

Aspectos a considerar en una actualización de la normativa nacional en materia de legionelosis

Considerations on Updating the Spanish Legislation on Legionellosis

Eduardo Forján Lozano¹ · Manuel M. García Ordiales¹ · Ángel Piñero Maza¹ · Marta Forján Delgado Rocío Carrasco Zalvide¹

¹. Unidad de Protección de la Salud. Distrito Sanitario Huelva-Costa. Consejería de Igualdad, Salud y Políticas Sociales. Junta de Andalucía.

Artículo de revisión Review Article

Correspondencia Correspondence

Eduardo Forján Lozano.
Centro de Salud «El Torrejón».
Av. de las Flores, s/n 21005 – Huelva.
Teléfono: 600 166 793.
E-mail: eduardo.forjan.sspa@juntadeandalucia.es.

Financiación Fundings

Sin financiación

Agradecimientos Acknowledgments

Los autores desean agradecer a la Unidad de Protección de la Salud del Distrito Sanitario Huelva-Costa las facilidades mostradas para la realización de este trabajo.

Conflicto de interés Competing interest

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

Received: 28.12.2015
Accepted: 23.01.2016

RESUMEN

Objetivo. En España, el vigente Real Decreto 865/2003 establece una serie de medidas destinadas a la prevención de la legionelosis que inciden especialmente en el mantenimiento de las instalaciones de riesgo relacionadas con la proliferación y transmisión de *Legionella*. Este trabajo pretende revisar determinados aspectos estructurales, de mantenimiento, operacionales y documentales que, desde el punto de vista del Control Oficial, podrían ser incluidos en una futura nueva norma que pudiera ser más efectiva, si cabe, en la prevención y control de la legionelosis en las instalaciones de riesgo.

Materiales y Métodos. Se ha utilizado la normativa nacional vigente en materia de la legionelosis, documentación técnica de apoyo, otras normativas de aplicación en países de la Unión Europea, así como servicios en línea de información científica (ISI Web of Knowledge) y bases de datos de bibliografía médica (MEDLINE PubMed).

Resultados y Discusión. Tras más de una década en vigor, es necesario que ciertos aspectos técnicos de las instalaciones de riesgo en la transmisión de la legionelosis sean revisados y adecuados al conocimiento actual y a la experiencia adquirida. Entre ellos se encuentran la clasificación de riesgo de las instalaciones, aspectos técnicos y operacionales de los sistemas de agua fría de consumo humano y caliente sanitaria, de los equipos de enfriamiento evaporativos, de los sistemas de agua climatizada y de los procedimientos de toma de muestras. Por último, se discute sobre la inclusión de técnicas analíticas basadas en la Biología Molecular (qPCR) como método oficial en la determinación de *Legionella*.

Conclusiones. Una posible nueva normativa sobre prevención y control de la legionelosis debe contemplar una clasificación de las instalaciones en función del riesgo, que recoja las de reciente aparición que han sido asociadas a brotes. También deberá contar con anexos sobre las medidas preventivas para cada una de ellas, que desarrollen protocolos de toma de muestras específicos y modelos para la evaluación de riesgos adecuados que tengan en cuenta establecimientos especialmente sensibles, debería estudiarse la inclusión de las técnicas analíticas moleculares como métodos oficiales o complementarios a los oficiales. Esta actualización permitirá una actuación más rápida y eficaz ante la identificación de casos y la asociación de los mismos a las instalaciones de riesgo implicadas.

Palabras clave: *Legionella pneumophila*; legionelosis; instalaciones de riesgo; torres de refrigeración.

ABSTRACT

Objective. In Spain, Royal Decree 865/2003 establishes actions aimed at the prevention of legionellosis on the maintenance of systems related to the proliferation and transmission of the disease. This work aims to review certain structural, operational, of maintenance and documentary aspects which, from the point of view of Official Control, could be included in a future new legal regulation that might be more effective in preventing the emergence and proliferation of *Legionella* in the risk systems.

Materials y Methods. To carry out this work Spanish legislation on *Legionella*, technical support documentation, other regulations from countries of EU and online services of scientific information (ISI Web of Knowledge) and databases of medical literature (MEDLINE PubMed) were used.

Results and Discussion. After more a decade, it is necessary that certain technical aspects of risk systems in the transmission of legionellosis are reviewed and adapted to current knowledge and experience. These include the risk classification of the systems, technical and operational aspects of cold drinking

and hot water systems, evaporative cooling equipment, spa pools and sampling procedures. Finally, the inclusion of molecular analytical techniques based qPCR as official methods in determining *Legionella* is discussed.

Conclusions. A new legal regulation on the prevention and control of legionellosis should include a classification risk-based of the systems that collect emerging that have been associated with outbreaks. It must have annexes on preventive action to each of them, specific sampling procedures and models to assess appropriate risk that take into account sensitive establishments. Last it should be considered including molecular analytical techniques such as official or complementary methods. This update will allow a faster and more effective performance at identifying cases and associating them to risk systems.

Key words: *Legionella pneumophila*; risk systems; legionellosis; cooling towers.

INTRODUCCIÓN. LA LEGIONELOSIS.

Legionella pneumophila fue identificada por primera vez en un brote producido en participantes de la Convención de la Legión Americana celebrada en Philadelphia en 1976¹. Posteriormente, de forma retrospectiva, se ha publicado que ha sido la causa de casos de legionellosis desde el año 1947². El género *Legionella* se constituye por bacilos Gram (-) aerobios, incluidos hasta ahora en 59 especies³ que comprenden al menos 70 serogrupos, todos ellos considerados patógenos humanos potenciales⁴. El más importante es *Legionella pneumophila* serogrupo 1, responsable del 90 % de los casos de legionellosis neumónica y no neumónica (fiebre de Pontiac) descritos en humanos^{5,6}. La forma más grave de la enfermedad se presenta como una neumonía severa, con una tasa de letalidad entre el 5-10 %, que puede llegar al 80 % en pacientes inmunodeprimidos sin tratamiento⁷. El periodo de incubación oscila entre 2 y 10 días, aunque puede llegar a los 16 días. Entre los síntomas más frecuentes se encuentran fiebre, tos, dolores musculares y de cabeza, letargia, malestar general, hemoptisis, etc. En casos graves puede producirse fallo respiratorio y/o multiorgánico y, en último término, la muerte⁷. Puede considerarse que la legionellosis es una enfermedad oportunista, dado que raramente se presenta en personas sanas. Entre los factores de riesgo que predisponen a sufrir legionellosis se encuentran la edad avanzada (el 75-80 % de los casos tienen más de 50 años), el género masculino (constituye el 60-70 % de los casos), el tabaquismo, trasplantes, la presencia de trastornos crónicos de pulmón o riñón, de diabetes y de ciertas enfermedades asociadas a estados inmunodeficientes^{7,8,9}. Aunque no es frecuente, se han descrito casos en niños en los que el origen de la infección estuvo en el agua¹⁰. La forma más benigna de la enfermedad o forma no neumónica se conoce con el nombre de fiebre de Pontiac, proceso agudo de corto periodo de incubación (48 horas) con síntomas

similares a los de una gripe. Aunque no existe un consenso entre los investigadores sobre por qué la exposición a *Legionella pneumophila* da lugar a legionellosis o a fiebre de Pontiac⁵, algunos autores han publicado que la fiebre de Pontiac podría estar provocada por la exposición a una mezcla de bacterias vivas, endotoxinas y bacterias muertas, incapaces de causar neumonía¹¹.

L. pneumophila es una bacteria ambiental de distribución mundial. Las aguas superficiales de lagos, ríos, embalses, estanques y otros reservorios constituyen sus nichos naturales. Desde ellos puede colonizar los sistemas de abastecimiento de agua fría de consumo humano (AFCH), caliente sanitaria (ACS), u otros sistemas que requieran de agua para su funcionamiento, como torres de refrigeración (TR), condensadores evaporativos (CE) o fuentes ornamentales, entre otros. Estas instalaciones pueden favorecer su crecimiento y proliferación, sobre todo si el agua se encuentra a temperaturas entre 20-50 °C (óptima 37 °C) y presentan un estado de mantenimiento deficiente⁷. También se ha aislado en suelos y abonos agrícolas¹². En el nicho acuático la bacteria dispone de varias estrategias de supervivencia, entre las que se encuentra su multiplicación en protozoos (como *Acanthamoeba*, *Hatmannella* y *Tetrahymena*^{13,14}) y en biofilms, formados naturalmente en las redes de distribución de agua^{15,16}. Ambas estrategias le permiten protegerse de agresiones externas, como aumentos de temperatura o altas concentraciones de biocidas, lo que hace difícil erradicar *Legionella* en instalaciones que necesitan agua para su funcionamiento^{17,18}.

Para que *Legionella* produzca infección en el hombre es necesario que el microorganismo cuente con una vía de entrada a la instalación (sistema de AFCH), que se multiplique en el mismo hasta conseguir concentraciones infectivas, que se disperse en el aire formando aerosoles mediante un dispositivo o mecanismo de dispersión, que la cepa sea virulenta para el hombre y que, por último, individuos susceptibles se expongan a los aerosoles que contienen *Legionella* viable¹⁹. La legionellosis no se transmite de persona a persona²⁰. La infección en humanos se produce por la inhalación de gotículas aerosolizadas, inferiores a 5 µm, que son las que pueden llegar a alcanzar pulmones y conductos respiratorios²¹, o por la aspiración del agua contaminada con células de *Legionella*, principal mecanismo de transmisión en el ámbito hospitalario²². Las dosis infectivas de *Legionella* no han podido ser aún establecidas, aunque la invasión y replicación de *Legionella* en protozoos es fundamental en la transmisión de la enfermedad, dado que aumenta su supervivencia en el ambiente y su virulencia^{13,14,23}.

La legionellosis puede adquirirse en los ámbitos comunitario y hospitalario, y en ambos puede presentarse en forma

de brotes o como casos aislados. En nuestro país es una enfermedad de declaración obligatoria desde el año 1997²⁴. Al igual que ocurre en otros países, la mayoría de los casos detectados son comunitarios, frecuentemente no asociados a fuente conocida²⁵, y agrupados durante las estaciones cálidas^{14,25}. Los equipos de enfriamiento evaporativo

son las instalaciones a las que se han asociado los brotes más importantes, seguidos de los sistemas de agua consumo humano de hoteles, hospitales y balnearios²⁶. La Tabla 1 muestra una relación de los brotes de legionelosis más importantes ocurridos en España en el periodo 2000-2014.

Tabla 1. Principales brotes de legionelosis acaecidos en España (2000-2014).

Lugar (año)	Tipo	Nº Casos	Instalaciones asociadas	Asociación clínica con casos ^a
Murcia (2001) ²⁷	Comunitario	460	TR, ACS	Si
Mataró (2002) ²⁸	Comunitario	151	TR	Si
Barcelona (2004) ²⁹	Nosocomial	33	TR	Si
Vic y Gurb (2005) ³⁰	Comunitario	55	TR	Si
Castellón (2006) ³¹	Comunitario	5	TR	No
Pamplona (2006) ³²	Comunitario	146	TR	Si
Alcoy (2009) ³³	Comunitario	11	Camión cisterna Fresadora	Si
Calpe (2012) ³⁴	Comunitario Asociado viajes	25	No identificada (probable SPA)	No
Móstoles (2012) ³⁵	Comunitario	46	Depuradora de fuente, champañera	Si

^aLa cepa detectada en todos los brotes fue *L. pneumophila serogrupo 1*. TR: Torre/s de Refrigeración. ACS: Agua Caliente Sanitaria.

En Europa, las cifras de incidencia notificadas varían de un país a otro, dependiendo de las características de los sistemas de vigilancia nacionales implantados. España se encuentra entre los países de la Unión Europea con una incidencia más alta, lo que podría indicar una buena práctica de identificación, diagnóstico y notificación de casos en nuestro país³⁶. A nivel mundial, en los últimos años se ha observado un leve aumento en la incidencia de casos de legionelosis³⁷. No obstante, se acepta que el número de casos detectados está subestimado, debido a que la neumonía causada por *Legionella* es a menudo clínicamente indistinguible de otras neumonías causadas por otros gérmenes¹⁴.

La normativa vigente en nuestro país sobre legionelosis (Real Decreto 865/2003) ha conseguido su objetivo, que no era otro que el de salvaguardar la salud de la población, protegiendo y mejorando la calidad de vida de las personas³⁸. No obstante, después de 12 años creemos que algunos aspectos técnicos incluidos en ella deben ser revisados y adecuados al conocimiento actual y a la experiencia adquirida. Este trabajo pretende revisar determinados aspectos estructurales, de mantenimiento, operacionales y documentales que, desde el punto de vista del Control Ofi-

cial, podrían ser incluidos en una futura nueva norma que pudiera ser más efectiva, si cabe, en la prevención y control de la legionelosis en las instalaciones de riesgo.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Para la realización de este trabajo se ha utilizado toda la normativa nacional vigente y documentación técnica de referencia en materia de la legionelosis. También se han revisado normas y Guías de Mantenimiento de Instalaciones de Riesgo de aplicación en diversos países de la Unión Europea. Por último, para el estudio de los trabajos publicados se han utilizado servicios en línea de información científica, como la ISI Web of Knowledge, bases de datos de bibliografía médica, como la National Library of Medicine (Washington DC; MEDLINE PubMed), y otras informaciones disponibles *on line*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Normativa de aplicación en la prevención de la legionelosis.

Los programas de Salud Pública de los sistemas sanitarios deben incluir la prevención de los riesgos asociados a ins-

instalaciones implicadas en la transmisión de la legionelosis³⁹. La mayoría de los brotes de legionelosis asociados a estas instalaciones se pueden prevenir, y ello se sustenta en lo mucho que conocemos para su control, en los procedimientos de evaluación de riesgo de estas instalaciones y en la normativa existente que permite la intervención de las autoridades de Salud Pública, en caso necesario, para proteger la salud de la comunidad²⁶. Actualmente, en un gran número de países, entre ellos España, son de aplicación normas y Guías que tratan de prevenir el crecimiento y proliferación de *Legionella* en instalaciones de riesgo, aunque aún existen algunos países europeos que carecen de directrices específicas acerca del mantenimiento de estas instalaciones⁴⁰. Estas Guías desarrollan distintas formas de evaluar el riesgo, aunque coinciden en que unas buenas prácticas de mantenimiento son fundamentales para prevenir el crecimiento de la bacteria, en que su erradicación no es posible y que el objetivo ha de centrarse en reducir al mínimo la colonización del agua.

La primera legislación específica de ámbito nacional sobre prevención y control de la legionelosis publicada en nuestro país fue el Real Decreto (RD) 909/2001⁴¹. Esta norma fue revisada y reemplazada por el RD 865/2003³⁸, actualmente vigente, que establece una serie de medidas destinadas a la prevención de la legionelosis que inciden especialmente en el mantenimiento de las instalaciones de riesgo relacionadas con la proliferación y transmisión de la enfermedad. El Reglamento de Instalaciones Térmicas de los Edificios (RITE), aprobado por el RD 1027/2007⁴², también regula en su articulado algunos aspectos relacionados con la legionelosis y los sistemas de ACS y TR. Además existe documentación complementaria, como la Norma UNE 100030:2005 IN⁴³ y la Guía Técnica para la Prevención y Control de la Legionelosis en instalaciones (GT)⁴⁴, elaborada por el Ministerio de Sanidad y Consumo en base a lo dispuesto en la disposición final segunda del RD 865/2003. Esta Guía vino a aclarar numerosos aspectos técnicos no contemplados en la citada norma.

En España existe además legislación complementaria en algunas Comunidades Autónomas, como Madrid, Cataluña, Aragón, Andalucía, Extremadura, Galicia o la Comunidad Valenciana. En Andalucía, desde el año 2002, está vigente un Decreto que regula algunos aspectos relacionados con instalaciones de menor riesgo⁴⁵. En nuestra Comunidad corresponde a la Consejería de Igualdad, Salud y Políticas Sociales de la Junta de Andalucía, la inspección, evaluación y coordinación de las actuaciones que procedan en las instalaciones de riesgo y ante la aparición de casos de legionelosis. Los Distritos de Atención Primaria del Servicio Andaluz de Salud son los encargados de desarrollar el Programa anual de Prevención de la Legionelosis y son los agentes de

Salud Pública del CSFISSJA (Cuerpo A4) los encargados de comprobar el cumplimiento de la normativa en materia de *Legionella* en las instalaciones de riesgo.

Clasificación de las instalaciones de riesgo.

El RD 865/2003 clasifica en tres categorías diferentes las posibles fuentes de infección en función de la probabilidad de proliferación y dispersión de *Legionella* (Tabla 2). Según se tipifiquen de mayor o menor riesgo, la norma recoge las características de los programas de mantenimiento de estas instalaciones, más exhaustivos y completos en el caso de las primeras. Para establecer este sistema de clasificación se ha tenido en cuenta fundamentalmente la proliferación y diseminación de la bacteria en una serie de condiciones. Sin embargo, todas pueden actuar como reservorios y en algunas de ellas es necesario tener también en cuenta aspectos como el grado de dispersión o aerosolización y la posible población afectada. Así, un sistema de ACS con acumulación y circuito de retorno (CR) se tipifica de mayor riesgo y ello se explica porque el CR aumenta el riesgo de proliferación de *Legionella*. Sin embargo, el mismo tipo de instalación sin CR se considera de menor riesgo y por ello se le exigen menores requerimientos en su Programa de Mantenimiento, cuando podría prestar servicio a un establecimiento en el que reside población susceptible a la enfermedad. En los últimos años ha aumentado el número de brotes asociados a ámbitos cerrados como las residencias de ancianos, por lo que el mantenimiento de estas instalaciones requiere de una especial atención dada las características de sus residentes²⁶. Otro ejemplo se encuentra en ciertas fuentes ornamentales que presentan un alto grado de pulverización, que están localizadas en núcleos de urbanos alta densidad poblacional y cuya agua soporta altas temperaturas durante gran parte del año. Según nuestra normativa, una fuente ornamental es una instalación de menor riesgo, cuando podría considerarse de alto riesgo si se tienen en cuenta factores como la posible población afectada, el grado de pulverización del agua o la localización. En estos casos podría ser conveniente realizar una evaluación de riesgos inicial pormenorizada de cada instalación y, en función del resultado, determinar si el establecimiento es de mayor o menor riesgo⁴⁶.

Es fundamental, por tanto, contar con una evaluación de riesgos fidedigna de las instalaciones y establecimientos. La GT aporta unas tablas que permiten realizar la evaluación de las instalaciones de riesgo, aunque para que se obtengan resultados que conlleven medidas correctoras la instalación ha de estar en condiciones muy deficientes. Además, los modelos aportados no contemplan aspectos como el número de instalaciones existentes en el establecimiento, las poblaciones expuestas, la existencia de incidencias (brotes) o el grado de confianza o implicación, referido a la im-

plantación del programa de mantenimiento, por parte de los responsables. De ello se traduce que la evaluación debe incluir el tipo de establecimiento en el que se encuentran las instalaciones de riesgo.

Tabla 2. Instalaciones de riesgo en la proliferación y dispersión de *Legionella*³⁸.

Instalaciones con menor probabilidad de proliferación y dispersión de <i>Legionella</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Torres de refrigeración y condensadores evaporativos. • Sistemas de agua caliente sanitaria con acumulador y circuito de retorno. • Sistemas de agua climatizada con agitación constante y recirculación a través de chorros de alta velocidad o la inyección de aire: spas, jacuzzis, piscinas, vasos o bañeras terapéuticas, bañeras de hidromasaje, tratamientos con chorro a presión, otras. • Centrales humidificadoras industriales.
Instalaciones con mayor probabilidad de proliferación y dispersión de <i>Legionella</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Sistemas de instalación interior de agua fría de consumo humano (tuberías, depósitos, aljibes), cisternas o depósitos móviles y agua caliente sanitaria sin circuito de retorno. • Equipos de enfriamiento evaporativo que pulvericen agua, no incluidos en el apartado 2.1º. • Humectadores. • Fuentes ornamentales. • Sistemas de riego por aspersión en el medio urbano. • Sistemas de agua contra incendios. • Elementos de refrigeración por aerosolización, al aire libre. • Otros aparatos que acumulen agua y puedan producir aerosoles.
Instalaciones de riesgo en terapia respiratoria
<ul style="list-style-type: none"> • Equipos de terapia respiratoria. • Respiradores. • Nebulizadores. • Otros equipos médicos en contacto con las vías respiratorias.

Equipos de enfriamiento evaporativo: Torres de Refrigeración y Condensadores Evaporativos.

Estos dispositivos han dado lugar a un alto número de brotes de legionelosis de gran repercusión, debido fundamentalmente a la gran capacidad de dispersión del germen y al alto número de personas afectadas. El RD 865/2003 establece que TR y CE deberán disponer de sistemas de dosificación en continuo, que no deben confundirse con los sistemas de dosificación automáticos. La GT explica el significado del término «en continuo» como aquel que consiga la concentración efectiva del biocida, pero también recoge que todos los productos químicos empleados en el tratamiento deben aplicarse en puntos en los que se asegure la mezcla adecuada con el agua circulante, de la forma más automatizada posible, y que la dosificación puede hacerse mediante bomba dosificadora temporizada, proporcional al caudal de agua de entrada al sistema o comandada por una sonda de medición de la concentración residual de biocida⁴⁷. Países como Australia⁴⁸, Gran Bretaña⁴⁹ o Irlanda⁴⁶ han recogido en su legislación y guías que estos equipos han de contar con dosificación automática. En nuestro país, normativas de Comunidades como la de Navarra⁵⁰ o la de Aragón⁵¹ también recogen este aspecto.

Respecto a las tareas de revisión, el RD 865/2003 establece una revisión anual para el separador de gotas, cuando la GT indica una revisión semestral. Sería necesario recoger en la normativa esta periodicidad con objeto de evitar confusiones. En la práctica, estas revisiones suelen realizarse semestralmente puesto que los responsables de mantenimiento las hacen coincidir con las revisiones semestrales del relleno en las TR o de las tuberías y condensador en los CE.

Por último, podría plantearse la necesidad de que TR y CE cuenten con sistemas de filtración en el agua de aporte⁵², tal y como se exige en los sistemas de AFCH. Para controlar los sólidos en suspensión es importante poner en marcha mecanismos que eviten la entrada de los mismos en el sistema⁴⁷. La Guía Técnica sobre TR y Condensadores como factor de riesgo de difusión de *Legionella* (RITE) recoge que conviene que estos dispositivos dispongan de un sistema eficaz de filtrado de agua, con circulación en derivación con la balsa de agua, que elimine materias en suspensión de forma continua⁵³. El mismo planteamiento podría aplicarse a las fuentes ornamentales.

Sistemas de Agua Fría de Consumo Humano.

La instalación de AFCH es muy importante en la prevención de *Legionella*, no en vano es la puerta de entrada del microorganismo. Eliminar la bacteria una vez que ha colonizado estos sistemas es difícil y en la mayoría de las ocasiones solo podemos aspirar a controlar su proliferación^{17,18}. Los tratamientos de choque consiguen una importante reducción de *Legionella* en estos sistemas pero no la eliminan completamente. Una de las medidas preventivas para evitar la entrada de la bacteria en estos sistemas es la colocación de un sistema de filtración que, según el RD 865/2003, ha de cumplir la norma UNE-EN 13443-1 (tamaño de poro 80-150 µm, preferiblemente autolimpiante con lavado a contracorriente sin interrupción del paso de agua)³⁸. No obstante, se ha propuesto disminuir estos micrajes por los dispuestos en el vigente Código Técnico de la Edificación, que los sitúa entre los 50-80 µm⁵⁴. El uso de filtros en puntos terminales es muy eficaz, aunque su uso está limitado por su alto coste en habitaciones de pacientes hospitalarios de alto riesgo¹⁸.

Otros aspectos, como el control de pH en el agua, la realización de análisis para determinar *Legionella sp.* o las acciones correctoras a ejecutar en función de los resultados obtenidos de temperatura, pH, Cloro Libre Residual (CLR) y *Legionella sp.*, se desarrollan en la GT⁵⁵. La instalación de dos depósitos en paralelo cuando se requiera de acumulación de agua fría, para asegurar el servicio durante las actuaciones de limpieza, se recoge en la norma UNE-EN 100030⁴³.

Sistemas de Agua Caliente Sanitaria.

Los sistemas de ACS con acumulación y CR son, junto con los sistemas de enfriamiento evaporativo, instalaciones en las que *Legionella* puede crecer y proliferar rápidamente, especialmente si presentan un mal estado de mantenimiento. Por ello se proponen algunas medidas que puedan disminuir aún más el riesgo en estas instalaciones. En este sentido, el RITE recoge que los establecimientos de alto riesgo se han de diseñar para mantener el agua permanentemente a 70 °C, proponiéndose incluso el sistema de doble intercambiador para que el agua de aporte y la de retorno pasen también por una desinfección térmica a esta temperatura⁵⁶.

El RD 865/2003 establece que la instalación interior de agua de consumo humano deberá facilitar la accesibilidad a los equipos para su inspección, limpieza, desinfección y toma de muestras. La norma también recoge que trimestralmente se deberá revisar el estado de conservación y limpieza de los depósitos acumuladores y que en los mismos debe comprobarse mediante inspección visual que no presentan suciedad general, corrosión o incrustaciones. La GT se pronuncia en el mismo sentido, indicando que esta actividad

se realizará con el fin de detectar la presencia de sedimentos, incrustaciones, productos de la corrosión, lodos y cualquier otra circunstancia que altere o pueda alterar el buen funcionamiento de la instalación. Según lo anterior, sería imposible comprobar el estado de conservación y limpieza de los depósitos acumuladores si estos no se abren. Por ello, la GT va un poco más allá y establece la obligatoriedad de que, en función del volumen almacenado, los acumuladores de ACS de sistemas con CR cuenten con boca de mano (< 750 l) o boca de hombre (> 750 l). Frecuentemente, durante las visitas de inspección, los técnicos encargados del mantenimiento de estos dispositivos mantienen que es contraproducente la apertura trimestral de los acumuladores, ya que ello puede dañar juntas y tornillería de los equipos. Se propone que estas revisiones se hicieran anualmente, coincidiendo con las actividades anuales programadas de limpieza y desinfección, y en aquellos casos en los que se requiera tras un resultado anómalo de las purgas semanales. El estado del agua purgada determinaría en este caso la realización de una revisión de todo el acumulador. Países, como Irlanda⁵⁷ o Gran Bretaña⁵⁸ han adoptado esta periodicidad.

Sistemas de Agua Climatizada.

El Anexo 5 del RD 865/2003 se ocupa de los sistemas de agua climatizada con agitación constante y recirculación a través de chorros de alta velocidad o de inyección de aire. En el mismo se establece que en las piscinas con recirculación de uso colectivo el agua debe ser renovada continuamente a razón de 3 m³/h para cada 20 usuarios durante las horas de uso, lo cual resulta bastante complicado de comprobar. Por ello, la GT indica que la renovación se realice en función del volumen de la piscina o jacuzzi, de forma que si es superior a 10 m³ se deberá renovar el 5 % de este volumen diariamente⁵⁹, valor recogido en la mayoría de las normativas autonómicas de piscinas. Para establecer los tiempos de recirculación y la determinación de otros parámetros físico-químicos y microbiológicos en el agua de estas instalaciones, la GT recoge que se deberán tener en consideración los análisis indicados en las normativas de piscinas⁵⁹.

Si es necesario aclarar que hay aspectos en la GT que no coinciden con lo expuesto en la norma. El RD 865/2003 establece que los niveles de cloro y bromo libre residual de bañeras y piscinas de hidromasaje de uso colectivo han de situarse entre 0.8-2 ppm y 2-4 ppm, respectivamente³⁸. La Guía recomienda unos valores más altos, entre 2-5 ppm para el CLR y entre 3-6 ppm para el bromo. Algo similar ocurre con las desinfecciones de mantenimiento en continuo. La norma establece una desinfección diaria con cloro o bromo hasta alcanzar 5 ppm en el sistema, recirculando

un mínimo de 4 horas por todo el circuito. Al respecto, la GT recoge que, dado que la desinfección de mantenimiento en continuo para este tipo de sistemas ya alcanza generalmente estos valores, no se considera necesaria la realización rutinaria de desinfecciones de choque. Igual ocurre con el límite establecido para la turbidez por el RD 865/2003 (0.5 NTU), aumentado a 2 en la GT⁵⁹.

Otras instalaciones de riesgo.

En los últimos años se han publicado casos de legionelosis asociados a ambientes o instalaciones que parecían tener bajo riesgo, o bien se ha demostrado la presencia de *Legionella* en los mismos. Se han referido casos asociados a prácticas de nacimiento en medio acuático⁶⁰, humidificadores domésticos⁶¹, máquinas de hielo⁶², unidades dentales⁶³, generadores de niebla usados en supermercados⁶⁴, camiones cisterna de riego de vías públicas³³, lavaderos de coche y túneles de autolavado⁶⁵ y establecimientos de restauración que contaban con diversos equipos de enfriamiento³⁵. En los últimos años han proliferado equipos de enfriamiento evaporativo con sistemas de pulverización/nebulización de agua mediante boquillas, utilizados para crear microclimas durante los meses cálidos en ambientes externos de establecimientos de restauración⁶⁶. Así mismo, también se ha aislado *Legionella* de duchas y lavapiés ubicados en playas⁶⁷ y en aguas y filtros de piscinas⁶⁸. En este sentido, la nueva normativa nacional de piscinas⁶⁹ recoge la determinación obligatoria de *Legionella* en vasos con aerosolización y climatizados, cumpliendo así la recomendación de la OMS⁷⁰. La mayoría de estos sistemas no se recogen de forma expresa en la normativa, no disponen de capítulos específicos en la GT y no suelen estar integrados en los programas de intervención del control oficial en las distintas comunidades autónomas.

Toma de muestras. Protocolos de muestreo.

La toma de muestras es un procedimiento clave en el control de *Legionella* en las instalaciones de riesgo, ya que permite descartar o confirmar fuentes potenciales de exposición y, ante la aparición de casos de legionelosis, realizar tratamientos con objeto de evitar nuevos casos. También determina el éxito de los ensayos, de forma que una mala praxis en el muestreo puede llevar a que los casos no puedan correlacionarse con las cepas de *Legionella* que colonizan los sistemas contaminados⁷¹.

El RD 865/2003 desarrolla en su Anexo 6 la toma de muestras en depósitos y redes de agua caliente y fría, y en equipos de enfriamiento evaporativo, aunque la GT desarrolla procedimientos de toma de muestras para todas las instalaciones. La toma de muestras debe ser representativa del sistema que queremos analizar, ha de diseñarse en función

de la finalidad del ensayo y han de ser realizadas por personal con formación adecuada para ello²⁰. El conocimiento de la instalación, la elección, localización y representatividad de los puntos de muestreo, el momento del muestreo en relación con las operaciones de control que se llevan a cabo, el procedimiento de recogida (calidad) y el adecuado transporte y almacenamiento de las muestras⁷², son factores fundamentales a la hora de realizar la toma de muestras, que deberá ir encaminada a los puntos más desfavorables. Todo esto hace necesario unificar los protocolos de toma de muestras para la determinación de *Legionella* en Guías consensuadas y, en este tema, el Departamento de Sanidad y Consumo del Gobierno Vasco ha revisado los procedimientos de muestreo establecidos por los diferentes organismos internacionales⁷³. Como ejemplo, en los sistemas de ACS y AFCH desarrolla dos procedimientos distintos en función de que se pretenda muestrear la red o el punto terminal. También recoge una tabla en la que se detalla el número de muestras a tomar en función del número de terminales en la red. Un sistema de distribución de aguas de un hospital o de un hotel puede contener cientos de puntos terminales y kilómetros de tuberías, conformando un enorme escenario donde las condiciones pueden ser absolutamente diferentes de un sitio a otro⁷⁴. En este sentido, la legislación francesa establece que en los sistemas de ACS no utilizados durante varias semanas hay que tomar muestras para determinar *Legionella* tras la purga de las redes y en las dos semanas anteriores a la apertura al público, de forma que los resultados de los análisis estén disponibles antes de la apertura del establecimiento⁷⁵. Este sería un aspecto muy interesante a solicitar en aquellos establecimientos turísticos de apertura estacional.

Respecto a la periodicidad trimestral de muestreo para *Legionella* establecida en equipos de enfriamiento evaporativo, es necesario remarcar que la mayoría de los brotes de legionelosis ocurre en los meses calurosos¹⁴, lo que justificaría por sí mismo obligar a TR y CE de funcionamiento estacional a realizar muestreos mensuales, coincidiendo con la realización de los ensayos físico-químicos establecidos. El aumento en la frecuencia de determinación de la bacteria sería también necesario en aquellas instalaciones asociadas a brotes, no bastando con el análisis a realizar tras 15 días de los tratamientos, y obligando a realizar un seguimiento periódico, mensual por ejemplo, durante un periodo de tiempo determinado.

Por último, como ocurre en otros países, se podría exigir la acreditación del ensayo para la determinación de *Legionella*⁷⁵, o incluso del proceso de toma de muestras⁷⁶, y contemplar otros métodos de ensayo, además de los basados en la microbiología tradicional. Este último aspecto se trata en el siguiente punto.

Ensayos de determinación de *Legionella*: Microbiología convencional vs PCR.

En los últimos años, el método utilizado para la determinación de *Legionella* ha sido uno de los principales temas de discusión para los investigadores. En nuestra normativa el cultivo mediante técnicas de microbiología convencional es el método de referencia para la detección de *Legionella* en muestras de agua^{38,77}. Para algunos autores este es el método de elección⁷⁸, sin embargo presenta algunos inconvenientes como: a) Largos tiempos de incubación, de hasta 10 días; b) No todas las especies crecen en el medio BCYE, de baja sensibilidad diagnóstica⁷⁹; c) Sobreestimación de *Legionella* en la muestra debido a la presencia de especies similares pertenecientes a otras familias, como *Chitinofagaceae*⁸⁰; d) Pérdida de viabilidad/cultivabilidad en la bacteria debido a pretratamientos de la muestra⁸¹ o tras realizar tratamientos de desinfección⁸²; e) Dificultad de detección de *Legionella* por su habilidad para parasitar amebas, protozoos y ciliados^{14,71}; f) Subestimación del total de células infectivas debido a la presencia de células viables no cultivables (CVNC)^{15,16,83}. En relación a este punto, las células de *Legionella* pueden llegar a este estado de CVNC cuando se exponen a ambientes escasos en nutrientes, estrés osmótico u oxidativo o a tratamientos de desinfección con biocidas o con temperaturas altas^{82,83}, lo que sugiere que se trataría de una estrategia adaptativa para aumentar su supervivencia ante condiciones ambientales desfavorables¹⁶. Estas células no crecen en los medios de cultivo o no son detectables, aunque mantienen intacta su membrana y material genético, son metabólicamente activas y mantienen su virulencia⁸⁴, lo que hace que un resultado negativo utilizando técnicas de microbiología convencional no asegura que *Legionella* no esté presente¹¹. En definitiva, el método oficial de determinación de *Legionella* en muestras de agua podría subestimar el número total de bacterias viables en una muestra⁸³ y dar lugar a resultados falsos negativos^{11,85}.

Por otro lado, para gestionar eficazmente los riesgos en Salud Pública, comenzaron a desarrollarse métodos moleculares más rápidos para identificar *Legionella* basados en la amplificación del ADN cromosómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos ensayos han utilizado como dianas el gen *mip* (potenciador de la infectividad a macrófagos) y los genes que codifican las subunidades 5S y 16S del ARNr. Estas técnicas revolucionarias permitieron la amplificación y detección del germen en una única reacción⁸⁶, aunque sin cuantificar su número. Posteriormente se desarrollaron técnicas de PCR cuantitativa (qPCR) que permitieron esta cuantificación, aunque quedaba aún por demostrar si el material genético detectado procedía de células viables o de células muertas⁸⁷. En los últimos 10 años se han propuesto métodos que ofrecen resultados cuanti-

tativos, obtenidos por qPCR, de *Legionella* en muestras de aguas que permiten cuantificar de forma específica los microorganismos viables. La estrategia más utilizada se basa en el empleo de sondas marcadas con fluoróforos (Etidio Monoazida, EMA; Propidio Monoazida, PMA) que se intercalan de forma selectiva en el ADN de células con daños en membranas. Una vez dentro de la célula no viable, el grupo azida se expone a luz visible para generar un radical nitreno altamente reactivo que se fija al ADN, impidiendo así la amplificación por PCR de las células muertas^{80,88,89}. La principal limitación del método radica en que el concepto de viabilidad se apoya en la integridad de la membrana, de hecho la amplia mayoría de las células con membranas permeables al PMA no son viables, pero no todas las células no viables tienen las membranas dañadas⁹⁰.

Una nueva normativa en materia de legionelosis debe tener en cuenta los progresos técnicos que se han realizado en el campo de la identificación de *Legionella* en muestras de agua. Los métodos moleculares basados en la qPCR ya se han convertido en una alternativa real^{91,92} y podría aceptarse esta técnica para la toma de decisiones urgentes ante brotes, especialmente como *screening* negativo. Cada método tiene sus ventajas e inconvenientes, pero es necesario abrir el abanico de pruebas a los métodos moleculares, ampliamente reconocidos por la comunidad científica y que pueden actuar como complemento ideal de las técnicas microbiológicas convencionales. Mientras tanto, en el año 2006, la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR) estableció un método estandarizado para la utilización de la PCR en el análisis de agua que permitía la detección específica y cuantificación de *L. pneumophila*⁹¹. Otros países, como Irlanda, también han reconocido este método para la detección y cuantificación de especies de *Legionella*⁹³.

CONCLUSIONES.

El RD 865/2003 ha estado vigente desde el año 2003 y durante este tiempo ha demostrado ser válido en la prevención y control de la legionelosis. Se han producido avances en el conocimiento de las características epidemiológicas asociadas a brotes, en la identificación de nuevas fuentes de infección, en el mantenimiento de las instalaciones de riesgos y en su control. Aun así, siguen produciéndose brotes de legionelosis que provocan alarma social y preocupación en todos los profesionales que trabajan en su control. Ha transcurrido más de una década y es necesario adaptarse a los progresos técnicos aparecidos en este tiempo y tener en cuenta la experiencia adquirida por todos los actores intervinientes, actualizar diversos aspectos documentales, operacionales y de mantenimiento de las instalaciones de riesgo implicadas. Una posible nueva normativa debe contemplar una clasificación de las instalaciones (fuentes de

infección) en función del riesgo, que recoja las de reciente aparición que han sido asociadas a brotes. También deberá contar con anexos sobre las medidas preventivas para cada una de ellas, que desarrollen protocolos de toma de muestras específicos y modelos para la evaluación de riesgos adecuados que tengan en cuenta establecimientos especialmente sensibles, y deberá estudiarse la inclusión de las técnicas analíticas moleculares como métodos oficiales o complementarios a los oficiales. Es cierto que aún existen incertidumbres asociadas a los riesgos a sufrir legionelosis, pero esta actualización permitirá una actuación más rápida y eficaz ante la identificación de casos y la asociación de los mismos a las instalaciones de riesgo implicadas, todo con el objetivo último de proteger la salud de la población.

BIBLIOGRAFÍA

- Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG *et al.*. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med.* 1977; 297:1189-1197.
- Terranova W, Cohen ML, Fraser DW. 1974 outbreak of Legionnaires' disease diagnosed in 1977. Clinical and epidemiological features. *Lancet* 1978;2:122-124.
- List of Prokaryotic names with standing in nomenclature [Internet]. Disponible en: <http://www.bacterionet/legionella.html>.
- Mercante JW, Winchell JM. Current and Emerging *Legionella* Diagnostics for Laboratory and Outbreak Investigations. *Clinical Microbiology Reviews* 2015;28:95-133.
- Diederer BMW. *Legionella spp.* and Legionnaires' disease. *J Infect.* 2008;56: 1-12.
- Den Boer JW, Bruin JP, Verhoef LPB, Van der Zwaluw K, Jansen R, Yzerman EPF. Genotypic comparison of clinical *Legionella* isolates and patient-related environmental isolates in The Netherlands, 2002-2006. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:459-466.
- World Health Organization. Legionellosis. Fact sheet No 285. 2014. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs285/en/>.
- McCormick D, Thorn S, Milne D, Evans C, Stevenson J, Llano M *et al.*. Public health response to an outbreak of Legionnaires disease in Edinburgh, United Kingdom. *Eurosurveillance* 2012;17:1-4.
- Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, Stagg HR, Zhang N, Kumar K *et al.*. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis.* 2014;14:1011-1021.
- Greenberg D, Chiou CC, Famigilletti R, Lee TC, Yu VL. Problem pathogens: Pediatric legionellosis-implications for improved diagnosis. *Lancet* 2006;6:529-535.
- Whiley H, Keegan A, Fallowfield H, Ross K. Uncertainties associated with assessing the public health risk from *Legionella*. *Frontiers in microbiology* 2014;5:1-8.
- Lindsay DS, Brown AW, Brown DJ, Pravinkumar SJ, Anderson E, Edwards GF. *Legionella longbeachae* serogroup 1 infections linked to potting compost. *J Med Microbiol.* 2012;61:218-222.
- Cirillo JD, Cirillo SL, Yan L, Bermudez LE, Falkow S, Tompkins LS. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* 1999;67:4427-4434.
- Walser SM, Gerstner DG, Brenner B, Höller C, Liebl B, Herr CEW. Assessing the environmental health relevance of cooling towers-A systematic review of Legionellosis outbreaks. *Int J Hyg Environ Health* 2014;217:145-154.
- Chang B, Sugiyama K, Taguri T, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H. Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated dithionite and PCR/real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:147-153.
- Ducret A, Chabalier M, Dukan S. Characterization and resuscitation of 'non-culturable' cells of *Legionella pneumophila*. *BMC Microbiol.* 2014;14:3.
- Cristino S, Legnani PP, Leoni E. Plan for the control of *Legionella* infections in long-term care facilities: Role of environmental monitoring. *Int J Hyg Environ Health* 2012;215:279-285.
- Orsi GB, Vitali M, Marinelli L, Ciorba V, Tufi D, Del Cimmuto A *et al.*. *Legionella* control in the water system of antiquated hospital buildings by shock and continuous hyperchlorination: 5 years experience. *BMC Infectious Diseases* 2014;14:394.
- Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral (Ministerio de Sanidad y Consumo). Guía Técnica para la Prevención y Control de la Legionelosis en Instalaciones. Capítulo 1. Ecología y Biología de *Legionella*. 2005.
- World Health Organization. Legionella and the Prevention of Legionellosis. Geneva, Switzerland. 2007; pp. 1-276. Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf.
- Cox CS, Wathes CM. *Bioaerosols Handbook*. BocaRaton, FL. CRC Press; 1995.
- Sabriá M. Legionelosis Nosocomial. Un problema bastante generalizado. *Enfermedades Emergentes* 2000;2:203-205.
- Armstrong TW, Haas CN. A quantitative microbial risk assessment model for Legionnaires' disease: animal model selection and dose-response modeling. *Risk Anal.* 2007; 27:1581-1596.
- Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la red nacional de vigilancia epidemiológica. BOE núm 21, de 24/1/1996.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease surveillance in Europe, 2012, Stockholm. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/legionnaires-disease-surveillance-2012.pdf>.

26. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Brotes de legionelosis notificados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Años 1999 a 2011. Disponible en: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/Legionelosis_brotes_1999-2011.pdf.
27. Gutiérrez Molina C, López Casares R, Gómez Campoy ME, Córdoba Martínez F, Sintas Lozano F, Sanz Navarro J. Brote de legionelosis en Murcia en julio de 2001. La óptica de sanidad ambiental. *Revista de Salud Ambiental* 2002;2:22-31.
28. Barrufet-Barqué MP, Sauca-Subias G, Force-Sanmartín L, Felip-Benach A, Martínez-Pérez E, Capdevila-Morell JA. Estudio de un brote de infección por *Legionella pneumophila*. *Medicina clínica* 2006;126:178-182.
29. García de Olalla P, Gracia J, Rius C, Caylá JA, Pañella H, Villabí JR *et al.*. Brote comunitario de neumonía por *Legionella pneumophila*: importancia del control de las torres de refrigeración en los centros sanitarios. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26:16-22.
30. Sala Ferré MR, Arias C, Oliva JM, Pedrol A, García M, Pellicer T *et al.*. A community outbreak of Legionnaires' disease associated with a cooling tower in Vic and Gurb, Catalonia (Spain) in 2005. *Eur J Clin Microbiol*. 2009;28:153-159.
31. Bellido-Blasco JB, Pelaz-Antolín C, Delas-González MA, Sarrion-Martínez J, Moreno-Muñoz MR, Herrero-Carot C. Agregación de casos de neumonía por *Legionella* en trabajadores relacionados con la industria de la cerámica en Castellón en 2006. *Rev Esp Salud Pública* 2008;82:111-116.
32. Castilla J, Barricarte A, Aldaz J, García Cenoz M, Ferrer T, Pelaz C *et al.*. A large Legionnaires' disease outbreak in Pamplona, Spain: early detection, rapid control and no case fatality. *Epidemiol Infect*. 2008;136:823-832.
33. Coscollá M, Fenollar J, Escribano I, González-Candelas F. Legionellosis Outbreak Associated with Asphalt Paving Machine, Spain, 2009. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16:1381-1387.
34. European Centre for Disease Prevention and Control. Outbreak of Legionnaires' disease in a hotel in Calpe, Spa in 2012. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1205-TER-Updated-Risk-assessment-Legionnaires-Spain.pdf>.
35. Abad Sanz I, Velasco Rodríguez MJ, Marín Riaño M E, Pérez Alonso J, Muñoz Guadalajara MC, Jodra Trillo E. Brote de legionelosis en un restaurante de la Comunidad de Madrid. *Rev Esp Salud Publica* 2014;88:661-669.
36. Gómez-Barroso D, Nogareda F, Cano R, Pina MF, Del Barrio JL, Simon F. Patrón especial de la legionelosis en España, 2003-2007. *Gac Sanit*. 2011;25:290-295.
37. Center for Diseases Control and Prevention. Increasing incidence of legionellosis in the United States, 2000-2009. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6032a3.htm>.
38. Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 865/2003, de 18 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. BOE núm. 171, de 18/7/2003.
39. Ricketts KD, Joseph C, Lee J, Wewalka G. Survey on legislation regarding wet cooling systems in European Countries. *Eurosurveillance*, 2008;13:1-5.
40. Rangel KM, Delcios G, Emery R, Symanski E. Assessing maintenance of evaporative cooling systems in legionellosis outbreaks. *J Occup Environ Hyg*. 2011;8:249-265.
41. Boletín Oficial del Estado. 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. BOE núm. 180, de 28/7/2001.
42. Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 1027/2007, de 20 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de Instalaciones Térmicas en los Edificios. BOE núm. 207, de 29/08/2007.
43. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). Norma UNE 100030:2005 IN. Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones.
44. Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral (Ministerio de Sanidad y Consumo). Guía Técnica para la Prevención y Control de la Legionelosis en Instalaciones. 2005. Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/agenBiologicos/guia.htm>.
45. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía. Decreto 287/2002, de 26 de noviembre, por el que se establecen medidas para el control y la vigilancia higiénico-sanitarias de instalaciones de riesgo en la transmisión de la legionelosis y se crea el Registro Oficial de Establecimientos y Servicios Biocidas de Andalucía. BOJA núm. 144, de 07/12/2002.
46. Health Protection Surveillance Centre. Chapter 4: Risk assessment. En: National Guidelines for the control of legionellosis in Ireland, 2009. Report of Legionnaires' Disease Subcommittee of the Scientific Advisory Committee Health Protection Surveillance Centre. Dublín, HPSC; 2009. p.34-40. Disponible en: <https://www.hpsc.ie/A-Z/Respiratory/Legionellosis/Publications/File,3936,en.pdf>.
47. Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral (Ministerio de Sanidad y Consumo). Guía Técnica para la Prevención y Control de la Legionelosis en Instalaciones. Capítulo 4. Torres de Refrigeración y Condensadores Evaporativos. 2005. Disponible en: http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/agenBiologicos/pdfs/4_leg.pdf.
48. Standards Australia Limited/Standards New Zealand. Section 4: Design, Installation and commissioning of cooling water systems. En: Air - handling and water systems of build-

- dings – Microbial control. Part:1 Design, installation and commissioning. AS/NZS 3666.1:2011.p.18-21.
49. Health and Safety Executive. Requirements of a cooling water treatment programme. En: Legionnaires' disease: Technical guidance Part 1: The control of *Legionella* bacteria in evaporative cooling systems. 2013. p.16-25.
 50. Boletín Oficial de Navarra. Decreto Foral 54/2006, de 31 de Julio, por el que se establecen medidas para la prevención y control de la legionelosis. BON núm. 96, de 11/8/2006.
 51. Boletín Oficial de Aragón. Decreto 136/2005, de 5 de julio, por el que se establecen medidas especiales para la prevención y control de la legionelosis. BOA núm. 87, de 20/7/2005.
 52. Ministry of Health. Operation and maintenance of cooling towers. En: The Prevention of Legionellosis in New Zealand. Guidelines for the control of *Legionella* bacteria. Part 1: legionellosis, sources of Legionellae and control measures. New Zealand: 2012. p. 24-43. Disponible en: www.health.govt.nz.
 53. Asociación Técnica Española de Climatización y Refrigeración. Guía técnica de torres de refrigeración. Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDEA). Madrid: 2007. Disponible en: http://www.idae.es/uploads/documentos/documentos_10540_Torres_refrigeracion_GT4_07_05_eca613.pdf.
 54. Martí S. Propuestas técnicas desde Aqua España para el nuevo Real Decreto. Ponencia de la 23ª Jornada Técnica de la Sociedad Española de Sanidad Ambiental; 2014 oct 2-3: Madrid, España.
 55. Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral (Ministerio de Sanidad y Consumo). Guía Técnica para la Prevención y Control de la Legionelosis en Instalaciones. 2005. Capítulo 2. Agua Fría de Consumo Humano. 2005. Disponible en: http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/agenBiologicos/pdfs/2_leg.pdf.
 56. Asociación Técnica Española de Climatización y Refrigeración. Guía Técnica de Agua Caliente Sanitaria Central. Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDEA). Madrid: 2010. Disponible en: http://www.idae.es/uploads/documentos/documentos_08_Guia_tecnica_agua_caliente_sanitaria_central_906c75b2.pdf.
 57. Subcommittee of the Scientific Advisory Committee Health Protection Surveillance Centre. Chapter 5: *Legionella* prevention and control. En: Report of Legionnaires' Disease. National Guidelines for the control of legionellosis in Ireland. Dublín, HPSC; 2009. p. 40-56. Disponible en: <https://www.hpsc.ie/A-Z/Respiratory/Legionellosis/Publications/File,3936,en.pdf>.
 58. Health and Safety Executive. Operation and inspection of hot and cold water systems. Hot water systems. Maintenance. Checklist for hot and cold water systems. En: Legionnaires' disease. Part 2: The control of *Legionella* bacteria in hot and cold water systems. 2014. p. 25-33.
 59. Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral (Ministerio de Sanidad y Consumo). Guía Técnica para la Prevención y Control de la Legionelosis en Instalaciones. 2005. Capítulo 6. Sistemas de Agua Climatizada con agitación constante. 2005. Disponible en: http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/agenBiologicos/pdfs/6_leg.pdf.
 60. Phin N, Cresswell T, Parry-Ford F. Case of Legionnaires' disease in a neonate following a home birth in a heated birthing pool, England, June 2014. Euro Surveill. 2014;19:20857. Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20857>.
 61. Bonilla Escobar BA, Montero Rubio JC, Martínez Juárez G. Neumonía por *Legionella pneumophila* asociada al uso de un humidificador doméstico en una niña inmunocompetente. Med Clin. 2014;142:70-72.
 62. Schuetz AN, Hughes RLM, Howard RM, Williams TC, Nolte FS, Jackson D *et al.*. Pseudo outbreak of *Legionella pneumophila* serogroup 8 infection associated with a contaminated ice machine in a bronchoscopy suite. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 2009;30:461-466.
 63. Atlas RM, Williams JF, Huntington MK. *Legionella* contamination of dental-unit waters. Appl. Environ. Microbiol. 1995;61:1208-1213.
 64. Mahoney FJ, Hoge CW, Farley TA, Barbaree JM, Breiman RF, Benson RF *et al.*. Community wide outbreak of Legionnaires' disease associated with a grocery store mist machine. J. Infect. Dis. 1992;165:736-739.
 65. Sjoerd ME, De Jong S, Bruin JP, Klapwijk HP, Brandsema PS, Reijnen L *et al.*. Legionnaires' disease associated with a car wash installation. The Lancet 2013;382:2114.
 66. Consejería de Salud. Junta de Andalucía. Guía orientativa para el Control de la *Legionella* en las instalaciones con sistemas de pulverización/nebulización de agua mediante boquillas. Disponible en: http://www.juntadeandalucia.es/salud/export/sites/csalud/galerias/documentos/c_3_c_2_medio_ambiente_y_salud/nebulizadores/guia_control_legionella.pdf
 67. Renau Gimeno E. Prevención de la legionelosis en instalaciones de riesgo en playas mediante programas avanzados de control basados en métodos rápidos de detección de *Legionella sp.* Ponencia del VI Congreso Nacional de Legionella y Calidad Ambiental; 2015 feb 11-12: Tarrasa, Barcelona.
 68. Napoli C, Fasano F, Iatta R, Barbuti G, Cuna T, Montagna MT. *Legionella spp.* and legionellosis in southeastern Italy: disease epidemiology and environmental surveillance in community and health care facilities. BMC Public Health 2010;10:660.

69. Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 742/2013, de 27 de septiembre, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de las piscinas. BOE núm. 244, de 11/10/2013.
70. World Health Organization. Guidelines for Safe Recreational Water Environments. Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/srwe1/en/.
71. McCoy W, Downes EL, Leonidas LF, Cain MF, Sherman DL, Chen K *et al.*. Inaccuracy in *Legionella* tests of building water systems due to sample holding time. *Water Research* 2012;46:3497-3506.
72. Cuetos Y. Control Preventivo de legionelosis en instalaciones de riesgo de la CAPV. Guía para la toma de muestras. Ponencia del VI Congreso Nacional de *Legionella* y Calidad Ambiental; 2015 feb 11-12: Tarrasa, Barcelona.
73. Departamento de Sanidad y Consumo, Viceconsejería de Sanidad, Dirección de Salud Pública (Gobierno Vasco). Control preventivo de legionelosis en instalaciones de riesgo de la CAPV. Guía para la toma de muestras. 2012.
74. Sabriá M. Estrategias y controversias para la prevención de la legionelosis en grandes edificios. Ponencia del VI Congreso Nacional de *Legionella* y Calidad Ambiental; 2015 feb 11-12: Tarrasa, Barcelona.
75. Ministère de la Santé. Arrête du 1er Février 2010, relatif à la surveillance des légionelles dans les installations de production de stockage et de distribution d'eau chaude sanitaire.
76. Ferrer Gimeno T. Nueva normativa. Propuestas a considerar. Ponencia de la 23ª Jornada Técnica de la Sociedad Española de Sanidad Ambiental; 2014 oct 2-3: Madrid, España.
77. Asociación Española de Normalización y Certificación. 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.
78. Edelstein PH, Cianciotto NP. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6ª ed. Madrid: Elsevier; 2006.
79. Lee TC, Vickers RM, Yu VL, Wagener MM. Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: a comparative study. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2764-2768.
80. Grúas C, Llambi S, Arruga MV. Detection of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in water samples of Spain by specific real-time PCR. *Arch Microbiol.* 2014;196:63-71.
81. Ohno A, Kato N, Yamada K, Yamaguchi K. Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* Serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69:2540-2547.
82. Chang CW, Hwang YH, Cheng WY, Chang CP. Effects of chlorination and heat disinfection on long-term starved *Legionella pneumophila* in warm water. *J Appl Microbiol.* 2007;102:1636-1644.
83. Laam L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology* 2014;5:258.
84. Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2010;34:415-425.
85. Soriano Ponce A, Sastre Salas G, Alonso Molina JL, Moreno Trigos Y. Determinación de *Legionella* spp viable mediante qPCR utilizando la concentración óptima de PMA. *Tecnoaqua* 2013;Julio-Agosto:58-64.
86. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The lightcycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997; 22:176-181.
87. Chen NT, Chang CW. Rapid quantification of viable *Legionella* in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR. *J Appl Microbiol.* 2010; 109:623-634.
88. Mansi A, Amori I, Marchesi I, Marcelloni AM, Proietto AR, Ferranti G, Magini V, Valeriani F, Borella P. *Legionella* spp. survival after different disinfection procedures: Comparison between conventional culture, qPCR and EMA-qPCR. *Microchem J* 2014; 112:65-69.
89. Whiley H, Taylor M. *Legionella* detection by culture and qPCR: comparing apples and oranges. *Crit. Rev. Microbiol.* 2014; doi:10.3109/1040841X.2014.885930.
90. Brull Fontseré M, Manero Camps A. Análisis de *Legionella*, cuantificación de viables por biología molecular (v-qPCR): una realidad. Ponencia del VI Congreso Nacional de *Legionella* y Calidad Ambiental; 2015 feb 11-12: Tarrasa, Barcelona.
91. Association Française de Normalisation (AFNOR). NF T90-471 Avril 2010. Qualité de l'eau - Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT - PCR).
92. Organización Internacional de Normalización. Norma ISO/TS 12869:2012. Water quality -- Detection and quantification of *Legionella* spp. and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR).
93. Subcommittee of the Scientific Advisory Committee Health Protection Surveillance Centre. Chapter 2: Laboratory Diagnosis. 2.4 Application of PCR for the detection and enumeration of *Legionella* species. En: Report of Legionnaires' Disease. National Guidelines for the control of legionellosis in Ireland. Dublín, HSE/HPSC; 2009. p. 23-27. Disponible en: <https://www.hpsc.ie/A-Z/Respiratory/Legionellosis/Publications/File,3936,en.pdf>.