

Evaluación del sistema activ'H2O



Julio 2008

INDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1.Aspectos clínicos de la infección	3
1.2.Vías de transmisión	4
1.3.Ecología de <i>L. pneumophila</i>	4
1.4.Factores de proliferación de <i>L. pneumophila</i>	5
1.5.Prevenición y control de la legionelosis	5
2. OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO	9
3. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA	9
4. TRABAJO REALIZADO	10
5. MATERIAL Y MÉTODOS	12
6. RESULTADOS OBTENIDOS	13
7. CONCLUSIONES	16

1. INTRODUCCIÓN

Legionella pneumophila es una bacteria perteneciente a la familia *Legionellaceae*. Dentro de esta familia, que se encuentra en continua expansión, *L. pneumophila* es el agente que más frecuentemente se asocia a patologías en humanos y de los 15 serogrupos que se conocen, el serogrupo 1 es el más habitualmente encontrado en aislamientos clínicos y de origen ambiental.

1.1. Aspectos clínicos de la infección

La importancia del estudio de esta bacteria radica en sus implicaciones sanitarias, ya que es el agente etiológico de neumonías severas, aunque son también importantes sus implicaciones socioeconómicas, ya que puede afectar a grandes colectividades en forma de brote epidémico, con la consiguiente incidencia sobre diferentes sectores industriales como el turismo, petroquímica, etc.

L. pneumophila es el agente patógeno causal de la legionelosis, infección que puede presentar dos formas clínicas fundamentalmente, la neumonía por *Legionella* o enfermedad del legionario y la fiebre de Pontiac.

La fiebre de Pontiac, llamada así porque el primer brote epidémico surgió en un departamento de salud en Pontiac (Michigan) en 1968, es un cuadro pulmonar no neumónico caracterizado por tos, fiebre, cefalea, intensas mialgias y síntomas sistémicos similares a los de la gripe. El período de incubación de la enfermedad es corto, apareciendo la sintomatología entre 24 y 48 h tras la exposición, afecta a más del 95% de los individuos expuestos y se resuelve espontáneamente y sin secuelas en algunos días. Este síndrome se ha presentado en contados brotes epidémicos y la patogenia del mismo es confusa (Pascual *et al.*, 1987).

La enfermedad del legionario es un cuadro clínico neumónico, con una importante tasa de morbilidad y mortalidad, tiene menor tasa de afectación que la fiebre de Pontiac y su período de incubación es mayor, próximo a los diez días (Bouza, 1986).

1.2. Vías de transmisión

Respecto a la transmisión de la enfermedad, el único medio documentado de diseminación de *Legionella* es a través del aire. La vehiculización se produce mediante la formación de aerosoles a partir de reservorios de agua contaminada, pudiendo estar también presente en el polvo de tierras removidas. La inhalación de estas partículas y el impacto que produce a nivel del alveolo pulmonar es lo que puede desencadenar la infección, por lo que es lógico que todos los brotes epidémicos se hayan producido en ambientes donde tenía lugar la formación de este tipo de aerosoles. Las duchas y grifos de agua caliente pueden aerosolizar pequeñas cantidades de la bacteria durante su uso rutinario, siendo el tamaño de partícula originado lo suficientemente pequeño como para penetrar en el aparato respiratorio humano. Destacar también que no se ha descrito transmisión interhumana. (Martí Viudes *et al.*, 1986)

1.3. Ecología de *L. pneumophila*

L. pneumophila está ampliamente distribuída en la naturaleza y es capaz de sobrevivir en medios muy diversos. Se ha descrito que el suelo puede constituir un reservorio para la bacteria, y el polvo de las tierras removidas, originado por las excavaciones o situaciones similares, podrían facilitar su difusión. Pero es el agua la principal fuente medioambiental de esta bacteria, que forma parte de la comunidad microbiana natural de ecosistemas acuáticos. Cualquier habitat acuático concebible, con excepción de estuarios y ambientes salinos, es apto para su supervivencia, siendo ésta posible en una amplia variabilidad de condiciones físico-químicas y biológicas.

1.4. Factores de proliferación de *L. pneumophila*

La supervivencia y multiplicación de *L. pneumophila* en redes internas es función de elementos denominados amplificadores como son las temperaturas estables entre 32 y 42°C, crecimiento de algunos protozoos y de bacterias, estancamiento del agua debido a la existencia de puntos muertos u obstrucciones en las tuberías, que facilita el depósito de sedimentos; diseño de los tanques de almacenamiento de agua caliente; bajas dosis de desinfectante, formación de "biofilms", determinados valores de los parámetros físico-químicos de calidad del agua, como son el pH, cloruros, nitrógeno total y alcalinidad.

Otro factor que predispone a la presencia de *L. pneumophila* en los sistemas de distribución de agua lo constituye el diseño incorrecto de las redes de distribución que con la existencia de puntos distales o cabos extremos y obstrucciones en las tuberías, facilitan el depósito de sedimento.

1.5. Prevención y control de la legionelosis

Para evitar la aparición de brotes epidémicos, se emplean por una parte, métodos de erradicación cuando se producen casos o brotes asociados a un edificio y por otra parte, métodos preventivos, que posibilitan el mantenimiento de la concentración de la bacteria dentro de unos límites (preferiblemente por debajo de los límites de detección de las técnicas de aislamiento utilizadas), y que están resultando ser eficaces a raíz del desarrollo de la ingeniería sanitaria y la mejora en el diseño de aparatos e instalaciones.

1.5.1. Métodos preventivos

En ciertos ambientes creados por el hombre se hace necesario el control de *Legionella*, para ello en los países avanzados se han elaborado normas para la

prevención de la legionelosis que controlan dos fases de actuación, por una parte durante el montaje y diseño de los sistemas y por otra durante la fase de explotación de las instalaciones, mediante un mantenimiento adecuado. En España existe una norma UNE 100030 IN 2005, que sirve de "Guía para la prevención y control de la proliferación y diseminación de la legionella en instalaciones", además de legislaciones de comunidades autónomas en la que se encuentran procedimientos explícitos sobre el tema. Por otra parte, a raíz de los grandes brotes de legionelosis ocurridos en nuestro país en los últimos años, surgió el Real Decreto 909/2001, de 27 de julio, por el que se establecían los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis, actualizado posteriormente por el R.D.865/2003. El decreto vigente es aplicable a sistemas de agua caliente sanitaria, sistema de agua fría de consumo humano, torres de refrigeración, condensadores evaporativos, equipos de terapia respiratoria, humidificadores y humectadores, conductos de aire acondicionado, piscinas climatizadas, instalaciones termales, fuentes ornamentales, sistemas de riego por aspersión, sistemas de agua contra incendios, elementos de refrigeración por aerosolización al aire libre y otros aparatos que acumulen agua y puedan producir aerosoles.

Torres de refrigeración

Las torres de refrigeración están relacionadas con muchos casos de la enfermedad del legionario ya que son un excelente amplificador y diseminador de *Legionella*, debido a que reúnen una serie de condiciones apropiadas para ello, como son la elevada temperatura del agua (28-38°C, sobre todo en verano), la humedad, el incremento en la tensión de oxígeno en las superficies agua-aire y la acumulación de nutrientes.

En España, la norma UNE 100030 IN 2005, y el Real Decreto 865/2003 proporcionan una serie de pautas sobre las acciones preventivas a realizar en el caso de las torres de refrigeración. En cualquier caso, todos estos documentos coinciden en una serie de factores a considerar, entre otros, situación de los

aparatos en relación a los vientos predominantes, instalación de separadores de gota de alta eficacia, acceso fácil para el mantenimiento y limpieza, inspección periódica de las torres para comprobar su estado respecto al crecimiento de algas, deterioro de los materiales, daño de los componentes, efectos de corrosión y correcto funcionamiento de motores y bombas, limpieza de las torres para eliminar la acumulación de sedimentos y materia orgánica y finalmente la aplicación de biocidas que provean al sistema completo de un efecto residual.

Redes internas

Respecto a los sistemas internos de agua potable de hoteles, hospitales y viviendas particulares, han sido también muy numerosos los brotes epidémicos descritos asociados a estos edificios.

La norma UNE 100030 IN 2005, describe el adecuado diseño y montaje en las instalaciones de agua sanitaria, estableciendo entre otras las temperaturas de almacenamiento del agua caliente y fría, aislamiento de los depósitos, situación de los intercambiadores de calor, sentido de la circulación del agua, diseño de los acumuladores, materiales empleados en los sistemas, etc.

Tanto las normas nacionales como internacionales coinciden en una serie de recomendaciones al respecto. Los sistemas deberán carecer de tramos ciegos y derivaciones innecesarias por las que el agua circule con dificultad, debiéndose evitar la utilización de materiales que sirvan de substrato para el crecimiento de *Legionella*. Se deberá realizar una limpieza periódica de los sistemas de agua doméstica para prevenir la acumulación de sedimentos y microorganismos. El agua caliente deberá almacenarse a 60°C, mientras que el agua fría almacenada y distribuida debe mantenerse por debajo de 20°C. Para determinar si el mantenimiento es correcto se deberán realizar controles físico-químicos y microbiológicos, pudiendo variar los parámetros medidos y la frecuencia de muestreo dependiendo del tipo de sistema y el modo en que éste se utiliza.

En resumen, los métodos para limitar o prevenir el crecimiento de *Legionella* están basados simplemente en el conocimiento de los factores que potencian el crecimiento de la bacteria. Evitando estos factores y manipulando apropiadamente los sistemas de agua domésticos es posible evitar la aparición de la enfermedad.

Las Autoridades Sanitarias aconsejan que en instalaciones a las que se asocie la aparición de casos, se aplicaran métodos de erradicación en los que las medidas de limpieza y desinfección serán más extremas que las descritas en las medidas preventivas.

1.5.2. Métodos de erradicación

Actualmente para lograr una descontaminación selectiva de *L. pneumophila*, se emplea una acción coordinada de los biocidas junto con choques térmicos. Se han realizado gran cantidad de estudios para evaluar la termorresistencia de *L. pneumophila* y la eliminación de estos gérmenes de los circuitos de agua caliente, encontrándose que es importante tener en cuenta la heterogeneidad fisiológica de la población bacteriana, la protección por los productos de lisis de otras células y la existencia de mutantes termorresistentes. Como se ha descrito anteriormente, los métodos más comúnmente empleados para prevenir y erradicar *L. pneumophila* son la hipercloración y la elevación de la temperatura. Sin embargo, se ha demostrado que en centros en los que se aplican estos métodos se producen posteriores recontaminaciones (Gómez Lus *et al.*, 1994; Barker *et al.*, 1994). Además los procesos de hipercloración, junto con las elevadas temperaturas producen importantes fenómenos de corrosión en los sistemas y suponen un elevado costo económico.

Como alternativa a los métodos clásicos, se han estudiado otros agentes biocidas y otros métodos de control. En este sentido, diferentes autores han estudiado la eficacia "in vitro" de biocidas alternativos como el ozono, el peróxido de



hidrógeno y la luz ultravioleta con vistas a disponer de métodos preventivos adecuados con diferentes resultados.

En los últimos años, se han adoptado también para la erradicación de *Legionella*, métodos electrofísicos, con aportaciones de cobre y plata al agua que se obtienen haciendo pasar el agua por electrodos de plata de construcción especial entre los que circula una débil corriente eléctrica continua (Yu *et al.*, 1990). Estos métodos presentan la ventaja de que no se afectan por la temperatura y la incidencia de pH es menor. Presentan también una serie de inconvenientes, como la necesidad de un diseño personalizado para cada edificio y el consumo energético del mismo, lo cual encarece el procedimiento. No constituye un sistema de erradicación en casos de colonización por la bacteria sino que es un sistema preventivo, debiéndose mantener unas dosis de plata en el agua que obliga a efectuar controles analíticos especializados.

Se han descrito también otros sistemas físicos, basados en la pasteurización en continuo y del agua, así como diversos sistemas basados en fotocátalisis, en el fenómeno de cavitación y sistemas electroquímicos.

2. OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO

Evaluar la eficacia "in vitro" del sistema electroquímico denominado "ACTIV'H2O" en la erradicación de *Legionella* de sistemas de agua.

3. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA

ACTIV'H2O es un módulo electroquímico investigado y desarrollado por el Centro Nacional de Investigación Científica francés.



El principio de funcionamiento del sistema es la electroperoxidación, que consiste en realizar una electrolisis del agua que pasa en régimen laminar entre dos electrodos catalíticos. Se produce un doble efecto, por un lado el campo eléctrico creado entre los electrodos es superior al existente en la membrana bacteriana, provocando un efecto bactericida. Las importantes variaciones del pH que se crean en las proximidades de los electrodos actúan igualmente sobre las bacterias. Por otro lado, existe un efecto indirecto debido a las reacciones químicas en los electrodos y en el baño electrolítico. Los oxidantes que se generan en el agua por los catalizadores depositados sobre los electrodos (cloritos, cloratos bromatos, peróxido de hidrógeno...) inducen un efecto bactericida penetrando la membrana bacteriana. Ciertas materias orgánicas disueltas pueden ser igualmente eliminadas por estos oxidantes residuales. Según describe el fabricante, la acción de desinfección del agua se prolonga a la salida del electrolizador durante el transporte y el almacenamiento hasta el punto de utilización o consumo debido a su efecto bacteriostático.

El sistema puede funcionar en circuito abierto o en circuito cerrado, según las aplicaciones deseadas y los tipos de utilización. El tiempo de funcionamiento está regulado automáticamente en función del caudal. Además, el sistema es totalmente automático, efectuando la limpieza de las placas mediante el control electrónico. La intensidad de la corriente se regula en función de los oxidantes totales deseados y de la conductividad del agua. La concentración de oxidantes residuales puede ser controlada en continuo por colorimetría o por amperometría.

4. TRABAJO REALIZADO

Se realizó una instalación del equipo que simulara al máximo las condiciones de funcionamiento habitual (Fig. 1). Es decir, una entrada de agua de red a un pequeño depósito, consistente en un bidón de 50 L, desde donde pudiera ser bombeada al sistema a un caudal similar al que habitualmente existe en un sistema real.



Fig. 1

En dicho tipo de bidón se prepararon muestras de agua artificialmente contaminadas con *Legionella*. Para ello, agua de red fue inoculada con agua residual bruta y con cultivos puros de *Legionella pneumophila* ATCC 33152. Uno de los bidones preparados contenía en su interior 5 tubos de PVC de 60 cm de longitud y 11 cm de diámetro, cuya función era la de servir de soporte para la colonización de *Legionella*.

Las muestras fueron inoculadas sucesivamente con una periodicidad de 2-3 días durante un período de hasta más de un mes en el caso de las muestras con tubos de PVC, con el fin de disponer en la muestra tanto de *Legionella* planctónica (libre en el agua) como sésil acantonada en los biofilms desarrollados sobre los tubos de PVC.

Consideraciones:

1. Lo que desde luego es difícil de reproducir es una red interna de distribución de agua, por lo que los resultados se reducirán a describir lo sucedido con un sistema simplificado y que no va a reproducir lo que ocurre en una red de distribución real. En cualquier caso, el objeto del trabajo es comprobar la eficacia del sistema en la eliminación de *Legionella*, no demostrar su funcionamiento en redes reales, que sería objeto de trabajos de campo, a largo plazo y por supuesto sin inocular el agua de entrada al sistema, sino efectuando los correspondientes estudios en situaciones reales.
2. El sistema sobre el que se va a realizar el estudio presenta un grado de colonización por *Legionella* reducido, ya que no existen extremos ciegos, presencia de sedimentos, productos de corrosión, ni biofilms formados durante largos períodos de tiempo, por lo que la evaluación efectuada es fundamentalmente sobre *Legionella* planctónica, es decir dispersa por el agua circulante.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas empleadas

Legionella pneumophila American Type Culture Collection, ATCC 33152. Ya que se trata de una cepa de laboratorio, habitualmente adaptada a condiciones óptimas de crecimiento, se ha empleado también agua residual bruta donde habitualmente existen cepas salvajes y otros microorganismos que pueden favorecer la creación de biofilms sobre la pared de los tubos de PVC.

Sistema ACTIV'H2O

Cedido por la empresa **sbm**

Técnica de aislamiento en cultivo

Legionella puede ser considerada como una bacteria exigente en sus condiciones de crecimiento, ya que el pH y la temperatura son condiciones necesarias para su buen desarrollo y presenta requerimientos específicos tales como carbón activo, hierro, L-cisteína y α -cetoglutarato. La mayoría de los medios selectivos ensayados están basados en el empleo de carbón activo y extracto de levadura, estos medios se denominan genéricamente como Carbon Yeast Extract (CYE) y el más comúnmente empleado en muestras medioambientales es el BCYE- α , que contiene tampón ACES, α -cetoglutarato, cisteína y que está suplementado con GVPC (Glicina, Vancomicina, Polimixina B y Cicloheximida).

El método empleado por LABAQUA, está basado en la norma ISO 11731, y se encuentra acreditado por ENAC.

Medición de oxidante residual "in situ"

Se empleó un espectrofotómetro de campo Lovibond LR.

6. RESULTADOS OBTENIDOS

6.1. Muestra inoculada en bidón conteniendo cilindros de PVC

Fecha	Tiempo	<i>Legionella</i> (ufc/L)	Oxidante (mg/L)
23.04.08	Preparación de la muestra		
30.04.08		Bio contaminado	
16.05.08		Incontable	
19.05.08		Incontable	
28.05.08		Incontable	

05.06.08	Se hace pasar la muestra por el equipo una sola vez		
	Antes	56×10^5	<0.01
	0 min	5.3×10^5	4.68
	15 min	21×10^3	5.23
	2 h	16×10^2	4.76
	24 h	0	0.08
09.06.8	Se devuelve la muestra al bidón inicial conteniendo los tubos de PVC		
	Antes	0	<0.05
	Después	0	
11.06.08		0	
13.06.08		52×10	
17.06.08		22×10	
20.06.08		17×10	
23.06.08		12×10	
27.06.08		23×10	
07.07.08		31×10	

En la Fig. 2 se observa el crecimiento de *Legionella* en la muestra antes de hacerla pasar por el sistema.



Fig. 2

En la Fig. 3 se observa la muestra tomada el día 09.06.08 cuando se pasó al bidón conteniendo los cilindros de PVC. Existe una abundante microbiota, pero no se consiguió aislar *Legionella*.



Fig. 3

6.2. Muestra inoculada en bidón sin cilindros de PVC

Fecha	Tiempo	<i>Legionella</i> (ufc/L)	Oxidante (mg/L)
09.06.08	Preparación de la muestra		
16.06.08		57×10^5	
20.06.08	Se hace pasar la muestra por el equipo en un sistema en circuito cerrado, durante 24 h.		
	Antes	62×10^5	
	0 min	44×10^2	4.42
	15 min	0	11.66
	30 min	0	16.2
	1 h	0	58.6
	2 h	0	39.4
	24 h	0	44.6

23.06.08		0	0.88
27.06.08		0	<0.05
30.06.08		0	
04.07.08		0	

En la Fig. 4 se puede observar la presencia de *Legionella* en la muestra antes de hacerla pasar por el sistema.



Fig. 4

7. CONCLUSIONES

1. El tratamiento con el sistema evaluado de las muestras preparadas, conteniendo una elevada concentración de *Legionella*, permite eliminar *Legionella* cultivable en las condiciones de ensayo empleadas, aunque cuando el sistema se emplea como tratamiento puntual y la muestra esta colonizada por *Legionella*, ésta vuelve a ser detectada por aislamiento en cultivo una vez el sistema ha sido desconectado, aunque a niveles muy inferiores a los encontrados en la muestra original.
2. Cuando la muestra se hace pasar por el sistema en un circuito cerrado y se hace funcionar durante 24 h, *Legionella* desaparece en la muestra en menor tiempo que si solo ha sufrido un pase por el sistema.

3. Cuando la muestra no está colonizada por *Legionella*, sino que toda se encuentra en forma planctónica, libre en el agua, una vez eliminada por el sistema ensayado, ésta no vuelve a detectarse en la muestra.
4. Los resultados obtenidos se circunscriben a ensayos "in vitro", lo cual no quiere decir que funcione en un sistema real, donde el número de variables es mucho mayor, y presenta una mayor complejidad. En la evaluación del sistema, sería interesante poder instalarlo en un edificio hospitalario u hotelero con conocimiento histórico de la existencia de *Legionella* en la red de distribución de agua fría y caliente sanitaria, y poder realizar un seguimiento de la concentración de *Legionella* tras la incorporación del sistema.