonias de *Legionella* es un factor importante para considerar puesto que puede adherirse con comodidad a varios plásticos diferentes usados en la fabricación de conducciones, pero sin embargo el cobre inhibe su adherencia (Rogers *et al.*, 1994).

Por otra parte, la absorción dentro de los protozoos está condicionada por la presencia de bacterias en el biofilm.

Pseudomona aeruginosa puede inhibir la colonización por *Legionella*, mientras que *Klebsiella pneumoniae* disminuye el efecto inhibidor de la anterior.

Legionella pneumophila produce un tensioactivo, que resulta tóxico para otras especies de *Legionella*, e impide su acceso y crecimiento en los biofilms (Geesey *et al.*, 2000).

En cuanto a parámetros fisicoquímicos se observan las siguientes singularidades a tener en cuenta:

Parámetros estimulantes del desarrollo de *Legionella*:

- Los cationes como el calcio y el magnesio, zinc y manganeso estimulan la colonización del biofilm por *Legionella*. Particularmente el zinc aumenta la capacidad de *Legionella* de unirse a las células huésped epiteliales pulmonares humanas, lo que viene a indicar que estos cationes pueden aumentar la unión de *Legionella* a las superficies bióticas además de a los biofilms abióticos (Yaradou *et al.*, 2007).

- La disponibilidad de carbono también favorece la colonización de superficies abióticas por *Legionella*, presumiblemente porque proporciona nutrientes para que se replique. No obstante, este incremento de la bacteria por presencia de carbono orgánico solo se ha podido observar a 20°C, lo que parece indicar que el carbono solo puede influir en ese incremento poblacional a ciertas temperaturas (Pang *et al.*, 2006).

Como parámetros inhibidores del desarrollo de *Legionella*, tenemos la presencia de nanopartículas y cobre que, con frecuencia dificultan la colonización del biofilm por *Legionella* (Koubar *et al.*, 2013).

La temperatura podía considerarse un parámetro ambivalente puesto que es un determinante importante para la colonización de los biofilms por parte de *Legionella*. En los sistemas de agua, incluso en presencia de fuentes de carbono orgánico, la temperatura por encima de 55°C reduce la cantidad detectable de UFC, mientras que entre 20°C y 45°C la favorece.

No obstante, esta circunstancia según algunos autores también podría deberse a una disminución de otras especies de microorganismos que pudieran favorecer el crecimiento de *Legionella* (Van der Kooij *et al.*, 2005).

El flujo o el estancamiento del agua

El estancamiento del agua en los sistemas de distribución favorece la colonización por *Legionella*. El flujo constante en el agua puede disminuir su presencia, si bien esta puede persistir en condiciones de flujo turbulento. Esta persistencia de *Legionella* bajo flujo turbulento, parece encontrar explicación en el hecho de que la bacteria puede localizarse en la parte de sedimento menos afectada por el impulso del flujo (Fliermans *et al.*, 1981).

La mayor parte de la investigación sobre la colonización de biofilms de *Legionella* se ha centrado en determinar los parámetros fisicoquímicos descritos anteriormente que hacen que *Legionella* pueda colonizar y crecer sobre los biofilms.

Son menos conocidos los factores moleculares de *Legionella* que contribuyen directamente a este proceso colonización de biofilms.

La proteína similar al colágeno de *Legionella* (Lcl) se identificó inicialmente como una adhesina necesaria para la infección de protozoos y macrófagos. El Lcl promueve la adhesión a sustratos abióticos, así como las interacciones célula-célula/célula-sustrato (Vandersmissen *et al.*, 2010; Mallegol *et al.*, 2012).

Los *pili* de tipo IV también participan en la colonización de los biofilms de *Legionella* debido a su papel en la adherencia a las células protozoarias (Stone *et al.*, 1998).

Factores endógenos de Legionella que pueden influir en la colonización de biofilms

Para *Legionella* como para otros microorganismos, la formación de biofilms es una respuesta a las situaciones ambientales hostiles que le permiten sobrevivir.

Un factor ambiental importante es el hierro, con un gran papel en el crecimiento de muchos organismos y puede influir en la replicación de *Legionella* (Cianciotto, 2007).

Se ha comprobado que la adición de lactoferrina, que es un quelante del hierro, puede reducir enormemente la presencia de UFC de *Legionella*, lo que demuestra la importancia del hierro en su viabilidad (Orsi, 2004).

Por otra parte, el transporte bacteriano del ión ferroso promueve la replicación intracelular de *Legionella* en protozoos, lo que puede influir en la colonización de biofilms (Robey *et al.*, 2002).

Sin embargo, aunque el hierro es esencial para el crecimiento de la bacteria y la formación de biofilms, las altas concentraciones de hierro pueden inhibir ese crecimiento, desconociéndose hasta la fecha el fundamento bioquímico de este fenómeno (Hindre *et al.*, 2008).

La temperatura mencionada anteriormente como un determinante importante para la colonización de los biofilms, puede regular las propiedades de estos biofilms producidos por *Legionella*. *In vitro*, a 37-42°C, los biofilms tienen forma de micelio y están compuestos por bacterias filamentosas, mientras que los biofilms producidos a 25°C son más delgadas y están formados por células en forma de bastoncillos (Piao *et al.*, 2006). Estos hallazgos demuestran que la filamentación de *Legionella* está regulada por la temperatura.

Se ha observado que este crecimiento filamentoso ocurre igualmente en otras especies bacterianas para aumentar la aptitud frente a condiciones ambientales adversas (Justice *et al.*, 2008).

In vitro, los biofilms producidos a 37°C son mucho más fuertes y robustos que los producidos a 25°C pero sin embargo los biofilms producidos a 25°C son más adherentes. Igualmente, los *pili* tipo IV están regulados por la temperatura y pueden influir en la unión a diferentes temperaturas (Liles *et al.*, 1998).

Función de las especies microbianas no protozoarias en la colonización de biofilms por parte de Legionella

Las especies de *Flavobacterium* y cianobacterias favorecen el crecimiento y la colonización de *L. pneumophila* en biofilms al proporcionar una fuente de nutrientes (Wadowsky *et al.*, 1983).

Estudios realizados *in vitro* han demostrado que el crecimiento de *Legionella* puede ser necrotrófico si bien está restringido a ciertas especies microbianas. Por ejemplo, *Pseudomonas putida* muerta por calor favorece este crecimiento puesto que se posiciona como fuente de nutrientes, sin embargo, otros microorganismos muertos como *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus plantarum* no favorecen el crecimiento de *L. pneumophila* (Temmerman *et al.*, 2006).

Se ha planteado la hipótesis de que *L. pneumophila* pueda inhibir el crecimiento de otras especies de *Legionella* porque se sabe que *L. pneumophila* produce un tensioactivo secretado por la proteína TolC, que es tóxico para otras especies de *Legionella*, pero que sin embargo no tiene ningún efecto sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Listeria monocytogenes*

por lo que no se puede afirmar con rotundidad que *L. pneumophila* influya negativamente en el crecimiento de otras especies de *Legionella* en su entorno natural (Stewart *et al.*, 2011).

Resistencia de los biofilms que contienen Legionella a los biocidas

Existe una gran industria orientada e interesada en mejorar los métodos de desinfección de biofilms que contienen *Legionella* debido a la amenaza continua para la salud humana que representan estos organismos en las aguas de consumo humano. Sin embargo, debido a la forma de vida intracelular de *Legionella* dentro de los protozoos, es difícil determinar si la resistencia de *Legionella* en los biofilms es debida a la estructura de estos, a su asociación con la ameba, o a ambas.

Resulta evidente no obstante que el medio en el que se encuentra en los biofilms *Legionella* es extremadamente resistente al tratamiento con biocidas y *puede* entrar en un VBNC.

Esta propiedad nos lleva a determinar que realizar una evaluación precisa de los niveles de contaminación con *Legionella* es complicado, ya que requiere el cocultivo de *Legionella* con ameba para poder evaluar el VBNC. (Declerck *et al.*, 2005).

Las nanopartículas pueden interrumpir las interacciones entre *Legionella* y las amebas, y pueden eliminar eficazmente a *Legionella* de los biofilms con flora bacteriana diversa, pareciendo ser una opción de tratamiento atractiva para desinfectar los circuitos de agua sanitaria (Rogers *et al.*, 1995).

Los biocidas más comunes utilizados para controlar los patógenos transmitidos por el agua son generalmente derivados del cloro, y estos son más eficaces que los rayos UV para desinfectar *Legionella* (Schwartz *et al.*, 2003). No obstante, la cloramina, uno de los biocidas derivados del cloro más potentes, no erradica por completo *Legionella* de los biofilms (Williams *et al.*, 2003).

La ubicación del biofilm es un factor importante para valorar en las estrategias de desinfección. Los biofilms formados en los sedimentos, protegen a *Legionella* contra la radiación UV. Las bacterias *Legionella* cultivadas en una superficie sólida son más resistentes a la muerte por yodo que las bacterias cultivadas en caldo, lo que sugiere que existen diferencias

metabólicas entre las bacterias del género *Legionella*, asociadas a la superficie sobre la que estas se desarrollan (Cargill *et al.*, 1992).

1.1.3.- Legionelosis:

Legionella y legionelosis son términos relacionados pero distintos en su naturaleza y uso en el contexto de la microbiología y la salud pública. *Legionella* se refiere a un género de bacterias Gramnegativas, de las cuales *Legionella pneumophila* es la especie más conocida y responsable de la mayoría de los casos de infección. Estas bacterias son comúnmente encontradas en ambientes acuáticos naturales y artificiales, incluyendo sistemas de agua sanitaria (Boamah *et al.*, 2017).

La legionelosis es el término clínico que se utiliza para describir las enfermedades causadas por la infección con estas bacterias. Incluye tanto la LD, una forma grave de neumonía, como la fiebre de Pontiac, una enfermedad más leve similar a la gripe (Abdel-Nour *et al.*, 2013).

La LD se caracteriza por síntomas como neumonía con fiebre alta, escalofríos, tos, dolor de cabeza, dolores musculares y, en algunos casos, síntomas gastrointestinales como diarrea y dolor abdominal (Fields *et al.*, 2002).

Por lo tanto, la legionelosis, pasa a ser una enfermedad respiratoria grave, principalmente causada por la bacteria *Legionella pneumophila*, que acaba provocando una neumonía severa con una tasa de letalidad que varía entre el 5% y el 80% (Abdel-Nour *et al.*, 2013; Burillo *et al.*, 2017).

Es importante resaltar el hecho de que la presencia ambiental de la bacteria está vinculada a la aparición de los brotes, pero no existe una correlación directa entre la concentración ambiental y la aparición del brote.

La casuística de aparición de enfermos de neumonía por *Legionella* está mucho más relacionada con la existencia de factores intrínsecos del propio paciente.

Esta bacteria como patógeno acuático, que se encuentra de forma ubicua en ambientes naturales y sistemas de agua potable (Abu Khweek & Amer,

2018), se transmite principalmente a través de la inhalación de aerosoles contaminados, generados en las instalaciones potencialmente transmisoras.

La replicación dentro de protozoos ambientales, le permite evadir las condiciones adversas y los tratamientos biocidas (Boamah *et al.*, 2017).

La coevolución con múltiples especies de protozoos ha desembocado en el desarrollo de mecanismos que permiten a *L. pneumophila* ocupar un rango muy amplio de hospedadores e infectar células humanas (Abu Khweek y Amer, 2018).

Estudios recientes indican que la presencia de protozoos, como *Acanthamoeba* y *Hartmannella*, son importante para la formación de biofilms y la persistencia de *Legionella* (Boamah *et al.*, 2017). Estos protozoos no solo proporcionan un hábitat protegido para la replicación intracelular de la bacteria, sino que también aumentan su virulencia y resistencia a las estrategias de desinfección actuales (Fields *et al.*, 2002; Abu Khweek y Amer, 2018).

Es evidente entonces que se establece una relación simbiótica con los protozoos que junto con la capacidad de formar biofilms, facilitan la colonización y persistencia de *L. pneumophila* en ambientes acuáticos (Caicedo *et al.*, 2019).

Además, las interacciones entre *L. pneumophila* y otras especies microbianas dentro de los biofilms juegan un papel importante en la colonización y la resistencia de la bacteria (Assaidi *et al.*, 2020). La prevención de la formación de biofilms y el control de las poblaciones de protozoos en sistemas de agua son necesarios para reducir el riesgo de legionelosis (Caicedo *et al.*, 2019; Chatziprodromidou *et al.*, 2022).

La formación de biofilms en sistemas de distribución de agua, contribuye a la persistencia de *L. pneumophila*. Podemos entender estos biofilms como comunidades microbianas complejas que ofrecen un nicho protegido donde la bacteria puede sobrevivir y resistir los esfuerzos de desinfección (Assaidi *et al.*, 2020).

En el brote de neumonía por *L. pneumophila*, esta suele ir acompañada de otros microorganismos, sin embargo, esta bacteria es la más persistente debido a esta simbiosis con protozoos y a la persistencia en los biofilms.

Se consideran brotes comunitarios si hay dos o más casos en un mes o menos, en individuos que hayan estado en el mismo lugar en los 2 a 10 días previos al inicio de los síntomas (Almeida *et al.*, 2021).

La legionelosis puede manifestarse en casos esporádicos también además de los brotes epidémicos, y, dentro de los brotes es común distinguir entre el entorno comunitario y el hospitalario (Adeyemi, 2023). En el entorno hospitalario sería un brote nosocomial, igualmente referido a dos o más casos confirmados que ocurrieron en personas hospitalizadas en el mismo lugar en los 2 a 10 días anteriores al inicio de los primeros síntomas.

Partiendo de la base de que, en ambos casos, se considera un brote cuando hay al menos dos casos identificados, es importante destacar que, en la aparición comunitaria de los casos de legionelosis, la mayoría de los casos son esporádicos y no están vinculados a brotes conocidos. Sin embargo, en entornos hospitalarios, la presentación recurrente de casos o brotes ha llevado a denominarla legionelosis nosocomial endémica. En general, se trata de brotes prolongados atribuidos a la contaminación de los sistemas de abastecimiento de agua por *Legionella*, son causados por torres de refrigeración o sistemas de agua sanitaria contaminados, que a través de la emisión de aerosoles expanden la bacteria (Almeida *et al.*, 2021).

Siguiendo con el razonamiento anterior, la forma más común de presentación de la enfermedad son los casos esporádicos en la comunidad, seguidos en orden de frecuencia por los brotes comunitarios. Los casos de origen nosocomial ocupan la tercera posición en cuanto a frecuencia.

Los casos adquiridos durante viajes pueden ser clasificados tanto como parte de brotes comunitarios como esporádicos de la comunidad, e incluso como un grupo distinto por sí mismos porque tienen diferente interés epidemiológico (Moreno Bañón, 2024).

En la figura 3 se describe la tasa de notificación de todos los casos, desglosada por CC. AA., correspondiente al año 2022. Se observa una cierta correlación geográfica, en el sentido de que, salvo Extremadura, aparece una tasa de notificación más elevada en el nordeste español.

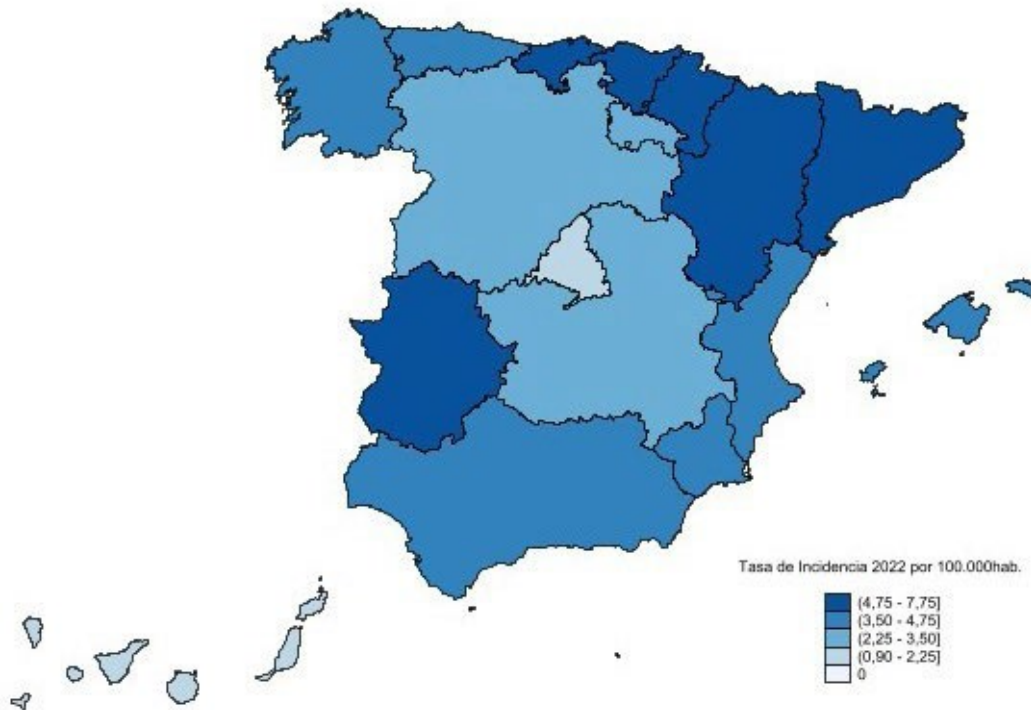


Figura 3: Tasas de notificación de legionelosis por 100000 habitantes según la comunidad autónoma. Año 2022. Fuente: RENAVE.

Los pacientes con mayor predisposición a contraer la enfermedad son aquellos que están bajo tratamiento con inmunosupresores o han recibido un trasplante de órgano sólido. Sin embargo, la mayoría de los casos se registran en individuos de edad avanzada, fumadores o con broncopatía. Asimismo, el periodo de incubación oscila entre 2 y 10 días, siendo generalmente de 5 a 6 días (Murdoch *et al.*, 2020).

La identificación temprana y el tratamiento adecuado son fundamentales para reducir la mortalidad asociada a la legionelosis. El tratamiento generalmente incluye el uso de antibióticos como los macrólidos o las quinolonas (Vaccaro *et al.*, 2021).

En la figura 4 podemos apreciar cómo se ha producido un incremento en la comunicación de casos del año 2017 al 2022 y sobre todo como en época estival es cuando se produce el mayor número de comunicación de casos y brotes.

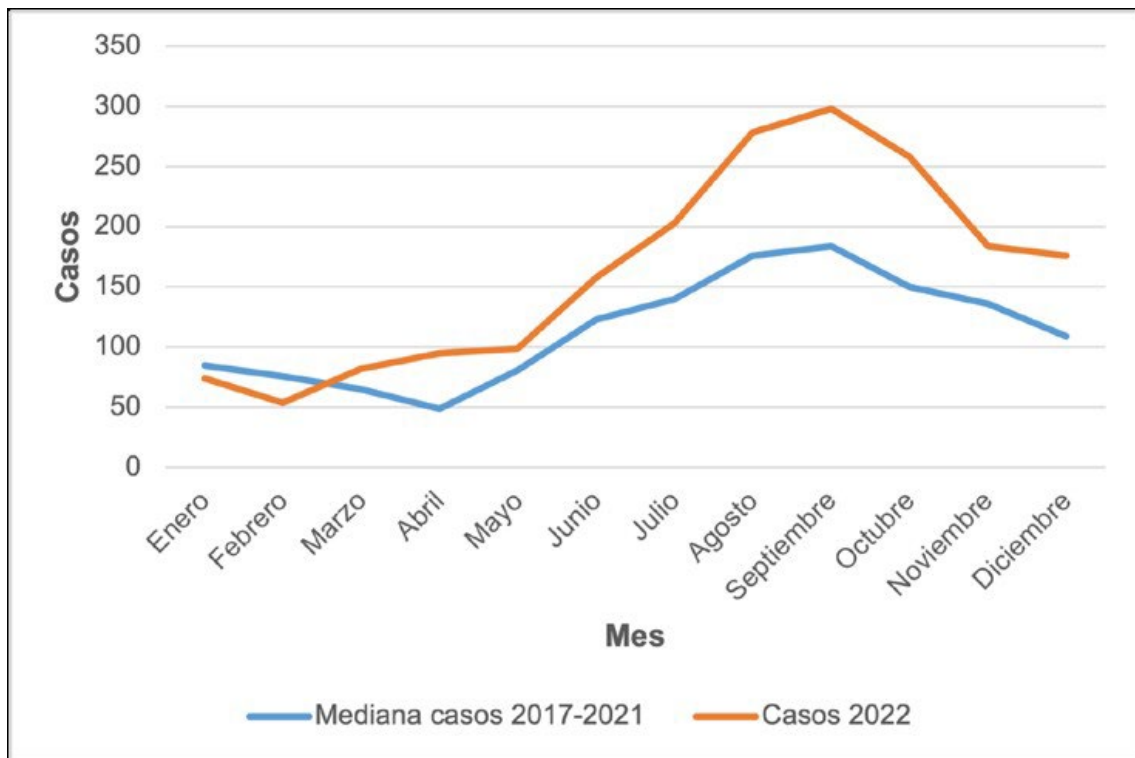


Figura 4: Evolución de la mediana de casos comunicados de legionelosis comparativa 2017-2021/2022. Año 2022. Fuente: RENAVE.

Las tasas de notificación a lo largo de una década desglosadas por sexo y edad ofrecen la particularidad de que en las mujeres la media de edad de los casos notificados es mayor que en los hombres, es decir que los casos diagnosticados en hombres corresponden a personas más jóvenes de forma mayoritaria que los casos diagnosticados en mujeres. Puede existir una correlación entre este desglose de la incidencia por sexo y los hábitos de vida saludables, puesto que no se conoce ningún estudio donde se considere una predisposición mayor a contraer la LD en hombres que en mujeres.

Las figuras 5 y 6 recrean esta situación y se observa perfectamente esa evolución.

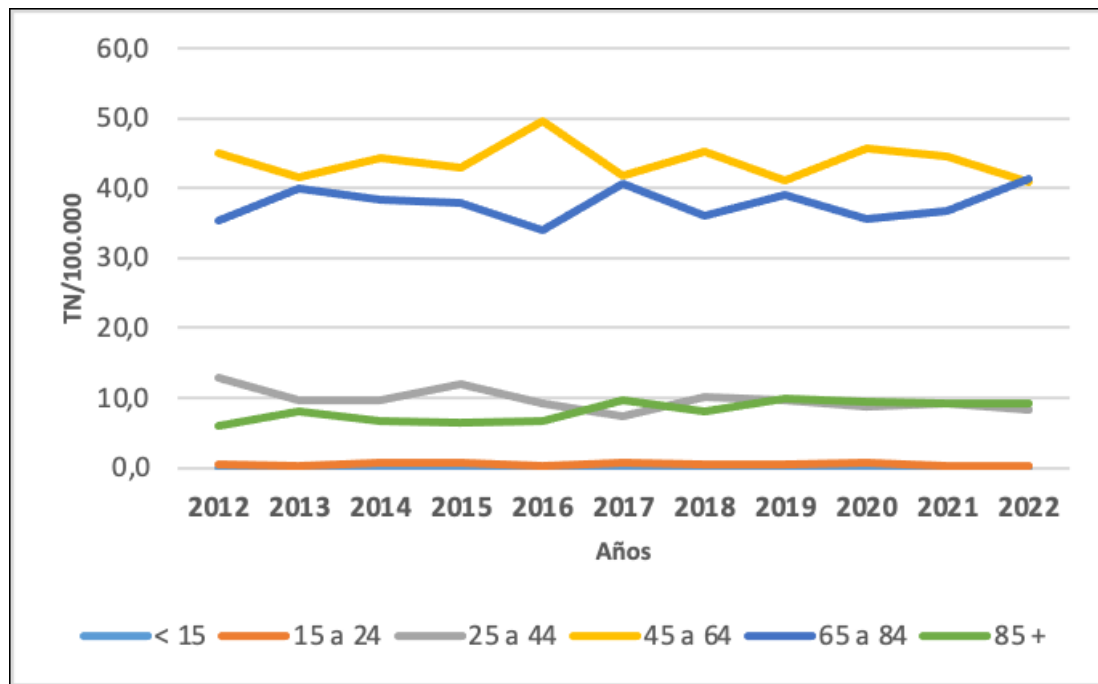


Figura 5: Tasas de notificación de legionelosis en España según la edad en hombres. Años 2012 a 2022. Fuente: RENAVE.

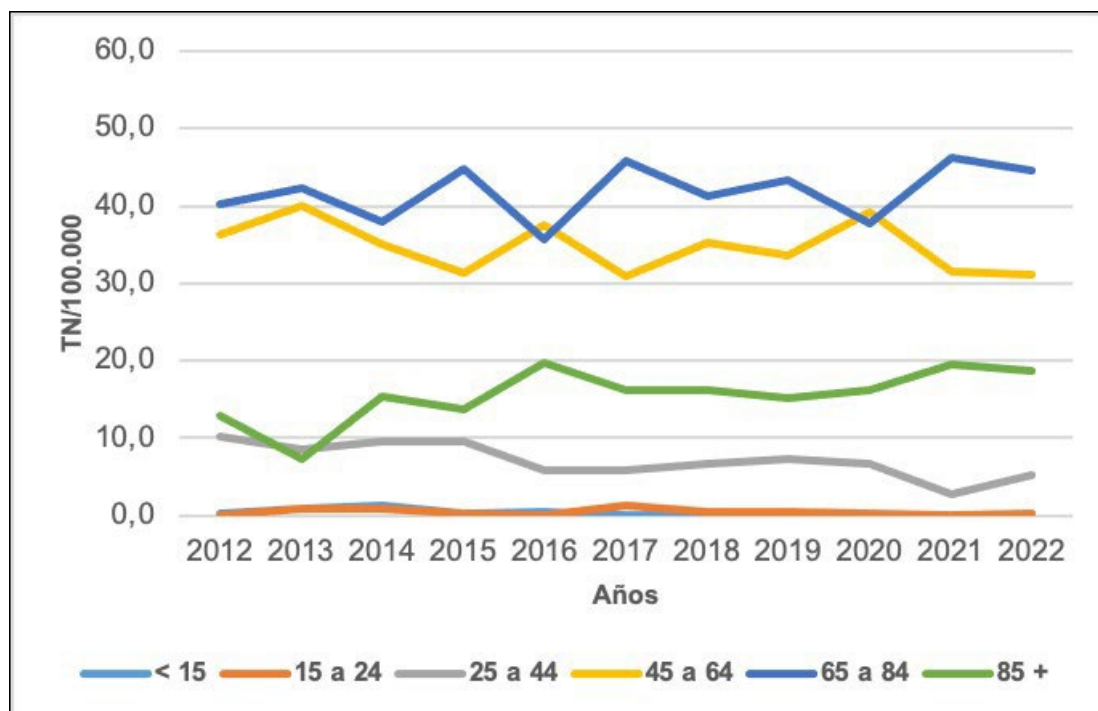


Figura 6: Tasas de notificación de legionelosis en España según la edad en mujeres. Años 2012 a 2022. Fuente: RENAVE.

En la figura 7 se aprecia que en el año 2022 la tendencia descrita anteriormente para la década anterior se repite y, de nuevo se observa que en el sexo masculino tiene mayor notificación de casos en personas más jóvenes y en mujeres corresponden a persona de más edad

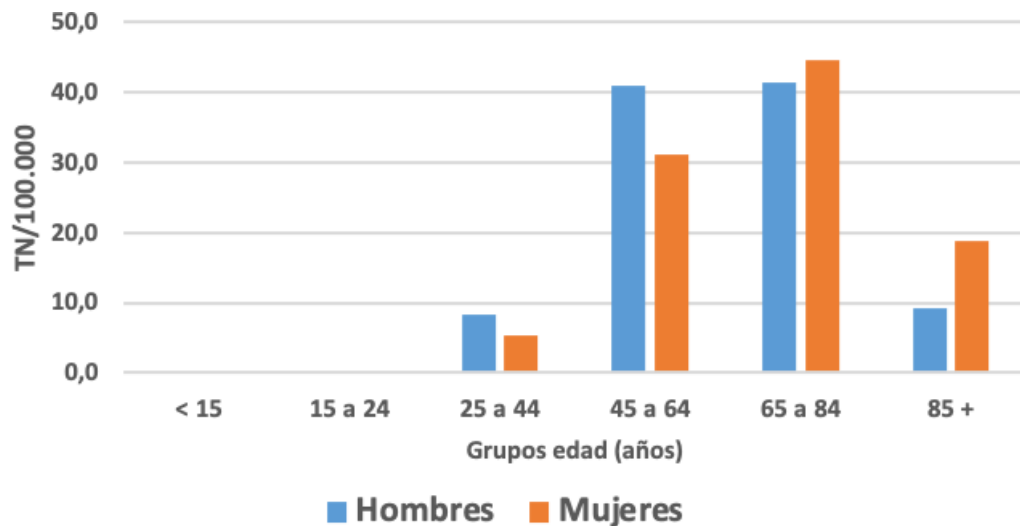


Figura 7: Tasas de notificación de legionelosis en España según la edad y el sexo en España. Año 2022. Fuente: RENAVE.

Principales vías de transmisión de *Legionella* spp. en entornos urbanos y rurales

En los entornos urbanos y rurales, las principales fuentes de transmisión de *Legionella* siguen siendo los sistemas de agua y dispositivos que generan aerosoles (Barrabeig *et al.*, 2010; Prussin *et al.*, 2017). En un estudio sobre un brote de legionelosis asociado con una máquina de nebulización de aire en un supermercado se destacó de manera muy específica, cómo estos dispositivos pueden dispersar aerosoles contaminados con *Legionella*, facilitando la inhalación de las bacterias por las personas expuestas (Barrabeig *et al.*, 2010).

En entornos rurales, aunque menos documentados, también existen riesgos significativos. Se describen casos de legionelosis asociados con plantas de tratamiento de aguas residuales industriales. Estas plantas pueden

liberar aerosoles contaminados durante el tratamiento de oxigenación del agua, lo cual es especialmente relevante en áreas rurales donde el tratamiento de aguas puede ser menos riguroso y más susceptible a la proliferación de *Legionella* (Kusnetsov *et al.*, 2010; Kanarek *et al.*, 2022).

Además de estas fuentes, tanto en entornos urbanos como rurales, los sistemas de riego y fuentes naturales como lagos y ríos también pueden actuar como reservorios de *Legionella*. La contaminación de estos cuerpos de agua puede ocurrir de manera natural o a través de la actividad humana, como la descarga de aguas residuales (Kanarek *et al.*, 2022). Los aerosoles generados por el movimiento del agua en estas fuentes pueden ser inhalados por personas que se encuentran cerca, representando otra vía de transmisión potencial (Sabatini *et al.*, 2022).

Impacto de la calidad del agua potable en la incidencia de legionelosis en diferentes regiones geográficas

Es de destacar que variables como la temperatura del agua, los niveles de cloro residual y la presencia de materia orgánica son determinantes críticos para el control de *Legionella*. Los países que aplican rigurosamente estos controles tienden a reportar menos casos de legionelosis, lo que subraya la importancia de una gestión adecuada del agua potable (Julien *et al.*, 2022).

Se ha valorado cómo los cambios en la temperatura del agua, influenciados por el cambio climático, pueden afectar la proliferación de *Legionella*. Las regiones con climas más cálidos o con sistemas de agua que no regulan adecuadamente la temperatura pueden experimentar un aumento en la incidencia de legionelosis debido a las condiciones favorables para el crecimiento bacteriano (Gunkel *et al.*, 2022).

Las temperaturas más cálidas favorecen la reproducción de la bacteria y pueden reducir la eficacia de los tratamientos de desinfección, como la cloración. Esto sugiere que el cambio climático podría agravar los problemas de calidad del agua y, por ende, aumentar los riesgos de legionelosis (Gunkel *et al.*, 2022).

A medida que las temperaturas globales aumentan, se observa una elevación de la temperatura en los almacenes de agua y en los sistemas de

distribución de agua potable. Este aumento de la temperatura crea un ambiente más propicio para el crecimiento de *Legionella*, especialmente en sistemas que no están adecuadamente regulados (Gamage *et al.*, 2022).

Por otra parte, también parece probable que las regiones geográficas que experimentan mayores cambios en las condiciones climáticas podrían ver un incremento en los casos de legionelosis. Esto se debe a que las infraestructuras de agua en estas áreas pueden no estar preparadas para manejar las nuevas condiciones ambientales, lo que aumenta el riesgo de brotes de legionelosis (Gamage *et al.*, 2022).

¿Cómo afectan las diferentes especies de protozoos a la replicación y persistencia de Legionella pneumophila en varios sistemas acuáticos?

El entorno intracelular dentro de los protozoos no solo protege a *L. pneumophila* de condiciones adversas, sino que también mejora su patogenicidad cuando infecta a huéspedes humanos.

Ha quedado demostrado que la coevolución de *L. pneumophila* con protozoos ha equipado a la bacteria con mecanismos sofisticados para manipular los procesos celulares del huésped y facilitar su replicación (Chambers *et al.*, 2021). Por ejemplo, *L. pneumophila* secreta proteínas efectoras a través del sistema de secreción de tipo IV Dot/Icm, que modula las vías de tráfico vesicular del huésped para crear una vacuola permisiva para la replicación (Fields *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2022). Esta capacidad para manipular la maquinaria celular del huésped es una prueba de la adaptación de la bacteria a sus hospedadores protozoarios.

La presencia de protozoos en los sistemas acuáticos puede reducir significativamente la eficacia de las estrategias de desinfección dirigidas a controlar las poblaciones de *L. pneumophila*.

Los biofilms, que son comunidades complejas de microorganismos incrustados en una matriz extracelular autogenerada, son a menudo sitios donde coexisten protozoos y *L. pneumophila* (Boamah *et al.*, 2017; Assaidi *et al.*, 2020). La interacción entre protozoos y *L. pneumophila* dentro de los biofilms mejora la capacidad de resistencia de la bacteria frente a los estreses ambientales y las medidas de desinfección (Abu Khweek y Amer, 2018).

Agente causal de la legionelosis: Legionella

En el brote de 1976 de la entonces conocida como LD, se aisló una bacteria en muestras de pulmón de los pacientes. Estas bacterias eran bacilos desconocidos que oscilaban entre 0,4 μm y 0,8 μm de ancho y entre 2 μm y 4 μm de largo (Fraser *et al.*, 1978). Se realizaron varias pruebas estándar, incluyendo la tinción de Gram, para identificar al agente etiológico responsable, pero las bacterias no se tiñeron con éxito, ya que solo algunas se tiñeron débilmente como bacilos gramnegativos (Fraser *et al.*, 1978).

Dado que las bacterias no fueron identificadas, se inició un nuevo estudio para buscar la relación genética de las cepas que comparó doce cepas bacterianas desconocidas, sospechosas de causar la LD, con cepas de bacterias conocidas y bien caracterizadas. Se determinó que las cepas no estaban relacionadas con ninguno de estos microorganismos conocidos. Este resultado sugirió que las bacterias aisladas desconocidas eran miembros de una especie poco estudiada o de un grupo previamente no clasificado (Fraser *et al.*, 1978).

Las siguientes investigaciones encontraron que las bacterias no identificadas eran exigentes, requerían cisteína, eran incapaces de reducir nitratos, negativas para la degradación de urea y necesitaban algo de oxígeno para crecer (Fraser *et al.*, 1977).

Con estos resultados del estudio de relación genética, se determinó que las bacterias causantes de la enfermedad eran parte de una familia nueva. El nombre propuesto fue *Legionella pneumophila*, con el nombre del género refiriéndose a la Legión Americana, donde se descubrió la enfermedad por primera vez, y el nombre de la especie "que tiene querencia por los pulmones". *L. pneumophila* fue la primera especie en la familia recién clasificada *Legionellaceae* (Fraser *et al.*, 1977).

Actualmente existen 65 especies en el género *Legionella*, pero no todas causan legionelosis con la misma frecuencia. Las especies se dividen en más de 70 serogrupos. La cepa del serogrupo 1 (Sg 1) causa aproximadamente el 90% de los casos de legionelosis por *L. pneumophila*, la cual representa entre el 80 y el 90% de los casos en Europa y EE. UU. (Iliadi *et al.*, 2022).

Además, la LD puede ser causada por especies no pertenecientes a *L. pneumophila*, como *Legionella longbeachae*, que es la principal causa de legionelosis en Australia y Nueva Zelanda y es la única especie que se encuentra naturalmente en el suelo (Iliadi *et al.*, 2022).

L. pneumophila se compone de tres subespecies: *pneumophila*, *fraseri* y *pascullei* (Wadowsky *et al.*, 1985; Fields *et al.*, 1986).

1.1.3.1.- Aspectos clínicos, factores de riesgo, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad:

Legionella es muy sensible a la desecación, mientras que en un ambiente húmedo puede sobrevivir más de un año (Sciuto *et al.*, 2021).

Aunque puede existir la transmisión de persona a persona, es rara. Normalmente las vías de infección son las descritas a través de aerosoles. Desde el punto de vista patogénico la bacteria tiene la capacidad de multiplicarse dentro de los macrófagos alveolares y los monocitos sanguíneos. La infección ocurre después de que el microorganismo entra en el tracto respiratorio a través de gotas y se encuentra con los macrófagos alveolares en el tracto respiratorio inferior (Chambers *et al.*, 2021). Después de ser fagocitada por un macrófago, *L. pneumophila* remodela su fagosoma en una vacuola que contiene Legionella (LCV) (Guillemot *et al.*, 2022; Bass *et al.*, 2023).

La LCV está rodeada por una doble membrana (Kim y Isberg, 2023). *L. pneumophila* secreta desde el LCV más de 300 elementos efectores bacterianos hacia el citosol utilizando el sistema de secreción de tipo 4 (T4SS), que está codificado por el gen Dot/Icm (Iliadi *et al.*, 2022; Adeyemi, 2023). Las cepas deficientes en el gen Dot/Icm no forman vacuolas LCVs y no pueden prevenir la acidificación del fagosoma y por lo tanto no se replican intracelularmente (Kim y Isberg, 2023).

La figura 8 describe gráficamente el ciclo de invasión del macrófago por parte de *Legionella* y su multiplicación dentro de él, hasta su liberación al medio ambiente.

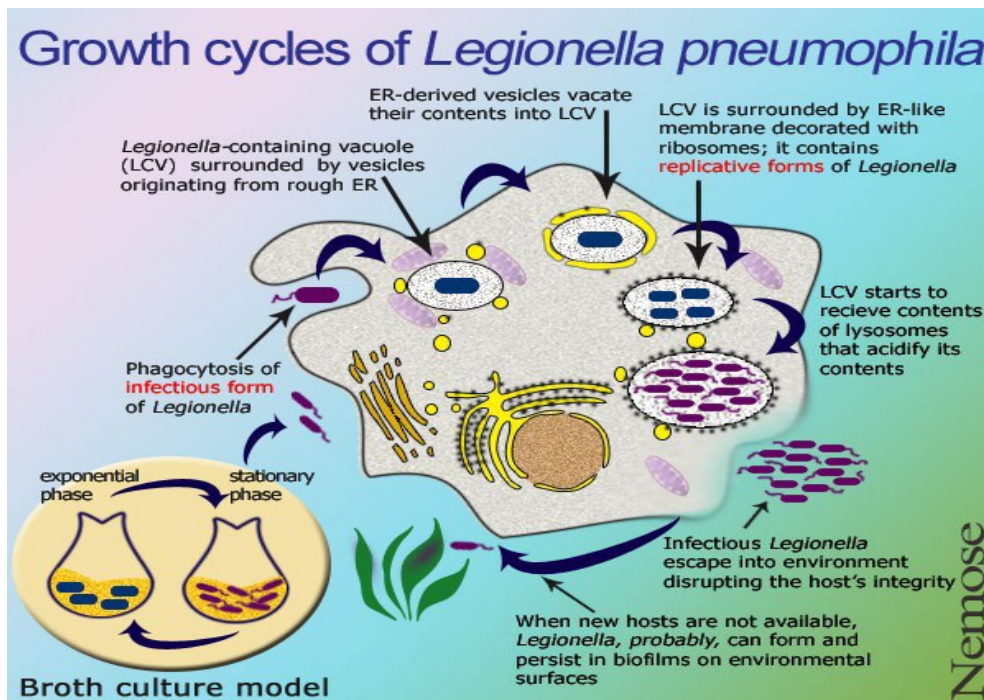


Figura 8: Esquema de abordaje de *Legionella* a los macrófagos alveolares.

Fuente: www.alamy.es.

El período de incubación de la legionelosis se estima entre 2 y 10 días (Fraser *et al.*, 1977). La mayoría de las personas sanas expuestas a *Legionella* no enferman. La enfermedad es más común en individuos con un mayor riesgo de infección, como son personas de edad avanzada, fumadores actuales o exfumadores, personas con enfermedades pulmonares como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o el enfisema pulmonar, personas con comorbilidades como diabetes mellitus, neoplasias, insuficiencia renal o que toman medicamentos para suprimir el sistema inmunológico (Pérez-Cobas *et al.*, 2020).

En la figura 9 se recrea gráficamente el proceso de invasión de los alveolos pulmonares por parte de la bacteria transportada en los aerosoles.



Figura 9: Esquema de recepción de aerosoles por las vías respiratorias.

Fuente: www.phsserkonten.com.

La legionelosis es más común durante el verano y principios del otoño, debido a las condiciones ambientales que favorecen el crecimiento y la diseminación de la bacteria (Graham *et al.*, 2023).

El riesgo de neumonía por *Legionella* puede aumentar en ciertas circunstancias, como después de períodos de lluvia o durante emergencias de salud pública como así fue durante la pandemia de COVID-19, lo que subraya la necesidad de mejorar en diagnósticos diferenciales.

No obstante, la neumonía por *Legionella* puede producirse en pacientes sin exposición típica a entornos susceptibles, lo que complica aún más su diagnóstico (Palazzolo *et al.*, 2020).

En determinados momentos el diagnóstico de la neumonía por *Legionella* puede comprometer la vida del paciente, especialmente en casos con comorbilidades con lesiones pulmonares previas (Rhoads y Hammes, 2021).

Presentación clínica

Tras la exposición a aerosoles que contienen *Legionella*, los individuos pueden ser asintomáticos o presentar síntomas, dependiendo de su estado de salud en el momento de contraer la infección.

El inicio del proceso morboso es agudo, con fiebre alta, mialgia y tos. Aproximadamente el 50% de los pacientes presentan además alteraciones neurológicas y gastrointestinales, bradicardia relativa, hipofosfatemia o niveles elevados de ferritina (Prussin *et al.*, 2017).

Esta enfermedad a menudo se complica por la diseminación extrapulmonar, causando una mortalidad del 8 al 12% (Magdzińska *et al.*, 2023).

En casos raros, la legionelosis puede presentarse como una "infección extrapulmonar por *Legionella pneumophila*, sin neumonía, afectando tejidos blandos, líquido sinovial o el corazón (Barrabeig *et al.*, 2010).

Aparte de neumonía esta bacteria provoca fiebre de Pontiac, una forma leve y autolimitada no relacionada con la neumonía que también ha sido vinculada a la exposición a aerosoles que contienen *Legionella* (Prussin *et al.*, 2017; Iliadi *et al.*, 2022). Suele diagnosticarse solo cuando los casos ocurren en forma de brote epidemiológico, debido a la naturaleza leve de los síntomas. Este diagnóstico de la fiebre de Pontiac está sesgado por la falta de procedimientos diagnósticos claros establecidos.

En el caso de la neumonía causada por *L. pneumophila* es más sencillo hacer un diagnóstico de sospecha previo, cuando los antibióticos beta-lactámicos o aminoglucósidos son ineficaces, el paciente está inmunosuprimido, tiene insuficiencia hepática o renal, diabetes mellitus, ha estado en el lugar de exposición o ha trabajado con instalaciones de fontanería/agua directamente antes de la infección (Niu y Zhao., 2022; Magdzińska *et al.*, 2023).

Diagnóstico de laboratorio de la legionelosis

Para diagnosticar que un paciente padece legionelosis en alguna de sus formas clínicas, además de la sintomatología que exprese, es necesaria la confirmación del laboratorio. Las pruebas se realizan a partir de muestras de

esputo, secreciones del tracto respiratorio, tejido, sangre, suero y orina (Magdzińska *et al.*, 2023).

El rango de posibilidades diagnósticas en laboratorio incluye pruebas serológicas, cultivos bacterianos del tracto respiratorio, pruebas de antígenos en orina y pruebas de anticuerpos en suero y otros métodos moleculares (p. ej., reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Iliadi *et al.*, 2022).

En los resultados de laboratorio, se puede observar un aumento en la actividad de la alanina amino transferasa (ALT), de la aspartato amino transferasa (AST) y de la creatina quinasa (CK), así como hiponatremia en el suero sanguíneo.

Por otro lado, en el análisis de orina, pueden aparecer proteínas y hematuria. Una radiografía de tórax muestra una infiltración en los pulmones ubicada cerca de la pleura, unilateral o bilateral, con signos de desintegración del órgano a veces (Magdzińska *et al.*, 2023).

El cultivo respiratorio es el más frecuente para el diagnóstico de la legionelosis y permite la identificación de especies. Aunque la detección de antígeno urinario se utiliza cada vez más en el ámbito médico, este método solo es capaz de diagnosticar *L. pneumophila* serogrupo 1 (Lp1).

El medio de cultivo más comúnmente utilizado para aislar y cultivar *Legionella* spp. es el agar de extracto de levadura y carbón tampón (BYCE), suplementado con 0,1% de alfa-cetoglutarato. Este medio puede hacerse selectivo añadiendo antibióticos (Vittal *et al.*, 2021).

El uso rutinario de esta técnica es altamente recomendado ya que permite el diagnóstico de todas las especies de *Legionella* y la investigación de brotes y estudios epidemiológicos adicionales. Además, los cultivos de secreciones del tracto respiratorio inferior pueden ser utilizados para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (Instituto de Salud Carlos III, 2019; Iliadi *et al.*, 2022).

El cultivo de muestras no respiratorias se recomienda solo si se sospecha que la enfermedad afecta a otros espacios anatómicos. A veces pueden ocurrir episodios de manifestaciones de legionelosis no respiratoria, acompañadas o no de neumonía (Chambers *et al.*, 2021). Las infecciones extrarespiratorias son variadas e incluyen esplenomegalia y rotura de bazo,

pericarditis, miocarditis, infecciones de heridas, endocarditis, artritis e infecciones del sistema nervioso central (Burillo *et al.*, 2017).

La PCR se utiliza cada vez más en y actualmente es una prueba validada para un diagnóstico rápido de la legionelosis causada por Lp1 y otras especies de *Legionella pneumophila* (Burillo *et al.*, 2017; Tomaskovic *et al.*, 2022).

La mayoría de los casos de legionelosis son esporádicos y adquiridos en la comunidad (más del 70%), seguidos por aquellos relacionados con viajes (más del 20%) o relacionados con la atención sanitaria (alrededor del 10%).

En la figura número 10 se observa la evolución en la notificación de casos asociados a viajes tanto en viajeros nacionales como extranjeros en una década.

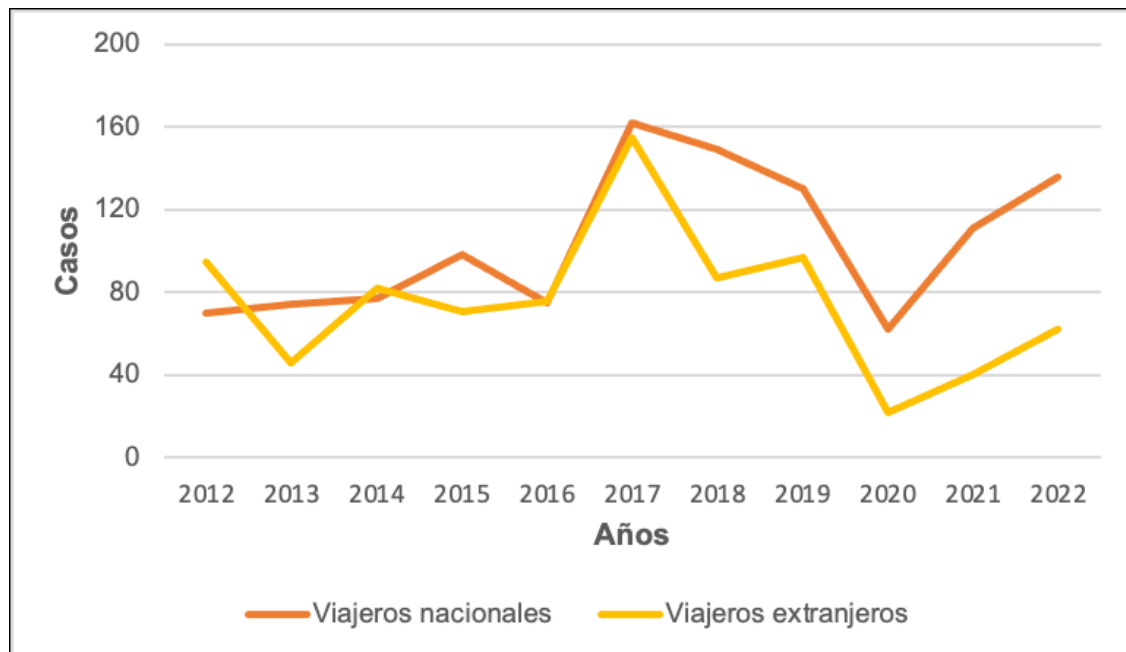


Figura 10: Casos en viajeros nacionales y extranjeros asociados a viajar a España. Años 2012 a 2022. Fuente:RENAVE.

Durante la última década, las tasas de incidencia de legionelosis han aumentado en los Estados Unidos, Canadá, Europa, Israel y Japón, aunque está subestimada a nivel mundial (Burillo *et al.*, 2017; Tomaskovic *et al.*, 2022).

No obstante, el diagnóstico de laboratorio de la LD puede basarse en técnicas de cultivo o no cultivo (Burillo *et al.*, 2017).

Técnicas de No Cultivo

L. pneumophila puede identificarse en muestras clínicas mediante microscopía fluorescente, aunque la sensibilidad de este método es baja debido a su alta dependencia de la calidad de la tinción, la habilidad del operador y la necesidad de una alta carga bacteriana (Burillo *et al.*, 2017). Además, la existencia de organismos no *Legionella* que se tiñen de forma cruzada ha determinado que este método diagnóstico se utilice raramente. (Chambers *et al.*, 2021).

En la figura 11 se observa una imagen típica de *Legionella* mediante microscopía fluorescente.

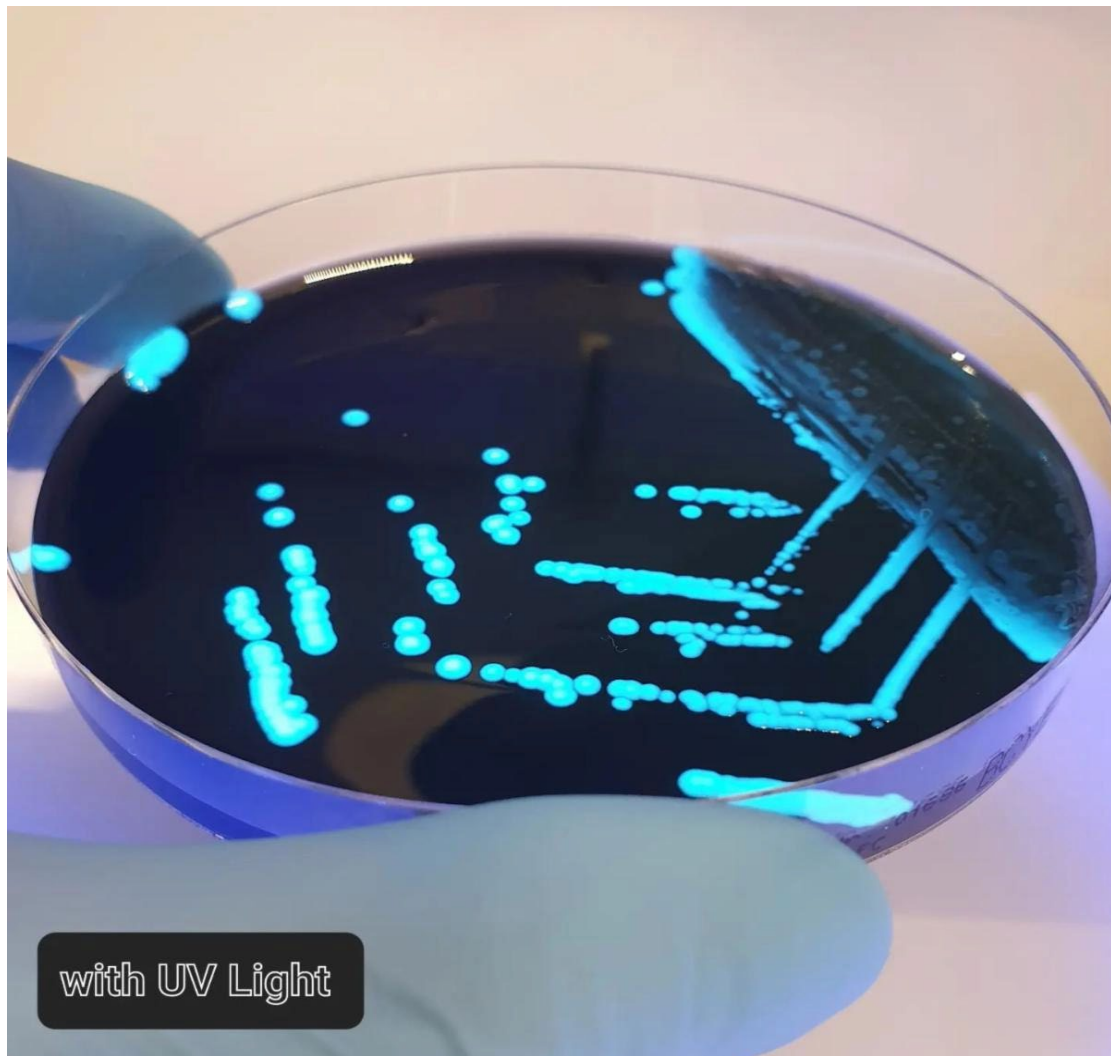


Figura 11: Imagen de microscopía fluorescecente de Legionella.

Fuente. www.ewcdiagnostics.com.

Legionella es difícil de detectar mediante la microscopía de muestras de pacientes teñidas con Gram (Brenner *et al.*, 1979). La tinción con solución de fucsina básica al 0,1% en lugar de safranina es más efectiva, pero aun así es difícil visualizarlas.

La prueba diagnóstica no basada en cultivo más utilizada para la legionelosis es la detección de antígeno soluble en orina, que identifica el lipopolisacárido, un componente de la pared celular de *L. pneumophila* (LPS) (Fields *et al.*, 2002).

Este método es el más rápido, aunque está limitado a *L. pneumophila* serogrupo 1 (Lp1). En Europa, los casos diagnosticados que utilizan el método de antígeno urinario han aumentado significativamente desde 1998 (15% en 1995 vs. más del 90% en 2006), acompañando el aumento en el uso de esta prueba. Los pacientes dan un resultado positivo en la prueba dentro de 48 a 72 horas desde la aparición de los síntomas y pueden continuar dando positivo durante varias semanas o meses (Kim *et al.*, 2022).

La sensibilidad de la prueba es del 56% al 99%, lo que significa que puede no detectar hasta el 40% de los casos de LD. La sensibilidad es mayor para los subtipos Lp1 MAb 3/1. Se ha observado una sensibilidad más baja, que oscila alrededor del 40% para otros subtipos. La sensibilidad de la prueba se ha correlacionado con la gravedad de la LD, y también es menor en pacientes con infección nosocomial o bajo inmunosupresión debido a una mayor probabilidad de infecciones causadas por cepas distintas de Lp1 MAb 3/1 o por especies de *Legionella* distintas de *L. pneumophila* (Burillo *et al.*, 2017).

Una minoría de pacientes con fiebre de Pontiac también puede dar positivo en la prueba de antígeno urinario. Si los hallazgos epidemiológicos y clínicos en estos pacientes indican fiebre de Pontiac asociada a Lp1, la prueba podría servir para confirmar los casos (Prussin *et al.*, 2017).

Las guías de la IDSA-ATS (Infectious Diseases Society of América) sobre el manejo de la neumonía adquirida en la comunidad (community-acquired pneumonia -CAP-) en adultos, recomiendan la prueba de antígeno urinario en pacientes que no responden al tratamiento con antibióticos ambulatorios, aquellos con neumonía grave, especialmente si requieren cuidados intensivos, están inmunocomprometidos, pacientes que abusan del alcohol,

si han viajado en las últimas dos semanas, o bien presentan derrames pleurales (Burillo *et al.*, 2017).

Técnicas Moleculares

Las técnicas moleculares pueden mejorar el diagnóstico de LD porque detectan diferentes serogrupos y especies (Nisar *et al.*, 2020). Estas técnicas también presentan una mayor sensibilidad (alrededor del 30%) que los métodos de cultivo. Los métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos han identificado con éxito especies de *Legionella*, especialmente *L. pneumophila*, en orina, esputo y sangre (Nisar *et al.*, 2020).

Existen seis ensayos comerciales, pero solo ha recibido la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. el ensayo conocido como BD ProbeTec ET *L. pneumophila* amplified DNA assay, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, (Cho *et al.*, 2012).

Métodos Serológicos

Los métodos serológicos no son muy efectivos. Los títulos altos de anticuerpos detectados en muestras de suero en fase aguda no son concluyentes porque pueden estar presentes anticuerpos de infecciones subclínicas previas por *Legionella* spp. o anticuerpos de reacción cruzada de infecciones bacterianas heterólogas. Además, en la mayoría de los pacientes con LD confirmada por cultivo, la seroconversión no es detectable hasta al menos tres semanas después de la infección (Feng *et al.*, 2021).

Hasta en una cuarta parte de los pacientes con enfermedad confirmada por cultivo, no hay seroconversión detectable. Además, muchos pacientes inmunosuprimidos nunca producen anticuerpos. Las muestras de suero en fase aguda con un título de anticuerpos alto no son concluyentes dado que del 1% al 16% de los adultos sanos tienen títulos mayores de 1:256 (Burillo *et al.*, 2017; Graham, 2022).

El cultivo de muestras del tracto respiratorio inferior (LRT) sigue siendo el punto óptimo para detectar la LD. Las muestras para cultivo obtenidas en la fase aguda de la infección deben ser transportadas rápidamente al laboratorio, preferiblemente antes de iniciar la terapia antimicrobiana.

Para obtener rendimientos óptimos de *Legionella* spp., las muestras se diluyen para limitar la inhibición del crecimiento por factores tisulares y séricos o antibióticos (Vittal *et al.*, 2021).

Para minimizar la microbiota respiratoria que acompaña, las muestras se tratan previamente con un choque térmico o una solución de lavado ácido (Niu, 2022) La primera etapa de aislamiento requiere medios de cultivo especiales que contengan L-cisteína, hierro y alfa-cetoglutarato (Murdoch *et al.*, 2020; Vittal *et al.*, 2021).

Aspectos Clínicos de la Legionelosis

La patogenia de la LD comienza con la adhesión de las células bacterianas a las células del huésped, seguida de la replicación intracelular y la diseminación. La capacidad de *L. pneumophila* para atravesar la barrera del epitelio pulmonar acaba provocando bacteriemia, shock séptico y fallo multiorgánico. (Moretti *et al.*, 2021).

L. pneumophila altera la función de las células del huésped creando un entorno protector que proporciona nutrientes para su crecimiento, mediante mecanismos como la apoptosis de naturaleza fisiológica y desencadenada por señales celulares controladas genéticamente, que hace posible la destrucción de las células dañadas. Por otra parte, contribuyen también a la generación de nutrientes procesos de autofagia, así como biosíntesis de fosfolípidos (Iliadi *et al.*, 2022).

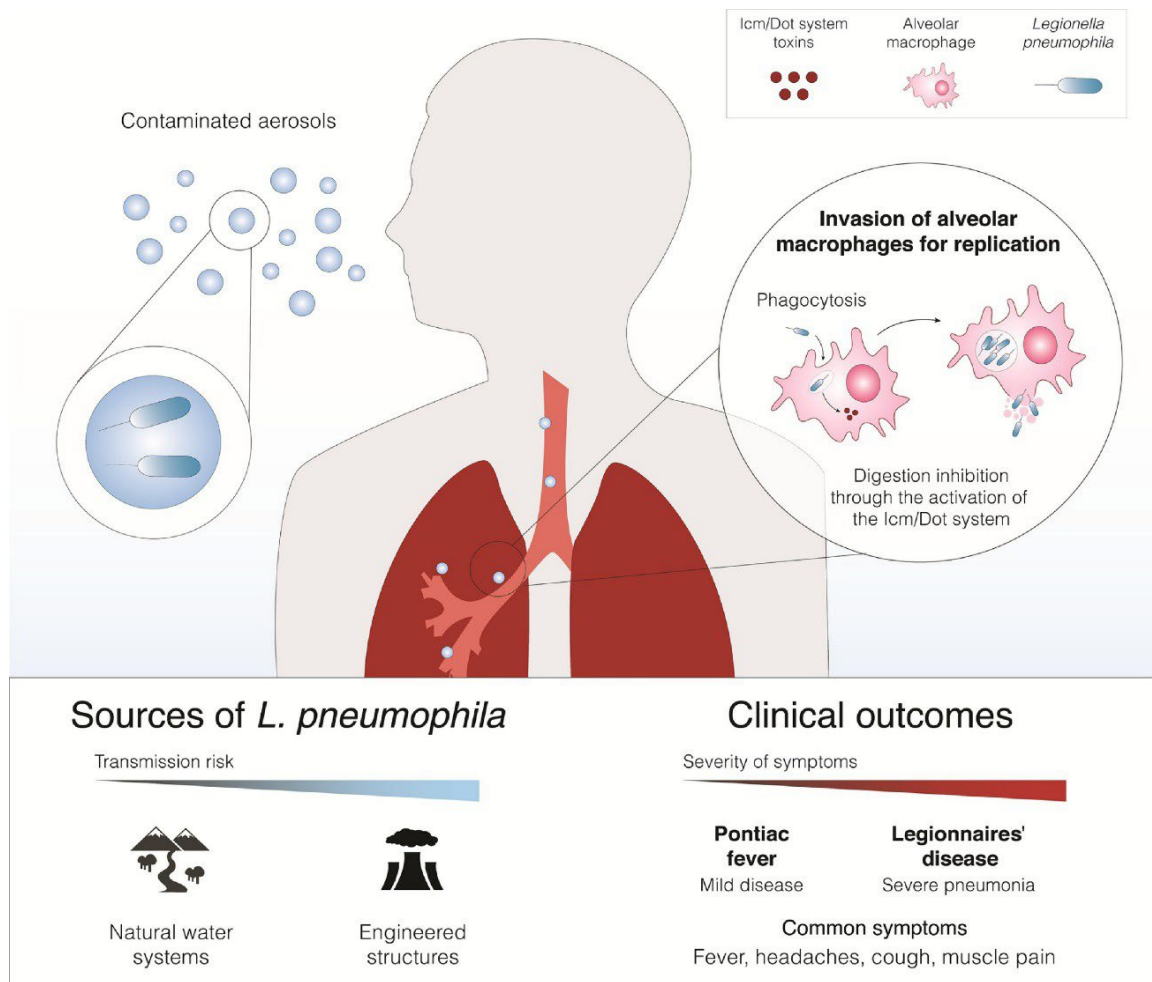
L. pneumophila transloca más de 300 proteínas efectoras en los macrófagos del huésped e inhibe la síntesis de proteínas eucariotas alterando la traducción del ARNm (Moretti *et al.*, 2021).

A través de la secuenciación del genoma, se ha descubierto que *L. pneumophila* codifica una variedad de proteínas similares en funcionalidad a las proteínas eucariotas. Además, la investigación sobre microARNs (miRNAs) ha demostrado que ciertos miRNAs (miR-125b, miR-221 y miR-579) afectan significativamente la replicación intracelular de *L. pneumophila* (Iliadi *et al.*, 2022).

No obstante, la manifestación clínica de la LD depende de la carga bacteriana en el aerosol, pero fundamentalmente del estado inmunológico del

paciente y sus factores de riesgo como puede ser el tabaquismo y las enfermedades pulmonares crónicas (Moretti *et al.*, 2021).

La figura 12 recrea el proceso de invasión de las vías respiratorias por parte de *Legionella* desde los aerosoles procedentes del exterior.



Trends in Microbiology

Figura 12: Esquema de invasión alveolar de *Legionella*.

Fuente: ar.inspiredpencil.com.

Legionella spp. actúa también en combinación con otros microorganismos, como *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter cinaedi*, e infecciones virales como SARS CoV-2, llegando a provocar sepsis generalizada después de la infección (Riccò, 2022).

Además de la fiebre de Pontiac y la LD se han reportado manifestaciones extrapulmonares de la Legionelosis, como afecciones cardíacas, cerebrales,

abdominales (vesícula biliar), articulares y cutáneas. Las manifestaciones de LD que se presentan con exantema son extremadamente raras, diagnosticándose solo once casos en la literatura científica (Iliadi *et al.*, 2022).

La forma neumónica de la legionelosis tiene un período de incubación que suele ser de 2 a 10 días, aunque en algunos brotes se ha registrado hasta 16 días. La gravedad de la enfermedad varía desde una tos leve hasta una neumonía con una evolución fatal rápida.

Los síntomas iniciales incluyen fiebre, pérdida de apetito, dolor de cabeza, malestar y letargo. Algunos pacientes también pueden experimentar mialgia, diarrea y confusión (Moretti *et al.*, 2021). Por lo general, el síntoma inicial es una tos seca leve que en el 50% de los pacientes se vuelve productiva. La hemoptisis ocurre en aproximadamente un tercio de los casos. Algunos pacientes con inmunosupresión, como los trasplantados de riñón o con lupus eritematoso sistémico (LES), desarrollaron absceso pulmonar y empiema pleural (Moretti *et al.*, 2021).

Las manifestaciones gastrointestinales como diarrea acuosa y dolor abdominal repentino pueden ser los síntomas iniciales en pacientes con LD. *L. pneumophila* comparte con otros patógenos intracelulares, la propensión a producir bradicardia relativa en presencia de fiebre (Chambers *et al.*, 2021). La bradicardia relativa conocida como signo de Faget es poco común en la neumonía bacteriana.

La tasa de mortalidad relacionada con LD depende de la celeridad a la hora de recibir un tratamiento antimicrobiano inicial, y los factores idiosincrásicos del huésped (nutrición, estado inmunológico, coinfección, etc.) (Moretti *et al.*, 2021). En general, la tasa de mortalidad suele estar en el rango del 5% al 10%. Sin embargo, puede llegar hasta el 40-80% en pacientes inmunosuprimidos no tratados. Con el tratamiento adecuado, la tasa de mortalidad, incluso en los casos mencionados, puede reducirse al 5-30% (Iliadi *et al.*, 2022).

Es importante destacar que los brotes nosocomiales son los que presentan mayor tasa de mortalidad precisamente porque suelen afectar a pacientes inmunológicamente degradados (Riccò, 2022).

En las figuras 13 y 14 puede observarse que la edad es un factor de riesgo de mortalidad importante en la LD tanto en hombre como en mujeres, porque en ambos casos se ve un aumento de esta mortalidad en individuos de edad más avanzada.

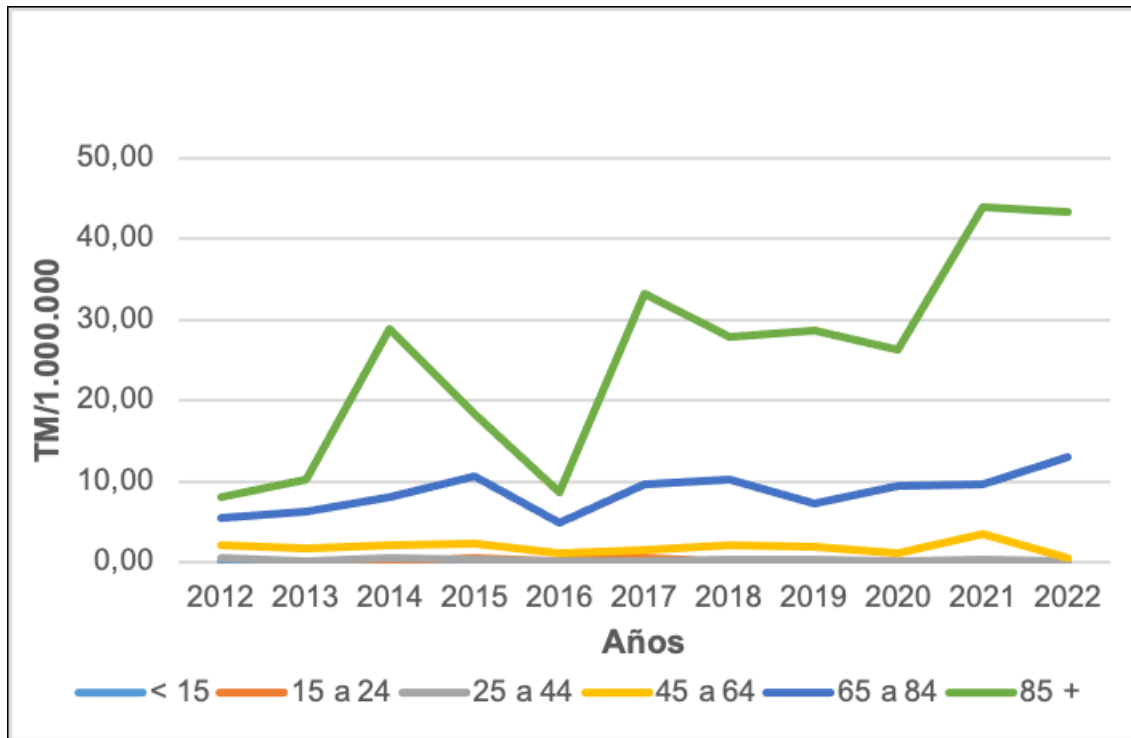


Figura 13: Tasas de mortalidad por legionelosis por grupo de edad en hombres. España. Años 2012 a 2022. Fuente: RENAVE.

Se ha descrito una manifestación aún más rara de LD que cursa con hipertrigliceridemia y rabdomiólisis masiva, en un paciente con legionelosis diseminada (Ricco, 2022).

Determinadas alteraciones analíticas como hiponatremia, hipofosfatemia, niveles elevados de enzimas hepáticas y aumento agudo del nivel de creatina fosfoquinasa incrementan el riesgo de complicaciones en la enfermedad.

No obstante, los estudios clínicos no son determinantes a la hora de identificar y verificar parámetros clínicos y de laboratorio vinculados específicamente para la infección por *Legionella* (Moretti et al., 2021).

Recientemente se ha realizado un estudio por Beekman *et al.* que a su vez valida y establece un sistema de puntuación diagnóstica para la detección de neumonía por *L. pneumophila*, basado en seis ítems al ingreso que se denomina puntuación de predicción de *Legionella* (Iliadi *et al.*, 2022).

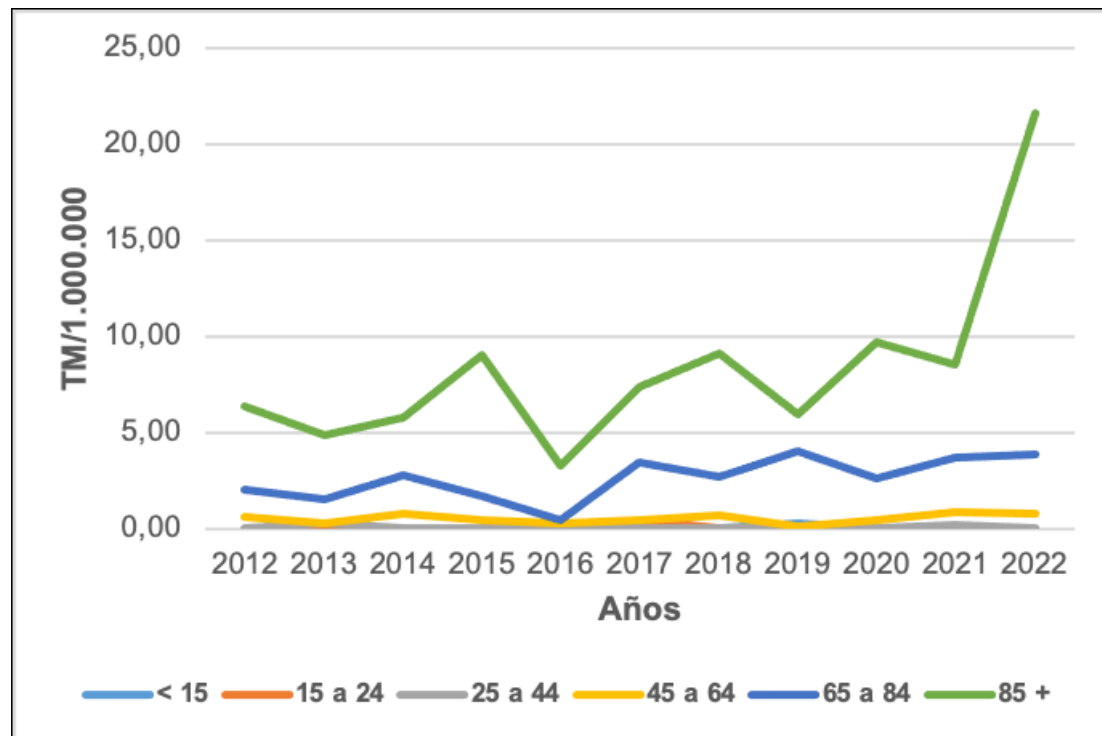


Figura 14: Tasas de mortalidad por legionelosis por grupo de edad en mujeres. España. Años 2012 a 2022. Fuente: RENAVE.

Estructura de las Células Bacterianas de *L. pneumophila* como Fuente de Factores de Virulencia Superficiales

Las interacciones de *Legionella* spp. con los organismos hospedadores dependen también de sus estructuras superficiales, como la envoltura celular (Iliadi *et al.*, 2022).

Otra estructura a considerar es la membrana interna, que circunscribe el citoplasma bacteriano. La membrana interna es una bicapa de fosfolípidos con proteínas integrales como FeoB o enzimas metabólicas como IraA/IraB.

La estructura lipídica y las propiedades fisicoquímicas de la membrana interna de *L. pneumophila* fueron descubiertas y analizadas por concluyendo que contiene fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina (Hindahl y Iglewski, 1984).

Dado el papel influyente del hierro durante todas las fases del crecimiento de *Legionella* spp., diferentes proteínas y enzimas están involucradas en este proceso. La captación del ión ferroso se realiza principalmente por FeoB, un transportador de hierro dependiente de la transaminasa glutámico-pirúvica (GTP). Además, estudios *in vitro* han demostrado que FeoB es necesario para la inactivación eficiente de los macrófagos (Feeley *et al.*, 1979).

- El espacio periplásmico, o periplasma, contiene enzimas solubles como proteasas y nucleasas, que se consideran un precursor evolutivo de los lisosomas clásicos de las células eucariotas (Żbikowska *et al.*, 2014; Voth, 2019). Además, el periplasma contiene peptidoglicano, un importante factor de virulencia microbiana que contribuye a la supervivencia de *L. pneumophila* dentro de los macrófagos y las amebas. También se encuentran varios antígenos colocalizados, incluido la proteína asociada al peptidoglicano (PAL).

La proteína PAL se excreta en la orina como un componente de los antígenos de *Legionella* y es útil como prueba alternativa de diagnóstico.

- La membrana externa (OM) es la característica estructural distintiva de *Legionella* spp. Es una bicapa lipídica compuesta de fosfolípidos, lipoproteínas, LPS y otras proteínas que conectan la OM al peptidoglicano (Iliadi *et al.*, 2022).

Legionella spp. contiene varias fosfolipasas en la OM que juegan un papel patogénico como factores de virulencia principales. Las fosfolipasas bacterianas como PlaB destruyen las membranas del huésped (Newton *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2021).

Se ha observado que la presencia de proteínas asociadas a la superficie en la OM, entre ellas la proteína de potenciación de infectividad de macrófagos (Mip) y la proteína mayor de la membrana externa (MOMP), juegan un papel determinante en la legionelosis (Garduño, 2020).

MOMP está involucrada en la adhesión a las células del huésped y ha sido aislada por Hindahl e Iglewski (Hindahl e Iglewski, 1983). La Mip, esencial

durante el proceso de invasión de *L. pneumophila*, muestra actividad isomerasa peptidil-prolil cis/trans y es necesaria para las primeras etapas de la infección intracelular y la supervivencia en los macrófagos y el epitelio pulmonar (Marra y Shuman, 1989).

Lipopolisacáridos (LPS)

Los LPS son los principales antígenos de todas las bacterias Gramnegativas, pero las respuestas celulares mediadas por los LPS de *Legionella* spp. son reducidas debido a que una parte de su composición química es un carbohidrato (Escobar Villalobos, 2021). No obstante, parece demostrado que los LPS están involucrados en el proceso de adhesión a la célula huésped (Abu Khweek *et al.*, 2018).

Factores de Virulencia Secretados

Legionella spp. secreta varios pigmentos, toxinas y enzimas, así como más de 10000 proteínas secretoras, algunas de las cuales permiten que sobreviva en condiciones ambientales adversas, como el exceso de luz y prevaleciendo por encima de otros microorganismos. (Grabowska-Grucza *et al.*, 2023; Iliadi *et al.*, 2022).

Sistemas de Secreción

Se han descrito cuatro tipos de sistemas de secreción como fuente de factores de virulencia (Guillemot *et al.*, 2022):

- Sistema de Secreción Tipo I (T1SS): Conocido como Lss, consiste en un transportador ABC, una proteína de fusión de membrana y una proteína de la membrana externa, identificadas exclusivamente en cepas de *L. pneumophila*.

- Sistema de Secreción Tipo II (T2SS): Denominado Lsp, secreta más de 25 proteínas y numerosas enzimas de degradación, incluyendo RNasas y metaloproteasas.

- Sistema de Secreción Tipo III (T3SS): Consiste en un mecanismo de transporte de proteínas que transloca sustratos citoplasmáticos directamente al citoplasma del huésped.

- Sistema de Secreción Tipo IV (T4SS): Incluye entrada en las células del huésped, replicación, apoptosis y finalmente la salida de las células del

huésped. Hay dos subclases de T4SS: T4SS-A (Lvh) y T4SS-B (Dot/Icm). Los genes Dot/Icm codifican proteínas del sistema secretor Dot/Icm y regulan el tráfico de orgánulos y la multiplicación intracelular (Guillemot *et al.*, 2022).

Macrófagos

La patogenicidad de *Legionella* comienza con la entrada del microorganismo en el organismo humano, seguida de la replicación bacteriana dentro de los fagocitos, los macrófagos alveolares.

Los principales receptores de en los macrófagos son los identificados como TLR3 y TLR4, junto con TLR2 y TLR5. Estos receptores realizan el reconocimiento por parte de los macrófagos alveolares de los patrones (PRRs) de *L. pneumophila* (Guillemot *et al.*, 2022).

Legionella spp. desarrolla una estrategia de supervivencia intracelular en la que participan las endosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias (Guillemot *et al.*, 2022).

Tras la invasión, *Legionella* spp. activa sus mecanismos de virulencia, a saber:

- vacuolas que contienen *Legionella* (LCVs).
- activación de la expresión de genes que codifican un sistema de secreción de tipo IV (T4SS) para la translocación de proteínas.
- Secreción de la enzima GTPasa RAB1 a la membrana de las LCVs a través del sistema T4SS.
- Asegurar el suministro nutricional de las mitocondrias para la replicación bacteriana (Guillemot *et al.*, 2022).

Además, *L. pneumophila* dispone de mecanismos inhibidores de la autofagia a través de la proteína efectora, RavZ. Esta proteína se localiza en la membrana del fagóforo (el precursor del autofagosoma) y luego escinde la región C-terminal de las proteínas de la familia Atg8 conjugadas con fosfatidiletanolamina (PE), como LC3. La maduración de la proteína LC3 es un proceso fundamental en los pasos de elongación del fagóforo (Li *et al.*, 2024).

Epitelio Pulmonar

La superficie alveolar está revestida por el epitelio pulmonar. La mayor parte del área superficial está formada por células neumocíticas de tipo I, especializadas en el intercambio de gases, mientras que las menos abundantes células neumocíticas de tipo II son responsables de las funciones secretoras (Cegelski *et al.*, 2008). La capacidad de las cepas de *Legionella* spp. para penetrar la barrera epitelial alveolar a través de los procesos bioquímicos descritos anteriormente, durante la fase temprana de la infección tiene una influencia significativa en el progreso de la LD (Escobar Villalobos, 2021).

Células Endoteliales

L. pneumophila puede infectar y romper la barrera anatómica de los vasos sanguíneos pulmonares y las células endoteliales como un posible proceso iniciador de bacteriemia, durante la diseminación sistémica de la bacteria a través de la circulación sanguínea. Igualmente se ha demostrado que *L. pneumophila* puede crecer dentro de células endoteliales humanas cultivadas (Chiaraviglio *et al.*, 2008).

Respuesta Inmune Humoral

La inmunidad humoral juega un papel secundario en la defensa del huésped de *Legionella*.

Estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que *L. pneumophila* induce la maduración de células dendríticas (DCs) (Guillemot *et al.*, 2022). Los mecanismos de la maduración de las DCs dependen de la señalización de los receptores tipo Toll 2 y 4. La presentación del antígeno (Ag) por las DCs se evidencia por la regulación al alza del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. La consecuencia de la síntesis y la presencia de anticuerpos específicos fortalece la fagocitosis. Las DCs activan células linfocitos T CD4+, a través del MHC de clase II.

Posteriormente, los linfocitos T CD4+ activados estimulan las células B específicas del antígeno. La inmunidad humoral inicialmente responde produciendo anticuerpos IgM seguidos de IgG para activar la inmunidad adaptativa contra *Legionella*, y especialmente contra la reinfección. Además,

las DCs maduras aumentan la secreción de citocinas proinflamatorias como IFN γ , TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Guillemot et al., 2022).

TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral Alfa)

El TNF- α , o Factor de Necrosis Tumoral Alfa, es una citocina proinflamatoria importante en la respuesta inmune. Desempeña múltiples funciones en la inflamación y la defensa del huésped contra infecciones, incluida la legionelosis.

Función y producción de TNF- α :

- Producción por Macrófagos: Algunos estudios *in vitro* han demostrado que *Legionella spp.* induce la secreción de TNF- α desde los macrófagos (Guillemot et al., 2022). Esta secreción es una respuesta inicial del sistema inmunitario al detectar la presencia de patógenos, y es fundamental para la activación de otras células inmunitarias y la propagación de la señal de inflamación en el cuerpo.

- Inducción por Células Dendríticas (DCs): La maduración de las células dendríticas, inducida por *L. pneumophila*, también contribuye a la secreción de TNF- α . Las DCs maduras aumentan la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β . Estas citocinas actúan en conjunto para promover la inflamación y coordinar la respuesta inmunitaria contra la infección.

- Rol en la Fagocitosis: El TNF- α fortalece la fagocitosis, el proceso mediante el cual los macrófagos y otras células inmunitarias ingieren y destruyen patógenos. La presencia de TNF- α estimula a los macrófagos a ser más activos en la eliminación de *Legionella* y otros patógenos (Grigoryeva y Cianciotto, 2021; Guillemot et al., 2022).

Interacción de TNF- α con receptores Tipo Toll (TLR)

- La señalización de los receptores tipo Toll 2 y 4 (TLR2 y TLR4) interesa para la maduración de las células dendríticas y la producción de TNF- α . Estos receptores reconocen patrones moleculares asociados con patógenos (PAMPs) en *L. pneumophila*, desencadenando cascadas de señalización que terminan en la activación de la respuesta inmunitaria (Grigoryeva y Cianciotto, 2021).

Implicaciones clínicas de la producción de TNF- α :

- **Inflamación Sistémica:** La liberación de TNF- α contribuye a la inflamación sistémica, una característica de las infecciones severas. En casos graves, niveles elevados de TNF- α pueden conducir a complicaciones como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y el shock séptico.
- **Terapia y Pronóstico:** El manejo de la inflamación mediada por TNF- α es importante en el tratamiento de la legionelosis. Los agentes antiinflamatorios que modulan la actividad de TNF- α pueden ser útiles para controlar la inflamación excesiva y mejorar los resultados clínicos (Grigoryeva y Cianciotto, 2021).

Tratamientos de la Legionelosis

La legionelosis se trata de manera efectiva con una combinación de terapia antibiótica y soporte vital. La elección del tratamiento depende de la severidad de la enfermedad y del estado inmunológico del paciente.

Terapia Antibiótica

Los antibióticos de elección para tratar la legionelosis son:

- **Macrólidos:** La azitromicina es un macrólido que se ha utilizado ampliamente debido a su eficacia, perfil de seguridad y menor toxicidad.
- **Fluoroquinolonas:** levofloxacin es eficaz en el tratamiento de infecciones severas debido a su penetración en los tejidos y su actividad bactericida rápida en pacientes inmunocomprometidos.
- **Tetraciclinas:** La doxiciclina es una alternativa eficaz, especialmente en combinación con otros antibióticos en infecciones mixtas (Garrido *et al.*, 2005).

Las fluoroquinolonas se utilizan en la primera línea de tratamiento y en casos más complicados con la siguiente posología:

- **Levofloxacin:** administrada por vía intravenosa o intramuscular, una dosis de 500 mg dos veces al día o 750 mg una vez al día. (Garrido *et al.*, 2005).
- **Ciprofloxacin:** 400 mg por vía intravenosa dos veces al día o 500 mg por vía oral dos veces al día.
- **Ofloxacin:** por vía oral 400 mg dos veces al día.

- Moxifloxacino: por vía oral a una dosis de 400 mg una vez al día.

En tratamientos de segunda línea en casos menos complicados.

- Macrólido: azitromicina 500 mg una vez al día, claritromicina 500 mg dos veces al día o eritromicina 500 mg cuatro veces al día.
- Doxiciclina: por vía oral o intravenosa a una dosis inicial de 200 mg, seguida de 100 mg una vez al día (dos veces al día en casos más graves).

Los pacientes con LD deben recibir tratamiento durante al menos 7-14 días, con ciclos más cortos de azitromicina debido a su larga vida media. La recuperación es más probable si se administran los antibióticos adecuados y de forma temprana. (Garrido *et al.*, 2005).

El tratamiento no debe interrumpirse hasta que el paciente haya estado sin fiebre durante 48-72 horas. La duración del uso de antibióticos siempre debe ajustarse según la respuesta clínica hasta 21 días máximo, o 10 días para azitromicina en pacientes inmunocomprometidos (Rhoads *et al.*, 2021; Magdzińska *et al.*, 2023).

Manejo mediante Soporte vital

Incluye la terapia de oxígeno y administración de fluidos. En casos severos, puede ser necesario el soporte ventilatorio y la monitorización en una unidad de cuidados intensivos (UCI).

- Oxigenoterapia: Se administra para corregir la hipoxemia.
- Fluidos intravenosos: Para mantener la hidratación y apoyar la función renal.
- Manejo de complicaciones: Las complicaciones como el shock séptico requieren el uso de vasopresores y monitoreo hemodinámico intensivo (Ministerio de Sanidad, 2021).

Prevención de la Resistencia Antibiótica

El uso inapropiado de antibióticos puede llevar al desarrollo de resistencia bacteriana. Es esencial realizar pruebas de sensibilidad para guiar el tratamiento y ajustar los antibióticos según sea necesario (Ministerio de Sanidad, 2021).

La resistencia a los antibióticos mencionados anteriormente es relativamente rara (Rhoads *et al.*, 2021).

Tratamientos Alternativos y en Investigación

La terapia antibiótica estándar es eficaz en la mayoría de los casos, pero a veces hay que desarrollar tratamientos adicionales que puedan mejorar los resultados en infecciones severas o resistentes, por ejemplo, desarrollo de terapias antivirulencia que están diseñadas para desactivar los factores de virulencia bacterianos sin matar a la bacteria directamente, lo que podría reducir la presión selectiva para desarrollar resistencia (Cegelski *et al.*, 2008). La inmunoterapia en estos momentos está en fase de experimentación. (Bass *et al.*, 2023).

Control y Prevención

La prevención de la legionelosis implica el mantenimiento y desinfección adecuada de sistemas de agua, especialmente en entornos hospitalarios y de alto riesgo. Las regulaciones específicas y las directrices de control ambiental son esenciales para prevenir la proliferación de *Legionella* (Ministerio de Sanidad, 2021).

- Control del agua: Implementar sistemas de monitorización y tratamiento regular para prevenir la colonización de *Legionella* en sistemas de agua.

- Educación y entrenamiento: Asegurar que el personal responsable del mantenimiento de sistemas de agua esté adecuadamente entrenado en procedimientos de prevención y control (Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral, 2005)

Los pacientes con enfermedad confirmada (mediante prueba de PCR, prueba de antígeno en orina o cultivo de esputo) son comúnmente tratados con los antibióticos citados anteriormente

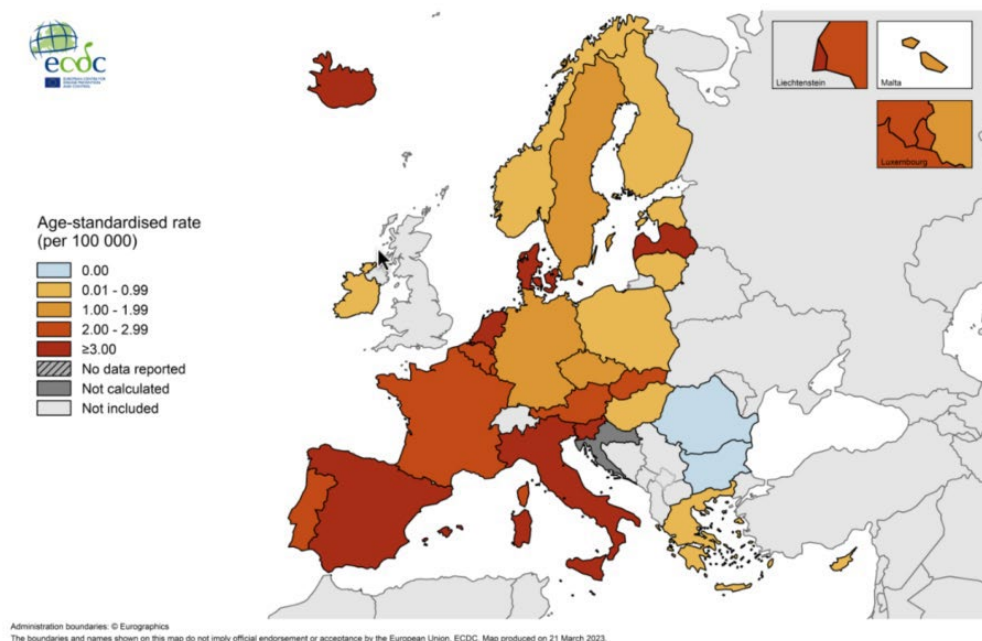
Para la infección extrapulmonar por *Legionella*, los pacientes suelen ser tratados con una fluoroquinolona (por ejemplo, levofloxacina) en combinación con varios procedimientos, como incisión y drenaje (Tomaskovic *et al.*, 2022).

1.1.3.2.- Epidemiología:

Legionella pneumophila, el agente causal más común, contribuye activamente en el cómputo global de neumonía adquiridas a nivel mundial (Graham *et al.*, 2022). En Europa, la neumonía por *Legionella* sigue siendo una preocupación notable de salud pública, con un número sustancial de casos reportados anualmente.

En la figura 15 se describe la distribución de casos en los países de Europa, correspondientes al año 2021. Se observa que el número de casos reportados es mayor en aquellos países en los que la red de vigilancia nacional está más consolidada, lo cual es una evidencia más del infradiagnóstico que aún persiste en este proceso morboso.

Figure 1. Distribution of cases of Legionnaires' disease per 100 000 population by country, EU/EEA, 2021



The general trend in the 2017–2021 period, has been of an increasing number of reported cases, other than the decrease during the COVID-19 pandemic period (Table 1; Figure 2).

Figura 15: Distribución de los casos de legionelosis por cada 100000 habitantes en países de Europa. Fuente: RENAVE.

Se ha demostrado que la prueba de antígeno urinario de *Legionella* (UAT) es importante en el diagnóstico de la neumonía por *Legionella*, con más del

90% de los casos en Europa identificados a través de este método (Guillot *et al.*, 2023).

Por otra parte, un estudio hospitalario realizado en Malasia proporciona información relevante sobre la epidemiología de la neumonía, incluyendo la contribución de la neumonía por *Legionella*.

Este estudio, exploró la epidemiología de la neumonía por *Legionella* en un entorno local (Malasia), identificando factores de riesgo como el tabaquismo, enfermedad pulmonar crónica, edad avanzada, diabetes e inmunosupresión. A pesar de la limitada disponibilidad de kits de prueba, se detectaron tres casos positivos de *Legionella* a través de pruebas de UAT y posteriormente confirmados con pruebas de inmunoensayos enzimáticos (EIA) de orina para determinar *Legionella*.

Los hallazgos de este estudio destacan que los factores de riesgo para la neumonía por *Legionella* incluyen el tabaquismo, enfermedad pulmonar crónica, edad avanzada, diabetes e inmunosupresión. Estos factores de riesgo son los que aparecen en la literatura existente que señala la importancia de estos elementos en la predisposición a desarrollar infecciones por *Legionella*.

Estos casos fueron tratados con azitromicina intravenosa durante 10 días, y los pacientes mostraron recuperación clínica y fueron dados de alta en un plazo de 10 días de hospitalización (Anthony *et al.*, 2020).

La presencia de estos factores de riesgo en la población estudiada sugiere la necesidad de una mayor vigilancia y conciencia sobre la neumonía por *Legionella*, especialmente en entornos hospitalarios donde los pacientes pueden presentar comorbilidades que los hacen más susceptibles a esta infección (Anthony *et al.*, 2020).

La inclusión de la neumonía provocada por *Legionella* en un estudio epidemiológico más amplio sobre la neumonía resalta la importancia de considerar esta infección en el diagnóstico diferencial de las neumonías adquiridas en la comunidad.

Las infecciones por *Legionella* han ido en aumento en ciertas regiones, como Nueva Zelanda, donde los métodos de diagnóstico mejorados han aumentado la incidencia de legionelosis en las últimas dos décadas (Graham *et al.*, 2023).

En otro estudio se señala que La epidemiología de la infección con *L. longbeachae* y otras especies de *Legionella* no pertenecientes a *L. pneumophila* está pobremente descrita en todo el mundo, aunque se han reportado casos en muchos países. Una razón principal para esto es la dificultad en el diagnóstico, con la probabilidad de que los casos estén significativamente subdiagnosticados y no reconocidos.

En muchos centros, las pruebas se basan principalmente en pruebas de antígeno en orina que reconocen solo el serogrupo 1 de *L. pneumophila*. El cultivo de muestras respiratorias es desaconsejado por algunas autoridades para enfermedades no graves, incluyendo en pacientes hospitalizados.

Los resultados también pueden verse comprometidos si las muestras se toman después de que se haya administrado terapia de amplio espectro (incluida la terapia anti-legionella (Chambers *et al.*, 2021).

Incidencia

La incidencia global de la LD es actualmente desconocida, principalmente porque está gravemente subdiagnosticada y subnotificada, y porque los países difieren en su nivel de conciencia, métodos de diagnóstico y esfuerzos de investigación. A pesar de esto, la información disponible sobre esta enfermedad ha mejorado considerablemente en los últimos veinte años, ya que la enfermedad se diagnostica con más frecuencia y las notificaciones han aumentado (Yang *et al.*, 2022).

Donde se emplean otras técnicas, como serología, técnicas específicas de cultivo y PCR, *L. longbeachae* ha emergido como una causa importante de la LD en la neumonía adquirida en la comunidad. Otras especies no pertenecientes a *L. pneumophila* se reconocen particularmente en pacientes severamente inmunocomprometidos.

Casi con certeza, las especies no pertenecientes a *L. pneumophila* causan muchos más casos de enfermedad leve a moderada que no llegan a la atención médica y siguen siendo una carga continua de morbilidad en la población (Chambers *et al.*, 2021).

La evidencia epidemiológica de la infección humana de otras especies no pertenecientes a *L. pneumophila* es limitada. Estas infecciones se reportan raramente, al menos en parte, debido al sesgo diagnóstico que impide que

se identifiquen los casos. Parece haber poca diferencia en la distribución o las tasas de incidencia reportadas de estas especies en todo el mundo (Molina *et al.*, 2023).

En la figura 16 se observa el incremento de los casos en España cuando la legionelosis pasó a ser considerada una enfermedad de declaración obligatoria, lo que es un indicio claro del infradiagnóstico existente hasta entonces y que aún persiste en muchas áreas del planeta.

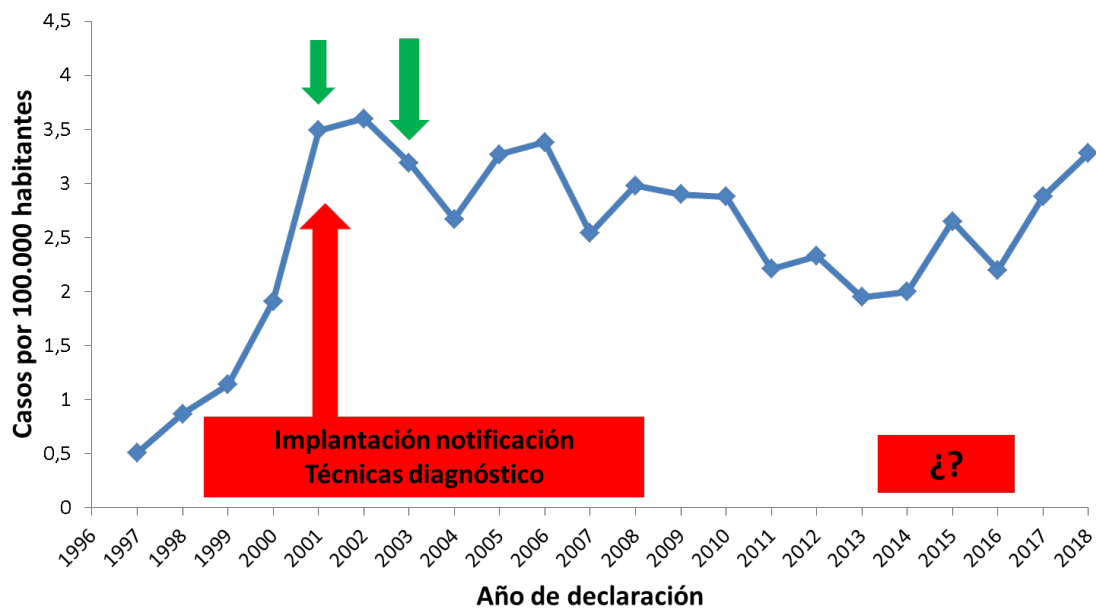


Figura 16. Vigilancia epidemiológica de la legionelosis. Tasas de incidencia (1997-2018). Fuente: Viñuela *et al.*, 2002.

De estas, *L. micdadei* es la más consistentemente reportada en todas las regiones. Se han descrito grupos de casos relacionados con una fuente común, incluidos 12 casos de LD causada por *L. micdadei* entre 38 pacientes con trasplante renal y cardíaco en un centro durante un período de tres meses, y se detectaron más casos 16 meses después. Posteriormente, se reportaron 16 casos de *L. micdadei* en otro centro de atención a mayores durante un período de 12 años, predominantemente entre pacientes hospitalizados inmunocomprometidos (Chambers *et al.*, 2021).

Existen algunos datos sobre la frecuencia de *Legionella* spp. como causa de la neumonía adquirida en la comunidad. Se estima que este agente causante representa entre el 2% y el 9% de estos casos (Yang *et al.*, 2022; Riccò, 2022). Hay datos de incidencia disponibles de los Estados Unidos y Canadá, Europa, algunos países del sudeste asiático (Japón, Singapur), y de Australia y Nueva Zelanda, debido a que es una enfermedad de notificación obligatoria en todos estos países (Burillo *et al.*, 2017).

En otro estudio sobre la incidencia se observó que la tasa de incidencia de neumonía por *Legionella* fue de 5,4 por cada 100 000 personas por año. *L. longbeachae* fue la especie predominante identificada y estuvo implicada en 150 (63%) de los 238 casos diagnosticados de LD. Esta fue la tasa más alta de LD reportada, causada tanto por *L. longbeachae* como por *L. pneumophila* a nivel mundial (Priest *et al.*, 2019).

Un sesgo importante de este estudio fue que los resultados se basan solo en aquellas muestras enviadas al laboratorio. Un pequeño estudio posterior que utilizó la recolección mejorada de esputo de pacientes hospitalizados con neumonía adquirida en la comunidad encontró que más del 40% de los pacientes con neumonía en nuestro estudio no pudieron expectorar esputo de manera espontánea, que aumentó significativamente al 67% con asistencia adicional o inducción de esputo. Este refuerzo en la expectoración aumentó la detección de casos de LD en un 36%. Por lo tanto, se puede deducir que se perdieron algunos casos en este estudio, ya que una tos seca es más común en la enfermedad del legionario que en otras causas de neumonía adquirida en la comunidad.

En Australia, durante el período de 2009 a 2015, la tasa anual de notificación de legionelosis mediante vigilancia pasiva fue de aproximadamente 1.5 por cada 100 000 personas. *L. longbeachae* fue la más comúnmente identificada (144 a 215 casos notificados) en comparación con *L. pneumophila* (114 a 228 casos).

L. longbeachae fue más común (>50%) en el clima mediterráneo de Australia Occidental y los Territorios del Norte tropicales (Australia's notifiable disease status, 2015; Annual report of the National Notifiable Diseases Surveillance System, 2019).

En contraste, *L. longbeachae* se reportó en números bajos en otros lugares, constituyendo el 0,3–3,6% de los casos en los EE. UU., 0,7% en Japón y 1% en Europa. Hay algunas evidencias preliminares de que los casos de *L. longbeachae* están aumentando tanto en Escocia como en los Países Bajos.

Hay muy poca información sobre la epidemiología de la LD en países de ingresos bajos y medios, pero se ha podido conocer un estudio poblacional de un año sobre las causas microbiológicas de la neumonía adquirida en la comunidad que requiere hospitalización en una provincia rural de Tailandia.

La infección con *L. longbeachae* fue identificada por seroconversión utilizando un ensayo de inmunofluorescencia indirecta de títulos combinados de IgG, IgA e IgM. Estos casos no fueron confirmados por cultivo o pruebas de PCR. La tasa de incidencia fue de 5-29 casos por cada 100,000 de la población, la incidencia aumentó con la edad y fue más común entre los hombres - razón de tasas 1,6, IC del 95%: 1,1-2,3 - (Feng, *et al.*, 2021).

Igualmente se ha notificado un solo caso de LD causada por *L. longbeachae* en un niño en Zambia. Este fue el único caso encontrado como parte de un estudio de un año realizado en cinco lugares en África y dos en Asia, de 2757 casos de neumonía adquirida en la comunidad infantil (Chambers *et al.*, 2021).

Se ha hallado otro grupo de cinco casos de neumonía nosocomial causada por *L. bozemanii* en un hospital comunitario entre pacientes inmunocomprometidos.

Estas series de casos han demostrado que la LD puede ser causada por una amplia variedad de especies no pertenecientes a *L. pneumophila* en pacientes inmunocomprometidos (Chambers *et al.*, 2021).

El Centro MD Anderson en Houston, Texas, reportó casos consecutivos de infecciones por *Legionella* en pacientes con cáncer de 2002 a 2014. La mayoría de las 33 cepas identificadas se obtuvieron en muestras durante la broncoscopia, y 18 eran especies no pertenecientes a *L. pneumophila*. Veintisiete pacientes tenían malignidades hematológicas subyacentes y ventitrés estaban leucopénicos (Han *et al.*, 2015).

Sin embargo, según el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC, 2023) en la gran mayoría de los casos europeos (aproximadamente el 70%), no se identifican factores de riesgo ambientales específicos en los diez días previos al inicio del síndrome clínico, lo que sugiere una infección adquirida en la comunidad.

Como consecuencia, los casos descritos de LD generalmente se clasifican como adquiridos en la comunidad (CALD), asociados a viajes (TALD) y asociados a atención médica (HALD) (Burillo *et al.*, 2017; Graham *et al.*, 2020).

Los HALD son particularmente relevantes tanto por su incidencia bruta como por su mayor mortalidad, ya que ambos aspectos están influenciados por las patologías preexistentes de los pacientes y su nivel de inmunocompetencia (Burillo *et al.*, 2017; Graham *et al.*, 2020).

Los estudios epidemiológicos sobre *Legionella* han reportado una notable variabilidad geográfica en la prevalencia general de la legionelosis, y particularmente de la LD, lo que podría explicarse por la elección de diferentes pruebas diagnósticas (PCR, cultivo o prueba de antígeno en orina), la eficiencia de los sistemas de vigilancia, el clima y/o factores de riesgo geográficamente vinculados.

Existen, no obstante, algunas evidencias de que la tasa de notificación de LD ha aumentado tanto en América del Norte como en la Unión Europea/Espacio Económico Europeo (UE/EEE), con ambas regiones mostrando tasas de notificación comparables y entornos y epidemiología similares. Por ejemplo, la tasa de notificación para la UE/EEE aumentó entre 2011 y 2018 de 1,2 a 1,8 casos por 100000 habitantes, mientras que la incidencia estimada en la ciudad de Nueva York vio un aumento del 230% de 2002 a 2009. En la misma década, la tasa de mortalidad anual ajustada por edad para LD en EE. UU. aumentó ligeramente de 0,038 por 100 000 habitantes en 2000 a 0,040 por 100 000 habitantes en 2010. (Centro Nacional de Epidemiología, 2023).

Las causas de este impulso son desconocidas, pero posiblemente incluyan tasas de prueba más altas, el cambio climático con el aumento de la temperatura que desarrolla condiciones climáticas cálidas y húmedas que

facilitan el crecimiento y la propagación de bacterias que a su vez alimentan la proliferación de los hospedadores de *Legionella*, y la transición demográfica, con más sujetos de alto riesgo pertenecientes a una población general cada vez más envejecida (Centro Nacional de Epidemiología, 2023).

Sin embargo, hay que destacar que nuestro conocimiento de la incidencia real de LD sigue siendo en gran medida desconocido, sobre todo porque la mayor parte de nuestra comprensión proviene de pacientes sintomáticos, que presentan CALD, TALD o HALD (Burillo *et al.*, 2017; Graham *et al.*, 2020).

Dado que la LD no se puede distinguir clínica o radiológicamente de los casos de neumonía de diferente etiología, un índice de sospecha bajo significa que una parte significativa de todos los diagnósticos simplemente se pasa por alto porque no se realizan pruebas diagnósticas específicas.

Es importante resaltar que varios estudios han mostrado niveles de anticuerpos en poblaciones saludables que van desde menos del 1% hasta el 45.1%, por lo tanto, la abrumadora mayoría de todas las infecciones generalmente pasan desapercibidas, con solo una pequeña fracción de todos los casos desarrollando fiebre de Pontiac o LD (Burillo *et al.*, 2017; Graham *et al.*, 2020).

En segundo lugar, cuando se realizan pruebas en una enfermedad aguda, los especialistas clínicos confían principalmente en las pruebas de antígeno en orina (UAT), que representan del 82% al 97% de los diagnósticos en Europa y Estados Unidos, respectivamente (Cassell *et al.*, 2021). La UAT se puede realizar rápidamente y con una especificidad muy alta para Lp1, pero tiene una sensibilidad muy baja para los antígenos no Lp1. Las pruebas de diagnóstico alternativas y los procedimientos de laboratorio (es decir, cultivo, identificación de la bacteria mediante serología emparejada, detección de la bacteria en tejido o fluidos corporales mediante microscopía de inmunofluorescencia y métodos genotípicos de PCR) se ven afectados a su vez por limitaciones específicas que incluyen mayores gastos y tiempos de respuesta aumentados, por lo tanto, no se realizan debido a estas razones económicas y/o prácticas, lo que sugiere que una gran parte de todos los casos puede simplemente no ser diagnosticada (Cassell *et al.*, 2021).

La LD por lo tanto es un importante problema de salud pública en términos de morbilidad y mortalidad, particularmente en ciertos grupos de alto riesgo, pero nuestra comprensión incompleta de su epidemiología perjudica la implementación adecuada de medidas de respuesta, incluidas las intervenciones ambientales, campañas preventivas centradas en la seguridad de las posibles fuentes de infección y la comunicación de riesgos. Como consecuencia, una reevaluación actualizada y exhaustiva de los datos de vigilancia puede ser particularmente útil para las autoridades sanitarias nacionales y locales.

1.1.4.- Prevención y control de la legionelosis:

La prevención y el control de las diversas infecciones por *Legionella* requieren un enfoque multifacético que incluya en primer lugar una buena vigilancia ambiental, en segundo lugar, una evaluación de riesgos y en tercer lugar conseguir estrategias de gestión efectivas de las dos anteriores.

En todos estos apartados previos a la aparición de la enfermedad se sitúa la inspección de salud pública, como una gigantesca herramienta de prevención, aún en fase de construcción, que tiene como gran reto integrar estos elementos y que debe enfatizar en fomentar la vigilancia integrada para cerrar la brecha entre el conocimiento científico y las demandas sociales en la gestión de la presencia ambiental de *Legionella* spp. (Pereira *et al.*, 2021).

Por ejemplo, el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas, como las sondas de ácido nucleico peptídico para la detección de *Legionella* en muestras de agua, puede mejorar los estándares de vigilancia y reducir los riesgos para la salud pública asociados con la contaminación por *Legionella* (Nachér-Vázquez *et al.*, 2022)

La prevención y control de la colonización de *Legionella* en centros hospitalarios es de vital importancia porque muchos pacientes hospitalizados tienen un alto riesgo de infección por *Legionella* puesto que su estado inmunitario suele estar deteriorado.

Podemos determinar que hasta el momento los métodos más efectivos para la desinfección de *Legionella* en los sistemas de distribución de agua

serían, el uso del ion cloro en diferentes formas moleculares, la temperatura del agua en los circuitos, que por encima de 50°C deteriora muchas de las opciones de proliferación de la bacteria, y la ionización cobre-plata que es una opción en auge en los últimos tiempos, (Marchesi *et al.*, 2016).

Sobre el uso de la temperatura para el control de la bacteria, la legislación española en vigor, el 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, es clara al respecto y determina que los sistemas de agua caliente deben mantenerse a 50 °C en los puntos terminales de red y a 60 °C en los acumuladores de agua caliente sanitaria, si bien el sistema debe poder garantizar alcanzar 70°C en los puntos finales de red de forma puntual y a demanda, para realizar los choques térmicos desinfectantes, (Quero *et al.*, 2021).

Las intervenciones rápidas cuando se producen brotes de legionelosis, como son los muestreos ambientales completos, la confirmación mediante diagnóstico precoz de los posibles enfermos y las acciones correctivas para controlar la proliferación de *Legionella*, han demostrado ser efectivas para prevenir una mayor difusión y transmisión, reduciendo los riesgos para la salud pública, (Young *et al.*, 2021).

En este sentido, los avances en los métodos de detección de *Legionella*, como las técnicas de separación inmunomagnética, ofrecen una mayor sensibilidad y precisión en la identificación de la colonización por la bacteria en entornos hospitalarios y otros ambientes de alto riesgo, por encima de la opción más utilizada que es la siembra en placa. (Ortí-Lucas y Luciano, 2022).

Es fundamental en el control de *Legionella* el mantenimiento en óptimas condiciones de los sistemas que tienen riesgo potencial de transmisión de la bacteria, así como la monitorización con frecuencia regular de la persistencia ambiental de la bacteria y detectar su presencia temprana (Falkinham *et al.*, 2015).

Además de los mencionados procedimientos de desinfección química y térmica manteniendo el agua caliente sanitaria por encima de 50°C y hasta 70°C en momentos puntuales, el uso de biocidas a base de cloro como hipoclorito sódico o dióxido de cloro y en menor medida monocloraminas, los

tratamientos físicos como la radiación ultravioleta también pueden ser efectivos para reducir la carga bacteriana.

Diseño y Gestión de Sistemas de Agua

El diseño y la gestión de los sistemas de distribución de agua deben minimizar la presencia de agua estancada y la formación de biofilms.

En la figura 17 se recrea el gráfico de un esquema tipo de una instalación de ACS, donde los acumuladores reciben el agua de las placas del intercambiador que calienta el agua y al mismo tiempo el agua de recirculación procedente del circuito de retorno.

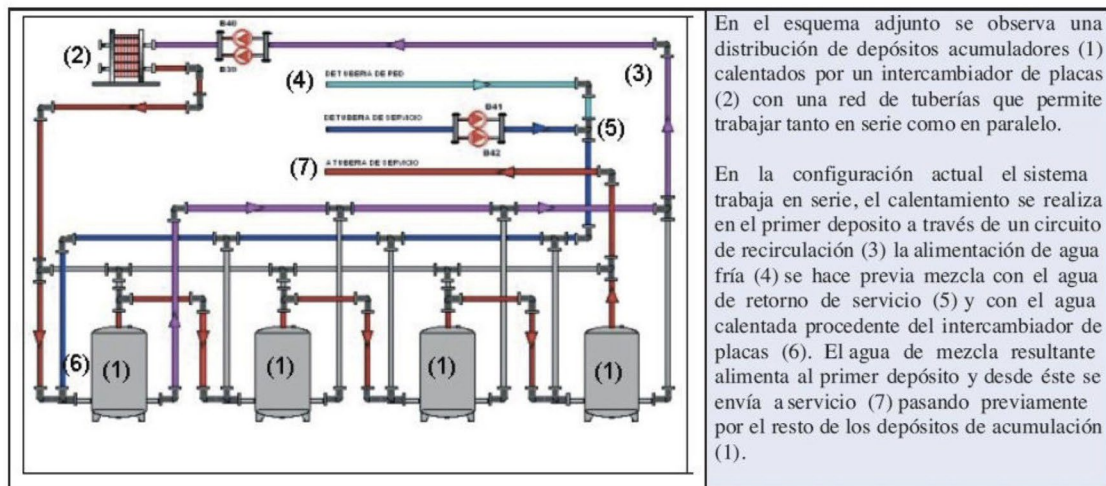


Figura 17: Esquema de un sistema de ACS. Fuente: Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e igualdad, 2007; Salinas Granell, 2017.

Recordamos que el flujo continuo de agua que evita su estancamiento es un elemento a sumar en un enfoque de gestión integral, que integre prefiltros, filtros y sistemas de control remoto, que ha demostrado ser eficaz en entornos hospitalarios.

Los factores que regulan el crecimiento y supervivencia de *Legionella*, fundamentalmente son:

Las condiciones ambientales.

El tipo y la concentración de nutrientes orgánicos e inorgánicos disponibles.

La presencia de protozoos.

La ubicación espacial de los microorganismos.

Los componentes metálicos de las tuberías.

Los productos de corrosión asociados.

La figura 18 reproduce el esquema anterior, es un ejemplo correcto de cómo debe funcionar un sistema de distribución de ACS, donde los dos acumuladores reciben agua caliente de los intercambiadores de placas y del circuito de retorno.



Figura 18: Sistema de distribución de agua caliente. Fuente: Autor.

Además de la limpieza y desinfección regular de los sistemas de agua sanitaria, se deben implementar de Planes de Seguridad del Agua (WSP), que ayuden a gestionar sistemáticamente los riesgos asociados con el crecimiento de *Legionella*. Estos planes deben incluir horarios de mantenimiento rutinario, procedimientos de desinfección adecuados y protocolos de respuesta en caso de emergencia (Sciuto *et al.*, 2021).

La figura 19 refleja un sistema de distribución de AFCH con ETAP intermedia en este caso acompañado de un sistema de descalcificación.



Figura 19: Sistema de distribución de AFCH con ETAP intermedia. Fuente: Autor.

Tratamiento del Agua

Los desinfectantes más comunes en la prevención de *Legionella* incluyen el cloro, el dióxido de cloro y la monocloramina. Cada uno de estos

desinfectantes tiene sus ventajas y limitaciones en términos de efectividad y formación de subproductos de desinfección (DBPs).

Al abordar la seguridad microbiológica del agua, hay que considerar el aumento del riesgo de colonización microbiana y formación de biofilm en los sistemas de conducción de agua durante las etapas de construcción y puesta en marcha de un nuevo edificio. Se debe diseñar una estrategia efectiva de gestión del riesgo de *Legionella* incluso antes de la apertura del edificio para asegurar un control adecuado sobre el sistema de distribución de agua (Farina *et al.*, 2023).

Este planteamiento de gestión del riesgo previo de manera frecuente no se realiza de forma objetiva previamente a la ejecución de los sistemas de conducción de agua con lo que no se prevén generalmente los tramos de conducción excesivamente largos y sinuosos o la instalación de mezcladores de agua rígidos, que no permiten la realización de choques térmicos.

Destaca la importancia de las prácticas de gestión ambiental para controlar *Legionella* en sistemas de agua de consumo humano mediante el uso de agentes oxidantes, más frecuentemente, hipoclorito sódico, dióxido de cloro, monoclaramina y ozono (Farina *et al.*, 2023).

Hipoclorito sódico

El cloro es un agente oxidante ampliamente utilizado en la desinfección primaria del agua potable debido a su capacidad para oxidar componentes celulares bacterianos, permeabilizando las membranas citoplasmáticas y causando fugas de proteínas y daño en el ADN.

Sin embargo, *Legionella pneumophila* puede resistir altos niveles de cloro mediante la formación de biofilms, mientras que el cloro libre residual (CLR) alto puede provocar corrosión de conducciones de cobre y hierro, no obstante, si se mantiene el pH por encima de 8 se puede contrarrestar esta corrosión.

Igualmente, los polifosfatos inhiben la corrosión, pero pueden aumentar la lixiviación de metales.

La OMS recomienda una concentración de 0,5 mg/L de cloro libre para inactivar contaminantes microbianos y prevenir el rebrote microbiano (Zholdakova *et al.*, 2019).

Dióxido de Cloro

Tiene una capacidad superior al hipoclorito para penetrar biofilms y desactivar protozoos libres como *Acanthamoeba*. En entornos hospitalarios, el uso de dióxido de cloro puede reducir significativamente el riesgo de legionelosis.

Esta molécula no ha demostrado una efectividad intensa en los circuitos de AFCH, por lo que habitualmente en España se ha utilizado más específicamente en agua caliente sanitaria debido a que aguanta más fácilmente el efecto de la temperatura y mantiene más tiempo los niveles de CLR altos que el hipoclorito sódico. Sin embargo, puede dañar tuberías de polietileno y de PP-r (polipropileno Random), polímero plástico que tiene unas excelentes propiedades para la distribución y suministro de agua potable a presión en los sectores doméstico, industrial y alimentario.

Esta circunstancia no se habría tenido en cuenta en España hasta la fecha y quedó acreditada en el estudio descrito a continuación, realizado por Farina *et al.* en 2023.

Dicho estudio se orientó a definir medidas de control confiables para una gestión efectiva del riesgo de proliferación de *Legionella*, y una parte fundamental de este proceso fue la elección de una estrategia adecuada para la desinfección del agua.

Los procedimientos tasados en pasos y las decisiones clave tomadas en el estudio, fueron:

Estrategia Inicial de Desinfección

- Desinfección del Agua Fría: Se utilizó dióxido de cloro generado in situ para la desinfección del agua fría.

- No se planificó ninguna desinfección química para el agua caliente doméstica en el proyecto técnico original; en cambio, se propuso un tratamiento térmico, manteniendo la temperatura del agua caliente entre 65–70°C en los tanques de almacenamiento.

Evaluación del Riesgo:

- La evaluación de riesgos realizada por el grupo de trabajo (WSG) destacó que, dada la extensión de los sistemas de distribución de agua caliente y la presencia de válvulas mezcladoras, el tratamiento térmico podría ser inadecuado para evitar efectivamente la proliferación de *Legionella*. Además, el dióxido de cloro residual proveniente del agua fría era insuficiente para asegurar una desinfección adecuada.

Problemas con el Dióxido de Cloro

- Incompatibilidad con Materiales de las Tuberías:
 - Se decidió introducir un tratamiento químico adicional para el agua caliente doméstica, pero se descartó el uso de dióxido de cloro debido a la remarcada incompatibilidad con las tuberías del PP-r, presentes en los sistemas de distribución de agua.
 - Se observaron resultados insatisfactorios en el edificio del hospital, en el sentido de que, en 2012, a pesar de la dosificación continua de dióxido de cloro, el 18% de las muestras recogidas (13 de 72) fueron positivas para *Legionella*.

- Implementación de Monocloramina:

Entonces el WSG adoptó una nueva estrategia basada en la dosificación de monocloramina proporcionalmente al consumo de agua y la concentración residual, manteniendo niveles de 2-3 mg/L en los puntos de salida.

Esta concentración de monocloramina se verifica mensualmente en puntos de control designados dentro de los edificios, y las mediciones confirmaron que la concentración de monocloramina se mantuvo dentro del rango objetivo (aproximadamente 2,5 mg/L).

Conclusiones del estudio:

La desinfección del agua fría con dióxido de cloro no era suficiente para controlar la proliferación de *Legionella* en los sistemas de agua caliente, debido a la incompatibilidad con ciertos materiales de tubería y los resultados insatisfactorios observados. La estrategia basada en monocloramina demostró ser una solución más efectiva, manteniendo concentraciones adecuadas para la desinfección continua y reduciendo significativamente la presencia de *Legionella* (Farina *et al.*, 2023).

En España, no obstante, como ya se ha comentado, sí se ha venido utilizando el dióxido de cloro sobre todo en agua caliente de forma sostenida en el tiempo con resultados mejores que el uso del hipoclorito puesto que la molécula es más estable en agua caliente y mantiene de forma más prolongada los niveles de CLR, no siendo tan frecuente el uso de la monoclaramina en los circuitos de agua sanitaria.

La figura 20 reproduce una ETAP o depósito de AFCH de fibra, que es un material adecuado que soporta bien la corrosión de la molécula de cloro libre.



Figura 20: Estación de tratamiento de agua potable. Fuente: Autor.

Monocloramina

Formada por la reacción del amoníaco con cloro, se usa principalmente como desinfectante secundario. La OMS recomienda concentraciones de 3 mg/L y 4 mg/L respectivamente. Es más efectiva en la penetración de biofilms que el cloro libre, especialmente en biofilms de cobre, pero puede provocar nitrificación, formando nitritos tóxicos y corrosión de materiales elastoméricos (Farinelli *et al.*, 2021).

Revisando estudios recientes sobre la efectividad de la monocloramina en el control de esta bacteria encontramos un estudio realizado en 2022 que examinó la precisión del método de cultivo establecido en la norma ISO 11731 para la determinación de la presencia ambiental de *Legionella* en sistemas de agua de edificios, comparándolo con otro método más innovador que utiliza una metodología híbrida de microbiología tradicional y detección molecular.

En este estudio se observaron y abordaron las deficiencias del método de siembra y cultivo descrito en la norma ISO 11731, especialmente en sistemas de agua desinfectados con monocloraminas, donde se verificó una discrepancia significativa en la detección de *Legionella* VBNC.

Se analizaron 476 muestras de agua utilizando el método que utiliza una metodología híbrida de microbiología tradicional y detección molecular. Las muestras se concentraron mediante filtración y se transfirieron a frascos de cultivo con caldo EB7. Se realizaron extracciones de ADN en los puntos de tiempo T0 (0 h) y T2 (40-48 h) para evaluar el cambio en la concentración de ADN, indicador de crecimiento microbiano.

El método de cultivo estándar descrito en la ISO 11731:2017 se utilizó para comparar los resultados obtenidos con el anterior. Las muestras se concentraron y se cultivaron en agar GVPC, y se incubaron a 35 °C durante 10 días, confirmándose las colonias sospechosas de *Legionella* mediante auxotrofia de cisteína y aglutinación de látex.

Para confirmar la presencia de *Legionella* VBNC, se realizaron co-cultivos con *Acanthamoeba castellanii*. De 28 muestras analizadas, 7 (25%) fueron positivas para ambos métodos (detección molecular y co-cultivo), 4 (14.3%) fueron positivas para el primero y negativas para el segundo (co-cultivo) y 2 (7%) fueron negativas para el primero y positivas para co-cultivo. Estos

resultados respaldaron la presencia de *Legionella* VBNC detectada por detección molecular pero no por ISO 11731, por lo que esta detección molecular proporciona una forma práctica y sensible de detectar todas las formas viables de *Legionella* en sistemas de agua, especialmente en aquellos desinfectados con monoclóramina.

De esta forma se pudo valorar la eficacia de la monoclóramina en la penetración en los biofilms y la reducción en la prevalencia de *Legionella* VBNC (Wickenberg *et al.*, 2022).

La figura 21 refleja un sistema de cloración automática que utiliza hipoclorito sódico.



Figura 21: Sistema tipo de cloración automática a base de hipoclorito sódico.
Fuente: Autor.

Ozono

Es un desinfectante muy eficiente, para la eliminación de multitud de microorganismos, que basa esa eficiencia en su capacidad de oxidar componentes celulares. Sin embargo, su efectividad en sistemas de agua reales es limitada debido a su corta duración en el agua. La combinación de ozono con cloro puede producir subproductos de desinfección bromados.

Estudios recientes sugieren que la pre-ozonización es una técnica efectiva para reducir la carga orgánica y, por ende, la formación de DBPs, compuestos tóxicos que se forman durante la desinfección del agua de consumo por reacción del cloro con sustancias orgánicas precursoras, en plantas de tratamiento de agua potable (Xing *et al.*, 2018).

Por esta situación, y para abordar estos problemas referidos como son los subproductos de la desinfección bromados derivados del uso del cloro y ozono o la reacción de la molécula de cloro con la materia orgánica, se ha investigado más en profundidad el uso del ozono como una alternativa para la desinfección del agua.

Un estudio reciente investigó el uso de tratamientos a base de ozono, incluyendo ozono solo (O₃), ozono con radiación ultravioleta (O₃/UV) y ozono con peróxido de hidrógeno (O₃/H₂O₂), para la eliminación de microcontaminantes orgánicos (OMPs) y la inactivación de bacterias en muestras de agua superficial. Los resultados mostraron que los tratamientos con ozono eran efectivos para eliminar más del 85% de los OMPs detectados y reducir la cantidad de bacterias a niveles por debajo de los permitidos para el agua potable, incluso después de un almacenamiento de tres días (Gorito *et al.*, 2021).

Se combinó el tratamiento con ozono y carbón activado biológicamente (BAC) antes de la cloración. El ozono tiene la capacidad de oxidar los precursores de DBP, inactivar microorganismos patógenos resistentes y reducir el carbono orgánico disuelto refractario (DOC), generando más carbono orgánico disuelto biodegradable (BDOC), lo que promueve el crecimiento biológico en el sistema de distribución aguas abajo o en la superficie del BAC., y conlleva aplicar cloración de refuerzo

Para la observación de los resultados se utilizaron varios métodos analíticos para caracterizar el DOC y la estructura de los biofilms, incluyendo la absorción ultravioleta específica, la cromatografía de exclusión de tamaño de alto rendimiento y las mediciones de matriz de emisión-excitación de fluorescencia. Además, se realizaron recuentos de placas heterotróficas, para cuantificar las poblaciones bacterianas heterotróficas viables y tratamientos con propidio monoazida acoplados con PCR en tiempo real (PMA-qPCR) para enumerar las bacterias vivas totales y los patógenos oportunistas en los sistemas de distribución de agua.

Los tratamientos con ozono demostraron ser efectivos para reducir la cantidad de OMPs y la carga bacteriana en el agua. Sin embargo, dosis más bajas de ozono ($1.5 \text{ mg O}_3 \text{ L}^{-1}$) no pudieron prevenir el rebrote de bacterias heterotróficas, que alcanzaron niveles cinco veces superiores a los recomendados tras la incubación a 37°C . Estos resultados subrayan la importancia de utilizar dosis de ozono capaces de lograr ambos objetivos: destrucción de OMPs e inactivación microbiana durante períodos prolongados (Gorito *et al.*, 2021).

El estudio concluyó que la combinación de ozonización y filtración con BAC, seguida de la cloración, es una estrategia eficaz para mejorar la calidad del agua potable al reducir significativamente la cantidad de OMPs y patógenos oportunistas. Sin embargo, es fundamental aplicar dosis adecuadas de ozono para prevenir el rebrote microbiano y asegurar una desinfección prolongada.

Es decir, el proceso correcto será ozonización seguida de filtración con BAC y cloración de refuerzo, siempre y cuando la dosis de ozono sea la adecuada. Esto sería un método avanzado y combinado de tratamiento del agua para que mejore sensiblemente la desinfección de sistemas de distribución de agua potable (Gorito *et al.*, 2021).

1.1.4.1.- Evolución del enfoque en la prevención y control de la proliferación de *Legionella* y su reflejo en los aspectos históricos de las normativas higiénico-sanitarias, hasta la actualidad:

La legislación vigente en España no contempla medidas específicas sobre la calidad del aire en relación con la legionelosis. Sin embargo, sí regula el diseño, explotación y mantenimiento de los sistemas de agua, como fuentes importantes de infección. En centros sanitarios, se requiere que el sistema de ventilación sea cerrado para prevenir la entrada de aerosoles contaminados desde el exterior.

Tradicionalmente se ha enfatizado mucho en la importancia de implementar medidas de control y prevención en entornos hospitalarios y en edificios públicos de uso humano sobre todo frecuentados por personal de riesgo para la prevención de la enfermedad. No obstante, en los últimos años la literatura científica se inclina por establecer que se necesitan estrategias diagnósticas más sensibles y programas de capacitación dedicados para mejorar la gestión de la esta enfermedad, (Montagna *et al.*, 2018)

Los aspectos históricos de las normativas higiénico-sanitarias en relación con la legionelosis revelan la importancia de la detección y prevención de *Legionella* en instalaciones de agua. Se destaca que el cultivo microbiológico ha sido el método de referencia para detectar *Legionella* en muestras de agua, a pesar de sus limitaciones en cuanto a largos tiempos de incubación y sensibilidad diagnóstica, (Forján Lozano *et al.*, 2016)

Brotos Iniciales y Desarrollo de Normativas

El brote de 1976 desencadenó una serie de investigaciones que condujeron a la identificación de *L. pneumophila* y a la implementación de medidas de control y prevención. Antes de este brote, la neumonía causada por *Legionella* no se diferenciaba de otras neumonías bacterianas, lo que dificultaba su detección y control (Fraser *et al.*, 1977). La incidencia y evolución de la legionelosis dió lugar a la aparición de normativas específicas en distintos países para prevenir la proliferación de la bacteria en sistemas de agua y otras instalaciones (Fields *et al.*, 2002).

En España, la legionelosis se convirtió en una enfermedad de declaración obligatoria en 1997 (MSSSI, 1997).

La primera legislación específica de ámbito nacional en España sobre la prevención y control de la legionelosis fue el Real Decreto 909/2001.

En este Real Decreto se establecieron los criterios higiénico-sanitarios para prevenir la enfermedad mediante la adopción de medidas en instalaciones que utilizan agua y pueden producir aerosoles, tales como torres de refrigeración y sistemas de agua caliente sanitaria.

El anterior fue revisado y reemplazado por el Real Decreto 865/2003, que fue eficaz en la reducción de casos de legionelosis al mejorar las prácticas de mantenimiento y control en instalaciones de riesgo. Sin embargo, después de más de una década, se identificó la necesidad de revisar ciertos aspectos técnicos que contenía este Real Decreto para adaptarlos a los avances científicos y la experiencia adquirida. Las revisiones propuestas abarcaban aspectos estructurales, de mantenimiento, operacionales y documentales, con el objetivo de aumentar la eficacia en la prevención y control de la legionelosis, por ejemplo, la clasificación que se hacía de instalaciones de primer y segundo nivel de riesgo que se había quedado anticuada.

Asimismo, las administraciones sanitarias regionales que habían sufrido brotes más intensos de legionelosis valoraban la posibilidad de aumentar la temperatura del ACS en los puntos finales de red, con serias dificultades puesto que las quías sanitarias regionales de prevención y control de legionelosis no pueden contravenir la normativa estatal (García. *et al.*, 2015). Todo este proceso desembocó en la publicación del R.D. *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* (BOE núm. 148 del 22/06/2022) firmado el 21 de junio de 2022 y que entró en vigor el 02 de enero de 2023. Paralelamente a este Real Decreto se elaboró y publicó la Norma UNE 100030 de octubre de 2023 cuya referencia en el título es "Prevención y Control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones "que emerge como un potente manual de referencia en el sector, sin por supuesto tener rango de norma legal.

El Real Decreto 865/2003 se centra en el mantenimiento de instalaciones de riesgo, regulando específicamente los sistemas de agua caliente sanitaria, las torres de refrigeración y los condensadores evaporativos. Establece obligaciones detalladas para los titulares de estas instalaciones, incluyendo la notificación a las autoridades sanitarias y la implementación de programas de mantenimiento que aseguren la calidad microbiológica y fisicoquímica del agua.

Por otra parte, el Reglamento de Instalaciones Térmicas en los Edificios (RITE), aprobado mediante el Real Decreto 1027/2007, también aborda aspectos relacionados con la legionelosis. Este reglamento establece las condiciones que deben cumplir las instalaciones térmicas de los edificios, incluyendo sistemas de calefacción, climatización y agua caliente sanitaria, con el objetivo de minimizar el riesgo de proliferación de *Legionella*.

Todas estas normativas combinadas constituyen un marco integral para la prevención y control de la legionelosis en España, destacando como idea fuerza la importancia del mantenimiento adecuado de las instalaciones y la vigilancia constante para proteger la salud pública.

En prácticamente todas las Comunidades Autónomas, se han promulgado normativas adicionales que complementan la legislación nacional.

Clasificación y Evaluación de Riesgos en Instalaciones

El Real Decreto 865/2003 clasificaba las instalaciones en tres categorías de riesgo según la probabilidad de proliferación y dispersión de *Legionella*. Las instalaciones de mayor riesgo, como los sistemas de agua caliente con acumulación y circuito de retorno, que se les atribuye necesidad de programas de mantenimiento más exhaustivos. Esta clasificación estaba basada en la proliferación y diseminación de la bacteria, considerando también el grado de aerosolización y la población susceptible (Van Kenhove *et al.*, 2019). Complementando las normativas nacionales, se desarrollaron las diferentes normas UNE: Norma UNE 100030:1994, Norma UNE 100030:2001, Norma UNE 100030:2005 IN, Norma UNE 100030:2017 y Norma UNE 100030:2023.

La Guía Técnica para la Prevención y Control de la Legionelosis en instalaciones, elaborada por el Ministerio de Sanidad y Consumo desarrollada

en base a lo dispuesto en la disposición final segunda del RD 865/2003, proporcionó claridad en numerosos aspectos técnicos no contemplados en la normativa original (AENOR, 2005; Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral, 2005).

La figura 22 refleja la actuación de limpieza y desinfección de un acumulador de ACS siguiendo el procedimiento descrito por el Real Decreto 487/2022.



Figura 22: Procedimiento de limpieza y desinfección de acumulador de agua caliente sanitaria según R.D. 487/2022. Fuente: Autor.

La figura 23 refleja la actuación de limpieza y desinfección de una ETAP siguiendo el procedimiento descrito por el Real Decreto 487/2022.



Figura 23: Procedimiento de limpieza y desinfección de una E.T.A.P. según R.D. 487/2022. Fuente: Autor.

Evolución de las normativas europeas

El enfoque europeo hacia la regulación de *Legionella* se ha caracterizado por un marco colaborativo entre los estados miembros y la adaptación de directrices basadas en la evidencia científica y epidemiológica.

Las primeras respuestas reguladoras en Europa se centraron en la creación de directrices para la prevención y el control de *Legionella*. El ECDC ha sido fundamental en la elaboración de estas directrices. Por ejemplo, el informe de 2017 del ECDC detalló las tasas de incidencia y las estrategias de control implementadas en diferentes países europeos (ECDC, 2017).

En 2020, el ECDC publicó un informe de vigilancia que evaluó la efectividad de las medidas de control de *Legionella* en varios países europeos. Este informe subrayó la necesidad de una vigilancia continua y adaptaciones regulares en las políticas para abordar nuevas amenazas y brotes (ECDC, 2020).

Las directrices europeas actuales para la prevención y el control de *Legionella*, de nuevo enfatizan la importancia de la supervisión regular y el mantenimiento adecuado de los sistemas de agua para prevenir brotes (ECDC, 2023).

Desarrollo de normativas en España

España ha sido proactiva en la implementación de normativas para la prevención y el control de la *Legionella*, adaptando y desarrollando sus propias guías y planes de acción basados en las directrices europeas y la investigación local.

Primeras Normas y Guías: Desde principios de la década de 2000, España ha desarrollado una serie de guías técnicas y normativas para abordar la prevención y control de *Legionella*. En 2002, el Ministerio de Sanidad publicó una guía técnica específica para la prevención de la Legionelosis en instalaciones que incluyó recomendaciones detalladas para la gestión de riesgos (Ministerio de Sanidad, 2021).

Plan Nacional de Control y Prevención: En 2022, el Instituto de Salud Carlos III introdujo el Plan Nacional de Control y Prevención de la Legionelosis, que estableció una estrategia integral para la vigilancia, prevención y respuesta a brotes de *Legionella* en todo el país (Instituto de Salud Carlos III, 2022).

Investigación y Actualización de Guías: El informe anual de 2023 sobre la Legionelosis en España proporcionó una actualización detallada sobre la incidencia de la enfermedad y la efectividad de las medidas preventivas implementadas. Este informe subrayó la importancia de la adaptación continua de las estrategias de prevención basadas en datos epidemiológicos recientes (Centro Nacional de Epidemiología, 2023).

Impacto de las normativas en la Salud Pública

La implementación de estas normas ha tenido un impacto significativo en la reducción de la incidencia de brotes de *Legionella* y en la mejora de la salud pública, que se refleja en los siguientes aspectos:

Reducción de Brotes: Estudios realizados por el ECDC han mostrado una reducción notable en la incidencia de brotes de *Legionella* en países con normativas estrictas y cumplimiento adecuado de las directrices (ECDC, 2015). Por ejemplo, las directrices europeas y españolas han sido efectivas en la identificación temprana y la respuesta rápida a los brotes, reduciendo así la mortalidad asociada a la enfermedad (ECDC, 2019).

Mejora en la Vigilancia: La vigilancia epidemiológica ha sido una herramienta crucial en la lucha contra *Legionella*. La Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) en España ha proporcionado datos detallados sobre la incidencia y las tendencias de *Legionella*, lo que ha permitido ajustar las políticas y mejorar las prácticas preventivas (Amillategui-Dos-Santos *et al.*, 2023)

Evolución de las normas y legislación a futuro

A pesar de los avances significativos, persisten desafíos en la implementación efectiva y la adaptación continua de las normativas higiénico-sanitarias para la prevención de *Legionella*.

- **Desafíos Técnicos y Operativos:** La heterogeneidad en la implementación de las normativas por parte de las diferentes administraciones y particulares, la variabilidad en el mantenimiento de las instalaciones de agua, así como la evaluación de las medidas de control de *Legionella* en Europa reveló discrepancias en la aplicación de las directrices, lo que afecta la efectividad general de las normativas (ECDC, 2020).

- **Necesidad de Innovación:** La innovación en tecnologías de detección y control se vislumbra como elemento fundamental para abordar las limitaciones actuales. Las investigaciones recientes, como ya se ha apuntado han destacado la necesidad de desarrollar métodos más eficientes para la detección y la eliminación de la bacteria en los sistemas de agua (Van Heijnsbergen *et al.*, 2015).

Revisión y actualización de la normativa

Tras más de una década de aplicación del Real Decreto 865/2003, se observó la necesidad de revisar y actualizar ciertos aspectos técnicos para adecuarlos al conocimiento y experiencia adquiridos. Esto incluyó la clasificación de riesgo de las instalaciones, los sistemas de agua fría de consumo humano, los equipos de enfriamiento evaporativos, los sistemas de agua climatizada, y los procedimientos de toma de muestras y la técnica analítica de detección utilizada.

La inclusión de técnicas analíticas basadas en la biología molecular, como la qPCR, se discute en ese momento como método oficial para la determinación de *Legionella*, lo que permitiría una actuación más rápida y eficaz ante la identificación de casos y la asociación de estos a las instalaciones de riesgo (Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral, 2005).

En términos de legislación, las normativas vigentes en España y en otros países europeos actualmente exigen la implementación de medidas estrictas en el diseño, explotación y mantenimiento de los sistemas de agua, con la monitorización regular y el tratamiento adecuado del agua para evitar la formación de biofilms, que son ambientes propicios para la bacteria. Sin embargo, no existen regulaciones específicas en cuanto a la calidad del aire en relación con la legionelosis. A pesar de esto, se recomienda que los sistemas de ventilación en hospitales sean de tipo cerrado para evitar la entrada de aerosoles contaminados del exterior, que podrían contener *Legionella*. Esta recomendación busca reducir el riesgo de infecciones nosocomiales por esta bacteria (Amillategui-Dos-Santos *et al.*, 2023).

Aspectos críticos y nuevas propuestas

Es fundamental contar con una evaluación de riesgos precisa de las instalaciones y establecimientos, aunque generalmente estas deben estar en condiciones muy deficientes para que se implementen medidas correctoras efectivas.

Por otra parte, los modelos proporcionados no siempre contemplan aspectos como el número de instalaciones en el establecimiento, las poblaciones expuestas, la existencia de incidencias (brotes), o el grado de

implicación por parte del personal de la instalación en el programa de mantenimiento (Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral, 2005).

El Real Decreto 487/2022, propone una clasificación basada en el riesgo, que incluya las instalaciones emergentes asociadas a brotes recientes.

Indica el establecimiento de programas con medidas preventivas específicas para cada tipo de instalación, desarrollando protocolos de toma de muestras específicos y modelos para la evaluación de riesgos adecuados, teniendo en cuenta establecimientos especialmente sensibles, si bien siempre quedan fuera situaciones y circunstancias específicas de las propias instalaciones que son en sí mismas muy heterogéneas.

1.1.4.2.- Instalaciones de riesgo:

Las instalaciones de riesgo en el contexto de *Legionella* se refieren a aquellos lugares que, debido a sus características y usos, presentan un mayor riesgo de proliferación y transmisión de esta bacteria. En estas instalaciones ubicadas en edificios de uso público aumenta el nivel de riesgo si están ubicadas en hospitales, residencias de ancianos, hoteles, centros de spa y balnearios, sistemas de agua caliente y refrigeración, y cualquier otro lugar con sistemas de agua que puedan generar aerosoles que contengan bacterias *Legionella* y alberguen personal inmunocomprometido.

Torres de refrigeración y condensadores evaporativos

Son las instalaciones que con mayor frecuencia se hallan colonizadas por *Legionella* spp. y que se han identificado como potenciales fuentes de infección comunitaria, si bien las conducciones de agua sanitaria tienen una intensidad silenciosa y un efecto propagador mucho mayor porque hay mucha más presencia de estas instalaciones en los ámbitos de uso humano. (Méndez Arranz *et al.*, 2022).

La evidencia existente recoge casos de transmisión de *L. pneumophila*, dispersa desde aerosoles emitidos por torres de refrigeración a distancias de hasta varios kilómetros. El riesgo de infección decrece a medida que aumenta

la distancia respecto al foco de emisión, siendo tres veces más probable este riesgo en torno a 0,5 km en relación con más de 1 km.

En general, se considera que los aerosoles de las torres de refrigeración pueden dispersarse y, potencialmente, ocasionar la infección dentro de un área geográfica limitada de unos 200 m. (Méndez Arranz *et al.*, 2022).

Cuando existen vientos y corrientes de aire favorables, los aerosoles transportadores de *Legionella* spp. pueden alcanzar una distancia de hasta 12 km y se han descrito infecciones a esas distancias del foco emisor sobre todo en grandes aglomeraciones urbanas, donde el potencial número de personas expuestas es elevado (Méndez Arranz *et al.*, 2022).

La incidencia ambiental de *Legionella* en torres de refrigeración ha sido estudiada desde diferentes puntos de vista por toda la geografía europea, resultando de especial interés un análisis de la contaminación en Grecia que mostró que *Legionella* se encontró en el 48.9% de las 96 torres de refrigeración probadas y el 30% de ellas estaban clasificadas como altamente contaminadas ($\geq 10^4$ cfu/L) (Mouchtouri *et al.*, 2010).

En un principio se desconocía con exactitud la influencia de la climatología y la latitud en el desarrollo y amplificación de la bacteria, asociándolo a climas mediterráneos y subtropicales. No obstante, esta afirmación quedó descartada comprobando que existe una proliferación bacteriana similar en climas templados más fríos.

En Alemania, concretamente en Renania del Norte-Westfalia en 2013 se comprobó igualmente que las torres de refrigeración fueron una posible fuente de contaminación, debido al aislamiento de cepas patógenas de *Legionella* en estas unidades (Maisa *et al.*, 2015).

La concentración de *Legionella* en las torres de refrigeración varía igualmente durante diferentes períodos del año, lo que demuestra la alta dinámica de los ecosistemas y el alto nivel de adaptabilidad de estas bacterias, capaces de sobrevivir a condiciones ambientales adversas, como la desinfección periódica.

Un ejemplo de investigación realizada con éxito utilizando modelos meteorológicos fue un estudio llevado a cabo en Lidköping, Suecia, donde se determinó la dirección de dispersión de la fracción respirable que contenía

patógenos de las torres de refrigeración analizando la dirección y la fuerza del viento, así como la topografía local del área.

En este estudio se precisó que la fuente probable de un brote de neumonía por legionelosis fue una torre de refrigeración industrial con propagación por aerosol que incluyó al menos a 32 pacientes con dos casos de muertes. Se trataba de *L. pneumophila* sg 1, subtipo Benidorm perteneciente al grupo virulento MAb 3-1, si bien existían más de un subtipo de *Legionella* obtenidos mediante procedimientos de genotipado.

La investigación y la modelización meteorológicas sobre la dispersión realizadas en este estudio proporcionaron información importante sobre las condiciones del viento, comprobando que los aerosoles se propagan hasta muchos kilómetros de distancia -entre 6 y 11 km- (Ulleryd *et al.*, 2012).

Circuitos de agua sanitaria

Los circuitos de agua sanitaria son una permanente fuente de crecimiento ambiental de *Legionella* y posible foco de aparición de legionelosis y reservorio de cepas clínicamente importantes de *Legionella*. Es una situación perfectamente descrita a lo largo de los años, e investigada en diversas ocasiones. Un caso que llamó especialmente la atención ocurrió en Alemania. La investigación microbiológica concluyó que una boquilla de ducha altamente contaminada era la fuente de los patógenos, con una concentración de 15×10^3 UFC/ml (Mühlenberg, 1993).

En Reino Unido se llevaron a cabo controles ambientales de presencia de *Legionella* en 82 hogares que concluyeron que el 6% de las duchas estaban contaminadas con bacilos de *Legionella*. En este estudio se comprobó que la colonización de las boquillas de las duchas por patógenos estuvo asociada con la duración y frecuencia de uso de la ducha (Collins *et al.*, 2017).

Otro estudio en residencias de ancianos italianas demostró que la presencia de *Legionella* en conducciones de agua es frecuente puesto que apareció en el 36,8% de las muestras (De Filippis *et al.*, 2018).

No obstante, a pesar de los resultados observados en edificios particulares en Reino Unido, las legislaciones occidentales, y particularmente la europea centran la obligación de testar y llevar a cabo planes de mantenimiento preventivo sanitario, solamente en los edificios de uso público, ya que pueden

ser una fuente importante de *Legionella* debido al acceso generalizado a los mismos.

La figura 24 recrea un acumulador de ACS con una boca de acceso de 40 cm.



Figura 24: Modelo normalizado de acumulador de ACS según lo establecido en el R.D. 487/2022. Fuente: Autor.

La figura 25 recrea la purga de un acumulador de ACS con circuito de retorno.



Figura 25: Purga de acumulador de agua caliente sanitaria. Fuente: Autor.

Otro dato a considerar es la variación en la prevalencia de la bacteria en el agua de aporte a las conducciones de agua sanitaria, si es agua subterránea o es agua superficial.

La investigación llevada a cabo en los Países Bajos puso en evidencia que el uso de agua superficial para la producción de agua potable está positivamente correlacionado con altas tasas más elevadas de legionelosis, con respecto al uso de agua de procedencia subterránea (De Boer *et al.*, 2007). Es importante a este respecto considerar que los métodos

convencionales de purificación de agua superficial pueden no ser efectivos para controlar *Legionella* debido a su capacidad a largo plazo para colonizar y regenerarse en los sistemas de suministro de agua (Schwake *et al.*, 2021).

En cualquier caso, las aguas subterráneas europeas también pueden albergar un importante reservorio de bacterias *Legionella*. De Giglio *et al.* (2019) detectaron serogrupos de *Legionella* spp. en 31 (21,4%) de 145 pozos utilizados para regar plantas con agua subterránea en el sur de Italia. Lógicamente este agua contaminada aplicada en la pulverización de cultivos puede producir aerosoles y representar un riesgo grave para los trabajadores agrícolas.

La tendencia en cualquier caso a la hora de gestionar las actuaciones en la prevención y control es la realización de una evaluación del riesgo de proliferación de *Legionella* de forma detallada para posteriormente desarrollar medidas eficaces. Esta idea parte de un estudio realizado en la provincia de Gerona, clasificando los diferentes factores que convergen en una instalación para posteriormente priorizar intervenciones mediante un modelo de evaluación de riesgos que clasifica las instalaciones en función de su probabilidad de proliferación y dispersión de *Legionella* (Vilà *et al.*, 2020).

Este camino ha sido posteriormente recorrido por otros estudios hasta cristalizar en la norma UNE 100030:2023 donde se desarrolla un procedimiento de trabajo para poder determinar el riesgo de la instalación considerando cuatro bloques de factores condicionantes: entrada del agua de aporte a la instalación y sus características físicoquímicas y microbiológicas, depósito del agua, conexión del circuito con otros sistemas, distribución de los agua en los canales de distribución y por último evaluación de los puntos finales de red.

Dentro de las acciones para gestionar el riesgo de forma correcta se encuentran:

- La modificación de sistemas de agua mediante recubrimientos específicos que puedan inhibir la formación de biofilms (Filice *et al.*, 2022).
- La reducción de la presencia de hospedadores protozoarios para *Legionella* (Nisar *et al.*, 2020).

- La determinación de la concentración óptima de ion ferroso es también un indicador a controlar (Vittal *et al.*, 2021).

- Evitar el estancamiento prolongado de los sistemas de agua (Palazzolo *et al.*, 2020).

Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales en la transmisión del Legionella

La Agencia Europea para la Seguridad y la Salud en el Trabajo reconoce a las plantas de tratamiento de aguas residuales como una posible fuente de infecciones por *Legionella* spp. no hospitalarias (Caicedo *et al.*, 2019; Bulski, 2020). La infraestructura de estas plantas crea condiciones favorables para el crecimiento de bacterias *Legionella*.

Algunos estudios llevados a cabo en Suecia y Finlandia indican una fuerte contaminación en los tanques de lodos activados, con concentraciones de hasta 8.0×10^9 UFC/L de *L. rubrilucens* (Kusnetsov *et al.*, 2010).

Los estanques de aireación también representan una amenaza significativa, como se apreció en pruebas realizadas en Borregaard Ind. (Noruega), donde se encontró contaminación con *Legionella* spp. de hasta 3300 UFC /m³ (Fykse *et al.*, 2013).

Igualmente, en Países Bajos se investigó la dispersión atmosférica de *Legionella* desde estas plantas durante seis años, encontrando una correlación significativa entre las condiciones operativas y la presencia de *Legionella* en el ambiente, entendiéndose que la bacteria accede a las plantas desde la entrada de agua y son los procesos de aireación de estas aguas residuales las que provocan la aparición de brotes. Para mejorar la comprensión de la propagación de patógenos desde las plantas de tratamiento de aguas residuales se ha recurrido a modelos atmosféricos que explican de manera ajustada como se produce la proliferación de la bacteria en estas plantas (Vermeulen *et al.*, 2021).

Fuentes ornamentales en la transmisión del Legionella

Además de las conducciones de agua, en muchas ciudades europeas, las fuentes ornamentales representan un riesgo significativo para la proliferación de *Legionella*, especialmente aquellas que operan en un ciclo cerrado de agua.

Varios muestreos realizados acreditan la importante concentración de *Legionella* en estas instalaciones generalmente mal diseñadas y con programas de prevención sanitaria incompletos (Chatziprodromidou *et al.*, 2022).

Un análisis microbiológico realizado como parte de la investigación del brote de legionelosis en Bresso (Italia) identificó a las fuentes urbanas como la fuente más probable de infección (Faccini *et al.*, 2020).

Otro ejemplo son los 11 casos de legionelosis reportados en el norte de Portugal, donde las investigaciones identificaron una fuente en una plaza como la fuente más probable de infección (Correia *et al.*, 2001).

Centros Recreativos

Las áreas de recreación acuática interior, como piscinas, centros de bienestar, jacuzzis y spas, presentan una elevada incidencia de *Legionella* ambiental con elevado riesgo de infectar a un número significativo de personas.

Un ejemplo significativo fue una evaluación de prevalencia de *Legionella* en Staffordshire (Reino Unido) que determinó que una piscina de spa contaminada en un edificio comercial cerrado fue la fuente de 21 casos de enfermedad (Coetzee *et al.*, 2012).

Legionella como Agente de Infecciones Nosocomiales a través de equipos de Hospital

Las infecciones por *Legionella* spp. afectan mayormente a individuos inmunocomprometidos, como pacientes de edad avanzada con comorbilidades (EPOC, diabetes, insuficiencia renal), observándose también casos de neumonía grave asociada a *L. pneumophila* entre neonatos (Perez-Ortiz *et al.*, 2021) y manifestaciones cutáneas en pacientes inmunocomprometidos (Vaidya *et al.*, 2020).

Las instalaciones más sensibles son los humidificadores portátiles para neonatos (Yiallourous *et al.*, 2013).

La figura 26 recrea una ETAP integrada que es la tendencia más moderna en este tipo de instalaciones. No tiene superficies abiertas lo que dificulta su

contaminación y está construida con material plástico que facilita su desinfección



Figura 26: Modelo de ETAP integrado según lo establecido en el Real Decreto 487/2022. Fuente: Autor.

1.1.5.- Presencia de *Legionella* en instalaciones de agua sanitaria:

La correlación entre la microbiota bacteriana y las especies de *Legionella* en el agua de estas instalaciones ha sido objeto de estudio a través de técnicas como la secuenciación del gen 16S rRNA (Kanatani *et al.*, 2024). Se trata de una técnica molecular avanzada que permite analizar la composición de la microbiota y la diversidad microbiana y detectar la presencia de especies de *Legionella* en el agua de dichas instalaciones (Lozano *et al.*, 2016).

La identificación de potenciales reservorios de *Legionella* en estas instalaciones permite implementar medidas específicas para reducir los riesgos de transmisión y prevenir brotes de legionelosis (American Water Works Association -AWWA-, 2020).

A lo largo de los años se ha abordado la detección y prevención de *Legionella* en instalaciones de agua sanitaria fundamentalmente en entornos como hospitales, hoteles y otros lugares donde el agua estancada o mal mantenida puede favorecer su proliferación (Rodríguez *et al.*, 2002; AWWA, 2018; AWWA, 2019). Igualmente han sido objeto de intenso estudio la transmisión de la enfermedad a través de la inhalación de aerosoles contaminados con *Legionella* (Weintraub *et al.*, 2008; Baudart *et al.*, 2015), el estudio de factores como la temperatura del agua y los materiales de fontanería que pueden influir en la formación de biofilm por *Legionella pneumophila* (Ortí-Lucas y Luciano, 2019; AWWA, 2019), la colonización de sistemas de agua sanitaria en centros de bienestar o residencias de ancianos (Hsu *et al.*, 1984; Rhoads *et al.*, 2021), o su estudio como agente etiológico de neumonía grave adquirida, lo que resalta la importancia de considerar esta bacteria en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades respiratorias (Hernández *et al.*, 2002).

Se ha recurrido a diferentes métodos de detección de *Legionella* en sistemas de agua sanitaria como la citometría de flujo para evaluar la viabilidad de *Legionella* en muestras de agua, lo que puede ser útil para una monitorización efectiva (Allegra *et al.*, 2008). Las estrategias de tratamiento ya descritas han copado también buena parte de los estudios llevados a cabo en esta materia, haciendo hincapié en el uso de biocidas con efecto residual

prolongado (Weintraub *et al.*, 2008; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine -NASEM-, 2019; Ito e Ishida, 2020). Prácticamente en todo el mundo se han realizado estudios sobre la prevalencia de la bacteria por su trascendencia no solo clínica sino económica.

En Argentina, se ha reconocido un aumento de casos relacionados con *Legionella*, en instalaciones de distribución de agua sanitaria (Medina *et al.*, 2021).

Igualmente, en Costa Rica, se ha investigado la presencia de *Legionella* en circuitos de agua sanitaria de hospitales, siguiendo las recomendaciones del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (Rodríguez *et al.*, 2002).

La sostenibilidad ambiental en el uso de medidas preventivas también ha sido objeto de estudio a lo largo de los años en todo el mundo, sobre todo en el caso del agua (Girolamini *et al.*, 2020; Calderón *et al.*, 2021). El uso de tecnologías eficientes de calentamiento de agua y su impacto económico ha llegado también a países donde el grado de investigación no está avanzado, pero se ha considerado de gran interés por el dispendio que supone, tal es el caso de Ecuador (Guamán *et al.*, 2016), e igualmente, en Marruecos donde se ha analizado la presencia de *Legionella* y el uso de agua en su prevención en ambientes turísticos (Assaidi *et al.*, 2020).

En USA hay infinidad de estudios al respecto y casi todos coinciden en relacionar deficiencias en el procedimiento de prevención con el desarrollo del brote de legionelosis (Garrison *et al.*, 2016; Zahran *et al.*, 2018).

Las medidas de prevención de la proliferación de *Legionella* abarcan el ámbito de la ingeniería, buscando sistemas de recirculación de agua potable para su aplicación en instalaciones de agua sanitaria. Estos sistemas automáticos buscan mejorar la eficiencia en el uso del agua y garantizar un suministro constante de agua en diferentes entornos (Fernández *et al.*, 2020).

Las estrategias más importantes basadas en investigaciones y la legislación reciente serían:

Diseño y Mantenimiento de Sistemas

- Recirculación de Agua: Instalar sistemas de recirculación de agua caliente para evitar el estancamiento, manteniendo la temperatura del agua fuera del rango óptimo para la proliferación de *Legionella* (20-45°C) (Real Decreto 487/2022).

- Monitorización frecuente y regular: Establecer programas de muestreo y análisis de agua según los estándares UNE-EN ISO 11731:2017, asegurando una detección y respuesta temprana a la presencia de *Legionella* mediante métodos de cultivo y moleculares (Mondino *et al.*, 2020).

- Control de Temperatura: Mantener la temperatura del agua caliente por encima de 50°C y del agua fría por debajo de 20°C para limitar el crecimiento bacteriano (Real Decreto 487/2022).

Formación y Capacitación

Asegurar que el personal encargado del mantenimiento y control de instalaciones tenga la formación adecuada, cumpliendo con las normativas de capacitación profesional y certificados de aprovechamiento para la prevención y control de *Legionella*.

Procedimientos Específicos

- Realizar la toma de muestras de agua bajo la responsabilidad de laboratorios acreditados, siguiendo procedimientos documentados específicos para cada tipo de instalación (Real Decreto 487/2022).

- Desarrollar e implementar el PPCL o PSL, que incluyan medidas correctoras inmediatas en caso de detectar niveles inaceptables de *Legionella*.

¿Cuál es la relación entre el estancamiento del agua y la obstrucción del flujo con la calidad del agua potable y el aumento del riesgo de legionelosis?

El estancamiento del agua ya sea temporal o permanente, puede tener un impacto significativo en la calidad del agua potable al reducir la eficacia de los desinfectantes y aumentar el riesgo de proliferación de *Legionella*, lo que a su vez incrementa la posibilidad de legionelosis (Nisar *et al.*, 2020; Naher, 2024; Rhoads *et al.*, 2016; Valcina *et al.*, 2019).

La instalación de grifos de flujo de tiempo electrónico contribuye a reducir la presencia de *Legionella* en redes de agua caliente, no obstante, la resistencia de *Legionella* a agentes químicos en tuberías de bajo flujo con estancamiento de agua sigue siendo un desafío importante en la gestión de la calidad del agua potable (Totaro *et al.*, 2020; Aydin *et al.*, 2023).

La frecuencia de limpieza necesaria puede ser alcanzable solo con grifos de auto-limpieza o válvulas solenoides, lo que indica que, para algunos sistemas, la limpieza de los componentes por sí sola puede no lograr resultados aceptables.

Las recomendaciones de los circuitos de agua sanitaria se suelen basar en la suposición de que el agua suministrada al edificio y utilizada para la limpieza tiene algún componente que inhibe el crecimiento (altas temperaturas o desinfectante) y un componente de control de corrosión, lo cual puede no ser el caso (NASEM, 2019; Judd, 2020), si bien el uso de agua fresca de manera frecuente es evidente que ayuda a evitar la proliferación de la bacteria (Meyers *et al.*, 2020). Debido a esto los procedimientos de gestión del agua en edificios a menudo contienen indicaciones para la limpieza semanal de puntos finales de red no usados (NASEM, 2019).

La frecuencia necesaria de limpieza es especialmente difícil de determinar. Semanalmente puede ser insuficiente para el control efectivo de *Legionella* debido a problemas de diseño de la instalación, por equilibrio hidráulico o de temperatura que sean inadecuados, complejidad de componentes como grifos electrónicos y válvulas mezcladoras térmicas o demasiado volumen de agua almacenada en relación con el uso de agua, es decir que exista un recambio incompleto. Un ejemplo verificado fue un hospital con temperaturas de recirculación de agua caliente que eran inadecuadas para prevenir el crecimiento de *Legionella* (<45°C), donde se requirió una frecuencia de limpieza cada 2 horas para reducir los niveles de *Legionella* cultivables en sistemas de distribución de agua sanitaria a niveles adecuados (Totaro *et al.*, 2018).

Después de un estancamiento prolongado en grandes edificios, pueden surgir nuevos incidentes (Proctor *et al.*, 2020).

- Pérdida de desinfectante residual y disminución de la estabilidad residual del desinfectante.
- Disminución de la eficacia de la desinfección, lo que conduce a un posible crecimiento microbiano.
- Acumulación de contaminantes químicos y microbianos en el sistema de agua.
- Corrosión de materiales de la conducción, que pueden introducir metales en el agua (AWWA, 2019).
- Formación de biofilms, que pueden albergar patógenos y afectar la calidad del agua.
- Aumento de los niveles de plomo y otros metales debido a la lixiviación de materiales de la conducción (AWWA, 2019).
- Cambios en la temperatura del agua, el pH y los niveles de cloro, que afectan la calidad del agua.

Algunas de las recomendaciones para evitar estos inconvenientes son:

- Implementar lavados de rutina del sistema de suministro de agua para mantener la calidad del agua.
- Realizar pruebas periódicas de la calidad del agua para controlar la presencia de contaminantes.
- Considerar el uso de filtros en el punto de uso para eliminar posibles contaminantes. (Ra *et al.*, 2020).

El objetivo por lo tanto es cuádruple: mantener la calidad del agua, reducir el riesgo de proliferación de *Legionella*, conseguir no desperdiciar agua y ahorrar el máximo de energía.

Un estudio de Dinne *et al.* (2017) se centró en evaluar el riesgo de *Legionella* spp. desarrollado en instalaciones sanitarias, especialmente en lo que se refiere a sistemas de ACS. El objetivo principal de la investigación fue determinar la viabilidad de reducir el consumo de energía para la producción de ACS sin comprometer la higiene del agua y sin aumentar el riesgo de proliferación de *Legionella*.

Un aspecto del estudio fue el mantenimiento de la temperatura de producción de ACS en 45°C, con calentamiento periódico a 60°C durante diferentes duraciones y frecuencias. Esta estrategia de control de

temperatura tenía como objetivo lograr un equilibrio entre la eficiencia energética y el control de *Legionella* dentro del sistema de suministro de agua. Los investigadores utilizaron una instalación de prueba integral que constaba de un tanque de agua de 200 litros, un sistema de circulación de casi 40 metros y dos tuberías de drenaje que representan escenarios de uso típicos en un hogar, como una cocina y un baño. *Legionella* spp. se introdujo intencionalmente en las instalaciones de prueba para monitorizar sus concentraciones tanto en el agua como en el biofilm. Los resultados del estudio destacaron la importancia de la desinfección por choque térmico en la prevención de *Legionella*.

Tomaron como referencia las directrices del Consejo Superior de Salud de Bélgica que recomienda mantener las concentraciones de *Legionella* por debajo de 1000 UFC/L en instalaciones de alto riesgo. Para lograrlo, los investigadores implementaron una desinfección por choque térmico calentando el agua del acumulador a 60°C durante 30 minutos. Se examinaron factores como la desinfección de los grifos de muestreo, el caudal durante el muestreo y la desinfección del sistema del circuito de retorno y del circuito de salida (Hayes-Phillips *et al.*, 2019).

Los resultados indicaron que los protocolos de desinfección térmica, incluido el precalentamiento del tanque a 60°C durante 30 minutos antes de aplicar un choque térmico a los puntos finales de red, redujeron eficazmente las concentraciones de *Legionella* (Hayes-Phillips *et al.*, 2019).

Durante la semana once del estudio, las concentraciones de *Legionella* experimentaron una disminución significativa después de la extracción continua de agua y la desinfección térmica (Dinne *et al.*, 2017). Sin embargo, las concentraciones se recuperaron después de 24 horas y regresaron a los niveles iniciales en dos semanas, lo que indica que es necesario realizar desinfección sostenida en el tiempo. Una vez elevada la concentración de *Legionella* spp, los procedimientos posteriores de desinfección térmica a 60 °C durante una hora en el circuito de circulación no disminuyeron las concentraciones de *Legionella*, que persistieron por encima del límite recomendado de 1000 UFC/L. (Dinne *et al.*, 2017), lo cual indica que cuando la concentración es elevada un solo choque térmico no es suficiente para revertir la concentración, y es preciso realizar choques térmicos frecuentes.

Tabla 1: Medidas para instalaciones de ACS y AFCH en función de los resultados analíticos de *Legionella* spp.

Recuento de <i>Legionella</i> spp UFC /L	Medias a adoptar
No detección o < 100	Mantener los programas actuales.
≥ 100 y < 1 000	a) Si una proporción de muestras menor o igual al 30 % son $\geq$ a 1 000 UFC/L, tomadas simultáneamente (mismo muestreo) o 1 sola muestra es igual o superior a 1 000 UFC/L: Revisión de los programas, para identificar las medidas correctoras necesarias. Considerar la limpieza y desinfección del tramo de tubería y puntos terminales implicados. Realizar una nueva toma de muestra entre 15 y 30 días tras la limpieza y desinfección. b) Si más del 30 % de las muestras son positivas: Inmediata revisión de los programas para identificar otras acciones correctoras requeridas. Limpieza y Desinfección del sistema. Realizar una nueva toma de muestra a los 15-30 días tras la limpieza y desinfección.
$\geq 1\ 000$	Inmediata revisión del PPCL para identificar las medidas correctoras, incluyendo la limpieza y desinfección del sistema. Realizar nueva toma de muestra a los 15-30 días tras la limpieza y desinfección. Si es necesario, parar la instalación e informar a los usuarios.

La tabla 1 indica las medidas a adoptar según el número de UFC de *Legionella* que describe el Real Decreto 487/2022.

En la tabla 2 se describen los datos a reflejar en el acta de toma de muestras ambientales de *Legionella* spp según lo descrito en el Real Decreto 487/2022.

Se ha ampliado ostensiblemente los parámetros a medir y las condiciones de transporte, así como los tiempos de procesado de las muestras. Como novedad este Real Decreto aporta el hecho de que se incrementa la periodicidad de toma de muestras de las instalaciones y además de indica que debe hacerlo personal autorizado que esté acreditado por el propio laboratorio que va a llevar a cabo el procesado de las muestras.

Tabla 2: Registro de datos de la toma de muestra de *Legionella* spp. según el Real Decreto 487/2022.

- 1.-La muestra debe ser identificada de forma inequívoca e indeleble en su envase o etiqueta del envase.
- 2.-Los datos de identificación de cada una de las muestras deben coincidir con los consignados sobre la misma en el Registro de la Toma de Muestras.
- 3.-En el Registro de Toma de Muestras deberá recoger al menos la siguiente información:
 - Día y hora de la toma de la muestra.
 - Identificación de la persona que realiza la muestra.
 - Identificación de la muestra: Código de identificación.
 - Naturaleza de la muestra (agua, biocapa)
 - Neutralizante utilizado en la toma de muestra o, en su caso, indicación expresa de no utilización de neutralizante (solo para ensayos microbiológicos).
 - Volumen de muestra tomada.
 - Investigaciones a efectuar.
 - Identificación del remitente de la muestra (puede o no coincidir con el tomador de la muestra, establecimiento de procedencia).
 - Identificación del transportista y medio de transporte.
 - Fecha de entrega de la muestra al transportista (día y hora).
 - Identificación del establecimiento de procedencia.
 - Tipo de Instalación de la que procede la muestra (torre de refrigeración, agua caliente sanitaria, etc.).
 - Identificación del punto de muestreo.
 - Motivo del muestreo.
 - Resultados de los parámetros físico-químicos determinados *in situ*:
 - Temperatura de recogida de la muestra (si procede).
 - Biocida empleado y concentración medida.
 - Otros parámetros: (Consignar).
 - Resultados obtenidos de los ensayos efectuados sobre muestras tomadas simultáneamente o, en su defecto, correlación inequívoca con el informe del ensayo correspondiente.
 - Observaciones: Datos que deben acompañar a la muestra.

La figura 27 recrea el procedimiento de hipercloración mediante bomba impulsora directamente a la red, que es un procedimiento habitual cuando no existe ETAP.

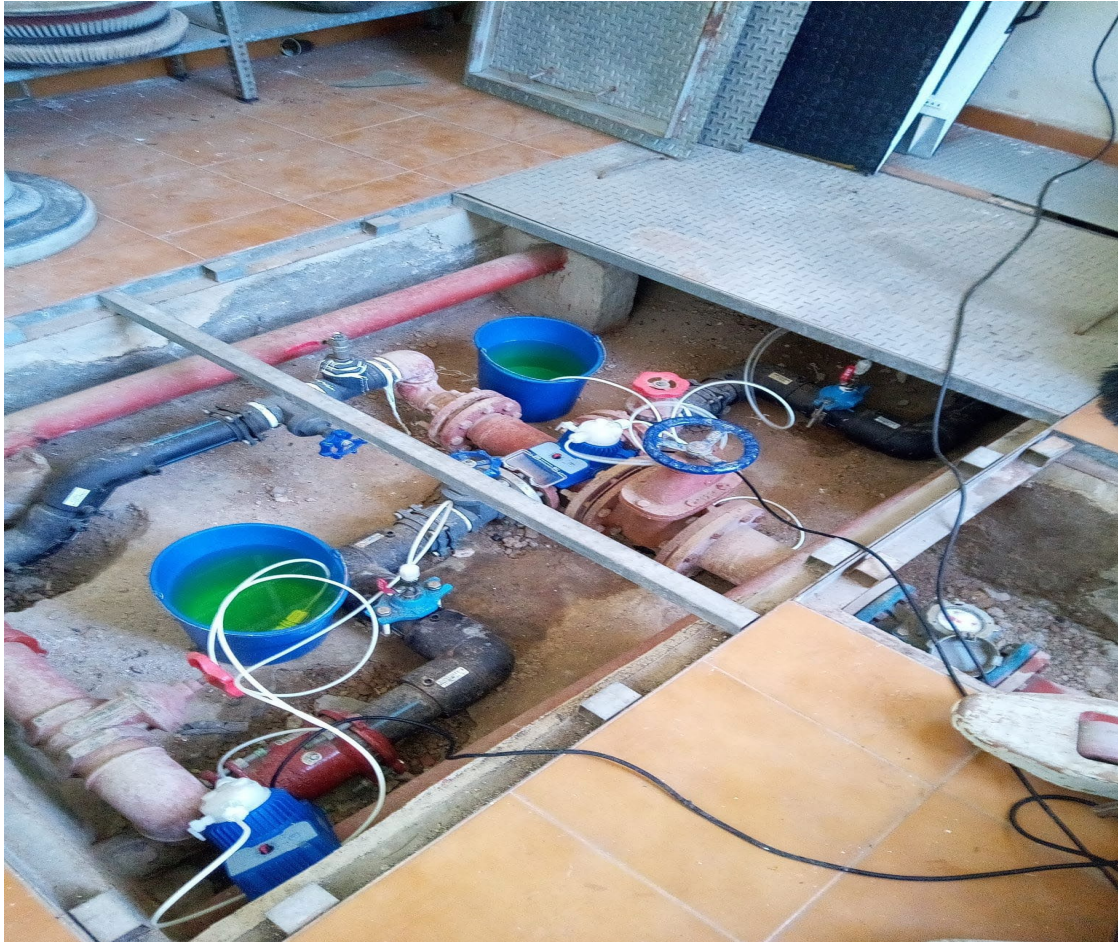


Figura 27: Procedimiento de hipercloración directo a la red en un circuito de AFCH. Fuente: Autor.

1.1.5.1.- Diseño y características estructurales de las instalaciones:

Un aspecto que ha sido estudiado extensamente es la temperatura del agua en los sistemas de agua caliente. Las investigaciones realizadas destacan que las concentraciones de *Legionella* pueden aumentar significativamente en sistemas de agua caliente donde las temperaturas del agua están por debajo de 55°C (Valcina *et al.*, 2023). Este hallazgo subraya

la importancia de mantener las temperaturas del agua caliente por encima de este umbral para prevenir la proliferación de la bacteria *Legionella*.

La presencia de *Legionella* en los sistemas de distribución de agua, se relaciona con la presión dentro de estos sistemas y puede impactar en las tasas de flujo y la distribución del agua, lo que a su vez puede afectar la probabilidad de colonización por *Legionella* (Pierre *et al.*, 2019; Marras *et al.*, 2023).

Además, los niveles de cloro se relacionan con la temperatura y el flujo, y juegan un papel significativo en el control de la contaminación por *Legionella*. Las tasas de contaminación por *Legionella* en sistemas de agua caliente son más altas a temperaturas por debajo de 50°C y cuando los niveles de cloro libre eran inferiores a 0,2 mg/L (Doménech-Sánchez *et al.*, 2022).

El diseño y la disposición de los sistemas de agua sanitaria también influyen en la colonización por *Legionella*. Se ha tratado de evaluar como la distancia de los puntos de muestreo al origen de la red de agua sanitaria influye en la distribución de *Legionella* dentro del sistema sin resultados concretos (Marchesi *et al.*, 2020).

¿Cómo influye el diseño de los sistemas de agua sanitaria en la proliferación de *Legionella*?

Mantener la temperatura entre 20°C y 50°C, favorece el crecimiento de *Legionella spp* (Bartram *et al.*, 2020). Para prevenir su crecimiento, se recomienda mantener la temperatura del agua caliente por encima de los 60°C en los tanques de almacenamiento y asegurar que el agua que llega a los grifos esté al menos a 50°C (Borella *et al.*, 2021).

Para mitigar riesgos, se deben diseñar sistemas con tuberías cortas y circuitos de retorno que mantengan el agua en movimiento y a una temperatura elevada (Leoni *et al.*, 2021). Además, la instalación de mezcladores termostáticos en los puntos de uso puede ayudar a mantener temperaturas seguras y reducir el riesgo de quemaduras (Lu *et al.*, 2020).

Un estudio realizado en un hospital italiano reveló que la instalación de un sistema de retorno de agua caliente y el aumento de la temperatura de

almacenamiento redujeron la presencia de *Legionella* en un 85% (Borella et al., 2021).

Otro estudio en Francia demostró que la sustitución de tuberías de hierro por cobre y la instalación de sistemas de cloración automática disminuyeron la incidencia de brotes de legionelosis en un 70% (Pascale et al., 2020).

¿Qué materiales de tuberías son más efectivos para prevenir la colonización por Legionella?

Las tuberías galvanizadas y de hierro fueron el estándar para las tuberías de agua caliente y fría antes de los años 1950 y 1960. Esta tecnología fue patentada en la década de 1830, reemplazando las tuberías de plomo y siendo la referencia de uso durante aproximadamente 100 años. Los sistemas de tuberías a base de hierro comienzan con un interior relativamente liso, pero se oxidan y corroen. Resisten bien el calor, pero no los elementos oxidantes en el agua, lo que eventualmente genera la superficie interior más rugosa de todos los sistemas de tuberías, haciéndolos los menos deseables para el control de *Legionella*.

Las tuberías de cobre han sido de elección desde la década de 1960. Cuando son nuevas, tienen una superficie interior muy lisa, incluso más lisa que la mayoría de los materiales de tuberías no metálicos. Sin embargo, con el tiempo, se oxidan, se pueden picar y la superficie se vuelve muy áspera, lo cual es ideal para el desarrollo de biofilms y de *Legionella*.

El cloruro de polivinilo clorado (CPVC) tiene una superficie lisa y una alta tolerancia a los oxidantes introducidos en el agua para la desinfección primaria o secundaria/complementaria. Su resistencia a los desinfectantes y su capacidad para soportar temperaturas más altas lo hace ideal para reducir el crecimiento de *Legionella* y biofilms tanto en sistemas de tuberías de agua fría como caliente. Mantiene una superficie lisa durante un largo período de tiempo.

Por último, el acero inoxidable mantiene un acabado interior relativamente liso durante largo tiempo, resiste bien a los oxidantes y tiene una alta tolerancia al calor. Es una buena opción para el control de biofilms y la prevención de la proliferación de *Legionella*, pero no se usa comúnmente en sistemas de tuberías domésticas o debido a su coste relativamente alto.

Se ha demostrado que algunos materiales son más efectivos que otros en inhibir el crecimiento de este patógeno.

- Cobre: Tiene propiedades antimicrobianas que son eficaces contra una variedad de patógenos, incluida *Legionella*. Se ha demostrado que las tuberías de cobre pueden reducir significativamente la presencia de *Legionella* en comparación con otros materiales (Ditommaso *et al.*, 2021).

- PVC: Es comúnmente utilizado debido a su bajo costo y facilidad de instalación. Sin embargo, su efectividad en la prevención de *Legionella* es menor en comparación con el cobre y el acero inoxidable. Las superficies de PVC pueden acumular biofilms, proporcionando un ambiente adecuado para el crecimiento de *Legionella* (Bartram *et al.*, 2020).

- Acero inoxidable: Este material es altamente resistente a la corrosión y puede soportar temperaturas elevadas, lo que lo convierte en una buena opción para sistemas de agua caliente. El acero inoxidable es menos propenso a la colonización por *Legionella* que el PVC, aunque no es tan efectivo como el cobre (Leoni *et al.*, 2021).

Compatibilidad con prácticas de mantenimiento y desinfección

Además de la efectividad en la prevención de *Legionella*, es importante considerar cómo cada material se comporta con respecto a las prácticas de mantenimiento y desinfección. Las tuberías de cobre, por ejemplo, no solo inhiben el crecimiento de *Legionella*, sino que también son compatibles con la mayoría de los métodos de desinfección, incluidos el cloro y el ozono (Pascale *et al.*, 2020). El acero inoxidable también es compatible con varios métodos de desinfección, aunque puede requerir un manejo especial para evitar la corrosión inducida por algunos agentes químicos.

Las tuberías de PVC pueden ser menos resistentes a algunos métodos de desinfección agresivos, lo que puede limitar las opciones de tratamiento disponibles. Además, la acumulación de biofilms en las superficies de PVC puede dificultar la eliminación completa de *Legionella* durante los procedimientos de desinfección (Ditommaso *et al.*, 2021).

¿Qué papel juegan los puntos de estancamiento y los puntos ciegos en la infraestructura del agua en la proliferación de Legionella?

Estos puntos pueden incluir secciones de tuberías poco utilizadas, tanques de almacenamiento sin circulación adecuada y circuitos terminales en sistemas de agua (Lu *et al.*, 2020). En estos lugares, el agua puede enfriarse a temperaturas que favorecen el crecimiento de *Legionella*, creando un entorno propicio para su desarrollo.

Los hallazgos en la investigación en este punto los encontramos en un estudio que demostró que los sistemas de distribución de agua sanitaria con numerosos puntos de estancamiento o puntos ciegos presentaban concentraciones significativamente mayores de *Legionella* en comparación con sistemas bien diseñados con recirculación continua (Borella *et al.*, 2021). Para detectar y eliminar puntos ciegos en sistemas de agua sanitaria, se pueden emplear varias técnicas y estrategias:

- Inspección y monitorización: La inspección visual y el uso de sensores de flujo pueden ayudar a identificar áreas de baja circulación. Además, la monitorización regular de la calidad del agua y la temperatura en diferentes puntos del sistema puede indicar la presencia de estancamiento (Leoni *et al.*, 2021).

- Diseño estructural: Implementar un diseño que favorezca la recirculación continua del agua es esencial. Esto incluye la instalación de bombas de recirculación y la reducción de la longitud de las tuberías, especialmente en áreas de bajo uso (Pascale *et al.*, 2020).

- Mantenimiento regular: Realizar un mantenimiento preventivo regular, como la purga de las tuberías y la limpieza de tanques de almacenamiento, puede reducir significativamente los puntos de estancamiento y, por ende, la proliferación de *Legionella*.

En conclusión, la proliferación de *Legionella* en instalaciones de agua sanitaria está estrechamente vinculada con el diseño del sistema, los materiales de las tuberías y la gestión de los puntos de estancamiento.

La figura 28 recrea un sistema de mezclado de ACS y AFCH.



Figura 28: Estructura de mezclado final de ACS y AFCH. Fuente: Autor.

Influencia de la Configuración de los Sistemas de Almacenamiento y Distribución de Agua en la Proliferación de Legionella

Diseño de Tanques de Almacenamiento

Los tanques de agua mal diseñados, que permiten el estancamiento y tienen zonas de baja circulación, son ambientes ideales para la proliferación de *Legionella*. La falta de flujo constante de agua y la acumulación de sedimentos favorecen la colonización bacteriana. (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2020; Sciuto *et al.*, 2021).

Sistemas de Bombeo y Circulación

Los sistemas de bombeo que no aseguran una circulación continua pueden generar puntos de estancamiento, lo que proporciona un ambiente propicio para el crecimiento de *Legionella* (Falkinham, 2020; Raya *et al.*, 2024).

Los autores recomiendan el uso de bombas que mantengan un flujo constante de agua, y la monitorización regular de estos sistemas para asegurar que no existan áreas con baja circulación.

El Management of *Legionella* in Water Systems del National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (2020) incluye información relevante sobre el diseño y las características estructurales de las instalaciones de agua sanitaria para el control de *Legionella*, que, entre otras destacan:

- **Diseño de Sistemas de Agua:** La importancia de mantener las temperaturas del agua fuera del rango de crecimiento preferido por *Legionella* (77-109°F), utilizando válvulas mezcladoras térmicas y asegurando temperaturas elevadas (por encima de 140°F en el calentador de agua y 131°F en puntos distales).
- **Gestión Hidráulica:** La necesidad de una correcta circulación del agua para ser efectiva, incluyendo la limpieza de agua que puede reducir la cantidad de células de *Legionella*.
- **Materiales de distribución:** Diferentes materiales de tuberías y su impacto en el crecimiento de biofilms, con una mención específica a los problemas con tuberías de hierro que favorecen la formación de biofilms y anulan la acción de desinfectantes.

- Gestión de la Porción Distal de la red: La alta concentración de *Legionella* en los puntos distales y las estrategias para prevenir el crecimiento de biofilms en estos puntos.

- Prevención de formación de aerosoles: Como un factor de riesgo importante en la transmisión de *Legionella* y las recomendaciones para evitar su formación.

1.1.5.2.- Medidas preventivas y de control:

Las técnicas para prevenir el aumento y la propagación de *Legionella* deben ser cuidadosamente consideradas e implementadas durante las etapas de planificación, instalación, operación y mantenimiento de los sistemas (Moreno Bañón, 2024).

Aunque estos métodos no pueden garantizar que un sistema o parte de este esté completamente libre de *Legionella*, contribuirán a reducir su proliferación y, por lo tanto, la perspectiva de crear una contaminación bacteriana severa (Tan *et al.*, 2021). Una medida preventiva primaria efectiva radica en el mantenimiento regular y frecuente de las plantas y depósitos, así como en la revisión periódica del estado de los puntos críticos de edificios particularmente los de uso público (Gómez Ordóñez, 2022).

Control y Prevención de Legionella en Sistemas de distribución de aguas

La prevalencia de la enfermedad causada por *Legionella spp.* depende en gran medida de la intensidad de la exposición a los aerosoles y de la susceptibilidad de las personas expuestas.

En general, los tratamientos térmicos y la cloración son los métodos más comunes para controlar y prevenir la proliferación de *Legionella spp.* en los sistemas de agua potable.

En instalaciones que recogen agua y pueden generar aerosoles, hay que emplear tratamientos que minimicen la supervivencia y multiplicación de la bacteria (Springston y Yocavitch, 2017).

Por ejemplo, se recomienda mantener temperaturas elevadas en todo el sistema de distribución de agua caliente y evitar el estancamiento para optimizar la circulación. Sin embargo, en edificios grandes o con sistemas

antiguos, es difícil mantener estas condiciones. Además, el uso diario de estas instalaciones es importante, ya que la presencia de *Legionella* spp. es mayor en puntos que no se usan frecuentemente, lo que sugiere la necesidad de complementar con otros métodos de desinfección (Gavaldá *et al.*, 2019).

Tratamientos específicos:

1. Control de la temperatura: Elevar la temperatura a 70°C-80°C durante dos o tres días consecutivos, asegurando que en los puntos más alejados la temperatura no sea inferior a 60°C.
2. Filtración (*Point-of-use*) (POU): Dispositivos diseñados para tratar pequeñas cantidades de agua en grifos, duchas y fregaderos, operados por vacío o presión (Springston y Yocavitch, 2017; Parkinson *et al.*, 2020).
3. Dióxido de cloro: Eficiente en desinfectar y controlar el sabor y color del agua, aunque no elimina completamente a *Legionella* spp. y puede causar corrosión en tuberías de hierro (Marchesi *et al.*, 2016; Springston y Yocavitch, 2017; Montagna *et al.*, 2018).
4. Cloración mediante hipoclorito sódico: Uso de cloro libre a concentraciones bajas (0,5-1 mg/L) para el mantenimiento continuo del sistema y, en emergencias, hipercloración a dosis altas (Kanamori *et al.*, 2016; Springston y Yocavitch, 2017).
5. Cloraminación (monocloroamina): Más estable y eficaz que la cloración, aunque puede promover el crecimiento de mycobacterias y afectar componentes de caucho y plástico (Rhoads *et al.*, 2015; Marchesi *et al.*, 2016; Springston y Yocavitch, 2017).
6. Ionización cobre-plata: Efectiva en controlar *Legionella* spp., pero su eficacia puede reducirse por la presencia de iones cloruro y productos químicos anticorrosivos (Kanamori *et al.*, 2016; Springston y Yocavitch, 2017).
7. Radiación de luz ultravioleta (UV): Esteriliza y mata la bacteria sin efectos adversos en el agua o el sistema, pero no elimina el biofilm (Rhoads *et al.*, 2015; Marchesi *et al.*, 2016; Springston y Yocavitch, 2017).

8. Ozonización: Más efectiva que otros tratamientos, aunque difícil de mantener niveles residuales significativos y puede dañar las tuberías (Springston y Yocavitch, 2017; Gerrity *et al.*, 2018).

Medidas Preventivas para el Control de Patógenos Transmitidos por el Agua. Evaluación de la Eficacia de Filtros de Punto de Uso (POU)

Los patógenos oportunistas transmitidos por el agua, como *Legionella* y *Pseudomonas*, representan una amenaza significativa, con altas tasas de morbilidad y mortalidad asociadas a las infecciones que causan (Parkinson *et al.*, 2020). Ante esta problemática, diversas entidades gubernamentales y organizaciones industriales, han establecido la prevención de la LD como una prioridad, exigiendo políticas y procedimientos para reducir el riesgo de transmisión de estos patógenos en los sistemas de agua de edificios sanitarios (Centers for Medicare & Medicaid Services, 2017). Además de *Legionella*, otros patógenos como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y micobacterias no tuberculosas también se han identificado como agentes infecciosos relevantes en este contexto. Los filtros de punto de uso (POU) son una alternativa no química para reducir la presencia de bacterias en el agua (Soda *et al.*, 2017; Parkinson *et al.*, 2020).

Estos filtros, que se conectan directamente a grifos y duchas, han demostrado ser efectivos en la exclusión de bacterias por tamaño de partícula, brindando una solución tanto a corto plazo, para brotes, como a largo plazo, especialmente en unidades de alto riesgo dentro de los hospitales (Totaro *et al.*, 2017).

La investigación realizada por Parkinson *et al.* (2020) se enfocó en evaluar la eficacia de nuevos filtros POU de 62 días en la eliminación de *Legionella* y otros patógenos transmitidos por el agua en una instalación de atención médica en Ontario, Canadá. Los resultados obtenidos demostraron una reducción significativa en las concentraciones de *Legionella* en los puntos de agua con filtros en comparación con los puntos de control, respaldando la efectividad de estos dispositivos para prevenir la exposición a patógenos transmitidos por el agua (Guspiel *et al.*, 2017; Garvey *et al.*, 2017; Parkinson *et al.*, 2020).

Los filtros POU se presentan como una herramienta clave al proporcionar una barrera física que evita la exposición a bacterias peligrosas, como *Legionella* y *Pseudomonas*, contribuyendo así a la prevención de enfermedades infecciosas graves (Parkinson *et al.*, 2020).

Asimismo, la geotermia se presenta como una estrategia diferente para combatir *Legionella*, aprovechando la energía térmica almacenada debajo de la superficie terrestre para sistemas de calefacción y refrigeración. La geotermia, utilizada inicialmente en lugares con climas fríos, se ha desarrollado ampliamente en regiones con variaciones anuales de temperatura importantes, como Europa, Estados Unidos y Canadá, donde se emplea para calefacción en invierno y refrigeración en verano a través de sistemas como los "pozos canadienses" (Buffa *et al.*, 2021).

En este contexto, se ha desarrollado un nuevo kit basado en amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), permitiendo la detección rápida, sensible de *L. pneumophila* y que ahorra mano de obra. El kit, denominado "*Legionella pneumophila* Glow", se validó según la norma ISO/TS 12869:2012, probando la sensibilidad, inclusividad y exclusividad, y la robustez del kit. La sensibilidad mostró que el kit "*Legionella pneumophila* Glow" puede detectar hasta 28 copias de plásmido/ μ L. Las pruebas de robustez mostraron resultados consistentes, con niveles de contaminación y matrices utilizadas que dieron resultados reproducibles (Dietersdorfer *et al.*, 2018; Caruso *et al.*, 2024).

En resumen, el kit LAMP "*Legionella pneumophila* Glow" se demostró como una opción útil para el cribado rápido y eficiente, ofreciendo ventajas significativas sobre el método tradicional, ya que se caracteriza por una alta sensibilidad, facilidad de uso para pruebas de laboratorio y una gran reducción en el tiempo de análisis, convirtiéndolo en un activo para los controles oficiales (Caruso *et al.*, 2024).

1.1.6.- Desinfección del agua sanitaria:

Efectividad de los Tratamientos de Limpieza y Desinfección Anuales frente a la Legionella en los Sistemas de Agua Sanitaria

Una investigación realizada por Liang *et al.* (2023), afirma que dos medidas principales para controlar *Legionella* son mantener altas temperaturas de circulación para frenar su crecimiento y realizar choques térmicos para eliminar las poblaciones asentadas. Las instalaciones a menudo sufren recolonización de sus sistemas de agua caliente porque las colonias desarrollan resistencias. Existen diferencias significativas y diferentes perfiles mutacionales de poblaciones de *L. pneumophila* adaptadas al calor y otras no adaptadas, incluyendo mutaciones en genes importantes. Haciendo analogía con la resistencia a los antibióticos, es necesaria la erradicación completa de la población de bacterias resistentes que son las más persistentes (Liang *et al.*, 2023).

La contaminación de infraestructuras humanas favorece la infección al aerosolizar la bacteria y facilitar su ingreso en los pulmones (Cunha *et al.*, 2016).

En los primeros estudios sobre la bacteria se atribuyó la contaminación y la aparición de la enfermedad a la dispersión a través de emisiones de torres de refrigeración contaminadas, si bien posteriormente se ha encontrado *L. pneumophila* en sistemas de agua sanitaria, incluidos spas, fuentes decorativas, destacando las conducciones en hospitales como causa importante de infección nosocomial (Prussin *et al.*, 2017).

Los hospitales presentan un riesgo complementario por la necesidad de reducir las altas temperaturas del agua para evitar quemaduras además de albergar a pacientes inmunocomprometidos que son más vulnerables a los contaminantes bacterianos recurrentes (Almeida *et al.*, 2021).

La ingeniería de los sistemas de agua tiene un gran impacto en el potencial de crecimiento de *L. pneumophila*. Los edificios grandes con sistemas de conducción de agua sanitaria son especialmente vulnerables a la contaminación, y pueden coexistir diferentes serotipos de *L. pneumophila* de manera estable.

Como bacteria mesófila que se replica mejor entre 20°C y 45°C, *L. pneumophila* favorece la colonización de sistemas de distribución de agua caliente (Almeida *et al.*, 2021). El diseño inadecuado de las redes de distribución o la estimación incorrecta de la demanda de agua, pueden llevar al estancamiento y la formación de puntos ciegos.

Estos espacios de bajo flujo de agua permiten la acumulación de incrustaciones y la formación de biofilms, erigiéndose como estructuras que pueden proteger físicamente a *Legionella* de la exposición a desinfectantes (Van Kenhove *et al.*, 2019).

Existe indiscutiblemente un antagonismo difícilmente compatible entre la disminución de la temperatura del agua en favor del ahorro de energía y la generación de temperaturas tibias que favorecen el crecimiento de *L. pneumophila* y sus huéspedes eucariotas.

Las evidencias de diversos estudios indican que la antigüedad y composición de los biofilms y su microbiota asociado mejoran la supervivencia de *Legionella* spp. en condiciones hostiles de calor o exposición a biocidas (Buse *et al.*, 2022).

Además del tratamiento químico mediante cloración o ionización de cobre-plata, mantener altas temperaturas a lo largo del sistema de distribución de agua, desde el calentador de agua hasta las salidas terminales, es una medida crítica de control contra *L. pneumophila*. Esto debe ir asociado a los choques térmicos denominados *superheat-and-flush*, que elevan las temperaturas del agua por encima de lo que *L. pneumophila* puede tolerar (Lin *et al.*, 2011).

Estas estrategias pueden cambiar dependiendo de la estructura específica del sistema de distribución de agua caliente. Hay que tener en cuenta que los choques térmicos pueden ser efectivos para la eliminación a corto plazo de *Legionella*, pero los estudios longitudinales han demostrado que la recontaminación es común en espacios de tiempo de meses o años (Lin *et al.*, 2011). Como ya se ha comentado el uso reiterado de los choques térmicos puede llevar a la evolución de las poblaciones de *L. pneumophila* a una mayor resistencia al calor.

En las bacterias el estrés por calor puede dañar varios subcomponentes vitales de la célula al causar despolarización de la membrana y daño en la

misma, desestabilización del nucleóide, e inactivación y agregación de enzimas vitales y proteínas estructurales.

Las bacterias desarrollan una sofisticada respuesta al choque térmico, canalizada a través del factor sigma alternativo RpoH que redirige la transcripción hacia la resistencia al estrés al impulsar la producción de proteínas de choque térmico. Estas proteínas amortiguan los efectos tóxicos de las proteínas mal plegadas y agregadas en la célula, ya sea promoviendo su repliegue o dirigiéndolas para su destrucción (Basta *et al.*, 2020).

Estas proteínas incluyen proteasas, así como chaperonas, como HtpG y DnaK, y sus co-chaperonas, como DnaJ y GrpE (Kim *et al.*, 2022).

Una vez concluye el choque térmico, estas proteínas se retroalimentan negativamente dirigidas por RpoH para su destrucción por FtsH, una proteasa unida a la membrana (Basta *et al.*, 2020).

Esta distribución se mantiene en *L. pneumophila*, mediante cinco proteínas de choque térmico identificadas a través de estudios de radiomarcado y otras más anotadas en la secuencia genética.

Las proteínas de choque térmico promueven la internalización de *L. pneumophila* por la célula huésped (Zhao *et al.*, 2016).

Los componentes LetAS y CpxRA también se sabe que influyen en la supervivencia al choque térmico, probablemente mediada a través de su regulación del cambio de fase de vida durante el crecimiento de la bacteria (Mendis *et al.*, 2018).

La evolución adaptativa en laboratorio es un concepto experimental con el que se manipula un organismo cualquiera elegido en un entorno de laboratorio para así obtener información sobre fenómenos complejos que ocurren en la naturaleza.

Este sistema se ha empleado en el caso de *L. pneumophila* para simular la exposición a largo plazo a altas temperaturas en sistemas de distribución de agua sanitaria. Para este estudio se ha contado con la facilidad que suponen por parte de esta bacteria los cortos tiempos de generación, la relativa facilidad de cultivo y capacidad de almacenamiento en condiciones

de laboratorio para estudiar la evolución en un proceso como este, muy controlado y repetible (Kim *et al.*, 2022).

Esta línea de estudiar la evolución adaptativa en laboratorio de la *L. pneumophila* se ha seguido para estudiar la resistencia a antibióticos fluoroquinolonas y macrólidos y la adaptación a macrófagos de ratón.

Debido a que el estrés por temperatura elevada altera de manera no específica múltiples componentes de la célula bacteriana, el estudio mediante la evolución adaptativa en laboratorio se convierte en un protocolo adecuado para estudiar todas las mutaciones que favorecen la tolerancia al calor de las poblaciones de *L. pneumophila* observadas en sistemas de agua caliente y que trata de descubrir las rutas evolutivas que toma esta bacteria para desarrollar una tolerancia al choque térmico. El objetivo último del estudio es verificar los cambios genéticos que puede desarrollar la población superviviente expuesta de forma transitoria a altas temperaturas (Deatherage *et al.*, 2017).

Otro patógeno oportunista capaz de crecer en sistemas de distribución de agua caliente sanitaria es *Acanthamoeba*, que puede causar infecciones oculares/meningitis, además de actuar como organismo huésped para la proliferación de *Legionella* (Martin *et al.*, 2020).

Por otra parte, se ha atribuido en algunos estudios la responsabilidad en la aparición de un brote en Flint (Michigan) a las empresas que realizan la gestión de la distribución de agua cuando no la suministran al menos a 0,5 ppm de CLR (Zahran *et al.*, 2018).

En este estudio anterior se viene a indicar que es necesario complementar la investigación existente sobre los efectos de la temperatura, evaluando sistemáticamente los efectos de los niveles de cloro en el punto de entrada del edificio sobre el crecimiento de patógenos oportunistas como *Legionella* y *Acanthamoeba* (Martin *et al.*, 2020).

Los niveles de cloro que establece la Agencia de Protección Ambiental de los EE. UU. (EPA) intentan combinar la actividad frente a patógenos fecales y el riesgo de la generación de los subproductos de desinfección al requerir que el 95% de las muestras de agua distribuida recolectadas en los puntos de

control representativos de las salidas principales, han de tener residuos detectables de cloro (generalmente $>0,1$ o $0,2$ mg/L) (Martin *et al.*, 2020).

No obstante, la Organización Mundial de la Salud ha indicado que se necesitarían niveles más altos de desinfectante de $0,3$ – $0,5$ mg/L en el punto de entrada del edificio para limitar el crecimiento de *Legionella* spp. (Martin *et al.*, 2020).

A medida que el agua distribuida se reparte a través de los sistemas de distribución de agua sanitaria, el cloro libre o la cloramina se pierde o se vuelve ineficaz merced a reacciones biológicas y químicas, motivadas por la corrosión de tuberías de cobre y hierro y la nitrificación (Martin *et al.*, 2020; Rhoads y Hammes, 2021).

Si la desinfección se interrumpe o se reduce, *Legionella* y otros patógenos oportunistas pueden volver a los niveles anteriores a la desinfección en cinco días o restablecerse a un estado viable pero no cultivable (VBNC) (Martin *et al.*, 2020).

Estas deficiencias en el sistema de desinfección de agua, así como las estructurales de la red se han asociado con el 85% de los brotes de LD entre 2000-2014, incluyendo la falta de una concentración de desinfectante adecuado (70%) y el almacenamiento de agua en el rango adecuado de temperatura para el crecimiento de *Legionella* -52%- (Martin *et al.*, 2020; Zahran *et al.*, 2018).

Si bien está ampliamente aceptado que el aumento de la temperatura del agua acelera las tasas de descomposición del cloro y la cloramina en las tuberías principales, no es del todo preciso el proceso de descomposición del CLR en función de la escala de temperaturas (Martin *et al.*, 2020).

Se ha concluido que por encima de 30°C aumentan las tasas de eliminación de cloro y en un estudio concreto se observó que al aumentar la temperatura del agua de 25°C a 43°C se duplica la dosis de cloro requerida para mantener el nivel de cloro libre residual (CLR) en 4 mg/L. Se deduce además que la desinfección es más efectiva cuando el nivel de CLR se mantiene con adiciones regulares de cloro, en comparación con aplicar una sola vez una dosis más amplia (Martin *et al.*, 2020).

El aumento del contenido de carbono orgánico eleva la tasa necesaria de CLR en el agua fría y puede servir como fuente de nutrientes para el recrecimiento microbiano en la red de distribución (Martin *et al.*, 2020).

Remitiéndonos al ejemplo anterior, cuando la ciudad de Flint en Michigan cambió el suministro pasando a suministrar agua de río tratada localmente con mayor contenido de carbono orgánico, la demanda de cloro requerida para mantener el nivel de CLR fue mucho mayor, lo que a su vez generó excesos en la producción de subproductos de desinfección como trihalometano. No obstante, el desarrollo de *Legionella* a veces se relaciona con el carbono orgánico en el agua, pero también puede crecer cuando el contenido de carbono es bajo (Martin *et al.*, 2020).

En cuanto al papel del pH se observa que un pH más bajo tiende a aumentar la efectividad de desinfección del cloro libre, incluso aunque tienda a acelerar la tasa de desaparición del cloro (Martin *et al.*, 2020).

Al mismo tiempo el pH por sí mismo puede tener un efecto directo en el crecimiento de *Legionella*, puesto que es generalmente tolerante a los ácidos (a un pH de 3 y 5), pero pierde capacidad de cultivo por encima de pH 11 (Martin *et al.*, 2020).

Un estudio que examinó un cultivo puro de *L. pneumophila* observó crecimiento hasta un pH de 9,5, con una pérdida de capacidad de cultivo a pH 10,5 (Martin *et al.*, 2020).

En este mismo estudio, se evaluaron los efectos de un desinfectante en patógenos oportunistas representativos, incluidos *Legionella* spp., *L. pneumophila* y *Acanthamoeba*, bajo posibles condiciones de protección de varios materiales de las tuberías de conducción conocidos por causar pérdida de cloro o alterar el pH. En concreto, se planteó la hipótesis de que las temperaturas altas, un pH más básico y mayores concentraciones de carbono orgánico tenderían a aumentar el crecimiento de patógenos oportunistas, debido a la disminución de la efectividad de los niveles de desinfectantes de cloro o cloramina (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2019).

Las pruebas se realizaron en calentadores de agua de vidrio simulados, cada uno con materiales/condiciones de interés, incluyendo pH 10, hierro,

óxido de hierro, magnesio y una combinación de magnesio e hierro, con un aumento secuencial en la dosis de desinfectante de cloro o cloramina (Rhoads y Hammes, 2021).

Se seleccionó una temperatura de 37°C para representar las partes de la red de agua caliente en mayor riesgo de crecimiento de patógenos oportunistas, incluidas las válvulas mezcladoras y los grifos distales mezclados (Zahran *et al.*, 2018).

El objetivo del estudio es examinar la estabilidad del cloro y la efectividad de la desinfección en las temperaturas más altas, de acuerdo con diferentes condiciones de la red de distribución.

- AOC: Es el carbono orgánico asimilable, y es la fracción del carbono orgánico total en el agua que puede ser utilizada por microorganismos como fuente de energía y crecimiento, y que por tanto puede influir en el crecimiento de bacterias y otros patógenos en los sistemas de agua potable (Van der Wielen y Van der Kooij, 2013).

- TOC (Total Organic Carbon): Es la cantidad total de carbono total presente en compuestos orgánicos dentro del agua. Incluye tanto el carbono fácilmente degradable por microorganismos (como el AOC), como el que no es. Es un indicador de la carga orgánica en el agua que afecta a la demanda de desinfectantes y la formación de subproductos de desinfección (Van der Wielen y Van der Kooij, 2013).

Descomposición del Cloro en diferentes condiciones

Se procedió a cuantificar la demanda de cloro en cuatro aguas distintas con dos niveles de pH diferentes (7,5 y 10) y dos niveles de carbono orgánico total también diferentes (TOC, 0,52 mg/L y 1,00 mg/L).

A pH 7,5 y bajo TOC, el rendimiento del cloro residual fue de 0,99 mg/L por cada 1 mg/L de cloro dosificado, mientras que, en condiciones de alto TOC, el rendimiento fue de 0,67. Esto confirma que la elevada concentración de carbono incrementa la demanda de cloro.

- Cuando el nivel de TOC es bajo y pH 10, *Legionella* spp. disminuyó en un 97-100%.

- Cuando el nivel de TOC es alto y pH 10, no hubo cambios significativos en *Legionella* spp. y bacterias totales, pero sí un 100% en *Acanthamoeba*.

Se confirma por lo tanto que el cloro es más eficiente y mantiene un nivel de CLR elevado cuando el pH es cercano a la neutralidad y el nivel total de carbono orgánico en agua es bajo.

Efecto de la Temperatura en el descenso del nivel CLR

A 37°C, la tasa de conservación de CLR a pH 10 y bajo TOC, fue del 90% y el 14% después de 1 y 24 horas, respectivamente.

A 37°C la tasa de conservación a pH 10 y alto TOC, solo el 3% del CLR permaneció después de 24 horas.

Por otra parte, el cloro fue más efectivo que la cloramina para reducir la presencia de *L. pneumophila* en condiciones de bajo TOC, mientras que, en condiciones de alto TOC, es a la inversa.

Correlación entre Microbios y Medidas Químicas

La concentración de hierro y magnesio incrementaron significativamente la presencia de *Legionella* y *L. pneumophila*, mientras que la adición de cloro redujo significativamente el magnesio liberado por la corrosión de los ánodos en los calentadores de agua y por lo tanto redujo la presencia bacteriana. (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2019).

Queda por lo tanto demostrado que la eficacia de desinfección del cloro frente a *Legionella* spp., *L. pneumophila* y *Acanthamoeba* en los sistemas de distribución de agua sanitaria es compleja puesto que depende de diversos factores como son, los cambios en la temperatura, los aumentos en el carbono orgánico total y las elevaciones importantes en el pH.

El residuo de cloramina resulta ser menos eficaz que el cloro para reducir las bacterias totales, *Acanthamoeba* y *Legionella* spp. en condiciones de bajo y alto TOC (Martin *et al.*, 2020).

1.1.6.1.- Métodos de desinfección:

Inicialmente se valoraba con mayor interés la contaminación de los sistemas de suministro de agua sanitaria en hospitales para prevenir la proliferación de *Legionella* spp. debido a los brotes de LD, en este caso de origen nosocomial, que además genera fuertes trastornos económicos. Esta inquietud, sobre todo en instalaciones antiguas, se ha visto reflejada en diversas publicaciones (Vincenti *et al.*, 2019; Lytle *et al.*, 2021; Unterberg *et al.*, 2021).

La medida de desinfección química más utilizada es la hipercloración, para controlar la presencia de *Legionella* (Donohue, 2021; Buse *et al.*, 2022). Es uno de los métodos químicos más comúnmente utilizados e implica la aplicación de hipoclorito sódico en altas concentraciones para eliminar *Legionella* del sistema de agua. Aunque es efectivo, la hipercloración requiere aplicaciones regulares o continuas, lo que puede afectar la calidad del agua y no siempre proporciona una solución sostenible (Lytle *et al.*, 2021; Sciuto *et al.*, 2021).

La inyección de cloro en dosis elevadas para la desinfección de *Legionella* en sistemas de agua sanitaria tiene consecuencias, puesto que las altas concentraciones de desinfectantes a base de cloro forman subproductos desinfectantes peligrosos cuando están presentes en aguas con cargas orgánicas más altas y causan problemas de sabor y olor. Además, la efectividad de estos desinfectantes puede variar según la bacteria a la que se dirijan (Cervero-Arago *et al.*, 2015).

La ionización de cobre/plata también ha resultado efectiva para inactivar *Legionella* en sistemas de distribución de agua sanitaria (Lin *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1994). Sin embargo, la disociación y efectividad del cobre puede cambiar a medida que varía el pH, y mantener niveles adecuados de ión cobre puede resultar complicado (Lin *et al.*, 2002; Walraven *et al.*, 2016).

Se deben cumplir límites estrictos y el uso de cobre como biocida en Europa está estrictamente regulado por la Comisión Europea debido a los posibles efectos secundarios, lo que limita su uso (Unterberg *et al.*, 2021; Vincenti *et al.*, 2019).

Los filtros de agua estéril son efectivos, pero presentan problemas porque son complicados y costosos en cuanto a instalación y mantenimiento ya que deben montarse uno en cada punto final de red y cambiarse regularmente (Farina *et al.*, 2023; Unterberg *et al.*, 2021).

La desinfección térmica es otro sistema que se basa en la eliminación de *Legionella* mediante la recirculación de agua a temperaturas superiores a 70°C por los circuitos de agua sanitaria.

Una investigación realizada en un hospital universitario alemán mostró que este método es altamente efectivo y puede mantener bajos niveles de *Legionella* durante más de dos años sin necesidad de equipo especial. El inconveniente lógicamente es que la periodicidad no está clara y depende de la complejidad de las instalaciones y de las adherencias y biofilms generados en la red. No obstante, ofrece una solución económica y efectiva para la desinfección de sistemas de suministro de agua contaminados con *Legionella*, especialmente en instalaciones con estructuras de edificios más antiguas (Unterberg *et al.*, 2021).

Otro método a considerar es la irradiación ultravioleta (UV) que puede aplicarse en el suministro principal de agua o cerca de los puntos finales de red. Este sistema tan específico también requiere equipo especial, y ha sido evaluado en algunos estudios clínicos cuyos resultados casi nunca fueron duraderos y siempre dependían de las condiciones estructurales del edificio (Donohue, 2021; Buse *et al.*, 2022). Por lo tanto, actualmente la irradiación UV se presenta como una posibilidad entre muchas, y el debate no es claro a favor o en contra de su aplicación (Sciuto *et al.*, 2021). Igualmente, la irradiación UV requiere además de equipo especial, un mantenimiento regular (Unterberg *et al.*, 2021).

A pesar de estos inconvenientes, la desinfección con luz UV se ha convertido en una opción prometedora para controlar *Legionella*, dada su capacidad para inactivar microorganismos a través de la radiación (Boczek *et al.*, 2021), si bien es preciso evaluar la eficacia de diferentes longitudes de onda de luz UV, incluidas las tecnologías más recientes de diodos emisores de luz ultravioleta (LED UV), en la inactivación de *L. pneumophila*.

La irradiación UV ha sido ampliamente estudiada y valorada en cuanto a su efectividad. Una vez se ha aplicado la UV se realiza una enumeración de colonias según el estudio que se describe:

Tras la exposición a una dosis específica de UV y longitud de onda, las muestras se enumeraron utilizando diluciones seriadas y se colocaron en platos duplicados en placas de extracto de levadura con carbón amortiguado (BCYE) que contenían glicina, vancomicina, polimixina B y cicloheximida. Las placas se incubaron a 35°C durante cinco a siete días antes de ser contadas.

Además de este proceso se llevó a cabo un control paralelo de una muestra no expuesta a UV, pero mantenida a temperatura ambiente durante el mismo tiempo de exposición, que también fue enumerada (Boczek *et al.*, 2021).

El deterioro del ADN y las proteínas de *L. pneumophila* antes y después de la irradiación UV se evaluó primero mediante técnicas de ELISA para los dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) y un segundo test de mediante análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), respectivamente.

Los resultados mostraron una alteración significativa tanto en el ADN como en las proteínas, directamente relacionada con la inactivación observada destacando la eficacia de los LED UV, particularmente aquellos que emiten a 255 y 265 nm, en la inactivación de *L. pneumophila* (Boczek *et al.*, 2021).

Los LED UV ofrecen ventajas sobre las lámparas UV convencionales, incluida una mayor eficacia de inactivación, menor tamaño y fragilidad, y la capacidad de emitir en longitudes de onda específicas que optimizan el efecto destructor sobre el ADN de los patógenos.

Otro estudio reciente realizado en 2023 se centró en evaluar la eficacia de los LED UV para la desactivación de *Legionella pneumophila* y *Pseudomonas fluorescens* en superficies de los sistemas de distribución de agua potable, como hierro fundido y acero inoxidable. El estudio comparó la eficacia de los LED UV a 280 nm y 365 nm.

Los resultados mostraron que los LED UV a 280 nm lograron una reducción logarítmica de 4,8 medida en valor de reflectancia lumínica (LRV) en cultivos

puros de *P. fluorescens*, y una LRV de 4,02 en biofilms sobre acero inoxidable y 2,96 en hierro fundido.

Sin embargo, los LED UV a 365 nm fueron menos efectivos, mostrando reacciones fotolíticas en el hierro fundido y reducciones menores a 1,5 LRV para *Legionella pneumophila*, y similares resultados bajos para *P. fluorescens* (Lara de Larrea *et al.*, 2023).

En el estudio emplearon tres métodos de cuantificación para *Legionella pneumophila*, el recuento en placa estándar (SPC), el test Legiolert, y la PCR. Los resultados variaron significativamente entre los métodos. El SPC mostró una reducción logarítmica de 4 LRV, Legiolert mostró 1,8 LRV, y PCR mostró solo 1 LRV a 280 nm, lo cual sugiere que los métodos de recuento tienen diferentes niveles de sensibilidad y precisión (Lara de Larrea *et al.*, 2023).

No obstante, es importante considerar múltiples métodos de desinfección y su aplicabilidad según los casos en diferentes entornos. La selección del método adecuado debe basarse en una evaluación detallada de los riesgos, los beneficios y las limitaciones de cada método.

A pesar de todas las posibilidades de medidas de desinfección, en algunos casos aún no es posible lograr una reducción suficiente de la carga de *Legionella* (Lytle *et al.*, 2021; Unterberg *et al.*, 2021) y solo una reconstrucción completa del sistema de suministro de agua puede eliminar el problema (Vincenti *et al.*, 2019).

1.1.6.2.- Controversias ante la colonización y persistencia de la bacteria en las instalaciones:

Diferencias entre Colonización, Infección y Enfermedad

El concepto de colonización se refiere al hecho de que los microbios pueden sobrevivir de manera persistente en una superficie corporal, lo cual no necesariamente implica que haya una infección (Pendleton *et al.*, 2013).

La infección supone un crecimiento y replicación de estos hasta que sobrepasan las barreras de defensa del individuo y deterioran los tejidos del hospedador, mientras que la enfermedad surge por alteraciones del estado

fisiológico debido a los daños causados, ocasionando signos y síntomas asociados (Hall, 2013).

La colonización puede ser el primer paso requerido para el desarrollo de una infección o enfermedad (Magill *et al.*, 2014).

En la figura 29 observamos un circuito primario en un sistema de ACS, que es el encargado de elevar la temperatura en los acumuladores.



Figura 29: Calderas de circuito primario. Fuente: Autor.

Prevalencia de Legionella en Sistemas Solares térmicos

En un estudio reciente, se evaluó la presencia de *Legionella* spp. en 58 edificios con sistemas solares térmicos para la producción de agua caliente.

Se detectó *Legionella* spp. en el 40% de los edificios, encontrándose en el 40% de las muestras de agua caliente y en el 12% de las muestras de agua fría. Los recuentos de *Legionella* spp. variaron entre 2×10^2 y 7.6×10^5 UFC/L, con un promedio de $3.8 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^4$ UFC/L (Totaro *et al.*, 2020).

El estudio identificó varios factores que contribuyen a la colonización de *Legionella* spp. en sistemas de agua caliente, incluyendo la falta de mantenimiento adecuado y la insuficiente desinfección continua o periódica.

La actividad discontinua de los tanques de almacenamiento de agua, propios de los sistemas solares térmicos, puede causar calentamientos y enfriamientos progresivos del agua, creando condiciones ideales para el crecimiento de *Legionella* spp. Además, se encontró que el agua fría con temperaturas superiores a 20°C también podría proporcionar condiciones óptimas para el crecimiento de la bacteria (Totaro *et al.*, 2020).

Correlaciones con Parámetros Físico-Químicos

El análisis de correlación reveló una relación moderada entre la concentración de *Legionella* spp. y la disminución de las temperaturas del agua caliente ($r=0,46$; $p=0,035$). En las muestras de agua fría, se observó una fuerte correlación entre la presencia de *Legionella* spp. y el aumento de las temperaturas del agua ($r=0,82$; $p<0,001$). Estos hallazgos sugieren que las temperaturas de agua que no alcanzan niveles óptimos de desinfección favorecen la persistencia de la bacteria (Totaro *et al.*, 2020).

La formación de biofilms en las tuberías y la presencia de VBNC de *Legionella* spp. fueron destacados como factores importantes para la persistencia de la bacteria en los sistemas de agua. Estas formas VBNC pueden evadir los métodos tradicionales de desinfección y volver a un estado activo bajo condiciones favorables, representando un riesgo continuo para la salud pública (Totaro *et al.*, 2020).

El estudio concluye que la presencia de *Legionella* spp. en sistemas de agua caliente en edificios residenciales con paneles de energía solar térmica es significativa y está asociada con la oscilación de la temperatura, por lo que requieren un suplemento energético que estabilice dicha temperatura (Totaro *et al.*, 2020).

En otro orden, varios estudios han descrito la colonización a largo plazo de los sistemas de agua de los hospitales con *Legionella pneumophila*, a menudo con la persistencia de la misma cepa, como causa de la legionelosis nosocomial (Sabria *et al.*, 2001; García-Núñez *et al.*, 2008; Pancer *et al.*, 2013).

No se conocen bien las razones por las cuales una cepa con un patrón molecular particular es seleccionada en un sistema de agua. Se ha descrito que, en edificios con la misma red de suministro de agua, ciertos factores como el diseño del sistema y los materiales de las tuberías pueden determinar la composición y diversidad del microbioma del agua (Pancer *et al.*, 2013).

Vigilancia Ambiental del Agua:

La mayoría de los países europeos requieren la vigilancia ambiental del agua en edificios de uso público (Van Kenhove *et al.*, 2019). El cultivo en placa sigue siendo el método de elección y el mínimo obligatorio, si bien en 2022 se han aprobado más técnicas para el control de *Legionella*. El principal inconveniente de esta técnica es no solo el largo período para obtener resultados, sino también que solo se detecta la subpoblación de bacterias viables y cultivables.

El patógeno puede cambiar su estado metabólico a VBNC bajo estrés ambiental debido a un aumento/disminución de la temperatura, variación del pH del medio o presencia de compuestos bactericidas, entre otros.

La *Legionella* VBNC que aparece en biofilms oligotróficos, son capaces de infectar amebas incluso después de meses en este estado. A diferencia del estado replicativo, el patógeno necesitará más tiempo y requerirá una mayor multiplicidad de infección para internalizar la ameba (Dietersdorfer *et al.*, 2018). *Legionella* VBNC es más difícil de detectar, ya que esta subpoblación no crece en placa de cultivo, por lo que su erradicación es aún más difícil.

Particularmente peligrosa, debido a su alta letalidad, es la presencia de *Legionella* spp. en los sistemas de distribución de agua de grandes hospitales y otras instalaciones de salud, ya que estos a menudo presentan varios factores de riesgo como la presencia de tramos muertos, tanques de almacenamiento, bajo flujo y tuberías antiguas. Por lo tanto, los sistemas de agua representan un riesgo potencial para la población hospitalaria,

especialmente si se encuentra *Legionella* spp. en ciertas salas como cuidados intensivos, hematología, cardiología, hemodiálisis y neumología debido a la naturaleza crítica de los pacientes hospitalizados en estas unidades (Cunha *et al.*, 2016).

Un estudio realizado en hospitales italianos demostró que variaciones en la calidad del agua pueden afectar la eficacia de los tratamientos de desinfección y, por ende, la presencia de *Legionella* en los sistemas de agua. Específicamente, temperaturas subóptimas y niveles inadecuados de desinfectantes pueden promover el crecimiento y la supervivencia de *Legionella* (Deiana *et al.*, 2021).

Un estudio realizado por Parraga-Niño *et al.* (2024) propuso describir la persistencia y variabilidad genotípica de *L. pneumophila* en un hospital con dos sistemas de distribución de agua caliente independientes y estimar la termotolerancia de las diversas variantes genotípicas, siendo las conclusiones las siguientes:

- Las instalaciones hospitalarias con sistemas de agua independientes pueden ser colonizadas por diferentes tipos de *Legionella* durante largos periodos.
- Los estudios de termotolerancia mediante cultivos pueden subestimar la presencia de bacterias en estado VBNC, que retienen su potencial patógeno.
- Mantener la temperatura del agua a 60°C podría ser una medida eficaz para reducir la proliferación de *Legionella*, aunque tiene limitaciones prácticas.
- Es necesario actualizar las legislaciones actuales para incluir métodos de detección avanzados que identifiquen bacterias en estado VBNC y ajustar los planes de gestión del riesgo en función de estos hallazgos.
- La aplicación continua de desinfectantes puede seleccionar cepas más resistentes y termotolerantes, complicando aún más su control (Liang *et al.*, 2023).

Se ha analizado la implementación de filtros antibiofilm y nuevas superficies inteligentes y los resultados han sido prometedores en la inhibición de la formación de biofilms de *Legionella*. Estos filtros utilizan polímeros avanzados para crear superficies menos propensas a la adhesión

bacteriana, prolongando así la funcionalidad de los sistemas de agua (Filice *et al.*, 2022).

Perspectivas futuras y recomendaciones

A pesar de los avances en la detección y control de *Legionella*, persisten todavía retos importantes y significativos. La capacidad de *Legionella* para entrar en un estado VBNC y su resistencia dentro de biofilms sugieren que las estrategias actuales pueden no ser suficientes a largo plazo.

Las investigaciones en el futuro deberían centrarse en comprender mejor la interacción de *Legionella* con su entorno y en el desarrollo de nuevas tecnologías para su detección y control, así como la implementación de planes de gestión de agua que incluyan una coordinación efectiva entre los administradores de edificios y profesionales de salud pública es fundamental.

Se deben considerar enfoques innovadores como el uso de bacteriófagos y bacterias depredadoras como métodos biológicos para controlar la proliferación de *Legionella* en sistemas acuáticos (Cavallaro *et al.*, 2022), además de la implementación de superficies inteligentes y filtros antibiofilm (Filice *et al.*, 2022).

Cómo afecta la resistencia de Legionella a los tratamientos de desinfección en la efectividad a largo plazo de las estrategias de control en instalaciones

A pesar de los esfuerzos por implementar métodos como la hipercloración, el tratamiento térmico y el uso de biocidas, *Legionella* spp. ha demostrado la capacidad de adaptarse y desarrollar resistencia a estos tratamientos.

La exposición continua a desinfectantes puede seleccionar cepas más resistentes, lo que conlleva a una persistencia prolongada de la bacteria en los sistemas de agua (Liang *et al.*, 2023).

La resistencia a la temperatura ha sido igualmente descrita, así como la formación de biofilms, que proporcionan una barrera protectora contra los desinfectantes y facilitan la supervivencia de la bacteria en condiciones adversas (Assaidi *et al.*, 2021).

La formación de biofilms facilita la supervivencia a largo plazo de *Legionella*, ya que permite la coexistencia de diferentes microorganismos que

pueden ofrecer beneficios mutuos, como la transferencia de genes de resistencia (Sciuto *et al.*, 2021).

¿Cómo influyen las prácticas de mantenimiento y diseño de los sistemas de agua en la prevención de la colonización de Legionella?

Un diseño adecuado que minimice las áreas de estancamiento utilice materiales resistentes a la colonización bacteriana y mantenga una circulación constante del agua es fundamental para reducir el riesgo de proliferación de *Legionella* (Sciuto *et al.*, 2021). Además, las prácticas de mantenimiento, como la limpieza regular de tanques y tuberías, y la implementación de tratamientos de choque térmico o químico, ayudan a controlar la presencia de biofilms y reducir la carga bacteriana (Assaidi *et al.*, 2021). Un enfoque proactivo que combine un buen diseño con prácticas de mantenimiento rigurosas puede mejorar significativamente la gestión de *Legionella* en conducciones de agua sanitaria.

¿Qué estrategias emergentes se están explorando para mejorar la detección y control de Legionella en los sistemas de agua?

Podemos destacar los métodos de detección rápida y precisa, como la PCR en tiempo real y la citometría de flujo, que permiten identificar tanto bacterias cultivables como aquellas en estado VBNC (Oliver, 2010). Además, el desarrollo de sensores inteligentes que monitorean continuamente la calidad del agua y la presencia de *Legionella* puede proporcionar alertas tempranas y permitir una respuesta rápida (Liang *et al.*, 2023).

En términos de control, se están investigando tratamientos innovadores como el uso de luz ultravioleta ya descrito, ultrasonido y tecnologías basadas en nanopartículas para desinfectar el agua de manera más efectiva y sostenible (Cavallaro *et al.*, 2022).

1.2.- Justificación del estudio:

La inspección de salud pública ha desarrollado con los años una potente red de inspección con gran cantidad de medios humanos y económicos a través de las administraciones responsables. La función inspectora va orientada también a validar los programas de muestro y los libros de

mantenimiento que elaboran los responsables de las instalaciones, dirigidos a prevenir el desarrollo y la proliferación de la bacteria *Legionella* spp. apoyándose en una legislación que solamente establece obligaciones para establecimientos de uso público (Real Decreto 487/2022).

Nos centramos en este estudio en los circuitos de agua de consumo humano que se utilizan en la distribución de la misma en los edificios de uso público, observando la influencia que ejercen en la proliferación y amplificación de *Legionella* spp. en estas instalaciones, las condiciones correctas de mantenimiento de la red en cuanto a filtrado y estabilización de un adecuado nivel de biocida de forma constante frente a aquellas otras instalaciones donde solamente se realizan las elevaciones puntuales de la concentración de biocida en las redes de abastecimiento de agua de consumo humano para abordar el control y la proliferación de *Legionella* spp., no cumpliendo condiciones adecuadas en los supuestos anteriormente descritos.

El conjunto de las administraciones públicas han centrado su objetivo en elaborar normativa al respecto de la prevención de la proliferación ambiental de *Legionella* como herramienta de prevención. La administración general del estado, mediante la publicación del Real Decreto 487/2022, en vigor, los anteriores ya derogados, y las diferentes administraciones regionales, provinciales y locales, mediante el desarrollo de todas las guías que derivan de los citados Reales Decretos (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14, L15, L16).

La UE ha editado igualmente una guía que, como las legislaciones revisadas de los países europeos de nuestro entorno, responde a las mismas premisas (L17, L18, L19, L20, L21).

El objetivo en todas ellas siempre es identificar las instalaciones objeto de la inspección como instalaciones de riesgo, y a continuación desarrollar acciones orientadas a la prevención del proceso de amplificación de la bacteria en estas instalaciones.

Las acciones que han de desarrollarse de forma activa para evitar el proceso de amplificación de la bacteria *Legionella pneumophila*, aparecen en todos los programas de trabajo de prevención, que se utilizan en la inspección de salud pública. Estos programas han sido desarrollados por personal

perteneciente a las administraciones públicas, como las guías mencionadas anteriormente, o por asociaciones de empresas gestoras de edificios de uso público, obligadas por la norma a ejecutar estos libros de mantenimiento, o bien por los Comités Técnicos de Normalización (CTN) de la asociación española de normalización (AENOR), redactores de las normas UNE cuya última actualización es la norma UNE 100030:2023.

Todas estas normas tratan de establecer la obligatoriedad de realizar desinfecciones químicas anuales mediante elevación de la concentración del biocida desinfectante en los circuitos de agua fría de consumo humano, siendo el hipoclorito sódico el producto utilizado con mayor frecuencia.

Al mismo tiempo ofrecen la posibilidad de realizar desinfecciones térmicas en el caso del agua caliente sanitaria. Se explica igualmente de forma concreta en las diferentes guías editadas, las concentraciones de biocida que se deben alcanzar en las comúnmente denominadas hipercloraciones y los tiempos tasados que debe permanecer este agua con exceso de biocida en las conducciones, en función de cada uno de los supuestos planteados, ya sea en caso de positividad de muestras ambientales o de aparición de brote.

Siempre en todas las hipercloraciones de los circuitos de agua fría de consumo humano se acaban hiperclorando los circuitos de agua caliente sanitaria reduciendo su temperatura mediante apagado de calentadores, puesto que derivan directamente de los anteriores.

En la experiencia en la inspección de salud pública y en la aplicación de las guías sanitarias se observa que las instalaciones que disponen de un sistema de filtrado que cumpla la norma UNE-EN 13443-1:2003+A1:2009, y además una cloración estable por encima de 0,5 ppm de cloro, tienen una incidencia muy inferior de positividad de muestras ambientales, aun no habiendo realizado tratamientos de hipercloración en un tiempo tasado entre tres meses y un año posterior a la inicial obligatoria de cada año, sobre aquellas que, no reuniendo estos requisitos, realizan hipercloraciones anuales. Estas desinfecciones por hipercloración ofrecen además algunas dificultades en su desarrollo que merecen ser tenidas en cuenta, a saber:

a) Laboriosidad: Son complicadas de realizar con rigor en instalaciones con largos recorridos. No existe garantía de que se alcance el nivel deseado en el punto final de red.

b) El efecto de destrucción de la bacteria que se busca tiene un periodo de duración determinado, puesto que son frecuentes los casos en los que las analíticas ofrecen resultados satisfactorios tras la hipercloración, y a partir de unos meses aparecen de nuevo resultados ambientales positivos, debido a la especial capacidad que tiene la bacteria de hacer frente a la acción del cloro y desarrollar resistencias. Es de destacar la consideración de que la desinfección se realiza siempre conforme a la norma establecida, con carácter anual.

c) En las instalaciones que no presentan una ETAP en su estructura, no resulta objetivamente exacto realizar una neutralización química posterior del agua hiperclorada de forma correcta.

Este análisis se encuentra con un importante vacío en cuanto a la detección ambiental de la bacteria, en tanto en cuanto los análisis de muestras ambientales se hacen siempre sobre edificios de uso público, por lo que la enorme presencia de *Legionella* spp. en edificios dedicados a uso privado (viviendas particulares, oficinas, etc.) queda fuera del seguimiento, no pudiéndose valorar plenamente la influencia que estas instalaciones pueden tener sobre la pervivencia y difusión de la bacteria, actuando como reservorios de la misma.

Por otra parte, el planteamiento en la investigación sobre *Legionella* spp. está siempre más orientado en la literatura científica al desarrollo del proceso morboso que genera esta bacteria en el ser humano una vez que ha llegado al organismo infectado. No obstante, los agentes de inspección de salud pública tienen su campo de actuación en la fase anterior al desarrollo de la enfermedad en el ser humano, cuando comienza el crecimiento exponencial de la bacteria en los sistemas de conducción de agua de consumo humano en edificios contruidos y habitados por el hombre (Real Decreto 487/2022).

Las diferentes legislaciones españolas tanto las nacionales como las autonómicas, así como otras legislaciones internacionales además de las normas UNE redactadas por los Comités Técnicos de Normalización (CTN) de

la Asociación Española de Normalización (AENOR), han ido variando la forma de abordar los procedimientos de prevención en función de los avances en el conocimiento sobre la proliferación de *Legionella* spp. que se han ido produciendo.

Después de la existencia de varios brotes de legionelosis en España, la primera normativa en nuestro país que reguló las actuaciones en materia de prevención de *Legionella* spp. fue el Real Decreto 909/2001.

La Comisión de Salud Pública del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud, en su reunión del 29 de octubre de 1999 con el objetivo de evitar o reducir al mínimo la aparición de brotes, estimó necesario disponer de criterios técnico-sanitarios coordinados y aceptados por las autoridades sanitarias de la administración estatal, autonómica y local. Para ello acordaron la adopción de medidas normativas orientadas a la prevención y control de esta enfermedad en todo el territorio nacional (Real Decreto 909/2001). En su Artículo 6 establece que las medidas preventivas se basarán en la aplicación de dos principios fundamentales, a saber: primero, la eliminación o reducción de zonas sucias mediante un buen diseño y mantenimiento de las instalaciones, y segundo, evitar las condiciones que favorecen la supervivencia y multiplicación de *Legionella* mediante el control de la temperatura del agua y la desinfección continua de la misma.

Se establecen igualmente criterios sobre las hipercloraciones obligatorias para la desinfección de las redes de agua de consumo humano, indicando que han de ser anuales. Ambas serían elementos clave en los procedimientos de prevención y control de la amplificación de la bacteria (Real Decreto 909/2001).

La ponencia de Sanidad Ambiental adscrita a la Comisión de Salud Pública del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud se encargó de actualizar los anexos de este Real Decreto a la luz de los nuevos conocimientos científico-técnicos, destinados a mejorar la prevención y control de la legionelosis, lo que motivó que se viera superado en un breve plazo y diera paso al Real Decreto 865/2003. En el anexo 3 de este Real Decreto que habla sobre el mantenimiento de instalaciones interiores de ACS

y AFCH, y se detallan los aspectos mínimos que debe de recoger la revisión, la limpieza y la desinfección de las mismas.

En este anexo se especifica que el agua de la instalación interior de consumo humano deberá cumplir en todo momento con los parámetros y criterios establecidos en la legislación de aguas de consumo humano. En su apartado B añade que las instalaciones de agua fría de consumo humano y de agua caliente sanitaria se limpiarán y desinfectarán como mínimo una vez al año, cuando se ponga en marcha la instalación por primera vez, tras una parada superior a un mes, tras una reparación o modificación estructural, cuando una revisión general así lo aconseje y cuando así lo determine la autoridad sanitaria. Nuevamente este Real Decreto 865/2003 indica la obligatoriedad de realizar hipercloraciones (elevaciones puntuales del nivel de biocida) con carácter anual, siguiendo la indicación concreta, de que el nivel de biocida ha de llegar a todos los puntos terminales de la red en concentración de 1-2 mg/l y mantenerse durante 3 o 2 horas respectivamente.

Una vez derogado el Real Decreto anterior, el Real Decreto 487/2022, actualmente en vigor, indica expresamente que quedan excluidas de su ámbito de aplicación las instalaciones ubicadas en edificios dedicados al uso exclusivo de vivienda, siempre y cuando no afecten al ambiente exterior de estos edificios. Todo ello sin perjuicio de que, ante la sospecha de un riesgo para la salud de la población, la autoridad sanitaria podrá exigir que se adopten las medidas de control que se consideren oportunas. En el desarrollo de los programas de prevención este Real Decreto indica que el titular de una instalación que, utilizando agua, produce o es susceptible de producir aerosoles, con el objeto de minimizar la presencia, proliferación y dispersión de *Legionella* y sobre la base de la aplicación de cuatro principios (garantizar la eliminación o reducción de zonas sucias, el acúmulo de suciedad, así como los estancamientos mediante un buen diseño y el mantenimiento de las instalaciones y equipos; evitar las condiciones que favorecen la supervivencia y multiplicación de *Legionella*, mediante el control de la temperatura del agua y la desinfección de la misma; minimizar la emisión de aerosoles y, en su caso, la aplicación de medidas correctoras efectivas), puede recurrir a la implantación de un Plan de Prevención y Control de *Legionella* (PPCL) o a un

Plan Sanitario frente a *Legionella* (PSL), siendo el segundo opcional y el primero el punto de partida.

Y en base a esto concreta en su artículo 14 que cuando se tomen muestras para analizar *Legionella* spp., además deberán determinarse *in situ* al menos los siguientes parámetros físico-químicos: pH (si el efecto del desinfectante depende del pH), temperatura, conductividad y, en su caso nivel desinfectante residual.

En el anexo IV, este Real Decreto nos indica que la revisión, la limpieza y desinfección de toda la instalación se efectuará al menos una vez al año, sin superar los 12 meses entre una desinfección y la siguiente.

No entra el Real Decreto 487/2022 a especificar ningún tipo de desinfectante concreto dentro de los autorizados para su uso en el agua de consumo humano, sin embargo, sí lo hace, como decimos anteriormente, en la periodicidad de la elevación del nivel del mismo mediante la medición de la cantidad de moléculas libres. Al mismo tiempo en las referencias a la calidad del agua, especifica que es conveniente que sea agua de consumo humano y no solo agua sanitaria la que se utilice en las instalaciones de uso público, cumpliendo la legislación vigente al respecto en ese momento, es decir el Real Decreto 140/2003, actualmente derogado y sustituido por el Real Decreto 3/2023, de 10 de enero, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro.

La reciente modificación de este Real Decreto a través del Real Decreto 614/2024 no afecta a estos preceptos descritos, sino que las modificaciones van orientadas a otras vertientes del procedimiento inspector y de la responsabilidad en el cumplimiento de programas de prevención y control de *Legionella* spp.

Por otra parte, las Normas UNE desarrolladas a lo largo de los años también han ido tratando este tema de diferente manera, a medida que los conocimientos sobre la materia han ido avanzando.

En 1994 el informe UNE 100030:1994. *Guía para la prevención de Legionella en instalaciones*, indica que es muy importante un control continuo de la calidad del agua del circuito y, en su caso, del agua de aportación.

En cuanto a las instalaciones de agua sanitaria, hace referencia a que procede su limpieza y desinfección al menos una vez al año y, en cualquier caso, antes de su puesta en marcha, después de un brote o sospecha o cuando por la revisión rutinaria se considere necesario. La desinfección puede hacerse por vía química dejando correr el agua desde los tanques hiperclorados o añadiendo biocida al circuito dejando correr el agua hasta obtener 2 ppm de cloro libre en la grifería durante dos horas.

La norma *UNE 100030:2001. Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de Legionella en instalaciones, 2001*, establece que los circuitos de agua sanitaria deben disponer de un sistema de filtrado y un sistema de tratamiento permanente por medio de agentes biocidas.

Las concentraciones de cloro libre residual necesario en el agua se calculan a pH 7, de forma que, en función del valor del pH aplica un factor de corrección que de facto aumenta el nivel de biocida cuando el pH evoluciona a la basicidad.

La desinfección puede hacerse por vía química una vez al año, inyectando de 20 ppm a 50 ppm en los depósitos en caso de que los haya, dejando correr el agua hasta obtener 2 ppm de cloro libre en el punto final de red durante dos horas, matizando que puede ser de una hora si la concentración alcanzada es de 50 ppm. Igualmente, la calidad sanitaria del agua queda sometida a los criterios establecidos en la legislación en vigor en ese momento.

En la norma *UNE 100030:2005. Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de Legionella en instalaciones*, encontramos cambios en el punto 5, *instalaciones implicadas*, donde la nueva norma refleja la clasificación que realiza el Real Decreto 865/2003, distinguiendo entre instalaciones de mayor riesgo, e instalaciones de menor riesgo, e identificando al agua caliente sanitaria como de mayor riesgo y el agua fría de consumo humano como de menor riesgo.

Los procedimientos de desinfección se mantienen en cuanto a concentraciones y frecuencia con respecto a la norma UNE anterior. La calidad sanitaria del agua hace referencia a lo previsto en el Real Decreto 140/2003 y la concentración del biocida en el tratamiento remite al Real

Decreto 865/2003.

La norma *UNE 100030:2017. Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de Legionella en instalaciones*, no establece variaciones en ambos puntos, tanto en el nivel de biocida en el agua como en la concentración requerida en las elevaciones puntuales de las hipercloraciones y tampoco en la frecuencia de esta, que sigue siendo anual.

Por último, la norma *UNE 100030:2023. Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de Legionella en instalaciones*, pone el énfasis en la concentración de biocida y en el tiempo de contacto de este en las desinfecciones anuales por elevación de la concentración de biocida, especificando que ha de ser de 3 horas si son 2 ppm y 2 horas si son 3 ppm, incidiendo en que ha de ser en toda la red. En capítulo aparte se especifica que la calidad del agua sanitaria o de consumo humano de la red se regirá por lo establecido en la normativa sobre calidad de aguas de consumo.

Como conclusión, las normas UNE descritas y redactadas al efecto sobre prevención y control de *Legionella*, establecen igualmente las desinfecciones anuales por elevación de biocida como adecuadas, al tiempo que proponen que la concentración del biocida de forma constante sea el que establece la normativa sobre aguas de consumo humano, es decir se aceptan como valores adecuados de biocida aquellos por debajo de 0,5 ppm hasta 0,2 ppm.

Según lo explicado, la legislación describe dos aspectos importantes en la prevención y control de *Legionella* spp., que son la elevación del nivel de biocida con carácter anual y la garantía de que el agua de la instalación cumple criterios adecuados en el nivel de biocida que debe contener con carácter permanente.

En este estudio se trata de verificar que las elevaciones anuales del nivel de biocida como elemento de desinfección, no son en sí mismas garantía de control en la proliferación de la bacteria, si no van acompañadas de unas condiciones estructurales adecuadas en el sistema que constituye la red de distribución de agua de la instalación y, dentro de estas condiciones establecidas previamente como adecuadas, es conveniente especificar que niveles de biocida como el CLR por debajo de 0,5 ppm (que estarían dentro del rango adecuado de desinfección continua del agua – Real Decreto 3/2023-

) serían también insuficientes a efectos de la prevención y control en la proliferación de *Legionella* spp.

1.3.- Hipótesis y objetivos propuestos:

Hipótesis

La hipótesis y líneas de trabajo marcadas irán encaminadas a demostrar que es más eficaz a efectos de evitar el desarrollo *Legionella* spp., que los circuitos de agua fría de consumo humano mantengan de manera continua niveles de CLR entre 0,5 y 1 ppm y el agua llegue previamente al circuito sometida a un potente proceso de filtrado de partículas de acuerdo con los que establece la norma UNE-EN 13443-1:2003+A1:2009. *Equipo de acondicionamiento del agua en el interior de los edificios. Filtros mecánicos. Parte 1: Partículas de dimensiones comprendidas entre 80 µm y 150 µm. Requisitos de funcionamiento, seguridad y ensayo*, que realizar elevaciones puntuales de la concentración de biocida o realizar hipercloraciones anuales de los circuitos, no cumpliendo las premisas anteriores, incluso aunque no haya positividades previas en las muestras ambientales.

De esta forma, mantener el nivel de biocida de forma constante y sostenida en el tiempo, además de la filtración en la entrada previa de agua al circuito, aparece como elemento clave a la hora de controlar el crecimiento de la bacteria.

En los circuitos de ACS se observa igualmente que la desinfección térmica realizada de forma meticulosa y exhaustiva resuelve casi todos los problemas de positividad en estos circuitos y la temperatura es una herramienta eficaz para combatir *Legionella*.

Entonces las desinfecciones químicas anuales por elevación de la concentración de biocida que establece la normativa no obtienen el efecto deseado si no existen condiciones previas de estabilización de la instalación, e incluso en sistemas de distribución de agua de consumo humano que mantienen correctamente la cloración en el tiempo por encima de 0,5 ppm además de establecer un buen sistema de filtrado previo, las elevaciones

puntuales del biocida para realizar la desinfección anual prevista en la normativa pueden resultar menos útiles.

Los resultados de positividad en muestras ambientales obtenidos en los circuitos de agua fría ofrecen niveles sensiblemente inferiores que los de agua caliente, por lo que parecería lógico proponer el establecimiento de diferencias más nítidas en los PPCL que afectan al ACS y al AFCH.

Objetivos propuestos

El objetivo general de este proyecto llevado a cabo es que, una vez se han obtenido los resultados correspondientes a un tamaño muestral importante de muestras ambientales de *L. pneumophila*, dividiendo las instalaciones de procedencia entre dos grupos:

Un primer grupo de instalaciones que reciben un nivel estable de biocida que se ha establecido como superior a 0,5 ppm sin oscilaciones y que disponen de sistemas de filtración de partículas de acuerdo con lo establecido en la norma UNE-EN 13443-1:2003+A1:2009. *Equipo de acondicionamiento del agua en el interior de los edificios. Filtros mecánicos. Parte 1: Partículas de dimensiones comprendidas entre 80 µm y 150 µm. Requisitos de funcionamiento, seguridad y ensayo*, y no han realizado hipercloración en un periodo de al menos nueve meses desde la última analítica con 0 UFC, identificado en el estudio como grupo B.

Un segundo grupo de instalaciones que, identificadas como grupo A no cumplen las condiciones anteriores, en el sentido de que nivel de CLR es inferior a 0,5 ppm y está sometido a oscilaciones constantes, no disponen de equipo de filtrado y tampoco han realizado hipercloraciones en ese periodo de tiempo, si bien las han podido realizar con anterioridad.

Se pretende demostrar, que, de forma efectiva las instalaciones recogidas en el grupo B obtienen mejores resultados en cuanto a una menor positividad en muestras ambientales de *Legionella*, y menores recidivas en los muestreos intermedios realizados a lo largo del año, con respecto a las pertenecientes a las del grupo A.

Los objetivos específicos son:

- Dejar constancia fehaciente que la época del año en la que se recoge la muestra influye en los resultados obtenidos.

- Demostrar que el punto final de red como espacio principal de recogida de muestras en los circuitos de agua de consumo humano, no se comporta igual en los circuitos de ACS y en los circuitos de AFCH.

- Se pretende demostrar que la presencia de *L. pneumophila* serogrupo 1 o *L. pneumophila* serogrupo 2-14 en los positivos ambientales, no está relacionada con el tipo y las características de la instalación.

Como consecuencia del objetivo anterior igualmente se pretende establecer que la correcta gestión de la calidad del agua de consumo humano, así como la aplicación rigurosa de los planes de mantenimiento preventivo dentro de los libros de mantenimiento sanitario incluido en el PPCL es una garantía de control de la proliferación de *Legionella* spp., con lo que podemos valorar la aportación de los datos obtenidos y de estos conocimientos, al conjunto de la comunidad científica y contribuir en ciertos casos a simplificar estos libros de mantenimiento sanitario que aparecen en los Planes de Prevención de *Legionella* spp.

2.- MATERIAL Y MÉTODOS:

2.1.- Diseño experimental del estudio. Selección de muestras y método de detección y recuento de *Legionella* spp. Metodología:

En base a lo señalado en el punto anterior sobre las hipótesis y objetivos propuestos se verifica que es más eficaz a efectos de evitar la amplificación *Legionella* spp. en los sistemas, que los circuitos de agua fría de consumo humano mantengan de manera continua niveles de CLR entre 0,5 y 1 ppm y el agua llegue previamente al circuito sometida a un potente proceso de filtrado, que realizar elevaciones puntuales de la concentración biocida o realizar hipercloraciones anuales de los circuitos, incluso aunque no haya positividades previas en las muestras ambientales.

Por otra parte, la aparición de positivos en AFCH con respecto al ACS es muy inferior, por lo que, una vez cuantificada esa diferencia en la positividad de los resultados de las muestras de ambos circuitos, parecería lógico proponer el establecimiento de diferencias más claras entre los libros de mantenimiento de los PPCL entre el ACS y el AFCH.

La actividad desarrollada para este proyecto se desglosa en cada una de las etapas en las que se secuencian el trabajo.

Se dividieron las instalaciones en dos grupos diferentes (A y B), todas ubicadas en el sureste de España (provincias de Albacete, Alicante, Murcia) y se examinaron los resultados de los análisis de determinación y recuento de *Legionella* en ambos grupos durante dos años seguidos.

Recogida de muestras

El trabajo de campo consistió en la identificación de las instalaciones que cumplieran los criterios de aceptación para el estudio y recogida de las muestras. Esta recogida se hizo de forma rápida por técnicos capacitados para la recogida y transporte de las muestras.

Los recursos materiales utilizados fueron:

- Envases de toma de muestra de agua con tiosulfato sódico que inhibe la acción del biocida.
- Conductivímetro.
- pHmetro.
- Clorímetro: Medidor de cloro libre residual y de cloro total.
- Termómetro digital con sonda.

Los muestreos se realizaron de conformidad con la *Norma UNE 100030:2017*. En cada instalación se escogió un punto terminal de toma de muestras para el agua fría y otra para el agua caliente, teniendo en cuenta que la distancia del punto terminal de toma de las muestras al punto de aporte de agua al sistema fue de entre 10 y 20 m. Todas las muestras se tomaron dejando correr el agua al menos 1 minuto hasta alcanzar una temperatura constante que fue registrada, recogiendo a continuación el volumen de 1 L de agua en un recipiente estéril con tiosulfato sódico

pentahidratado (24 mg/L) como neutralizante. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de forma inmediata en contenedores asegurando una temperatura entre 6 y 18°C.

Detección y recuento de Legionella spp. mediante cultivo

Los ensayos de laboratorio se iniciaron antes de las 24 horas de la recolección de las muestras, siguiendo la *norma UNE-EN ISO 11731:2017*. Aquellas muestras en las que no se detectó *Legionella* spp. o cuando se determinó <10 UFC/L fueron consideradas negativas y el resultado equiparado a 0 UFC/L.

Al tratarse de muestras ambientales se siguió el procedimiento de siembra en placa, siguiendo la norma UNE-ISO 1173-2:2004, y en el procedimiento de obtención de resultados se diferenciaron tres bloques diferentes:

- *Legionella pneumophila* serogrupo 1.
- *Legionella pneumophila* serogrupos 2-14
- *Otras especies de Legionella*.

Los medios de siembra utilizados fueron medio selectivos GVPC y medio no selectivo BCYE, este último con o sin cisteína.

Una vez que se recopilaban todos los datos de las diferentes muestras de ACS y de AFCH, se realizó un estudio en el que se seleccionaron aquellas instalaciones en las que previamente se hizo un tratamiento de desinfección del circuito, por lo que se partió de 0 UFC en todas las instalaciones.

Posteriormente, se realizaron varios muestreos más en los mismos puntos terminales a los 3, a los 6, a los 9, o a los 12 meses siguientes, entre los cuales no se realizó ningún tratamiento nuevo de desinfección.

La figura 30 reproduce el procedimiento de filtrado según la Norma UNE correspondiente.



Figura 30: Procedimiento de filtrado de partículas según la norma UNE-EN 13443-1:2003+A1:2009. Fuente: Autor.

Desglosado por grupos la situación es la siguiente:

INSTALACIONES DEL GRUPO A:

Este grupo las instalaciones no realizaron hipercloraciones entre los tres y los últimos doce meses y cumplen las siguientes premisas:

Instalaciones no hipercloradas, sin ETAP previa ni filtrado de partículas según la norma UNE descrita anteriormente, y nivel de biocida oscilante (0 a 0,5 ppm).

Por lo tanto, los criterios fijados:

- Instalación no hiperclorada entre los 3 y los 12 últimos meses con histórico de positividad previo.
- Nivel de cloro en punto final de red entre 0 y 1 ppm de CLR.
- No existencia de ETAP ni filtrado previo.
- Temperatura en acumulador 60°C.
- Conductividad del agua entre 1000 y 1300 μSv .
- Longitud del circuito inferior a 50 m.
- Material de las conducciones, cobre o PVC.
- pH del agua entre 7,6 y 7,8.
- Tamaño del acumulador entre 750 L y 1 m³.

Estas instalaciones presentaban nivel *oscilante* de CLR porque está por debajo de 0,5 ppm y por lo tanto se considera inestable. El sistema de filtrado del agua previo a la entrada en la red, ya comentado, tampoco está garantizado de forma uniforme.

INSTALACIONES DEL GRUPO B:

En este grupo no se habían realizado hipercloraciones en las instalaciones entre los tres y los últimos doce meses y cumplían las siguientes premisas:

Instalaciones no hipercloradas con o sin ETAP. previa. Tienen un nivel *estable* de CLR por encima de 0,5 ppm hasta 1 ppm y por lo tanto presentan cloración estable y el sistema de filtrado de entrada de agua a la red general es correcto y constante de acuerdo con lo previsto en la norma *UNE-EN 13443-1:2003+A1:2009. Equipo de acondicionamiento del agua en el interior de los edificios. Filtros mecánicos. Parte 1: Partículas de dimensiones comprendidas entre 80 μm y 150 μm . Requisitos de funcionamiento, seguridad y ensayo.*

Por lo tanto, los criterios fijados:

- Instalación no hiperclorada entre los 3 y los 12 últimos meses.
- Nivel de cloro en punto final de red entre 0,5 y 1 ppm de CLR.
- Posible existencia de ETAP y filtrado previo.

- Temperatura en acumulador 60°C.
- Conductividad del agua entre 1000 y 1300 μSv .
- Longitud del circuito inferior a 50 m.
- Material de las conducciones, cobre o PVC.
- pH del agua entre 7,6 y 7,8.
- Tamaño del acumulador entre 750 L y 1 m³.

Las temperaturas de los puntos terminales en ambos grupos se encontraban en el ACS en torno a 60 °C y en el ACFH por debajo de 25 °C.

En ambos grupos se mide en todas las instalaciones el poder de recidiva de la proliferación bacteriana, partiendo de una situación de 0 UFC tras la hipercloración anual, realizándose al menos dos muestreos más datados entre los 3 meses y los 12 meses siguientes.

2.2.- Estudio estadístico:

Para el análisis estadístico descriptivo de la muestra se han empleado los métodos descriptivos básicos, de modo que, para las variables cualitativas, se ha obtenido el número de casos presentes en cada categoría y el porcentaje correspondiente.

La comparación entre grupos en las variables cualitativas se realizó mediante la prueba Chi-Cuadrado de Pearson. En los casos en los que la prueba resultó significativa y alguna de las variables no fuera dicotómica, se realizaron las comparaciones dos a dos con ajuste de Bonferroni para determinar entre qué grupos se muestran las diferencias.

La regresión logística se empleó para determinar la influencia del tipo de instalación (tipo A: nivel *oscilante* de cloro libre residual y tipo B: nivel *estable* de cloro libre residual) en el resultado positivo de la prueba del análisis de *Legionella*.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 27.0 para Windows (BM Corp., 2022; Field, 2018; Green y Salkind ,2016; Pallant., 2020; Kinnear y Gray., 2010; Norušis., 2012; Bryman y Cramer.,2011). Las diferencias consideradas estadísticamente significativas son aquellas cuya $p < 0,05$.

Sesgo del estudio: Son instalaciones muy bien estructuradas en general puesto que casi todas ellas albergan usuarios de riesgo.

3.- RESULTADOS:

3.1.- Análisis descriptivo general de la prevalencia de *Legionella* en instalaciones de riesgo:

Se realizó un estudio descriptivo previo para valorar la prevalencia de *Legionella* spp. El universo muestral del estudio se constituyó con 2778 muestras ambientales recogidas en dos años consecutivos en el sureste de España (provincias de Alicante, Murcia y Albacete) de las cuales un 9,9% (n = 2778) resultaron positivas y un 90,1% (n = 2503) negativas. Tres muestras se descartaron por diversas circunstancias.

En la tabla 3 se muestra la estadística descriptiva de las variables según la procedencia (agua caliente o agua fría). Se observa que se han recogido más muestras de agua fría de consumo humano, puesto que el estudio trata de valorar la influencia de la aplicación estable o inestable de biocida que siempre se aplica en los circuitos de agua fría.

Tabla 3. Análisis descriptivo. Desglose de la procedencia de las muestras entre los circuitos de ACS y de AFCH

Agua	n	%
AFCH	1674	60,3
ACS	1101	39,7

En la figura 31 se reflejan los resultados de positivos y negativos de muestras ambientales procedentes de ACS y de AFCH. Se observa como sistemas de ACS tienen un nivel de positividad superior al de los circuitos de AFCH.

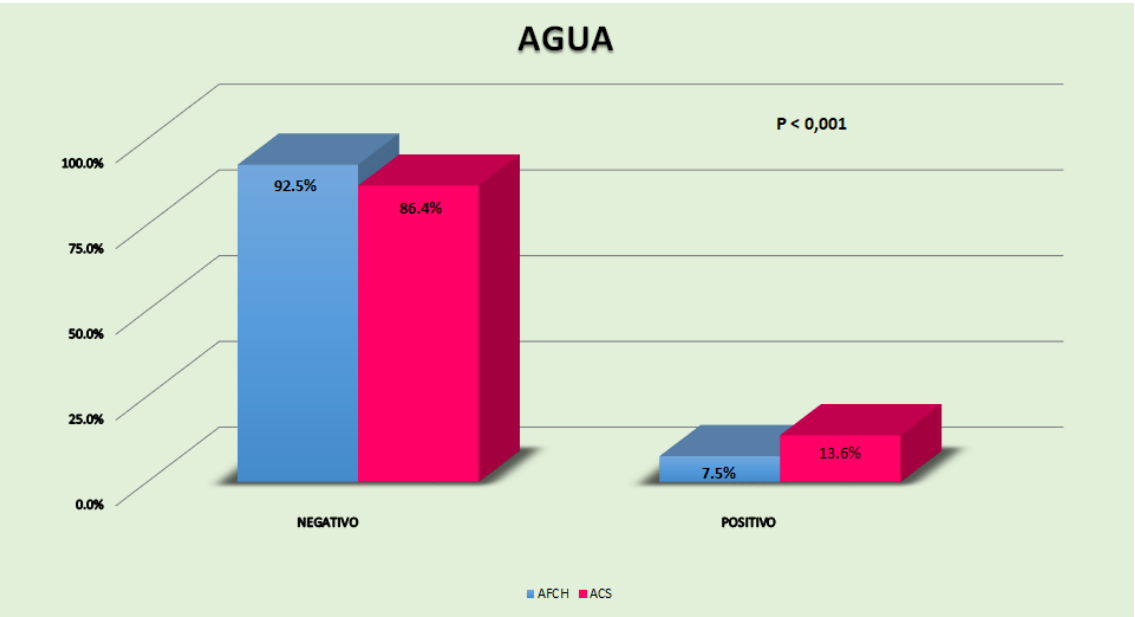


Figura 31: Positividad a *Legionella* spp. en muestras ambientales procedentes de ACS y de AFCH. Fuente: Autor.

En la tabla 4 se muestra la estadística descriptiva de los resultados positivos de muestras ambientales en *L. pneumophila* desglosados en el serogrupo 1 y el serogrupo 2-14. Se aprecia que el serogrupo 1 es mayoritario en las muestras correspondientes a esa especie.

Tabla 4. Análisis descriptivo en función del serogrupo obtenido en el resultado.

Serogrupo	n	%
ser. 1	177	68,3
ser. 2-14	82	31,7

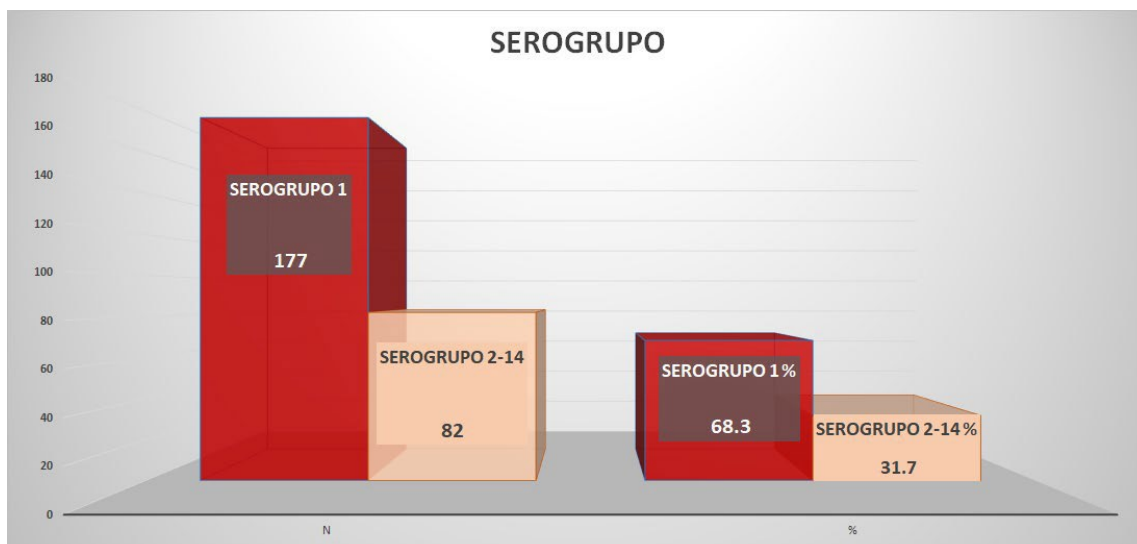


Figura 32: Recreación gráfica de los resultados del estudio desglosados por serogrupos 1 y 2-14 de *Legionella pneumophila*. Fuente: Autor.

En el estudio se desglosó la procedencia de las muestras en función del mes del año en que han sido recogidas. Este dato no tiene mayor relevancia puesto que no refleja más que la procedencia de la muestra en el mes correspondiente.

Tabla 5. Análisis descriptivo. Número y porcentaje de muestras recogidas en cada mes del año.

Mes	n	%
Enero	149	5,4
Febrero	169	6,1
Marzo	262	9,4
Abril	226	8,1
Mayo	244	8,8
Junio	277	10
Julio	196	7,1
Agosto	276	9,9
Septiembre	376	13,5
Octubre	196	7,1
Noviembre	198	7,1
Diciembre	210	7,6

A continuación, se describe la procedencia de la muestra en función de los diferentes tipos de instalaciones chequeadas hasta un total de 17

procedencias diferentes. Se tomó una procedencia muy variada de las muestras ambientales, al objeto de diversificar lo máximo posible las variables que influyen en la positividad del resultado.

No obstante, esto no resulta del todo práctico a la hora de alcanzar los objetivos marcados en el estudio, puesto que suponen demasiadas variables y algunas tienen poca entidad, por lo que resultó más práctico agruparlas en función de si el agua procede de circuitos de agua sanitaria o de equipos que producen humectación o aerosolización.

Tabla 6. Análisis descriptivo en función de tipo de instalación de procedencia de la muestra.

Tipo	n	%
Aporte	31	1,1
Condensador	32	1,2
Depósito AFCH	248	8,9
Depósito ACS	298	10,7
Depósito incendio	1	0
Equipo de humectación	16	0,6
Fuentes ornamentales	97	3,5
Jacuzzi	130	4,7
Otro	8	0,3
Piscina	113	4,1
Punto terminal ACS	621	22,3
Punto terminal AFCH	1063	38,3
Sistema contra incendios	15	0,5
Sistema de lavado	1	0
Sistema de riego	67	2,4
Torre	21	0,8
Lavaojos	17	0,6

Una vez se realizó un estudio descriptivo objetivo de la procedencia de las muestras, se procedió a realizar un estudio comparativo de las variables relacionadas con las características de los puntos de muestreo, así como los resultados de las pruebas Chi-cuadrado realizadas para comparar dichas variables según el resultado de la prueba.

En la tabla 7 se observa que el porcentaje de positivos en los puntos de agua caliente (13,6%) fue significativamente superior a los de agua fría (7,5%).

Tabla 7. Análisis descriptivo y comparativo del resultado de la prueba según la procedencia de ACS o de AFCH.

	Resultado, <i>n</i> (%)		Prueba Chi-cuadrado	
	Negativo	Positivo	χ^2 (g.l)	<i>p</i> -valor
AGUA			28,14(1)	< 0,001
AFCH	1548 (92,5)	125 (7,5)		
ACS	951 (86,4)	150 (13,6)		

Para su estudio comparativo, las instalaciones se dividieron en dos grupos en función de su procedencia, si se trata de agua sanitaria o si se trata de instalaciones orientadas a la refrigeración/humectación, y, según se describe en la tabla 8, no se observó asociación entre el tipo de instalación y el resultado en estos dos grupos.

Tabla 8. Análisis descriptivo y comparativo del resultado de la prueba de muestras procedentes de agua sanitaria o de equipos de enfriamiento y humectación.

	Resultado, <i>n</i> (%)		Prueba Chi-cuadrado	
	Negativo	Positivo	χ^2 (g.l)	<i>p</i> -valor
Tipo			0,27 (1)	0,6
Consumo humano	2436(90,2)	266 (9,8)		
Refrigeración/ humectación	60 (88,2)	8 (11,8)		

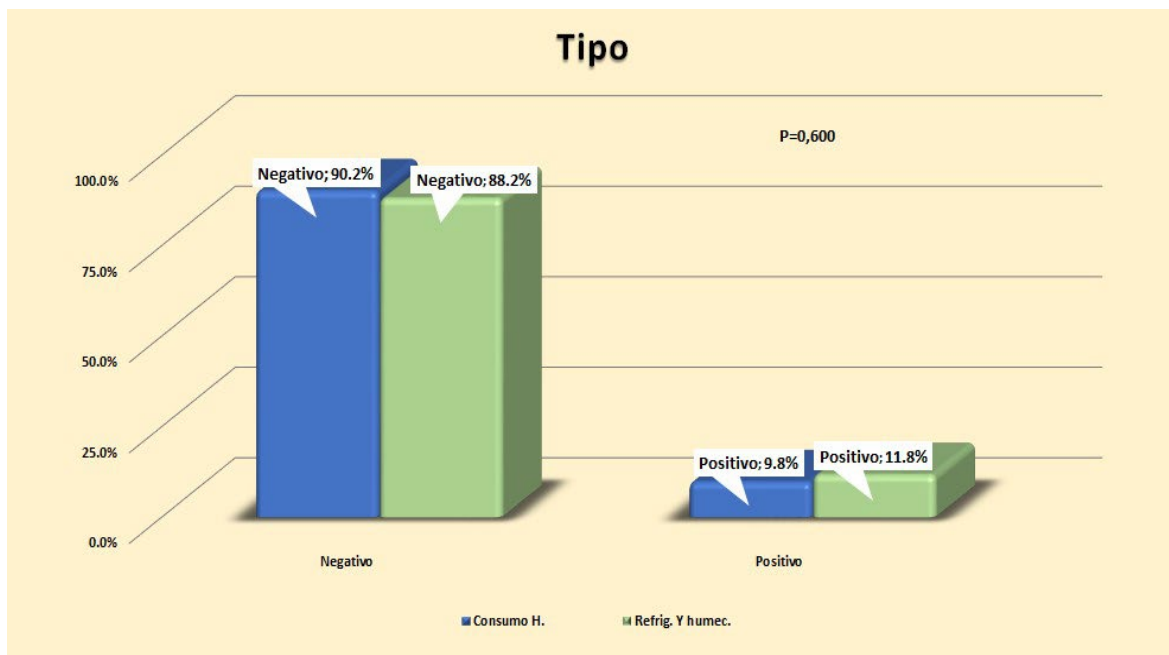


Figura 33: Recreación gráfica de los resultados del estudio desglosados por instalación de procedencia, equipos de refrigeración y humectación y agua de consumo humano. Fuente: Autor.

A continuación, se realizó un estudio descriptivo que comparó los resultados positivos de las muestras ambientales en los almacenes de agua caliente sanitaria (acumuladores), los almacenes de agua fría de consumo humano (depósitos), los puntos finales de red en agua caliente y los puntos finales de red en agua fría.

Se observa según lo descrito en la tabla 9 que:

Comparando las unidades almacenadoras de agua entre sí:

El número de muestras positivas en los almacenes de agua fría AFCH (5,5%) fue significativamente inferior al de los almacenes de agua caliente sanitaria de ACS (15,7%).

Comparando la procedencia de las muestras de agua fría:

Observamos que el número de muestras positivas en almacenes de agua fría (depósito o ETAP) (5,5%) fue significativamente inferior que las muestras procedentes de puntos finales de red de agua fría PTAFCCH (11,8%).

Comparando la procedencia de las muestras de ACS:

En este caso la situación es inversa, y el porcentaje de muestras ambientales positivas fue significativamente inferior en los puntos terminales de agua caliente sanitaria PTACS (8,3%) con respecto a las que proceden de los almacenes de ACS (15,7%).

Tabla 9. Análisis descriptivo y comparativo del resultado de la prueba según instalación de procedencia, almacenes de ACS, almacenes de agua fría, puntos terminales de red de ACS y puntos terminales de red de AFCH.

	Resultado, n (%)		Prueba Chi-cuadrado	
	Negativo	Positivo	χ^2 (g.l)	p-valor
Consumo humano			29,6	< 0,001
AFCH	342 (94,5)	20 (5,5)		
ACS	361 (84,3)	67 (15,7)		
PTAFCH	548 (88,2)	73 (11,8)		
PTACS	1168 (91,7)	106 (8,3)		

La figura 34 recrea gráficamente los resultados del estudio desglosados por instalación de procedencia.

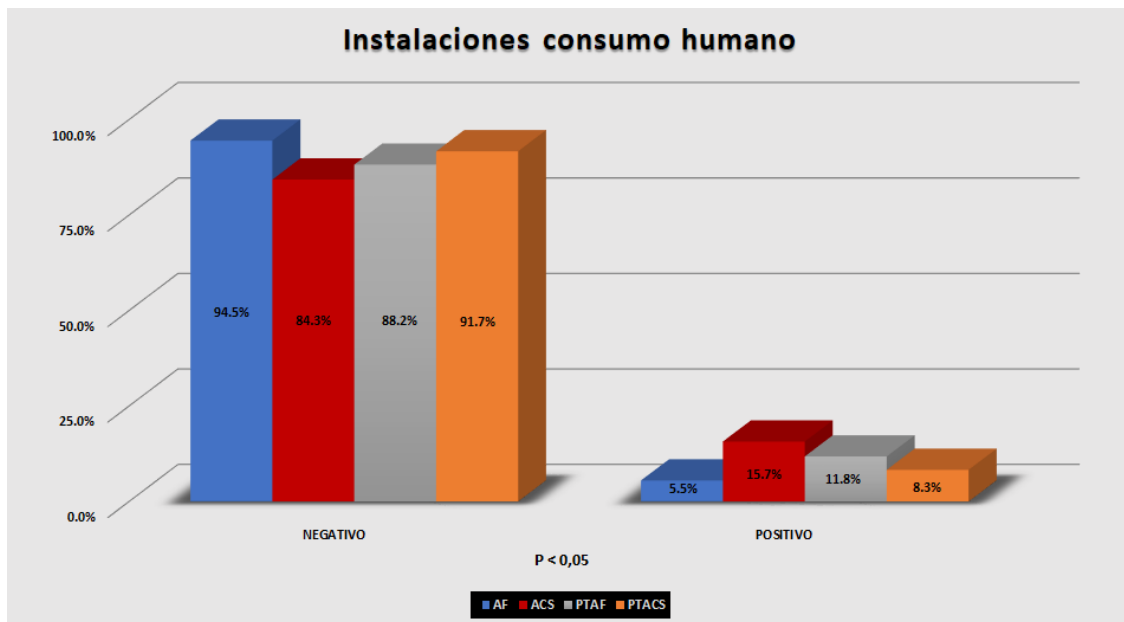


Figura 34: Recreación gráfica de los resultados del estudio desglosados por instalación de procedencia, almacenes de ACS, almacenes de agua fría, puntos terminales de red de ACS y puntos terminales de red de AFCH. Fuente: Autor.

Para determinar la posible influencia ambiental en la aparición de resultados positivos, se dividieron los meses en tres periodos térmicos.

Periodo frío: Meses de octubre, noviembre, diciembre y enero.

Periodo templado: Meses de febrero, marzo, abril y mayo.

Periodo caliente: Meses de junio, julio, agosto y septiembre.

El porcentaje de resultados positivos en el periodo templado fue superior al de los otros periodos, no mostrándose diferencias entre los periodos frío y caliente.

En la Tabla 10 se muestra el análisis descriptivo y el comparativo.

Tabla 10. Análisis descriptivo y comparativo del resultado de la prueba según periodo térmico en el que se toman las muestras.

	Resultado, n (%)		Prueba Chi-cuadrado	
	Negativo	Positivo	$\chi^2(g.l)$	p-valor
Periodo térmico			10,68 (2)	0,005
Frío	684 (91)	68 (9)		
Templado	788 (87,5)	113 (12,5)		
Caliente	1031 (91,6)	94 (8,4)		

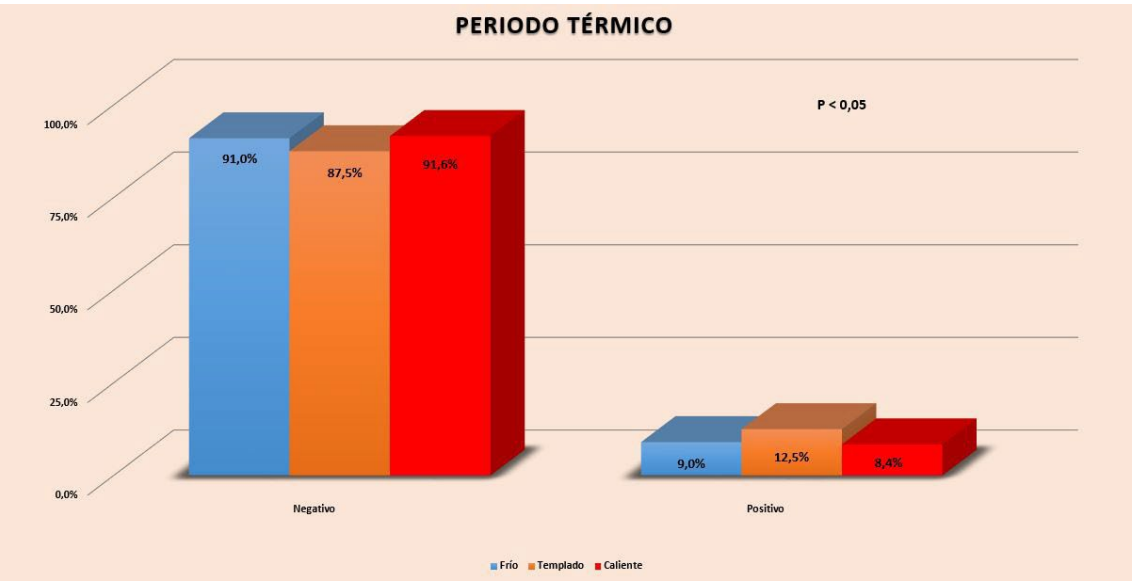


Figura 35: Recreación gráfica de los resultados del estudio desglosados por periodo térmico en el que fueron tomadas. Fuente: Autor.

En cuanto al nivel de biocida – CLR-, se observa que las instalaciones con un nivel de CLR inferior a 0,5 ppm (mg/L) tienen un mayor porcentaje de positivos (12,5%) que las instalaciones con un nivel de biocida , CLR superior a 0,5 ppm (mg/L).

En la Tabla 11 se muestra el análisis descriptivo y el comparativo.

Tabla 11. Descriptivo y comparativo del resultado de la prueba según el nivel de biocida cloro libre residual de la instalación de procedencia de las muestras.

	Resultado, n (%)		Prueba Chi-cuadrado	
	Negativo	Positivo	χ^2 (g.l)	p-valor
Cloro			21,39 (1)	< 0,001
< 0.5	1155 (87,5)	165 (12,5)		
≥ 0.5	1042 (93,1)	77 (6,9)		

La figura 36 recrea lo descrito en la tabla 11.

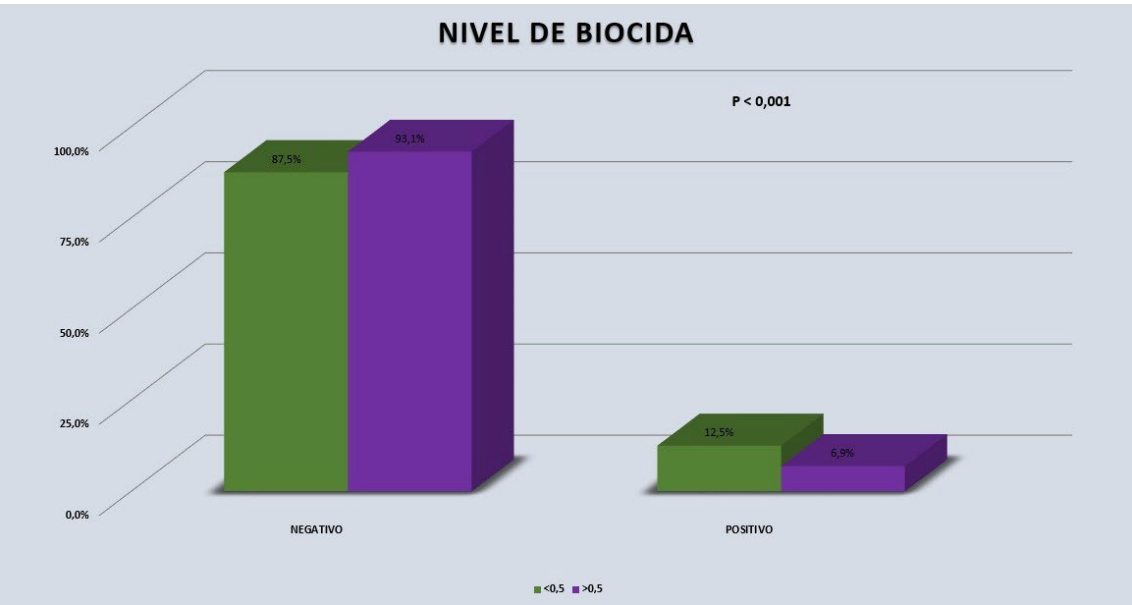


Figura 36: Recreación gráfica de los resultados del estudio desglosados por procedencia de la instalación con cloración estable e inestable. Fuente: Autor.

Otro factor a tener en cuenta en la valoración de la procedencia de las muestras positivas es la temperatura del agua.

Las instalaciones con una temperatura entre los 20°C y 50°C tienen un mayor porcentaje de positivos con respecto a las instalaciones con una temperatura inferior a 20°C y a las que tienen una temperatura superior a 50°C.

Las instalaciones con temperatura inferior a 20°C y las de temperatura superior a 50°C no muestran diferencias significativas.

Tabla 12. Descriptivo y comparativo del resultado de la prueba según temperatura del agua de la instalación de donde procede la muestra.

	Resultado, n (%)		Prueba Chi-cuadrado	
	Negativo	Positivo	χ^2 (g.l)	p-valor
Temperatura			6,96 (2)	0,031
< 20°C	16 (88,9)	2 (11,1) b		
20°C-50°C	288 (82,5)	61 (17,5) a		
>= 50°C	624 (88,4)	82 (11,6) b		

a, b. Comparaciones dos a dos. Entre dos grupos, si no comparten alguna letra indica diferencias estadísticamente significativas (ajuste de Bonferroni)

La figura 37 reproduce mediante gráfico lo expresado en la tabla 12.

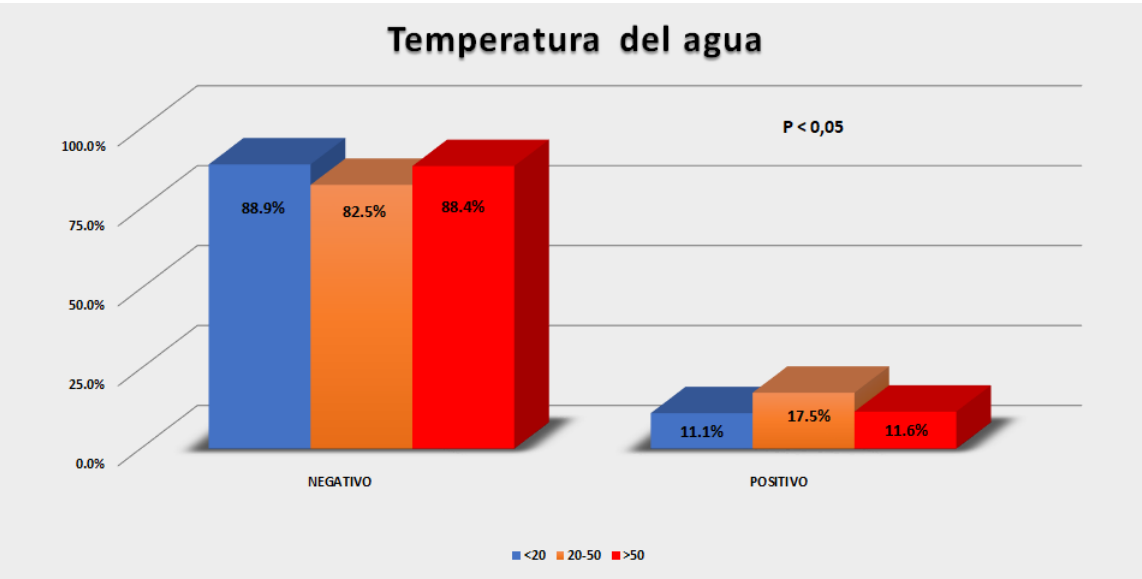


Figura 37: Recreación gráfica de los resultados del estudio desglosados por procedencia de la instalación en función de la temperatura de esta. Fuente: Autor.

En el estudio descriptivo se cuantificó la presencia de los diversos serogrupos de *L. pneumophila* tanto en el AFCH como en el ACS. Los resultados aparecen reflejados en las tablas 13 y 14. Se observa que el serogrupo 1 de *L. pneumophila* es mayoritario en todos los rangos de UFC excepto en el rango de > 10000 UFC, donde es mayoritario el serogrupo 2-14.

Tabla 13. Prevalencia de serogrupos de *L. pneumophila* en las muestras positivas de AFCH.

AFCH			
CANTIDAD	SER 1	SER 2-14	OTRAS ESPECIES
1-100 UFC	33	23	6
101-500 UFC	24	6	1
501- 1000 UFC	6	2	0
1001-10000 UFC	16	3	0
>10000 UFC	2	3	0
TOTAL	81	37	7

Tabla 14. Prevalencia de serogrupos de *L. pneumophila* en las muestras positivas de ACS.

ACS			
CANTIDAD	SER 1	SER 2-14	OTRAS ESPECIES
1-100 UFC	38	13	4
101-500 UFC	29	8	0
501- 1000 UFC	6	6	1
1001-10000 UFC	17	8	0
>10000 UFC	6	9	0
TOTAL	96	44	5

3.2.- Efectividad de los tratamientos de desinfección en instalaciones de agua de consumo humano:

INSTALACIONES CON SISTEMAS DE ACS EVALUADOS:

De acuerdo con el planteamiento estadístico del estudio dividiendo las instalaciones en dos grupos diferentes, descritos con antelación, se muestra a continuación, el resultado del estudio estadístico descriptivo y el comparativo de los resultados de las muestras ambientales de *Legionella* spp. en las instalaciones de agua caliente según su tipología:

Grupo A (nivel *oscilante* de Cloro libre residual).

Grupo B (nivel *estable* de Cloro libre residual).

La prueba Chi-cuadrado evidenció que el porcentaje de positivos fue significativamente superior en las instalaciones de tipo A (37,7% que en las de tipo B (7,7%) en las instalaciones de ACS.

Las instalaciones pertenecientes al grupo A tienen 7,27 veces más probabilidad de tener un resultado positivo que las de tipo B (OR = 7,27, IC95%: 2,5-21,16, $p < 0,001$) como puede apreciarse en la tabla 15.

Tabla 15. Estudio descriptivo y comparativo del resultado de la prueba según la procedencia de los resultados de grupo A o grupo B, de las instalaciones de ACS.

	Grupo, n (%)		Prueba Chi-cuadrado	
	A	B	$\chi^2(1)$	p-valor
Resultado			28,14	< 0,001
Negativo	33 (62,3)	60 (92,3)		
Positivo	20 (37,7)	5 (7,7)		

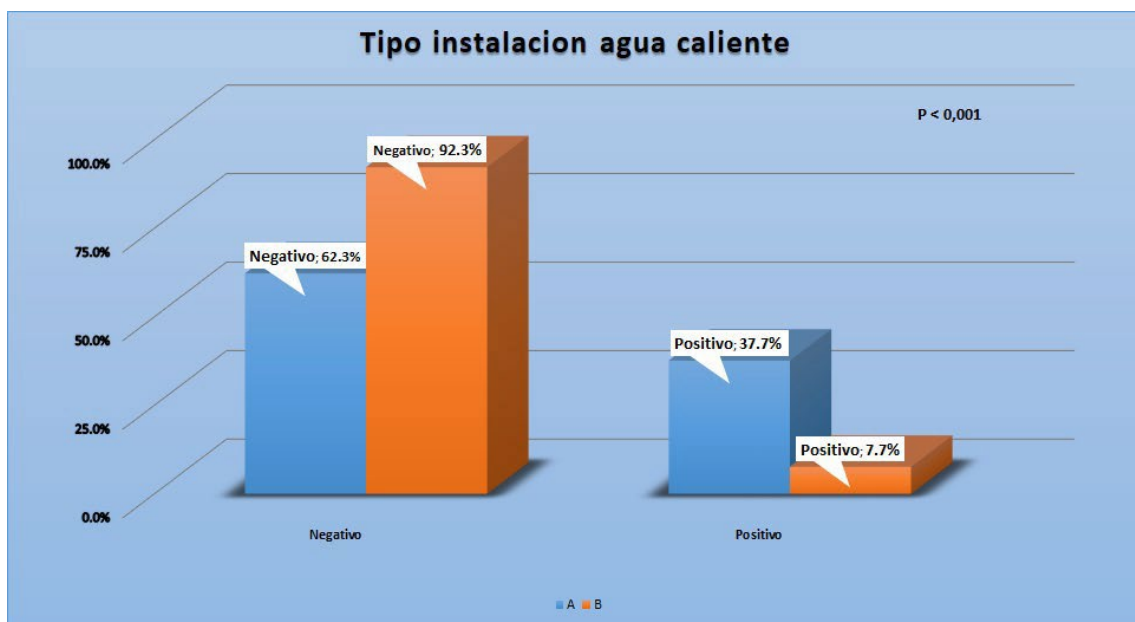


Figura 38: Recreación gráfica de los resultados del estudio desglosados por procedencia de la instalación de ACS en función del grupo al que pertenece o B. Fuente: Autor.

En cuanto al serogrupo identificado de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 o serogrupo 2-14, no se observó asociación entre este y la procedencia de la instalación de agua caliente en el grupo A o en el grupo B, según describe la tabla 16.

Tabla 16. Estudio descriptivo y comparativo del serogrupo según la procedencia de la instalación de ACS en el grupo A o en el grupo B.

	Grupo, n (%)		Prueba Chi-cuadrado	
	A	B	$\chi^2(1)$	p-valor
Serogrupo			0,877	0,562 [†]
ser. 1	4 (20)	2 (40)		
ser. 2-14	16 (80)	3 (60)		

[†]Prueba exacta de Fisher

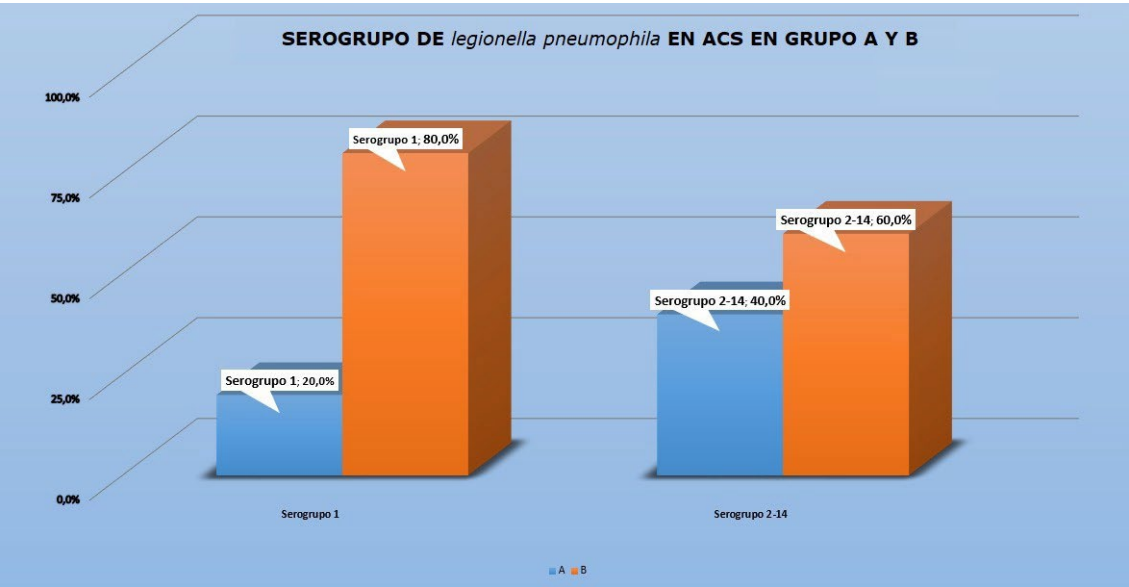


Figura 39: Recreación gráfica del estudio descriptivo y comparativo del serogrupo según la procedencia de la instalación de ACS en el grupo A o en el grupo B. Fuente: Autor.

INSTALACIONES CON SISTEMAS DE AFCH EVALUADOS:

En segundo lugar, se evaluaron en las instalaciones los sistemas de agua fría de consumo humano.

La prueba Chi-cuadrado evidenció que el porcentaje de muestras ambientales positivas fue significativamente superior en las instalaciones procedentes del grupo A (32,1%) que en las instalaciones procedentes del grupo B (6,1%).

Las instalaciones pertenecientes al grupo A tienen 7,34 veces más probabilidad de tener un resultado positivo que las pertenecientes al grupo B (OR = 7,34, IC95%: 2,31 – 23,33, $p < 0,001$).

Tabla 17. Estudio descriptivo y comparativo del resultado de la prueba según la procedencia de los resultados de grupo A o grupo B, de las instalaciones de AFCH.

	Grupo, n (%)		Prueba Chi-cuadrado	
	A	B	$\chi^2(1)$	p-valor
Resultado			13,94	< 0,001
Negativo	38 (67,9)	62 (93,9)		
Positivo	18 (32,1)	4 (6,1)		

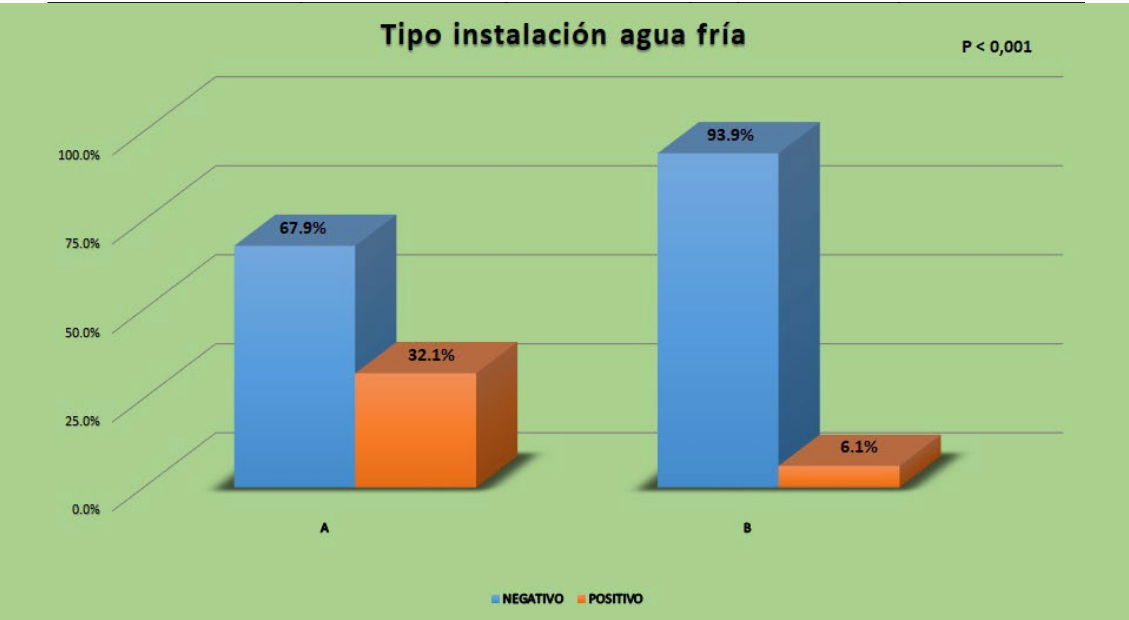


Figura 40: Recreación gráfica de los resultados del estudio desglosados por procedencia de la instalación de AFCH en función del grupo al que pertenece o B. Fuente: Autor.

En cuanto al serogrupo identificado de *Legionella pneumophila* serogrupo 1 o serogrupo 2-14, no se observó asociación entre este y la procedencia de la instalación de AFCH en el grupo A o en el grupo B.

Tabla 18. Estudio descriptivo y comparativo del serogrupo según la procedencia de la instalación de AFCH en el grupo A o en el grupo B.

	Grupo, n (%)		Prueba Chi-cuadrado	
	A	B	$\chi^2(1)$	p-valor
Serogrupo			0,014	1 [†]
ser. 1	14 (77,8)	3 (75)		
ser. 2-14	4 (22)	1 (25)		

[†]Prueba exacta de Fisher

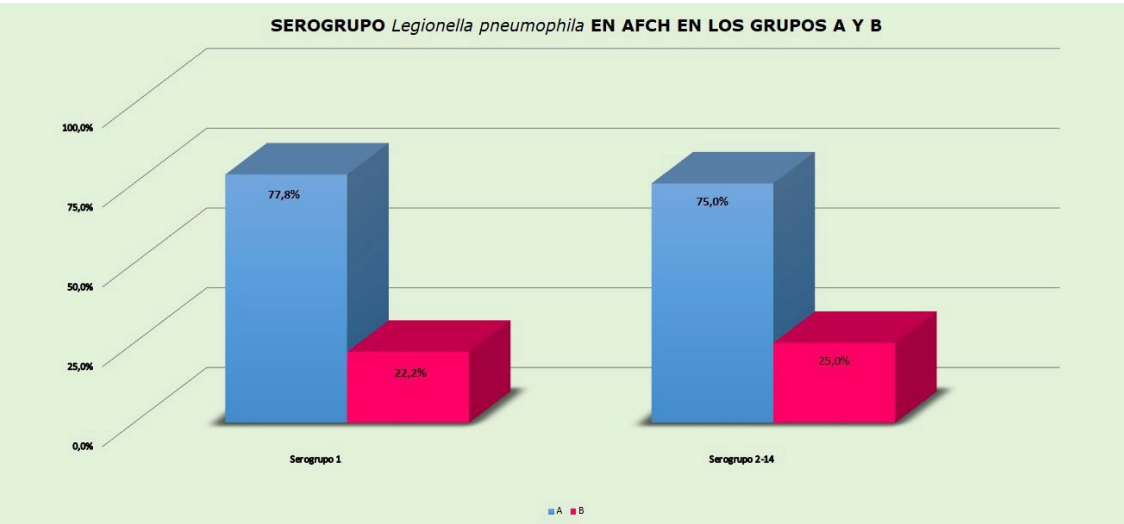


Figura 41: Recreación gráfica del estudio descriptivo y comparativo del serogrupo según la procedencia de la instalación de AFCH en el grupo A o en el grupo B. Fuente: Autor.

4.- DISCUSIÓN:

La prevalencia global de *Legionella* en circuitos de agua de consumo humano ha sido objeto de estudio durante años tanto en España como en el resto del mundo.

Un estudio de prevalencia global de *Legionella* en muestras de agua de consumo humano a nivel mundial entre 1983 y 2017, determinó que dicha prevalencia fue del 20% (IC 95%: 15-25) siguiendo el método de revisión sistemática y meta-análisis (Fakhri *et al.*, 2019).

En otras investigaciones realizadas en países europeos de nuestro entorno que han sido solamente revisiones, los resultados obtenidos ofrecen algunas discrepancias, pero en general indican una presencia ubicua de esta bacteria en aguas de consumo humano, en los siguientes porcentajes:

Prevalencia inferior al 37% en el sur de Italia durante el periodo entre 2001 y 2017 y del 21,4% en aguas subterráneas procedentes de pozos (De Giglio *et al.*, 2019).

Prevalencia cercana al 20,07% en el sur de Alemania en 2017 (Dilger *et al.*, 2018).

Prevalencia superior al 17% obtenido en hoteles de Israel entre 2015 y 2017 (Yakunin *et al.*, 2020).

Prevalencia del 36,8% de las muestras analizadas en residencias de ancianos italianas (De Filippis *et al.*, 2018).

Prevalencia del 6% de las duchas en hogares del Reino Unido, y asociación de la colonización del punto final de red testado (ducha) con la duración y frecuencia de uso de esta (Collins *et al.*, 2017).

Este dato ha quedado perfectamente descrito e identificado a lo largo de los años. En 1993 se detecta una concentración de *Legionella* de $1,5 \times 10^4$ UFC/L en puntos finales de red de agua de consumo humano (Mühlenberg, 1993).

En la investigación previa realizada en este trabajo se obtiene una prevalencia de 9,9% en el total de las muestras, siendo del 13,6% en ACS y el 7,5% en AFCH. La prevalencia detectada resulta inferior a los estudios referidos y esto se debe a dos circunstancias. En primer lugar, el estudio

realizado en este trabajo es posterior en el tiempo a los descritos anteriormente y refleja el hecho de que la prevención de *Legionella* avanza de forma explícita cada año, y en segundo lugar las instalaciones analizadas siguen programas de mantenimiento detallados.

L. pneumophila ha sido la especie más aislada en las instalaciones de agua de consumo en España (Viñuela *et al.*, 2022), lo cual concuerda totalmente con los resultados obtenidos en este estudio donde esa especie aparece como abrumadoramente mayoritaria tanto en ACS como en AFCH.

En cuanto los diferentes serogrupos detectados de *L. pneumophila* encontramos las siguientes aportaciones:

Legionella pneumophila serogrupo 1 es el que más se relaciona con la aparición de brotes de legionelosis en el hombre, ya que aparece en el 85% de los casos, seguido de los serogrupos 4 y 6, si bien con un sesgo estadístico elevado porque se utiliza para su diagnóstico la prueba UAT que solo detecta este serogrupo (Gómez Valero *et al.*, 2009).

La cepa del serogrupo 1 causa aproximadamente el 90% de los casos de legionelosis por *L. pneumophila* en Europa y EE. UU. (Iliadi *et al.*, 2022) y es mayoritario en todos los resultados encontrados en los muestreos realizados.

En este estudio se observa, que dentro de los resultados positivos obtenidos en *L. pneumophila*, el serogrupo 1 es mayoritario en todos, estableciendo una prevalencia en AFCH 64,8% para el serogrupo 1 y de 29,6% para el serogrupo 2-14 mientras que para el ACS estos mismos datos son 66,2% para el serogrupo 1 y 30,3% para el serogrupo 2-14, lo cual expresa que la temperatura del agua no determina en ningún caso la prevalencia de unos serogrupos sobre otros. Incluso la proporción en otras especies de *Legionella* la prevalencia en ACS y AFCH es muy similar.

Posteriormente en el estudio específico no se observó asociación entre el serogrupo identificado, *Legionella pneumophila* serogrupo 1 o serogrupo 2-14, y la procedencia de la instalación del grupo A o del grupo B, tanto en ACS como en AFCH.

Por lo tanto, en este estudio existe igualmente concordancia entre los resultados obtenidos y lo descrito por la literatura científica citada.

Cabe destacar que, en los resultados muy elevados, por encima de 10000 UFC/L, es el serogrupo 2-14 el que cobra más fuerza, tanto en ACS como en AFCH.

De esta circunstancia puede deducirse que cuando las condiciones de ambientales para proliferación de la bacteria son muy favorables, el serogrupo 1 es dominante, pero cuando esas mismas condiciones son aún más ventajosas, el serogrupo 2-14 toma la iniciativa rebasando al serogrupo 1.

En la literatura científica encontramos que, *Legionella pneumophila* produce un tensioactivo, que resulta tóxico para otras especies de *Legionella*, e impide su acceso y crecimiento en los biofilms (Geesey *et al.*, 2000). Podría ocurrir en este caso a tenor de los resultados obtenidos que el serogrupo 2-14 impidiese igualmente la proliferación del serogrupo 1 ante condiciones ambientales extraordinariamente favorables o bien que el serogrupo 2-14 tenga más capacidad de multiplicación y esta se desarrolla exponencialmente ante las citadas condiciones ambientales favorables, adelantando la ratio de multiplicación del serogrupo 1.

Abundando aún más sobre este dato, es importante destacar que esta situación se produce tanto en ACS como en AFCH (tabla 13 y tabla 14) y la proporción de superación del serogrupo 2-14 sobre el serogrupo 1 en ese rango elevado es de 3 a 2.

En cuanto a la temperatura de proliferación de la bacteria *Legionella* en las muestras de ACS, Gavaldá (2016) realiza una evaluación del efecto de la temperatura, exclusivamente sobre la proliferación de la bacteria *Legionella* en los circuitos que transportan agua caliente, poniendo de manifiesto en sus conclusiones que la temperatura en los puntos finales de red de los circuitos de agua caliente sanitaria es más segura si es superior a los 50°C que marca la legislación (sugiere que en el entorno de los 55° C preferentemente), al objeto de prevenir la amplificación de la bacteria. Añade además que en el entorno hospitalario que investiga preferentemente, los tratamientos térmicos se perfilan como incompletos para garantizar la inocuidad de los circuitos.

Por otra parte, otro estudio concluye que la presencia de *Legionella* spp. en sistemas de ACS en edificios con paneles de energía solar térmica es significativa y está asociada con la oscilación de la temperatura, por lo que requieren un suplemento energético que estabilice dicha temperatura (Totaro *et al.*, 2020).

Mantener la temperatura entre 20°C y 50°C, favorece el crecimiento de *Legionella* spp. (Bartram *et al.*, 2020). Para prevenir su crecimiento, se propone mantener 60°C en los tanques de almacenamiento y asegurar que el agua que llega a los grifos esté al menos a 50°C (Borella *et al.*, 2021).

Los protocolos de desinfección térmica, incluido el precalentamiento del tanque a 60 °C durante 30 minutos antes de aplicar un choque térmico a los puntos finales de red, redujeron eficazmente las concentraciones de *Legionella* (Hayes-Phillips *et al.*, 2019)

En este estudio, los resultados obtenidos por el autor ofrecen una mayor positividad en los circuitos de ACS que mantienen un rango de temperatura entre 20°C y 50°C, lo cual no refleja discrepancias con los autores citados.

En cuanto a la influencia de la época del año en la que se han realizado los muestreos, se ha observado que la legionelosis es más común durante el verano y principios del otoño, debido a las condiciones ambientales que favorecen el crecimiento y la diseminación de la bacteria (Graham *et al.*, 2023) y además se ha producido un sensible incremento en la notificación de casos de legionelosis tanto en Europa como en EE. UU., posiblemente debido al cambio climático con el consiguiente aumento de la temperatura, que desarrolla condiciones climáticas cálidas y húmedas que facilitan el crecimiento y la propagación de bacterias *Legionella* (Centro Nacional de Epidemiología, 2023).

En este estudio se observa que en los muestreos realizados en la época primaveral de febrero a junio se incrementan los positivos de muestras ambientales de *Legionella* lo que podría traducirse en un incremento de la casuística de enfermos por legionelosis descrita por los autores anteriores.

En cuanto al nivel de CLR detectado en los muestreos y por ende de las instalaciones testadas, podemos destacar en la literatura científica que la desinfección es más efectiva cuando el nivel de CLR se mantiene con

adiciones regulares de cloro, en comparación con aplicar una sola vez una dosis más amplia (Martin *et al.*, 2020), mientras que La OMS recomienda una concentración de 0,5 mg/L de cloro libre para inactivar contaminantes microbianos y prevenir el rebrote microbiano (Zholdakova *et al.*, 2019).

A tenor de los resultados obtenidos en este estudio, se observa en el estudio descriptivo que cuando las instalaciones tienen un nivel de CLR menor de 0,5 ppm los resultados positivos tanto en circuitos de ACS como en circuitos de AFCH son del 12,5%, mientras que en las instalaciones con un nivel de CLR superior a 0,5 ppm las muestras positivas descienden hasta el 6,9%.

Podemos afirmar entonces que seguir la recomendación de OMS en este punto parece una buena opción a efectos de mejorar la prevención del *Legionella*.

En cuanto al estudio efectividad podemos hacer las siguientes valoraciones:

La norma UNE 100030:2023. *Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de Legionella en instalaciones*, pone el énfasis en la concentración de biocida y en el tiempo de contacto de este en las desinfecciones anuales por elevación de la concentración de biocida.

El Real Decreto 487/2022 en el anexo IV, nos indica que la revisión, la limpieza y desinfección de toda la instalación se efectuará al menos una vez al año, sin superar los 12 meses entre una desinfección y la siguiente. No entra a especificar ningún tipo de desinfectante concreto dentro de los autorizados para su uso en el agua de consumo humano, pero sí establece dentro de los libros de mantenimiento correspondientes al PPCL, una limpieza y desinfección de las instalaciones para la prevención de la presencia de *Legionella* por elevación de biocida (mínimo anualmente).

Esta exigencia se ha mantenido desde la promulgación de la primera disposición legal en el año 2001. Pese a ello, se observa que, tras estos tratamientos (siendo los más habituales las hipercloraciones y las elevaciones de temperatura) se producen posteriores recontaminaciones, además de incrementar los fenómenos de corrosión en los sistemas de distribución de agua.

Estos tratamientos descritos por elevación puntual del nivel de biocida, no producen un efecto de desinfección prolongado en el tiempo, sino que generan un ecosistema que favorece la proliferación de *Legionella*, especialmente en el caso de que existan *biofilms* en las redes de distribución de agua, que se generan a partir de depósitos orgánicos y minerales y con gran presencia de carbono, además de albergar una población microbiana diversa en los que la bacteria se encuentra protegida, por el escaso efecto de la desinfección dentro de estos *biofilms*.

Las observaciones demuestran que las elevaciones puntuales del nivel de biocida no son tan eficaces en un plazo corto y mucho menos medio o largo, y frecuentemente no cubren el objetivo de disminuir la carga bacteriana de la red de abastecimiento en el año natural para el que están previstas.

En base a esto podemos valorar que la prevalencia de la bacteria en las instalaciones se puede considerar importante, aunque estén cumpliendo estrictamente las prerrogativas legales establecidas.

En el caso particular de las desinfecciones térmicas en los circuitos de ACS, que en muchas instalaciones se realizan opcionalmente con carácter preventivo con periodicidad mensual o inferior, es evidente que presentan problemas en su aplicación, pues el mantenimiento estable de la temperatura en los choques térmicos no siempre se consigue, toda vez que la bacteria es capaz de desarrollar procesos enzimáticos y bioquímicos que le permiten ser termorresistente.

En este contexto global, la persistencia de la bacteria en las instalaciones se puede considerar importante, aun estando correctamente mantenidas según los criterios higiénico-sanitarios de la legislación española.

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto que las instalaciones que siguen de manera meticulosa los procedimientos de mantenimiento establecidos según lo descrito en el estudio, encuadradas dentro del grupo B, tienen muchas menos posibilidades de generar resultados positivos en las muestras, tanto en el ACS como en el AFCH en una proporción parecida en ambos, tal y como describe el estudio estadístico.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se podría concluir que mantener un nivel constante y estable de biocida sostenido en el tiempo, además de la filtración, aparecería como elemento clave a la hora de controlar el crecimiento de la bacteria a largo plazo, en detrimento de las desinfecciones anuales por elevación de los niveles de biocida en los circuitos que ofrecen resultados para tiempos reducidos.

El presente estudio presenta algunas limitaciones, ya que es imposible conseguir una homogeneidad absoluta en los tipos de instalaciones sobre todo en cuanto a sinuosidad de los sistemas de conducción y exposición de las instalaciones a agentes ambientales diversos como las horas de luz recibidas en función de la orientación del edificio.

Además, no se puede descartar que los resultados hayan sido condicionados por factores que no se han tenido en consideración, como algunas diferencias estructurales y operativas significativas entre los dos grupos de instalaciones (tamaño, sistemas de calentamiento complementarios, régimen de funcionamiento, operaciones adicionales de mantenimiento, etc.).

Por otra parte, las instalaciones testadas en el estudio han realizado el seguimiento frecuente de los niveles de presencia ambiental de *Legionella* de forma voluntaria porque albergan en su interior personas de riesgo, y se puede afirmar que generalmente son instalaciones bien mantenidas en su estructura y cuyos PPCL son más completos que los de la media de las instalaciones obligadas por la legislación a realizarlos.

5.-CONCLUSIONES:

PRIMERA. - de acuerdo con los resultados observados en este estudio, se puede afirmar que las instalaciones pertenecientes al grupo B han obtenido niveles inferiores de positividad en muestras ambientales con respecto a las pertenecientes al grupo A, a lo largo del periodo establecido, siendo estadísticamente significativa la dependencia entre ambas variables.

SEGUNDA: En la época primaveral el grado de positividad en muestras de *Legionella*, es sensiblemente superior y no existen diferencias significativas ente el periodo estival y el periodo invernal.

TERCERA: El punto final de red como espacio de recogida muestral y punto de control crítico en los sistemas de distribución de agua de consumo humano, se comporta de forma diferente en los circuitos de ACS y en los circuitos de AFCH. El punto final de red en AFCH ofrece un nivel de positividad superior a los depósitos de AFCH mientras que el punto final de red en ACS contrariamente ofrece un nivel de positividad inferior a los almacenes de ACS o acumuladores.

CUARTA: La presencia de los diferentes serotipos de *L. pneumophila* dentro de las muestras positivas, no está relacionada con el grupo al que pertenece la instalación dentro del estudio.

QUINTA: Las instalaciones que tienen mejor condición estructural y siguen más en detalle los libros de mantenimiento, encuadradas todas en el grupo B, resulta evidente que obtienen mejores resultados en cuanto a una positividad inferior, por lo que a partir de los resultados obtenidos se pueden simplificar los libros de mantenimiento correspondientes a los PPCL reduciendo el programa de desinfecciones por elevación de biocida previsto.

6.- BIBLIOGRAFÍA:

- Abdel-Nour M., Duncan C., Low D. E., Guyard C. (2013). Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*. International Journal of Molecular Sciences, 14(11), 21660–21675. <https://doi.org/10.3390/ijms141121660>
- Abu Khweek A. y Amer, A. O. (2018). Factors mediating environmental biofilm formation by *Legionella pneumophila*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 8, 38. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00038>
- Adeyemi, K. (2023). Characterization of *Legionella pneumophila* Effector Proteins, LneB and MavA.
- Allegra S., Berger F., Berthelot P., Grattard F., Pozzetto B., Riffard S. (2008). Use of flow cytometry to monitor *Legionella* viability. Applied and Environmental Microbiology, 74(24), 7813-7816. <https://doi.org/10.1128/aem.01364-08>
- Almeida D. Q., Silva T., Rodrigues V., et al. (2021). Outbreak of legionnaires' disease in the Northern Portuguese Coast During the COVID-19 Pandemic. Acta Medica Portuguesa. <https://doi.org/10.20344/amp.15823>
- Amillategui-Dos-Santos R., Cano Portero R., Sastre-García M., Martín Mesonero C., Soler-Soneira M. (2023). Resultados de la vigilancia de las enfermedades transmisibles notificadas a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) en 2022. Boletín Epidemiológico Semanal, 31(4), 221-225. <https://doi.org/10.4321/s2173-92772023000400001>. Disponible en: Boletín Epidemiológico Semanal
- Anthony A. I. L., Zam Z., Hussin N. (2020). A hospital-based study on the local epidemiology of pneumonia including the contribution of *Legionella pneumophila*. Malaysian Journal of Medical Sciences, 27(6), 79-88. <https://doi.org/10.21315/mjms2020.27.6.8>

- Assaidi A., Ellouali M., Latrache H., et al. (2020). Chlorine disinfection against *Legionella pneumophila* biofilms. *Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development*, 10(6), 885–893._
<https://doi.org/10.2166/washdev.2020.151>
- Australia's notifiable disease status (2015). Annual report of the National Notifiable Diseases Surveillance System. *Commun. Dis. Intell.* 2019, 43.
- AWWA. (2018) Residential fire sprinkler systems guidance for water utilities, Denver, Colorado: AWWA. <https://www.awwa.org/Portals/0/AWWA/ETS/Resources/ResidentialFireSprinklerSystems.pdf>.
- AWWA. (2019) Trending in an Instant. A risk communication guide for water utilities, Denver, Colorado: AWWA.
- AWWA. (2020). Sample utility communications plan. Retrieved from_
<https://www.awwa.org/Policy-Advocacy/CommunicationsOutreach/Public-Communications-Toolkit/Sample-UtilityCommunications-Plan>
- Aydin E., Dicle Y., Tuna D. (2023). A study on the presence of *Legionella pneumophila* in hospital water samples from eastern turkey. *Dicle Medical Journal / Dicle Tip Dergisi*, 50(2), 173-180._
<https://doi.org/10.5798/dicletip.1313238>
- Barrabeig I., Rovira A., Garcia M., et al. (2010). Outbreak of legionnaires' disease associated with a supermarket mist machine. *Epidemiology and Infection*, 138(12), 1823–1828.
<https://doi.org/10.1017/S0950268810000841>
- Bartram J., Chartier Y., Lee J. V., Pond K., Surman-Lee S. (2020). *Legionella* and the prevention of legionellosis. World Health Organization

- Bass A. R., Egan M. S., Alexander-Floyd J., Lopes Fischer N., Doerner J., Shin S. (2023). Human GBP1 facilitates the rupture of the *Legionella*-containing vacuole and inflammasome activation. *Mbio*, 14(5), e01707-23.
- Basta D. W., Angeles-Albores D., Spero M. A., Ciemniecki J. A., Newman D. K. (2020). Heat-shock proteases promote survival of *Pseudomonas aeruginosa* during growth arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(8), 4358–4367.
- Baudart J., Guillaume C., Mercier A., Binet M. (2015). Rapid quantification of viable legionellain nuclear cooling tower waters using filter cultivation, fluorescentin situhybridization and solid-phase cytometry. *Journal of Applied Microbiology*, 118(5), 1238-1249.
<https://doi.org/10.1111/jam.12783>
- BM Corp. (2022). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 28.0 [Software]. IBM Corp. <https://www.ibm.com/spss>
- Boamah D. K., Zhou G., Ensminger A. W., O'Connor T. J. (2017). From many hosts, one accidental pathogen: the diverse protozoan hosts of *Legionella*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 477.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00477>
- Boczek L.A., Ryu H., Beck S.E., Cashdollar J.L., Linden K.G. (2021). Evaluation of UV-C LED disinfection performance and investigating potential dual-wavelength synergy. *Water Research*, 109, 207-216.
- Borella P., Montagna M. T., Stampi S., Stancanelli G., Romano-Spica V., Triassi M., Napoli C. (2021). *Legionella* infection risk from domestic hot water. *Emerging Infectious Diseases*, 27(3), 503-510
- Brenner D. J., Steigerwalt A. G., McDade J. E. (1979). Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Annals of Internal Medicine*, 90(4), 656-658. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-90-4-656>.

- Bryman A. y Cramer D. (2011). Quantitative Data Analysis with IBM SPSS 17, 18 & 19: A Guide for Social Scientists. Routledge.
- Buffa S., Fouladfar M. H., Franchini G., Lozano Gabarre I., Andrés Chicote M. (2021). Advanced control and fault detection strategies for district heating and cooling systems—A review. *Applied Sciences*, 11(1), 455.
- Bulski K. (2020). Bioaerosols at plants processing materials of plant origin—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 27507–27514. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09121-4>
- Burillo A., Pedro-Botet M. L., Bouza E. (2017). Microbiology and epidemiology of legionnaire's disease. *Infectious Disease Clinics of North America*, 31(1), 7–27. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.10.002>.
- Busch, L.M. y Charles E., María T. Infecciones por legionella. Manual MSD. 2018: (p.1).
- Buse H., Hall J. S., Hunter G., Goodrich J. (2022). Differences in UV-C LED inactivation of *Legionella pneumophila* serogroups in drinking water. *Microorganisms*, 10(2), 352. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020352>
- Caicedo C., Rosenwinkel K.H., Exner M., et al. (2019). *Legionella* occurrence in municipal and industrial wastewater treatment plants and risks of reclaimed wastewater reuse: Review. *Water Research*, 149, 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.080>
- Calderón M. V. C., Elizondo-Salazar J. A., Reina A. M. M., Peña J. A. G., Morelo R. E. T., Cantero S. P. P. (2021). Establecimiento de tres indicadores de eficiencia en el uso de agua para lavado en instalaciones lecheras en zarcero, costa rica. *Agronomía Costarricense*, 153-163. <https://doi.org/10.15517/rac.v45i1.45745>

- Cargill K.L., Pyle B.H., Sauer R.L., McFeters G.A. (1992). Effects of culture conditions and biofilm formation on the iodine susceptibility of *Legionella pneumophila*. *Can. J. Microbiol.* 1992, 38, 423–429.
- Caruso G., Coniglio M. A., Laganà P., Fasciana T., Arcoleo G., Arrigo I., Di Carlo P., Palermo M., Giammanco A. (2024). Validation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification-Based Kit for the Detection of *Legionella pneumophila* in Environmental Samples According to ISO/TS 12869:2012. *Microorganisms*, 12(5), 961._
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12050961>
- Cassell K., Davis J. L., Berkelman R. L. (2021). Legionnaires' disease in the time of covid-19. *Pneumonia*, 13(1).
<https://doi.org/10.1186/s41479-020-00080-5>.
- Cavallaro, A. (2023). *Legionella* relative abundance in shower hose biofilms is associated with specific microbiome members. *Fems Microbes*, 4.
<https://doi.org/10.1093/femsmc/xtad016>
- Cegelski L, Marshall G.R., Eldridge G.R., Hultgren S.J. (2008). The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat Rev Microbiol* 6: 17-27.
[doi:10.1038/nrmicro1818](https://doi.org/10.1038/nrmicro1818)
- Centers for Medicare y Medicaid Services. (2017). Requirement to reduce *Legionella* risk in healthcare facility water systems to prevent cases and outbreaks of Legionnaires' disease .
Retrieved from <https://www.cms.gov/Medicare/Provider-Enrollment-and-Certification/SurveyCertificationGenInfo/Downloads/QSO17-30-HospitalCAH-NH-REVISED-.pdf>
- Centro Nacional de Epidemiología. (2023). Informe anual sobre la situación de la legionelosis en España. Instituto de Salud Carlos III. Recuperado de Centro Nacional de Epidemiología.

- Cervero-Arago S., Rodriguez-Martinez S., Puertas-Bennasar A., Araujo R.M. (2015). Effect of Common Drinking Water Disinfectants, Chlorine and Heat, on Free Legionella and Amoebae-Associated Legionella.
- Cianciotto NP. (2001). Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. Int J Med Microbiol. 2001;291: 331-343.
- Cianciotto, N.P. (2007). Iron acquisition by *Legionella pneumophila*. *Biometals* 2007, 20, 323–331.
- Coetzee N., Duggal H., Hawker J., et al. (2012). An outbreak of Legionnaires' disease associated with a display spa pool in retail premises, Stoke-on-Trent, United Kingdom, July 2012. *Eurosurveillance*, 17(37), 20271.
<https://doi.org/10.2807/es.e.17.37.2027>
- Collins S., Stevenson D., Bennett A., Walker J. (2017). Occurrence of *Legionella* in UK household showers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220(3), 401–406.
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.12.001>
- Correia A. M., Gonçalves G., Reis J., et al. (2001). An outbreak of legionnaires' disease in a municipality in northern Portugal. *Eurosurveillance*, 6(7), 121–124.
<https://doi.org/10.2807/esm.06.07.00228-en>
- Cunha B. A., Burillo A., Bouza E. (2016). Legionnaires' disease. In *The Lancet* (pp. 376–385). Lancet Publishing Group.
- Chambers S., Slow S., Scott-Thomas A., Murdoch, D. (2021). Legionellosis caused by non-legionella pneumophila species, with a focus on *Legionella longbeachae*. *Microorganisms*, 9(2), 291.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9020291>

- Chatziprodromidou I. P., Savoglidou I., Stavrou, V. (2022). Surveillance of *Legionella* spp. in Open Fountains: Does It Pose a Risk? *Microorganisms*, 10(12), 2458.

<https://www.mdpi.com/2076-2607/10/12/2458>

- Chiaraviglio L., Brown D. A., Kirby J. E. (2008). Infection of cultured human endothelial cells by *Legionella pneumophila*. *PloS one*, 3(4), e2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002012>

- Cho M. C., Kim H., An D., et al. (2012). Comparison of sputum and nasopharyngeal swab specimens for molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, and *Legionella pneumophila*. *Annals of Laboratory Medicine*, 32(2), 133–138.

- De Boer J. W., Yzerman E. P. F., Jansen R., et al. (2007). Legionnaires' disease and gardening. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 88–91. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01562.x>

- De Filippis P., Mozzetti C., Messina A., D'Alò G. L. (2018). Prevalence of *Legionella* in retirement homes and group homes water distribution systems. *Science of the Total Environment*, 643, 715–724.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.216>.

- Deatherage D.E., Kepner, J.L., Bennett AF, Lenski RE, Barrick JE. (2017) Specificity of genome evolution in experimental populations of *Escherichia coli* evolved at different temperatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E1904–E1912.

- Declerck P., Behets J., van Hoef V., Ollevier, F. (2007) Replication of *Legionella pneumophila* in floating biofilms. *Curr. Microbiol.* 2007

- Declerck P., Behets J., Delaedt Y., Margineanu A., Lammertyn E., Ollevier F. (2005). Impact of non-*Legionella* bacteria on the uptake and intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *Microb. Ecol.* 2005, 50, 536–549.

- Deiana G., Arghittu A., Dettori M., Masia M., Deriu M. G., Piana A., Muroi M., Castiglia P., Azara A. (2021). Environmental Surveillance of *Legionella* spp. in an Italian University Hospital: Results of 10 Years of Analysis. *Water*, 13(16), 2304. <https://doi.org/10.3390/w13162304>
- Dietersdorfer E., Kirschner A., Schrammel B., Ohradanova-Repic A., Stockinger H., Sommer R., Walochnik J., Cervero-Arago S. (2018). Starved viable but nonculturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. *Water Research*, 141, 428–438.
- Dilger T., Melzl H., Gessner A. (2018) *Legionella* contamination in warm water systems: A species-level survey. *Int J Hyg Environ Health*. DOI: 10.1016/j.ijheh.2017.10.011. PubMed PMID: 29108681.
- Dinne K., Gerin O., Bleys B., De Cuyper K. (2017). Evaluation of the risk of *Legionella* spp. development in sanitary installations. CIBW062 Symposium 2017, 68. Belgian Building Research Institute (BBRI).
<https://www.instal2020.be/wp-content/uploads/2015/07/CIBW062-Symposium-2017-publication-Legionella.pdf>.
- Ditommaso S., Giacomuzzi M., Memoli G., Garlasco J., Zotti C. M. (2021). Comparison of BCYE α +AB agar and MWY agar for detection and enumeration of *Legionella* spp. in hospital water samples. *BMC Microbiology*, 21(1), 48.
<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02097-2>
- Doménech-Sánchez A., Laso E., Berrocal C. I. (2022). Environmental surveillance of *Legionella* in tourist facilities of the Balearic Islands, Spain, 2006 to 2010 and 2015 to 2018. *Eurosurveillance*, 27(21), 2100769.
<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.21.2100769>
- Donlan R.M., Forster T., Murga R., Brown E., Lucas C., Carpenter J., Fields B. (2005). *Legionella pneumophila* associated with the protozoan *Hartmannella vermiformis* in a model multi-species biofilm has reduced

susceptibility to disinfectants. *Biofouling* 2005.

- Donohue M. (2021). Quantification of *Legionella pneumophila* by qPCR and culture in tap water with different concentrations of residual disinfectants and heterotrophic bacteria. *The Science of the Total Environment*, 774, 145142. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.145142>

- European Centre for Disease Prevention and Control. (2015). Surveillance reports on Legionnaires' disease. ECDC. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report-2015>

- European Centre for Disease Prevention and Control. (2018). Legionnaires' disease. In ECDC. Annual epidemiological report for 2017. ECDC. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report-2017>

- European Centre for Disease Prevention and Control. (2019). European technical guidelines for the prevention, control and investigation of infections caused by *Legionella* species. ECDC. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/european-technical-guidelines-prevention-control-and-investigation-infections>

- European Centre for Disease Prevention and Control. (2020). Legionnaires' disease - Annual Epidemiological Report for 2020. ECDC. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report-2021.pdf>.

- European Centre for Disease Prevention and Control. (2023, July 3). Increasing rates of Legionnaires' disease in the EU/EEA. ECDC. <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/increasing-rates-legionnaires-disease-eueea>

- Escobar Villalobos C. A. (2021). *Principales aspectos patogénicos, clínicos y de diagnóstico del género legionela* (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile). Escuela de Tecnología Médica.).

- Faccini M., Russo A. G., Bonini M., et al. (2020). Large community-acquired Legionnaires' disease outbreak caused by *Legionella pneumophila* serogroup 1, Italy, July to August 2018. *Eurosurveillance*, 25, 1900523._
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.20.1900523>

- Falkinham J., Hilborn E.D., Arduino M.J., Pruden A., Edwards M.A. (2015) Epidemiología y ecología de patógenos oportunistas de plomería en locales: *Legionella pneumophila*, micobacteria avium, y *Pseudomonas aeruginosa* (3). 758; <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1408692>

- Farag A. S., Stedtfeld T.M., Waseem H., Williams M.R., Stedffeld R.D., Hashsham S.A. (2017). On-filter direct amplification of *Legionella pneumophila* for rapid assessment of its abundance and viability. *Water Res.* 2017;121: 162–170.

- Fakhri Y., Nasiri M.J., Asadi A., Avazpour M., Alinejad A., Gholami Z. y Khaneghah A.M. (2019). The prevalence of *Legionella pneumophila* in different water systems: A global systematic review and meta-analysis. Research Square.
<https://doi.org/10.21203/rs.2.13555/v1>

- Farina C., Cacciabue E., Averara F., Ferri N., Vailati F., Del Castillo G., Serafini A., Fermi B., Doniselli N., Pezzoli, F. (2023). Water Safety Plan, Monochloramine Disinfection and Extensive Environmental Sampling Effectively Control *Legionella* and Other Waterborne Pathogens in Nosocomial Settings: The Ten-Year Experience of an Italian Hospital. *Microorganisms*, 11(1794). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071794>.

- Farinelli G., Giagnorio M., Ricceri F., Giannakis S., Tiraferri, A. (2021). Evaluation of the effectiveness, safety, and feasibility of 9 potential biocides

to disinfect acidic landfill leachate from algae and bacteria. Water Research, 191, 116801. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116801>

- Feeley J.C., Gibson R.J., Gorman G.W., Langford N.C., Rasheed J.K., Mackel D.C., Baine W.R. (1979). Charcoal yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. J.Clin. Microbiol. 10:437-441

- Feng S., Luo P., Huang S., Ou Z. (2021). Diagnosis and treatment for a case of *Legionella longbeachae* severe pneumonia and literature review. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 46(11), 1167–1171. <https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2021.200629>

- Fernández D. L., Gómez Á. I. P., Morón C., Díaz, J. P. (2020). Sistema automático de recirculación de agua potable para su aplicación en instalaciones de agua caliente sanitaria = automatic drinking water recirculation system for application in sanitary hot water installations. Anales De Edificación, 6(1), 77. <https://doi.org/10.20868/ade.2020.4458>

- Field, A. (2018). Discovering Statistics Using IBM SPSS Statistics (5th ed.). SAGE Publications.

- Fields B. S., Benson R. F., Besser, R. E. (2002). Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clinical Microbiology Reviews, 15(3), 506-526. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.506-526.2002>. PMID: 12097254; PMCID: PMC118082.

- Fykse E. M., Aarskaug T., Thrane I., Blatny, J. M. (2013). *Legionella* and non-*Legionella* bacteria in a biological treatment plant. Canadian Journal of Microbiology, 59(2), 102–109. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0166>

- Filice S., Sciuto E. L., Scalese S., et al. (2022). Innovative Antibiofilm Smart Surface against *Legionella* for Water Systems. Microorganisms, 10, 870. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050870>

- Fliermans C.B., Cherry W.B., Orrison L.H., Smith, S.J., Tison D.L., Pope D.H. (1981) Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, 41, 9–16.
- Forján Lozano E., García Ordiales M. M., Piñero Maza Á., Forján Delgado M., Carrasco Zalvide, R. (2016). Aspectos a considerar en una actualización de la normativa nacional en materia de legionelosis. *Ars Pharm*, 57(1), 11-22
- Fraser D. W., Tsai T. R., Orenstein W., Parkin W. E., Beecham H. J., Sharrar R. G., Harris J., Mallison G. F., Martin S. M., McDade J. E., Shepard C. C., Brachman, P. S. (1977). Legionnaires' disease: Description of an epidemic of pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 297(22), 1189–1197.
- Gamage S., Jinadatha C., Coppin J., Kralovic S., Bender A., Ambrose M., Roselle G. (2022). Factors that affect legionella positivity in healthcare building water systems from a large, national environmental surveillance initiative. *Environmental Science & Technology*, 56(16), 11363-11373. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c02194>.
- García M. T. *et al.* (2015). Propuesta de revisión del Real Decreto 865/2003. *J Health*, 8(4), 451-459.
- García-Núñez M., Pedro-Botet M. L., Ragull S., Sopena N., Morera J., Rey-Joly C., Sabria, M. (2009). Cytopathogenicity and molecular subtyping of *Legionella pneumophila* environmental isolates from 17 hospitals. *Epidemiology and Infection*, 137(2), 188–193.
- Garduño, R. A. (2020). Freshwater ecology of *Legionella pneumophila*. *Legionellosis Diagnosis and Control in the Genomic Era*, 7-76.
- Garrido R.M.B., Parra F.J.E., Frances L.A., *et al* (2005). Antimicrobial Chemotherapy for Legionnaires Disease: Levofloxacin versus Macrolides. *Clin Infect Dis.* 2005;40(6):800–806. doi:10.1086/428049.

- Garrison L.E., Kunz J.M., Cooley L.A., Moore M.R., Lucas C., Schrag S., Sarisky J., Whitney C.G. (2016). Vital Signs: Deficiencies in Environmental Control Identified in Outbreaks of Legionnaires' Disease—North America, 2000–2014. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(22), 576–584. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6522e1>

- Garvey M. I., Bradley C. W., Wilkinson M. A. C., Bradley C., Holden, E. (2017). Engineering waterborne *Pseudomonas aeruginosa* out of a critical care unit. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220(6), 1014-1019. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.06.003>

Gavaldá L. (2016). Efectividad a largo término de la temperatura como método de control de *Legionella* en agua caliente sanitaria. Tesis doctoral Universidad Autónoma de Barcelona.

- Gavalda L., Garcia-Nunez M., Quero S., Gutierrez-Milla C., Sabria, M. (2019). Role of hot water temperature and water system use on *Legionella* control in a tertiary hospital: An 8-year longitudinal study. *Water Research*, 149, 460-466.

- Geesey G.G., Wigglesworth-Cooksey B., Cooksey K.E(2000). Influence of calcium and other cations on surface adhesion of bacteria and diatoms: A review. *Biofouling* 2000, 15, 195–205.

- Gerrity D., Arnold M., Dickenson E., Moser D., Sackett J. D., Wert E. C. (2018). Microbial community characterization of ozone-biofiltration systems in drinking water and potable reuse applications. *Water Research*, 135, 207-219. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.023>

- Girolamini L., Salaris S., Lizzadro J., Mazzotta M., Pascale M. R., Pellati T., Cristino S. (2020). How molecular typing can support legionella environmental surveillance in hot water distribution systems: a hospital experience. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(22), 8662. <https://doi.org/10.3390/ijerph17228662>

- Gładysz I., et al. (2021). *Legionella* spp. in Polish hospitals in 2009–2013 and 2014–2016: An epidemiological analysis. *Postepy Hig Med Dosw.*
- Gómez Ordóñez J. L., Osuna Pérez F., Moya González L., Cabrera Manzano D. (2022). Los grandes centros comerciales y el porvenir de nuestras ciudades: Por una desamortización ambiental
- Gomez-Valero I., Rusniok C., Buchrieser C. (2009). *Legionella pneumophila*: population genetics, phylogeny and genomics. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(5):727-39.
- Gorito A. M., Pesqueira J. F., Moreira N. F., Ribeiro A., Pereira M. F., Nunes O., Almeida C., Silva A. M. T. (2021). Ozone-based water treatment (O₃, O₃/UV, O₃/H₂O₂) for removal of organic micropollutants, bacteria inactivation and regrowth prevention. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9, 105315.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105315>
- Graham F., Harte D., Baker, M. (2023). Environmental investigation and surveillance for legionella in Aotearoa New Zealand, 2000–2020. *Current Microbiology*, 80(5). <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03261-9>
- Grabowska-Grucza K. y Kiersztyn, B. (2023). Relationships between *Legionella* and *Aeromonas* spp. and associated lake bacterial communities across seasonal changes in an anthropogenic eutrophication gradient. *Scientific Reports*, 13(1), 17076.
- Green S. B. y Salkind, N. J. (2016). Using SPSS for Windows and Macintosh: Analyzing and understanding data (8th ed.). Pearson.
- Grigoryeva L. S. y Cianciotto, N. P. (2021). Human macrophages utilize a wide range of pathogen recognition receptors to recognize *Legionella pneumophila*, including toll-like receptor 4 engaging *Legionella* lipopolysaccharide and the toll-like receptor 3 nucleic-acid sensor. *PLoS Pathogens*, 17(e1009781). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009781>

- Grupo de Trabajo Europeo para las Infecciones por Legionella -EWGLI- (2015). <http://www.ewgli.org/>
- Guamán J., García M., Guevara D., Ríos A. (2016). Evaluación del impacto económico en diferentes escenarios de implementación de tecnologías eficientes de calentamiento de agua en el ecuador. Revista Técnica "Energía", 12(1)
<https://doi.org/10.37116/revistaenergia.v12.n1.2016.52>
- Guillemot J., Ginevra C., Allam, C., Kay, E., Gilbert C., Doublet P., Jarraud S., Chapalain A. (2022). TNF- α Response in Macrophages Depends on Clinical *Legionella pneumophila* Isolates Genotypes. Virulence, 13, 160–173.
- Guillot P., Delamaire F., Gacouin A., Painvin B., Piau C., Reizine F., Maamar A. (2023). Early discontinuation of combination antibiotic therapy in severe community-acquired pneumonia: a retrospective cohort study. BMC Infectious Diseases, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08493-5>
- Gunkel G., Michels U., Scheideler M. (2022). Climate change: water temperature and invertebrate propagation in drinking-water distribution systems, effects, and risk assessment. Water, 14(8), 1246._
<https://doi.org/10.3390/w14081246>.
- Guspiel A., Menk J., Streifel A., Messinger K., Wagner J., Ferrieri P. et al. (2017). Management of risks from water and ice from ice machines for the very immunocompromised host: A process improvement project prompted by an outbreak of rapidly growing mycobacteria on a pediatric hematopoietic stem cell transplant (HSCT) unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 38(7), 792-800. <https://doi.org/10.1017/ice.2017.97>
- Hall G. S. (2013). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology (13th ed.). *Laboratory Medicine*, 44, e138-e139.

- Han X. Y., Ihegword A., Evans S. E., Zhang J., Li L., Cao H., Tarrand J. J., El-Kweifi O. (2015). Microbiological and clinical studies of legionellosis in 33 patients with cancer. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(7), 2180–2187.
- Hayes-Phillips D., Bentham R., Ross K., Whiley, H. (2019). Factors influencing *Legionella* contamination of domestic household showers. *Pathogens*, 8(1), 27. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010027>
- Hernández J. I., Polo V. A., Orjuela A. M., Gaona J. O. P., Ríos, D. I. (2002). Detección de *Legionella pneumophila* como agente etiológico de neumonía grave adquirida en la comunidad. *Revista Repertorio De Medicina Y Cirugía*, 11(3), 74-79.
- <https://doi.org/10.31260/repertmedcir.v11.n3.2002.288>
- Hindahl M.S., Iglewski B.H. (1984). Isolation and Characterization of the *Legionella pneumophila* Outer Membrane. *J. Bacteriol.* 1984, 159, 107–113.
- Hindre T., Bruggemann H., Buchrieser C., Hechard Y. (2008) Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology* 2008, 154, 30–41.
- Hsu S., Martin R., Wentworth B. (1984). Isolation of *Legionella* species from drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4), 830-832. <https://doi.org/10.1128/aem.48.4.830-832.1984>
- Hubert H, Jarraud S, Hartland E, et al. (2011). Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control. *Mol Microbiol.* 2011; 76(1): 1–11.
- Instituto de Salud Carlos III. (2022). Plan Nacional de Control y Prevención de la Legionelosis. Gobierno de España. Recuperado de Instituto de Salud Carlos III.

- Iliadi V., Staykova J., Iliadis S., Konstantinidou I., Sivykh P., Romanidou G., Konstantinidis, T. (2022). *Legionella pneumophila*: the journey from the environment to the blood. *Journal of Clinical Medicine*, 11(20), 6126. <https://doi.org/10.3390/jcm11206126>
- Instituto de Salud Carlos III. (2019). Informe anual del Centro Nacional de Epidemiología 2018. https://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/Informe_CNE_2018.pdf
- Ito, A. y Ishida, T. (2020). *Legionella* pneumonia due to non-legionella pneumophila serogroup 1. *Hospital Acquired Infection and Legionnaires' Disease*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88187>
- Judd, J. (2020). Reopening businesses reminded to flush water system. KNSI Radio. Retrieved from <https://knsiradio.com/news/local-news/reopening-businesses-reminded-flushwater-system>
- Julien R., Saravi B., Nejadhashemi A. P., Whelton A. J., Aw T. G., Mitchell, J. (2022). Identifying water quality variables most strongly influencing *Legionella* concentrations in building plumbing. *AWWA Water Science*, 4(1). <https://doi.org/10.1002/aws2.1267>
- Justice S.S., Hunstad D.A. Cegelski L., Hultgren S.J. (2008). Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008, 6, 162–168.
- Kanamori H., Weber D. J., Rutala W. A. (2016). Healthcare outbreaks associated with a water reservoir and infection prevention strategies. *Clinical Infectious Diseases*, 62(11), 1423-1435. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw122>
- Kanatani J., Fujiyoshi S., Isobe J., Kimata K., Watahiki M., Maenishi E., Oishi K. (2024). Correlation between bacterial microbiome and *Legionella* species in water from public bath facilities by 16s rRNA gene amplicon sequencing. *Microbiology Spectrum*, 12(4).

<https://doi.org/10.1128/spectrum.03459-23>

- Kanarek P., Bogiel T., Breza-Boruta B. (2022). Legionellosis risk—an overview of *Legionella* spp. habitats in Europe. Environmental Science and Pollution Research, 29(51), 76532-76542. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22950-9>
- Kaufmann A.F., McDade J.E., Patton C.M. et al. (1981). Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. Am J Epidemiol. 1981; 114:337-347.
- Kim P., Deshpande A., Rothberg M. (2022). Urinary antigen testing for respiratory infections: current perspectives on utility and limitations. Infection and Drug Resistance, 15, 2219-2228. <https://doi.org/10.2147/idr.s321168>
- Kim S. y Isberg, R. R. (2023). The Sde phosphoribosyl-linked ubiquitin transferases protect the *Legionella pneumophila* vacuole from degradation by the host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(33), e2303942120.
- Kinnear P. R. y Gray, C. D. (2010). IBM SPSS Statistics 19 Made Simple. Psychology Press.
- Koubar M., Rodier M.H.,Frere J.(2013) Involvement of minerals in adherence of *Legionella pneumophila* to surfaces. *Curr. Microbiol.* 2013, 66, 437–442.
- Kusnetsov J., Neuvonen L.K., Korpio T., et al. (2010). Two Legionnaires' disease cases associated with industrial waste water treatment plants: A case report. BMC Infectious Diseases, 10(1), 343. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-343>.
- Lara de Larrea J., MacIsaac S. A., Rauch K. D., Stoddart A. K., Gagnon, G. A. (2023). Comparison of *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas*

fluorescens Quantification Methods for Assessing UV LED Disinfection. ACS EST Water, 3(11), 3667-3675.

<https://doi.org/10.1021/acsestwater.3c00428>

- Leoni E., De Luca G., Legnani P. P., Sacchetti R., Stampi S., Zanetti F. (2021). Legionella waterline colonization: Detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems. Journal of Applied Microbiology, 121(2), 701-707

- Li C., Fu J., Shao S., Luo, Z. Q. (2024). *Legionella pneumophila* exploits the endo-lysosomal network for phagosome biogenesis by co-opting SUMOylated Rab7. Plos Pathogens, 20(5), e1011783.

- Liang J., Cameron G., Faucher S. (2023). Development of heat-shock resistance in *Legionella pneumophila* modeled by experimental evolution. Applied and Environmental Microbiology, 89._
<https://doi.org/10.1128/aem.00666-23>

- Liles M.R., Viswanathan V.K., Cianciotto N.P. (1998). Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. Infect. Immun. 1998, 66, 1776-1782.

- Lin Y.E., Stout, J.E., Yu, V.L. (2011). Controlling *Legionella* in Hospital Drinking Water: An Evidence-Based Review of Disinfection Methods. Infection Control & Hospital Epidemiology, 32(2), 166-173.

- Liu R., Yu Z., Guo H., Liu M., Zhang H., Yang M. (2012). Pyrosequencing analysis of eukaryotic and bacterial communities in faucet biofilms. Sci. Total, Environ. 2012,

- Lozano E. F., Ordiales M. M. G., Maza Á. P., Delgado M. F., Zalvide R. C. (2016). Aspectos a considerar en una actualización de la normativa nacional en materia de legionelosis. Ars Pharmaceutica (Internet), 57(1), 11-22.
<https://doi.org/10.30827/ars.v57i1.4381>

- Lu J., Struewing I., Yelton S., Ashbolt N. J. (2020). Development of a multiplex qPCR assay for the detection of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in building water systems. *Journal of Water and Health*, 18(1), 39-50.

- Lytle D. A., Pfaller S., Muhlen C., Struewing I., Triantafyllidou S., White C., Hayes S., King D., Lu J. (2021). A comprehensive evaluation of monochloramine disinfection on water quality, *Legionella*, and other important microorganisms in a hospital. *Water Research*, 189, 116656. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116656>.

- Maisa A., Brockmann A., Renken F. et al. (2015). Epidemiological investigation and case-control study: a Legionnaires' disease outbreak associated with cooling towers in Warstein, Germany, August–September 2013. *Eurosurveillance*, 20, 30064. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.46.30064>

- Magdzińska M., Cudzik-Dziurzyńska J., Błaszczuk A., Barwinek K. (2023). *Legionella pneumophila* as an important public health problem – epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Med Srod.*, 26(3-4), 125-128. <https://doi.org/10.26444/ms/172892>

- Magill S. S., Edwards J. R., Bamberg W., et al. (2014). Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *The New England Journal of Medicine*, 370, 1198-1208.

- Mallegol J., Duncan C., Prashar A., So, J., Low D.E., Terebeznik M., Guyard C. (2012). Essential roles and regulation of the *Legionella pneumophila* collagen-like adhesin during biofilm formation. *PLoS One* 2012, 7, e46462.

- Marchesi I., Ferranti G., Mansi A., Marcelloni A. M., Proietto A. R., Saini, N., Borella P. (2016). Control of *Legionella* contamination and risk of corrosion

in hospital water networks following various disinfection procedures. Applied and Environmental Microbiology, 82(9), 2959-2965.

<https://doi.org/10.1128/AEM.04046-15>.

- Marra A. y Shuman H. (1989) Isolation of a *Legionella pneumophila* restriction mutant with increased ability to act as a recipient in heterospecific matings.

<https://doi.org/10.1128/jb.171.4.2238-2240.1989>

- Marras L., Bertolino G., Sanna A., Carraro V., Coroneo V. (2023). *Legionella* spp. monitoring in the water supply systems of accommodation facilities in sardinia, italy: a two-year retrospective analysis. International Journal of Environmental Research and Public Health, 20(18), 6722._

<https://doi.org/10.3390/ijerph20186722>.

- Martin R. L., Harrison K., Proctor C. R., Martin A., Williams K., Pruden A., Edwards M. A. (2020). Chlorine disinfection of *Legionella* spp., *L. pneumophila*, and *Acanthamoeba* under warm water premise plumbing conditions. Microorganisms, 8(9), 1452._

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8091452>

- Medina M. G., Lösch L. S., Merino L. A. (2021). *Legionella pneumophila*: un patógeno emergente en argentina. Actualizaciones en Sida E Infectología.

<https://doi.org/10.52226/revista.v29i107.86>

- Méndez Arranz D., Garrastazu Díaz C., García López P., Rayón López H., Boldo Pascua E. (2023). Aplicación de geotecnologías para el sistema de vigilancia ambiental de instalaciones de alto riesgo de legionelosis del Ayuntamiento de Madrid. Revista de Salud Ambiental, 23(1), 6-12.

- Mendis N., McBride P., Saoud J., Mani T., Faucher S.P. (2018). The LetA/S two-component system regulates transcriptomic changes that are essential for the culturability of *Legionella pneumophila* in water. *Sci Rep* 8:6764.

- Meyers J., Luna T. y Willon, P. (2020). Newsom: Reopening California businesses coming soon. Los Angeles Times.

<https://www.latimes.com/california/story/2020-04-28/reopen-california-businesses-gavin-newsomphases-stay-home-order-coronavirus>.

- Ministerio de Sanidad. (2021). Guía técnica para la prevención de la Legionelosis en instalaciones. <https://www.sanidad.gob.es>

- Molina J., Bennassar M., Palacio E., Crespi S. (2023). Impact of prolonged hotel closures during the covid-19 pandemic on *Legionella* infection risks. *Frontiers in Microbiology*, 14.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1136668>

- Mondino S., Schmidt S., Rolando M., Escoll P., Gómez-Valero L., Buchrieser C. (2020). Legionnaires' disease: state of the art knowledge of pathogenesis mechanisms of legionella. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15(1), 439-466.

<https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032742>

- Montagna M., De Giglio O., Napoli C., Diella G., Rutigliano S., Agodi A., Auxilia F., Baldovin T., Bisetto F., Arnoldo L., Brusaferro S., Busetti M., Calagreti G., Casini B., Cristina M. L., Di Luzio R., Fiorio M., Formoso M., Liguori G., Martini E., Molino A., Mondello P., Mura I., Novati R., Orsi G. B., Patroni A., Poli A., Privitera G., Ripabelli G., Rocchetti A., Rose F., Sarti M., Savini S., Silvestri A., Sodano L., Spagnolo A. M., Tardivo S., Teti V., Torregrossa M. V., Torri E., Veronesi L., Zarrilli R., Pacifico C., Goglio A., Moro, M., Pasquarella C. (2018). Control and prevention measures for legionellosis in hospitals: A cross-sectional survey in Italy. *Environmental Research*, 166, 55-60.

- Moreno Bañón M. (2024). Evaluación del riesgo de las instalaciones implicadas en los principales brotes o casos causados por *Legionella*

pneumophila: revisión bibliográfica. Memoria de Trabajo Fin de Grado, Grado en Farmacia, Sant Joan d'Alacant.

<http://dspace.umh.es/bitstream/11000/31779/1/Moreno%20Bañón%2C%20Marina.pdf>

- Moretti M., Allard S. D., Dauby N., De Geyter D., Mahadeb B., Miendje V. Y., Balti E. V., Clevenbergh P. (2021). Clinical features of Legionnaires' disease at three Belgian university hospitals: A retrospective study. *Acta Clinica Belgica*, 77, 753–759.

- Mouchtouri V. A., Goutziana G., Kremastinou J., Hadjichristodoulou C. (2010). *Legionella* species colonization in cooling towers: Risk factors and assessment of control measures. *American Journal of Infection Control*, 38, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2009.04.285>

- MSSSI. (1997). Enfermedades de Declaración Obligatoria. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

- Murdoch D., Chambers S. T., Priest, P. (2020). Clinical manifestations and diagnosis of *Legionella* infection. *UpToDate*, Waltham, MA. (Accessed on February 19, 2021.)

- Naher N., Bari M. L., Ahmed, S. (2024). Risk assessment and detection of *Legionella* species in the water system of a luxury hotel in dhaka city, bangladesh. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 40(1), 33-39. <https://doi.org/10.3329/bjm.v40i1.71711>

- Nachér-Vázquez M., Barbosa A., Armelim I., Azevedo A. S., Almeida G. N., Pizarro C., Azevedo N. F., Cerqueira L. (2022). Development of a Novel Peptide Nucleic Acid Probe for the Detection of *Legionella* spp. in Water Samples. *Microorganisms*, 10(7), 1409. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071409>

- NASEM. (2019). Management of *Legionella* in water systems. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25474>

- National Academies of Sciences, Medicine Division, Division on Earth, Life Studies, Board on Population Health, Public Health Practice, & Committee on Management of Legionella in Water Systems. (2020). *Management of Legionella in water systems*. National Academies Press.
- Newton H. J., Ang D. K., Van Driel I. R., Hartland E. L. (2010). Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clinical microbiology reviews*, 23(2), 274-298.
- Nisar M. A., Ross K. E., Brown M. H., et al. (2020). *Legionella pneumophila* and protozoan hosts: Implications for the control of hospital and potable water systems. *Pathogens*, 9(4), 286._
<https://doi.org/10.3390/pathogens9040286>
- Norušis, M. J. (2012). IBM SPSS Statistics 19 Guide to Data Analysis. Pearson.
- Niu S. y Zhao L. (2022). Metagenomic next-generation sequencing clinches the diagnosis of *Legionella* pneumonia in a patient with acute myeloid leukemia: A case report and literature review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12.
- Oliver J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 415-425.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2007) *Legionella* and the prevention of legionellosis.
- Orsi N. (2004). The antimicrobial activity of lactoferrin: Current status and perspectives. *Biometals* 2004, 17, 189–196.
- Ortí-Lucas R. M. y Luciano E. (2022). New immunomagnetic separation method to analyze risk factors for *Legionella* colonization in health care

centres. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 32(5), 744–750. <https://doi.org/10.1038/s41370-022-00421-0>

- Palazzolo C., Maffongelli G., D'Abramo A., et al. (2020). Legionella pneumonia: ¿Increased risk after COVID-19 lockdown? *Eurosurveillance*, 25(30), 2001372.

<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.30.2001372>.

- Pallant J. (2020). *SPSS Survival Manual: A step by step guide to data analysis using IBM SPSS (7th ed.)*. Routledge.

- Pancer K., Matuszewska R., Bartosik M., Kacperski K., Krogulska B. (2013). Persistent colonization of 2 hospital water supplies by *Legionella pneumophila* strains through 7 years—Sequence-based typing and serotyping as useful tools for a complex risk analysis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20(4), 687–694.

- Pang C.M. y Liu, W. (2006) Biological filtration limits carbon availability and affects downstream biofilm formation and community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 5702–5712.

- Parkinson J., Baron J. L., Hall B., Bos H., Racine P., Wagener M. M., Stout J. E. (2020). Point-of-use filters for prevention of health care-acquired Legionnaires' disease: Field evaluation of a new filter product and literature review. *American Journal of Infection Control*, 48(2), 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.09.006>

- Pascale M. R., Mazzotta M., Salaris S., Girolamini L., Grottola A., Simone, M. L., et al. (2020). Evaluation of MALDI-TOF Mass Spectrometry in diagnostic and environmental surveillance of Legionella species: A comparison with culture and Mip-gene sequencing technique. *Frontiers in Microbiology*, 11, 3172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.03172>

- Pendleton J. N., Gorman S. P., Gilmore B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 11, 297-308.
- Pereira A., Silva A. R., Melo L. (2021). *Legionella* and Biofilms—Integrated Surveillance to Bridge Science and Real-Field Demands. *Microorganisms*, 9(6), 1212.
- Pérez-Cobas A. E., Ginevra C., Rusniok C., Jarraud S., Buchrieser, C. (2020). Persistent Legionnaires' disease and associated antibiotic treatment engender a highly disturbed pulmonary microbiome enriched in opportunistic microorganisms. *MBio*, 11(3), 10-1128.
- Pérez-Ortiz A., Hahn C., Schaible T., et al. (2021). Severe pneumonia in neonates associated with *Legionella pneumophila*: Case report and review of the literature. *Pathogens*, 10(8), 1031._
<https://doi.org/10.3390/pathogens10081031>
- Piao Z., Sze, C.C., Barysheva O., Iida K., Yoshida, S. (2006). Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 1613–1622.
- Priest P. C., Slow S., Chambers S. T., Cameron C. M., Balm M. N., Beale M. W., Blackmore T. K., Burns A. D., Drinković D., Elvy J. A., et al. (2019). The burden of Legionnaires' disease in New Zealand (LegiNZ): A national surveillance study. *Lancet Infectious Diseases*, 19(7), 770–777.
- Prussin A., Schwake D., Marr L. (2017). Ten questions concerning the aerosolization and transmission of *Legionella* in the built environment. *Building and Environment*, 123, 684-695._
<https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2017.06.024>
- Quero S., Párraga-Niño N., Garcia-Núñez M., et al. (2021). The impact of pipeline changes and temperature increase in a hospital historically colonised with *Legionella*. *Scientific Reports*, 11, 1916.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-81625-6>

- Ra K., Montagnino E., Proctor C., Whelton A. (2020). Example Flushing procedure for a school building. West Lafayette, IN: Purdue University.
- Raya J. C., del Hoyo Pastor R., Sánchez I. C., Casanovas I. M. (2024). Distribución y frecuencia de las diferentes especies y serogrupos de *Legionella* aisladas por cultivo en instalaciones de riesgo por legionelosis. La experiencia del Laboratorio de Salud Pública de L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona). *Revista de Salud Ambiental*, 24(1), 16-29.
- Riccò M., Ferraro P., Peruzzi S., Zaniboni A., Ranzieri, S. (2022). SARS-CoV-2-*Legionella* Co-Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis (2020–2021). *Microorganisms*, 10.
- Rodríguez E., Gamboa, M. d. M., Arias, M. L. (2002). *Legionella* spp. ¿ausente en los hospitales de costa rica? *Revista Biomédica*, 13(3), 165-169. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v13i3.313>.
- Robey M., Cianciotto N.P. (2002). *Legionella pneumophila* feoAB promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infect. Immun.* 2002, 70, 5659–5669.
- Rhoads W. J. y Hammes F. (2021). Growth of *Legionella* during COVID-19 lockdown stagnation. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 7(1), 10–15. <https://doi.org/10.1039/D0EW00819B>.
- Rogers J., Dowsett A.B., Dennis P.J., Lee J.V., Keevil C.W. (1994) Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994.
- Rogers J., Dowsett A.B., Keevil C.W.(1995). A paint incorporating silver to control mixed biofilms containing *Legionella pneumophila*. *J. Ind. Microbiol.* 1995, 15, 377–383.

- Rowbotham T.J. (1981). Pontiac fever, amebae and *Legionellae*. *Lancet* 1981.

- Sabatini L., Sisti M., Campana R. (2022). Isolation and identification of *Legionella* spp. from non-hospital facilities: a preliminary one-year surveillance study in the urban area of Pesaro-Urbino (Central Italy). *Annali di Igiene, Medicina Preventiva e di Comunità*, 34(2), 93-102._
<https://www.annali-igiene.it/articoli/2022/2/08-Sabatini.pdf>.

- Sabria M., Garcia-Nunez M., Pedro-Botet M.L., Sopena, N., Gimeno J.M., Reynaga E., Rey-Joly C., 2001. Presence and chromosomal subtyping of *Legionella* species in potable water systems in 20 hospitals of Catalonia. Spain. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 22 (11), 673–676.

- Salinas Granell, M.B. (2017). Caracterización clínico-epidemiológica de la legionelosis y estudio de la colonización por *Legionella no pneumophila* en las redes de distribución de agua y los sistemas evaporativos en España. Tesis doctoral

- Sánchez Serrano, C. unizar.es T.F.M. Ecología medioambiental de *Legionella spp.* 2013-1180 (p.6)

- Schwake D. O., Alum A., Abbaszadegan M. (2021). *Legionella* Occurrence beyond Cooling Towers and Premise Plumbing. *Microorganisms*, 9(12), 2543.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9122543>.

- Schwartz T., Hoffmann, S., Obst U. (2003) Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system. *J. Appl. Microbiol.* 2003, 95, 591–601.

- Sciuto E., Laganà P., Filice S., Libertino S., Corso D., Faro G., Coniglio M. (2021). Environmental management of legionella in domestic water systems: consolidated and innovative approaches for disinfection methods and risk assessment. *Microorganisms*, 9(3), 577._
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9030577>.

- Sod E. A., Barskey A. E., Shah P. P., Schrag S., Whitney C. G., Arduino M. J., Morbidity and Mortality Weekly Report. – MMWR- (2017). Vital signs: Health care–associated Legionnaires’ disease surveillance data from 20 states and a large metropolitan area—United States, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 66(22), 584-589._
<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6622e1>
- Springston J. P. y Yocavitch, L. (2017). Existence and control of *Legionella* bacteria in building water systems: A review. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 14(2), 124-134._
<https://doi.org/10.1080/15459624.2016.1229481>
- Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral (Ministerio de Sanidad y Consumo). (2005). Guía Técnica para la Prevención y Control de la Legionelosis en Instalaciones. Disponible en:_
<http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/agenBiologicos/guia.htm>
- Stewart C.R., Burnside D.M., Cianciotto N.P. (2011). The surfactant of *Legionella pneumophila* is secreted in a TolC-dependent manner and is antagonistic toward other *Legionella* species. *J. Bacteriol.* 2011, 193, 5971–5984.
- Stone B.J. y Kwaik Y.A. Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: Identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect. Immun.* 1998, 66, 1768–1775.
- Storey M.V., Winiecka-Krusnell, J., Ashbolt N.J.; Stenstrom T. (2004). The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. *Scand. J. Infect. Dis.* 2004.

- Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral (Ministerio de Sanidad y Consumo). (2005). Guía Técnica para la Prevención y Control de la Legionelosis en Instalaciones. Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/agenBiologicos/guia.htm>
- Tan L. T. H., Tee W. Y., Khan T. M., Ming L. C., Letchumanan V. (2021). *Legionella pneumophila*, the causative agent of Legionnaires' disease. *Progress In Microbes & Molecular Biology*, 4(1).
- Taylor M., Ross K., Bentham R. (2009). *Legionella*, protozoa, and biofilms: Interactions within complex microbial systems. *Microb. Ecol.* 2009.
- Temmerman R., Vervaeren H., Nosedá B., Boon N., Verstraete W. (2006). Necrotrophic growth of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006.
- Tomaskovic I., Gonzalez A., Dikic I. (2022). Ubiquitin and *Legionella*: from bench to bedside. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, S1084952122000489. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.02.008>.
- Totaro M., Costa A. L., Frendo L., Profeti S., Casini B., Gallo A., Privitera, G., Baggiani, A. (2020). Evaluation of *Legionella* spp. colonization in residential buildings having solar thermal system for hot water production. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(19), 7050. <https://doi.org/10.3390/ijerph17197050>.
- Ulleryd P., Hugosson A., Allestam G., *et al.* (2012). Legionnaires' disease from a cooling tower in a community outbreak in Lidköping, Sweden- epidemiological, environmental, and microbiological investigation supported by meteorological modelling. *BMC Infectious Diseases*, 12, 313. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-313>.

- Unterberg M., Rahmel T., Kissinger T., Petermichl C., Bosmanns M., Niebius M., Schulze C., Jochum H.P., Parohl N., Adamzik M., Nowak H. (2021). *Legionella* contamination of a cold-water supplying system in a German university hospital – assessment of the superheat and flush method for disinfection. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 62(3), E751-E758.
<https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2021.62.3.1944>
- Vaccaro L., Gomes T. S., Izquierdo F., et al. (2021). *Legionella freeii*: ubiquitous pathogen in the environment and causative agent of pneumonia. *Frontiers in Microbiology*, 12, 707187.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.707187>.
- Vaidya T., Schmidt E., Papanicolaou G., et al. (2020). Cutaneous *Legionella* infections in allogeneic hematopoietic cell transplantation recipients. *Dermatology Online Journal*, 26(6), 13030/qt05f926n7.
<https://doi.org/10.5070/D3266049314>.
- Valciņa O., Pūle D., Grantina-Ievina L., Trofimova J., Makarova C. Ģ., Konvisers G., Krūmiņa A. (2019). Co-occurrence of free-living amoeba and *Legionella* in drinking water supply systems. *Medicina*, 55(8), 492.
<https://doi.org/10.3390/medicina55080492>.
- Van der Kooij D.K., Veenendaal H.R., Scheffer W.J.H. (2005). Biofilm formation and multiplication of *Legionella* in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Res.* 2005, 39, 2789–2798.
- Van der Wielen P. W., van der Kooij D. (2013). Nontuberculous mycobacteria, fungi, and opportunistic pathogens in unchlorinated drinking water in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(3), 825–834.
- Van Heijnsbergen E., Schalk J. A. C., Euser S. M., Brandsema P. S., den Boer J. W., de Roda Husman A. M. (2015). Confirmed and potential sources

of *Legionella* reviewed. Environmental Science & Technology, 49(8), 4797-4815. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00142>.

- Van Kenhove E., et al. (2019). Legionella risk in cooling towers. Environmental Research, 171, 136-146.

- Vandersmissen L., de Buck, E., Saels, V., Coil D.A., Anne J. A.W. (2010). *Legionella pneumophila* collagen-like protein encoded by a gene with a variable number of tandem repeats is involved in the adherence and invasion of host cells. FEMS Microbiol. Lett. 2010, 306, 168–176.

Vaqué Rafart J. y Martínez Gómez X. (2002). Epidemiología de la legionelosis. Servicio de Medicina Preventiva y Epidemiología. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Universidad Autónoma de Barcelona.2002; 40(6): 271-281.

- Vermeulen L. C., Brandsema P. S., van der Hoek W. (2021). Atmospheric dispersion and transmission of *Legionella* from wastewater treatment plants: A 6-year case-control study. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 233, 113682._
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463921001267>

- Vilà I., Esparraguera C., Arjona L. (2020). Local policy for managing the risk of the proliferation and spread of *Legionella* in the Girona area. European Journal of Public Health, 30(Supplement_5), ckaa166.106._
<https://academic.oup.com/eurpub/article-pdf/doi/10.1093/eurpub/ckaa166.106/33819425/ckaa166.106.pdf>

- Vincenti S., de Waure C., Raponi M., Teleman A. A., Boninti F., Bruno S., Boccia S., Damiani G., Laurenti P. (2019). Environmental surveillance of *Legionella* spp. colonization in the water system of a large academic hospital: Analysis of the four-year results on the effectiveness of the chlorine dioxide disinfection method. Science of The Total Environment, 657, 248-253.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.036>

- Viñuela-Martínez J.M., Redondo-Cadenas M.A., Alonso-Calleja C. (2022). Prevalencia de *Legionella* en instalaciones de suministro de agua en España: revisión sistemática y meta-análisis. *Revista de Sanidad de las Fuerzas Armadas de España*, 78(4), 245-252.
- Vittal R., Raj J., Karunasagar I., Kumar B. (2021). Iron content as an indicator for *Legionella* species in artificial water systems. *MLU: Med Leg Update*. <https://doi.org/10.37506/mlu.v21i1.2415>.
- Voth K. A. (2019). *Structural Biology of Legionella pneumophila Effectors* (Doctoral dissertation, University of Saskatchewan).
- Wadowsky R.M. y Yee R.B. Satellite growth of *Legionella pneumophila* with an environmental isolate of *Flavobacterium breve*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983, 46, 1447–1449.
- Walraven N., Pool W., Chapman C. (2016). Efficacy of copper-silver ionisation in controlling *Legionella* in complex water distribution systems and a cooling tower: Over 5 years of practical experience. *Journal of Water Process Engineering*, 13, 196-205.
- Weintraub J., Flannery B., Vugia D., Gelling L., Salerno J., Conroy M., Moore, M. (2008). *Legionella* reduction after conversion to monochloramine for residual disinfection. *Opflow*, 100(4), 129-139. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2008.tb09609.x>
- Williams M.M. y Braun-Howland E. (2003). Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 5463–5471.
- Xing X., Wang H., Hu C., Liu L. (2018). Effects of phosphate-enhanced ozone/biofiltration on formation of disinfection byproducts and occurrence of opportunistic pathogens in drinking water distribution systems. *Water Research*, 139, 168-176. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.073>.

- Yakunin E., Kostyal E., Agmon V., Grotto I., Valinsky L., Moran-Gilad J. A. (2020). Snapshot of the Prevalence and Molecular Diversity of *Legionella pneumophila* in the Water Systems of Israeli Hotels. *Pathogens*.

DOI: 10.3390/pathogens9060414. PubMed PMID: 32471136;

- Yang J., Li D., Zhan X. (2022). Concept about the virulence factor of *Legionella*. *Microorganisms*, 11(1), 74_

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11010074>.

- Yaradou D.F., Raze D., Ginevra C., Ader F., Doleans-Jordheim A., Vandenesch F., Menozzi F.D., Etienne J., Jarraud S. (2007). Zinc-dependent cytoadherence of *Legionella pneumophila* to human alveolar epithelial cells *in vitro*. *Microb. Pathog.* 2007, 43, 234–242.

- Yiallourous P. K., Papadouri T., Karaoli C., et al. (2013). First outbreak of nosocomial *Legionella* infection in term neonates caused by a cold mist ultrasonic humidifier. *Clinical Infectious Diseases*, 57, 48–56.

<https://doi.org/10.1093/cid/cit176>

- Young C., Smith D., Wafer T., Crook B. (2021). Rapid Testing and Interventions to Control *Legionella* Proliferation following a Legionnaires' Disease Outbreak Associated with Cooling Towers. *Microorganisms*, 9(3), 615. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030615>

- Yu V. L., Plouffe J. F., Pastoris M. C., Stout J. E., Schousboe M., Widmer A., Summersgill J., File T., Heath C. M., Paterson D. L., Chereshsky A. (2002). Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: An international collaborative survey. *Journal of Infectious Diseases*, 186(1), 127-128.

- Zahran S., McElmurry S. P., Kilgore P. E., Mushinski D., Press J., Love N. G., Sadler R. C., Swanson M. S. (2018). Assessment of the Legionnaires' disease outbreak in Flint, Michigan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(8), E1730–E1739.

- Żbikowska E., Kletkiewicz H., Walczak M., Burkowska A. (2014). Coexistence of *Legionella pneumophila* bacteria and free-living amoebae in lakes serving as a cooling system of a power plant. Water Air Soil Pollut, 225, 2066. <https://doi.org/10.1007/s11270-014-2066-y>
- Zhao B.B., Li X.H., Zeng Y.L., Lu Y.J. (2016). ClpP-deletion impairs the virulence of *Legionella pneumophila* and the optimal translocation of effector proteins. BMC Microbiol 16:1–12
- Zholdakova Z. I., Sinitsyna O. O., Mamonov R. A., Lebed-Sharlevich Ya. I., Pechnikova, I. A. (2019). Improvement of monitoring requirements over the application of chlorine-containing agents for water decontamination. Public Health and Life Environment – PH&LE, (12), 30-35._
<https://doi.org/10.35627/2219-5238/2019-321-12-30-35>

7.- ANEXO LEGISLATIVO:

- AENOR, Informe UNE 100030:1994. Guía para la prevención de *Legionella* en instalaciones.1994 (NO EN VIGOR).
- AENOR, norma UNE 100030:2001. Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones, 2001. (NO EN VIGOR).
- AENOR, norma UNE 100030:2005. Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones, 2005. (NO EN VIGOR).
- AENOR, norma UNE 100030:2017. Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones, 2017. (NO EN VIGOR).
- AENOR, norma UNE 100030:2023. Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones, 2023. (EN VIGOR).
- AENOR, norma UNE-EN ISO /IEC 17025: 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- AENOR, norma UNE-EN ISO /IEC 17025: 2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- AENOR, norma UNE ISO 11731-2:2004. Water quality — Detection and enumeration of *Legionella* — Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts
- AENOR, norma UNE-EN ISO 11731-2:2008. Calidad del agua. Detección y recuento de *Legionella*. Parte 2: Método de filtración directa en membrana para aguas con bajos contenidos de bacterias. (Adaptación de la norma ISO 11731-2:2004)
- AENOR, norma UNE-EN 13443-1:2003+A1:2009. Equipo de acondicionamiento del agua en el interior de los edificios. Filtros mecánicos. Parte 1: Partículas de dimensiones comprendidas entre 80 µm y 150 µm . Requisitos de funcionamiento, seguridad y ensayo.

- Real Decreto 909/2001, de 27 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. -derogado.
- 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. -derogado.
- 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.
- Real Decreto 614/2024, de 2 de julio, por el que se modifica el 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.
- Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los Criterios Sanitarios de la calidad del agua de consumo humano)- DEROGADO.
- Real Decreto 3/2023, de 10 de enero, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro.
- Real Decreto 314/2016, de 29 de julio, por el que se modifican el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de calidad del agua de consumo humano.
- Real Decreto 2210/95, de 28 de diciembre, por el que se crea la red nacional de vigilancia epidemiológica, y Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II Y III del Real Decreto anterior.
- (L1). - Guía Técnica para la Prevención Y Control de la legionelosis en instalaciones objeto del ámbito de aplicación del R.D. 865/2003. Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral.
- (L2). - Guía Técnica para la prevención y control de la legionelosis en edificios. Ministerio de Sanidad y Consumo.
- (L3). - Manual para la prevención de legionelosis en instalaciones de riesgo de la Comunidad de Madrid.
- (L4). -Ministerio de Sanidad y Consumo. Guía técnica para la prevención y control de la legionelosis en edificios: 2006.
- (L5). - Manual de prevención y control ambiental de la legionelosis de la Xunta de Galicia

- (L6). - Manual para la prevención de legionelosis en instalaciones de riesgo de la Comunidad de Madrid.
- (L7). - Guía práctica para el diseño del plan de autocontrol de *Legionella*. (Consejería de sanidad del Gobierno Vasco)
- (L8). - Decreto Foral 54/2006, de 31 de julio, por el que se establecen medidas para la prevención y control de la legionelosis.
- (L9). - Programa de Vigilancia Sanitaria para la Prevención y Control de la Legionelosis en Aragón 2006 -2012.
- (L10). - Programa de Vigilancia Sanitaria para la Prevención y Control de la Legionelosis en Aragón actualización 2017
- (L11). - Prevención y control de la legionelosis en el ámbito laboral. Junta de Andalucía
- (L12). - Manual de procedimiento para el control oficial en prevención y tratamiento de *Legionella* en instalaciones de riesgo. Junta de Extremadura.
- (L13). - Programa de prevención y Control de legionella de la Diputación de Barcelona
- (L14). - *Legionella* y ruta de la salud. Diputación de Valencia
- (L15). - Manual de Prevención Y Control de *Legionella* publica por la Dirección General de Salud Pública de Baleares. Mercedes Gumà Torà, Andrea Catalina y Mariano Soler.
- (L16). -Manual para la prevención y control de la legionelosis, aspergilosis y tuberculosis en instalaciones sanitarias. Consejería de salud de Andalucía. Año 2002.
- (L17). -European Technical guidelines for the prevention, control and investigation, of infection caused by *Legionella* species. June 2017.
- (L18). - Infektionsschutzgesetz IfGS. Legislación en Alemania sobre la prevención de *Legionella*
- (L19). - AcoP L8 . Legislación en Inglaterra sobre la prevención de *Legionella*.

- (L20). - Decreto de 1 de febrero de 2010, relativo al control de la *Legionella* en las instalaciones de producción, almacenamiento y distribución del agua caliente sanitaria. Legislación en Francia sobre la prevención de *Legionella*.
- (L21). - Guía para la prevención y el control de la legionelosis, aprobada en mayo de 2015. Legislación en Italia sobre la prevención de *Legionella*.