

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ  
VICERRETORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA DE MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

ENUMERACIÓN DE *LEGIONELA PNEUMOPHILA* EN AGUA DE LAS TORRES DE  
ENFRIAMIENTOS DE LAS INSTALACIONES EN EL ÀREA METROPOLITANA  
DE LA CIUDAD DE PANAMÀ

JOSÈ E. MORRIS M

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE LA MAESTRÍA DE MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL.

PANAMÀ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2021



# DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi familia (mi esposa Liliana Iveth De Gracia Quiroz y mi hijo José Manuel Morris De Gracia), por su apoyo constante a lo largo de este proceso en la realización de este estudio de interés nacional en la Salud Pública. Han sido muchos años de estudio en donde mi familia ha estado a mi lado, dándome el apoyo necesario para lograr las metas que nos planificamos en conjunto.

**“Tú no eliges a tu familia. Ellos son un regalo de Dios para ti,  
como tú lo eres para ellos”  
(Desmond Tutu)**

# AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios, por ayudarme en este caminar de la vida estudiantil. Cada paso que doy en este proceso de crecimiento personal se lo debo a Dios, solo soy parte de un instrumento que refleje la opción de la vida cristiana.

A mi esposa Liliana De Gracia, mi hijo Jose Manuel Morris y mi madre Mariela Montenegro, por su apoyo y amor incondicional en este nuevo proceso de estudio de la maestría. Le agradezco, por cada momento que me animaron a culminar con este nuevo nivel de conocimiento en mi vida.

Al igual a todas las empresas que abrieron sus puertas con la finalidad de establecer los controles preventivos a estos nuevos retos de control de calidad de *Legionella* en Torres de Enfriamiento en nuestro país.

Agradecemos especialmente a nuestras asesoras de tesis Prof. Margarita de Cornejo y la Msc. Icela de Palma, en su apoyo en este proyecto, que sin el mismo no se hubiera logrado los objetivos. Al igual personal técnico del Laboratorios Expert-Lab que contribuyen a lograr la logística de los procesos de muestreo en las Torres de enfriamiento. Adicional me gustaría agradecer los conocimientos técnicos dados por IDEXX Laboratories a: Msc. Sonia O'Donnell, Msc. Kristin Majeska y Dra. Jennifer Clancy.

Finalmente agradecemos al resto de nuestros familiares, profesores, amigos y compañeros de laboratorio, gracias por estar presente en cada momento, fueron una pieza clave para lograr culminar este proyecto.

# ÌNDICE GENERAL

## Contenido

DEDICATORIA .....	3
AGRADECIMIENTO .....	5
ÌNDICE GENERAL .....	7
ÌNDICE DE TABLAS .....	12
ÌNDICE DE ILUSTRACION .....	14
ÌNDICE DE GRÀFICAS .....	16
ÌNDICE DE ANEXOS .....	18
ABREVIATURAS.....	19
RESUMEN .....	21
1. INTRODUCCIÒN .....	23
2. OBJETIVOS .....	28
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3. ANTECEDENDES .....	30
3.1 Generalidades de <i>Legionella</i> .....	31
3.2 Distribuci3n de la <i>Legionella</i> .....	34
3.3 Incidencia y Letalidad.....	36
3.4 Cadena de condiciones para que el pat3geno infecte al ser humano .....	39
3.4.1 Microorganismo <i>Legionella</i> .....	39
3.4.2 Reservorio de <i>Legionella</i> .....	41
3.4.3 Mecanismo de transmisi3n.....	44
3.4.4 Fuentes Comunitarias y Hospitalarias.....	45
3.4.4.1 Fuentes comunitarias .....	45
3.4.4.1.1 Desinfecci3n del agua: .....	45
3.4.4.1.2 Circuitos de agua cerrados en la red de agua sanitaria caliente .....	46
3.4.4.2 Fuentes hospitalarias .....	46
3.4.5 Clasificaci3n de Torres de Enfriamiento .....	47
3.4.5.1 Equipos con ventilaci3n mecánica.....	47
3.4.5.1.1 Equipos de tiro forzado .....	47
3.4.5.1.2 Equipos de tiro inducido .....	48
3.4.6 Medidas preventivas y controles establecidos para <i>Legionela</i> .....	49

3.4.7	Limpieza y desinfección de las torres de enfriamiento:.....	56
3.4.8	Laboratorio de control para <i>Legionella</i> .....	60
3.4.8.1	El Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública-Panamá:.....	60
3.4.8.2	El Laboratorio EMLab P&K -Estados Unidos: .....	61
3.4.9	Interpretación de Resultados .....	63
4.	METODOLOGÍA .....	66
4.1	Criterios de exclusión para la selección de las muestras.....	67
4.1.1	Pasos a efectuar en el proyecto .....	67
4.2	Toma de muestrea de <i>Legionella</i> : .....	68
4.2.1	Inactivación de desinfectante:.....	69
4.3	Tiempo entre el muestreo y Análisis: .....	70
4.4	Prácticas correctas de higiene en la toma de muestras:.....	72
4.5	Registros de datos de toma de muestra .....	75
4.6	Procesamiento de análisis .....	76
4.6.1	Recuento de aerobios mesófilos o Heterótrofos.....	76
4.6.2	Ensayos químicos y Físico-químicos:.....	79
4.6.2.1	Temperatura: .....	79
4.6.2.2	Turbiedad: .....	79
4.6.2.3	Conductividad:.....	80
4.6.2.4	Cloro total y Cloro residual libre: .....	80
4.6.2.5	Bromo libre, pH, Cloro residual libre: .....	81
4.6.2.6	Kit de medición de Hierro:.....	82
4.7	Métodos para la detección y enumeración <i>Legionella pneumophila</i> : .....	83
4.7.1	Métodos de detección y enumeración de <i>Legionella pneumophila</i> por sustrato definido (Legiolert).....	83
4.7.1.1	Materiales y Reactivos .....	84
4.7.1.2	Equipos .....	85
4.7.1.3	Preparación de las muestras .....	85
4.7.1.3.1	Aguas potables (Protocolo de 10ml).....	85
4.7.1.3.2	Agua potable (Protocolo de 100mL).....	85
4.7.1.3.3	Aguas no potables (Protocolo de 0.1mL).....	86
4.7.1.3.4	Aguas no potables (Protocolo de 1 mL).....	86

4.7.1.3.5	Prueba de enumeración de Quanti-Tray: .....	87
4.7.1.3.6	Interpretación de los resultados.....	88
4.7.1.3.7	Procedimiento IDEXX, mediante la técnica de Legiolert para el aislamiento y confirmación de <i>Legionella pneumophila</i> .....	90
4.7.2	Procesamiento con el Método SM 9260 J del Standard Methods para la detección de <i>Legionella</i> spp.....	92
4.7.2.1	Condiciones generales del método.....	92
4.7.2.2	Pretratamiento de las muestras de agua: .....	94
4.7.2.3	Identificación de Colonias de <i>Legionella</i> .....	95
4.7.2.4	Confirmación de Colonias de placas BCYE .....	96
4.7.3	Confirmación Serológica de <i>Legionella pneumophila</i> .....	98
4.7.3.1	Generalidades del método Kit serología M45-Microgen <i>Legionella</i> .....	98
4.7.3.3	Interpretación de los resultados del método Kit serología M45-Microgen <i>Legionella</i> : .....	101
4.8	Verificación y Comparación el método detección de Legiolert vs SM 9260J.....	102
4.8.1	Verificación del método a través de la Norma ISO 13483:2017 .....	102
	.....	103
4.8.2	Comparación del método a través de la Norma ISO 17994:2004.....	106
4.8.2.1	Tipo de muestras .....	107
4.8.2.2	Comparación de un método de recuento con un método de P/A: .....	107
4.8.2.3	Procesamiento: .....	108
4.8.2.4	Evaluación de resultados obtenidos: .....	109
4.9	Comparación de Resultados positivos de <i>Legionella pneumophila</i> por Legiolert en Torres de enfriamiento con Laboratorio Externos: .....	110
4.9.1	Laboratorio de Referencia Nacional de Salud Pública de Panamá (LCRSP): .....	110
4.9.2	Laboratorio EMLab P&K: .....	111
4.10	Sensibilización a los encargados de las instalaciones muestreadas: .....	112
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	115
5.1	Clasificación de la actividad económica de las Instalaciones muestreadas: .....	116
5.2	Clasificación y codificación de las confidencialidades de cada Instalación: .....	120
5.3	Resultados de la enumeración de <i>Legionella pneumophila</i> y determinación de su serogrupo: .....	125
5.4	Comparación de resultados de <i>Legionella pneumophila</i> con laboratorios de referencia:	
	147	

5.5	Evaluación de resultados de análisis fisicoquímicos de agua de las torres de enfriamiento: .....	149
5.5.1	Evaluación de los resultados de análisis Fisicoquímicos:.....	158
5.5.1.1	Evaluación de la temperatura (°C) en las torres de enfriamiento:.....	158
5.5.1.2	Evaluación del cloro residual libre (Cl <sup>L</sup> ), Bromo (Br) y pH en las torres de enfriamiento .....	159
5.5.1.3	Evaluación de la turbiedad (NTU (unidades nefelométricas de formacina)), Hierro (Fe) y Conductividad (uS/cm) en las torres de enfriamiento .....	161
5.6	Comparación de Métodos de Legiolert vs el método tradicional SM 9260J en base ISO 13483: 163	
6.	CONCLUSIÒN.....	166
7.	RECOMENDACIONES.....	173
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFÌA.....	177
	Bibliografía .....	178
9.	ANEXOS .....	181

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Instalaciones muestreadas según el tipo de clasificación de la actividad económicas.....	116
Tabla 2: Define la cantidad total de Torres de Enfriamiento por actividad económica.	118
Tabla 3: Clasificación y Codificación de confidencialidad de cada Instalación en estación lluviosa (LR1): .....	120
Tabla 4: Clasificación y Codificación de confidencialidad de cada Instalación estación lluviosa (LR1): .....	121
Tabla 5: Describe la clasificación y código de confidencialidad de cada Instalación en muestreo de la estación seca (LR2) de M1 a M16.....	123
Tabla 6: Describe la clasificación y código de confidencialidad de cada Instalación en muestreo de la estación seca (LR2) DE M17 A M23. ....	124
Tabla 7: Describe los resultados obtenidos de Legionella pneumophila (Legiolert) y la detección del serogrupo (S1 o S2-15) para Legionella pneumophila en la estación lluviosa (LR1) de M1 M10.....	125
Tabla 8: Describe los resultados obtenidos de Legionella pneumophila (Legiolert) y la detección del serogrupo (S1 o S2-15) para Legionella pneumophila en la estación lluviosa (LR1) de M11 a M18. ....	126
Tabla 9: Describe los resultados obtenidos de Legionella pneumophila (Legiolert) y la detección del serogrupo (S1 o S2-15) para Legionella pneumophila en la estación lluviosa (LR1) de M19 a M23 .....	127
Tabla 10: Describe los resultados obtenidos de los recuentos de Legionella pneumophila (Legiolert) y la detección del serogrupo (S1 ò S2-15) para Legionella pneumophila del muestreo realizado en la estación seca (LR2).....	131
Tabla 11: Describe los resultados obtenidos de los recuentos de Legionella pneumophila (Legiolert) y la detección del serogrupo (S1 ò S2-15) para Legionella pneumophila del muestreo realizado en la estación seca (LR2).....	132
Tabla 12:Diferencias de resultados de detección de <i>Legionella pneumophila</i> en muestras muestreadas en la estación lluviosa (LR1) y estación seca (LR2).....	135
Tabla 13: Evaluación de los resultados de enumeración de Legionela pneumophila en muestras tomadas en la estación lluviosa (LR1) y estación seca (LR2), verificando el cumplimiento de los Límites máximos permisibles (LMR) descritos por la UNE 100030:2017/BOE 365 < 1000 NMP o UFC/L. ....	138
Tabla 14: Evaluación de los resultados de enumeración de Legionela pneumophila en muestras tomadas en la estación lluviosa (LR1) y estación seca (LR2). ....	139
Tabla 15: Evaluación de los resultados de enumeración de Legionela pneumophila en muestras tomadas en la estación lluviosa (LR1) y estación seca (LR2), verificando el (%) de eficiencia del proceso de L+D (Limpieza y desinfección) de la M1 A LA M15.....	141

Tabla 16: Evaluación de los resultados de enumeración de Legionela pneumophila en muestras tomadas en la estación lluviosa (LR1) y estación seca (LR2), verificando el (%) de eficiencia del proceso de L+D (Limpieza y desinfección) de la M16 A M23 .....	142
Tabla 17: Evaluación de los resultados de enumeración de Legionela pneumophila en muestras tomadas en la estación lluviosa (LR1) y estación seca (LR2), verificando el (%) de eficiencia del proceso de L+D (Limpieza y desinfección).....	143
Tabla 18: Comparación de resultados de muestras positivas aisladas de los muestreos de Torre de Enfriamiento enviados al El Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública (LCRSP).....	147
Tabla 19: Comparación de resultados de muestras positivas aisladas de los muestreos de Torre de Enfriamiento enviados al Laboratorio externo de EMLab&PK.....	148
Tabla 20: Resultados de análisis de los ensayos de análisis Fisicoquímicos de las Torres de Enfriamiento muestreados en la Estación lluviosa (LR1):.....	150
Tabla 21: Resultados de análisis de los ensayos de análisis Fisicoquímicos de las Torres de Enfriamiento muestreados en la Estación seca (LR2): .....	151
Tabla 22: Resultados de análisis de los ensayos de análisis Fisicoquímicos de las Torres de Enfriamiento muestreados en la Estación seca (LR2) y Estación lluviosa (LR1): ....	152
Tabla 23: Resumen del promedio de los resultados obtenidos de las muestras colectadas en las dos estaciones: LR1y LR2. ....	157
Tabla 24: Verificación de Método en base a la Norma ISO 13483. Comparación de resultados de Legiolert vs SM 9260J: .....	163
Tabla 25: Resultados de la verificación de método en base a la Norma ISO 13483 .....	164
Tabla 26: Comparación de datos obtenidos de la prueba de Validación de método de Legiolert por e distribuidor IDEXX Laboratorio en un total de mayor de > 1000 resultados. ....	164

## ÌNDICE DE ILUSTRACION

Ilustración 1: Mecanismo de cadena epidemiològica.....	43
Ilustración 2: Torre de enfriamiento de tiro forzado.....	48
Ilustración 3: Torre de enfriamiento con Tiro Inducido .....	48
Ilustración 4: Parámetros indicadores de la calidad del agua en torres de refrigeración y condensadores evaporativos (Tabla N°1-BOE), Fuente: (BOE-A-2003-14408, 2003)....	51
Ilustración 5: Documento de notificación de torres de enfriamiento y condensadores evaporativos. (Anexo 1 BOE).....	51
Ilustración 6: Frecuencia de control de prevención de Legionella .....	53
Ilustración 7: Acciones para torres de enfriamiento y dispositivos análogos en función de los análisis microbiológicos de Legionella .....	54
Ilustración 8: Niveles indicadores de parámetros fisicoquímicos y aerobios en torres de enfriamiento .....	54
Ilustración 9: Acciones a realizar frente a resultados positivos de Legionella spp (UNE)	55
Ilustración 10: Acciones a realizar según recuento de Aerobios totales (UNE).....	56
Ilustración 11: Instituto Commemorativo Gorgas de Estudios de la Salud-LCRSP .....	61
Ilustración 12: Certificaciones y Acreditaciones de Laboratorio EMLAB P&K .....	62
Ilustración 13: Tabla F.1: Tiempo de toma de muestra, conservación y volumen necesario para el análisis.....	71
Ilustración 14: Simplate HPC para la evaluación de los Recuentos de aerobios mesófilos .....	77
Ilustración 15: Termómetro marca: Control company -calibrado para la medición de agua de las torres de enfriamiento.....	79
Ilustración 16: Equipo HACH 2100 para la medición de la turbiedad.....	80
Ilustración 17: Equipo medidor de la conductividad marca HACH .....	80
Ilustración 18: Medidor de Cloro Total y Libre- HANNA.....	81
Ilustración 19: Kit medidor de pH, Bromo Libre y Cloro residual libre .....	81
Ilustración 20: Kit de medición de Hierro .....	82
Ilustración 21: Muestra como el microorganismo Legionella pneumophila consume el substrato para liberar un indicador.....	84
Ilustración 22: Muestra los grados de dureza que se puede encontrar en las Torres de enfriamiento su neutralización.....	86
Ilustración 23: Interpretación cualitativa de Legionella pneumophila por Quantray/Legiolert.....	88
Ilustración 24: Diagrama de proceso de analisis de Legiolert .....	89
Ilustración 25: Resultado positivos (color marròn) y negativos (sin cambio de color) de Legiolert.....	90
Ilustración 26: Placas para confirmar la detección de Legionella (BCYE, BCYE sin cisteina, Tripticosa Soya Agar (TSA) o BA( Agar Sangre).....	92
Ilustración 27: Fases del proceso del método SM 9260J: Método tradicional- Requerimiento.....	94

Ilustración 28: Diagrama de Flujo para el tratamiento de las muestras de Legionella por SM 9260J. ....	97
Ilustración 29: Kit de Microgen para Legionella .....	99
Ilustración 30: Resultados positivos y negativos usando el Kit de Microgen Legionella para determinar el serogrupo. ....	99
Ilustración 31: Tabla de interpretación de resultados por el Kit Microgen Legionella ..	102
Ilustración 32: Tabla de verificación de métodos descrito en la UNE 13483 .....	103
Ilustración 33: Describe el formato de la evaluación de los parámetros de la verificación y la matriz 2 x2 siendo aplicada por el McNemar .....	104
Ilustración 34: Calculo de la Dispersión de Poisson.....	109
Ilustración 35: Resultados aceptable de la dispersion de Poisson.....	109
Ilustración 36: Estuches de seguridad biologica para el transporte de muestras peligrosas. ....	111
Ilustración 37: Describe los % de prevalencia de muestras de Torres de enfriamiento que se detectaron LP y no detectado en la LR1 y LR2.....	135

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Describe el porcentaje (%) de las instalaciones muestreadas según su actividad económica. ....	116
Gráfica 2: Cantidad de Torres de Enfriamiento muestreadas por actividad económica en la estación lluviosa (PR1) y estación seca (PR2).....	118
Gráfica 3: Describe la cantidad de Torres de Enfriamiento muestreadas por actividad en la estación lluviosa (PR1) .....	122
Gráfica 4: Describe la cantidad de Torres de Enfriamiento muestreadas por actividad económica en la estación seca (LR2).....	122
Gráfica 5: Describe el recuento de Legionella pneumophila por mL según el método de Legiolert en las Torres de Enfriamiento en la estación lluviosa (PR1) .....	128
Gráfica 6: Describe el recuento de Legionella pneumophila por L según el método de Legiolert en las Torres de Enfriamiento en la estación lluviosa (PR2) .....	128
Gráfica 7: Describe los resultados de los recuentos de Legionella pneumophila en mL en las torres de enfriamiento muestreadas por en la estación seca (PR2) .....	133
Gráfica 8: Describe los resultados de los recuentos de Legionella pneumophila en L en las torres de enfriamiento muestreadas por en la estación seca (PR2) .....	133
Gráfica 9: Porcentaje de prevalencia de serogrupo de Legionella pneumophila en las estaciones de muestra.....	140
Gráfica 10: Describe los % de prevalencia de las muestras de LP de las Torres de enfriamiento en base a la eficiencia de L+D.....	144
Gráfica 11: Describe los % de prevalencia de las muestras de LP de las Torres de enfriamiento en base a los Serogrupos después del proceso de L+D. ....	146
Gráfica 12: Comparación de resultados obtenidos entre el Proyecto LP vs LCRSP.....	147
Gráfica 13: Comparación de resultados obtenidos entre el Proyecto LP vs EMLAB & PK. ....	149
Gráfica 14: Describe los valores de temperatura (°C) para los muestreos realizados en las torres de enfriamiento en la estación seca (LR1) y lluviosa (LR2). ....	153
Gráfica 15: Describe los valores de Cloro total (ppm) para los muestreos realizados en las torres de enfriamiento en la estación seca (LR1) y lluviosa (LR2). ....	153
Gráfica 16: Describe los valores de Cloro residual libre (ppm) para los muestreos realizados en las torres de enfriamiento en las estación seca (LR1) y lluviosa (LR2). ..	154
Gráfica 17: Describe los valores de Bromo (ppm) para los muestreos realizados en las torres de enfriamiento en la estación seca (LR1) y lluviosa (LR2). ....	154
Gráfica 18: Describe los valores de Turbiedad (NTU) para los muestreos realizados en las torres de enfriamiento en la estación seca (LR1) y lluviosa (LR2). ....	155
Gráfica 19: Describe los valores de Hierro (ppm) para los muestreos realizados en las torres de enfriamiento en la estación seca (PR1) y lluviosa (PR2).....	155
Gráfica 20: Describe los valores de pH para los muestreos realizados en las torres de enfriamiento en la estación seca (LR1) y lluviosa (LR2). ....	156
Gráfica 21: Describe los valores de Conductividad (µS/cm) para los muestreos realizados en las torres de enfriamiento en la estación seca (PR1) y lluviosa (PR2).....	156

Gráfica 22: Describe los valores de recuento de heterótrofos (HPC) para los muestreos realizados en las torres de enfriamiento en la estación seca (PR1) y lluviosa (PR2). .... 157

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1:Carta de invitación al Proyecto de Torres de enfriamiento en Instalaciones	182
ANEXO 2: Certificados de calidad de productos e insumos utilizados para el proyecto	183
ANEXO 3: Registro de Control de calidad de reactivos con cepas positivas y negativas. .....	197
ANEXO 4: Fotos del muestreo de Legionella en Torres de Enfriamiento .....	198
ANEXO 5: Fotos del análisis realizado en el proyecto de Legionella para torres de enfriamiento .....	199
ANEXO 6: Tabla de la UNE 100030 para el mantenimiento preventivo de Legionella pneumophila.....	200
ANEXO 7: Acciones correctivas utilizadas en los procesos de L+D.....	201
ANEXO 8: Tablas de cuantificación de los Métodos Simplate HPC y Legiolert .....	202
ANEXO 9: Proceso de contaminación de un Huésped por la inhalación de aerosoles en Torre de Enfriamiento.....	204
ANEXO 10: Proceso de sensibilización de las instalaciones del proyecto de Legionella en Torres de Enfriamiento. ....	205
ANEXO 11: Resultados de muestras de Legionella pneumophila positivas detectadas en agua de la Torre de enfriamiento a los laboratorios externos de LRSP (Instituto Gorgas- Panamá) y Eurofins- EMLab P&K (Laboratorio ubicado en USA-Aprobado por a CDC). .....	211
ANEXO 12: Certificación de Legiolert aprobado por la AFNOR – IDX33/06-06/19...	216
ANEXO 13: Registros de cadena de custodia realizada durante el muestreo del proyecto de análisis de LP en torres de enfriamiento .....	217
ANEXO 14: Tabla que muestra las normas internacionales sobre el control de Legionella en agua potable y agua no potable .....	218
ANEXO 15: Laboratorio a nivel de Panamá que han implementado técnicas de detección de Legionella.....	219
ANEXO 16: Factores de riesgo que promueve el crecimiento de Legionella.....	220
ANEXO 17:Factores Extinticos e Intrínsecos que pueden promover el crecimiento de Legionella .....	222
ANEXO 18: Anexo G de la UNE 10030:2017-Eficacia de Hipoclorito sódico en función del pH.....	223

## **ABREVIATURAS**

MINSA: Ministerio de Salud.

CNA: Consejo Nacional de Acreditación.

DGNTI-COPANIT: Dirección de Normas y Tecnológica Industrial- Comisión Panameña de Normas Industriales y Técnicas.

UNE: acrónimo de Una Norma Española.

NTU: Nephelometric Turbidity Unit.

LP: Legionella pneumophila

Lp1: Legionella pneumophila serogrupo 1.

BOE: Boletín Oficial del Estado-España

LR1: Estación lluviosa

LR2: Estación seca

WTB: Legionellosis - Cooling Technology Institute

ISO: International Organization for Standardization

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PHO: Public Health Ontario- Canada

SM: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

S1= Serogrupo 1 de *Legionella pneumophila*.

ASHRAE: Sociedad Estadounidense de Ingenieros de Calefacción, Refrigeración y Aire Acondicionado.

CDC: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades.

USEPA: Agencia de Protección Ambiental.

DOL-OSHA: Administración de Seguridad y Salud Ocupacional.

CMS: Centers for Medicare & Medicaid Services.

ELDSNEL: Europea de Vigilancia de Enfermedades del Legionario.

ECDC: Centro Europeo para la Prevención y Control de enfermedades.

AENOR: Asociación Española de Normalización.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

LCRSP: El Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública.

FFP2: Mascarillas protectora autofiltrante.

HPC: Recuento de heterotrofos.

L+D: Proceso de Limpieza y desinfección.

NMP: Numero más probable.

BCYE: Agar de carbón tamponado y extracto de levadura.

BA: Agar sangre.

GVPC: Glicina, Vancomicina, Polimixina B y Cicloheximida.

MMWR: Morbidity and Mortality Weekly Report-CDC.

H: Hoteles.

EO: Edificios dedicados al arrendamiento de oficinas y aspectos generales.

EHOP: Edificios Hospitalarios.

EFPA: Edificios dedicado a las fabricaciones.

AIHA: American Industrial Hygiene Association.

DOHMH: Department of Health and Mental Hygiene.

NFS: National Sanitation Foundation.

LD: Enfermedad del Legionar

# RESUMEN

La bacteria *Legionella pneumophila* es la responsable de la mayor parte de los casos que se producen por la enfermedad de los legionarios de interés en Salud Pública. En exteriores, esta bacteria vive en la tierra y en el agua, pero no suele provocar infecciones. En cambio, en interiores puede multiplicarse en cualquier sistema de agua, como las torres de enfriamiento. Este estudio implementó la prueba Legiolert (un ensayo basado en cultivo para *L. pneumophila* basado en el número más probable [MPN]) en 20 instalaciones del área metropolitana de la ciudad de Panamá con un total de 98 torres de enfriamiento muestreadas: 53 en las estaciones lluviosa y 45 en la estación seca. *L. pneumophila* se detectó en un 56.6% (30 detectadas entre 1100 a 1 109 700 NMP/L) en la estación lluviosa y 51.1% (23 detectada entre 1100 a 361 000 NMP/L). Las pruebas de serogrupo mediante el uso de MicroKit *Legionella* demostraron la prevalencia de *Legionella pneumophila* (Lp1) entre un 73.3% a 91.3%. y (Lp2-15) entre un 8.69% a 26.7%. La enumeración de *Legionella pneumophila* mediante el Legiolert comparando los Límites máximo permitidos por la UNE 100030 (<1000 NMP/mL) se obtuvo los siguientes valores: Los resultados obtenidos en esta primera fase de muestreo de la estación seca (LR2) resalta la detección de *Legionella pneumophila* en un 51.1 % (en 23 torres de enfriamiento) y un 48.9% no se detectó *Legionella pneumophila* (en 22 torres de enfriamiento).

PALABRAS CLAVE: *L. pneumophila*, Legiolert, *Legionella*, Serogrupo

The *Legionella pneumophila* bacterium is responsible for most of the cases that occur from Legionnaires' disease of interest in Public Health. Outdoors, this bacteria lives on land and in water, but it does not usually cause infections. Instead, indoors it can multiply in any water system, such as cooling towers. This study implemented the Legiolert test (a culture-based assay for *L. pneumophila* based on the most probable number [MPN]) in 20 facilities in the metropolitan area of Panama City with a total of 98 sampled cooling towers: 53 in the rainy seasons and 45 in the dry season. *L. pneumophila* was detected in 56.6% (30 detected between 1,100 to 1,109,700 MPN / L) in the rainy season and 51.1% (23 detected between 1,100 to 361,000 MPN / L). Serogroup tests using the *Legionella* MicroKit demonstrated the prevalence of *Legionella pneumophila* (Lp1) between 73.3% to 91.3%. and (Lp2-15) between 8.69% to 26.7%. The enumeration of *Legionella pneumophila* using the Legiolert, comparing the maximum limits allowed by the UNE 100030 (<1000 MPN / mL), the following values were obtained: The results obtained in this first sampling phase of the dry season (LR2) highlight the detection of *Legionella pneumophila* in 51.1% (in 23 cooling towers) and 48.9% *Legionella pneumophila* was not detected (in 22 cooling towers).

KEY WORDS: *L. pneumophila*, Legiolert, *Legionella*, Serogroup

# 1. INTRODUCCIÒN

El género *Legionella* pertenece al orden taxonómico *Legionellales*, que incluye las familias *Coxiellaceae* y *Legionellaceae*. Se han propuesto tres géneros diferentes para las *Legionellaceae*; *Legionella*, *Flouribacter* y *Tatlockia*. Si embargo, los últimos dos géneros mencionados nunca han sido utilizados ni aceptados de forma generalizada, y se utiliza casi de forma universal el único género *Legionella* para describir a todas las especies (UNE100030, 2017). La *Legionella* es una bacteria que incluye 50 especies que habitan normalmente en el suelo y el agua. La *Legionella* es una bacteria gram negativa, delgada y redondeada por los extremos, de unos 0,5-0,7  $\mu$  de ancho y de 2 a 20  $\mu$  de largo. Esta bacteria crece mejor en condiciones aerobias, pero tolera ambientes casi anaerobios. Tiene unos requerimientos nutritivos complejos, incluyendo un 13 requerimiento inusual de concentraciones elevadas de hierro. A pesar de todo es capaz de sobrevivir en un amplio rango de condiciones físico-químicas (pH, temperatura, conductividad, etc.) (Plá, 2017).

La bacteria *L. pneumophila* se describió por primera vez en 1977, como causa de un brote de neumonía grave registrado en 1976 en un centro de convenciones en los Estados Unidos (OMS, 2018). En esta era una convención de la legión americana, donde asistieron más de 4000, asistentes, 220 enfermaron y 30 murieron. Como consecuencia, se le denominó a esta enfermedad como la enfermedad de los legionarios (Legionelosis) (UNE-CEN/TR16355, 2014). Desde entonces se la ha asociado a brotes relacionados con sistemas hídricos artificiales deficientemente mantenidos, en particular torres de enfriamiento o condensadores de evaporación utilizados para sistemas de acondicionamiento de aire y refrigeración industrial, sistemas de agua fría y caliente en edificios públicos y privados, e instalaciones de hidromasaje (OMS, 2018). Las normas de prevención de *Legionella* hacen una división en cuatro bloques: a. Instalaciones en edificios, medios de transporte y de proceso (Ejemplo: Sistema de agua caliente sanitaria, Sistema de agua fría de consumo. Sistema de agua contra incendios, Torres de enfriamiento y condensadores evaporaditos, y otros); b. Instalaciones recreativas (Ejemplo: Spas, jacuzzi, bañeras de hidromasaje, tratamiento con choros a presión, otras); c. Instalaciones urbanas (Ejemplo: Fuentes de ornamentales con difusión de aerosoles, Sistema de riego por aspersión, otros); d. Instalaciones de uso sanitario/terapéutico (Ejemplo: Respiradores, Nebulizadores, Sistema de agua a presión en tratamiento dentales y otros) (UNE100030, 2017).

La *Legionella* es una bacteria ambiental capaz de sobrevivir en un amplio intervalo de condiciones físico-químicas, multiplicándose entre 20 °C y 45 °C, destruyéndose a 70 °C. Su temperatura óptima de crecimiento es 35-37 °C. Su nicho ecológico natural son las aguas superficiales, como lagos, ríos, estanques, formando parte de su flora bacteriana. Desde estos reservorios naturales la bacteria puede colonizar los sistemas de abastecimiento de las ciudades y, a través de la red de distribución de agua, se incorpora a los sistemas de agua sanitaria (fría o caliente) u otros sistemas que requieren agua para su funcionamiento como las torres de refrigeración. En algunas ocasiones, en estas instalaciones, mal diseñadas, sin mantenimiento o con un mantenimiento inadecuado, se favorece el estancamiento del agua y la acumulación de productos nutrientes de la bacteria, como lodos, materia orgánica, materias de corrosión y amebas, formando una biocapa. La presencia de esta biocapa, junto a una temperatura propicia, explica la multiplicación de *Legionella* hasta concentraciones infectantes para el ser humano. Si existe en la instalación un mecanismo productor de aerosoles, la bacteria puede dispersarse al aire. Las gotas de agua que contienen la bacteria pueden permanecer suspendidas en el aire y penetrar por inhalación en el aparato respiratorio (BOE-A-2003-14408, 2003). Los equipos de enfriamiento evaporativos (torres de enfriamiento) y humectadores en los que no se produce recirculación del agua, y que por tanto trabajan a "agua perdida" no entrañan riesgo apreciable de multiplicación de la *Legionella*, ya que no se producen las condiciones óptimas para el crecimiento de esta bacteria (Plá, 2017).

*L.pneumophila* tolera concentraciones de cloro y por ello, sobrevive los procedimientos de tratamiento de agua. La mayoría de las infecciones causadas por *L. pneumophila* se debe a la inhalación de organismos dispersados: las bacterias penetran en las vías respiratorias superiores cuando se aspira el líquido que la contiene o se inhala un aerosol contaminado. Si el cuerpo no lo elimina, llega a los pulmones, donde se multiplica causando alguno de los dos tipos de infecciones: Legionelosis o "Enfermedad del Legionario", caracterizada por una neumonía lobular atípica grave con síntomas polisistémicos, con una tasa de muerte entre 5 y 30%; o fiebre de Pontiac, enfermedad

parecida a la influenza, que se manifiesta con fiebre, dolor muscular, mareos y afectación general del organismo (OMS, 2018). Los factores determinan en qué forma se presentará la enfermedad no se conocen, aunque probablemente el estado del huésped influye en ello. La legionelosis es una enfermedad bacteriana de origen ambiental que suele presentar dos formas clínicas diferenciadas: la infección pulmonar o «Enfermedad del Legionario», y la forma no neumónica, conocida como «Fiebre de Pontiac», que se manifiesta como un síndrome febril agudo y de pronóstico leve. La infección por *Legionella* puede ser adquirida en dos ámbitos, el comunitario y el hospitalario. En ambos casos la enfermedad puede estar asociada a varios tipos de instalaciones, equipos y edificios. Puede presentarse en forma de brotes y casos aislados o esporádicos (BOE-A-2003-14408, 2003).

En nuestro país y a nivel de Latinoamérica no existe una vigilancia pública de la enfermedad del *Legionario* en el cuadro clínico de pacientes con neumonía que puede ser causada por el microorganismo *Legionella pneumophila*. El agente causal como *Legionella pneumophila* que es un patógeno que puede afectar severamente a personas sanas como enfermos mediante la inhalación de bioaerosoles provenientes de reservorio de las torres de enfriamiento y otros puntos sensitivos dentro de las instalaciones. En nuestro país cada día aumenta la utilización de torres de enfriamiento por parte de la empresa para lograr un ahorro en el consumo energéticos con el fin obtener un ambiente satisfactorio al cliente que los visita. Por tal motivo la enfermedad del Legionario debe ser de interés de Salud Pública, con el fin de establecer las medidas de prevención y normas de control para el uso de tales equipos que puede generar indirectamente una contaminación a los usuarios que concurran a dicho lugares o a su entorno de ubicación.

Los sistemas de agua caliente sanitaria y las torres de refrigeración han sido las instalaciones que con mayor frecuencia se han identificado como fuentes de infección por las condiciones adecuadas de crecimiento de la *Legionella* (Temperaturas entre 35 a 60°C). Las pérdidas producidas en forma de microgotas son diseminadas al aire, pudiendo ser captadas por las aspiraciones de aire de los ventiladores del climatizador (toma de aire

exterior), pudiendo así ser introducidas en el interior del edificio por los conductos. Evidentemente si la torre de enfriamiento se halla alejada de la toma de aire exterior del climatizador, el riesgo de contaminar el edificio disminuye considerablemente. Recordemos que, en el caso de que uno de estos sistemas esté contaminado por *Legionella*, el 75% de las partículas del bioaerosol son respirables, y que se pueden transportar eficazmente hasta distancias de 1.6 Km (Plá, 2017).

Con este trabajo se busca identificar y cuantificar la *Legionella pneumophila* (prevalencia) en agua de las torres de enfriamiento (demostrando que la misma puede ser una fuente de reservorio adecuada para este microorganismo) en las instalaciones de la Ciudad de Panamá, debido a que no se cuenta con investigaciones en nuestro país y se necesitan las bases científicas para la implementación de guías de recomendación para la prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella pneumophila* en instalaciones con el fin de evitar posibles brotes de la enfermedad de Legionario en la población panameña.

## 2. OBJETIVOS

## **2.1. OBJETIVO GENERAL**

- Identificar y Cuantificar la *Legionella pneumophila* en agua de las torres de enfriamiento en las instalaciones de la Ciudad de Panamá.

## **2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer la mayor prevalencia de *Legionella pneumophila* en aguas de las torres de enfriamiento en el área metropolitana de la ciudad de Panamá.
- Evaluar parámetros microbiológicos (recuento de heterótrofos) y fisicoquímicos (Turbidez, Conductividad, pH, Temperatura, Cloro residual o compuesto activo del Biocida) en las aguas de torres de enfriamientos.
- Caracterización de los serogrupos de *Legionella pneumophila* detectados mediante la utilización de pruebas de aglutinación Latex.
- Comparar el método detección de Legiolert vs Standard Methods (SM) 9260J para la detección de *Legionella pneumophila* usando la Norma ISO/TR 13843:2000 o ISO 17994:2004.
- Sensibilizar a los encargados de mantenimiento preventivo de las torres de enfriamientos de las instalaciones muestreadas para que sean agentes de multiplicadores.

## 3. ANTECEDENTES

### 3.1 Generalidades de *Legionella*

Tras el primer brote epidémico reconocido de la enfermedad del legionario, acontecido en 1976, se remonta a la torre de enfriamiento en la azotea del Hotel Bellevue. Más tarde se descubrió que *Legionella*, también podrían colonizar y amplificarse en los sistemas de agua domésticos, como el sistema de agua caliente. En el año 1977 fue nombrado *Legionella* para honrar a las víctimas de la convención de legionarios) *pneumophila* (síntomas de neumonía y ocurrieron en Filadelfia) *Legionella* se encuentra presente de forma generalizada en ambientes acuáticos naturales y artificiales, suelos, composts y puede causar legionelosis. *Legionella* puede desarrollarse intracelularmente en protozoos tales como *Acanthamoeba castellanii*, especies de *Harmannella* o especies de *Naegleria*. Se han descrito al menos 61 especies diferentes de *Legionella*. En 26 de estas especies, se han registrado algunas cepas con capacidad infectiva para los humanos. *Legionella pneumophila* puede subtiparse en al menos 15 serogrupos diferentes; otras nueve especies también puede subtiparse en al menos dos serogrupos distintos. La monitorización de *Legionella* es importante desde la perspectiva de la salud pública con el propósito de identificar fuentes ambientales que pueden constituir un riesgo de legionelosis, tales como torres de enfriamiento, sistemas de distribución de agua caliente o fría en edificios y los equipamientos asociados, tales como piscina de spa, las unidades dentales, las unidades de aire acondicionado, etc. La monitorización es también importante para la validación de las medidas de control y verificar el modo contante su efectividad (UNE100030, 2017).

La *Legionella* son pequeños bacillos Gram negativo con exigentes requerimientos de crecimiento. Las proteínas se emplean, más que los hidratos de carbono, como fuentes de energía. Son microorganismos aerobios estrictos. El serogrupo más importante es el S1 de *L. pneumophila* provocó la epidemia de 1976 de Filadelfia y es la causante del 70% al 90% de todos los casos de la enfermedad del legionario para los que se han efectuado aislamiento de la cepa bacteriana (WTB-148, 2008).

Al menos veinte de las especies se han relacionado con enfermedades humanas. La primera especie, *L. pneumophila* sigue siendo la especie más común y primaria asociada con la enfermedad. Adicionalmente, *L. pneumophila* se encuentra que incluye al menos 14 serotipos. *Legionella pneumophila* el serotipo S1 no es solo el tipo más común (seguido de los serotipos 4 y 6) detectado en muestras ambientales, sino también el más común asociado con la enfermedad. Se estima que *L. pneumophila* representa del 80 al 85% de la enfermedad, así como las cepas recuperadas de las fuentes de agua asociadas con los edificios. Su serotipo 1 es el subtipo primario encontrado en la enfermedad y las fuentes ambientales (WTB-148, 2008).

*Legionella* las bacterias pueden sobrevivir en un rango de temperatura de 20-50°C (o 68 a 122°F) y crecer en un rango de temperatura de 25- 42°C (o 77 a 108°F), aunque hay indicios de que pueden sobrevivir en temperaturas inferiores a 20°C. Las temperaturas cercanas a los 55°C o 131°F comienzan a matar al organismo. La ecología de este grupo de bacterias es importante en su propagación. Son a base de agua y se pueden aerosolizar. Se encontró que *L. pneumophila* puede sobrevivir hasta 139 días a temperatura ambiente en agua destilada y durante más de un año en agua corriente. Crecen, no solo sobreviven, en el agua del grifo en asociación con las amebas. Los organismos pueden sobrevivir en aerosoles y se han encontrado a una distancia de hasta 200 m de la fuente de aerosol. Se descubrió que el material proteínico y los extractos de algas azul-verdes estabilizan el organismo en aerosoles. Se ha descubierto que se propagan a través de los sistemas de HVAC (Calefacción, Ventilación y Aire acondicionado) cuando las bacterias que crecen en la torre de enfriamiento se aerosolizan y entran en el sistema de admisión de aire. Investigaciones recientes sugieren que las bacterias establecen una relación simbiótica con una variedad de protozoos y amebas. Crecen y se multiplican dentro de estos organismos. Esa asociación hace que el tratamiento para eliminar la bacteria sea mucho más difícil. Además del agua de la torre de enfriamiento, *Legionella* se han aislado bacterias de los suministros de agua potable, lagos, suelos, etc (WTB-148, 2008).

Los serogrupos de *Legionella* S2-S16, generan lo que se conoce como la fiebre de Pontiac se considera una forma más leve de la enfermedad causada por *Legionella* bacterias como lo indica su nombre, la fiebre y las enfermedades similares a la gripe son los síntomas principales de la fiebre de Pontiac. Esta enfermedad no se considera letal. Sin embargo, más del 95% de la población expuesta puede desarrollar síntomas después de un corto período de incubación. Una recuperación completa se produce un par de días después.

Debido a los requisitos de temperatura cálida para *Legionella* la amplificación, los sistemas de agua caliente (así como las torres de enfriamiento) son particularmente susceptibles. Además, las patas y esquinas muertas de las tuberías y el calentador de agua caliente, y la estratificación de la temperatura en el calentador pueden permitir la sobrevivencia de la bacteria *Legionella* e incluso amplificarse. La biopelícula o biofilm en las superficies interiores del sistema de agua es relativamente inerte al calor y puede proteger a las bacterias de temperaturas extremadamente altas (WTB-148, 2008).

Para indicar la efectividad de las medidas de control tomadas y proporcionar una alerta temprana de posibles problemas, todos los sistemas de alto riesgo, como las torres de enfriamiento y los sistemas de agua domésticos, deben ser probados para las bacterias de *Legionella* de forma rutinaria (trimestralmente para sistemas normales o mensualmente para torres en centros de salud). Las pruebas comunes realizadas para la calidad del agua de las torres de enfriamiento, como el pH y los recuentos de placas heterotróficas (también conocidos como recuentos de placas estándar), no tienen correlación directa con el agua de enfriamiento que contiene bacterias de *Legionella*. También es importante señalar que las pruebas deben utilizarse para complementar las prácticas de mantenimiento que se utilizan o para indicar dónde pueden ser inadecuadas (WTB-148, 2008).

Sin embargo, recomendaciones para monitorear las bacterias de *Legionella* en los sistemas de agua han sido recomendadas por agencias estatales, organizaciones profesionales y grupos comerciales. El DOL-OSHA mantiene un sitio web informativo sobre *Legionella* bacterias y legionelosis. La dirección web es <http://www.osha.gov>. Además de OSHA, la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (USEPA) y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) han participado activamente en la investigación, la calidad del agua y los problemas de salud pública relacionados con *Legionella* bacterias y legionelosis. Sus sitios web son [www.epa.gov](http://www.epa.gov) y [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov), respectivamente. Recientemente, la Sociedad Estadounidense de Ingenieros de Calefacción, Refrigeración y Aire Acondicionado, Inc. (ASHRAE) publicó un nuevo conjunto de pautas (Pauta ASHRAE 12-2000) sobre la prevención y el control de la Legionelosis en los sistemas de agua de los edificios. El documento presenta el primer conjunto de pautas disponibles en los Estados Unidos que cubren todos los sistemas de agua en un edificio.

### **3.2 Distribución de la *Legionella***

Se cree que la enfermedad del legionario está presente en todas las partes del mundo (BOE-A-2003-14408, 2003). Se han descrito casos de la enfermedad del legionario en África, América del Norte y del Sur, Australia, Europa y Japón por lo que puede decirse que se distribuye por todo el mundo. Ahora bien, como los edificios que cuentan con un circuito complejo de suministro de agua y con sistemas de acondicionamiento de aire se hallan más extendidos en los países desarrollados, es en ellos donde la enfermedad presenta una mayor incidencia y constituye un notable problema de salud pública (Sandrea et al, 2015).

En Europa, Australia y los Estados Unidos de América, se detectan sobre 10 a 15 casos por cada millón de habitantes (OMS, 2018).

Entre un 75% y un 80% del conjunto de casos notificados son personas mayores de 50 años, y entre el 60% y el 70% son hombres. También son factores de riesgo para la legionelosis extrahospitalaria o asociada a los viajes: el tabaquismo, el consumo excesivo de alcohol, las neumopatías, la inmunodepresión y las enfermedades respiratorias o renales crónicas (OMS, 2018). La bacteria *Legionella* puede causar un tipo grave de neumonía llamada LD en personas en riesgo. Los que están en riesgo incluyen personas que tienen al menos 50 años de edad, fumadores o personas con afecciones médicas subyacentes, como enfermedad pulmonar crónica o inmunosupresión. Los brotes se han relacionado con sistemas de agua mal mantenidos en edificios con sistemas de agua grandes o complejos, incluidos hospitales e instalaciones de atención a largo plazo. La transmisión puede ocurrir a través de aerosoles de dispositivos como regaderas, torres de enfriamiento, jacuzzis y fuentes decorativas ( CMS, 2017)

El periodo de incubación de la enfermedad neumónica oscila normalmente entre 2 y 10 días, aunque en la Fiebre de Pontiac es sensiblemente más corto, de 5 a 66 horas. La transmisibilidad, desde el agua, persiste mientras persista la contaminación de la fuente de infección a concentraciones suficientes. La susceptibilidad a la enfermedad es universal, pero afecta con mayor frecuencia a individuos del grupo etéreo comprendido entre los 40 y los 70 años, presentándose de dos a tres veces más en varones que en mujeres y siendo rara su aparición en niños. También es más frecuente la infección en sujetos inmunodeprimidos, diabéticos, pacientes con enfermedades pulmonares crónicas, individuos fumadores y alcohólicos (A.M.E.S, 2016).

Aunque hay notificaciones de la enfermedad durante todo el año, la mayor parte de los casos esporádicos y brotes comunitarios se produce a finales del verano y el otoño, debido presumiblemente a que el microorganismo prolifera mejor en los reservorios acuáticos durante los meses de calor. En los hospitales, los casos y brotes, que fundamentalmente se

asocian a los circuitos de distribución de agua sanitaria caliente, se pueden producir durante todo el año (BOE-A-2003-14408, 2003).

### **3.3 Incidencia y Letalidad**

No se conoce bien la incidencia de la enfermedad del legionario, puesto que los estudios realizados en grupos poblacionales representativos han sido escasos hasta ahora. Las estimaciones disponibles muestran un rango entre 2 y 20 casos por 100.000 habitantes año. En un estudio prospectivo de una cobertura del 10% de la población de Seattle la incidencia anual se estimó en 12 casos por 100.000 habitantes. En Nottingham se observó una incidencia mucho más baja, de 1,9 por 100.000 habitantes, mientras que en el estudio prospectivo de Ohio la incidencia fue de 6 por 100.000 adultos. El CDC estima que cada año se producen en los EE.UU. entre 10.000 y 20.000 casos de la enfermedad, de los que se declaran a las autoridades entre 1.500 y 1.800, el 23% de los cuales, aproximadamente, son nosocomiales (OMS, 2018).

Aproximadamente 1,000 casos de legionelosis se reportan anualmente a los Centers for Disease Control and Prevention (CDC), pero se estima que más de 25,000 casos de esta enfermedad ocurren cada año en el mundo, causando más de 4,000 muertes. Como referencia de un país de América- México, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica publicó en 2005 el reporte de dos casos con diagnóstico clínico de neumonía por *Legionella*, sin pruebas de laboratorio confirmatorias y ninguno por aislamiento del agente causal; estos casos fueron del Estado de México y Guerrero (Manzanares Gaudy y Montiel Norma, 2014).

En las neumonías por legionela la letalidad se sitúa, en general, entre el 10 y el 30%. Son determinantes de la misma: las características del inóculo, la especie y serogrupo del

microorganismo, la adquisición comunitaria o nosocomial, los factores individuales de susceptibilidad y el tratamiento administrado al inicio del proceso. Las neumonías nosocomiales suelen tener mayor letalidad que las comunitarias (OMS, 2018).

En el destacado estudio sobre los casos notificados al CDC de los EEUU entre 1980 y 1989, la letalidad global fue del 25%, siendo del 20% en los que la adquirieron en la comunidad y del 40% en los enfermos con neumonía nosocomial. La letalidad asociada a *L. pneumophila* serogrupo 1 fue del 35,6%, la del serogrupo 6, del 62,9% y la de *L. micdadei*, del 8,6% (OMS, 2018).

Según la Norma (UNE100030, 2017) se recuerda que la legionelosis es una enfermedad de declaración obligatoria, por parte de los servicios médicos privados y públicos, en España desde el año 1996, al crearse la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Del mismo modo, todos los casos, especialmente los asociados a viajes, se declaran en la Red Europea de Vigilancia de Enfermedades del Legionario (ELDSNET), dependiente del Centro Europeo para la Prevención y Control de enfermedades (ECDC).

La proporción de neumonías de origen comunitario causadas por *L.pneumophila* se estima en torno a un 0,5-5% del total de las mismas. A pesar de que la legionelosis es un problema bien conocido, los datos son muy escasos en los países en desarrollo, ya que no existen redes adecuadas de vigilancia y notificación de casos. Habida cuenta que los entornos de riesgo y las poblaciones vulnerables se encuentran en todo el mundo, es seguro que el problema de la *Legionella* no es realmente conocido en estas regiones (OMS, 2018).

En EEUU, según datos de los CDC, entre 8.000 y 18.000 personas son hospitalizadas con legionelosis. Recientemente, los CDC americanos han incluido los viajes como un

factor de riesgo para la legionelosis, habiendo detectado que más del 20% de los casos notificados de esta enfermedad se relacionaban con algún tipo de viaje (OMS, 2018).

En Europa, es una enfermedad infrecuente, generalmente notificada en forma de infecciones aisladas, con tasas de incidencia (según los ECDC) de 1,16 casos/100.000 habitantes, a pesar que ésta se ha incrementado en el 17% entre 2009 y 2010. El mayor número de casos se registra en Francia, España e Italia, que representan el 62% de los casos europeos. En 2011 se notificaron dos brotes de mayor entidad, uno en Italia (17 casos) y otro en Grecia (15 casos) (OMS, 2018).

En España, según los datos obtenidos de la vigilancia epidemiológica de la enfermedad, se detecta un aumento en la frecuencia de casos de un 52% desde 1997 (191 casos declarados) hasta el momento actual (1315 casos en 2009). Esto se debe probablemente a una mejora en la detección y en la notificación de la enfermedad, más que por un aumento de la incidencia real de la enfermedad (OMS, 2018).

Según el Informe de casos determinado de Legionelosis en Europa reportado por la ECDC (Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades) especifica lo siguiente (ECDC, 2017):

- ✚ La enfermedad del legionario sigue siendo una infección respiratoria infrecuente y principalmente esporádica con una tasa de notificación general en 2017 para la UE / EEE de 1,8 por 100 000.
- ✚ Existe una heterogeneidad en las tasas de notificación entre los países de la UE / EEE, con la tasa más alta registrada por Eslovenia (5,8 por 100 000).
- ✚ La tasa de notificación anual aumentó continuamente durante el período 2013-2017, de 1,2 por 100 000 en 2013 a 1,8 en 2017.
- ✚ Hubo un aumento del 30% en el número de casos en 2017 en comparación con 2016.

- ✚ Cuatro países (Francia, Alemania, Italia y España) representaron el 68% de todos los casos notificados en 2017.
- ✚ Los varones de 65 años y más fueron los más afectados (7,0 por 100 000).

En América podemos poner como referencias casos que se ha detectado en Estados Unidos, su ente de control el CDC comenta estos puntos generales (CDC, 2018):

- ✚ La cantidad de casos notificados a los CDC ha ido aumentando desde el año 2000. En el 2017, los departamentos de salud notificaron aproximadamente 7500 casos de enfermedad Del legionario en los Estados Unidos.
- ✚ Los departamentos de salud notificaron aproximadamente 6100 casos de enfermedad del legionario en los Estados Unidos en el 2016. Sin embargo, debido a la probabilidad de que no se diagnostiquen todos los casos, esta cifra podría representar una subestimación de la incidencia real.
- ✚ Aproximadamente 1 de cada 10 personas que contraen la enfermedad del legionario morirá.
- ✚ Según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, la mayoría de las personas se recuperan, pero entre el 5% y el 30% de los que se contagian con la enfermedad mueren. Se estima que entre 8.000 y 18.000 casos hospitalizados de legionelosis ocurren cada año en Estados Unidos.
- ✚ En una ciudad como Nueva Jersey se puede dar cada año entre 250 y 350 casos de esta enfermedad de Legionario.

### **3.4 Cadena de condiciones para que el patógeno infecte al ser humano**

#### **3.4.1 Microorganismo *Legionella***

Hasta ahora han sido reconocidos 50 especies de *Legionella* y 48 serogrupos. De los 18 serogrupos reconocidos de *L. pneumophila*, 1 y 6 son los que con mayor frecuencia causan enfermedad. Además de este serogrupo, destacan como patógenas las especies *L.*

*micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. longbeachae*, que han sido aisladas principalmente en pacientes inmunodeprimidos con neumonía ( UNE-EN-ISO11731-2, 2008).

Las legionelas tienen la estructura característica de los bacilos gramnegativos, con una dimensión de 0,3 a 0,9  $\mu\text{m}$  de ancho y 1,5 a 5  $\mu\text{m}$  de largo. Presentan desde formas cocoides o bacilares en los tejidos a formas muy alargadas en algunos cultivos. Son motiles (excepto *L. oakridgensis*) por uno o más flagelos polares o subpolares, y en ellas se ha demostrado la presencia de fimbrias y de una estructura polisacárido acídica extracelular ( UNE-EN-ISO11731-2, 2008).

*Legionella* normalmente capaces de crecer en no menos de 2 días en un medio agar tamponado de extracto de levadura y carbón vegetal que contiene L-cisteína y hierro (III) y que forman colonias, normalmente blancas, o colonias coloradas que van desde el púrpura a azul o a verde amarillento, algunas especies emiten fluorescencia bajo luz UV de longitud de onda larga. Las colonias tienen la apariencia de vidrio esmerilado si se observan en un microscopio estereoscópico de baja potencia ( UNE-EN-ISO11731-2, 2008).

Se tiñen muy tenuemente con la coloración de Gram, en cambio lo hacen bien con el método de Giménez y las técnicas argénticas. No son alcohol-ácido-resistentes, aunque *L. micdadei* lo es débilmente en muestras clínicas o de tejidos. Desde el punto de vista metabólico son aerobias estrictas, capnófilas, escasamente sacarolíticas y en general metabólicamente poco activas. La principal fuente de energía la obtienen de los aminoácidos, algunos de los cuales son esenciales para su crecimiento. Si bien se desarrollan muy bien en presencia de hierro, éste no es un factor esencial, aunque sí lo es la cisteína para el aislamiento ( UNE-EN-ISO11731-2, 2008).

### 3.4.2 Reservorio de *Legionella*

Las instalaciones que con mayor frecuencia se encuentran contaminadas con *Legionella* y han sido identificadas como fuentes de infección son los sistemas de distribución de agua sanitaria, caliente y fría y los equipos de enfriamiento de agua evaporativos, tales como las torres de refrigeración y los condensadores evaporativos, tanto en centros sanitarios como en hoteles u otro tipo de edificios (BOE-A-2003-14408, 2003).

La Legionela consigue nutrientes en su hábitat natural porque son aportados por otros microorganismos, como amebas, protozoos ciliados y otros, que, en el caso de los sistemas artificiales como cañerías, acumuladores e interiores de las torres de refrigeración, se hallan dentro de biocapas («biofilms») que recubren las superficies. Las amebas y los protozoos se consideran huéspedes naturales y amplificadores de *Legionella* spp. La ecología y la supervivencia de *Legionella* en el medio acuático están muy relacionadas con estos microorganismos en los que la bacteria es capaz de proliferar, sobrevivir y resistir factores ambientales hostiles. La interacción entre legionela y un protozoo o ameba genera un endosimbionte que proporciona al huésped aminoácidos y otros factores de crecimiento que la mayoría de protozoos necesitan como nutrientes. Las biocapas incorporan algas y microorganismos (flavobacterias y cianobacterias) que se adhieren a las paredes de las conducciones y depósitos de agua (BOE-A-2003-14408, 2003) .

La formación de las biocapas se ve favorecida por el estancamiento de agua, la existencia de ramales o tramos ciegos o de uso infrecuente, la disminución del flujo de agua, los materiales usados en la construcción de las cañerías o de las bombas, y la temperatura del agua. Se considera que la formación de biocapas es una adaptación a la precariedad en nutrientes del agua sanitaria. Los microorganismos que forman las biocapas comparten nutrientes procedentes de materiales de la superficie de la tubería o de la fase

acuosa. Entre los géneros bacterianos que proporcionan factores de crecimiento a la legionela figuran *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Flavobacterium* y *Alcaligenes* spp. El material en que crecen los microorganismos incluye productos de corrosión del metal. La biocapa facilita así el crecimiento bacteriano de legionela y la protege frente a la acción de los biocidas y las técnicas de prevención aplicadas contra ella, como son el hipercalentamiento o la hipercloración (J. Vaqué Rafart y X. Martínez Gómez, 2002).

Las bacterias del género *Legionella* son termofílicas, crecen en el agua a temperaturas entre 20 y 50 °C y poseen un desarrollo óptimo entre 35 y 38 °C. Estas temperaturas son inusuales en hábitats acuáticos, aunque frecuentes en las instalaciones y dispositivos que en los últimos treinta años han tenido una amplia expansión en la sociedad, como por ejemplo, las torres de refrigeración en las que la temperatura del agua suele mantenerse a unos 25-35 °C para conseguir una máxima eficiencia. Por debajo de los 20°C las bacterias permanecen latentes, sin multiplicarse, sobreviven durante un período de tiempo variable entre 40 y 60 °C y mueren por encima de los 60 °C. Según la norma de AENOR (UNE100030, 2017) “La temperatura del agua para que se produzca la proliferación de la bacteria debe estar en el rango de 20°C a 45°C, y es óptimo alrededor de 37°C. A temperaturas muy bajas queda en letargo y vuelve a multiplicarse en condiciones de temperaturas favorables”. Mantener la temperatura del agua, en el circuito de agua caliente, por encima de 50 °C en el punto más alejado del circuito o en la tubería de retorno al acumulador. La instalación permitirá que el agua alcance una temperatura de 70 °C (BOE-A-2003-14408, 2003).

La legionela, desde su nicho natural en las aguas superficiales y a través de la red de distribución, puede pasar a colonizar los sistemas de suministro de agua de las poblaciones, e incorporarse a los circuitos de agua sanitaria fría y caliente y depósitos de edificios y viviendas, que pueden convertirse en reservorios secundarios donde sobrevive el microorganismo. Las instalaciones, equipos y dispositivos que requieren agua para su funcionamiento y la reciben de los citados circuitos, como las torres de refrigeración, los

condensadores de evaporación y las bañeras de hidromasaje, constituyen fuentes desde donde el agente se transmite al ser humano (Ilustración 1). Muchas de estas fuentes también pueden actuar como reservorios (J. Vaqué Rafart y X. Martínez Gómez, 2002).

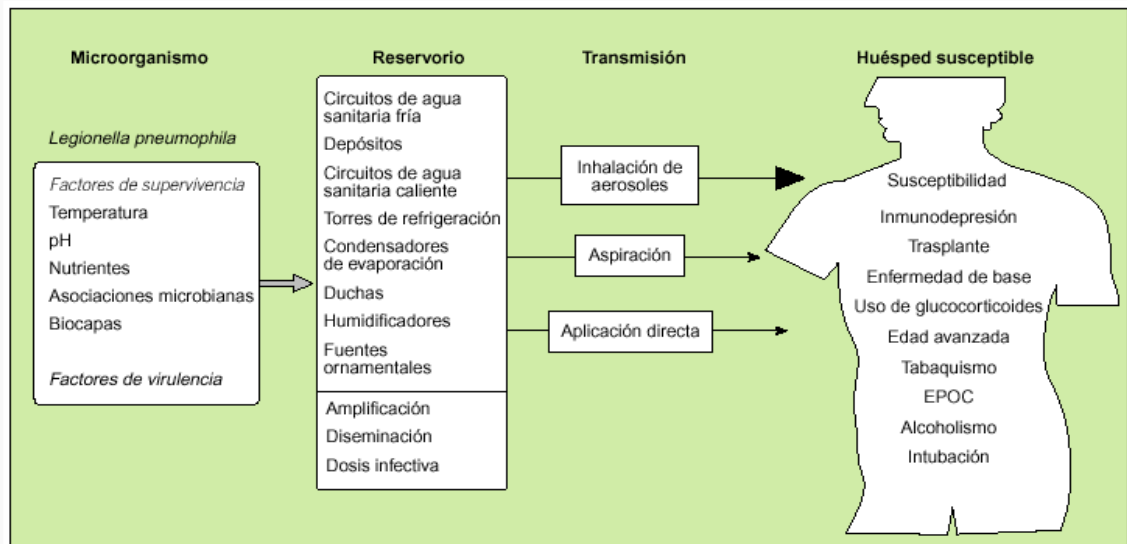


Ilustración 1: Mecanismo de cadena epidemiológica

Fuente: <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-epidemiologia-legionelosis-13038561>

Para que pueda infectar a un individuo, la bacteria, además de colonizar un reservorio, debe haberse amplificado a efectos de que el inóculo sea suficiente. Este fenómeno de la amplificación ocurre cuando el crecimiento y multiplicación bacteriana es rápido y masivo, debido a que las condiciones de temperatura, aporte de nutrientes a través de lodos, materia orgánica y asociaciones microbianas, la humedad y pH, y otras características fisicoquímicas, son favorables. Se puede producir en los reservorios y fuentes antes citadas. Por otro lado, en las fuentes pueden generarse aerosoles que se diseminan por el entorno y llegan al ser humano. Además, algunos de estos sistemas artificiales poseen ventiladores que contribuyen a diseminar extensamente el microorganismo (J. Vaqué Rafart y X. Martínez Gómez, 2002).

### 3.4.3 Mecanismo de transmisión

La infección se transmite por vía aérea a través de la inhalación de aerosoles o gotitas respirables ( $< 5 \mu\text{m}$ ) que contienen *Legionella*, y también por microaspiración de agua contaminada. Mediante ambas vías, las partículas microbianas pueden llegar al alveolo pulmonar donde quedan retenidas. El tracto respiratorio constituye la puerta de entrada del microorganismo en el ser humano. La inhalación de aerosoles es la vía de mayor trascendencia epidemiológica (Ilustración 1).

Como tercer mecanismo de transmisión debe comentarse que se han descrito casos de neumonía por instalación de agua contaminada en vías respiratorias, o al usar agua contaminada para limpiar una herida quirúrgica. La eventual aplicación directa del microorganismo en áreas corporales susceptibles constituye el tercer posible mecanismo de transmisión de la infección, aunque es muy infrecuente (J. Vaqué Rafart y X. Martínez Gómez, 2002).

En las torres de refrigeración, se puede producir una gran amplificación de *Legionella* y una notable producción de aerosol contaminado, si el mantenimiento y la limpieza son insuficientes, en especial en aquellas que funcionan de manera discontinua o irregular y mantienen agua estancada durante largos períodos de tiempo. La diseminación puede ser muy elevada al poner en marcha una torre que ha estado inactiva durante semanas y no se ha limpiado antes de entrar en servicio. En general, los aerosoles de las torres de refrigeración pueden transmitir la infección dentro de un área geográfica limitada de unos 200 m; ahora bien, en determinadas circunstancias, como vientos y corrientes de aire favorables, los aerosoles transportadores de *Legionella* pueden alcanzar de 1,6 a 3,2 km (INSTRUMENTS, HANNA, 2020).

Los sistemas y conductos de aire acondicionado de los edificios pueden aspirar y distribuir aerosoles procedentes de torres de refrigeración o de condensadores de evaporación, situados en zonas próximas (INSTRUMENTS, HANNA, 2020) .

### **3.4.4 Fuentes Comunitarias y Hospitalarias**

#### **3.4.4.1 Fuentes comunitarias**

Las instalaciones que con mayor frecuencia se hallan colonizadas por Legionela y que se han identificado como fuentes de infección comunitaria son las torres de refrigeración y los condensadores de evaporación. También deben tenerse en cuenta las instalaciones y dispositivos que utilizan agua en su funcionamiento y producen aerosoles, tanto si se hallan ubicadas en el interior como en el exterior de edificios, por ejemplo: fuentes ornamentales, sistemas de riego por aspersión, piscinas, bañeras de hidromasaje y otras de características similares. En este estudio nos enfocaremos a las torres de enfriamiento (J. Vaqué Rafart y X. Martínez Gómez, 2002). Los factores que condicionan el riesgo son los siguientes:

##### **3.4.4.1.1 Desinfección del agua:**

La desinfección es indispensable siempre que exista tanque de almacenamiento, tanto en los casos en que el abastecimiento se realiza mediante captación propia, como en aquellos en que el agua procede de la red de abastecimiento público, debido a que a pesar de que el agua procedente de la red lleva una concentración adecuada de cloro, durante el almacenamiento el cloro libre residual se evapora y, por lo tanto, es indispensable una rechloración para mantener unas concentraciones de desinfectante que garanticen las adecuadas condiciones microbiológicas (J. Vaqué Rafart y X. Martínez Gómez, 2002).

#### **3.4.4.1.2 Circuitos de agua cerrados en la red de agua sanitaria caliente**

En la mayoría de los edificios de concurrencia pública, la producción de agua sanitaria caliente se realiza mediante circuitos primarios cerrados, con acumuladores o intercambiadores de calor. Los elementos que forman parte de las instalaciones del circuito de agua caliente son los que tienen más riesgo de ser colonizados por *Legionella spp.* Los serpentines de calefacción o los circuitos de los intercambiadores y los acumuladores de calor pueden llegar fácilmente a recubrirse de incrustaciones, que pueden desprenderse y sedimentar juntamente con otras partículas en suspensión presentes en el agua, y así formar un sedimento que disminuye el rendimiento térmico del sistema y produce un descenso de la temperatura del agua. Los sedimentos e incrustaciones favorecen el acantonamiento de *Legionella spp.* y disminuyen la eficacia de la desinfección debido a que dificultan la acción del cloro. Este fenómeno facilita el crecimiento de los microorganismos, creándose las condiciones óptimas para su proliferación. Es importante, por ello, que en los sistemas de agua caliente se realice un tratamiento y/o un mantenimiento que reduzca la formación de incrustaciones y corrosiones.

#### **3.4.4.2 Fuentes hospitalarias**

El reservorio clásico de legionela en el hospital es, fundamentalmente, el sistema de distribución de agua sanitaria caliente, aunque también puede hallarse implicado el circuito de agua sanitaria fría. En los últimos años las torres de refrigeración han perdido protagonismo como origen de casos de legionelosis nosocomial. El hospital ofrece múltiples fuentes potenciales de exposición. Los aerosoles más habitualmente implicados en la aparición de legionelosis nosocomial son los generados por las duchas. La colonización orofaríngea y la aspiración de agua sanitaria podrían explicar algunos casos. Se han descrito casos asociados con el uso de nebulizadores y equipos de terapia respiratoria, material de irrigación, piscinas para hidroterapia, equipos de extinción de

incendios utilizados recientemente y cubitos de hielo producidos por máquinas situadas en las plantas de hospitalización, entre otras fuentes.

### **3.4.5 Clasificación de Torres de Enfriamiento**

Las torres de enfriamiento son sistemas mecánicos destinados a enfriar masas de agua en procesos que requieren una disipación de calor (Casal, Antonio Fernández, 2012).

El principio de enfriamiento de estos equipos se basa en la evaporación, el equipo produce una nube de gotas de agua bien por pulverización, bien por caída libre que se pone en contacto con una corriente de aire. La evaporación superficial de una pequeña parte del agua inducida por el contacto con el aire, da lugar al enfriamiento del resto del agua que cae en la bandeja a una temperatura inferior a la de pulverización (Casal, Antonio Fernández, 2012).

Hay equipos de múltiples tamaños y estructuras según la potencia a disipar, el fabricante, los materiales, etc., sin embargo, podríamos clasificar las torres de refrigeración en dos grandes categorías:

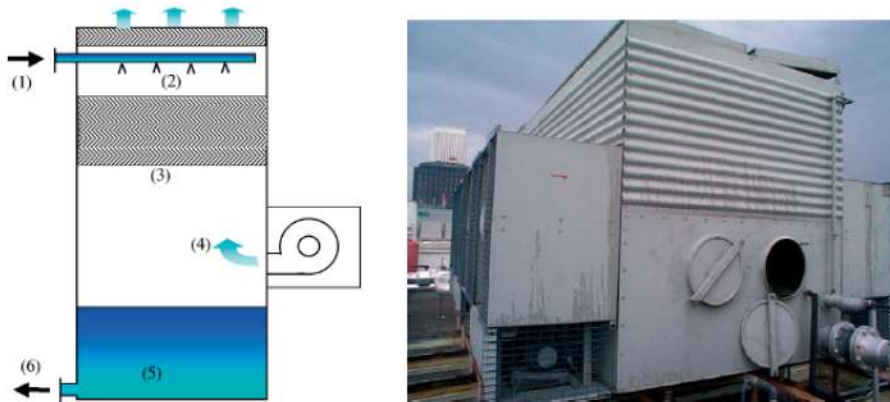
- Equipos de tiro natural
- Equipos con ventilación mecánica

#### **3.4.5.1 Equipos con ventilación mecánica**

##### **3.4.5.1.1 Equipos de tiro forzado**

Los equipos con ventilación mecánica denominados de tiro forzado, disponen de ventiladores (normalmente de tipo centrifugo salvo en las instalaciones industriales que ocasionalmente son axiales) ubicados en la parte baja de la torre que impulsan el aire al interior de la misma sobre presurizando e impulsando por tanto su salida

por la parte superior a través del relleno, el esquema general y una foto de un típico equipo de estas características se puede ver adelante.



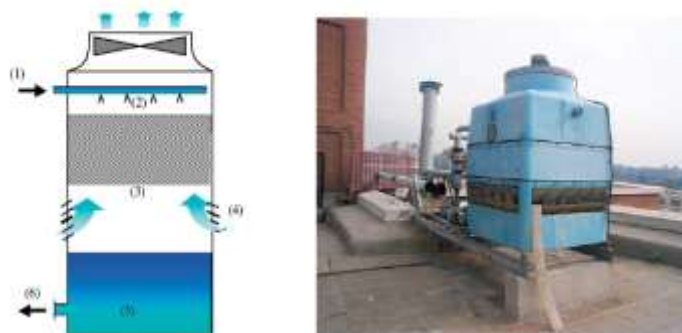
El agua de retorno procedente del punto de uso (1) es pulverizada por la parte superior de la torre (2) pasando a través del relleno (3), cuya misión es incrementar el tiempo de retención y por tanto el contacto con el aire ascendente (4) cuyo único punto de entrada es a través del ventilador. En el relleno se produce el enfriamiento, quedando el agua refrigerada en la balsa de la torre (5) que se impulsa (6) por medio de equipos de bombeo para reiniciar el ciclo de intercambio de calor en el punto de uso.

*Ilustración 2: Torre de enfriamiento de tiro forzado*

Fuente: (Casal, Antonio Fernández, 2012)

### 3.4.5.1.2 Equipos de tiro inducido

Los equipos de tiro inducido a diferencia de los anteriores funcionan en depresión, es decir el ventilador, localizado en la parte superior de la torre, extrae aire del interior de la unidad que se renueva a través de aperturas localizadas en la parte baja de la misma, según se puede apreciar en la fotografía y el esquema mostrados abajo.



El agua de retorno procedente del punto de uso (1) es pulverizada por la parte superior de la torre (2) pasando a través del relleno (3), cuya misión es incrementar el tiempo de retención y por tanto el contacto con el aire ascendente (4) cuya zona de entrada es a través de las aperturas laterales. En el relleno se produce el enfriamiento, quedando el agua refrigerada en la balsa de la torre (5) que se impulsa (6) por medio de equipos de bombeo para reiniciar el ciclo de intercambio de calor en el punto de uso.

*Ilustración 3: Torre de enfriamiento con Tiro Inducido*

Fuente: (Casal, Antonio Fernández, 2012)

Como parte de este estudio se utilizarán las referencias bibliográficas: BOE 865/2003 y UNE como parte de este estudio se utilizarán las referencias bibliográficas: BOE 865/2003 y UNE 100030:2017 que contiene los límites máximos permisibles para los análisis microbiológicos y fisicoquímicos requerido para la torre de enfriamiento. La BOE 865/2003 define la torre de enfriamiento como una instalación con mayor probabilidad de proliferación y dispersión de *Legionella*.

#### **3.4.6 Medidas preventivas y controles establecidos para *Legionella***

Como medidas preventivas a nivel ambiental y para promover el cuidado de la Salud Publica, existe países que ha implemento normativas o guías de recomendaciones que puedan aplicarse para su realización de cada instalación. Según la (BOE-A-2003-14408, 2003) del gobierno español estipula en sus artículos 3,4 y 5:

##### **Artículo 3. Notificación de torres de refrigeración y condensadores evaporativos.**

Los titulares y las empresas instaladoras de torres de refrigeración y condensadores evaporativos están obligados a notificar a la administración sanitaria competente, en el plazo de un mes desde su puesta en funcionamiento, el número y características técnicas de éstas, así como las modificaciones que afecten al sistema. Asimismo, los titulares también deberán notificar en el mismo plazo el cese definitivo de la actividad de la instalación. Estas notificaciones se realizarán mediante el documento que se recoge en el Ilustración 5.

Los titulares de la instalación, fabricantes, instaladores, mantenedores u otras entidades que dispongan de información sobre la instalación objeto de notificación, estarán obligados a atender las demandas de información realizadas por las autoridades sanitarias

competentes. A este efecto, deberán disponer de los correspondientes registros donde figuren las operaciones realizadas, que estarán a disposición de la autoridad sanitaria.

#### **Artículo 4. Responsabilidad de los titulares de las instalaciones.**

Llevar a cabo los programas de mantenimiento periódico, las mejoras estructurales y funcionales de las instalaciones, así como del control de la calidad microbiológica y físico-química del agua, con el fin de que no representen un riesgo para la salud pública. La contratación de un servicio de mantenimiento externo no exime al titular de la instalación de su responsabilidad.

#### **Artículo 5. Registro de operaciones de mantenimiento.**

Los titulares de las instalaciones recogidas en el artículo 2 deberán disponer de un registro de mantenimiento.

- a) Fecha de realización de las tareas de revisión, limpieza y desinfección general, protocolo seguido, productos utilizados, dosis y tiempo de actuación.
- b) Fecha de realización de cualquier otra operación de mantenimiento (limpiezas parciales, reparaciones, verificaciones, engrases) y especificación de éstas, así como cualquier tipo de incidencia y medidas adoptadas.
- c) Fecha y resultados analíticos de los diferentes análisis del agua.
- d) Firma del responsable técnico de las tareas realizadas y del responsable de la instalación.

El registro de mantenimiento estará siempre a disposición de las autoridades sanitarias responsables de la inspección de las instalaciones.

**TABLA 1**

**Parámetros indicadores <sup>(1)</sup> de la calidad del agua en torres de refrigeración y condensadores evaporativos**

Parámetros físico-químicos	Niveles
Turbidez	≤ 15 UNF <sup>(1)</sup>
Conductividad	2000
pH	6,5-9,0 <sup>(1) (2)</sup>
Fe total	≤ 2 mg/l
Nivel de biocida	Según especificaciones del fabricante

(1) Los informes de los análisis deberán especificar el correspondiente método analítico basado en alguna norma tipo UNE-EN, ISO o Standard Methods, e indicar su límite de detección o cuantificación.

(2) Debe estar comprendida entre los límites que permitan la composición química del agua (dureza, alcalinidad, cloruros, sulfatos, otros) de tal forma que no se produzcan fenómenos de incrustación y/o corrosión. El sistema de purga se debe automatizar en función a la conductividad máxima permitida en el sistema indicado en el programa de tratamientos del agua.

(3) Se valorará este parámetro a fin de ajustar la dosis de cloro a utilizar (UNE 100030-2001) o de cualquier otro biocida.

(4) El agua en ningún momento podrá tener características extremadamente incrustantes ni corrosivas. Se recomienda calcular el índice de Ryznar o de Langelier para verificar esta tendencia.

*Ilustración 4: Parámetros indicadores de la calidad del agua en torres de refrigeración y condensadores evaporativos (Tabla N°1-BOE), Fuente: (BOE-A-2003-14408, 2003)*

Dado en Madrid, a 4 de julio de 2003.

JUAN CARLOS R.

La Ministra de Sanidad y Consumo,  
ANA MARÍA PASTOR JULIÁN

**ANEXO 1**  
**Documento de notificación de torres de refrigeración y condensadores evaporativos**

ANEXO 1  
Documento de notificación de torres de refrigeración y condensadores evaporativos

Año:  Mes:  Día:

Título: .....

Instalador: .....

Representante (en su caso): .....

Dirección: ..... P.O. Box: ..... Código postal: .....

Ubicación de los equipos. (Especificar dirección y ubicación exacta, altura del receptor, distancia del receptor a la vía pública, torres de aire y ventanillas, etc. etc.)

Torre de evaporación	M. de medida	Unidad	0-2000	0-2000	0-2000	0-2000
Torres de refrigeración						
Condensadores evaporativos						

Régimen de funcionamiento:  Continuo<sup>(1)</sup>  Estacional<sup>(2)</sup>  Intermitente<sup>(3)</sup>  Irregular<sup>(4)</sup>

Horas/días de funcionamiento: .....

Explotación del agua:  Red Pública  Superficial  Subterránea

Suministro Propio  Subterránea

¿Existe depósito?  No  Sí (Especificar ubicación)

Fecha de cesar defectivos de la actividad de la instalación: .....

(1) Funcionamiento de forma inintermitente.  
(2) Funcionamiento condicionado por las condiciones climatológicas que varían con el año.  
(3) Funcionamiento por períodos de modo de corto duración.  
(4) Que los equipos funcionan durante un período determinado.

*Ilustración 5: Documento de notificación de torres de enfriamiento y condensadores evaporativos. (Anexo 1 BOE)*

Fuente: (BOE-A-2003-14408, 2003)

**Las torres de refrigeración y sistemas análogos (BOE-A-2003-14408, 2003):**

- a) Estarán ubicados de manera que se reduzca al mínimo el riesgo de exposición de las personas a los aerosoles. A este efecto se deberán ubicar en lugares alejados tanto de las personas como de las tomas de aire acondicionado o de ventilación.
- b) Los materiales constitutivos del circuito hidráulico resistirán la acción agresiva del agua y del cloro u otros desinfectantes, con el fin de evitar los fenómenos de corrosión. Se evitarán los materiales que favorecen el desarrollo de bacterias y hongos como el cuero, madera, fibrocemento, hormigón o los derivados de celulosa.
- c) El diseño del sistema deberá hacerse de manera que todos los equipos y aparatos sean fácilmente accesibles para su inspección, limpieza, desinfección y toma de muestras.
- d) Existirán suficientes puntos de purga para vaciar completamente la instalación y estarán dimensionados para permitir la eliminación de los sedimentos acumulados.
- e) Deberán disponer de sistemas separadores de gotas de alta eficiencia cuyo caudal de agua arrastrado será menor del 0,05 por ciento del caudal de agua circulante.
- f) Deberán disponer de sistemas de dosificación en continuo del biocida.

**Revisión de la Torres de enfriamiento (BOE-A-2003-14408, 2003):**

En la revisión de todas las partes de la instalación se comprobará su correcto funcionamiento y su buen estado de conservación y limpieza.

La revisión de todas las partes de una instalación para comprobar su buen funcionamiento, se realizará con la siguiente periodicidad: anualmente el separador de gotas, semestralmente, el condensador y el relleno y mensualmente la bandeja. Se revisará el estado de conservación y limpieza general, 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.

Se revisará también la calidad físico-química y microbiológica del agua del sistema determinando los siguientes parámetros, mensualmente, temperatura, pH, conductividad, turbidez, hierro total y diariamente nivel de cloro o biocida utilizado (Ilustración 4). Recuento total de aerobios en el agua de la bandeja con periodicidad mensual (Ilustración 6). Se determinará *Legionella* con una periodicidad adecuada al nivel de peligrosidad de la instalación, como mínimo trimestralmente, y siempre 15 días después de la realización del tratamiento de choque. Se incluirán, si fueran necesarios, otros parámetros que se consideren útiles en la determinación de la calidad del agua o de la efectividad del programa de mantenimiento de tratamiento del agua.

TABLA 2

**Frecuencia mínima de muestreo para torres de refrigeración y condensadores evaporativos**

Parámetros	Frecuencia mínima
Legionella <sup>(1)</sup> .	Trimestral.
Aerobios totales <sup>(2)</sup> .	Mensual <sup>(3)</sup> .

(1) Análisis realizado según la norma ISO 11731 Parte 1, 1998. Calidad del agua. Detección y enumeración de Legionella.

(2) Análisis realizado según la norma ISO 6222, 1999. Calidad del agua. Enumeración de microorganismos cultivables. Recuento de colonias por siembra en medio de cultivo de agar nutritivo.

(3) Con valores superiores a 10.000 UFC/ml será necesario comprobar la eficacia de la dosis y tipo de biocida utilizado y realizar un muestreo de Legionella.

*Ilustración 6: Frecuencia de control de prevención de Legionella*

Fuente: (BOE-A-2003-14408, 2003)

Cuando se detecten cambios en los parámetros físico-químicos que miden la calidad del agua, se revisará el programa de tratamiento del agua y se adoptarán las medidas necesarias (Ilustración 4). Cuando se detecten cambios en el recuento total de aerobios y en el nivel de desinfectante, se procederá a realizar una determinación de *Legionella* y se aplicarán, en su caso, las medidas correctoras necesarias para recuperar las condiciones del sistema (Ilustración 7).

TABLA 3

**Acciones para torres de refrigeración y dispositivos análogos en función de los análisis microbiológicos de Legionella (\*\*)**

Recuento de Legionella (1) UFC(*)/l	Acción propuesta
≤100 ≤1.000	Revisar el programa de mantenimiento y realizar las correcciones oportunas. Remuestreo a los 15 días.
≤1.000 ≤10.000	Se revisará el programa de mantenimiento, a fin de establecer acciones correctoras que disminuyan la concentración de Legionella. Limpieza y desinfección de acuerdo con el anexo 4b. Confirmar el recuento, a los 15 días. Si esta muestra es menor de 100 UFC/l, tomar una nueva muestra al cabo de un mes. Si el resultado de la segunda muestra es ≤100 UFC/l continuar con el mantenimiento previsto.
≤10.000	Si una de las dos muestras anteriores dan valores ≤100 UFC/l, revisar el programa de mantenimiento e introducir las reformas estructurales necesarias. Si supera las 1.000 UFC/l, proceder a realizar una limpieza y desinfección de acuerdo con el anexo 4c. Y realizar una nueva toma de muestras a los 15 días. Parar el funcionamiento de la instalación, vaciar el sistema en su caso. Limpiar y realizar un tratamiento de choque de acuerdo con el anexo 4c, antes de reiniciar el servicio. Y realizar una nueva toma de muestras a los 15 días.

(1) Análisis realizado según la norma ISO 11731, 1998.

(\*) UFC/l: Unidades Formadoras de Colonias por litro de agua analizada.

(\*\*) Los análisis deberán ser realizados en laboratorios acreditados para aislamiento de Legionella en agua o laboratorios que tengan implantado un sistema de control de calidad para este tipo de ensayos.

*Ilustración 7: Acciones para torres de enfriamiento y dispositivos análogos en función de los análisis microbiológicos de Legionella*

Fuente: (BOE-A-2003-14408, 2003)

**Tabla 3 – Niveles indicadores de parámetros fisicoquímicos y aerobios en torres de refrigeración, condensadores evaporativos y sistemas análogos**

Parámetros	Niveles	Observación
Turbidez	< 15 UNF (Unidades Nefelométricas de Formacina)	Cuando se superen los niveles señalados se debe revisar el Programa de tratamiento del agua y se aplicarán las medidas necesarias para su corrección.
Conductividad	(1)	
pH	6,5 – 9,5	
Hierro total	< 2 mg/l(2)	
Aerobios totales	< 100 000 UFC//ml	

(1) Debe estar comprendida entre los límites que permita la composición química del agua (dureza, alcalinidad, cloruros, sulfatos, otros) de tal forma que no se produzcan fenómenos de incrustación y/o corrosión. El sistema de purga se debe automatizar en función de las características del agua y de la conductividad máxima permitida en el sistema, indicado en el programa del tratamiento del agua.  
(2) Análisis posterior a la digestión de la muestra. La realización de este análisis está condicionada a los materiales utilizados en la instalación, descritos en la fase de diseño.

*Ilustración 8: Niveles indicadores de parámetros fisicoquímicos y aerobios en torres de enfriamiento*

Fuente: (UNE100030, 2017)

Instalaciones de refrigeración (Torres de enfriamiento y condensadores evaporativos, centrales humidificadoras industriales, humidificadoras y equipos de enfriamientos evaporativos)

Las acciones que deben realizar al tener un resultado positivo de *Legionella* spp se describen en la (Ilustración 6 y Ilustración 7)

**Tabla E.2 - Acciones a realizar frente a resultados positivos de *Legionella* spp en torres de refrigeración y condensadores evaporativos, centrales humidificadoras industriales, humidificadores, equipos de enfriamiento evaporativo y equivalentes**

UFC/L	Acción a desarrollar y observaciones
No detectada o $\leq 1000$	Seguir con el Programa de Actuación (1)
$> 1000$ y $\leq 10\ 000$	Revisar el Programa de Actuación Asegurar que el sistema de tratamiento del agua esté funcionando correctamente Ajustar la dosis de biocida y adoptar las medidas correctoras apropiadas El responsable técnico debe valorar la necesidad de realizar una desinfección preventiva sin parada según el apartado H.3.1.2. o con parada según el apartado H.3.1.1 Muestrear nuevamente pasados aproximadamente 15-30 días tras la realización de las posibles medidas correctivas
$< 10\ 000$ y $\leq 100\ 000$	Se requieren acciones inmediatas Hacer un tratamiento de limpieza y desinfección preventiva con parada, según el apartado H.3.1.1 Revisar el Programa de Actuación Adoptar las medidas correctoras apropiadas Muestrear nuevamente pasados aproximadamente 15-30 días tras la realización del tratamiento de limpieza y desinfección y de otras posibles medidas correctivas
$> 100\ 000$	Parar el funcionamiento de la instalación hasta realizar un tratamiento de limpieza y desinfección de choque según el apartado H.3.2 Incrementar la concentración de biocida hasta disponer de nuevos resultados de <i>Legionella</i> spp Revisar y replantear el Programa de Actuación Adoptar las medidas correctoras apropiadas Muestrear nuevamente pasados aproximadamente 15-30 días tras la realización del tratamiento de limpieza y desinfección y otras posibles medidas correctivas
(1) En el caso de detectar <i>Legionella</i> el titular o responsable técnico valorará si realiza otro muestreo o realiza alguna medida preventiva adicional o correctiva.	

Ilustración 9: Acciones a realizar frente a resultados positivos de *Legionella* spp (UNE)

Fuente: (UNE100030, 2017)

Las acciones a realizar en función de recuento de aerobios totales deben ser las descritas en al siguiente :

**Tabla E.3 – Acciones a realizar según recuentos de Aerobios Totales**

UFC/ml	Acción a desarrollar y observaciones
≤ 100 000	Seguir con el Programa de Actuación
> 100 000	Valorar la necesidad de limpiar. Aumentar la concentración del biocida, complementar o sustituir el biocida

*Ilustración 10: Acciones a realizar según recuento de Aerobios totales (UNE)*  
Fuente: (UNE100030, 2017)

#### 3.4.7 Limpieza y desinfección de las torres de enfriamiento:

Se tendrá en cuenta que una desinfección no será efectiva si no va acompañada de una limpieza exhaustiva (BOE-A-2003-14408, 2003).

La limpieza y desinfección del sistema completo se realizará, al menos, dos veces al año, preferiblemente al comienzo de la primavera y el otoño(Verano e Invierno) , cuando las instalaciones sean de funcionamiento no estacional y además en las siguientes circunstancias: 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 lo determine la autoridad sanitaria.

Cuando el tiempo de parada de la instalación supere la vida media del biocida empleado, se comprobará el nivel del biocida y la calidad microbiológica –aerobios totales– (Ilustración 6) del agua antes de su puesta en funcionamiento. En caso necesario, se realizará una limpieza y desinfección de la instalación.

El procedimiento de limpieza y desinfección general para equipos que pueden cesar en su actividad, en caso de utilizar cloro, será el siguiente:

- a) Cloración del agua del sistema, al menos 5 mg/l de cloro residual libre y adición de biodispersantes capaces de actuar sobre la biocapa y anticorrosivos compatibles con el cloro y el biodispersante, en cantidad adecuada, manteniendo un pH entre 7 y 8.
- b) Recircular el sistema durante 3 horas, con los ventiladores desconectados y cuando sea posible las aberturas cerradas para evitar la salida de aerosoles. Se medirá el nivel de cloro residual libre al menos cada hora reponiendo la cantidad perdida.
- c) Neutralizar el cloro, vaciar el sistema y aclarar con agua a presión.
- d) Realizar las operaciones de mantenimiento mecánico del equipo y reparar las averías detectadas.
- e) Limpiar a fondo las superficies con técnicas adecuadas que eliminen las incrustaciones y adherencias y aclarar.
- f) Llenar de agua y añadir el desinfectante de mantenimiento. Cuando este desinfectante sea cloro, se mantendrán unos niveles de cloro residual libre de 2 mg/l mediante un dispositivo automático, añadiendo anticorrosivo, compatible con el cloro, en cantidad adecuada.

Las piezas desmontables serán limpiadas a fondo, sumergidas en una solución que contenga 15 mg/l de cloro residual libre, durante 20 minutos, aclarando posteriormente con abundante agua fría. Los elementos difíciles de desmontar o de difícil acceso se pulverizarán con la misma solución durante el mismo tiempo. En caso de equipos, que por sus dimensiones o diseño no admitan la pulverización, la limpieza y desinfección se realizará mediante nebulización eléctrica, utilizando un desinfectante adecuado para este fin (la nebulización eléctrica no se puede realizar con cloro).

El procedimiento de limpieza y desinfección general para equipos que no pueden cesar en su actividad, en caso de utilizar cloro, será el siguiente:

- a) Ajustar el pH entre 7 y 8, para mejorar la acción del cloro.
- b) Añadir cloro en cantidad suficiente para mantener en el agua de la bandeja una concentración máxima de cloro libre residual de 5 mg/l.
- c) Añadir la cantidad adecuada de biodispersante para que actúe sobre la biocapa y permita el ataque del cloro en su interior, así como un inhibidor de la corrosión, específico para cada sistema.
- d) Recircular por espacio de 4 horas manteniendo los niveles de cloro residual libre.

Se realizarán determinaciones del mismo cada hora, para asegurar el contenido de cloro residual previsto. Es obligatoria la utilización de dosificadores automáticos.

Una vez finalizada la operación de limpieza en caso de que la calidad del agua no sea aceptable se podrá renovar la totalidad del agua del circuito a criterio del responsable de mantenimiento, abriendo la purga al máximo posible y manteniendo el nivel de la bandeja.

Las torres de refrigeración y condensadores evaporativos que den servicio a instalaciones industriales de carácter singular, tales como centrales de energías térmicas, centrales nucleares y otros, dispondrán de protocolos de limpieza y desinfección específicos:

- a) Clorar el agua del sistema hasta conseguir al menos 20 mg/l de cloro libre residual y añadir biodispersantes y anticorrosivos compatibles, en cantidad adecuada, manteniendo los ventiladores desconectados y, cuando sea posible, las aberturas cerradas para evitar la salida de aerosoles.

- b) Mantener este nivel de cloro durante 3 horas, comprobando éste cada hora y reponiendo la cantidad perdida, mientras está circulando agua a través del sistema.
- c) Neutralizar el cloro y proceder a la recirculación del agua de igual forma que en el punto anterior.
- d) Vaciar el sistema y aclarar con agua a presión.
- e) Realizar las operaciones de mantenimiento mecánico del equipo y reparar las averías detectadas.
- f) Limpiar a fondo las superficies del sistema con detergentes y agua a presión y aclarar.
- g) Introducir en el flujo de agua cantidad de cloro suficiente para alcanzar 20 mg/l de cloro residual libre, añadiendo anticorrosivos compatibles con el cloro, en cantidad adecuada. Se mantendrá durante 2 horas, comprobando el nivel de cloro residual libre cada 30 minutos, reponiendo la cantidad perdida. Se recirculará el agua por todo el sistema, manteniendo los ventiladores desconectados y las aberturas tapadas.
- h) Neutralizar el cloro y recircular de igual forma que en el punto anterior.
- i) Vaciar el sistema, aclarar y añadir el desinfectante de mantenimiento. Cuando este desinfectante sea cloro, mantener un nivel de cloro residual libre de 2 mg/l mediante un dosificador automático, añadiendo el anticorrosivo compatible, en cantidad adecuada.

Las piezas desmontables serán limpiadas a fondo y desinfectadas por inmersión en una solución de agua que contenga 20 mg/l de cloro residual libre, durante al menos 20 minutos. Las piezas no desmontables o de difícil acceso se limpiarán y desinfectarán pulverizándolas con la misma solución durante el mismo tiempo. En caso de equipos, que por sus dimensiones o diseño no admitan la pulverización, la limpieza y desinfección se realizará mediante nebulización eléctrica, utilizando un desinfectante adecuado.

### **3.4.8 Laboratorio de control para *Legionella***

Los laboratorios que lleven a cabo análisis de detección de *Legionella spp* por cultivo u otros métodos alternativos validados y certificados por un organismos nacional o internacional de certificación reconocida (PRC, método inmunomagnético, método de cultivo, etc), deben demostrar su conformidad con los requisitos técnicos de la Norma ISO 17025.

Dentro de los alcances del este proyecto, se realizó el aislamiento de las cepas positivas de *Legionella pneumophila* y la determinación de su serogrupos. Se evalúa la posibilidad de tomar una pequeña submuestra de los resultados positivos para evaluarlos con la técnica de PCR realizada por un laboratorio de referencia nacional y un laboratorio internacional aprobado por la CDC en el Programa Elite de *Legionella*.

#### **3.4.8.1 El Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública-Panamá:**

Es el Organismo que regula la actividad de todos los laboratorios de salud pública, privados de naturaleza diversa, comerciales y profesionales establecidos en la República de Panamá. Realiza los parámetros físicos, químicos, nutricionales y microbiológicos para aumentar la cobertura y eficiencia de los servicios analíticos en los programas de alimentos, aguas cosméticos y nutrición, garantizando la salud pública, protección al consumidor y facilitando el libre comercio.



*Ilustración 11: Instituto Commemorativo Gorgas de Estudios de la Salud-LCRSP*

*Fuente: [https://es.qwe.wiki/wiki/Instituto\\_Commemorativo\\_Gorgas\\_de\\_Estudios\\_de\\_la\\_Salud](https://es.qwe.wiki/wiki/Instituto_Commemorativo_Gorgas_de_Estudios_de_la_Salud)*

El Laboratorio Central de Referencia Método usado para la detección de *L. pneumophila*: PCR-PF (PCR Convencional (Punto Final)). La prueba se basa en la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) donde un fragmento de ADN conocido es copiado y amplificado billones de veces. El producto del PCR (punto final) es posteriormente visualizado en un gel de agarosa y proporciona evidencia cualitativa de la presencia de ese fragmento de ADN en la muestra ( (Herrera, Jorge, 2020)

#### **3.4.8.2 El Laboratorio EMLab P&K -Estados Unidos:**

La acreditación es una medida de competencia y coherencia. Nuestras acreditaciones y certificaciones reconocen y confirman la competencia y competencia de Eurofins EMLab P&K. Puede estar seguro de que el sistema de gestión de calidad de Eurofins EMLab P&K produce resultados de laboratorio precisos y fiables de forma constante.

El sistema de calidad de Eurofins EMLab P&K se adhiere a las estrictas directrices ISO / IEC 17025: 2005 para garantizar que reciba un alto estándar de precisión, fiabilidad e imparcialidad para los datos de su laboratorio. Nuestros laboratorios han sido validados y reconocidos formalmente por agencias externas independientes.

Eurofins EMLab P&K cuenta con los procedimientos adecuados para lograr y mantener un alto nivel de desempeño profesional. Están comprometidos con los altos estándares es un reflejo de nuestro compromiso de brindarle las mejores pruebas de laboratorio disponibles en la industria. Acreditaciones de Eurofins EMLab P&K: Laboratorio Aprobado por la CDC Elite Program (EMLAB P&k, 2020).



Ilustración 12: Certificaciones y Acreditaciones de Laboratorio EMLAB P&K

Fuente: (EMLAB P&k, 2020)

Método usando para la detección de *L. pneumophila* y clasificación del serogrupo: Aplico para la detección de *L.pneumophila* por el método ISO 11731:2017 y PCR-Tiempo Real para la clasificación del serogrupo.

La PCR en tiempo real es una modalidad del PCR de punto final, donde la acumulación de ADN amplificado es detectado y cuantificado a medida que la reacción avanza, es decir: “En tiempo real” esto se logra incorporando una molécula fluorescente que se asocia al ADN amplificado, donde el incremento de esta fluorescencia es la proporcional al incremento de la cantidad de moléculas de ADN amplificadas en la reacción( (Herrera, Jorge, 2020).

### **3.4.9 Interpretación de Resultados**

La interpretación de los resultados es muy sencilla y viable Las bacterias *Legionella* de cualquier especie y serotipo no deben estar presentes en los sistemas de agua de los edificios por encima del límite de detección (1 colonia por prueba o <1 UFC / ml). Varios estudios han demostrado que este objetivo es alcanzable en un programa de mantenimiento rentable. Se requiere un curso de acción creciente según la concentración de *Legionella* bacterias detectadas Si *Legionella* no se detecta, el programa de prueba existente y el mantenimiento deben continuar. Si se detectan niveles bajos de bacteria (<10 UFC / ml), se deben implementar medidas de control. Tenga en cuenta que, por conveniencia, el nivel se define en función de la experiencia profesional. El sistema debe volver a probarse en una o dos semanas. Si se detectan niveles más altos de bacterias o si hay bacterias presentes en una nueva prueba, el sistema debe tratarse nuevamente (BOE-A-2003-14408, 2003).

En el caso de que los sistemas de agua domésticos estén contaminados, se pueden usar varios métodos de remediación y control. Aquí se discuten tres métodos. Son: supercloración, sobrecalentamiento y secado y lavado.

El método de supercloración consiste en introducir gas de cloro libre (Cl) en el sistema de agua y permitir que los niveles de Cl aumentados circulen por todo el sistema de agua durante algunas horas. Todas las salidas se abren y se lavan para que se pueda lograr una desinfección adecuada. El monitoreo del Cl libre de las salidas seleccionadas se realiza para garantizar que haya un nivel efectivo de Cl libre en el agua. Se recomienda una concentración de Cl libre de más de 5 ppm para la supercloración. Además, se puede instalar un inyector de gas de cloro para introducir constantemente gas Cl en el sistema de agua para mantener un nivel de Cl libre a 1-2 ppm para controlar cualquier contaminación. El cloro gaseoso, aunque es altamente efectivo en concentraciones superiores a 5-10 ppm, es corrosivo para el sistema de plomería al nivel de 2 ppm o más. Adicionalmente, El método de sobrecalentamiento es elevar la temperatura del agua caliente a al menos 140°F o 60°C, o preferiblemente a 160°F o 70°C o más. El agua caliente debe circular y enjuagar todo el sistema de agua y las salidas por un período de tiempo. No hay una duración estándar para permitir que el agua súper caliente descargue el sistema. Se ha sugerido enjuagar durante 5 a 30 minutos a 160°F (70°C) o durante al menos 30 minutos a 140°F (60°C). Sin embargo, esto no tiene en cuenta la antigüedad del sistema de plomería y el grosor de la biopelícula acumulada, que no es un buen conductor de calor. Nuestra recomendación es tratar y lavar el sistema durante una hora por cada diez años de edad. Por ejemplo, para un sistema de plomería entre las edades de 11-20 años, se recomiendan dos horas de tratamiento y enjuague. Además de garantizar una duración suficiente del enjuague, La temperatura del agua caliente debe mantenerse adecuadamente. La mayoría de los calentadores de agua o las calderas no pueden compensar la pérdida de agua supercaliente durante el tratamiento. Recomendamos que el flujo de agua caliente se reduzca a goteo después de que el agua caliente que sale alcanza la temperatura deseada (verifique con un termómetro). La reducción al goteo conserva agua caliente, pero mantiene la temperatura deseable del agua caliente. Otro método, que es nuevo y experimental, es desconectar el sistema de agua, drenar toda el agua en el sistema y soplar aire seco y caliente a través de las tuberías. Después de que todo el sistema de agua esté seco, vuelva a conectarlo a la fuente de agua y enjuague el sistema. Debido a que las bacterias transmitidas por el agua son susceptibles a la desecación, el aire caliente y seco

probablemente matan las bacterias *Legionella*. El proceso de secado también facilita la eliminación de biopelículas y depósitos de incrustaciones. La biopelícula seca en la superficie interior se puede eliminar fácilmente del sistema de tuberías.

Los tres métodos discutidos eliminan bacterias *Legionella* del sistema si se llevan a cabo correctamente. Sin embargo, es probable que se vuelva a contaminar. Un método de mantenimiento que utiliza un sistema de ionización de cobre-plata (Cu-Ag) puede controlar eficazmente la reconexión y recolonización del sistema. El sistema Cu-Ag libera iones Cu y Ag en el agua como desinfectantes. Se ha encontrado que el sistema es efectivo para mantener el sistema de agua libre de contaminación por *Legionella* bacterias en la mayoría de los casos. Sin embargo, no recomendamos el sistema para desinfectar un sistema contaminado, ya que puede llevar varios meses reducir *Legionella* población bacteriana hasta el nivel no detectable. Además, se recomienda monitorear los niveles de iones de Cu y Ag en el agua caliente para asegurar que cumplan con los estándares de agua potable de la EPA, aunque normalmente no se recomienda el agua caliente para beber. Los electrodos de Cu y Ag también se deben quitar para limpiarlos y / o reemplazarlos regularmente. Este sistema es una buena póliza de seguro contra la recontaminación junto con uno de los tres métodos discutidos anteriormente.

Existen otros métodos potencialmente disponibles para tratar sistemas de agua contaminados con *Legionella* bacterias. La radiación ultravioleta y los tratamientos de ozonización son dos métodos que se mencionan con frecuencia. Nuestras evaluaciones sugieren que sus desventajas son mayores que los beneficios.

## 4. METODOLOGIA

#### **4.1 Criterios de exclusión para la selección de las muestras**

Para evaluar la prevalencia de *Legionella pneumophila* en torres de enfriamiento ubicada en el área metropolitana de la ciudad de Panamá, se solicitó de manera formal a través de una carta (

*ANEXO 1*) a cada instalación que desea efectuar controles de calidad para la detección de este microorganismos, incluyendo acuerdo de confidencialidad en los resultados .Se seleccionaron los mejores puntos accesible de las torres de enfriamiento (n= 20 Instalaciones (Hospitales, Hoteles, Industrias, edificios y otros), se colecto al menos 1.5 litro de agua (en duplicado) utilizando envases con tiosulfato de sodio (ver Certificado de calidad en ANEXO 2) como agente neutralizante. Este muestreo se realizará en Estación seca (Periodo del 2020 de enero a febrero) y Estación lluviosa (Período del 2019 de abril a diciembre). Generando una data mínima de 40 muestras tomadas en las dos estaciones. En campo se utilizará kit de muestreo para medir parámetros fisicoquímicos como: pH, cloro residual, temperatura, turbiedad, hierro total y conductividad. Las muestras serán transportadas a temperatura ambiente en una hilera sin hielo y procesadas inmediatamente. Si no puede ser posible su análisis inmediato se refrigeran, pero la misma deben ser analizadas antes de 48h como especifica el Standard Methods.

##### **4.1.1 Pasos a efectuar en el proyecto**

- Se confeccionará una lista de las Instalaciones que cuenten con Torres de enfriamiento para tomarlos en cuentas en la selección de los puntos de muestreo.
- Cada una de las empresas seleccionadas se le aplica una encuesta para el evaluar el status de monitoreo preventivo de la Legionelosis (ANEXO 7)
- Establece un cronograma de muestreo rutinario para evaluar las torres de enfriamiento en estación seca y lluviosa para los muestreos microbiológicos y fisicoquímicos (muestreo in situ).
- Se realizan los análisis correspondientes en base a la metodología de Legiolert (IDEXX Laboratories) y Standard Methods 9260 J (Método tradicional con medio BCYE+ suplementos).
- Se establecerán los procedimientos de aseguramiento de control de calidad como: controles positivos, controles negativos y si es posible, ensayos de Inter comparación para evaluar ambos métodos de determinación de *Legionella pneumophila* para ambos métodos.
- Se realizará las confirmaciones de las muestras presuntamente positivas para ambos métodos de detección y el uso de la información para hacer las comparaciones de métodos.
- Confirmación de positivos a través de las colonias del BCYE o pocillos del Legiolert presuntos para *Legionella* usando el Kit Microgen *Legionella* para la confirmación del serogrupo que pertenece las colonias positivas en *Legionella* sp, *Legionella pneumophila* S1 o *Legionella pneupmohila* S2-S15.
- Efectuar los procesos de concientización con: Seminarios, Webinar, Charlas educativas directas e información sobre el tema de *Legionella*.

#### 4.2 Toma de muestrea de *Legionella*:

Según la (UNE100030, 2017) resalta que la elección de los puntos de muestreo, el procedimiento de toma de muestras, la custodia y transporte y las condiciones de recepción por el laboratorio son aspectos que indicaran en la fiabilidad de los resultados de los ensayos, lo que puede repercutir en la toma de decisiones acertadas para optimizar el funcionamiento de las instalaciones y prevención de las legionelosis.

Generalmente se considera cualquier fuente de agua que pueda ser en forma de aerosol una fuente potencial para la transmisión de *Legionella*. Una bacteria rara vez se encuentran en los suministros municipales de agua y tienden a colonizar los puntos de los sistemas de tubería y dispositivos de puntos de uso. Para colonizar un sistema, las bacterias deben multiplicarse, y esto requiere temperaturas superiores a 25 ° C. Por lo tanto, *Legionella* se encuentran más comúnmente en sistemas de agua caliente. Estas bacterias no sobreviven en el secado.

Cuando se toman muestras para hacer análisis de *Legionella*, recoger dos muestras una de muestra agua para el análisis y otras en caso de realizar una verificación necesaria. Colectar al menos 1.5 litro de agua que permite la concentración de la muestra si es necesario. Según el (BOE-A-2003-14408, 2003) documenta que, en las torres de refrigeración, condensadores evaporativos u otros aparatos de refrigeración que utilicen agua en su funcionamiento y generen aerosoles, se tomará un litro de agua del depósito (en el punto más alejado del aporte) y del retorno. Recoger posibles restos de suciedad e incrustaciones. Medir la temperatura del agua y la cantidad de cloro residual libre.

#### 4.2.1 **Inactivación de desinfectante:**

Las muestras para ensayos microbiológicos se deben tomar en recipientes estériles de polietileno o similar, con cierre hermético y siempre debe dejarse una pequeña cámara de

aire sobre el nivel del agua. Una vez cerrado, hay que voltear el envase varias veces para que se mezcle bien el agua con el neutralizante (Rice W., Eugene y Baid B. Rodger, 2018).

En el muestreo se utilizó envases de 290mL con la presencia de un reactivo con tiosulfato de sodio (Marca IDEXX Laboratorios) como inactivación de desinfectante que pueda tomar la muestra. Según la (UNE100030, 2017) los envases normalizados que se comercializan para la toma de muestras de aguas para ensayos microbiológicos, en general, tienen una concentración de tiosulfato a razón de 20 mg/L, por lo que se puede utilizar, sin ningún sobreañadido de tiosulfato sódico, para aguas que contengan hasta 4 mg/L de cloro residual libre.

#### 4.3 Tiempo entre el muestreo y Análisis:

El periodo de tiempo transcurrido entre el muestreo y el análisis puede reducir la fiabilidad de los resultados obtenidos. Durante el transporte, se debe evitar la exposición a la luz y el calor. Siempre que se indique una temperatura de refrigeración, esta se debe referir a la temperatura de entorno de la muestra (No a la muestra en sí).

Si se toman muestras de agua a temperaturas muy diferentes no se deben transportar en la misma nevera, (por ejemplo, no mezclar muestras de agua caliente a 60°C con muestras de agua fría a 20°C (UNE100030, 2017).

Los tiempo y temperaturas de transporte aceptables deberían ajustarse a los requisitos específicos en la siguiente

**Tabla F.1 - Tiempo desde recogida hasta inicio del ensayo incluido transporte (t). Temperatura de conservación (T<sup>a</sup>) y volumen mínimo de muestra necesario (V) para ensayos microbiológicos más habituales**

Ensayo	t (h)	T <sup>a</sup> °C	V (ml)
<b>Aerobios totales</b>	< 24 <sup>(1)</sup>	5 ± 3	50 - 100
<b>Legionella spp.</b>	< 24	6- 18	1 000
	> 24 y < 48 <sup>(2)</sup>	5 ± 3	
<sup>(1)</sup> En casos excepcionales, con neutralizante y documentados puede ser inferior a 48 h.			
<sup>(2)</sup> En casos excepcionales, con neutralizante y documentados pueden ser inferior a 72 h.			

*Ilustración 13: Tabla F.1: Tiempo de toma de muestra, conservación y volumen necesario para el análisis.*  
Fuente: (UNE100030, 2017)

Según el BOE-A-2003-14402 documenta que una vez tomada las muestras se deberán llegar al laboratorio lo antes posible, manteniéndose a temperatura ambiente y evitando temperaturas extremas. Transportar todas las muestras a temperatura ambiente hasta el laboratorio, en las hieleras que ayudaran a la protección contra el calor o frío extremo. Refrigerar las muestras que no se puedan procesar con 24 a 48 horas desde el momento de la recolección (BOE-A-2003-14408, 2003).

El muestreador debe contar con los materiales necesarios para el muestreo de *Legionella* como: (UNE100030, 2017)

- Termómetro para la medición “in situ” de la temperatura.
- Medidor de cloro u otro biocida residual “in situ”.
- Tiosulfato (sino lo contiene el envase) y/o el neutralizante del biocida específico.
- Nevera portátil con refrigeración o bloques congeladores.
- Posibles herramientas para la manipulación en determinados puntos del muestreo (destornilladores, llaves de Allen, llave inglesa, alicates.)
- Guantes desechables.
- Torundas estériles
- Alcohol o toallitas desinfectantes.
- Mechero o soplete portátil para flameado si procede.

- Rotuladores, bolígrafos y etiquetados resistentes al agua.
- Equipos de medición (termómetros, pH metro, turbidímetro etc.), debe encontrarse dentro del periodo de calibración.

#### **4.4 Prácticas correctas de higiene en la toma de muestras:**

Se deben tener en cuenta una serie de precauciones para minimizar la contaminación (UNE100030, 2017):

- Lavarse las manos o llevar guantes desechables.
- Nunca fumar, comer o beber mientras se toman muestras.
- Si procede limpiar o desinfectar el punto de toma de muestras (por ejemplo, con un algodón impregnado con alcohol o toallita desinfectante) o flamear.
- No se debe introducir ningún objeto o instrumento (termómetro, pH metro) dentro del recipiente que contiene la muestra para la realización de análisis microbiológico. Los posibles análisis in situ debe realizarse en una submuestra en un recipiente aparte.
- Las neveras en la que se transportan las muestras se deben mantener limpias, de manera que nos aporten suciedad ni flora microbiana a los recipientes. A poder ser, se debe emplear neveras de uso exclusivo para este tipo de muestras.

Según la UNE 100030:2017, especifica en el Anexo F, punto F.6 “Formación y calificación del personal técnico de muestreo” que el mismo debe contar con una formación y determinación de competencias a todos los personales que participen en la toma de

muestras. Las entidades responsables de toma de muestras deben disponer de un procedimiento interno de personal donde debe incluir la formación y cualificación del personal de toma de muestra, así como deberán estar descritas las funciones del puesto de trabajo. Para efectuar un adecuado muestreo para las torres de enfriamiento en el cumplimiento de especificaciones y el control de rutina, la muestra de agua para la detección de *Legionella spp* debe tomar en alguno de los siguientes puntos, por orden de preferencia:

- Tubería de retorno del circuito: Se recomienda que la instalación disponga de un dispositivo toma muestras en el circuito de retorno del agua hacia la torre. Se deja correr el agua para eliminar el primer vertido y se procede a llenar el envase de recogida.
- Balsa de agua: Se recoge la muestra en un punto más alejado posible del aporte de agua, así como de las inyecciones de biocida. Para nuestro estudio realizado se aplicó más el muestreo en la Balsa de agua de las Torres de enfriamiento.

Se recuerda que debe tenerse en cuenta y aplicarse medidas de prevención y control de riesgos contra la legionelosis. Según la UNE 100030:2017 establece en el anexo A” Prevención de riesgos Laborales. PRL” especifica que el ámbito de la prevención de la legionelosis, entre las actuaciones que se debe llevar a cabo para que las instalaciones no supongan un riesgo, está la realización de tareas de inspección, mantenimiento, limpieza, desinfección y toma de muestras.

Los riesgos para salud de los trabajadores que realizan estas operaciones son fundamentalmente, son ser exhaustivos, los derivados de:

- Inhalación de aerosoles con *Legionella*.
- Exposición a productos químicos.
- Posturas forzadas.
- Trabajos en altura.

- Manipulación de cargas.
- Espacios confinados.

Sin desestimar el resto de los riesgos, respecto a la inhalación de aerosoles que contengan *Legionella*, los trabajadores implicados en el mantenimiento higiénico-sanitario de las instalaciones de riego puede entrar en contacto con agua contaminada, filtros, rellenos, etc., que puede contener *Legionella* y que puede poner en riesgo su salud. Por tanto, en estos puestos de trabajo, se implantarán procedimientos de trabajo que eviten o disminuyan la formación de bioaerosoles en las diferentes tareas. Asimismo, en los trabajos en laboratorio, el principal riesgo es la proyección o salpicadura durante la manipulación de las muestras de agua contaminada, para lo que se requiere el uso de guantes impermeables y de bata o ropa de trabajo adecuados. En caso de operaciones que impliquen generación de aerosoles se requieren las prácticas y la contención de un nivel 2 de bioseguridad, con el empleo de cabina de seguridad biológica para muestras usando el método tradicional. En el caso de la técnica de Legiolert es un sistema completamente cerrado, si es el caso de realizar una confirmación, realizar dentro de la cabina de seguridad biológica.

El personal de muestreo debe contar con unas mascarillas clase FFP2 como mínimo y en las instalaciones que se sospeche la presencia de *Legionella*, mascarilla FFP3, siendo estos los equipos de protección individual respiratoria, mascarillas eficaces frente a materia particulada. En cualquiera operación que en el que se entre contacto con agua de la instalación o partes sucias (filtros, rellenos, etc.) se deberán utilizar guantes en función de las necesidades de protección frente a la penetración química y biológica, junto con otros requerimientos de protección en función a la tarea a realizar (Ejemplo: uso de batas). En aquellas operaciones que puedan suponer salpicaduras de agua sucia a los ojos, se utilizará gafas de seguridad adaptables al rostro. Estará prohibido fumar, comer o beber durante la permanencia en zonas o la realización de las tareas de trabajo, en las que exista riesgo.

Tomar en consideración cuando se realice el muestreo de las torres de enfriamiento solicitar el apagado de los ventiladores para realizar la toma de muestra (UNE100030, 2017).

#### **4.5 Registros de datos de toma de muestra**

La muestra debe ser identificada de modo inequívoco e indeleble en su envase o etiqueta del envase (UNE100030, 2017).

Los datos de identificación de la misma deben coincidir con los consignados en el informes, acta y registro de la toma de muestra donde deben figurar, además, como mínimo, los siguientes datos:

- Día y hora de la toma de muestra.
- Personas que realiza la toma de muestra.
- Identificación de la muestra: código de identificación, Identificación del establecimiento de procedencia, instalación y punto exacto de muestreo.
- Características de la muestra tomada (Ejemplo: Balsa)
- Temperatura de recogida.
- Biocida empleado y concentración medida in situ (si procede).
- Neutralizante utilizado y anotación en caso de no haberlo utilizado(en muestras para análisis microbiológico).
- Otras medidas in situ que se consideren de interés (pH,etc.).

- Otras observaciones (Control post L+D, Control de rutina, etc.).

Las muestras para comprobar eficacia de un tratamiento de limpieza y desinfección (L+D) se toman dejando transcurrir un plazo aproximadamente de 15 a 30 días después de la realización del mismo.

#### 4.6 Procesamiento de análisis

Para la evaluación de nuestro proyecto en las torres de enfriamiento a nivel microbiológico se evaluó la detección y enumeración de *Legionella pneumophila* y Recuento de Heterótrofos como indicadores de calidad de la eficiencia del proceso de desinfección del Sistema.

##### 4.6.1 Recuento de aerobios mesófilos o Heterótrofos

Se tomará del muestreo de *Legionella* un volumen para realizar las pruebas a través de la técnica Simplate HPC “Se basa en la tecnología de enzimas múltiples que detectan bacterias viables en el agua, comprobando la presencia de enzimas claves que existen en esos organismos. Estas enzimas múltiples producen una fluorescencia azul al ser metabolizadas por la bacteria que se encuentra en el agua”. Este método es aprobado por Standards Methods (SM 9215 E) (Rice W., Eugene y Baid B. Rodger, 2018).



*Ilustración 14: Simplate HPC para la evaluación de los Recuentos de aerobios mesófilos*  
Fuente: (IDEXX LABORATORIES, 2015)

**Procedimiento de análisis de Simplate HPC (IDEXX LABORATORIES, 2015):**

1. Agregue  $10\pm 0,2$  ml de muestra a una probeta de medio, ponga la tapa y agite para disolver.
2. Vierta el contenido de la probeta en el centro de la base de la placa.
3. Cubra la placa con la tapa y agite suavemente para distribuir la muestra en todos los pocillos. NOTA: las burbujas de aire en los pocillos no interfieren con la muestra
4. Coloque la placa en un ángulo de  $90^\circ$  a  $120^\circ$  para verter el exceso en el paño absorbente.
5. Invierta la placa e incube durante 48 horas a  $35\pm 0,5^\circ\text{C}$ .
6. Cunte el número de pocillos que tienen fluorescencia: sujete una bombilla de 6 wats, 365 nm de luz UV a una distancia de 12,5 cm por encima de la placa. Apunte la bombilla hacia la muestra. Alternativamente, usted puede leer los pozos fluorescentes a través de la parte posterior de la base invertida del SimPlate.
7. Consulte la tabla de NMP (MPN) proporcionada para determinar el número más probable de bacteria de recuento de plaqueta heterotrófica en la muestra original. La tabla tiene en cuenta la muestra/medio eliminado en el paso e3 ( ANEXO 8).

**Notas del procedimiento**

1. Proceda con técnica aséptica.

2. Las muestras clorinadas se deben tratar con tiosulfato de sodio antes de hacer la prueba.
3. Los resultados se pueden leer desde 45 hasta 72 horas después de iniciada la incubación.
4. Elimine la muestra y el medio siguiendo buenas prácticas de laboratorio.
5. Las muestras se pueden diluir antes de agregar al medio siempre que el volumen final (muestra más diluyente esterilizado) sea  $10 \pm 0,2$  ml. Ajuste el NMP para reflejar las diluciones. Por ejemplo, si se ponen a prueba 1 ml de muestra y 9 ml de diluyente estéril (dilución de 1:10), multiplique el número de la tabla de NMP por 10 para encontrar el NMP/ml correcto (Ver ANEXO 8) .

### **Procedimiento de control de calidad**

El siguiente procedimiento se recomienda para cada lote de SimPlate para productos sometidos al HPC:

1. A. Control positivo: IDEXX-QC HPC2 : *Enterococcus faecalis*.  
B. Control negativo/blanco: use 10 ml de medios de HPC rehidratados.
2. Siga los pasos del 1 al 7.
3. Los pocillos de control negativo/blanco no deben quedar fluorescentes después de la incubación.

NOTA: Las pruebas de control de calidad interna de IDEXX se realizan según ISO 11133:2014. Los certificados de control de calidad se encuentran disponibles en idexx. (IDEXX LABORATORIES, 2015).

#### 4.6.2 Ensayos químicos y Físico-químicos:

Para obtener resultados adecuando de la eficiencia del proceso de desinfección del agua del sistema de la torre de enfriamiento incluimos dentro de este estudio controles de parámetros químicos y fisicoquímicos incluidos dentro de un plan de tratamiento continuo del agua de cada instalación. Estos parámetros analizados son muestreados en campo:

##### 4.6.2.1 Temperatura:

Se usará un termómetro de punción, el cual se sumergirá en el agua de la bandeja de la Torre de enfriamiento. El termómetro puede oscilar en un rango de 1 a 100 °C.



*Ilustración 15: Termómetro marca: Control company -calibrado para la medición de agua de las torres de enfriamiento.*

##### 4.6.2.2 Turbiedad:

Se utilizará un turbidímetro de la marca Hach y modelo 2100 Determinación turbidimetría de la relación del método de medición usando una dispersión de luz nefelometría primaria señal (90 °) a la señal de dispersión de luz transmitida. Los análisis se realizan en campo: Se toma muestra en el frasco de 10mL se introduce el frasco en la cámara de equipo y realizo la lectura de la turbiedad dando un resultado en NTU.



*Ilustración 16: Equipo HACH 2100 para la medición de la turbiedad*

#### **4.6.2.3 Conductividad:**

El sistema sensION+ medidor de conductividad portátil EC5 es un sistema integral con un menú de navegación guiado que acelera y hace más simples las pruebas generales de medición de la calidad del agua. Cada sistema está diseñado para usarlo en una amplia variedad de aplicaciones. Realizar este análisis en campo, solo tomar 100 mL de agua de la balsa de la torre de enfriamiento y colocar la sonda del equipo SensION para medir la conductividad en ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ).



*Ilustración 17: Equipo medidor de la conductividad marca HACH*

#### **4.6.2.4 Cloro total y Cloro residual libre:**

Se utilizará el equipo HI 701, Checker digital de Cloro Libre y Total, realiza las medidas según el Standars Method DPD. Este kit de cloro libre para realizar medidas precisas y

sencillas, mediante un equipo de bolsillo. Tomar alrededor de 10 mL en unos frascos especiales del kit y introducirlo dentro de la cámara de lectura y obtener los resultados. Recordar agregar el sobre de reactivo en polvo para cada análisis.



*Ilustración 18: Medidor de Cloro Total y Libre- HANNA*

#### 4.6.2.5 Bromo libre, pH, Cloro residual libre:

Kit de muestreo de agua que contiene reactivos listos para uso una vez que se toma la muestra de agua agregando una gota y posterior evaluando los resultados por cambio colorimétricos. Agregar al tubo amarillo un volumen de agua de la balsa hasta llenar la línea indicada, posterior agregar 3 gotas del reactivo determinado para cloro y bromo.



*Ilustración 19: Kit medidor de pH, Bromo Libre y Cloro residual libre*

#### 4.6.2.6 **Kit de medición de Hierro:**

Se suministran completos con todos los reactivos y equipos necesarios, incluido el disco Checker®. El disco Checker® hace que la determinación de concentración sea más precisa y fácil que un comparador de color típico. Los 3 kits contienen suficientes reactivos para realizar 100 pruebas.



*Ilustración 20: Kit de medición de Hierro*

Los análisis físicos químicos de analizaran in situ, por tal motivo cuidar los equipos de medición.

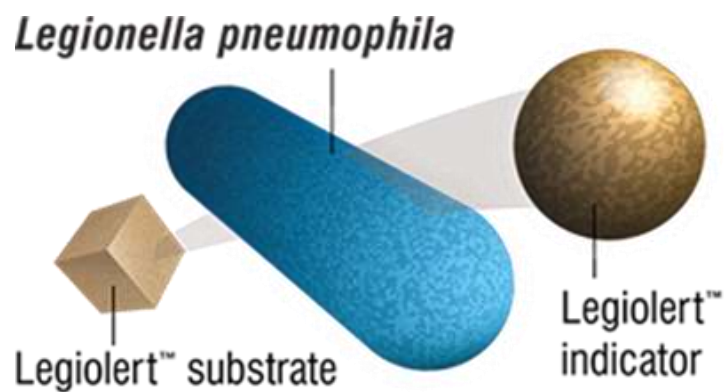
#### **4.7 Métodos para la detección y enumeración *Legionella pneumophila*:**

Una vez realizada la toma de muestra las mismas se procesaran por el método tradicional utilizando placas de Agar BCYE (Agar de carbón tamponado y extracto de levadura) y la utilización de sustrato definido Legiolert de la empresa IDEXX Laboratorios para la detección y enumeración de *L.pneumophila*. En el caso del método tradicional descrito en el SM (Standards Methods) 9260J solo se aplicará para la detección de *Legionella* sp.

##### **4.7.1 Métodos de detección y enumeración de *Legionella pneumophila* por sustrato definido (Legiolert)**

(IDEXX-LABORATORIES, 2019)

Legiolert es una prueba que detecta la *Legionella pneumophila* en muestras de agua. Esta prueba se basa en tecnología de detección de enzimas bacterianas que señala la presencia de *Legionella pneumophila* mediante la utilización de un sustrato presente en el reactivo de Legiolert. Las células de *Legionella pneumophila* crecen y se multiplican con rapidez debido al gran aporte de aminoácidos, vitaminas y otros nutrientes en el reactivo de Legiolert. Las cepas de *Legionella pneumophila* en crecimiento activo utilizan el sustrato añadido para producir un indicador de color marrón. Legiolert detecta *Legionella pneumophila* en un organismo en 100 ml en 7 días.



*Ilustración 21: Muestra como el microorganismo Legionella pneumophila consume el sustrato para liberar un indicador.*

Fuente: <https://www.idexx.com/water/products/legiolert.html> (noviembre,2017)

#### **4.7.1.1 Materiales y Reactivos**

- Guantes, Alcohol al 70 %, papel toalla
- Reactivo Legiolert IDEXX
- Legiolert supplement kit
- Legiolert pretreatment kit
- Envases estériles (vol: 125mL, 150mL y 250 mL marca IDEXX).
- Bandejas Quanti-Tray de 96 posillos.
- Molde de Goma para utilizar en el equipo Quanti Tray Legiolert.
- Tubos de ensayos chicos.

#### **4.7.1.2 Equipos**

- Sellador Quanti-Tray de IDEXX.
- Incubadoras  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  y  $39 \pm 0.5$ .
- Refrigerador 2 a  $8^{\circ}\text{C}$
- Thermohigrometros.

#### **4.7.1.3 Preparación de las muestras**

##### **4.7.1.3.1 Aguas potables (Protocolo de 10ml)**

- Agregue 90ml del diluyente estéril (Ej. Agua sin cloro, agua desionizada, buffer de fosfato, buffer Butterfield, o 0.1% de peptona) a un recipiente estéril.
- Agregue 10ml de la muestra de agua.
- Llevar la muestra a temperatura ambiente.
- Agregue el contenido del blíster Legiolert a la muestra.
- Agite hasta que los contenidos se disuelvan. La muestra puede permanecer turbia.

##### **4.7.1.3.2 Agua potable (Protocolo de 100mL)**

- Recoja 100 mL de muestra en un recipiente estéril.
- Lleve la muestra a temperatura ambiente.
- Utilizando una tira reactiva para la dureza (suministrada como parte del kit del suplemento de Legiolert ver en Anexo N°1), siga las instrucciones del fabricante para determinar si la muestra es de baja o alta dureza. Considere un resultado positivo ( $\leq 7 \text{ CaCO}_3$ ) en 0-2 almohadillas como baja dureza, y en un resultado positivo ( $\geq 14 \text{ CaCO}_3$ ) en 3-4 almohadillas como alta dureza.
- Añada el suplemento correspondiente (suministrado como parte del kit de suplemento ver en Anexo N°1) según se indica a continuación: Agite brevemente de dureza baja añada 0,33ml y para muestra de dureza alta añada 1,0ml.
- Añada el contenido del paquete del blíster de Legiolert a la muestra.
- Agite hasta que se disuelva el contenido. La muestra puede permanecer turbia.

# of Pads positive	0	1	2	3	4
CaCO <sub>3</sub> (°d)	< 3	> 4	> 7	> 14	> 21
Hardness	Low	Low	Low	High	High

Ilustración 22: Muestra los grados de dureza que se puede encontrar en las Torres de enfriamiento su neutralización

#### 4.7.1.3.3 Aguas no potables (Protocolo de 0.1mL)

- Agregar 100 ml de diluyente estéril (Ej. agua sin cloro, agua desionizada, buffer de fosfato, buffer de Butterfield o 0.1% de peptona) en un recipiente estéril.
- Agregue el contenido del blíster Legiolert al recipiente.
- Agite hasta que los contenidos se disuelvan. La solución puede permanecer turbia.
- Añada 0,2 ml de Pretratamiento Legiolert en un tubo estéril.
- Añada 0,2 ml de la muestra de agua no potable en el mismo tubo y mezcle bien.
- Incube el tubo a temperatura ambiente durante 60 segundos ( $\pm 5$  segundos).
- Mezcle el contenido del tubo y transfiera inmediatamente 0,2 ml al recipiente que contiene Legiolert y mezcle bien.

#### 4.7.1.3.4 Aguas no potables (Protocolo de 1 mL)

- Agregar 100 ml de diluyente estéril (Ej. agua sin cloro, agua desionizada, buffer de fosfato, buffer de Butterfield o 0.1% de peptona) en un recipiente estéril.
- Agregue el contenido del blíster Legiolert al recipiente.
- Agite hasta que los contenidos se disuelvan. La solución puede permanecer turbia.
- Añada 2,0 ml de Pretratamiento Legiolert en un tubo estéril.
- Añada 2,0 ml de la muestra de agua no potable en el mismo tubo y mezcle bien.
- Incube el tubo a temperatura ambiente durante 60 segundos ( $\pm 5$  segundos).

- Mezcle el contenido del tubo y transfiera inmediatamente 2,0 ml al recipiente que contiene Legiolert y mezcle bien.

#### **4.7.1.3.5 Prueba de enumeración de Quanti-Tray:**

- Vierta la mezcla de la muestra/el reactivo en una bandeja de Quanti-Tray /Legiolert. Golpee o palmee la bandeja para eliminar las burbujas de aire.
- Selle inmediatamente la bandeja en un sellador IDEXX Quanti-Tray.
- Incube las bandejas selladas: Para todas las muestras de agua potable o QC y PT, incube a  $39\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 7 días. Para las muestras de agua no potable, incube a  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 7 días. Quanti-Tray/Legiolert debe incubarse con el lado del papel hacia abajo y los pocillos hacia arriba en un ambiente humidificado (aproximadamente 85% humedad). Apile las bandejas en direcciones alternas para una mayor estabilidad. No apile más de 10 bandejas. Lea los resultados de acuerdo con la tabla de interpretación de resultados que aparece a continuación. Cuente el número de pocillos positivos y consulte la tabla de NMP (ANEXO 8) de Legiolert que se proporciona con las bandejas para obtener un número más probable. Multiplique los resultados por el factor de dilución para hallar el NMP final, si procede. Para el cálculo de número más probable del kit de Legiolert, se realiza de acuerdo a las siguientes fórmulas:

##### **Para las muestras de agua potable:**

- Protocolo de 10 mL:  $\text{NMP } Legionella = R \text{ NMP}_{\text{tabla}} \times 100$
- Protocolo de 100mL:  $\text{NMP } Legionella = R \text{ NMP}_{\text{tabla}} \times 10$

##### **Para muestras de aguas no potable:**

- Protocolo 0.1mL: NMP de *Legionella* = R NMPtabla x 10,000
- Protocolo 1.0 mL: NMP de *Legionella* = R NMPtabla x 1,000

Por ejemplo: En una charola se contó 2 pocillos grandes y 4 pequeños positivos o tubos, no vamos para la tabla de NMP y se obtiene 7.2. Utilizando el protocolo: agua potable de 10mL, tenemos que: NMP *Legionella* = R NMPtabla x 100

$$\text{NMP } Legionella = 7.2 \times 100 = 720 \text{ NMP/ 1L}$$

Ahora con el mismo ejemplo; pero esta vez con el protocolo de 100 mL: NMP *Legionella* = R NMPtabla x 10

$$\text{NMP } Legionella = 7.2 \times 10 = 72 \text{ NMP/ 1L}$$

#### 4.7.1.3.6 Interpretación de los resultados

Aspecto	Resultados
Cualquier coloración marrón superior al control negativo (con o sin turbiedad).	Positivo para <i>Legionella pneumophila</i>
Cualquier turbiedad superior al control negativo (con o sin cualquier cambio en la coloración marrón).	Positivo para <i>Legionella pneumophila</i>
Sin cambios en la coloración marrón y sin turbiedad superiores al control negativo.	Negativo para <i>Legionella pneumophila</i>

*Ilustración 23: Interpretación cualitativa de Legionella pneumophila por Quantry/Legiolert*

Fuente: (IDEXX-LABORATORIES, 2019)

- Los resultados de Legiolert son definitivos en 7 días. Además, los positivos observados antes de 7 días y los negativos observados después de 7 días también son válidos.
- La turbidez por sí sola indica crecimiento de *Legionella pneumophila* cuando el indicador puede no desarrollarse tan rápido o con fuerza.
- Para las comparaciones, puede utilizarse diluyente estéril incubado blanco que contenga reactivo Legiolert (control negativo) al interpretar los resultados.
- Legiolert es una prueba primaria de agua. Las características del rendimiento de Legiolert no se aplican a las muestras alteradas mediante enriquecimiento previo o concentración.
- Siempre deben seguirse técnicas asépticas al utilizar Legiolert. Deseche los materiales de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio autoclavar a 121°C por 30min.

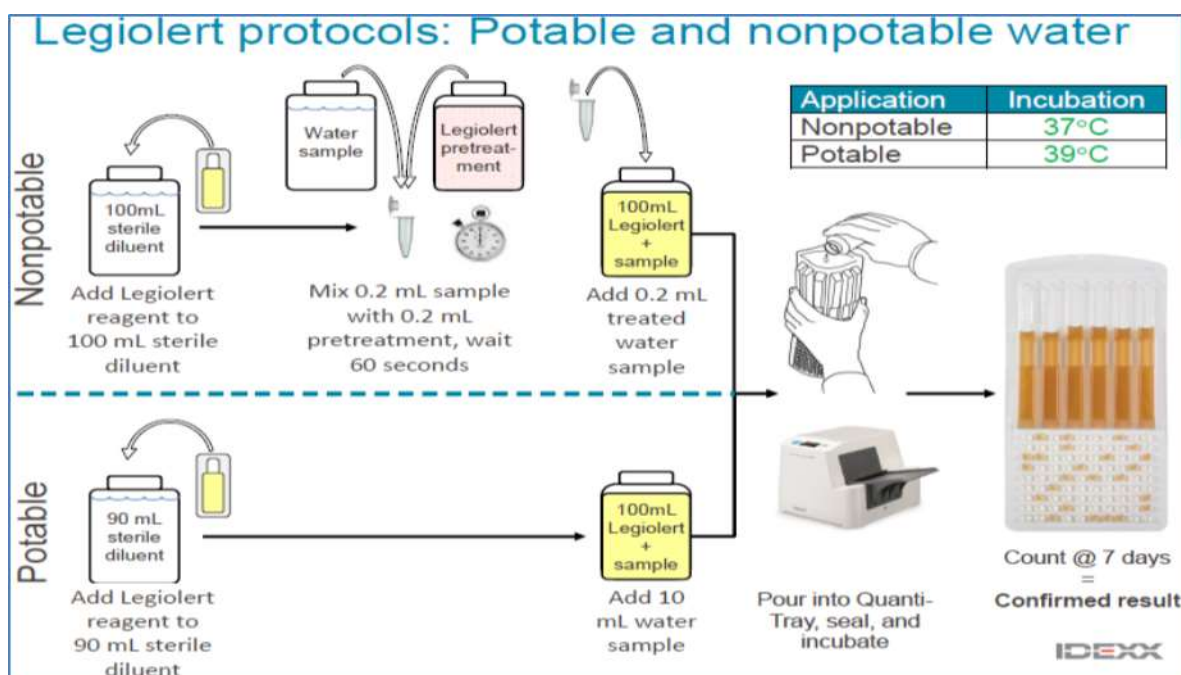


Ilustración 24: Diagrama de proceso de análisis de Legiolert

Fuente: ppt UNC-IDEXX-Legiolert-Slide –Event-Presentation-may-15-2007

Lea los resultados de acuerdo con la tabla de interpretación de resultados que aparece a continuación. Cunte el número de pocillos positivos y consulte la tabla de NMP de Legiolert que se proporciona con las bandejas para obtener un número más probable. Multiplique los resultados por el factor de dilución para hallar el NMP final, si procede.

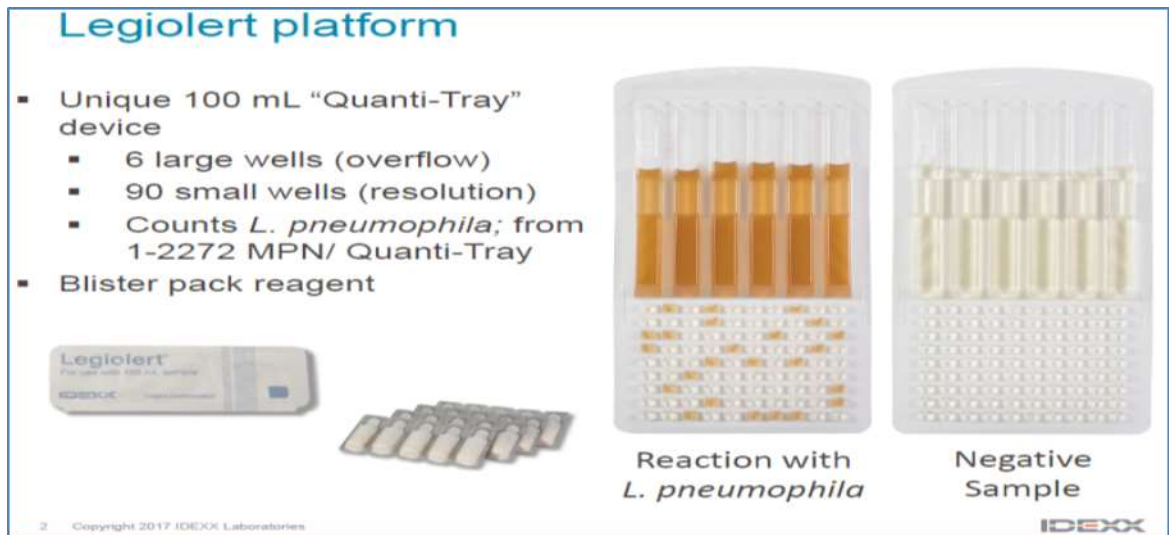


Ilustración 25: Resultado positivos (color marrón) y negativos (sin cambio de color) de Legiolert.

Fuente: ppt UNC-IDEXX-Legiolert-Side –Event-Presentation-may-15-2007

#### 4.7.1.3.7 Procedimiento IDEXX, mediante la técnica de Legiolert para el aislamiento y confirmación de *Legionella pneumophila*

Si tiene la intención de confirmar los resultados, como cuando adopta por primera vez el método en su laboratorio, se recomienda que realice los pasos que se describen a continuación:

- Limpie el área de muestreo de resultados en el lado de papel o membrana de la bandeja de Legiolert con una toallita empapada de alcohol.

- Con un chuchilla, pipeta de punta fina, o jeringa para tomar la muestra del pocillo, siempre cuando manteniendo una técnica aséptica.
- Transfiera una alícuota (10-20µL) de los pocillos muestreados a un plato de BCYE y otra alícuota a un plato BA. (Otros medios de confirmación comparables puede ser BCYE-cisteína, TSA (Tripticasa soya agar) o NA (agar nutritivo) pueden sustituir a BA (Agar Sangre)
- Realice un estriado de 3 zonas para cada alícuota en cada plato.
- Incube los platos de confirmación durante 3-7 días a 35±2°C con humedad.
- Examine las placas de confirmación BCYE y BA.
- Si hubo crecimiento del cultivo en BCYE y no en BA; considere que sea *Legionella pneumophila*. No es necesario confirmar los resultados de Legiolert por otro; los resultados son definitivos.

Nota: Al igual puede realizar la prueba directa del pocillo positivo de Legiolert a la prueba serológica detallada en el apartado 4.7.3

Control negativos de *L.pneumophila* (TSA, BA y BCYE sin cisteína) y BCYE con cisteína. (*L.pneumophila* crecimiento positivo).Nota: Las colonias de *L.pneumophila* se puede confirmar con el test de Microgen *Legionella* para determinar presencia de aglutinación de Latex para *Legionella* sp, *L. pneumohila* serogrupo 1 y *L. pneumophila* serogrupo 2. Ver el punto 4.7.3

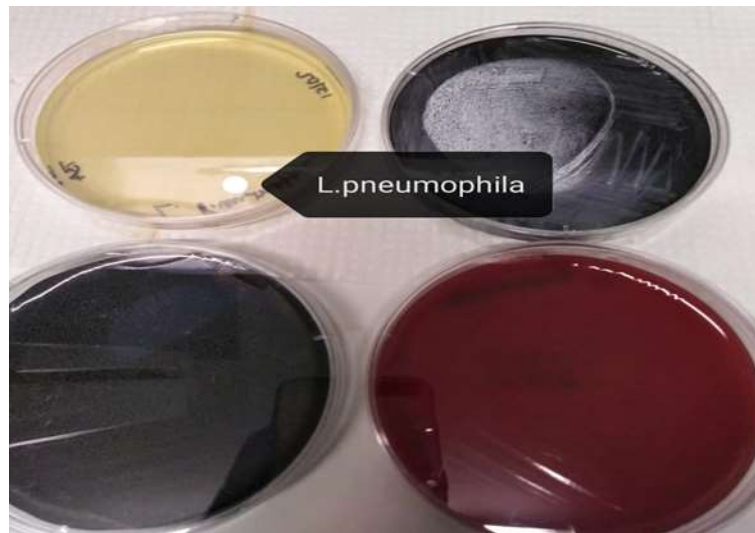


Ilustración 26: Placas para confirmar la detección de *Legionella* (BCYE, BCYE sin cisteína, Trypticase Soya Agar (TSA) o BA( Agar Sangre)

Fuente: Exp-Lab-PL-60 versión 2 (2019)

#### 4.7.2 Procesamiento con el Método SM 9260 J del Standard Methods para la detección de *Legionella* spp

(Rice W., Eugene y Baid B. Rodger, 2018):

##### 4.7.2.1 Condiciones generales del método

Este método para la detección de *Legionella* spp se fundamenta en dos vías: la primera para muestra tomadas de agua potable con baja carga microbiana y la segunda para muestras de agua no potable con alta carga microbiana. En el primer caso se aplica la utilización de técnicas de concentración como: filtración de membrana y centrifugación la cuales contribuyen a aumentar la probabilidad de detección de *Legionella* spp. Para el segundo caso, como las muestras de agua no potable puede contener altas concentración de flora acompañante que puede afectar la recuperación adecuada de *Legionella* spp., se obvia las técnicas de concentración para aplicar las técnicas de pretratamiento de la muestra, que se basa en aplicar tratamiento ácidos o térmicos que son claves para la

obtención de resultados adecuados. Es opción del analista escoger que tratamiento adecuado.

Todas las muestras son sembradas por el método de esparcido en placas de BCYE que es el medio Agar con extracto de levadura de carbón vegetal adecuado para el crecimiento de la *Legionella* spp a un pH de 8.4 suplementado con el GVPC (que contiene Glicina, Vancomicina, Polimixina B y Cicloheximida). Este suplemento GVPC contiene antibióticos contra la flora acompañante de bacterias Gram+, bacterias Gram- y hongos que son característicos en las torres de enfriamiento por su exposición al medio externo. Al igual al medio BCYE se puede agregar L-cisteína (aminoácido clave para el crecimiento), indicadores como: purpura de bromocresol y azul de bromocresol (aumentar el color de las colonias), y Suero de Albumina Bovina (suplemento para muchas *Legionella* spp fastidiosas).

**MATERIALES Y EQUIPOS NECESARIOS PARA LA TÉCNICA:**

**EQUIPOS REQUERIDOS:**

- Incubadora 35± 0.5°C
- Vortex
- Equipo de Filtración (Bomba de Vacío, Quitazato, Embudo capacidad 250 ml.)
- Cámara de flujo laminar
- Microscopio o Esteroscopio
- Lámpara de luz ultravioleta de 8 Watts de 366 nm.

**MATERIALES:**

- Guantes, Alcohol al 70 %, papel toalla
- Platos Petri 100 mm x15 mm
- Agar BCYE, G/VC\*
- Filtro de membrana de polycarbonato 47 mm con porosidad de 0.2 µm
- Envases de volumen de 1L, o Envases con fosfato de 250 mL.
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- Asa esparcidora en forma de L.
- Matraz de 1000, 500 y 50 ml.
- Pipetas estériles de 10ml, con graduación de 0,1 mL.
- Agua destilada estéril o Buffer phosphate.
- Asas bacteriológicas
- Hisopos de muestreo
- Control positivo: *Legionella bozemanii* NCTC11368
- Control negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922 o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Nota: (\*): Estos medios de cultivos son comprados comerciales, solicitando un certificado de calidad de este producto.



*Legionella cepa bozmani*

*Ilustración 27: Fases del proceso del método SM 9260J: Método tradicional-Requerimiento*

Fuente: Exp-Lab-PL-60 de *Legionella* (Procedimiento técnico) Versión 1, realizado: 02/01/2013.

#### 4.7.2.2 Pretratamiento de las muestras de agua:

Usar un procedimiento selectivo para reducir el número de bacterias que no son de *Legionella* antes de iniciar el cultivo de algunas muestras de agua con concentraciones de bacterias totales altas. Las bacterias que no representan el género *Legionella* se pueden eliminar selectivamente por el ácido o bien pretratados a una breve exposición a temperaturas altas. Las *Legionella* son más resistentes a pH más bajo y breves exposiciones a temperaturas más altas que muchas otras bacterias de agua dulce.

- Para tratamiento previo con ácido, mezclar 1 mL muestra con un Buffer ácido (pH 2,2) e incubar durante 3 a 30 min (Ver anexo N°2). La muestra es neutraliza por el Buffer dentro del agar BCYE y por lo tanto deben de esparcirse en una placa de agar al final del periodo de incubación con el Buffer de ácido.
- Para pretratamiento térmico incubar 10 ml de muestra en un baño de agua 50 °C durante 30 minutos.

Se puede utilizar multiples placas para cada muestra, incluyendo una placa de agar BCYE sin GVPC, una placa de agar BCYE+ GVPC y BCYE+ Glicina o BCYE+ Glicina+Indicadores+ 1.0% de albumina (*Legionella bozemani*). Las placas del BCYE son incubadas a 35°C con una humedad en condiciones de 2.5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.7.2.3 Identificación de Colonias de *Legionella***

La identificación de Las colonias de *Legionella* requieren aproximadamente 72 horas, aparecen en el agar BCYE y pueden requerir 7 días o más. Idealmente, Examinar las placas después de cuatro días de incubación y antes de descartar después del periodo de 7 a 10 de incubación. El centro blanco de la colonia es a menudo bordeado con matices púrpura verde, azul o rojo. Algunas especies producen colonias de *Legionella* que presentan fluorescencia blanco azules o rojo autofluorescente. Los aislamientos primarios pueden ser examinadas con luz UV de onda larga para detectar estas colonias fluorescentes.

Durante el crecimiento en agar de extracto de levadura y carbón activado, las especies de *Legionella* producen un compuesto extracelular, soluble en agua, que presenta una fluorescencia amarilla-verde cuando se expone a la luz ultravioleta de longitud de onda larga (360±20) nm. Varias especies exhiben una auto fluorescencia azul-blanca o roja bajo luz ultravioleta de longitud de onda larga.

#### 4.7.2.4 Confirmación de Colonias de placas BCYE

Las colonias presuntamente que se asemejan a *Legionella* puede identificarse en función a su necesidad de L-cisteína por un subcultivo de agar sangre o agar BCYE sin L-cisteína. Las colonias que crecen en el agar BCYE, pero no en el agar Sangre o sin BCYE L-cisteína, se supone que son *Legionellae*. Relativamente *Legionellae* son inertes en muchos medios de prueba bioquímica, es decir, estas pruebas tienen un valor limitado en la identificación. Se puede confirmar por serología como especifica el apartado 4.7.3

Según la UNE-EN ISO 111713: 2017 especifica en el 8.5 que la confirmación de las colonias presuntivas de *Legionella* en medio de cultivos: Agar BCYE (con cisteína) y Agar BCYE-cys (sin cisteína). Especifica lo mismo que los descrito en el SM 9260J, pero da las siguientes recomendaciones:

- Si en la placa de desarrollan más de un tipo de colonias presuntivas morfológicamente diferentes, se selecciona al menos una colonia de cada tipo.
- Tener cuidado en no arrastrar medio de cultivo con la colonia y en inocular en primer lugar la placa de agar BCYE-cys y a continuación, la placa de agar BCYE. Establecer incubación a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 2 a 5 d.
- Si los subcultivos iniciales no se confirman como *Legionella*. Se analizan nuevos subcultivos de colonias presuntivas de *Legionella* procedentes de otro tipo de placa (distintos medios de cultivos o tratamiento de la muestra).

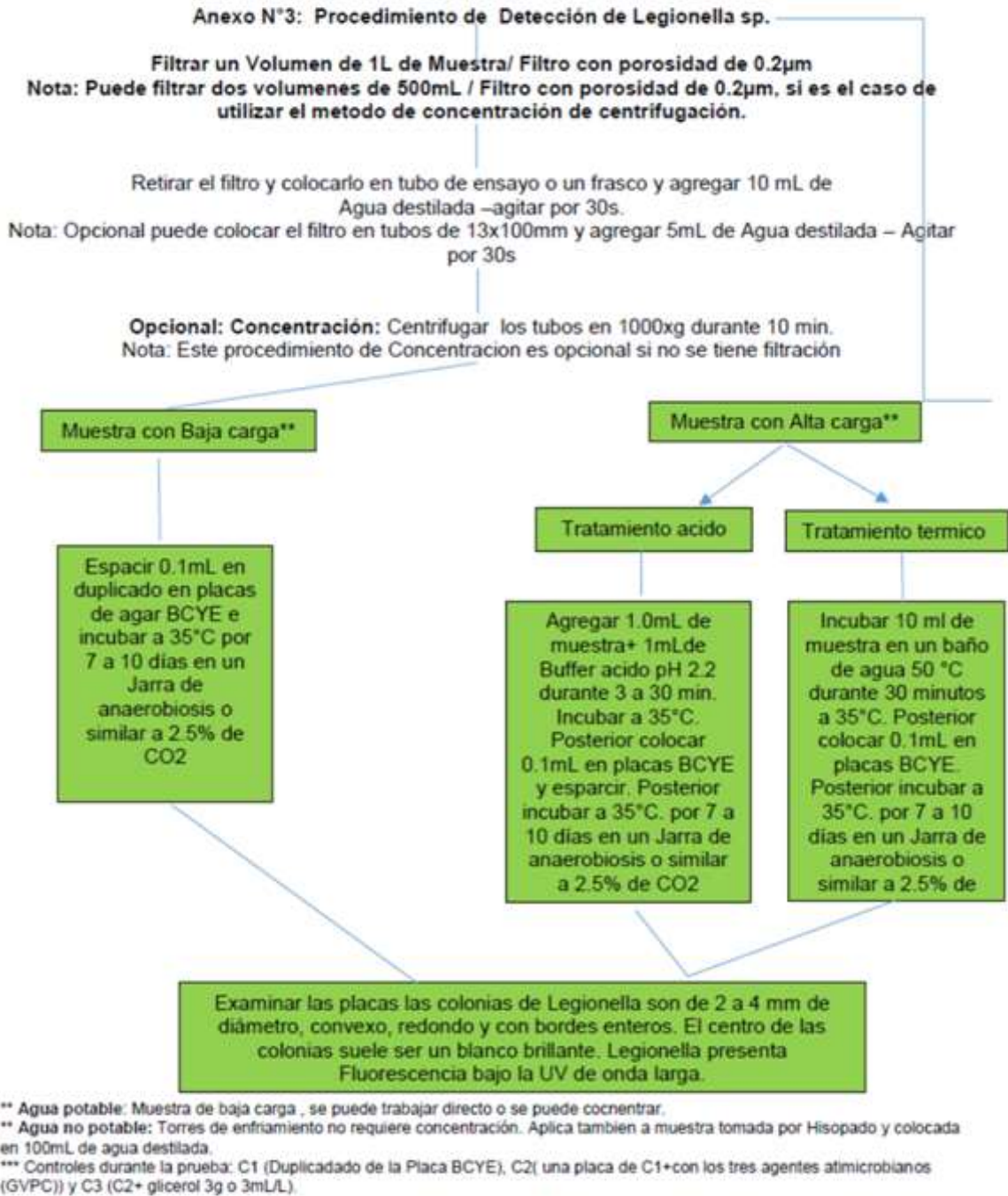


Ilustración 28: Diagrama de Flujo para el tratamiento de las muestras de Legionella por SM 9260J.

Fuente: Exp-Lab-PL-60 de Legionella (Procedimiento técnico) Versión 1, realizado: 02/01/2013.

#### 4.7.3 Confirmación Serológica de *Legionella pneumophila*

(MICROGEN BIOPRODUCTS, 2020)

##### 4.7.3.1 Generalidades del método Kit serología M45-Microgen *Legionella*

Microgen® *Legionella* es una prueba de aglutinación de látex destinada a la identificación confirmatoria de *Legionella pneumophila* y especies de *Legionella* comúnmente aisladas cultivadas en medios selectivos. La prueba es adecuada para organismos derivados de pacientes con sospecha de neumonía por *Legionella* o de fuentes ambientales. Microgen® *Legionella* permite la identificación por separado de *L. pneumophila* Serogroup 1 y Serogroups 2-15 \* y especies comúnmente aisladas de *Legionella*.

Para las especies de reactivos de prueba, las partículas de látex están recubiertas con anticuerpos policlonales de conejo producidos contra 10 especies de *Legionella* comúnmente aisladas (consulte la tabla a continuación). Cuando estas partículas de látex se mezclan con una suspensión que contiene la bacteria *Legionella* apropiada o antígenos muertos por calor de la bacteria *Legionella* spp, tiene lugar una reacción inmunoquímica que provoca que las partículas de látex se aglutinen en agregados que son fácilmente visibles a simple vista. El reactivo de látex recubierto con anticuerpos del serogrupo 1 solo se aglutinará en presencia de antígenos del serogrupo 1. El reactivo de látex recubierto con anticuerpos del serogrupo 2-15 solo se aglutinará en presencia de antígenos de cualquiera de los serogrupos 2-15.

Este método es 100% de especificidad y sensibilidad comprado con el método tradicional y cumplen con lo requerido con la Norma ISO11731 “Detección y Cuantificación de *Legionella*”

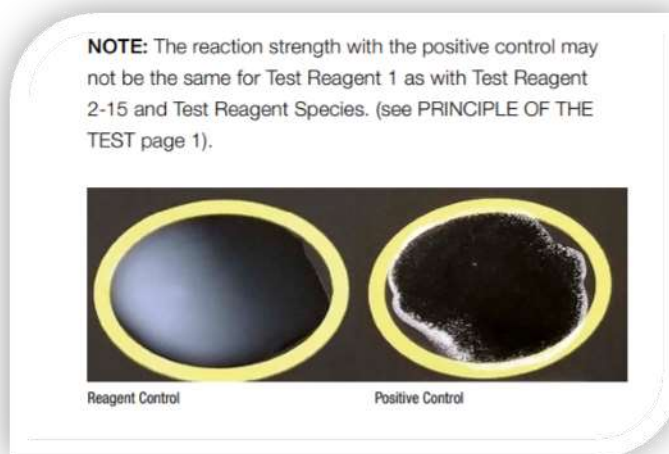
El Kit de Microgen *Legionella* (REF M45) incluye:

- Reactivo N°1: Detección de *L. pneumophila* Serogrupo 1.
- Reactivo N°2: Detección de *L. pneumophila* Serogrupo 2-15.
- Control Positivo: *Legionella* spp, *L. pneumophila* S1 y S2-15.
- Reactivo de especie: Detección de *Legionella* spp.



*Ilustración 29: Kit de Microgen para Legionella*

Fuente: <https://www.bioser.com/productos/microgen-Legionella-ltex-341p/>



*Ilustración 30: Resultados positivos y negativos usando el Kit de Microgen Legionella para determinar el serogrupo.*

Fuente: (MICROGEN BIOPRODUCTS, 2020)

#### **4.7.3.2 Procedimiento del método Kit serología M45-Microgen *Legionella*-Método de identificación a partir de medios sólidos selectivos.**

- 1) Coloque un tobogán desechable en el banco de trabajo.
- 2) Agregue 1 gota de solución salina a cada uno de los tres pocillos del portaobjetos desechable.
- 3) Con una varilla mezcladora o un asa de inoculación, emulsione 3-4 colonias sospechosas en cada gota de solución salina para producir una suspensión suave y espesa, esparciendo el líquido por toda la superficie del pozo.
- 4) Si la suspensión permanece suave, continúe con el paso 7. Si la suspensión es "fibrosa" o "granular" (a menudo como resultado de cultivos viejos y / o mucoides), proceda de la siguiente manera:
- 5) Dispense 0,5 ml de solución salina isotónica al 0,85% en un tubo de vidrio. Preparar una suspensión turbia homogénea de organismos extraídos de la placa de agar selectivo.
- 6) Hervir la suspensión durante 5 minutos. Deje enfriar a temperatura ambiente. Coloque 30 µL de suspensión hervida en cada uno de los tres pocillos de un portaobjetos de aglutinación.
- 7) Mezcle suavemente el reactivo de látex (M45a, M45b y M45d) para asegurar una suspensión homogénea.
- 8) Agregue una gota de Reactivo de prueba 1 a una de las suspensiones bacterianas, una gota de Reactivo de prueba 2-15 a la segunda suspensión y una gota de Especies de reactivo de prueba a la tercera suspensión. No permita que el gotero de reactivo toque la suspensión.
- 9) Mezcle el reactivo y la suspensión usando una nueva varilla mezcladora para cada combinación. Extienda el líquido por toda el área del pozo.
- 10) Deseche las varillas de mezcla y los portaobjetos usados en un desinfectante adecuado.
- 11) Mueva el portaobjetos suavemente durante 2 minutos y observe si hay aglutinación.

- 12) Una reacción positiva está indicada por la agregación visible de las partículas de látex.

#### 4.7.3.3 Interpretación de los resultados del método Kit serología M45-Microgen

##### *Legionella:*

- **Resultado positivo**

Un resultado positivo está indicado por la agregación visible de las partículas de látex. Esto normalmente ocurrirá a los pocos segundos de mezclar, sin embargo, el tiempo depende de la concentración exacta.

- **Resultado negativo**

Indicado por un aspecto lechoso sin ninguna agregación visible de partículas de látex. Se pueden detectar débiles rastros de granularidad en patrones negativos, dependiendo de la agudeza visual del operador, estos deben ignorarse.

- **Resultado falso negativo**

Pueden producirse resultados negativos falsos si se utiliza una cantidad insuficiente de cultivo para la extracción. Los medios de diferentes fabricantes pueden provocar una expresión de antígeno lenta. Los usuarios deben probar sus medios con cepas conocidas para asegurarse de que la prueba funcione según lo previsto antes de probar aislamientos desconocidos.

- **Resultado falso positivo**

Las reacciones fibrosas en el portaobjetos (que a menudo se observan con un fondo lechoso debajo) pueden no ser verdaderas reacciones positivas y se requieren más pruebas.

Test Reagent 1	Test Reagent 2-15	Test Reagent Species	Interpretation
+	-	-	<i>L. pneumophila</i> 1 present
-	+	-	<i>L. pneumophila</i> 2-15 present
-	-	+	<i>Legionella</i> species present
-	-	-	No <i>Legionella</i> presents
+	+	+	
+	+	-	*Possible nonspecific agglutination, inconclusive results
+	-	+	
-	+	+	

Ilustración 31: Tabla de interpretación de resultados por el Kit Microgen Legionella

Fuente: (MICROGEN BIOPRODUCTS, 2020)

#### 4.8 Verificación y Comparación el método detección de Legiolert vs SM 9260J

##### 4.8.1 Verificación del método a través de la Norma ISO 13483:2017

(AENOR-CTN 77 MEDIO AMBIENTE, 2018)

La Norma ISO 13483:2017 define la verificación de los métodos tiene lugar cuando un laboratorio procede a implementar un método que ha sido desarrollado externamente. La verificación se centra en proporcionar evidencia de que el laboratorio es capaz de producir datos funcionamiento similares a los establecidos en la caracterización primaria. Las muestras naturales constituyen los materiales de ensayo por excelencia y el trabajo solo

precisa dirigirse a los aspectos de funcionamiento del método que presenten interés para el laboratorio (Ver Ilustración 32).

**Tabla 12 - Características de funcionamiento mínimas requeridas para la verificación de un método por un solo laboratorio**

Parámetro	Definición
Sensibilidad	Fracción de todos los resultados positivos <sup>a</sup> correctamente asignados en el recuento presuntivo
Especificidad	Fracción de todos los resultados negativos <sup>b</sup> correctamente asignados en el recuento presuntivo
Tasa de falsos positivos	Fracción de resultados positivos (por ejemplo, colonias típicas) que posteriormente se ha comprobado corresponden a organismos distintos al objetivo
Tasa de falsos negativos	Fracción de resultados negativos (por ejemplo, colonias atípicas) que se ha comprobado que son organismos objetivo
Selectividad	Relación entre el número de colonias objetivo y el número total de colonias en el volumen de muestra
Eficiencia	Fracción de las colonias totales que ha sido correctamente asignadas en el recuento presuntivo
Repetibilidad	Precisión bajo condiciones de repetibilidad (los mismos operadores, las mismas condiciones de funcionamiento, periodo de tiempo corto...)
Incertidumbre de recuento	Desviación estándar relativa de recuentos repetidos del objetivo obtenidos por recuento repetido (placas, campos, tubos, etc.) bajo condiciones estipuladas (misma persona, personas diferentes, mismo laboratorio, etc.)
<p>a Los resultados positivos pueden ser los recuentos de colonias, unidades de reacción positiva (NMP) o los recuentos de células.</p> <p>b Los resultados negativos pueden ser colonias atípicas, las unidades de reacción negativa (NMP) o las células sin las características específicas requeridas.</p>	

*Ilustración 32: Tabla de verificación de métodos descrito en la UNE 13483*

Fuente: (AENOR-CTN 77 MEDIO AMBIENTE, 2018)

Los parámetros a evaluar para la verificación se incluyeron: Sensibilidad, Especificidad, Tasa de Falsos positivos, Tasa de Falsos negativos, Selectividad y Eficiencia. Ver procedimiento descrito en el 4.8.2.3.

**7.2.4.2** Para los métodos sin procedimiento de confirmación:

- número de colonias típicas identificadas como pertenecientes al organismo objetivo por un ensayo de confirmación externo (verdaderos positivos);
- número de colonias atípicas identificadas como pertenecientes al organismo objetivo por un ensayo de confirmación externo (falsos negativos);
- número de colonias típicas identificadas como no pertenecientes al organismo objetivo por un ensayo de confirmación externo (falsos positivos);
- número de colonias atípicas identificadas como no pertenecientes al organismo objetivo por un ensayo de confirmación externo (verdaderos negativos).

**7.2.4.3** Las frecuencias de estas categorías pueden expresarse apropiadamente en una matriz 2 × 2:

		Recuento presuntivo		
		+	-	
Recuento confirmado	+	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a + b</i>
	-	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>c + d</i>
		<i>a + c</i>	<i>b + d</i>	<i>n</i>

El número total de ensayos es  $a + b + c + d = n$ .

La sensibilidad, especificidad, selectividad, tasa de falsos positivos y tasa de falsos negativos para el organismo objetivo puede calcularse de la siguiente manera:

Sensibilidad =  $a / (a + b)$

Especificidad =  $d / (c + d)$

Tasa de falsos positivos =  $c / (a + c)$

Tasa de falsos negativos =  $b / (b + d)$

Selectividad =  $a / n$

*Ilustración 33: Describe el formato de la evaluación de los parámetros de la verificación y la matriz 2 x2 siendo aplicada por el McNemar*

Fuente: (AENOR-CTN 77 MEDIO AMBIENTE, 2018)

Nota: En comparación de métodos se puede modificar la tabla descrita en la ilustración 33 como: Recuento confirmado: Método de referencia (SM 9260J) y Método alternativo (Legiolert).

Para Legiolert, estas características se relacionan con el número de pocillos positivos para *L. pneumophila* que realmente contienen la bacteria diana, así como con el número de pocillos negativos que son realmente negativos para la bacteria diana. La evaluación de la sensibilidad, especificidad y selectividad de Legiolert se logró mediante la identificación de aislamientos positivos de pozos marrones y / o turbios positivos generados utilizando muestras contaminadas naturalmente. Estas muestras reflejarían el rango de flora de fondo potencialmente inhibidora que se espera para el análisis de *Legionella*. Después de la incubación, se seleccionaron los pocillos positivos de cada muestra (2 a 3 pocillos de cada muestra).

Estos fueron seleccionados para asegurar que se incluyera toda la gama de reacciones positivas encontradas. De manera similar, se seleccionaron pozos negativos para cada muestra para el aislamiento de cualquier bacteria potencial presente. Como resultado, se subcultivaron 30 pocillos positivos y 23 pocillos negativos para el aislamiento de cualquier bacteria presente. Los aislamientos se identificaron como *Legionella* o bacterias no objetivo mediante subcultivo tanto en extracto de levadura de carbón tamponado (BCYE) como en agar sangre (BA) o Tripticasa Soya Agar (TSA). Los aislamientos que exhibían crecimiento en BCYE solo se consideraron *Legionella* y los aislamientos que crecían en ambos medios se consideraron no objetivos. Se extrajeron volúmenes de 10 µl de los pocillos seleccionados utilizando una técnica aséptica y se inocularon sobre BCYE y agar sangre. Se realizó un patrón de rayas de dos zonas para ayudar a la visualización de colonias individuales. Las placas se incubaron durante un mínimo de 2 días a  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y se observó el crecimiento. Los aislamientos candidatos se serogrupo y resultados negativos se utilizando el kit de seroagrupación Microgen (prueba de látex Microgen \* *Legionella*), para su confirmación.

#### **4.8.2 Comparación del método a través de la Norma ISO 17994:2004**

( (AENOR-AEN/CTN 77 MEDIO AMBIENTE, 2004)

La Norma ISO 17994:2004 de calidad de agua “Criterios para establecer la equivalencia entre métodos microbiológicos, esta norma internacional presenta criterios y procedimientos para evaluar la equivalencia de los resultados obtenidos mediante dos métodos microbiológicos, uno de ellos puede ser una norma o un método de referencia.

Los métodos considerados están basados en recuentos de colonias o en tubos positivos o negativos en enriquecimiento en medio líquido (métodos de tipo NMP o Presencia/Ausencia). Esta norma internacional define un procedimiento de evaluación para la comparación de dos métodos destinados a la detección o cuantificación del mismo grupo o especie de microorganismos. Al igual indica los fundamentos matemáticos para la evaluación del funcionamiento medio relativo de los dos métodos, por comparación con criterios de equivalencia seleccionados.

Puede compararse dos métodos cualesquiera que esten basados en el recuento (de colonias o de tubos positivos) o dos métodos de detección (de tipo presencia/ausencia (P/A) que tengan el mismo propósito.

#### **En este estudio definiremos las siguientes variables:**

- Método SM 9260 J: Se describe como un método de referencia, es un método analítico prescrito para el análisis de un determinado grupo o especie de microorganismo.
- Método Legiolert: Se describe como un método tentativo, cualquier método cuya equivalencia se va a probar frente a un método de referencia.

- Recuento presuntivo: número de objetos que, conforme a su aspecto externo, deberían presumiblemente ser incluidos en el recuento.
- Recuento confirmado: recuento una vez corregidos los resultados falsos positivos, mediante ensayos posterior de los objetos presuntivos.

#### **4.8.2.1 Tipo de muestras**

Es conveniente que las muestras destinadas a las comparaciones del método contengan bacterias suficientes para que la probabilidad de que se produzcan recuentos con cero colonias sea pequeña. Es conveniente que las muestras destinadas a la comparación de métodos representen tipos de muestras incluidas del campo de aplicación de ambos métodos. Las muestras tomadas para este estudio fueron muestras naturalmente contaminadas de las torres de enfriamiento.

#### **4.8.2.2 Comparación de un método de recuento con un método de P/A:**

- Método de Recuento: Legiolert-Recuento de *L. pneumophila*.
- Método de Presencia/Ausencia: SM 9260J -P/A *L. pneumophila*.

Los ensayos cualitativos y los recuentos no son conmensurables. La comparación de un método de recuento con uno de tipo P/A requiere bien “degradar” los resultados correspondientes a los recuentos o bien “mejorar” los del método P/A.

La “degradación” se efectúa ignorando el valor numérico de cada recuento y sustituyéndolo por un signo (+), lo que significa que hay detección positiva de la presencia de un organismo. Por lo tanto, se pierde la mayor parte de la información implícita en los recuentos. En este caso es de aplicación lo indicado en cuanto al número de muestras requeridas para la comparación de dos métodos P/A.

Nota: Debido a que conversión del recuento en un mero (+) tiene lugar después de confirmado el recuento, no hay ahorro de trabajo en la confirmación.

#### 4.8.2.3 **Procesamiento:**

- Las muestras a utilizar son las misma determinadas en el plan de muestreo.
- Las muestras una vez llegan al laboratorio son homogenizadas para realizar submuestras para los correspondientes métodos de ensayos a comparar.
- Ambos métodos de ensayos son evaluados en base a 1 mL de muestra, ya que las muestras de torres de enfriamiento son agua no potable con alta carga de flora acompañante.
- Se aplicar los métodos correspondientes para cada análisis aplicando el tratamiento ácido que son aplicado para ambos métodos.
- Se seleccionará al menos 2 a 3 pocillos (en caso del Legiolert) o colonias (en caso de placas de BCYE) de las muestras presuntamente positivas.
- Las muestras presuntamente positivas serán confirmadas según el punto 4.7.2.4.(método de placas de agar BCYE y BCYE-cys o Agar nutriente o Agar sangre) y según el punto 4.7.3 (Método de serología con el kit Microgen *Legionella*).
- Colocar los resultados en una tabla donde describas las cantidades de colonias o pocillos evaluados y la cantidad de colonias o pocillos confirmado como positivo y aquellos descritos como negativos en la prueba realizada.
- Aplicar las Evaluación estadística de dispersión de Poisson  $X^2$  o Distribución de McNemar test.

#### 4.8.2.4 Evaluación de resultados obtenidos:

- Evaluación de resultados obtenidos del método A (Método de referencia) y método B (Método alternativo o a prueba).

#### 6.5 Métodos P/A

Para la evaluación estadística de los resultados P/A se precisan dos sumas:

$n_A$  es el número de muestras en las que el Método A es positivo y el Método B negativo;

$n_B$  es el número de muestras en las que el Método A es negativo y el Método B positivo.

La evaluación de los métodos P/A se basa en el índice de dispersión de Poisson,  $X^2$ , (otras alternativas adecuadas son el ensayo de McNemar y el ensayo o prueba de los signos). El valor del índice viene dado por:

$$X^2 = \frac{(n_A - n_B)^2}{(n_A + n_B)}$$

*Ilustración 34: Calculo de la Dispersión de Poisson*

Fuente: (AENOR-AEN/CTN 77 MEDIO AMBIENTE, 2004)

- Resultados satisfactorios de la comparación de ambos métodos:

#### 7.4 Dos métodos P/A

Cuando el valor del índice de dispersión de Poisson  $X^2 \geq 4$ , se considera que los métodos son "diferentes"; en caso de que  $X^2 < 4$  los métodos se consideran "no diferentes".

*Ilustración 35: Resultados aceptable de la dispersion de Poisson*

Fuente: (AENOR-AEN/CTN 77 MEDIO AMBIENTE, 2004)

#### 4.9 Comparación de Resultados positivos de *Legionella pneumophila* por Legiolert en Torres de enfriamiento con Laboratorio Externos:

- Una vez confirmadas la detección de *Legionella pneumophila* por el método tradicional (según el punto 555..5) y el método serológicos (según el punto). Se realizó al menos dos pases en placas de BCYE con cisteína +GVPC con el fin de evaluar la purificación de las colonias antes de su proceso de conversación. Nota: Con el método serológico se puede identificar en el cepario de cepas de *L. pneumophila* la clasificación del grupo S1 o S2-15.
- Se procedió a tomar un asada de 10µL de las colonias de placas BCYE para pasar a una Solución Salina de Page para el proceso de dilución y conservación en Caldo de glicerol estéril. La suspensión se dispensa en volúmenes de 1mL para la conservación a (-20± 5) °C (Según lo Describe la UNE-EN ISO 11731:2017 EN EL PUNTO 11.3 preparación del cultivo de trabajo y la suspensión para los ensayos de funcionamiento).
- Para la confirmación por laboratorio externo se aplicó lo siguiente:

##### 4.9.1 Laboratorio de Referencia Nacional de Salud Pública de Panamá (LCRSP):

- Reactivación de las muestras guardadas como cepas de reserva en conservación a (-20± 5) °C.
- Dejar reposar por un tiempo mínimo de 1 hora el crio vial de polipropileno.
- Cuando el vial está a temperatura ambiente, seleccionar con una micropipeta 100µL (0.1mL) en las placas de BCYE con cisteína +GVPC. Incubar a 36±2°C por un periodo de 3 a 5 días. (Realizar este proceso en duplicado).
- Revisar las placas de BCYE a los 5 días, si las colonias esta pequeñas dejar incubar por 3 a 5 días más. Revisar si las placas no tengan ningún crecimiento de flora acompañante o se dé una contaminación ambiental a las placas de BCYE por Hongos. Realizar todo el proceso dentro de una Cámara de Flujo Laminar.

- Selecciono la placa de Agar BCYE para él envié al Laboratorio Externo. Como medida de Bioseguridad colocar dentro de unos guantes latex y enviar dentro de un sistema de bioseguridad para la entrega de la muestra (Ver la foto). Se realiza una carta correspondiente a la entrega de este microorganismo por medidas de prevención en temas de Bioseguridad Biológica.



Ilustración 36: Estuches de seguridad biológica para el transporte de muestras peligrosas.

Fuente:[https://www.cnb.csic.es/images/Julia2015/Services/Radiation\\_Protection\\_Biol\\_Safety/4%20Seguridad%20Biologica.pdf](https://www.cnb.csic.es/images/Julia2015/Services/Radiation_Protection_Biol_Safety/4%20Seguridad%20Biologica.pdf)

#### 4.9.2 Laboratorio EMLab P&K:

Se realizaron el mismo procedimiento del LCRSP, pero a diferencia de enviar placas de agar BCYE, se realizó un procedimiento de suspensión de colonias *Legionella pneumophila* en agua destiladas probando su viabilidad por un tiempo de 7 días como mínimo. Esto con la finalidad que las cepas sobrevivieran al transporte de Panama ha Estado Unidos a temperatura ambiente con un tiempo límite de entrega de 7 días a Laboratorio EMLab P&K.

#### 4.10 **Sensibilización a los encargados de las instalaciones muestreadas:**

- Etapa 1: Presentación de proyecto de *Legionella pneumophila* en torres de enfriamiento con sus objetivos, su explicación de su búsqueda y selección de torres de enfriamiento.
- Etapa 2: Capacitación en el sitio de muestreo sobre los puntos críticos dentro de una torre de enfriamiento, toma de muestras y los controles in situ de los análisis fisicoquímicos. Esta información genera en el departamento de ingeniería de las instalaciones los controles que deben tomar de manera rutinaria para evitar el crecimiento de *Legionella pneumophila*.
- Etapa 3: Una vez obtenido los resultados se le explico la forma de interpretar los resultados de ensayos y determinar si el microorganismo *Legionella pneumophila* fue detectado. Adicional se evaluaron los resultados de enumeración de *Legionella pneumophila* con el fin de establecer si cumple dentro de los límites máximo permisibles de normas internacionales como es el caso de UNE-100030 y BOE 365/2003.
- Etapa 4: Si los resultados que detectaron fueron *L. pneumophila* y sobrepasaron de los Límites máximos permisibles (LMP) mayor a  $>1000$  NMP/L. Se procedió apoyar a los clientes en documentaciones y explicaciones de los procesos de Limpieza y desinfección que puede aplicarles a las torres de enfriamiento a través de su proveedor de servicios que le suministra los biocidas (compuesto químico que actúan con efecto residual para la eliminación de microorganismos, algas y amebas). La documentación se presento durante el primer muestreo fue:
  - (UNE100030, 2017)
  - (BOE-A-2003-14408, 2003)
  - (WTB-148, 2008)
  - (STANDARD ASHRE, 2000)
- Etapa 5: Después de la realización la Limpieza y desinfección (L+D) de las torres la instalación. El encargado de ingeniería se le informo una recomendación que después de la limpieza debe realizar un contra muestreo después de un periodo después de 30 días de aplicado la L+D.

- Etapa 6: Para aportar mayor conocimiento de los controles de *Legionella pneumophila* en las torres de enfriamiento los patrocinadores de este estudio (IDEXX Laboratories, Expert-Lab, Biosolutions), a participar en el evento de la NSF Conferencia de *Legionella* en los Angeles en septiembre del 2019.
- Etapa 7: Se realizo una jornada de sensibilización organización un seminario de “ENFERMEDAD DE LOS LEGIONARIOS: EL Riesgos, manejo y su impacto en Instalaciones de Hoteles, Edificios, Hospitales y Cruceros. ENFERMEDAD DE LOS LEGIONARIOS: EL Riesgos, manejo y su impacto en Instalaciones de Hoteles, Edificios, Hospitales y Cruceros”. En la misma se explicó los procedimiento adecuado en ellos procesos de prevención, diseminación y tratamiento de eliminación de *L.pneumophila* (ANEXO 10). La expositora fue la Dra. Jennifer Clancy es microbióloga, investigadora, consultora y experta en litigios ambientales con más de 30 años de experiencia en microbiología, tratamiento de agua y operaciones de servicios públicos de agua. Es una experta reconocida internacionalmente en el monitoreo, prueba e inactivación de patógenos en el agua potable y es cofundadora, presidenta y directora ejecutiva del Instituto de Investigación, Política y Ciencias Ambientales (ESPRI). Como experta en plomería de instalaciones y microbiología del entorno construido, ha estado involucrada en el apoyo de litigios en brotes de enfermedades transmitidas por el agua que involucran la enfermedad del legionario y *Naegleria fowleri*. El Dr. Clancy desarrolló los métodos USEPA 1622 y 1623 y siguen siendo estándares internacionales para las pruebas de Giardia y Cryptosporidium en agua. En junio de 2012, fue la primera en recibir el premio a la Innovación en Investigación de la Water Research Foundation. Participaron más de 80 personas entre instalaciones incluidas dentro del proyecto, MINSA, CNA, DGNTI-COPANIT, Proveedores de servicio de L+D y otros.

**Aspectos adicionales de sensibilización externa:**

- Etapa 8: Exposición de controles de Legionela pneumohila en torres de enfriamiento en el evento de la compañía Biomax Panama, para sus clientes que posee torres de mantenimiento en el mes de noviembre 2019.
- Etapa 9: Inducción al MINSA – Departamento de Ingeniería Ambiental sobre *Legionella pneumophila* en Torres de Enfriamiento en junio del 2020.

Laboratorio a nivel de Panamá que han implementado técnicas de detección de *Legionella sp*, enumeración de *Legionella pneumophila* y determinación del serogrupo de *L.pneumohila S1* y *S2-15*, los mismos cuenta con certificación del MINSA y acreditación en Norma ISO 17025 ( ANEXO 15).

**4.11 Evaluación de los resultados**

Los resultados obtenidos fueron evaluados y presentados en gráficas y tablas.

# 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## RESUMEN

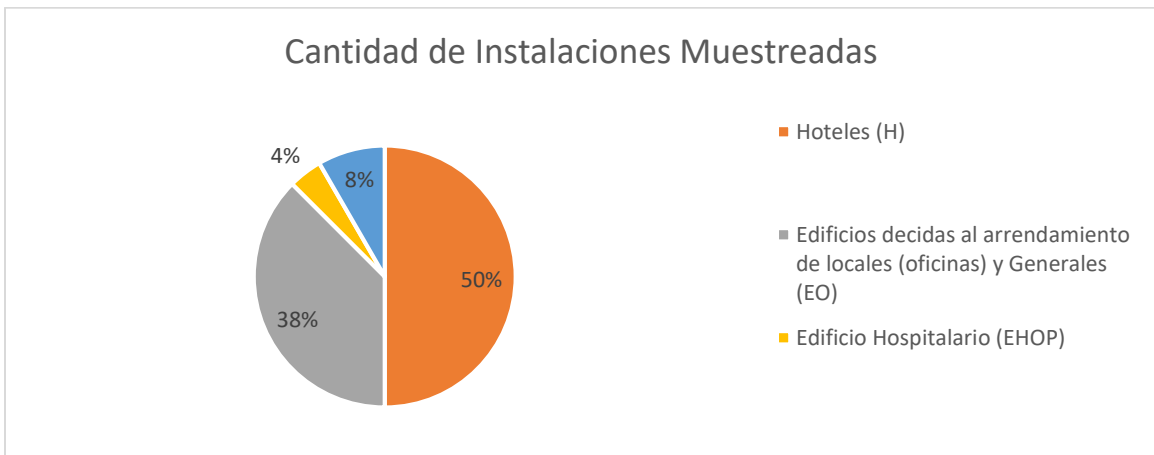
### 5.1 Clasificación de la actividad económica de las Instalaciones muestreadas:

Entre las actividades económicas de las instalaciones donde se evaluó las torres de enfriamiento tenemos: Hoteles, Edificios decidados al arrendamiento de locales (oficinas), Edificio Hospitalario y Edificio dedicado a la fabricación de producción de alimentos. En la Tabla 1, se puede observar la cantidad de instalaciones definidas por cada actividad económica, cantidad de torres de enfriamiento muestras por cada instalación y fechas de muestreo en base a su estación (seca (PR1) y lluviosa (PR2)).

Tabla 1: Instalaciones muestreadas según el tipo de clasificación de la actividad económicas

Clasificación de la Actividad Económicas	Cantidad de Instalaciones Muestreadas	Primera Muestreo		Segundo Muestreo
		Estación lluviosa (PR1)		Estación seca (PR2)
		2019 (abril-diciembre)		(enero-febrero)
<b>Hoteles (H)</b>	12	12	12	9*
<b>Edificios decidados al arrendamiento de locales (oficinas) y Generales (EO)</b>	8	8	8	8
<b>Edificio Hospitalario (EHOP)</b>	1	1	1	1
<b>Edificio dedicado a la fabricación (EFPA)</b>	2	2	2	1*
	N=23	N=23	N=23	N=19

Nota: \* En el segundo muestreo- estación seca, hubo clientes por razones propias no quisieron efectuar la prueba de *Legionella* descrita.



Gráfica 1: Describe el porcentaje (%) de las instalaciones muestreadas según su actividad económica.

La distribución en base a las instalaciones que aprobaron el proyecto de *Legionella pneumophila* se describe de la siguiente forma en la estación lluviosa (LR2): 50% de Hoteles (H) (12 instalaciones), 42.1% Edificios dedicados al arrendamiento de oficinas y aspectos generales (EO) (8 instalaciones), 4% Edificios Hospitalarios (EHOP) (1 instalaciones) y 8% de Edificios dedicado a las fabricaciones (EFPA) (2 instalaciones).

A diferencia en la estación seca (LR2) la distribución de los puntos de muestreo se efectuó de la siguiente manera: 47.4% de Hoteles (H) (9 instalaciones), 38% Edificios dedicados al arrendamiento de oficinas y aspectos generales (EO) (8 instalaciones), 2.1% Edificios Hospitalarios (EHOP) (1 instalaciones) y 2.1% de Edificios dedicado a las fabricaciones (EFPA) (1 instalación). Solo 10.4% de las instalaciones (4 instalaciones) optaron por no realizar el muestreo por decisiones propias recibidas por la gerencia de mantenimiento.

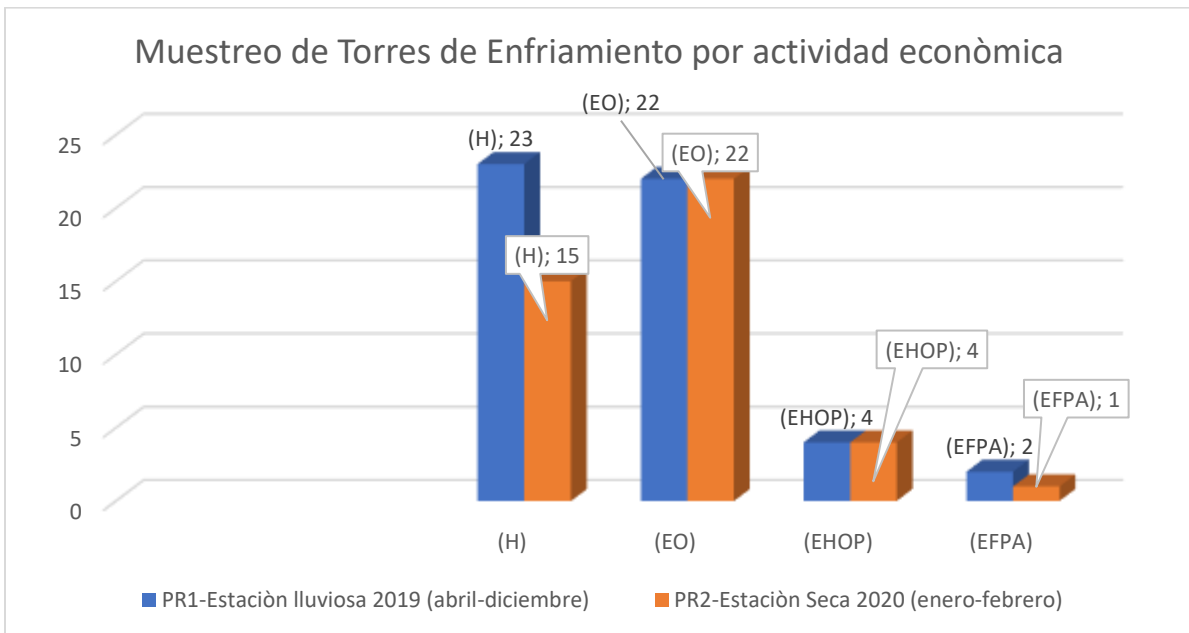
Las torres de enfriamiento actúan como grandes limpiadoras del aire, y el agua es bastante efectiva para capturar polvo, microorganismos y otros residuos. Estos pueden llegar a cambiar las características del agua y a favorecer las condiciones de crecimiento de los diferentes microorganismos, tanto los que llegaron al sistema a través del agua de alimentación como los captados del aire. La presencia de depósitos, de todo tipo, facilita la proliferación de los microorganismos. Por lo que la suciedad, en general, es un factor determinante en el aumento del ensuciamiento biológico (Plá, 2017).

Los entornos de brotes más frecuentes en este análisis de torres de enfriamiento fueron hoteles y centros turísticos, centros de atención a largo plazo y hospitales. Este hallazgo es consistente con la ubicación al aire libre de las torres de enfriamiento y su capacidad para crear columnas de agua potencialmente contaminada que pueden exponer a un mayor número de personas que los brotes de agua potable. (Garrison et al, 2016)

Tabla 2: Define la cantidad total de Torres de Enfriamiento por actividad económica.

Clasificación de la Actividad Económica	Cantidad de Instalaciones Muestreadas	Primera Muestreo*	Segundo Muestreo*
		Estación lluviosa (PR1)	Estación seca (PR2)
		2019 (abril-diciembre)	(enero-febrero)
<b>Hoteles (H)</b>	12	25	17
<b>Edificios dedicados al arrendamiento de locales (oficinas) y Generales (EO)</b>	9	22	22
<b>Edificio Hospitalario (EHOP)</b>	1	4	4
<b>Edificio dedicado a la fabricación (EFPA)</b>	2	2	1
	N=23	N=53	N=45**

Nota: \* Se define la cantidad de torres de enfriamiento muestreadas por instalación. \*\* En el segundo muestreo- estación seca, hubo clientes por razones propias no quisieron efectuar la prueba de *Legionella* descrita.



Gráfica 2: Cantidad de Torres de Enfriamiento muestreadas por actividad económica en la estación lluviosa (PR1) y estación seca (PR2)

La distribución de los puntos de muestreo en base a cada instalaciones que aprobaron el proyecto de *Legionella pneumophila* se describe de la siguiente forma en la estación lluviosa (LR2): 47.2% de Hoteles (H) (25 instalaciones), 41.5% Edificios dedicados al

arrendamiento de oficinas y aspectos generales (EO) (22 instalaciones), 7.5% Edificios Hospitalarios (EHOP) (4 instalaciones) y 3.8% de Edificios dedicado a las fabricaciones (EFPA) (2 instalaciones).

A diferencia en la estación seca (LR2) la distribución de los puntos de muestreo se efectuó de la siguiente manera: 37.8 % de Hoteles (H) (17 instalaciones), 41.5% Edificios dedicados al arrendamiento de oficinas y aspectos generales (EO) (22 instalaciones), 7.5% Edificios Hospitalarios (EHOP) (4 instalaciones) y 3.8% de Edificios dedicado a las fabricaciones (EFPA) (1 instalación). Solo 9.4% (8 Torres de enfriamiento de 4 instalaciones, siendo 3 de (H) y 1 de (EFPA)) optaron por no realizar el muestreo por decisiones propias recibidas por la gerencia de mantenimiento.

## 5.2 Clasificación y codificación de las confidencialidades de cada Instalación:

Tabla 3: Clasificación y Codificación de confidencialidad de cada Instalación en estación lluviosa (LRI):

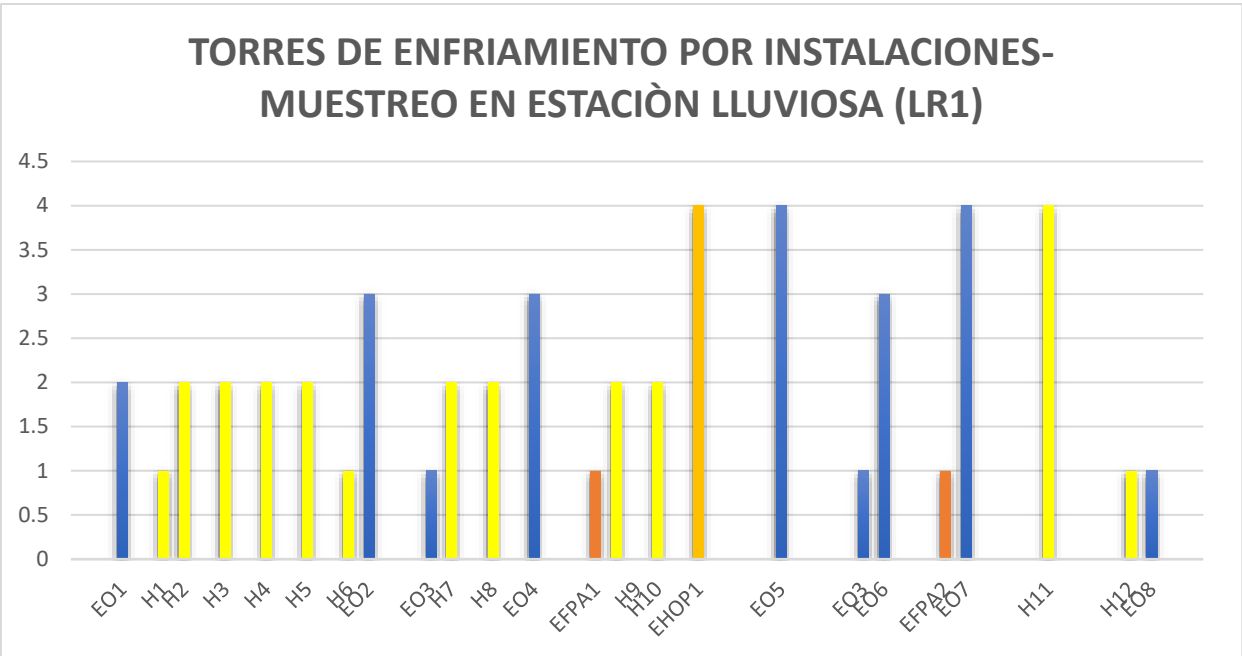
M: Se designará para reconocer la Instalación muestreadas en la estación lluviosa.

Tabla 1: Muestras los códigos de clasificación por actividad económica

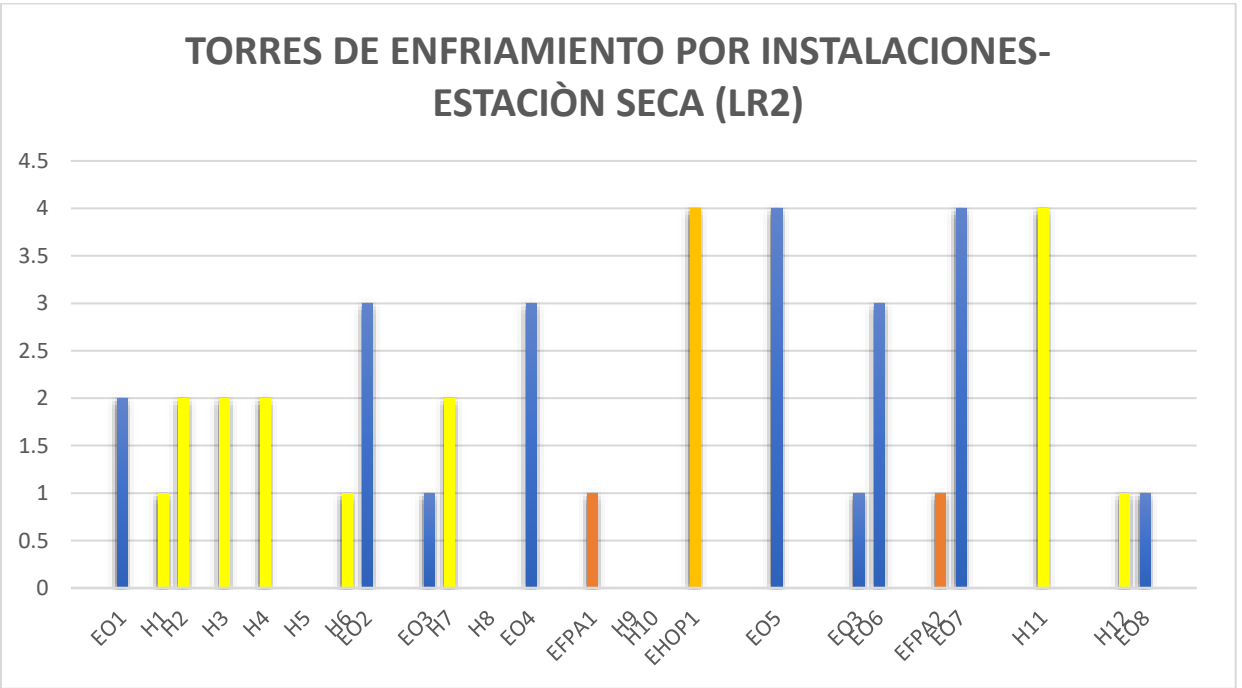
CODIGO DE LA INSTALACIÓN	CLASIFICACIÓN POR ACTIVIDAD ECONÓMICA	FECHA DE MUESTREO	CANTIDAD DE TORRE DE ENFRIAMIENTO POR INSTALACIÓN	DESIGNACIÓN DE LA TORRES DE ENFRIAMIENTO
M1	EO1	4/9/2019	2	Torre de Enfriamiento #2
				Torre de Enfriamiento #1
M2	H1	4/16/2019	1	Torre de Enfriamiento #1
M3	H2	4/16/2019	2	Torre de Enfriamiento #1
				Torre de Enfriamiento #2
M4	H3	4/16/2019	2	Torre de Enfriamiento #1
				Torre de Enfriamiento #2
M5	H4	4/17/2019	2	Torre de Enfriamiento #2
				Torre de Enfriamiento #1
M6	H5	4/24/2019	2	Torre de Enfriamiento #4
				Torre de Enfriamiento #1
M7	H6	4/25/2019	1	Torre de Enfriamiento #1
M8	EO2	4/26/2019	3	Torre de Enfriamiento #1
				Torre de Enfriamiento #2
				Torre de Enfriamiento #3
M9	EO3	4/30/2019	1	Torre de Enfriamiento #1
M10	H7	4/30/2019	2	Torre de Enfriamiento #1
				Torre de Enfriamiento #2
M11	H8	5/3/2019	2	Torre de Enfriamiento #1
				Torre de Enfriamiento #2

Tabla 4: Clasificación y Codificación de confidencialidad de cada Instalación estación lluviosa (LRI):

CODIGO DE LA INSTALACIÓN	CLASIFICACIÓN POR ACTIVIDAD ECONÓMICA	FECHA DE MUESTREO	CANTIDAD DE TORRE DE ENFRIAMIENTO POR INSTALACIÓN	DESIGNACIÓN DE LA TORRES DE ENFRIAMIENTO
<b>M12</b>	EO4	5/9/2019	3	Torre de Enfriamiento # 3
				Torre de Enfriamiento # 5
				Torre de Enfriamiento # 6
<b>M13</b>	EFPA1	5/20/2019	1	Torre de Enfriamiento #1
<b>M14</b>	H9	5/20/2019	2	Torre de Enfriamiento #1
				Torre de Enfriamiento #2
<b>M15</b>	H10	5/16/2019	2	Torre de Enfriamiento #1
				Torre de Enfriamiento #2
<b>M16</b>	EHOP1	5/29/2019	4	Torre de Enfriamiento #1
				Torre de Enfriamiento #2
				Torre de Enfriamiento #3
				Torre de Enfriamiento #4
<b>M17</b>	EO5	5/29/2019	4	Torre de Enfriamiento #2
				Torre de Enfriamiento #3
				Torre de Enfriamiento #4
				Torre de Enfriamiento #5
<b>M9</b>	EO3	6/12/2019	1	Torre de Enfriamiento #2
<b>M18</b>	EO6	6/18/2019	3	Torre de Enfriamiento #1
				Torre de Enfriamiento #2
				Torre de Enfriamiento #3
<b>M19</b>	EFPA2	7/17/2019	1	Torre de Enfriamiento #1
<b>M20</b>	EO7	7/24/2019	4	Torre de Enfriamiento #1
				Torre de Enfriamiento #2
				Torre de Enfriamiento #3
				Torre de Enfriamiento #4
<b>M21</b>	H11	7/31/2019	4	Torre de Enfriamiento #1
				Torre de Enfriamiento #2
				Torre de Enfriamiento #3
				Torre de Enfriamiento #4
<b>M22</b>	H12	26/9/2019	1	Torre de Enfriamiento #1
<b>M23</b>	EO8	20/9/2019	1	Torre de Enfriamiento #1
				Torre de Enfriamiento #2
				Torre de Enfriamiento #3



Gráfica 3: Describe la cantidad de Torres de Enfriamiento muestreadas por actividad en la estación lluviosa (PR1)



Gráfica 4: Describe la cantidad de Torres de Enfriamiento muestreadas por actividad económica en la estación seca (LR2)

Tabla 5: Describe la clasificación y código de confidencialidad de cada Instalación en muestreo de la estación seca (LR2) de M1 a M16.

M: Se designará para reconocer la Instalación muestreadas en la estación seca.

CODIGO DE LA INSTALACION	CLASIFICACION POR ACTIVIDAD ECONOMICA	FECHA DE MUESTREO	CANTIDAD DE TORRE DE ENFRIAMIENTO POR INSTALACION	DESIGNACION DE LA TORRES DE ENFRIAMIENTO
<b>M1</b>	EO1	27/01/2020	2	Torre de Enfriamiento #2
		7/01/2020		Torre de Enfriamiento #1
<b>M2</b>	H1	24/01/2020	1	Torre de Enfriamiento
<b>M3</b>	H2	19/01/2020	2	Torre de Enfriamiento #1
		19/01/2020		Torre de Enfriamiento #2
<b>M4</b>	H3	19/01/2020	2	Torre de Enfriamiento #1
		23/01/2020		Torre de Enfriamiento #2
<b>M5</b>	H4	17/01/2020	2	Torre de Enfriamiento #2
				Torre de Enfriamiento #1
<b>M6</b>	H5	N/A*	0	Torre de Enfriamiento #4
		N/A*		Torre de Enfriamiento #1
<b>M7</b>	H6	24/01/2020	1	Torre de Enfriamiento #1
<b>M8</b>	EO2	06/2/2020	3	Torre de Enfriamiento #1
		06/2/2020		Torre de Enfriamiento #2
		06/2/2020		Torre de Enfriamiento #3
<b>M9</b>	EO3	11/1/2020	1	Torre de enfriamiento #1
<b>M10</b>	H7	29/01/2020	2	Torre de Enfriamiento #1
		29/01/2020		Torre de Enfriamiento #2
<b>M11</b>	H8	N/A*	0	Torre de enfriamiento #1
		N/A*		Torre de enfriamiento #2
<b>M12</b>	EO4	28/01/2020	3	Torre de enfriamiento # 3
		28/01/2020		Torre de enfriamiento # 5
		28/01/2020		Torre de enfriamiento # 6
<b>M13</b>	EFPA1	18/01/2020	1	Torre de enfriamiento #1
<b>M14</b>	H9	N/A*	0	Torre de enfriamiento #1
		N/A*		Torre de enfriamiento #2
<b>M15</b>	H10	N/A*	0	Torre de enfriamiento #1
		N/A*		Torre de enfriamiento #2
<b>M16</b>	EHOP1	11/2/2020	4	Torre de enfriamiento #1
		11/2/2020		Torre de enfriamiento #2
		11/2/2020		Torre de enfriamiento #3
		11/2/2020		Torre de enfriamiento #4

Tabla 6: Describe la clasificación y código de confidencialidad de cada Instalación en muestreo de la estación seca (LR2) DE M17 A M23.

M: Se designará para reconocer la Instalación muestreadas en la estación seca.

CODIGO DE LA INSTALACION	CLASIFICACION POR ACTIVIDAD ECONOMICA	FECHA DE MUESTREO	CANTIDAD DE TORRE DE ENFRIAMIENTO POR INSTALACION	DESIGNACION DE LA TORRES DE ENFRIAMIENTO
<b>M17</b>	EO5	28/01/2020	4	Torre de Enfriamiento #2
		28/01/2020		Torre de Enfriamiento #3
		28/01/2020		Torre de Enfriamiento #4
		28/01/2020		Torre de Enfriamiento #5
<b>M9</b>	EO3	21/02/2020	1	Torre de Enfriamiento #2
<b>M18</b>	EO6	7/24/2019	3	Torre de Enfriamiento #1
				Torre de Enfriamiento #2
				Torre de Enfriamiento #3
<b>M19</b>	EFPA2	N/A	1	Torre de Enfriamiento #1
<b>M20</b>	EO7	3/4/2020	4	Torre de Enfriamiento #1
		3/4/2020		Torre de Enfriamiento #2
		3/4/2020		Torre de Enfriamiento #3
		3/4/2020		Torre de Enfriamiento #4
<b>M21</b>	H11	4/5/2020	4	Torre de Enfriamiento #1
		4/5/2020		Torre de Enfriamiento #2
		4/5/2020		Torre de Enfriamiento #3
		4/5/2020		Torre de Enfriamiento #4
<b>M22</b>	H12	26/09/2020	1	Torre de Enfriamiento #1
<b>M23</b>	EO8	4/5/2020	1	Torre de Enfriamiento #1
		4/5/2020		Torre de Enfriamiento #2

Es importante destacar las diferencias de las cantidades de torres de enfriamiento en las instalaciones muestreadas a la toma de decisiones de las propias instalaciones que evalúan la capacidad necesaria que necesitan en tema de ahorro energético. Panamá siendo un país donde las altas temperaturas es su constancia son viables su utilización en la efectividad del ahorro energético y reutilización de agua. Cada instalación invierte en la determinación de numero de torres de enfriamiento. Las torres de enfriamiento son un importante componente en los sistemas de refrigeración. El agua es el medio de enfriamiento más comúnmente usado en los procesos de refrigeración, debido a su disponibilidad y alta capacidad de calentamiento. Los procesos de enfriamiento requieren grandes cantidades de agua y a menudo presentan un potencial ahorro de esta. Los ahorros de agua generan una disminución en los costos de tratamiento y las facturas de alcantarillado. Adicional a la utilización de ahorro energético en los sistemas de refrigeración.

### 5.3 Resultados de la enumeración de *Legionella pneumophila* y determinación de su serogrupo:

Tabla 7: Describe los resultados obtenidos de *Legionella pneumophila* (Legiolert) y la detección del serogrupo (S1 o S2-15) para *Legionella pneumophila* en la estación lluviosa (LR1) de M1 M10

M: Se designará para reconocer la cantidad de instalaciones.

CODIGO DE LA INSTALACION	CLASIFICACION POR ACTIVIDAD ECONOMICA	DESIGNACION DE LA TORRES DE ENFRIAMIENTO	KIT: LEGIOLERT DETECCION Y ENUMERACION DE <i>LEGIONELA PNEUMOPHILA</i>				SEROGRUPO KIT: MICROGEN <i>LEGIONELLA</i>
			Pocillos Largos	Pocillos Pequeños	NMP/mL.	NMP/L	
M1	EO1	Torre de Enfriamiento #2	0	0	<1	<1000	N/A
		Torre de Enfriamiento #1	3	4	9.4	9400	LP S1
M2	H1	Torre de Enfriamiento	0	0	<1	<1000	N/A
M3	H2	Torre de Enfriamiento #1	6	9	53.4	53400	LP S1
		Torre de Enfriamiento #2	6	6	36.1	36100	LP S1
M4	H3	Torre de Enfriamiento #1	0	0	<1	<1000	N/A
		Torre de Enfriamiento #2	0	0	<1	<1000	N/A
M5	H4	Torre de Enfriamiento #2	6	76	939.8	939800	LP S1
		Torre de Enfriamiento #1	6	80	1109.7	1109700	LP S1
M6	H5	Torre de Enfriamiento #4	6	33	230.7	230700	LP S1
		Torre de Enfriamiento #1	6	45	350.1	350100	LP S1
M7	H6	Torre de Enfriamiento #1	0	0	<1	<1000	N/A
M8	EO2	Torre de Enfriamiento #1	0	0	<1	<1000	N/A
		Torre de Enfriamiento #2	0	0	<1	<1000	N/A
		Torre de Enfriamiento #3	0	0	<1	<1000	N/A
M9	EO3	Torre de Enfriamiento #1	0	0	<1	<1000	N/A
M10	H7	Torre de Enfriamiento #1	2	0	2.3	2300	LP S1
		Torre de Enfriamiento #2	2	1	3.5	3500	LP S1

N/A: No aplica el análisis. LP: *Legionella pneumophila* LP: ≤1000 (volumen utilizado 1 mL de agua de Torre de enfriamiento. Numero en color rojo: Superan los LP.

Tabla 8: Describe los resultados obtenidos de *Legionella pneumophila* (Legiolert) y la detección del serogrupo (S1 o S2-15) para *Legionella pneumophila* en la estación lluviosa (LR1) de M11 a M18.

M: Se designará para reconocer la cantidad de instalaciones.

CODIGO DE LA INSTALACIÓN	CLASIFICACIÓN POR ACTIVIDAD ECONÓMICA	DESIGNACION DE LA TORRES DE ENFRIAMIENTO	KIT: LEGIOLERT DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE <i>LEGIONELA PNEUMOPHILA</i>				Serogrupo Kit: Microgen <i>Legionella</i>
			Pocillos Largos	Pocillos Pequeños	NMP/mL.	NMP/L	
M11	H8	Torre de enfriamiento #1	0	0	<1	<1000	N/A
		Torre de enfriamiento #2	0	0	<1	<1000	N/A
M12	EO4	Torre de enfriamiento #3	4	1	7.4	7400	LP S2-15
		torre de enfriamiento #5	3	1	5.2	5200	LP S2-15
		Torre de enfriamiento #6	5	0	8.4	8400	LP S2-15
M13	EFPA1	Torre de enfriamiento #1	0	0	<1	<1000	N/A
M14	H9	Torre de enfriamiento #1	6	6	36.1	36100	LP S1
		Torre de enfriamiento #2	6	6	36.1	36100	LP S1
M15	H10	Torre de enfriamiento #1	6	55	477	477000	LP S2-15
		Torre de enfriamiento #2	6	54	462.8	462800	LP S2-15
M16	EHOP1	Torre de enfriamiento #1	1	0	1.1	1100	LP S1
		Torre de enfriamiento #2	3	0	3.9	3900	LP S1
		Torre de enfriamiento #3	1	0	1.1	1100	LP S1
		Torre de enfriamiento #4	1	0	1.1	1100	LP S2-15
M17	EO5	Torre de enfriamiento #2	6	17	105.7	105700	LP S1
		Torre de enfriamiento #3	6	32	221.9	221900	LP S1
		Torre de enfriamiento #4	6	74	872.3	872300	LP S1
		Torre de enfriamiento #5	6	75	904.9	904900	LP S2-15
M9	EO3	Torre de enfriamiento #2	0	0	<1	<1000	N/A
M18	EO6	Torre de enfriamiento #1	6	61	572	572000	LP S1
		Torre de enfriamiento #2	6	34	239	239000	LP S1
		Torre de enfriamiento #3	6	26	172	172000	LP S1

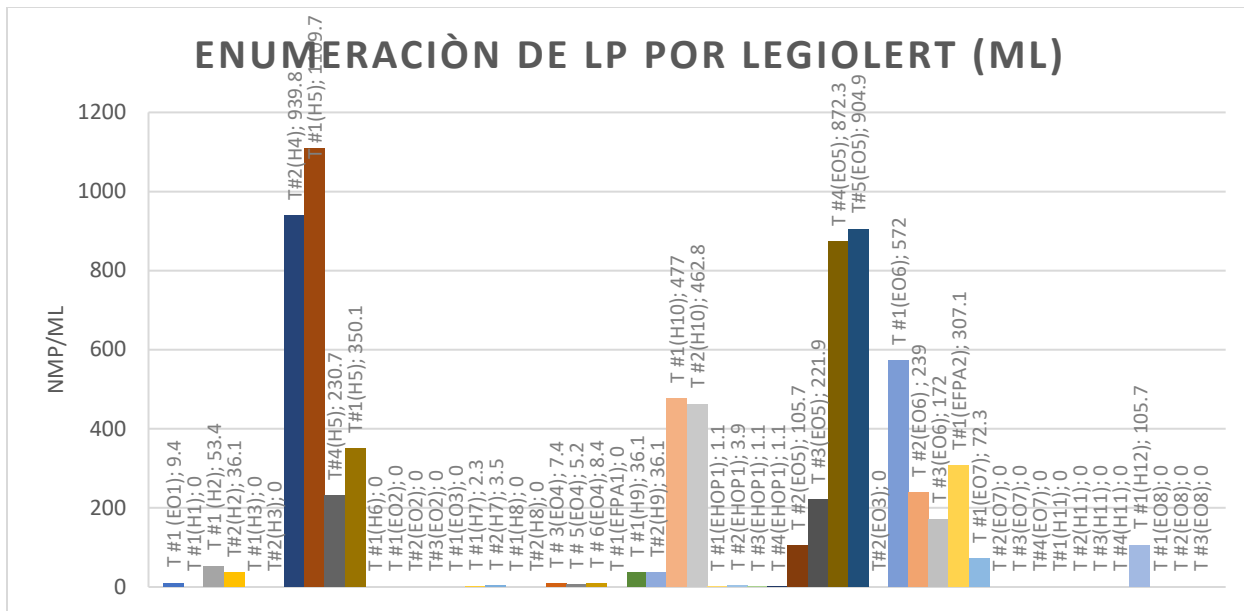
N/A: No aplica el análisis. LP: *Legionella pneumophila* LD:  $\leq 1000$  (volumen utilizado 1 mL de agua de Torre de enfriamiento).

Tabla 9: Describe los resultados obtenidos de *Legionella pneumophila* (Legiolert) y la detección del serogrupo (S1 o S2-15) para *Legionella pneumophila* en la estación lluviosa (LR1) de M19 a M23

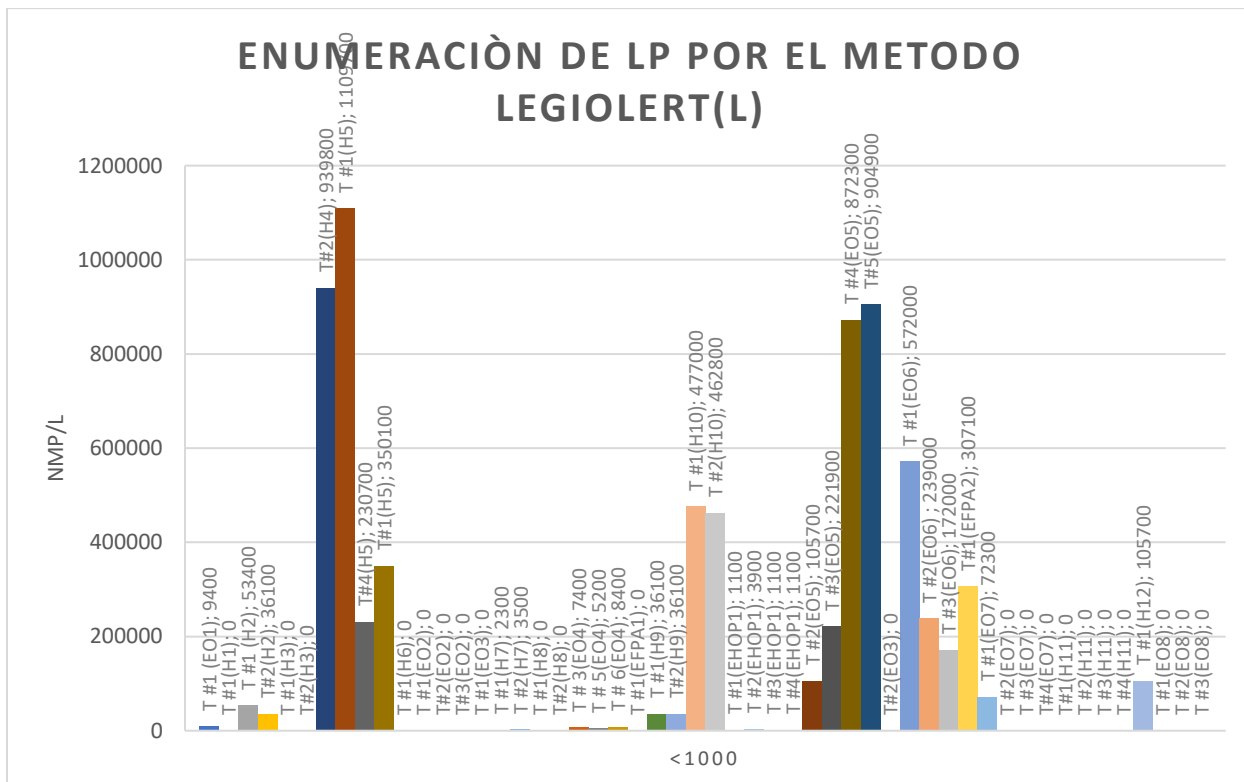
M: Se designará para reconocer la cantidad de instalaciones.

CODIGO DE LA INSTALACIÓN	CLASIFICACIÓN POR ACTIVIDAD ECONÓMICA	DESIGNACION DE LA TORRES DE ENFRIAMIENTO	KIT: LEGIOLERT DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE <i>LEGIONELA PNEUMOPHILA</i>				Serogrupo Kit: Microgen <i>Legionella</i>
			Pocillos Largos	Pocillos Pequeños	NMP/mL.	NMP/L	
M19	EFPA2	Torre de enfriamiento #1	6	41	307.1	307100	LP S1
M20	EO7	Torre de enfriamiento #1	6	12	72.3	72300	LP S1
		Torre de enfriamiento #2	0	0	<1	<1000	N/A
		Torre de enfriamiento #3	0	0	<1	<1000	N/A
		Torre de enfriamiento #4	0	0	<1	<1000	N/A
M21	H11	Torre de enfriamiento #1	0	0	<1	<1000	N/A
		Torre de enfriamiento #2	0	0	<1	<1000	N/A
		Torre de enfriamiento #3	0	0	<1	<1000	N/A
		Torre de enfriamiento #4	0	0	<1	<1000	N/A
M22	H12	Torre de enfriamiento #1	6	17	105.7	105700	LP S2-15
M23	EO8	Torre de enfriamiento #1	0	0	<1	<1000	N/A
		Torre de enfriamiento #2	0	0	<1	<1000	N/A
		Torre de enfriamiento #3	0	0	<1	<1000	N/A

N/A: No aplica el análisis. LP: *Legionella pneumophila* LD: ≤1000 (volumen utilizado 1 mL de agua de Torre de enfriamiento).



Gráfica 5: Describe el recuento de Legionella pneumophila por mL según el método de Legiolert en las Torres de Enfriamiento en la estación lluviosa (PR1)



Gráfica 6: Describe el recuento de Legionella pneumophila por L según el método de Legiolert en las Torres de Enfriamiento en la estación lluviosa (PR2)

Los resultados obtenidos en esta primera fase de muestreo de la estación lluviosa (LR1) resalta la detección de *Legionella pneumophila* en un 56.6 % (en 30 torres de enfriamiento) y un 43.4% de no detección de *Legionella pneumophila* (en 23 torres de enfriamiento). La concentración de *L. pneumophila* no debe ser superior a 1 000 UFC o NMP / L (Recomendado por la UNE 100030). Cuando los resultados sean superiores a 100.000 UFC o NMP / L, la torre de enfriamiento debe detenerse inmediatamente, el administrador de la instalación debe tomar medidas correctivas y debe informarse a la autoridad ambiental.

Los resultados comparados con otras guías de recomendación internaciones y legislaciones como: AIHA y OSHA (LMP:  $\leq 100$  UFC ò NMP/mL); y New York State Dept. Health ( (NEW YORK CITY DEPARTMENT OF HEALTH AND MENTAL HYGIENE , 2016) y Canada Webec (LMP:  $\leq 10$  UFC ò NMP/mL). Comparando estos Limites máximo permisibles (LMP) en base a los datos podemos definir lo siguiente:

- **AIHA Y OSHA( LMP:  $\leq 100$  UFC ò NMP/mL):** en base a esta norma los resultados obtenidos en esta primera fase de muestreo de la estación lluviosa (LR1) resalta la detección de *Legionella pneumophila* en un 28.3 % (en 15 torres de enfriamiento superior a 100 NMP/mL) y un 71.6% de no detección de *Legionella pneumophila* (en 38 torres de enfriamiento). En donde de las *Legionella pneumophila* no detectadas están dentro del rango de: 43.4% (23 torres de enfriamiento están por debajo de  $<1$  NMP/mL), 56.6% (15 torres de enfriamiento están entre los rangos de  $\geq 1$  y  $\leq 100$  NMP/mL).
- **New York State Dept. Health y Canada Webec (LMP:  $\leq 10$  UFC ò NMP/mL):** en base a esta norma los resultados obtenidos en esta primera fase de muestreo de la estación lluviosa (LR1) resalta la detección de *Legionella pneumophila* en un 47.3 % (en 25 torres de enfriamiento superior a 10 NMP/mL)) y un 52.7% de no detección de *Legionella pneumophila* (en 33 torres de enfriamiento). En donde de las *Legionella pneumophila* no detectadas están dentro del rango de: 69.7% (23 torres de enfriamiento están por debajo de  $<1$  NMP/mL), 20.3% (10 torres de enfriamiento están entre los rangos de  $\leq 10$  NMP/mL).

Según lo descrito (Fitzhenry et al., 2007), Muchos países, han promulgado leyes para registrar y regular las Torres de enfriamiento (TC), pero no existe un enfoque estándar y pocos países realizan una supervisión activa del cumplimiento. En ausencia de supervisión, el cumplimiento de las regulaciones suele ser bajo, a pesar de los estándares establecidos de la industria internacionales (ASHRE, AIHA y otros). En la ciudad de Nueva York, se espera que las inspecciones sin previo aviso y las sanciones financieras mejoren el cumplimiento. Después de la promulgación de la nueva ley, durante el 9 de mayo de 2016 al 31 de mayo de 2017, el DOHMH (Department of Health and Mental Hygiene) había inspeccionado 3.909 (79%) de los sistemas de TC registrados. Se encontraron muestras de 46 sistemas, que comprendían 1 o más TC, con *Legionella* superior a 1000 UFC / mL. La remediación en todos los casos se realizó de acuerdo con la nueva normativa. En ausencia de las regulaciones, es probable que no se hubieran recolectado y analizado muestras para *Legionella*. El DOHMH no habría tenido conocimiento de los peligros potenciales y no se habría producido ninguna reparación.

Evidenciar que existe la detección de *Legionella pneumophila* en torres de enfriamiento de nuestro país es un gran avance. Según Dr. Breysee de la NSF de los Estados Unidos que la *Legionella* “es un microorganismo que produce la enfermedad del legionario, una forma grave de neumonía causada por la inhalación de agua en aerosol que contiene la bacteria *Legionella*, es fatal para el 25% de las personas que la contraen en un entorno de atención médica y mortal para el 10% de la población en general, según datos de los CDC. Los resultados obtenidos en esta primera fase de muestreo de la estación lluviosa (LR1) resalta la detección del serogrupo predominante *Legionella pneumophila* (Lp S1) en un 73.3% (en 22 torres de enfriamiento) y un 26.7% de no detección de *Legionella pneumophila* (LP S2-15) (en 8 torres de enfriamiento). Según (Fitzhenry et al., 2007) en su estudio pudieron determinar veintitrés (23%) de los 108 casos-pacientes residentes en la zona del brote tuvieron cultivo positivo para Lp S1, y los aislamientos fueron indistinguibles por aislado obtenido de una Torre de enfriamiento de un hotel. La enfermedad del legionario (LD) es una neumonía asociada con sistemas de agua artificiales y se clasifica como nosocomial ( $\approx 10\%$  de los casos), relacionada con viajes ( $\approx 20\%$  de los casos) o adquirida en la comunidad ( $\approx 70\%$  de los casos). La LD es causada por bacterias del género *Legionella*, detectándose *Legionella pneumophila* serogrupo 1 (Lp1) hasta en un 80% de los casos. Es importante resaltar que los resultados de muestras ambientales puede ser un paso importante en la prevención de un brote.

Tabla 10: Describe los resultados obtenidos de los recuentos de *Legionella pneumophila* (Legiolert) y la detección del serogrupo (S1 ò S2-15) para *Legionella pneumophila* del muestreo realizado en la estación seca (LR2)

M: Se designará para reconocer la cantidad de instalaciones.

CODIGO DE LA INSTALACIÓN	CLASIFICACIÓN POR ACTIVIDAD ECONOMICA	DESIGNACIÓN DE LA TORRES DE ENFRIAMIENTO	KIT: LEGIOLERT DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE <i>LEGIONELA PNEUMOPHILA</i>				Serogrupo Kit: Microgen <i>Legionella</i>
			Pocillos largos	Pocillos pequeños	NMP/mL	NMP/L	
M1	EO1	T#2 (EO1)	0	0	<1	<1000	N/a
		T #1 (EO1)	1	0	1.1	1100	LP S1
M2	H1	T #1(H1)	6	46	361.4	361400	LP S1
M3	H2	T #1 (H2)	0	0	<1	<1000	N/a
		T#2(H2)	0	0	<1	<1000	N/a
M4	H3	T #1(H3)	0	0	<1	<1000	N/a
		T#2(H3)	0	0	<1	<1000	N/a
M5	H4	T#2(H4)	3	0	3.9	3900	LP S1
		T #1(H5)	1	0	1.1	1100	LP S1
M7	H6	T #1(H6)	3	2	<1	6600	LP S1
M8	EO2	T #1(EO2)	0	0	<1	<1000	N/a
		T#2(EO2)	0	0	<1	<1000	N/a
		T#3(EO2)	0	0	<1	<1000	N/a
M9	EO3	T #1(EO3)	0	0	<1	<1000	N/a
M10	H7	T #1(H7)	6	24	156.6	156600	LP S1
		T #2(H7)	6	19	119.8	119800	LP S1
M12	EO4	T # 3(EO4)	5	3	14.6	14600	LP S1
		T # 5(EO4)	5	2	10.4	10400	LP S1
		T # 6(EO4)	5	2	10.4	10400	LP S1
M13	EFPA1	T #1(EFPA1)	6	12	73.2	72300	LP S2
M16	EHOP1	T #1(EHOP1)	6	4	26.4	26400	LP S1
		T #2(EHOP1)	6	4	26.4	26400	LP S1
		T #3(EHOP1)	6	11	65.9	65900	LP S1
		T #4(EHOP1)	6	5	31.0	31000	LP S2
M17	EO5	T #2(EO5)	6	20	126.9	126900	LP S1
		T #3(EO5)	6	36	258	258000	LP S1
		T #4(EO5)	0	0	<1	<1000	N/a
		T#5(EO5)	6	12	72.3	72300	LP S1
M9	EO3	T#2(EO3)	0	0	<1	<1000	N/a

N/A: No aplica el análisis. LP: *Legionella pneumophila* LD: ≤1000 (volumen utilizado 1 mL de agua de Torre de enfriamiento).

Tabla 11: Describe los resultados obtenidos de los recuentos de *Legionella pneumophila* (Legiolert) y la detección del serogrupo (S1 ò S2-15) para *Legionella pneumophila* del muestreo realizado en la estación seca (LR2)

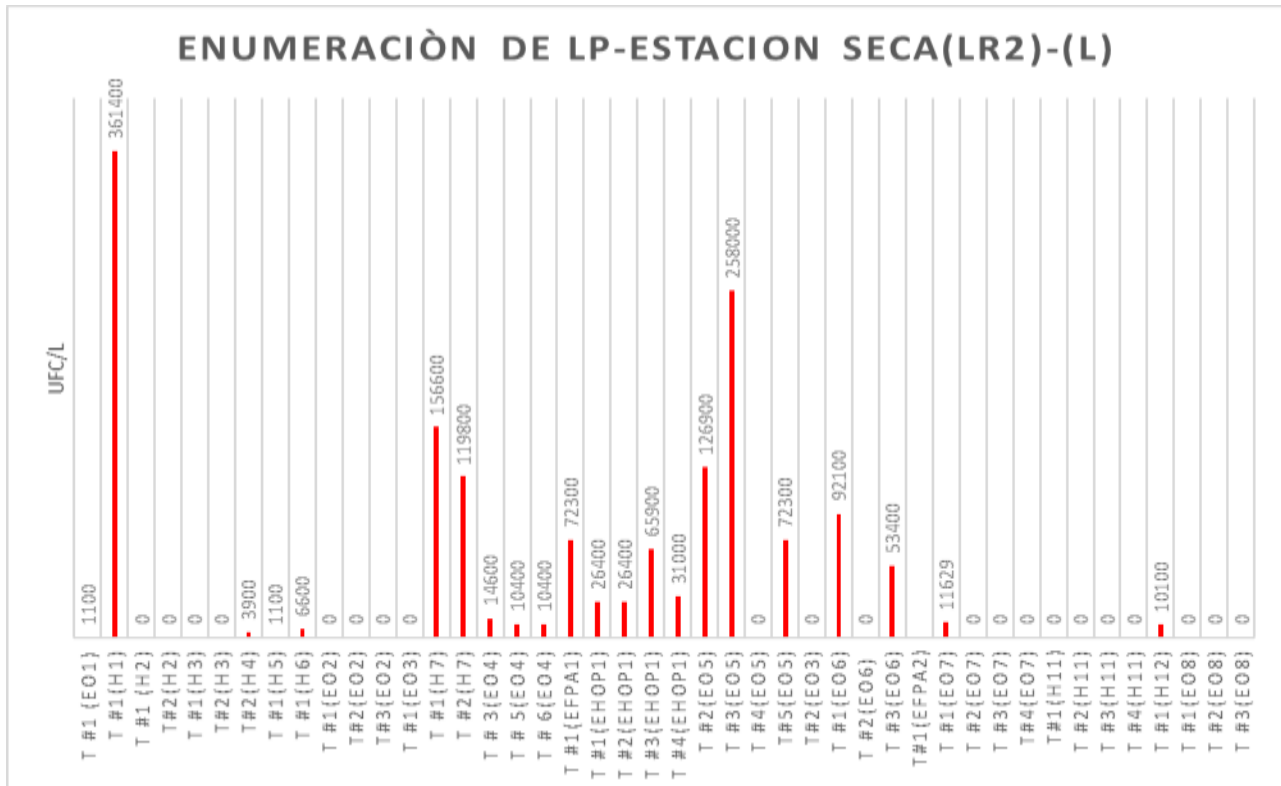
M: Se designará para reconocer la cantidad de instalaciones.

CODIGO DE LA INSTALACIÓN	CLASIFICACIÓN POR ACTIVIDAD ECONOMICA	DESIGNACIÓN DE LA TORRES DE ENFRIAMIENTO	KIT: LEGIOLERT DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE <i>LEGIONELA PNEUMOPHILA</i>				Serogrupo Kit: Microgen <i>Legionella</i>
			Pocillos largos	Pocillos pequeños	NMP/mL	NMP/L	
<b>M18</b>	EO6	T #1(EO6)	6	15	92.1	92100	LP S1
		T #2(EO6)	0	0	<1	<1000	N/a
		T #3(EO6)	6	9	53.4	53400	LP S1
<b>M20</b>	EO7	T #1(EO7)	6	16	11.6	11629	LPS1
		T #2(EO7)	0	0	<1	<1000	N/a
		T #3(EO7)	0	0	<1	<1000	N/a
		T#4(EO7)	0	0	<1	<1000	N/a
<b>M21</b>	H11	T#1(H11)	0	0	<1	<1000	N/a
		T #2(H11)	0	0	<1	<1000	N/a
		T #3(H11)	0	0	<1	<1000	N/a
		T #4(H11)	0	0	<1	<1000	N/a
<b>M22</b>	H12	T #1(H12)	6	10	10.1	10100	LPS1
<b>M23</b>	EO8	T #1(EO8)	0	0	<1	<1000	N/a
		T #2(EO8)	0	0	<1	<1000	N/a
		T #3(EO8)	0	0	<1	<1000	N/a

N/A: No aplica el análisis. LP: *Legionella pneumophila* LD: ≤1000 (volumen utilizado 1 mL de agua de Torre de enfriamiento. Color rojo: Fuera del Limite permitido.



Gráfica 7: Describe los resultados de los recuentos de Legionella pneumophila en mL en las torres de enfriamiento muestreadas por en la estación seca (PR2)



Gráfica 8: Describe los resultados de los recuentos de Legionella pneumophila en L en las torres de enfriamiento muestreadas por en la estación seca (PR2)

Los resultados obtenidos en esta primera fase de muestreo de la estación seca (LR2) resalta la detección de *Legionella pneumophila* en un 51.1 % (en 23 torres de enfriamiento) y un 48.9% de no detección de *Legionella pneumophila* (en 22 torres de enfriamiento). La concentración de *L. pneumophila* no debe ser superior a 1 000 UFC o NMP / L (Recomendado por la UNE 100030). Cuando los resultados sean superiores a 100.000 UFC o NMP / L, la torre de enfriamiento debe detenerse inmediatamente, el administrador de la instalación debe tomar medidas correctivas y debe informarse a la autoridad ambiental.

Los resultados comparados con otras guías de recomendación internaciones y legislaciones como: AIHA y OSHA (LMP:  $\leq 100$  UFC ò NMP/mL); y New York State Dept. Health ( (NEW YORK CITY DEPARTMENT OF HEALTH AND MENTAL HYGIENE , 2016) y Canada Webec (LMP:  $\leq 10$  UFC ò NMP/mL). Comparando estos Limites máximo permisibles (LMP) en base a los datos podemos definir lo siguiente:

- **AIHA Y OSHA(LMP:  $\leq 100$  UFC ò NMP/mL):** en base a esta norma los resultados obtenidos en esta primera fase de muestreo de la estación seca (LR2) resalta la detección de *Legionella pneumophila* en un 15.5 % (en 7 torres de enfriamiento superior a 100 NMP/mL) y un 84.5% de no detección de *Legionella pneumophila* (en 38 torres de enfriamiento). En donde de las *Legionella pneumophila* no detectadas están dentro del rango de: 57.9% (22 torres de enfriamiento están por debajo de  $<1$  NMP/mL), 43.1% (16 torres de enfriamiento están entre los rangos de  $\geq 1$  y  $\leq 100$  NMP/mL).
- **New York State Dept. Health y Canada Webec (LMP:  $\leq 10$  UFC ò NMP/mL):** en base a esta norma los resultados obtenidos en esta primera fase de muestreo de la estación lluviosa (LR1) resalta la detección de *Legionella pneumophila* en un 41.8 % (en 19 torres de enfriamiento superior a 10 NMP/mL)) y un 58.2% de no detección de *Legionella pneumophila* (en 24 torres de enfriamiento). En donde de las *Legionella pneumophila* no detectadas están dentro del rango de: 91.7% (23 torres de enfriamiento están por debajo de  $<1$  NMP/mL), 8.3% (2 torres de enfriamiento están entre los rangos de  $\leq 10$  NMP/mL).

Los resultados obtenidos en esta segunda fase de muestreo de la estación seca (LR2) resalta la detección del serogrupo predominante *Legionella pneumophila* (Lp S1) en un 91.3% (en 21 torres de enfriamiento) y un 8.69% de no detección de *Legionella pneumophila* (LP S2-15) (en 2 torres de enfriamiento).

Tabla 12: Diferencias de resultados de detección de *Legionella pneumophila* en muestras muestreadas en la estación lluviosa (LR1) y estación seca (LR2)

ESTACIONES	CANTIDAD DE INSTALACIONES MUESTREADAS	CANTIDAD DE TORRES DE ENFRIAMIENTO MUESTREADAS	MUESTRAS DE DETECTADAS LP	MUESTRAS NO DETECTADO LP	% DE DISMINUCIÓN PREVALENCIA DE LP
LLUVIOSA(LR1)	23	53	30	23	5.5 %
PORCENTAJE(%)		100%	56.6%	43.4%	
SECA (LR2)	19	45	23	22	
PORCENTAJE(%)		100%	51.1%	48.9%	

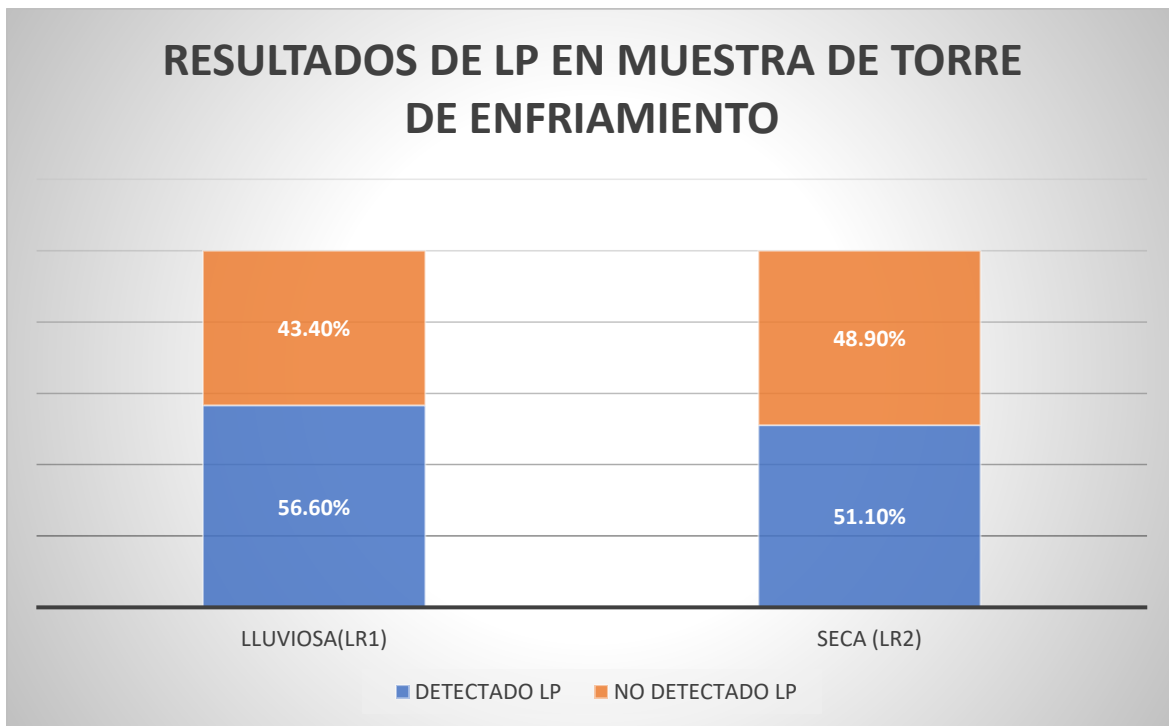


Ilustración 37: Describe los % de prevalencia de muestras de Torres de enfriamiento que se detectaron LP y no detectado en la LR1 y LR2

Los datos demuestran que no existe una diferencia significativa marcada entre los dos muestreos aplicados en la estación lluviosa (LR1) y estación seca (LR2), es decir, que no existe influencia delimitada del crecimiento del microorganismo *Legionella* en base a las condiciones climáticas. Diversos estudios han demostrado que entre el 40 y el 60% de las torres de enfriamiento analizadas contenían *Legionella*. Por lo tanto, es mejor asumir que cualquier sistema dado puede albergar al microorganismo, y que las prácticas rutinarias y continuas de control microbiológico deben

implementarse para minimizar el riesgo de *Legionella*. Estudio realizado en el Laboratorio Expert-Lab demostró una prevalencia de *Legionella pneumophila* en temporada lluviosa (56.6%) y Temporada seca ( 51.1%), mostrando una disminución de prevalencia de 5.5% de LP. En los Estados Unidos, el 62% de los casos de Enfermedad de Legionela ocurren entre junio y octubre, un período de clima generalmente cálido cuando los sistemas comerciales de aire acondicionado, incluidos aquellos con torres de enfriamiento (CT), están en funcionamiento. Se estima que el 28% de los casos esporádicos de LD pueden ser causados por emisiones de CT (Fitzhenry et al., 2007). Panamá, cuenta con una estación de seca reducida de solo dos a tres meses (enero a marzo), en cambio, la estación lluviosa posee una extensión de 7 meses (abril a diciembre).

Según la (WTB-148, 2008) para minimizar la proliferación de *Legionella pneumophila* y el riesgo asociado de la enfermedad del legionario, las recomendaciones de consenso son: a. Minimizar el estancamiento del agua: b. Minimice las fugas del proceso en el sistema de enfriamiento que proporcionan nutrientes para las bacterias; c. Mantener la limpieza general del sistema. Esto minimizará la acumulación de sedimentos que pueden albergar o proporcionar nutrientes para las bacterias y otros organismos: d. Aplique inhibidores de incrustaciones y corrosión según corresponda: e. Use eliminadores de niebla de alta eficiencia en torres de enfriamiento; f. Controlar la población microbiológica general.

Es importante resaltar que durante la realización del muestreo se pudo evidenciar en las instalaciones muestreadas en este proyecto las siguientes deficiencias en las torres de enfriamiento:

- Torres de enfriamiento que presentaban sedimentos en el fondo de la balsa y presencia de Biofilms en las estructuras.
- Ausencia de sistema automáticos para la aplicación de Biocidas, fúngicas, Inhibidor de corrosión e incrustación, biodispersante. Microbicidas (biocidas), Antiespumante y Limpiador desengrasante alcalino y Estabilizados de pH.
- Ausencia de registro de mantenimiento preventivos de parte del área de ingeniería.
- Crecimiento de algas en las balsas de las torres de enfriamiento.
- Separadores de gotas defectuosos, con requerimiento de cambio.
- Torres de enfriamiento con vida útil muy extendidas.

- Ausencia de los servicios de Limpieza y Desinfección (L+D) de manera programada.
- Ausencia de un programa de control de calidad microbiológico (Recuento de heterótrofos y *Legionella*) y Fisicoquímico (pH, biocida residual y conductividad).
- Ausencia de conocimiento en el mantenimiento preventivo, controles para las torres de enfriamiento y Acciones a generar en detección de *Legionella*.
- Ubicación de las torres de enfriamiento incorrectas.
- Ausencia de protección del personal de mantenimiento preventivo a las áreas de las torres de enfriamiento.

Según la MMWR (Garrison et al, 2016) veintitrés (85%) resúmenes de investigación tenían información suficiente para evaluar la contribución de las deficiencias en el mantenimiento del sistema de torre de enfriamiento. Las deficiencias más frecuentes observadas se clasificaron como fallas de proceso (n = 15, 65%), seguidas de errores humanos (12, 52%), fallas de equipos (8, 35%) y cambios externos no gestionados (8, 35%). Para 11 brotes (48%), se informaron deficiencias en más de una categoría. Dieciséis (70%) investigaciones informaron niveles inadecuados de desinfectante de agua y 12 (52%) informaron temperaturas del agua en el rango óptimo para el crecimiento de *Legionella* . Casi siempre se observaron indicios de mantenimiento inadecuado en torres de enfriamiento. En este estudio podemos mostrar las causas del brote por torres de enfriamiento:

- Desinfectante inadecuado en la torre de enfriamiento debido a la adición irregular de desinfectante por el contratista de mantenimiento de registros inadecuados.
- Desinfectante inadecuado en la torre de enfriamiento debido a la entrega programada que no permitió la entrega del desinfectante cuando la torre de enfriamiento no estaba funcionando
- Tormenta tropical con fuertes lluvias e inundaciones inmediatamente antes del inicio de los síntomas del primer caso.
- Falta de procedimientos de arranque y apagado para la torre de enfriamiento Falta de capacitación del personal sobre la operación y mantenimiento de la torre de enfriamiento La disfunción de la torre de enfriamiento, lo que provoca la apertura de las ventanas Fuertes lluvias, alta humedad y temperaturas cálidas precedieron el inicio de los casos

Tabla 13: Evaluación de los resultados de enumeración de *Legionella pneumophila* en muestras tomadas en la estación lluviosa (LR1) y estación seca (LR2), verificando el cumplimiento de los Límites máximos permisibles (LMR) descritos por la UNE 100030:2017/BOE 365 < 1000 NMP o UFC/L.

ESTACIONES	CANTIDAD DE INSTALACIONES MUESTREADAS	CANTIDAD DE TORRES DE ENFRIAMIENTO MUESTREADAS	MUESTRAS DETECTADAS LP	MUESTRAS NO DETECTADO LP	RANGO DE ENUMERACION DE LP EN TORRES DE ENFRIAMIENTO NMP/L
LLUVIOSA(LR1)	23	53	30	23	1100-1109700
PORCENTAJE(%)		100%	56.6%	43.4%	
SECA (LR2)	19	45	23	22	1100-361400
PORCENTAJE(%)		100%	51.1%	48.9%	

Nota: Ver Cuadro 5.10 para ver resultados de Serogrupos de LP.

Si hacemos una evaluación a través del conteo obtenido en la estación lluviosa (LR1) y estación seca (LR2) según los descrito en la UNE 100030 (Ver ANEXO 6) los podemos clasifica en:

**-Estación lluviosa: 53 Torres de enfriamiento muestreadas.**

- a.  $\leq 1000$  NMP/L: 23 Torres de enfriamiento (**43.4%**)
- b.  $>1\ 000$  y  $\leq 10\ 000$  NMP/L: 10 Torres de enfriamiento (**18.9%**)
- c.  $<10\ 000$  y  $\leq 100\ 000$  NMP/L: 5 Torres de enfriamiento (**9.4%**)
- d.  $> 100\ 000$  NMP/L: 16 Torres de enfriamiento (**30.3%**)

**-Estación seca: 45 Torres de enfriamiento muestreadas\*.**

- a.  $\leq 1000$  NMP/L: 22 Torres de enfriamiento (**48.9%**)
- b.  $>1\ 000$  y  $\leq 10\ 000$  NMP/L: 5 Torres de enfriamiento (**11.1%**)
- c.  $<10\ 000$  y  $\leq 100\ 000$  NMP/L: 12 Torres de enfriamiento (**26.7%**)
- d.  $> 100\ 000$  NMP/L: 6 Torres de enfriamiento (**13.3%**)

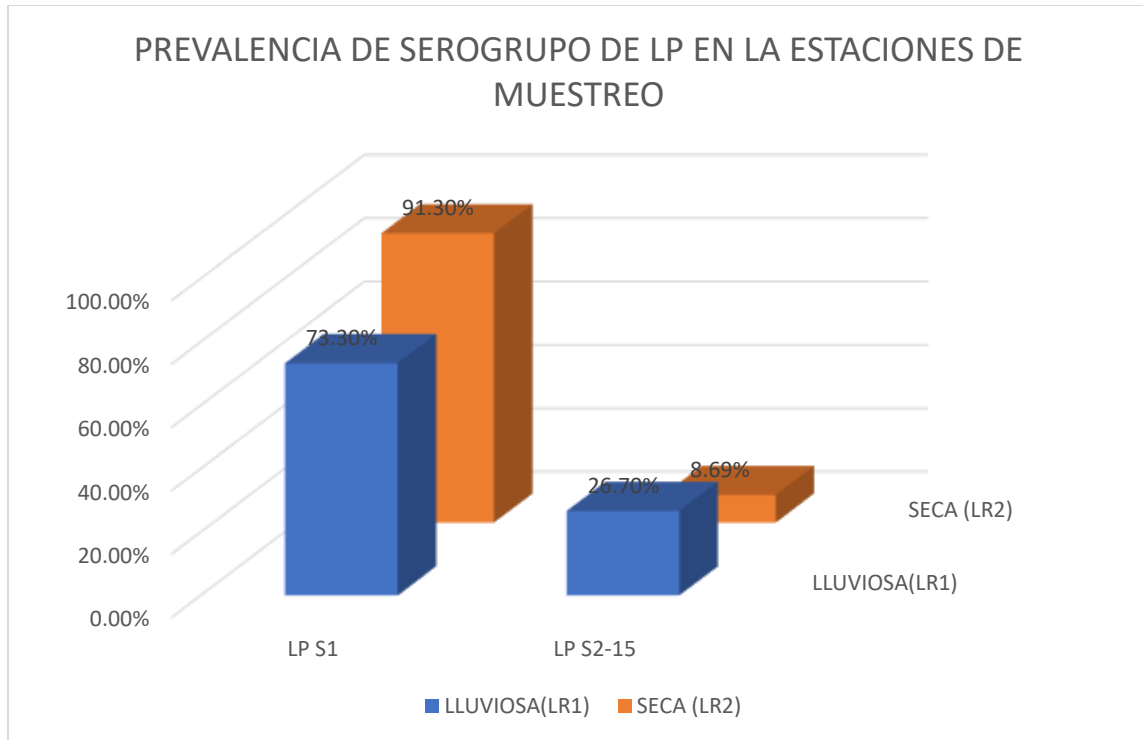
Según la UNE 10030 define la *Legionella pneumophila* como especie de *Legionella* cuyo serogrupo 1 es el que causa enfermedad con mayor frecuencia.

\*Nota: Se tomo 8 muestras menos que la estación lluviosa (LR1).

Tanto en las Estación lluviosa (LR1) como la Estación seca (LR2) se puede notar las disminuciones en los porcentajes (%) para el punto b ( $>1\ 000$  y  $\leq 10\ 000$  NMP/L) y punto d ( $> 100\ 000$  NMP/L) esto se debe a los procesos de L+D aplicados para las torres de enfriamiento descrita dentro de estos niveles. Solo en el caso del punto c ( $<10\ 000$  y  $\leq 100\ 000$ ) incremento de 9,4% de la estación lluviosa (LR1) a 26.7% en la estación seca (LR2), esto se debe a que los procesos de L+D fueron eficientes para algunas torres de enfriamiento que están clasificadas en el punto d ( $> 100\ 000$  NMP/L) y pasaron a punto c ( $<10\ 000$  y  $\leq 100\ 000$ ). Al igual proceso deficientes de L+D muestra el proceso de amplificaciones de crecimiento microbiano de LP en las muestras descritas en el punto b ( $>1\ 000$  y  $\leq 10\ 000$  NMP/L) que pasaron a punto c ( $10\ 000$  y  $\leq 100\ 000$ ).

Tabla 14: Evaluación de los resultados de enumeración de *Legionella pneumophila* en muestras tomadas en la estación lluviosa (LR1) y estación seca (LR2).

ESTACIONES	CANTIDAD DE INSTALACIONES MUESTREADAS	CANTIDAD DE TORRES DE ENFRIAMIENTO MUESTREADAS POSITIVAS DE LP	MUESTRAS DETECTADAS LP S1	MUESTRAS DETECTADAS LP S2-15	% DE SEROGRUPOS DETECTADOS
LLUVIOSA(LR1)	23	30	22	8	LP S1 +18%(LR1-LR2) LP S2-15 – 18.01%(LR1-LR2)
PORCENTAJE(%)		100%	73.3%	26.7%	
SECA (LR2)	19	23	21	2	
PORCENTAJE(%)		100%	91.3%	8.69%	



Gráfica 9: Porcentaje de prevalencia de serogrupo de *Legionella pneumophila* en las estaciones de muestra

Los resultados de la evaluación de las muestras positivas se determinaron lo siguiente: Una prevalencia de *L. pneumophila* S1 en 73.3% en la estación lluviosa (LR1) y un 91.3% en la estación seca (LR2). En cambio, se detectó los *L. pneumophila* S2-15 en 26.7% en la estación lluviosa (LR1) y un 8.69% en la estación seca (LR2). Tres brotes y el 84% (174/207) de los casos asociados con brotes ocurrieron en residentes del Bronx. Los cultivos fueron positivos para *Legionella* spp. para el 14.5% (30/207) de los casos asociados con brotes residentes en la ciudad de Nueva York (todos Lp1 ) y el 6.3% (130 / 2,055) de los casos no asociados con brotes residentes en la ciudad de Nueva York (90 Lp1 , 2 *L. pneumophila* 3 [ Lp3 ], 4 *L. pneumophila* 4[ Lp4 ], 3 *L. pneumophila* 5 [ Lp5 ], 1 *L. pneumophila* 6 [ Lp6 ], 3 *L. micdadei* y 27 *L. pneumophila* de un serogrupo indeterminado). (NEW YORK CITY DEPARTMENT OF HEALTH AND MENTAL HYGIENE , 2016)

Tabla 15: Evaluación de los resultados de enumeración de *Legionella pneumophila* en muestras tomadas en la estación lluviosa (LR1) y estación seca (LR2), verificando el (%) de eficiencia del proceso de L+D (Limpieza y desinfección) de la M1 A LA M15.

CODIGO DE LA INSTALACIÓN	CLASIFICACIÓN POR ACTIVIDAD ECONOMICA	DESIGNACION DE LA TORRES DE ENFRIAMIENTO	ESTACIÓN LLUVIOSA		ESTACIÓN SECA		Evaluación (M: Mejora NC: No hay Cambios IS: Incremento súbito)	Serogrupo ( I: Sin cambios D: Con Cambios)
			NMP/L LP	Sero- grupo LP	NMP/L LP	Sero- grupo LP		
M1	EO1	T #2(EO1)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	N/a
		T #1(EO1)	9400	LP S1	1100	LP S1	M (-88.3%)	I++
M2	H1	T #1(H1)	<1000	N/a	361400	LP S1	IS (+361.4%)	D+
M3	H2	T #1(H2)	53400	LP S1	<1000	N/a	M(100%)	D+-
		T #2(H2)	36100	LP S1	<1000	N/a	M(100%)	D+-
M4	H3	T #1(H3)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -
		T #2(H3)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -
M5	H4	T #2(H4)	939800	LP S1	3900	LP S1	M(-96%)	I++
		T #1(H4)	1109700	LP S1	1100	LP S1	M(-99.1%)	I++
M6	H5	T #4(H5)	230700	LP S1	N/AT	N/AT	NC	N/a
		T #1(H5)	350100	LP S1	N/AT	N/AT	NC	N/a
M7	H6	T #1(H6)	<1000	N/a	6600	LP S1	IS(+83%)	D+
M8	EO2	T #1(EO2)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -
		T #2(EO2)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -
		T #3(EO2)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -
M9	EO3	T #1(EO3)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -
M10	H7	T #1(H7)	2300	LP S1	156600	LP S1	IS(+680.8%)	I++
		T #2(H7)	3500	LP S1	119800	LP S1	IS(+342,28%)	I++
M11	H8	T #1(H8)	<1000	N/a	N/AT	N/AT	N/a	N/a
		T #2(H8)	<1000	N/a	N/AT	N/AT	N/a	N/a
M12	EO4	T #3(EO4)	7400	LP S2-15	14600	LP S1	IS(+98%)	D++(S2-15 a S1)
		T #5(EO4)	5200	LP S2-15	10400	LP S1	M(100%)	D++(S2-15 a S1)
		T #6(EO4)	8400	LP S2-15	10400	LP S1	IS(+20%)	D++(S2-15 a S1)
M13	EFPA1	T #1(EFPA1)	<1000	N/a	72300	LP S2-15	N/a	D+
M14	H9	T #1(H9)	36100	LP S1	N/AT	N/AT	N/a	N/a
		T #2(H9)	36100	LP S1	N/AT	N/AT	N/a	N/a
M15	H10	T #1(H10)	477000	LP S2-15	N/AT	N/AT	N/a	N/a
		T #2(H10)	462800	LP S2-15	N/AT	N/AT	N/a	N/a

Tabla 16: Evaluación de los resultados de enumeración de *Legionella pneumophila* en muestras tomadas en la estación lluviosa (LR1) y estación seca (LR2), verificando el (%) de eficiencia del proceso de L+D (Limpieza y desinfección) de la M16 A M23

CODIGO DE LA INSTALACIÓN	CLASIFICACIÓN POR ACTIVIDAD ECONOMICA	DESIGNACIÓN DE LA TORRES DE ENFRIAMIENTO	ESTACIÓN LLUVIOSA		ESTACIÓN SECA		Evaluación (M: Mejora NC: No hay Cambios IS: Incremento súbito)	Serogrupo ( I: Sin cambios D: Con Cambios)
			NMP/L LP	Serogrupo LP	NMP/L LP	Serogrupo LP		
M16	EHOP1	T #1(EHOP1)	1100	LP S1	26400	LP S1	IS(+240%)	I++
		T #2(EHOP1)	3900	LP S1	26400	LP S1	IS(+676%)	I++
		T #3(EHOP1)	1100	LP S1	65900	LP S1	IS(+599 %)	I++
		T #4(EHOP1)	1100	LP S2-15	31000	LP S2-15	IS(+282.8%)	I++
M17	EO5	T #2(EO5)	105700	LP S1	126900	LP S1	IS(+20.1%)	I++
		T #3(EO5)	221900	LP S1	258000	LP S1	IS(+16,2%)	I++
		T #4(EO5)	872300	LP S1	<1000	N/a	M(100%)	D+
		T #5(EO5)	904900	LP S2-15	72300	LP S1	M(-12.5%)	D++(S2-15 a S1)
M9	EO3	T #3(EO3)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -
M18	EO6	T #1(EO6)	572000	LP S1	92100	LP S1	M(-621.06%)	I++
		T #2(EO6)	239000	LP S1	<1000	N/a	M(100%)	D+
		T #3(EO6)	172000	LP S1	53400	LP S1	M(-322.1%)	I++
M19	EFPA2	T #1(EFPA2)	307100	LP S1	N/AT	N/AT	N/a	N/a
M20	EO7	T #1(EO7)	72300	LP S1	11629	LPS1	M(-626.6%)	I++
		T #2(EO7)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -
		T #3(EO7)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -
		T #4(EO7)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -
M21	H11	T #1(H11)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -
		T #2(H11)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -
		T #3(H11)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -
		T #4(H11)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -
M22	H12	T #1(H12)	105700	LP S2-15	10100	LPS1	M(-90,5%)	D++(S2-15 a S1)
M23	EO8	T #1(EO8)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -
		T #2(EO8)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -
		T #3(EO8)	<1000	N/a	<1000	N/a	NC	I - -

M (- %) = Disminución de LP en tanto %.

NC= Resultados de LP se mantiene estables, es decir <1000 NMP/L.

M (100%) = Disminución de LP en un 100% a partir de una muestra positiva.

IS (+%) = Incremento de LP en tanto %.

N/AT= Muestra no autorizada por el cliente. No se muestreo.

I++= Serogrupo sin cambio en ambos muestreos (LR1 Positiva y LR2 Positiva)

D-+= Serogrupo con cambios. (LR1 Negativo y LR2 Positivo)

D+= Serogrupo con cambios. (LR1 Positivo y LR2 Negativo)

D++(S2-15 a S1)= Serogrupo con cambios ambos muestreo positivo (LP S2-15 A LP S1)

I - - = Serogrupo sin cambios en ambos muestreos (LR1 Negativo y LR2 Negativo)

LP= *Legionella pneumophila*

Tabla 17: Evaluación de los resultados de enumeración de *Legionella pneumophila* en muestras tomadas en la estación lluviosa (LR1) y estación seca (LR2), verificando el (%) de eficiencia del proceso de L+D (Limpieza y desinfección).

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LP EN LOS DOS MUESTREOS (LR1 VS LR2) EFICIENCIA DE L+D			EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE SEROGRUPOS		
RESULTADOS	CANTIDAD DE MUESTRA	%	RESULTADOS	CANTIDAD DE MUESTRA	%
<b>M (- %) = Disminución de LP en tanto %</b>	8	15.09%	I++= Serogrupo sin cambio en ambos muestreos (LR1 Positiva y LR2 Positiva)	14	26.41%
<b>NC= Resultados de LP se mantiene estables, es decir &lt;1000 NMP/L</b>	20	37.73%	D-+= Serogrupo con cambios. (LR1 Negativo y LR2 Positivo)	5	9.43%
<b>M (100%) = Disminución de LP en un 100% a partir de una muestra positiva</b>	5	9.43%	D+ -= Serogrupo con cambios. (LR1 Positivo y LR2 Negativo)	2	3.77%
<b>IS (+%) = Incremento de LP en tanto %</b>	12	22.64%	D++(S2-15 a S1)= Serogrupo con cambios ambos muestreo positivo (LP S2-15 A LP S1)	5	9.43%
<b>N/AT= Muestra no autorizada por el cliente. No se muestreo</b>	8	15.09%	I - -= Serogrupo sin cambios en ambos muestreos (LR1 Negativo y LR2 Negativo)	17	32.07%
			N/a	10	18.86%
<b>N</b>	53		<b>N*</b>	53	

LP= *Legionella pneumophila* N\*= Sumarle el N/a que son 10 muestras que dieron negativo para LP.

M (- %) = Disminución de LP en tanto %.

NC= Resultados de LP se mantiene estables, es decir <1000 NMP/L.

M (100%) = Disminución de LP en un 100% a partir de una muestra positiva.

IS (+%) = Incremento de LP en tanto %.

N/AT= Muestra no autorizada por el cliente. No se muestreo.

I++= Serogrupo sin cambio en ambos muestreos (LR1 Positiva y LR2 Positiva)

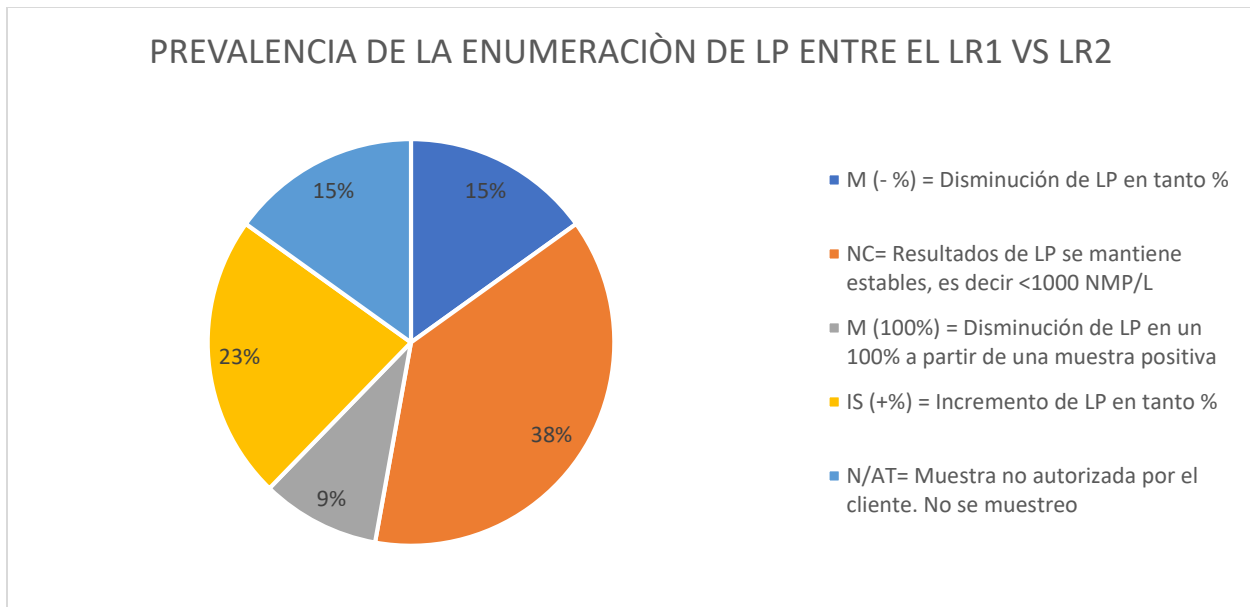
D-+= Serogrupo con cambios. (LR1 Negativo y LR2 Positivo)

D+ -= Serogrupo con cambios. (LR1 Positivo y LR2 Negativo)

D++(S2-15 a S1)= Serogrupo con cambios ambos muestreo positivo (LP S2-15 A LP S1)

I - -= Serogrupo sin cambios en ambos muestreos (LR1 Negativo y LR2 Negativo)

LP= *Legionella pneumophila*



*Gráfica 10: Describe los % de prevalencia de las muestras de LP de las Torres de enfriamiento en base a la eficiencia de L+D*

Evaluar los procesos de mantenimiento hacia la torre de enfriamiento, incluyendo el programa de Limpieza + Desinfección (L+D) entre ambas estaciones seca (LR2) y lluviosa (LR1)) podemos definir los siguiente en base a la eficiencia del proceso:

- 15.09%: Disminución de LP en tanto % (Rango Mínimo: -12.5% a Rango Máximo: -626.6%) entre la estación LR1 y LR2.
- 37.73%: Resultados de LP se mantiene estables, es decir por debajo de <1000 NMP/L en ambas estaciones LR1 y LR2.
- 9.43%: Disminución de LP en un 100% a partir de una muestra positiva detectada en LR1 y no detectada en el LR2.
- 22.64 %: Incremento de LP en tanto % (Rango Mínimo: +16.2% a Rango Máximo: +680.8%) entre la estación LR1 y LR2.
- 15.09%: Muestra no autorizada por el cliente. No se muestreo nuevamente con respecto al LR1.

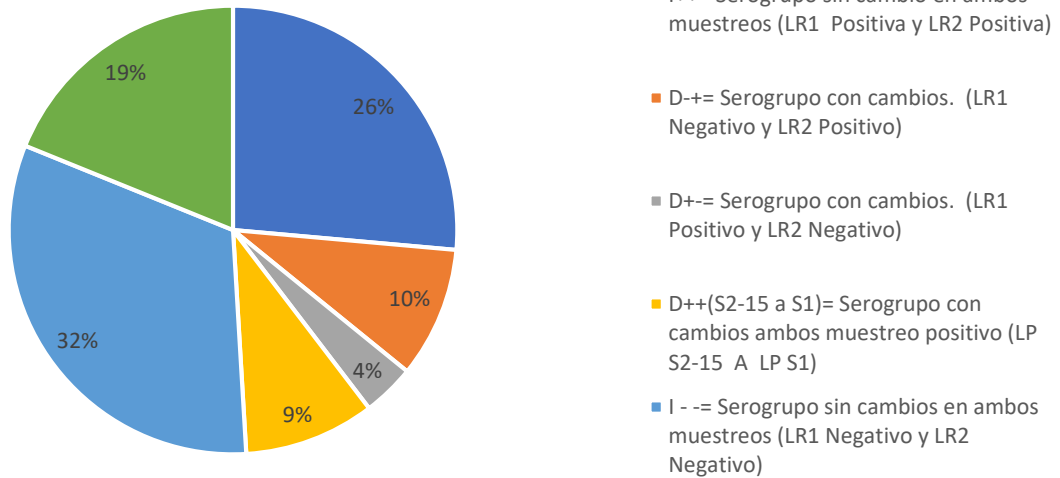
Podemos resaltar que los procesos de L+D establecidos en las instalaciones han mostrado un eficiencia de 47.16% donde incluimos los resultados de LP que se mantuvieron estables entre los dos muestreo aplicando buenos procesos de L+D y se da la disminución de LP en un 100% después

de detectar, aplicando acciones correctivas de L+D. Adicional podemos evidenciar que 15.09% de las torres de enfriamiento muestreadas obtuvieron una disminución de LP en un rango de -12.5% a -626.6%). Podemos expresar que un 22.64% de las torres de enfriamiento muestreadas obtuvieron incremento de LP en un rango de 16.2% hasta 680.8%). En 15.09% de las torres de enfriamiento no podremos evaluar su eficacia en el proceso de L+D, las cuales dieron detectadas con LP y el cliente no autorizo el muestreo en la estación seca (LR2).

En el caso de los IS (+%) con incremento de LP que presento un 22.64% de las muestras procesadas. Según (Agency for Health Protection and Promotion, 2014) *Legionella pneumophila* se ha demostrado que coloniza ciertos tipos de sistemas de agua que pueden tener áreas estancadas, por ejemplo, calentadores de agua, tanques, depósitos y cuencas. Los accesorios, tuberías y diversos materiales de juntas utilizados en estos sistemas también se pueden colonizar. Las condiciones estancadas promueven el crecimiento de *Legionella pneumophila* y dificultan la erradicación. Al igual se establecen factores que propician el crecimiento de *Legionella* un entorno para multiplicación (ver ANEXO 16) :

- La temperatura parece ser una de las influencias más importantes en cuanto a si o no las bacterias crecen. *Legionella* pueden sobrevivir y multiplicarse entre 25-45 sobrevivir (Los datos de las torres de enfriamiento muestreadas presentaron un rango de 27.5 a 29.5)
- Otro factor que es importante para la supervivencia y proliferación de *Legionella* es la formación de biofilm (Se evidenció la presencia de biofilm en las torres de enfriamiento).
- Los materiales usados dentro de un sistema también puede ser un factor de favorecimiento *Legionella* crecimiento (Se evidencio problemas de infraestructura en las instalaciones de las torres de enfriamiento).
- La acumulación de sedimento puede albergar *Legionella* bacterias y también proporcionan una fuente de nutrientes para ellos ((Se evidencio la presencia de sedimento en las instalaciones de las torres de enfriamiento).
- La L+D puede desprender los biofilm y Re contaminar las balsas o bandejas de las torres de enfriamiento. Evitando el proceso de eliminación de la *Legionella*.

## PREVALENCIA DE LA IDENTIFICACIÓN DE SEROGRUPOS DE LP ENTRE LR1 VS LR2



Gráfica 11: Describe los % de prevalencia de las muestras de LP de las Torres de enfriamiento en base a los Serogrupos después del proceso de L+D.

Evaluar los procesos de mantenimiento hacia la torre de enfriamiento, incluyendo el programa de Limpieza + Desinfección (L+D) entre ambas estaciones seca (LR2) y lluviosa (LR1)) podemos definir los siguiente en base a la eficiencia del proceso:

- 26.0%: I++= Serogrupo sin cambio en ambos muestreos (LR1 Positiva y LR2 Positiva).
- 10.0%: D-+= Serogrupo con cambios. (LR1 Negativo y LR2 Positivo)
- 4.0%: D+-= Serogrupo con cambios. (LR1 Positivo y LR2 Negativo)
- 9.0%: D++(S2-15 a S1) = Serogrupo con cambios ambos muestreo positivo (LP S2-15 a LP S1)
- 32.0%: I--= Serogrupo sin cambios en ambos muestreos (LR1 Negativo y LR2 Negativo)
- 19.0%: Son 10 muestras que dieron negativo para LP y no requerían evaluación del serogrupo.

#### 5.4 Comparación de resultados de *Legionella pneumophila* con laboratorios de referencia:

Tabla 18: Comparación de resultados de muestras positivas aisladas de los muestreos de Torre de Enfriamiento enviados al El Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública (LCRSP).

CODIGO DE LA INSTALACION	FECHA DE ANÁLISIS	SEROGRUPO LP EXPERT-LAB	LCRSP LP	TIPO DE AGUA	MATRIZ
M5	17-Jun-19	LP S2-15	LP (PCR)	DUCHA	AP
	17-Jun-19	LP S1	LP (PCR)	AGUA DE GRIFO-HAB	AP
M3	19-Jun-19	LP S2-15	LP (PCR)	CALDERA	AP
M2	24-Jun-19	LP S2-15	LP (PCR)	TANQUE DE RESERVA	AP
	24-Jun-19	LP S2-15	LP (PCR)	DUCHA	AP
M24	2/8/2019	LP S2-15	LP (PCR)	BARCO	AP
M24	2/8/2019	LP S2-15	LP (PCR)	BARCO	AP
M3	4/16/2019	LP S1	LP (PCR)	Torre de Enfriamiento #2	ANP
M6	4/24/2019	LP S1	LP (PCR)	Torre de Enfriamiento #4	ANP
		LP S1	LP (PCR)	Torre de Enfriamiento #1	ANP
M10	4/30/2019	LP S1	LP (PCR)	Torre de Enfriamiento #2	ANP
M12	5/9/2019	LP S2-15	LP (PCR)	Torre de Enfriamiento # 3	ANP
		LP S2-15	LP (PCR)	Torre de Enfriamiento # 5	ANP
		LP S2-15	LP (PCR)	Torre de Enfriamiento # 6	ANP
M14	5/20/2019	LP S1	LP (PCR)	Torre de Enfriamiento #1	ANP
M15	5/16/2019	LP S2-15	LP (PCR)	Torre de Enfriamiento #1	ANP
M16	5/29/2019	LP S1	LP (PCR)	Torre de Enfriamiento #2	ANP
M16	5/29/2019	LP S2-15	LP (PCR)	Torre de Enfriamiento #4	ANP
M17	5/29/2019	LP S1	LP (PCR)	Torre de Enfriamiento #3	ANP
<b>N=19</b>	<b>RESULTADOS</b>		<b>100 %</b>	<b>T=12 (100%)-ANP</b>	

LP: *Legionella pneumophila* PCR: Polymerase Chain Reaction AP: Agua potable ANP: Agua no potable. T: Torre de enfriamiento.



Gráfica 12: Comparación de resultados obtenidos entre el Proyecto LP vs LCRSP

Para establecer una correlación de los resultados obtenidos en base a otros métodos aprobado internacionalmente para la detección de *Legionella pneumophila* se envió al Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública (LCRSP) de Panamá del Instituto Commemorativo Gorgas de Estudios de la Salud un total de las 19 muestras para la detección de *Legionella pneumophila* mediante la técnica de PCR-PF. Las matrices enviadas se dividen de la siguiente forma: 7 muestra de agua potable (agua de tanque de reserva, agua de ducha de habitación, agua de grifo de habitación, agua de tanque de resera- Barco y agua de caldera) y 12 muestras de agua de torre de enfriamiento (agua no potable). Los resultados confirman la correlación al 100% de las cepas aislada de *L. pneumophila en ambas matrices (agua potable y agua no potable)* de sistema de detección y enumeración de Legiolert a través de la utilización de placas de Agar BCYE+ cisteína+ suplemento GVPC.

Tabla 19: Comparación de resultados de muestras positivas aisladas de los muestreos de Torre de Enfriamiento enviados al Laboratorio externo de EMLab&PK

CODIGO DE LA INSTALACION	DESIGNACION DE LA TORRES DE ENFRIAMIENTO	FECHA DE ANÁLISIS	SEROGRUPO LP EXPERT-LAB	EMLab&PK LP	TIPO DE AGUA	MATRIZ
M16 (3023)	T #4(EHOP1)	29/05/2019	LP S2-15	LP S5	TORRE DE ENFRIAMIENTO	ANP
M3 (3055)	T#5(E05)	29/05/2019	LP S2-15	LP S5	TORRE DE ENFRIAMIENTO	ANP
M5 (3438)	T#2(H4)	6/17/2019	LP S1	LP S1	TORRE DE ENFRIAMIENTO	ANP
M2 (3674)	AGUA POTABLE	24/06/2019	LP S2-15	LP S5	TANQUE DE RESERVA	AP
M2 (3675)	AGUA POTABLE	24/06/2019	LP S2-15	LP S5	DUCHA	AP
<b>N=5</b>		<b>RESULTADOS</b>		<b>100 %</b>	<b>T=3 (100%)-ANP</b>	

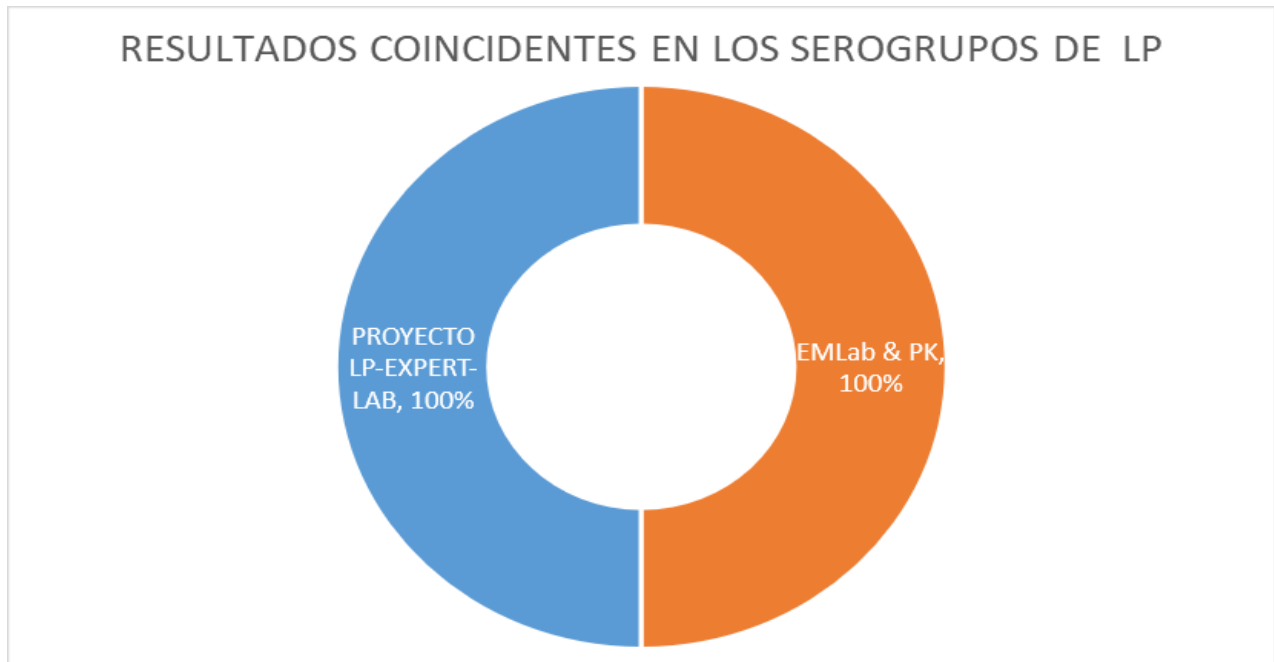
LP: *Legionella pneumophila* PCR: Polymerase Chain Reaction AP: Agua potable ANP: Agua no potable. T: Torre de enfriamiento.

#### QUANTITATIVE LEGIONELLA REPORT

Location:	3023		3055		3438		3674		3675	
Comments (see below)	A		B		A		A		A	
Lab ID-Version†:	11645793-1		11645803-1		11645804-1		11645805-1		11645806-1	
Analysis Date:	07/31/2020		07/31/2020		07/31/2020		07/31/2020		07/31/2020	
Sample type	Swab sample		Swab sample		Swab sample		Swab sample		Swab sample	
Volume filtered (ml)	N/A		N/A		N/A		N/A		N/A	
Reporting Units	1 swab		1 swab		1 swab		1 swab		1 swab	
Detection Limit†	< 100		< 100		< 100		< 100		< 100	
Analytical Sensitivity†	< 2,000		< 2,000		< 2,000		< 2,000		< 2,000	
	raw ct.	cfu*/unit	raw ct.	cfu*/unit	raw ct.	cfu*/unit	raw ct.	cfu*/unit	raw ct.	cfu*/unit
<i>L. pneumophila</i> serotype 1					500	1,000,000				
<i>L. pneumophila</i> serotype 5	500	1,000,000	210	420,000			500	1,000,000	500	1,000,000
Other Legionella species										
<b>§TOTAL Legionella</b>	<b>500</b>	<b>1,000,000</b>	<b>210</b>	<b>420,000</b>	<b>500</b>	<b>1,000,000</b>	<b>500</b>	<b>1,000,000</b>	<b>500</b>	<b>1,000,000</b>

\*cfu = colony forming units ND = none detected  
 Comments: A) Out of holding time - method deviation. Enumeration greater than 500 cfu/plate was observed but cannot be accurately reported. B) Out of holding time - method deviation.

Fuente: Resultado de Laboratorio EMLab &PK (ANEXO 15)



Gráfica 13: Comparación de resultados obtenidos entre el Proyecto LP vs EMLAB & PK.

Para establecer una correlación de los resultados obtenidos en base a otros métodos aprobado internacionalmente para la detección de *Legionella pneumophila* se envió también al Laboratorio Eurofins- EMLAB P&K. de Estados Unidos un total de las 5 muestras para la detección de *Legionella pneumophila* y clasificación del serogrupo mediante la técnica de PCR Tiempo real y Método de ISO 11731-2 Y CDC. Las matrices enviadas se dividen de la siguiente forma: 2 muestra de agua potable (agua de tanque de reserva Y agua de ducha de habitación) y 3 muestras de agua de torre de enfriamiento (agua no potable). Los resultados confirmas la correlación al 100% de las cepas aislada de *L. pneumophila en ambas matrices (agua potable y agua no potable)* de sistema de detección y enumeración de Legiolert a través de la utilización de placas de Agar BCYE+ cisteína+ suplemento GVPC.

#### **5.5 Evaluación de resultados de análisis fisicoquímicos de agua de las torres de enfriamiento:**

Los análisis fisicoquímicos del agua muestreada en las balsas de las torres de enfriamiento nos pueden dar indicios de las condiciones que puede favorecer la proliferación del microorganismo *Legionella pneumophila*, al igual de condiciones que puede permitir el control de su crecimiento y promover su erradicación de una manera constante:

Tabla 20: Resultados de análisis de los ensayos de análisis Físicoquímicos de las Torres de Enfriamiento muestreados en la Estación lluviosa (LR1):

CODIGO DE LA INSTALACIÓN	CLASIFICACIÓN POR ACTIVIDAD ECONOMICA	DESIGNACION DE LA TORRES DE ENFRIAMIENTO	T°C	Cl <sup>†</sup>	CL <sup>L</sup>	BR	NTU	Fe	pH	Cond uS/cm	Resultado DE UFC/mL
			M1	EO1	Torre de Enfriamiento #2	28,0	0	0,10	<1,3	0,30	0,2
		Torre de Enfriamiento #1	28,7	0,05	0	<1,3	0,27	0	8,78	1884	32,4
M2	H1	Torre de Enfriamiento	30,0	0,16	0,04	<1,3	0,46	0,2	8,39	1001	<0,2
M3	H2	Torre de Enfriamiento #1	28,6	0,09	0,03	<1,3	0,48	0	8,59	619	2,6
		Torre de Enfriamiento #2	28,6	0,12	0,0	<1,3	0,52	0,4	8,57	635	10,4
M4	H3	Torre de Enfriamiento #1	26,6	0,05	0	<1,3	3,35	0,2	8,75	782	>738,0
		Torre de Enfriamiento #2	28,0	0,03	0	<1,3	3,27	0	8,74	820	>738,0
M5	H4	Torre de Enfriamiento #2	28,0	0	0,10	<1,3	0,30	0,2	8,77	1956	90
		Torre de Enfriamiento #1	28,7	0,05	0	<1,3	0,27	0	8,78	1884	108,0
M6	H5	Torre de Enfriamiento #4	33,4	0,25	0	<1,3	0,38	0	8,5	363	>738,0
		Torre de Enfriamiento #1	28,0	0,04	0,01	<1,3	0,40	0	8,5	360	>738,0
M7	H6	Torre de Enfriamiento #1	27,5	3,5	2,17	>11,0	6,06	0	8,72	826	372
M8	EO2	Torre de Enfriamiento #1	28,3	0,08	0	<1,3	1,22	0,4	8,31	1247	>738,0
		Torre de Enfriamiento #2	27,5	0	0	<1,3	1,14	0,4	8,32	1333	>738,0
		Torre de Enfriamiento #3	26,4	0,02	0,06	<1,3	1,09	0,4	8,27	1294	>738,0
M9	EO3	Torre de enfriamiento #1	30,3	0,31	0,03	<1,3	1,27	0,2	8,77	872	
M10	H7	Torre de Enfriamiento #1	28,9	0,02	0	<1,3	0,73	0	8,96	1374	>738,0
		Torre de Enfriamiento #2	27,7	0,00	0	<1,3	0,62	0	8,97	1377	>738,0
M11	H8	Torre de enfriamiento #1	29,4	0,04	0,01	<1,3	0,42	0	8,62	326	414
		Torre de enfriamiento #2	30,4	0,04	0,01	<1,3	0,29	0	8,52	314	355
		Torre de enfriamiento # 3	26,9	0,0	0,0	<1,3	1,17	0	8,84	1170	470
M12	EO4	torre de enfriamiento # 5	27,5	0,0	0,0	<1,3	2,37	0	8,90	1226	7380
		Torre de enfriamiento # 6	29,0	0,10	0,0	<1,3	0,75	0	8,88	1130	5550
M13	EFPA1	Torre de enfriamiento #1	27,5	0	0	<1,3	2,1	0	8,4	293	5550
M14	H9	Torre de enfriamiento #1	26,8	0,04	0	<1,3	0,57	0	8,57	626	2878
		Torre de enfriamiento #2	26,3	0	0	<1,3	0,41	0	8,58	590	1950
M15	H10	Torre de enfriamiento #1	28,2	0,12	0,02	<1,3	3,09	0	8,75	728	2660
		Torre de enfriamiento #2	28,8	0,08	0	<1,3	2,95	0	8,75	710	2990
M16	EHOP1	Torre de enfriamiento #1	28,6	0,05	0,04	<1,3	0,25	0,2	8,75	922	680
		Torre de enfriamiento #2	28,4	0,06	0	<1,3	0,36	0	8,77	1091	300
		Torre de enfriamiento #3	30,5	0,12	0,04	<1,3	0,14	0	8,79	904	590
		Torre de enfriamiento #4	28,7	0,09	0	<1,3	0,14	0	8,8	932	350
M17	EO5	Torre de enfriamiento #2	29,5	0,13	0,16	<1,3	0,5	0	8,8	212	3390
		Torre de enfriamiento #3	31,5	0,2	0,09	<1,3	0,54	0	8,74	722	1200
		Torre de enfriamiento #4	30,2	0,2	0	<1,3	0,28	0	8,92	1869	830
		Torre de enfriamiento #5	30,3	0,14	0,08	<1,3	0,31	0	8,62	1631	1280
M9	EO3	Torre de enfriamiento #2	31,5	0,2	0,09	<1,3	0,54	0	8,74	722	108
M18	EO6	Torre de enfriamiento #1	28,7	0,09	0	<1,3	0,14	0	8,8	932	2820
		Torre de enfriamiento #2	31,7	0,06	0	<1,3	2,49	0	8,3	904	2570
		Torre de enfriamiento #3	28,7	0,09	0	<1,3	0,14	0	8,8	932	3110
M19	EFPA2	Torre de enfriamiento #1	29,3	0,06	0	<1,3	0,56	0	8,3	902	146
		Torre de enfriamiento #1	30,5	0,06	0,02	<1,3	1,29	0	8,7	946	8
M20	EO7	Torre de enfriamiento #2	28,5	0,1	0	<1,3	1,32	0	8,4	865	440
		Torre de enfriamiento #3	28,4	0,06	0	<1,3	1,27	0	8,8	569	276
		Torre de enfriamiento #4	29,3	0,09	0	<1,3	0,65	0	8,3	589	202
		Torre de enfriamiento #1	30,1	0,1	0	<1,3	0,34	0	8,9	834	195
M21	H11	Torre de enfriamiento #2	29,5	0,09	0	<1,3	1,32	0	8,6	845	1770
		Torre de enfriamiento #3	29,9	0,4	0	<1,3	1,27	0	8,3	857	1890
		Torre de enfriamiento #4	29,5	0,12	0	<1,3	0,78	0	8,5	867	1510
M22	H12	Torre de enfriamiento #1	33,0	0,09	0	<1,3	0,66	0	8,7	789	2870
		Torre de enfriamiento #1	28,2	0,5	<0,04	6,57	7,47	0,01	6,42	388	161
M23	EO8	Torre de enfriamiento #2	32	0,6	<0,04	7,3	8,2	0,01	6,45	416,5	209
		Torre de enfriamiento #3	31,3	0,62	<0,04	7,43	8,49	0,01	6,59	420,5	108

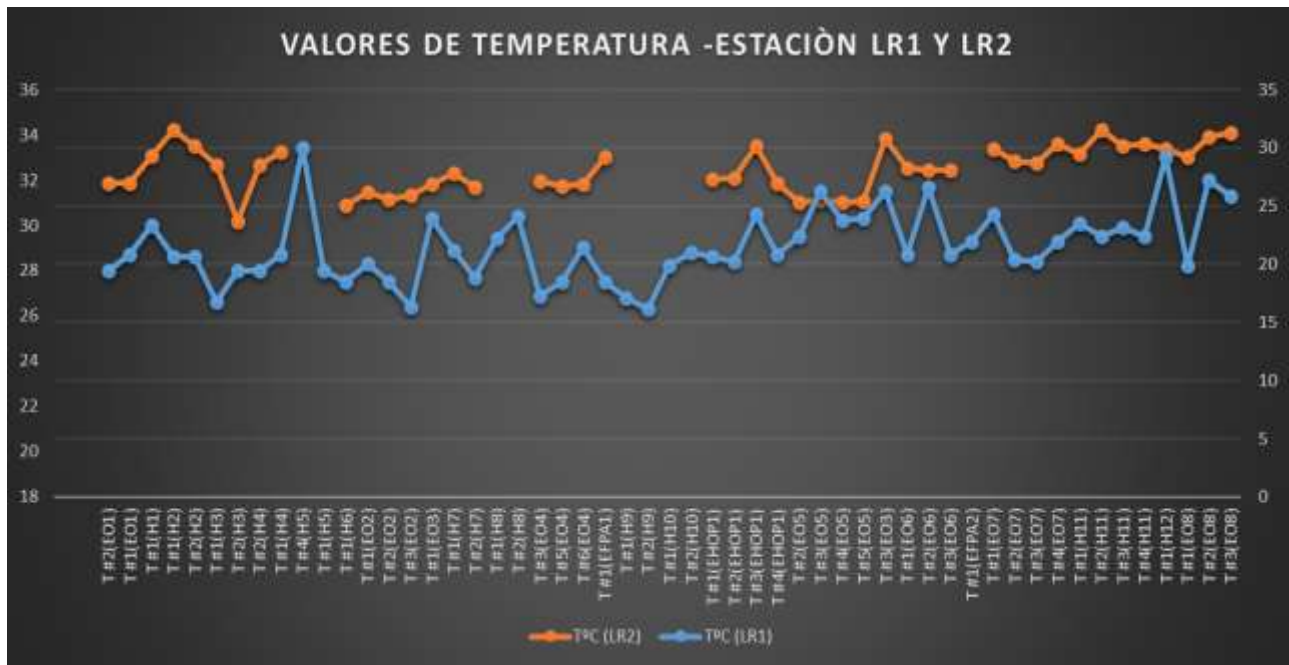
Tabla 21: Resultados de análisis de los ensayos de análisis Físicoquímicos de las Torres de Enfriamiento muestreados en la Estación seca (LR2):

CODIGO DE LA INSTALACIÓN	CLASIFICACIÓN POR ACTIVIDAD ECONOMICA	DESIGNACIÓN DE LA TORRES DE ENFRIAMIENTO	T°C	Cl <sup>-</sup>	CL <sup>-</sup>	BR	NTU	Fe	pH	Cond uS/cm	Resultado DE UFC/mL
			M1	EO1	Torre de Enfriamiento #2	27	0.23	0.09	<1.3	1.86	0
		Torre de Enfriamiento #1	27	0.09	0.01	<1.3	1.75	0	8.5	620	7380
M2	H1	Torre de Enfriamiento	29.3	0.05	0.02	<1.3	1.75	0	8.4	1375	7380
		Torre de Enfriamiento #1	31.5	0.2	0.09	<1.3	0.54	0	8.74	722	1200
M3	H2	Torre de Enfriamiento #2	302	0.2	0.09	<1.3	0.6	0	8.54	756	1280
		Torre de Enfriamiento #1	28.5	<0.03	<0.03	<0.2	1.66	0	8.86	1089	231
M4	H3	Torre de Enfriamiento #2	23.7	0.18	<0.03	<1.3	1.54	0.2	8.66	516	>73800
		Torre de Enfriamiento #2	28.5	0.06	0.13	<1.3	1.03	0	8.2	512	80
M5	H4	Torre de Enfriamiento #1	29.6	0.1	0.09	<1.3	1.24	0	8.2	502	350
		Torre de Enfriamiento #4									
M6	H5	Torre de Enfriamiento #1									
		Torre de Enfriamiento #1	25.1	0.14	0.05	<1.3	1.07	0.2	8.56	461	507
		Torre de Enfriamiento #1	26.2	<0.03	<0.03	<1.3	0.55	0	8.38	1294	355
M8	EO2	Torre de Enfriamiento #2	25.6	<0.03	<0.03	<1.3	0.32	0	8.32	1156	530
		Torre de Enfriamiento #3	25.9	<0.03	<0.03	<1.3	0.43	0	8.45	1233	800
M9	EO3	Torre de enfriamiento #1	26.9	<0.03	<0.03	<1.3	0.49	0.2	8.73	903	59.0
		Torre de Enfriamiento #1	27.8	<0.03	<0.03	<1.3	2.42	0	8.67	635	1000
M10	H7	Torre de Enfriamiento #2	26.6	<0.03	<0.03	<1.3	2.53	0	8.79	604	1200
		Torre de enfriamiento #1									
M11	H8	Torre de enfriamiento #2									
		Torre de enfriamiento #3	27.1	0.24	0.1	<1.3	0.48	0.4	8.78	890	5900
M12	EO4	torre de enfriamiento # 5	26.7	0.23	0.07	<1.3	0.49	0.2	8.88	924	6500
		Torre de enfriamiento # 6	26.9	<0.03	<0.03	<1.3	0.48	0.2	8.82	903	10400
M13	FFPA1	Torre de enfriamiento #1	29.2	0.05	<0.03	<1.3	1.31	0.04	8.06	198.7	0.4
		Torre de enfriamiento #1									
M14	H9	Torre de enfriamiento #2									
		Torre de enfriamiento #1									
M15	H10	Torre de enfriamiento #2									
		Torre de enfriamiento #1	27.3	<0.03	<0.03	<1.3	6.83	0.2	8.49	1487	83
		Torre de enfriamiento #2	27.4	<0.03	<0.03	<1.3	1.49	0.2	8.37	1456	128
M16	EHOP1	Torre de enfriamiento #3	30.2	<0.03	<0.03	<1.3	1.91	0.2	8.5	1466	77
		Torre de enfriamiento #4	27	<0.03	<0.03	<1.3	0.5	0.2	8.44	1433	555
		Torre de enfriamiento #2	25.3	0.13	0.16	<1.3	0.81	0	8.6	596	800
M17	EO5	Torre de enfriamiento #3	25.5	<0.03	<0.03	<1.3	0.32	0	8.52	380	161
		Torre de enfriamiento #4	25.3	<0.03	<0.03	<1.3	0.86	0	8.89	1749	3800
		Torre de enfriamiento #5	25.4	<0.03	<0.03	<1.3	0.81	0	8.64	468	257
M9	EO3	Torre de enfriamiento #2	30.8	0.3	0.12	<1.3	0.78	0	8.56	799	128
		Torre de enfriamiento #1	28.3	0.02	0	<1.3	0.25	0	8.5	461	4140
M18	EO6	Torre de enfriamiento #2	28.1	0.02	0	<1.3	0.66	0	8.2	592	2480
		Torre de enfriamiento #3	28.1	0.1	0	<1.3	0.33	0	8.5	363	1660
		Torre de enfriamiento #1									
M19	FFPA2	Torre de enfriamiento #1	29.9	0.06	0.02	<1.3	1.32	0	8.9	932	80
		Torre de enfriamiento #2	28.9	0.1	<0.03	<1.3	1.31	0	8.3	893	470
M20	EO7	Torre de enfriamiento #3	28.7	0.06	<0.03	<1.3	1.2	0	9.1	589	392
		Torre de enfriamiento #4	30.3	0.08	<0.03	<1.3	0.85	0	8.5	623	248
		Torre de enfriamiento #1	29.5	0.13	0.16	<1.3	0.5	0	8.8	512	3390
M21	H11	Torre de enfriamiento #2	31.5	0.2	0.09	<1.3	0.54	0	8.74	790	1200
		Torre de enfriamiento #3	30.2	0.2	0	<1.3	0.28	0	8.92	820	830
		Torre de enfriamiento #4	30.3	0.14	0.08	<1.3	0.31	0	8.62	920	1280
M22	H12	Torre de enfriamiento #1	29.9	0.06	0.02	<1.3	1.32	0	8.9	932	555
		Torre de enfriamiento #1	29.2	0.8	<0.04	6.57	7.97	0.01	6.65	432	209
M23	EO8	Torre de enfriamiento #2	30.9	0.7	<0.04	7.3	8.3	0.01	6.67	452	324
		Torre de enfriamiento #3	31.3	0.64	<0.04	7.43	8.19	0.01	6.87	453	161

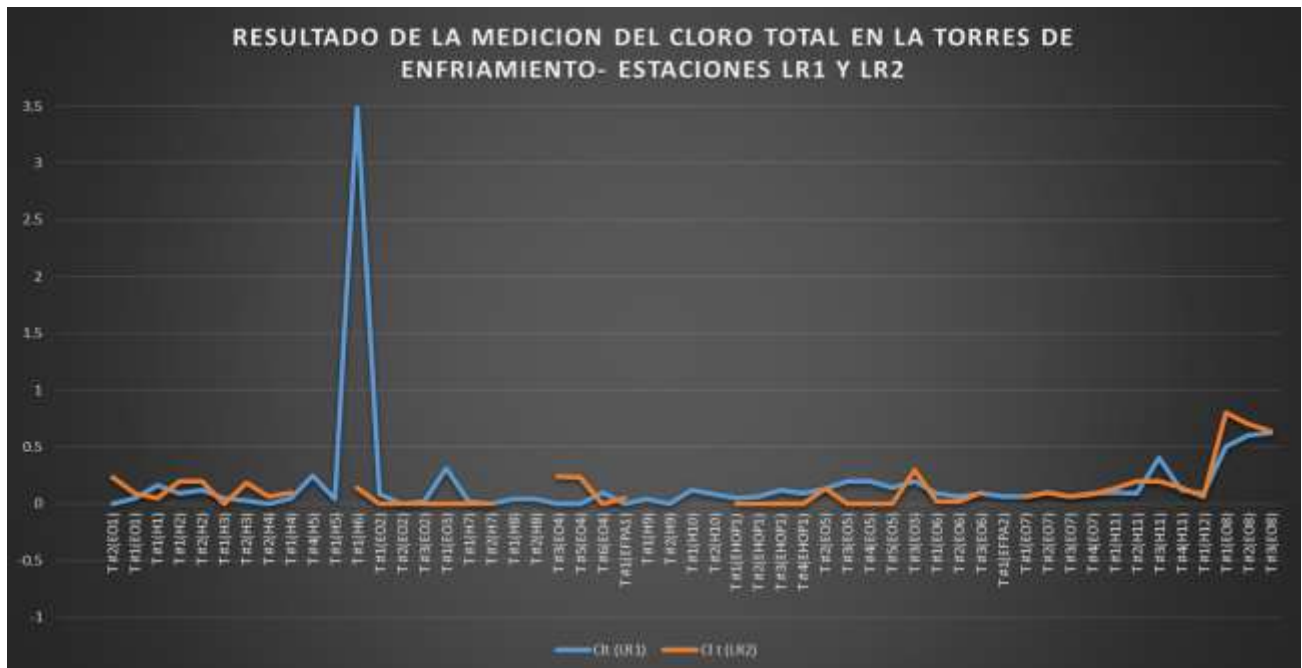
Tabla 22: Resultados de análisis de los ensayos de análisis Físicoquímicos de las Torres de Enfriamiento muestreados en la Estación seca (LR2) y Estación lluviosa (LR1):

CODIGO DE LA INSTALACIÓN	CLASIFICACIÓN POR ACTIVIDAD ECONOMICA	DESIGNACIÓN DE LA TORRES DE ENFRIAMIENTO	T°C (LR1)	T°C (LR2)	Cl <sup>1</sup> (LR1)	Cl <sup>1</sup> (LR2)	CL <sup>L</sup> (LR1)	CL <sup>L</sup> (LR2)	BR (LR1)	BR (LR2)	NTU (LR1)	NTU (LR2)	Fe (LR1)	Fe (LR1)	pH (LR1)	pH (LR2)	Cond uS/cm (LR1)	Cond uS/cm (LR2)	Resultado DE UFC/mL (LR1)	Resultado DE UFC/mL (LR2)
M1	EO1	T #2(E01)	28,0	27	0	0.23	0,10	0,09	<1,3	<1,3	0,30	1,86	0,2	0	8,77	8,7	1333	723	37,2	5070
		T #1(E01)	28,7	27	0,05	0,09	0	0,01	<1,3	<1,3	0,27	1,75	0	0	8,78	8,5	1884	620	32,4	7380
M2	H1	T #1(H1)	30,0	29,3	0,16	0,05	0,04	0,02	<1,3	<1,3	0,46	1,75	0,2	0	8,39	8,4	1001	1375	<0,2	7380
		T #1(H2)	28,6	31,5	0,09	0,2	0,03	0,09	<1,3	<1,3	0,48	0,54	0	0	8,59	8,74	619	722	2,6	1200
M3	H2	T #2(H2)	28,6	30,2	0,12	0,2	0,0	0,09	<1,3	<1,3	0,52	0,6	0,4	0	8,57	8,54	635	756	10,4	1280
		T #1(H3)	26,6	28,5	0,05	<0,03	0	<0,03	<1,3	<0,2	3,35	1,66	0,2	0	8,75	8,86	782	1089	>738	231
M4	H3	T #2(H3)	28,0	23,7	0,03	0,18	0	<0,03	<1,3	<1,3	3,27	1,54	0	0,2	8,74	8,66	820	516	>738	>73800
		T #2(H4)	28,0	28,5	0	0,06	0,10	0,13	<1,3	<1,3	0,30	1,03	0,2	0	8,77	8,2	1956	512	90	80
M5	H4	T #1(H4)	28,7	29,6	0,05	0,1	0	0,09	<1,3	<1,3	0,27	1,24	0	0	8,78	8,2	1884	502	108,0	350
		T #4(H5)	33,4		0,25		0		<1,3		0,38		0		8,5				>738,0	
M6	H5	T #1(H5)	28,0		0,04		0,01		<1,3		0,40		0		8,5				>738,0	
		T #1(H6)	27,5	25,1	3,5	0,14	2,17	0,05	>11,0	<1,3	6,06	1,07	0	0,2	8,72	8,56	826	461	372	507
M8	EO2	T #1(E02)	28,3	26,2	0,08	<0,03	0	<0,03	<1,3	<1,3	1,22	0,55	0,4	0	8,31	8,38	1247	1294	>738,0	355
		T #2(E02)	27,5	25,6	0	<0,03	0	<0,03	<1,3	<1,3	1,14	0,32	0,4	0	8,32	8,32	1333	1156	>738,0	530
		T #3(E02)	26,4	25,9	0,02	<0,03	0,06	<0,03	<1,3	<1,3	1,09	0,43	0,4	0	8,27	8,45	1294	1233	>738,0	800
M9	EO3	T #1(E03)	30,3	26,9	0,31	<0,03	0,03	<0,03	<1,3	<1,3	1,27	0,49	0,2	0,2	8,77	8,73	872	903	59,0	59,0
M10	H7	T #1(H7)	28,9	27,8	0,02	<0,03	0	<0,03	<1,3	<1,3	0,73	2,42	0	0	8,96	8,67	1374	635	>738,0	1000
		T #2(H7)	27,7	26,6	0,00	<0,03	0	<0,03	<1,3	<1,3	0,62	2,53	0	0	8,97	8,79	1377	604	>738,0	1200
M11	H8	T #1(H8)	29,4		0,04		0,01		<1,3		0,42		0		8,62				414	
		T #2(H8)	30,4		0,04		0,01		<1,3		0,29		0		8,52				355	
		T #3(E04)	26,9	27,1	0,0	0,24	0,0	0,1	<1,3	<1,3	1,17	0,48	0	0,4	8,84	8,78	1170	890	470	5900
M12	EO4	T #5(E04)	27,5	26,7	0,0	0,23	0,0	0,07	<1,3	<1,3	2,37	0,49	0	0,2	8,90	8,88	1226	924	7380	6500
		T #6(E04)	29,0	26,9	0,10	<0,03	0,0	<0,03	<1,3	<1,3	0,75	0,48	0	0,2	8,88	8,82	1130	903	5550	10400
		T #1(EFPA1)	27,5	29,2	0	0,05	0	<0,03	<1,3	<1,3	2,1	1,31	0	0,04	8,4	8,06	293	198,7	5550	0,4
M13	EFPA1	T #1(H9)	26,8		0,04		0		<1,3		0,57		0		8,57				626	2878
		T #2(H9)	26,3		0		0		<1,3		0,41		0		8,58				590	1950
M14	H9	T #1(H10)	28,2		0,12		0,02		<1,3		3,09		0		8,75				728	2660
		T #2(H10)	28,8		0,08		0		<1,3		2,95		0		8,75				710	2990
M15	H10	T #1(EHOP1)	28,6	27,3	0,05	<0,03	0,04	<0,03	<1,3	<1,3	0,25	6,83	0,2	0,2	8,75	8,49	922	1487	680	83
		T #2(EHOP1)	28,4	27,4	0,06	<0,03	0	<0,03	<1,3	<1,3	0,36	1,49	0	0,2	8,77	8,37	1091	1456	300	128
		T #3(EHOP1)	30,5	30,2	0,12	<0,03	0,04	<0,03	<1,3	<1,3	0,14	1,91	0	0,2	8,79	8,5	904	1466	590	77
		T #4(EHOP1)	28,7	27	0,09	<0,03	0	<0,03	<1,3	<1,3	0,14	0,5	0	0,2	8,8	8,44	932	1433	350	555
M16	EHOP1	T #2(E05)	29,5	25,3	0,13	0,13	0,16	0,16	<1,3	<1,3	0,5	0,81	0	0	8,8	8,6	212	596	3390	800
		T #3(E05)	31,5	25,5	0,2	<0,03	0,09	<0,03	<1,3	<1,3	0,54	0,32	0	0	8,74	8,52	722	380	1200	161
		T #4(E05)	30,2	25,3	0,2	<0,03	0	<0,03	<1,3	<1,3	0,28	0,86	0	0	8,92	8,89	1869	1749	830	3800
		T #5(E05)	30,3	25,4	0,14	<0,03	0,08	<0,03	<1,3	<1,3	0,31	0,81	0	0	8,62	8,64	1631	468	1280	257
		T #3(E03)	31,5	30,8	0,2	0,3	0,09	0,12	<1,3	<1,3	0,54	0,78	0	0	8,74	8,56	722	799	108	128
M9	EO3	T #1(E06)	28,7	28,3	0,09	0,02	0	0	<1,3	<1,3	0,14	0,25	0	0	8,8	8,5	932	461	2820	4140
		T #2(E06)	31,7	28,1	0,06	0,02	0	0	<1,3	<1,3	2,49	0,66	0	0	8,3	8,2	904	592	2570	2480
M18	EO6	T #3(E06)	28,7	28,1	0,09	0,1	0	0	<1,3	<1,3	0,14	0,33	0	0	8,8	8,5	932	363	3110	1660
		T #1(EFPA2)	29,3		0,06		0		<1,3		0,56		0		8,3				146	
M19	EFPA2	T #1(E07)	30,5	29,9	0,06	0,06	0,02	0,02	<1,3	<1,3	1,29	1,32	0	0	8,7	8,9	946	932	8	80
		T #2(E07)	28,5	28,9	0,1	0,1	0	<0,03	<1,3	<1,3	1,32	1,31	0	0	8,4	8,3	865	893	440	470
		T #3(E07)	28,4	28,7	0,06	0,06	0	<0,03	<1,3	<1,3	1,27	1,2	0	0	8,8	9,1	569	589	276	392
		T #4(E07)	29,3	30,3	0,09	0,08	0	<0,03	<1,3	<1,3	0,65	0,85	0	0	8,3	8,5	589	623	202	248
M20	EO7	T #1(H11)	30,1	29,5	0,1	0,13	0	0,16	<1,3	<1,3	0,34	0,5	0	0	8,9	8,8	834	512	195	3390
		T #2(H11)	29,5	31,5	0,09	0,2	0	0,09	<1,3	<1,3	1,32	0,54	0	0	8,6	8,74	845	790	1770	1200
		T #3(H11)	29,9	30,2	0,4	0,2	0	0	<1,3	<1,3	1,27	0,28	0	0	8,3	8,92	857	820	1890	830
		T #4(H11)	29,5	30,3	0,12	0,14	0	0,08	<1,3	<1,3	0,78	0,31	0	0	8,5	8,62	867	920	1510	1280
M21	H11	T #1(H12)	33,0	29,9	0,09	0,06	0	0,02	<1,3	<1,3	0,66	1,32	0	0	8,7	8,9	789	932	2870	555
		T #1(E08)	28,2	29,2	0,5	0,8	<0,04	<0,04	6,57	6,57	7,47	7,97	0,01	0,01	6,42	6,65	388	432	161	209
M22	H12	T #2(E08)	32	30,9	0,6	0,7	<0,04	<0,04	7,3	7,3	8,2	8,3	0,01	0,01	6,45	6,67	416,5	452	209	324
		T #3(E08)	31,3	31,3	0,62	0,64	<0,04	<0,04	7,43	7,43	8,49	8,19	0,01	0,01	6,59	6,87	420,5	453	108	161

Nota: Los espacios en azul son los clientes que en la estación seca (LR2)

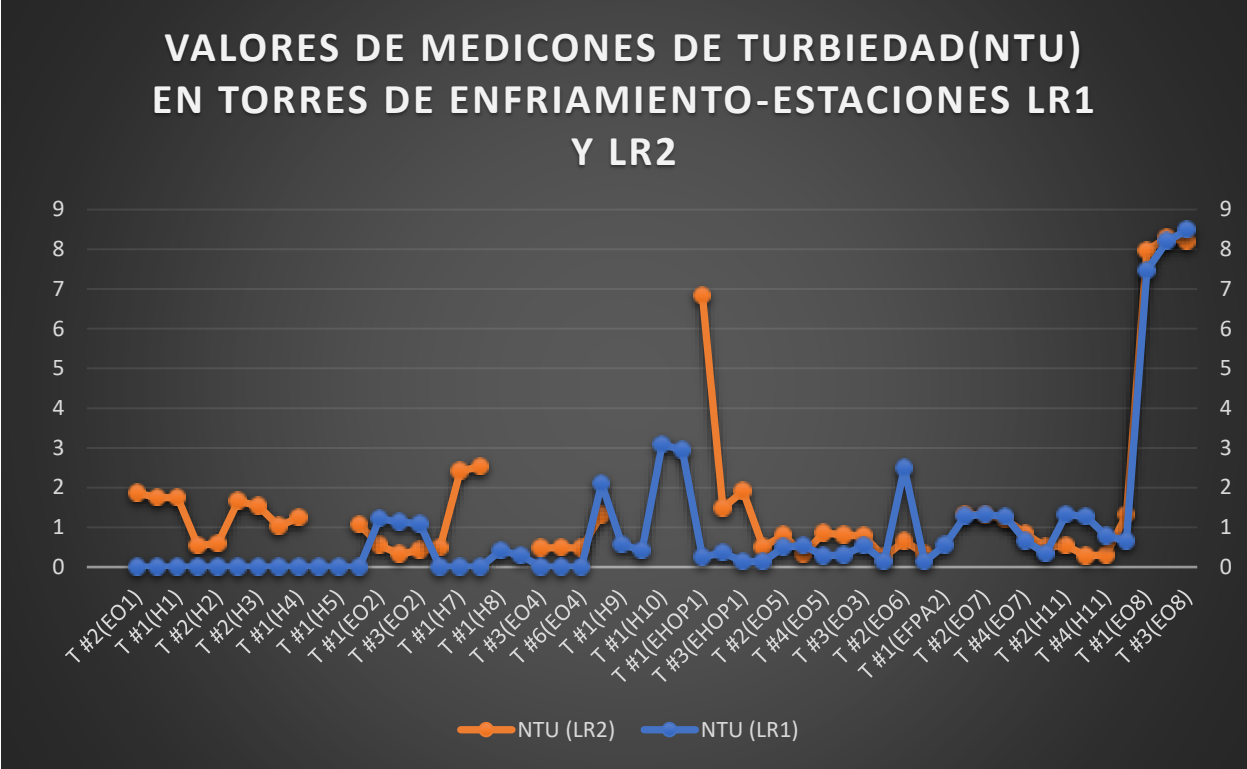


Gráfica 14: Describe los valores de temperatura (°C) para los muestreos realizados en las torres de enfriamiento en la estación seca (LR1) y lluviosa (LR2).

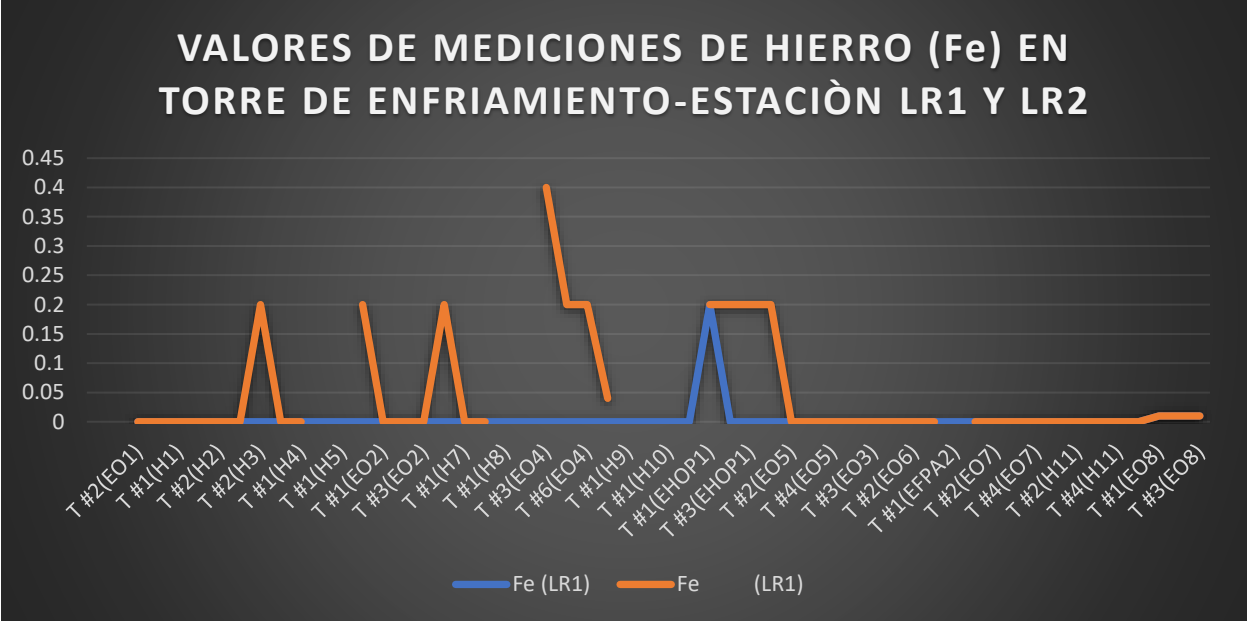


Gráfica 15: Describe los valores de Cloro total (ppm) para los muestreos realizados en las torres de enfriamiento en la estación seca (LR1) y lluviosa (LR2).

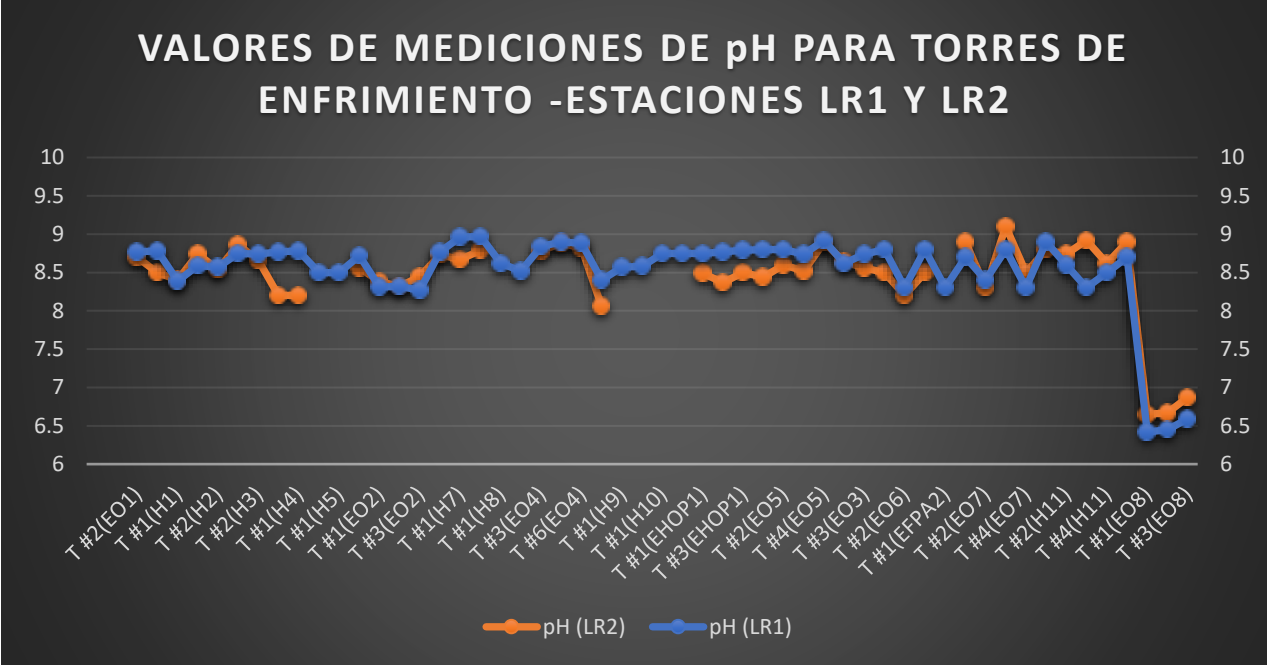




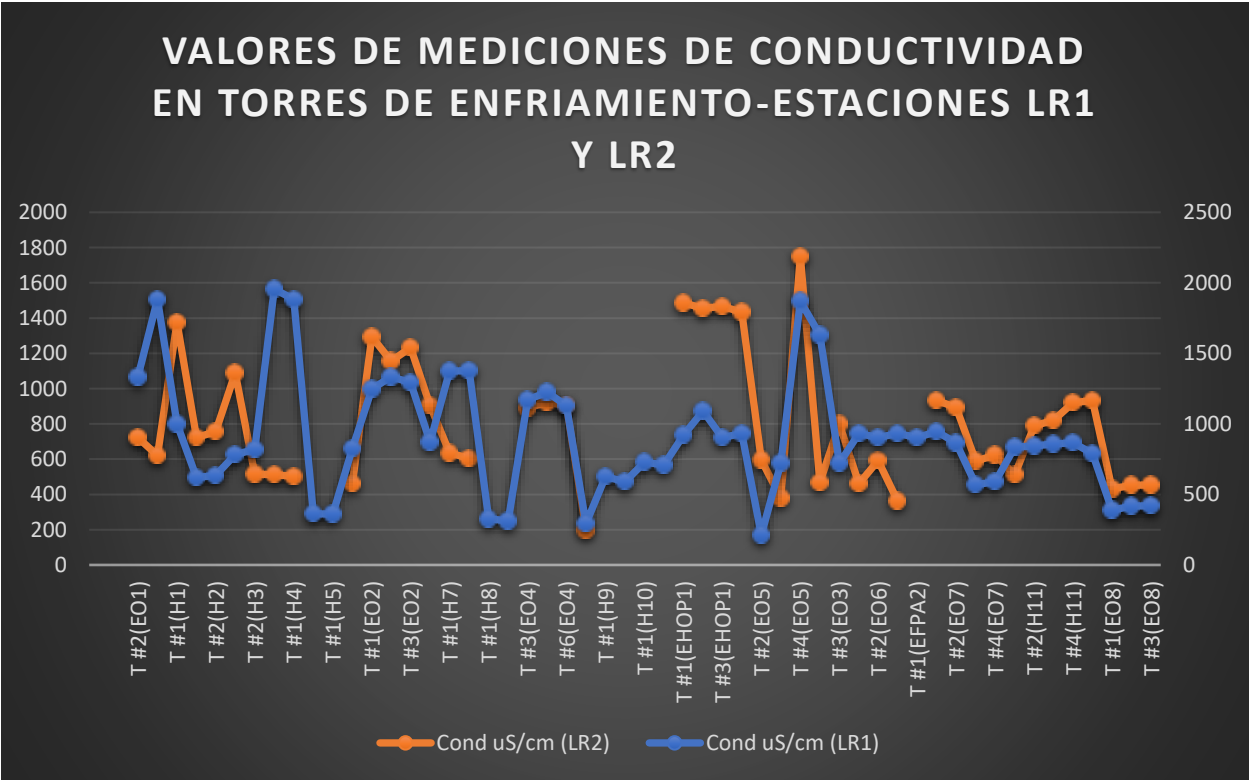
Gráfica 18: Describe los valores de Turbiedad (NTU) para los muestreos realizados en las torres de enfriamiento en la estación seca (LR1) y lluviosa (LR2).



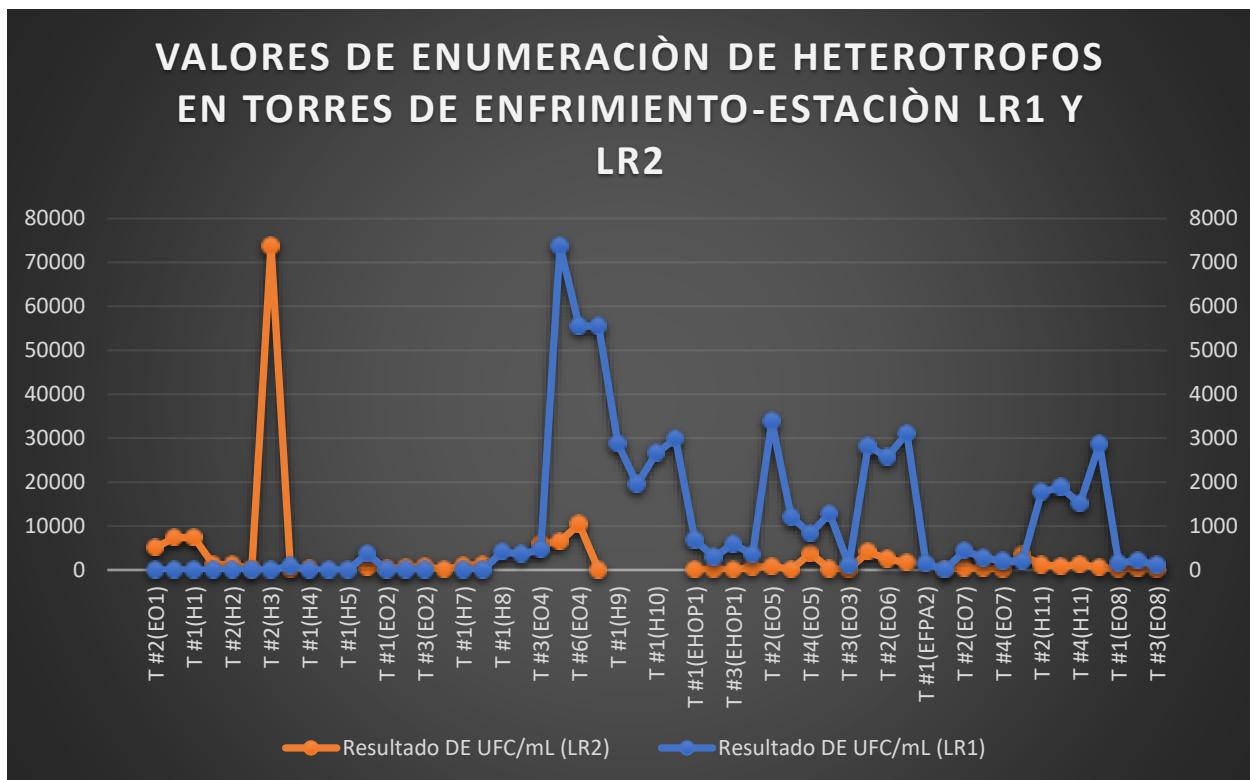
Gráfica 19: Describe los valores de Hierro (ppm) para los muestreos realizados en las torres de enfriamiento en la estación seca (PR1) y lluviosa (PR2).



Gráfica 20: Describe los valores de pH para los muestreos realizados en las torres de enfriamiento en la estación seca (LR1) y lluviosa (LR2).



Gráfica 21: Describe los valores de Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) para los muestreos realizados en las torres de enfriamiento en la estación seca (PR1) y lluviosa (PR2).



Gráfica 22: Describe los valores de recuento de heterótrofos (HPC) para los muestreos realizados en las torres de enfriamiento en la estación seca (PR1) y lluviosa (PR2).

Tabla 23: Resumen del promedio de los resultados obtenidos de las muestras colectadas en las dos estaciones: LR1 y LR2.

Parámetros Analizados en las Torres de Enfriamiento	T°C LR1	T°C LR2	Cl <sup>t</sup> (LR1)	Cl <sup>t</sup> (LR2)	Cl <sup>l</sup> (LR1)	Cl <sup>l</sup> (LR2)	BR (LR1)	BR (LR2)	NTU (LR1)	NTU (LR2)
<b>Resultados</b>	29.5	27.5	0.18	0.19	0.02	0.06	<1.3*	<1.3*	1.51	1.59
<b>LMP</b>	25-45	20-45	N/E	N/E	≤2	≤2	N/E	N/E	<15	<15
Parámetros Analizados en las Torres de Enfriamiento	Fe (LR1)	Fe (LR1)	pH (LR1)	pH (LR2)	Cond uS/cm (LR1)	Cond uS/cm (LR2)	Resultado de HPC UFC/mL (LR1)	Resultado de HPC UFC/mL (LR2)		
<b>Resultados</b>	0.0052	0.0512	8.44	8.46	908.2	809.4	1558	1712		
<b>LMP</b>	<2	<2	6.5-9.5	6.5-9.5	<2000	<2000	<100 000	<100 000		

LMP= Límite máximo permisible, T= Temperatura, Cl<sup>t</sup>=Cloro Total , Cl<sup>l</sup>= Cloro residual libre, Br: Bromo (mg/L) , NTU: Turbiedad (Unidades Nefelométricas) Solo un cliente presento Biocida en base a bromo dando resultados promedios en LR1=0.71 y LR2= 0.78. N/E: No especificado, Fe= Hierro, Cond= Conductividad eléctrica, HPC= Recuento de Heterótrofos.

### **5.5.1 Evaluación de los resultados de análisis Físicoquímicos:**

La clave en la disminución de la prevalencia de *Legionella* en las aguas de las torres de enfriamiento (balsa donde se recolecta la muestra) en la aplicación correcta de un tratamiento de desinfección residual aplicando la utilización de un biocida adecuado y el cumplimiento de las condiciones físicoquímicas adecuadas para el funcionamiento eficiente de la torre de enfriamiento. De las 53 muestras de LR1 y 45 muestras de LR2 podemos determinar los siguientes valores promedio de los análisis físicoquímicos evaluados:

#### **5.5.1.1 Evaluación de la temperatura (°C) en las torres de enfriamiento:**

Las torres de enfriamiento se mantienen en un rango promedio 29.1°C (LR1) con un rango de lectura de 26.3 °C-33.4°C y 28.2 °C (LR2) con un rango de 23.7 °C y 31.5 °C. Evaluando el rango de crecimiento de *Legionella pneumophila* de 25 a 45°C, la misma está en una temperatura óptima para la proliferación de *Legionella*. Según la CTI (Cooling Technology Institute) especifica que las condiciones de adecuadas para el crecimiento de *Legionella* es a temperatura de 20 °C-45 °C, al igual que la presencia de lodos, escala, moho, algas, otra materia orgánica y biofilms en el depósitos o balsa de la torres de enfriamiento promueven las fuente de nutrientes para el crecimiento de *Legionella* (WTB-148, 2008). Describe el programa de gestión del agua para reducir *Legionella* -Crecimiento y propagación en edificios (CDC, 2017), en climas cálidos, el agua en tuberías que normalmente transportan agua fría puede alcanzar una temperatura que permita el crecimiento de *Legionella*. El desinfectante residual detectable agregado por su proveedor de agua ayuda a limitar el crecimiento de *Legionella* y otros gérmenes. Además, las fuentes decorativas con iluminación sumergida y dispositivos como torres de enfriamiento y máquinas de hielo pueden contener áreas donde el agua fría se puede calentar a temperaturas que permitan el crecimiento de *Legionella*.

### 5.5.1.2 Evaluación del cloro residual libre (Cl<sup>L</sup>), Bromo (Br) y pH en las torres de enfriamiento

En el caso del cloro residual libre (Cl<sup>L</sup>) las torres de enfriamiento se mantienen en un rango promedio 0.06 ppm (LR1) con un rango de lectura de <0.04 a 2.17 ppm(mg/L) y 0.04 ppm (LR2) con un rango de lectura de <0.03 a 0.16 ppm (mg/L). Evaluando el valor mínimo que se solicita de cloro residual libre (biocida) para evitar el crecimiento y proliferación de *L. pneumophila* es de >2 ppm. Casi todas las muestras, exceptuando las que utilizaron como biocida el bromo, presentaron en un

En el caso de bromo (Br) en las torres de enfriamiento se mantienen en un rango promedio <1.3 ppm (LR1) y <1.3 ppm (LR2). Evaluando el valor mínimo que se solicita de bromo (biocida) para evitar el crecimiento y proliferación de *L. pneumophila* es de >2 ppm. Solo una instalación utilizada desinfectante a partir de Br es el M23 (T #1(EO8), T #2(EO8) y T #3(EO8)) la misma presentaron un valor en ppm: 6.65 a 6.87. Esta Torres de enfriamiento no presentaron resultados positivos de LP tanto en la estación lluviosa (LR1) como seca (LR2).

En el caso del parámetro pH es la clave del proceso de desinfección de las torres de enfriamiento, utilizar un cloro residual libre como agente desinfectante es importante que maneje un pH ideal cercano a pH7 para mejorar la eficiencia en el control de *Legionella pneumophila*. En el caso de las muestras tomadas en LR1 (pH promedio de 8.44) y LR2 (pH promedio de 8.46) dieron resultados alto del pH cercano a Límite máximo permitido (rango de 6.5 a 9.5). Es importante resaltar que las muestras que utilizan bromo en vez de cloro residual libre, es importante el pH para este 8 a 9. Evaluando los resultados de las muestras muestreadas en la estación lluviosa como la estación seca todas las muestras de agua de las torres de enfriamiento presentaron valores dentro de los límites de 6.5 a 9.5 de pH. Casi un 93.4 % de las muestras presentaron valores de pH entre 8 a 9. Según la UNE 10030:2017, en su anexo G (Ver ANEXO 18) especifica que cuando el pH =7.0, aproximadamente el 75% del cloro libre está en forma de ácido hipocloroso, con un buen efecto de desinfección, mientras que el pH=8.0 solamente el 20% del cloro libre está en forma de ácido hipocloroso, con una capacidad de desinfección muy reducida. Si el pH del agua es superior

a 8 se debe usar elevadas dosis de cloro con un importante riesgo de que se formen derivados de clorados. Así pues, en todos sistemas de desinfección continuo, basado en hipoclorito sódico es necesario disponer, además, de un control y una regulación automática del valor de cloro, y en ocasiones también del pH.

Según la CTI (Cooling Technology Institute) especifica la eficacia del cloro libre residual esta en función del pH del agua. Los valores normativos para el cloro residual libre se dan para un pH neutro (alrededor de 7). La acción biocida en los procedimientos de desinfección está influenciada por el valor del pH del agua; es máxima para valores de pH 7 ó menores (pero no debe bajarse de 6,5 por los efectos corrosivos en aguas ácidas) y la eficacia desinfectante decrece notablemente cuando se eleva el pH, por lo que se debe procurar no rebasar valores de pH 8. Para mantener las propiedades desinfectantes, tal como se eleva el valor pH se requiere un significativo aumento de la concentración de cloro libre residual aplicando un factor de corrección (Ver ANEXO 18 ), Cambios actuales en la calidad del agua que pueden conducir a *Legionella* crecimiento (como niveles bajos de cloro) (CDC, 2017). La eficacia de cualquiera de los halógenos disminuye al aumentar el pH; el bromo es relativamente más efectivo a un pH más alto (8.5 a 9.0). Un halógeno como cloro y bromo debe ser utilizados con un biodispersante / biodetergente puede ayudar en la penetración, eliminación y dispersión de la biofilms y, a menudo, aumenta la eficacia del biocida.

Según la ASHRE (La Sociedad Estadounidense de Ingenieros de Calefacción, Refrigeración y Aire Acondicionado) el cloro es el desinfectante más conocido. Se ha utilizado ampliamente para desinfectar sistemas de agua, torres de enfriamiento y otras instalaciones de agua. Se aplica en tratamientos de choque o continuos, siguiendo las recomendaciones de diferentes guías. Sin embargo, se ha demostrado la falta de efectividad de la hipercloración al intentar eliminar por completo la *Legionella* de las instalaciones, y varios autores han informado que la recolonización de los sistemas hiperclorados puede tener lugar en semanas o meses. Para sistemas relativamente limpios o donde se usa agua potable limpia, alimente una fuente de halógeno (cloro o bromo) continuamente y mantenga un residuo libre. Muchas agencias han recomendado residuos libres continuos de 0.5 a 1.0 ppm (como C12) en el agua de retorno caliente de la torre de enfriamiento.

Es necesario un control periódico de los residuos en los puntos de muestreo en todo el sistema de agua de refrigeración para asegurar una distribución adecuada.

#### **5.5.1.3 Evaluación de la turbiedad (NTU (unidades nefelométricas de formacina)), Hierro (Fe) y Conductividad (uS/cm) en las torres de enfriamiento**

Para los parámetros de Turbiedad (NTU), Hierro (Fe. mg/L o ppm) y Conductividad (uS/cm) los valores reportados cumplen dentro de los Límites máximos permisibles. Turbiedad posee un rango de 1.51 NTU (LR1) y 1.59 NTU (LR2) donde nos especifican que su límite máximo sea <15 NTU. El Hierro posee un rango de 0.0052 mg/L (LR1) y 0.0512 mg/L (LR2) donde nos especifican que su límite máximo sea <2 mg/L. La conductividad posee un rango de 908.2 uS/cm (LR1) y 809.4 uS/cm (LR2) donde nos especifican que su límite máximo sea <2000 uS/cm. Todas las muestras cumplieron los Límites máximos permisibles de Turbiedad, Hierro y Conductividad.

#### **5.5.1.4 Evaluación del recuento de heterótrofos en las torres de enfriamiento**

Evaluando los resultados de heterótrofos (HPC) en las aguas de las 53 torres de enfriamiento podemos obtener valores promedios por las dos estaciones: en la estación lluviosa se mostró un rango de conteo entre <0.2 NMP/mL a 5500 NMP/mL con un valor promedio de 1 550 NMP/mL. En el caso de la estación seca los rangos están entre 0.4 NMP/ml a 73 800 NMP/mL con un valor promedio de 1 712 NMP/mL. Ambos valores de conteo obtenidos en ambas estaciones no supera lo establecidos en la norma UNE 100030:2017/BOE 865/2003 >100 000 NMP o UFC/mL. Es importante resultar los heterótrofos como un proceso de verificación del tratamiento de L+D en las aguas de las torres de enfriamiento, pero no es un indicado indirecto de la detección/ no detección de *Legionella pneumophila*.

*Según el* (Sanchez, Luis., 2016)\_ tener pocas colonias de bacterias heterótrofas, no significa no tener cantidades altas de *Legionellas*. La determinación mensual de presencia-ausencia de *Legionella* en instalaciones de riesgo es una recomendación adecuada, que permite establecer medidas correctoras antes de que los problemas surjan.

Se deben establecer medidas y límites de control para cada punto de control. Deberá monitorear para asegurarse de que sus medidas de control estén funcionando según lo diseñado. Los límites de control, en los que se debe mantener un parámetro químico o físico, deben incluir un valor mínimo y un valor máximo. Ejemplos de medidas y límites de control químico y físico para reducir el riesgo de crecimiento de *Legionella*. La calidad del agua debe medirse en todo el sistema para garantizar que los cambios que puedan conducir a *Legionella* no se produce crecimiento (como una caída en los niveles de cloro). Los desinfectantes y otros niveles químicos en torres de enfriamiento deben mantenerse continuamente y monitorearse regularmente. Se deben limpiar las superficies con cualquier biopelícula visible (es decir, limo) (CDC, 2017)

Las reglas requieren la creación de planes de mantenimiento para las Torres de enfriamiento con monitoreo de rutina de la calidad del agua (pH, biocida residual y conductividad), recuentos semanales de placas heterótrofas, inspecciones semanales del equipo por parte del personal de mantenimiento y cultivo de *Legionella* al menos cada 90 días durante los períodos operativos de Torres de enfriamiento. Sobre la base del monitoreo y los resultados de la muestra, se deben realizar acciones correctivas mínimas específicas para controlar el riesgo de amplificación de *Legionella*. (WTB-148, 2008)

### 5.6 Comparación de Métodos de Legiolert vs el método tradicional SM 9260J en base ISO 13483:

Se evaluará a partir de 53 muestras de torres de enfriamiento (agua no potable) usando los datos de la estación LR1 (30 muestras positivas y 23 muestras negativas). Los conteos de *Legionella pneumophila* fue de 1100 NMP/mL a 1 572500 NMP/mL por el métodos de Legiolert . Se aplico procesos controlados de temperaturas de incubación según los instructivos: 37 °C y 39°C (En el caso de Legiolert), y 35°C (En el caso de SM 9260J). Muestras positivas fueron 30 para *Legionella pneumophila* y muestras negativas fueron 23, la muestra se seleccionaron 2 pocillos de la charola Legiolert o 2 colonias BCYE del método tradicional del SM 9260J, para su verificación. La confirmación se realizó pasado a placas de BCYE con cisteína y Trypticase Soya Agar. Posterior se realizó las pruebas de serogrupos para reconfirmar que las muestras son positivas para *Legionella pneumophila* usando el Kit de Microgen *Legionella*.

- Cantidad de pocillos o colonias presuntos positivas confirmadas= 30x 2= 60
- Cantidad de pocillos o colonias presuntos negativas confirmadas= 23x 2= 46

Tabla 24: Verificación de Método en base a la Norma ISO 13483. Comparación de resultados de Legiolert vs SM 9260J:

Comparación de Métodos de Legiolert vs el método tradicional SM 9260J		Valor Método B: Método Legiolert		
		Muestras +	Muestras -	Total de pruebas Verificadas
<b>Valor Método A: Referencia SM 9260J-<i>Legionella</i></b>	Muestras +	58	1	59
	Muestras -	2	45	47

Tabla 25: Resultados de la verificación de método en base a la Norma ISO 13483

Parámetros	Resultados	Resultados(%)
Sensibilidad	0.966666667	96.66666667
Especificidad	0.957446809	95.74468085
Selectividad	0.547169811	54.7169811
Falso positivo	0.033333333	3.333333333
Falso negativo	0.02173913	2.173913043
Eficiencia	0.97	97.16981132

Nota: Muestra los resultados obtenidos a través de las fórmulas expresas en el punto 4.8 (ver Ilustración 32) y tomar los datos de la Verificación de Método en base a la Norma ISO 13483. Comparación de resultados de Legiolert vs SM 9260J:Tabla 24

Tabla 26: Comparación de datos obtenidos de la prueba de Validación de método de Legiolert por e distribuidor IDEXX Laboratorio en un total de mayor de > 1000 resultados.

Parámetros	Resultados(%)- Estudio	Resultados(%)-Estudio IDEXX Laboratories - Validación de Legiolert
Sensibilidad	96.6 %	98%
Especificidad	95.7 %	>99%
Selectividad	54.7 %	66%
Falso positivo	3.33 %	<1%
Falso negativo	2.2 %	4.2%
Eficiencia	97.2 %	>99%

Nota: Comparación de los resultados de la validación primaria del Legiolert por IDEXX Laboratorios, muestras resultados similares, solo incrementando el número de muestras descrito

en el protocolo usado por IDEXX Laboratories contribuiría a la mejora de los resultados plasmados (Ver (IDEXX-LABORATORIES, 2019).

## **Comparación de Métodos de Legiolert vs el método tradicional SM 9260J en base ISO 17094**

### **Comparación de Presencia/Ausencia de *Legionella pneumophila*.**

Para la evaluación estadística de los resultados P/A precisan dos sumas:

nA= Es el número de muestras en las que el Método A (SM 9260J) es positivo y el Método B (Legiolert) negativo.

nB=Es el número de muestras en las que el Método A es negativo (SM9260J) y el Método B (Legiolert) es positivo

La evaluación de los métodos P/A se basa en el índice de dispersión de Poisson,  $X^2$ , (otras alternativas adecuadas son el ensayo de McNemar y el ensayos o pruebas de los signos). El valor del índice viene dado por:

$$X^2 = \frac{(n_A - n_B)^2}{(n_A + n_B)} = 0.333 \quad X^2 \leq 4$$

Nota: tomar los valores obtenido en la Tabla 24

Ahora, usando el enfoque (equivalente) del valor p, se encuentra que el valor p asociado a esta estadística de prueba esperado= $\Pr(\chi^2 > 0.333) = 0.5637$ . Dado que  $p = 0.5637 \geq \alpha = 0$ , Concluimos que la hipótesis nula no se rechaza. Así, la hipótesis nula no existe diferencia entre los métodos evaluados entre ambos métodos y se rechaza la hipótesis alternativa que existe diferencia entre los métodos evaluados.

## 6. CONCLUSIÒN

- Los datos obtenidos en este estudio demuestran la detección y enumeración del microorganismo *Legionella pneumophila* por el método Legiolert en agua de las torres de enfriamientos de las instalaciones muestreadas dentro del área metropolitana de la ciudad de Panamá. Evaluando de manera individual las dos estaciones muestreadas podemos definirlo lo siguiente: en la estación lluviosa (muestreo efectuado entre marzo hasta diciembre del 2019) se demostró una prevalencia de muestras positivas o detectados para *Legionella pneumophila* en un 56.6% (es decir, de las 53 muestras analizadas, 30 dieron resultados positivos) y un 44.4% mostraron resultados negativos o no detectados. (es decir, de las 53 muestras analizadas 23 dieron resultados negativos). En el caso de la estación seca (muestreo efectuado entre enero a febrero del 2020) se demostró una prevalencia de muestras positivas o detectados para *Legionella pneumophila* en un 51.1% (es decir, de las 45 muestras analizadas, 23 dieron resultados positivos) y un 49.9% mostraron resultados negativos o no detectados. (es decir, de las 45 muestras analizadas 22 dieron resultados negativos). Evaluando las diferencias de la prevalencia de *Legionella pneumophila* entre estaciones, solo hubo una disminución del 5.5% entre la estación lluviosa y estación seca. Estos los resultados obtenidos no demuestran una clara evidencia de una diferencia significativa entre las estaciones muestreadas.
- Revisando los resultados a nivel de enumeración de *Legionella pneumohila* se mantiene con el mismo porcentaje antes mencionados en muestras positivas, ya que los conteos obtenidos presentaron valores fuera del límite máximo permitidos (LMP) según las normas referencia descrita UNE 100030:2017/BOE 865/2003 >1000 NMP o UFC/L. Durante el muestreo de la estación lluviosa se presento valores de 1100 hasta 1 109 700 NMP/L y en estación sea se presentó valores de 1100 hasta 361 000 NMP/L.
- Caracterización de los resultados positivos de cada estación (seca y lluviosa) mediante la utilización de la prueba de aglutinación Latex (MicroKit *Legionella*) contribuyen a determinar la prevalencia de los serogrupos encontrados. En la estación lluviosa de las 30 muestras positivas para *L. pneumophila* se obtuvo un 73.3% de *L.pneumohila* serogrupo S1 y un 26.7% de serogrupo S2-S15. En el caso de la muestra tomadas en la estación seca de las 23 muestras positivas para *L. pneumophila* se obtuvo un 91.3% de *L.pneumohila*

serogrupo S1 y un 8.69% de serogrupo S2-S15, siendo el serogrupo de mayor prevalencia en las torres de enfriamiento el S1 en las dos estaciones muestreadas.

- La confirmación de los resultados de la detección del patógenos de *L. pneumophila* por otro método (PCR) se confirmó en un 100% en base a las muestras enviadas al Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES)-Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública, en donde 12 muestras aisladas fueron confirmadas en su totalidad como muestras positivas para *L. pneumophila*. Al igual la utilización de un laboratorio de referencia internacional (Eurofins- EMLab P&K) aprobado por la CDC (Centers for Disease Control and Prevention) y acreditado bajo la Norma ISO/IEC 17025 en el parámetro de *L.pneumophila* confirma en un 100% que las muestras enviadas a su laboratorio son *L. pneumophila* y la clasificación del serogrupos reportados contrastan con los resultados obtenidos con el MicroKit *Legionella* en un 100% ( un (1) muestras de *L. pneumophila* S1 y cuatro (4) muestras de *L.pneumohila* S2-S15). El método usado por Eurofins- EMLab P&K es PCR y protocolo de la ISO 11731 “Calidad del agua. Recuento de *Legionella* (LP)”.
  - Evaluar los procesos de mantenimiento hacia la torre de enfriamiento, incluyendo el programa de Limpieza + Desinfección (L+D) entre ambas estaciones (seca (LR2) y lluviosa (LR1)) podemos definir los siguiente en base a la eficiencia del proceso:
    - 15.09%: Disminución de LP en tanto % (Rango Mínimo: -12.5% a Rango Máximo: -626.6%) entre la estación LR1 y LR2.
    - 37.73%: Resultados de LP se mantiene estables, es decir por debajo de <1000 NMP/L en ambas estaciones LR1 y LR2.
    - 9.43%: Disminución de LP en un 100% a partir de una muestra positiva detectada en LR1 y no detectada en el LR2.
    - 22.64 %: Incremento de LP en tanto % (Rango Mínimo: +16.2% a Rango Máximo: +680.8%) entre la estación LR1 y LR2.
    - 15.09%: Muestra no autorizada por el cliente. No se muestreo nuevamente con respecto al LR1.

- Evaluando los resultados de heterótrofos (HPC) en las aguas de las 53 torres de enfriamiento podemos obtener valores promedios por las dos estaciones: en la estación lluviosa se mostró un rango de conteo entre <0.2 NMP/mL a 5500 NMP/mL con un valor promedio de 1 550 NMP/mL. En el caso de la estación seca los rangos están entre 0.4 NMP/ml a 73 800 NMP/mL con un valor promedio de 1 712 NMP/mL. Ambos valores de conteo obtenidos en ambas estaciones no supera lo establecidos en la norma UNE 100030:2017/BOE 865/2003 >100 000 NMP o UFC/mL. Es importante resultar los heterótrofos como un proceso de verificación del tratamiento de L+D en las aguas de las torres de enfriamiento, pero no es un indicado indirecto de la detección/ no detección de *Legionella pneumophila*.
- La clave en la disminución de la prevalencia de *Legionella* en las aguas de las torres de enfriamiento (balsa donde se recolecta la muestra) en la aplicación correcta de un tratamiento de desinfección residual aplicando la utilización de un biocida adecuando y el cumplimiento de las condiciones fisicoquímicas adecuadas para el funcionamiento eficiente de la torre de enfriamiento. De las 53 muestras de LR1 y 45 muestras de LR2 podemos determinar los siguientes valores promedio de los análisis fisicoquímicos evaluados:
  - Temperatura (°C): Las torres de enfriamiento se mantiene en un rango promedio 29.1°C (LR1) y 28.2°C (LR2). Evaluando el rango de crecimiento de *Legionella pneumophila* de 25 a 45°C, la misma está en una temperatura adecuada para su multiplicación.
  - Cloro residual libre (Cl<sup>L</sup>); Las torres de enfriamiento se mantiene en un rango promedio 0.06 ppm (LR1) y 0.04 ppm (LR2). Evaluando el valor mínimo que se solicita de cloro residual libre para evitar el crecimiento y proliferación de *L. pneumophila* es de 2 ppm.
  - Bromo (Br): Solo una instalación utilizada desinfectante a partir de Br es el M23 (T #1(E08), T #2(E08) y T #3(E08)) la misma presentaron un valor en ppm: 6.65 a 6.87. Esta Torres de enfriamiento no presentaron resultados positivos de LP tanto en la estación lluviosa (LR1) como seca (LR2).

- Para los parámetros de Turbiedad (NTU), Hierro (Fe. mg/L o ppm) y Conductividad (uS/cm) los valores reportados cumplen dentro de los Límites máximos permisibles. Turbiedad posee un rango de 1.51 NTU (LR1) y 1.59 NTU (LR2) donde nos especifican que su límite máximo sea <10 NTU. El Hierro posee un rango de 0.0052 mg/L (LR1) y 0.0512 mg/L (LR2) donde nos especifican que su límite máximo sea <2 mg/L. La conductividad posee un rango de 908.2 uS/cm (LR1) y 809.4 uS/cm (LR2) donde nos especifican que su límite máximo sea <2000 uS/cm.
- En el caso del parámetro pH es la clave del proceso de desinfección de las torres de enfriamiento, utilizar un cloro residual libre como agente desinfectante es importante que maneje un pH ideal cercano a pH7 para mejorar la eficiencia en el control de *Legionella pneumophila*. En el caso de las muestras tomadas en LR1 (pH= 8.44) y LR2 (pH 8.46) dieron resultados alto del pH cercano a Límite máximo permitido (rango de 6.5 a 9.5). Es importante resaltar que las muestras que utilizan bromo en vez de cloro residual libre, es importante el pH para este 8 a9.
- La comparación de los resultados obtenidos para la detección de Legiolert vs método tradicional de Standards methods (SM) 9260J podemos detallar lo siguiente:
  - Verificación del método Legiolert a través de la aplicación de la norma ISO/TR 13483: 2000 a partir de muestra naturalmente contaminadas obtuvo los siguientes resultados: Sensibilidad (96.6%), Especificidad (95.7%) Selectividad (54.7%), Falso positivo (3.3%), Falso negativo (2.2%) y Eficiencia (97.2 %) obtenidos valores cercano al estudio de validación del Legiolert, solo para incrementar o disminuir el % de unos parámetros es ideal que el numero de muestras aumente de resultados positivos y negativos para obtener un nivel estadístico más adecuado.
  - Comparación de los métodos Legiolert y SM 9260 J se determinó a través de la evaluación de los métodos P/A, se determinó el índice de dispersión de Poisson ( $X^2$ ), (ò el cálculo por el ensayo de McNemar). El valor del índice dado en la  $X^2=0.333$ , siendo aceptado la dispersión de Poisson mostrando un límite aceptable de  $X^2 < 4$ . En el cálculo por el ensayo de McNewar usando el enfoque (equivalente)

del valor p, se encuentra que el valor p asociado a esta estadística de prueba esperado= $\Pr(\chi^2 > 0.333) = 0.5637$ . Dado que  $p = 0.5637 \geq \alpha = 0$ , Concluimos que la hipótesis nula no se rechaza. Así, la hipótesis nula no existe diferencia entre los métodos evaluados entre ambos métodos y se rechaza la hipótesis alternativa que existe diferencia entre los métodos evaluados.

- Sensibilizar a los encargados de realizar el mantenimiento preventivo de las torres de enfriamientos de las instalaciones muestreadas, ha sido un proceso largo de Enseñanza-Aprendizaje de ambas partes, estableciendo recomendaciones definidas en las guías internacionales como son las: UNE 100030, BOE 365/2003, ASHRAE y otras referencias para el establecer los protocolos de Limpieza y desinfección (L+D) correcto paso a paso. Es importante resaltar que muchas instalaciones realizaron acciones correctivas encaminadas a evitar la proliferación y la disminución de riesgo de una contaminación por aerosilización de *Legionella pneumophila* en las torres de enfriamiento. Muchas instalaciones como muestran los resultados obtuvieron resultados satisfactorios, pero otros porcentajes de las instalaciones no mostraron resultados adecuados. La interacción en el Laboratorio- la Instalación y el proveedor de Limpieza y Desinfección(L+D) son claves para lograr resultados adecuados en el proceso. La sensibilización en realizar controles de manera rutinaria y L+D es la clave para evitar la proliferación de la *Legionella pneumophila*. Este proyecto empezó con las inscripciones de 23 instalaciones en el primer muestreo (LR1) y 19 instalaciones en el segundo muestreo (LR2). Las cuatros (4) instalaciones del ultimo muestreo que no se realizaron, se omitieron de efectuar el análisis descrito en el proyecto, logrando una sensibilización en la importancia de hacer los controles de *L.pneumophila* en torres de enfriamiento en un 82.6% .

- Es importante tener en cuenta que *Legionella* puede estar presente en el agua sin causar enfermedad. El riesgo de la enfermedad después de la exposición depende de muchos factores, además de la presencia de *Legionella*, incluyendo virulencia de la cepa, la susceptibilidad del huésped, si la *Legionella*- agua que contiene podría ser en aerosol a un tamaño respirable como es el caso de las torres de enfriamiento, y la supervivencia del organismo en el aerosol.

# 7. RECOMENDACIONES

- Establecer mediante procesos colaborativos una mesa abierta de comunicación con las Instituciones privadas, Asociaciones, Entidades públicas de interés de cuidado de la Salud pública y otros de interés nacional en establecer guías de prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en las instalaciones. Efectuar una guía de referencia puede disminuir el riesgo de contaminación de *Legionella* en los sistemas de agua, no solo en las torres de enfriamiento sino en agua fría (ACF) y agua caliente (ACS). Panamá por ser un país de tránsito y de actividad turística a nivel mundial, debe establecer normas regulatorias o guías prácticas que puedan contribuir a definir los siguientes puntos:

  - a. Documento de notificación de torres de refrigeración y condensadores evaporativos.
  - b. Empresas certificadas para realizar la limpieza y desinfección (L+D) de las torres de enfriamiento y definir su requerimiento mínimo en el ámbito de su aplicación.
  - c. Aprobación de los biocidas aplicados para la eliminación de *Legionella*.
  - d. Establecimiento de los registros necesarios de cumplimiento por parte de las instalaciones en los sistemas de agua (ACF, ACS y torre de enfriamiento).
  - e. Definir los Límites máximos permisibles de la *Legionella spp* o *Legionella pneumophila* en los sistemas de agua.
  - d. Establecer los procedimientos que pueda definir los métodos de tratamiento adecuados para ser utilizado en la eliminación de *Legionella*.
  
- Ampliar el estudio detección y enumeración de *Legionella*, es de vital importancia para evidenciar mediante diversos tipos de fuentes del sistema de distribución agua de una instalación, la persistencia de *Legionella* se debe por ser un microorganismo que crecer niveles bajo de nutrientes, amplio rango de resistencia a temperatura y a la desinfección. Estas características mencionadas lo hacen un microorganismo apto para lograr un crecimiento latente en instalaciones que presentan deterioro en su sistema de distribución de agua internos generando posibles fuentes de reservorios potenciales focos de contaminación microbiana. Las normas de referencias internacionales como la ISO 100030, ASHRE Standard 188, OSHA, UNE- 16355, NFS y otras, define otros matrices de estudio como: a. Sistema de agua fría de consumo (AFS), Sistema de agua caliente (ACS), Sistema de agua contra incendio, Condensadores evaporativos, Fuentes ornamentales, Sistema de riego, Agua de Jacuzzi, Nebulizadores y otros. Al igual es

importante señalar que se debe establecer un proyecto de estudio dirigido a efectuar muestreo en los hospitales donde el porcentaje de personas con diversas enfermedades puede generar la muerte de manera más efectiva al contaminarse por *Legionella pneumophila*. Según la CDC resalta la importancia en los muestreos de *Legionella* a nivel hospitalario definiéndolos como factores de riesgo para la neumonía nosocomial (o neumonía hospitalaria) incluyen: intervención quirúrgica reciente, intubación (procedimiento médico utilizado para colocar un tubo en la tráquea), ventilación mecánica, aspiración, presencia de sondas nasogástricas y utilización de equipo de terapia respiratoria. Los huéspedes más expuestos son los pacientes inmunodeficientes, por ejemplo, sujetos trasplantados y enfermos de cáncer o personas que reciben tratamientos con corticoesteroides.

- Reconocer que el proceso de mantenimiento preventivo es la clave para la prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en las instalaciones. Es importante lograr alianzas estratégicas entre facultades de interés para el mantenimiento y control eficiente de las torres de enfriamiento como son las la Facultad de Ingeniería y Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología (Especialmente el área de Biología-Microbiología). Estas alianzas contribuirán a generar una dinámica de conocimiento de ambas partes, en el ingeniero comprenderá la importancia de establecer controles de calidad enfocados a los puntos críticos que se puede encontrar en sus instalaciones a través de un programa de seguridad de agua (PSA) y ambiente. En cambio, al profesional Biólogo- Microbiólogo podrá comprender como funciona las instalaciones a nivel de un sistema de distribución de agua, dando base a establecer planes de control desde el punto de vista científico en conocimiento del manejo de la dinámica del posible riesgo microbiológico que puede presentar las instalaciones. Es importante que este estudio de *Legionella* trascienda a no solo conocer la existe del microorganismo en nuestro país. Sino sirva de colaboración para emprender a proyectos en conjunto con los profesionales de ingeniería incluyendo las siguientes aristas: a. Estudios de la evaluación de eficiencia de los biocidas y biodispersantes para el tratamiento de *Legionella* en torres de enfriamiento en relación a las condiciones adecuadas de los valores fisicoquímicos del agua para lograr su máximo beneficio en la eficiencia energética de las instalaciones.

- Ampliar estudios en el tema de la protección y la multiplicación que genera el Biofilm en las torres de enfriamiento. sistema de agua de duchas (cabezales de ducha), grifos de agua caliente y fría; y aguas de jacuzzi (filtros de hidromasaje) a la *Legionella*, *ampliarían los datos informativos de la colonización en fuentes de agua. Es recomendable* la muestrear los biofilms tomar muestras por hisopo en conjunción con muestras de agua de los sitios donde biofilms son propensos a formar.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFIA

## Bibliografía

- A.M.E.S. (26 de octubre de 2016). (*ASOCIACIÓN DE MEDICOS DE SANIDAD EXTERIOR*). Obtenido de Inf. Epidemiológica- Legionelosis - Epidemiología y situación mundial: <https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/169-legionelosis-epidemiologia-y-situacion-mundial>
- AENOR-AEN/CTN 77 MEDIO AMBIENTE. (diciembre de 2004). UNE-EN ISO 17994. *Criterios para establecer la equivalencia entre métodos microbiológicos*. Madrid, España: AENOR- Asociación de Normalización Española.
- AENOR-CTN 77 MEDIO AMBIENTE. (marzo de 2018). UNE-EN ISO 13843. *Requisitos para el establecimiento de la características de funcionamiento de los métodos microbiológicos cuantitativos*. Madrid, España: Asociación Normalización de España.
- Agency for Health Protection and Promotion. (2014). Preguntas y Respuesta de Legionella. Toronto, Ontario, CANADA: ISBN978-1-4606-4764-6. [www.publichealthontario.ca](http://www.publichealthontario.ca).
- BOE-A-2003-14408. (18 de JULIO de 2003). *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*. Obtenido de Ministeria de la Presidencia-España: <https://www.boe.es/eli/es/rd/2003/07/04/865>
- Casal, Antonio Fernández. (2012). Equipos y Sistemas de evacuación de calor para instalaciones de acondicionamiento de aire y refrigeración. Capítulo 4. Torres de refrigeración y condensadores evaporativos. España: Código 5706, ISBN/EAN: 9788496709911.
- CDC. (05 de junio de 2017). Desarrollo de un programa de gestión del agua para reducir Legionella -Crecimiento y propagación en edificios. *Una Guía Práctica para implementar normas de la industria*. Estados Unidos: Versión 1.1 [www.cdc.gov/legionella/WMPtoolkit](http://www.cdc.gov/legionella/WMPtoolkit) .
- CDC. (30 de abril de 2018). *Centros para el Control y Prevención de Enfermedades*. Obtenido de Legionella (enfermedad del legionario y fiebre de Pontiac): <https://www.cdc.gov/legionella/about/history-sp.html>.
- CMS. (02 de junio de 2017). Requirement to Reduce Legionella Risk in Healthcare Facility Water Systems to Prevent Cases and Outbreaks of Legionnaires' Disease (LD). Ref: *S&C 17-30-Hospitals/CAHs/NHs*. Baltimore, Maryland 21244-1850, Center for Clinical Standards and Quality/Survey & Certification Group: DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES.

ECDC. (17 de enero de 2017). *Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades*. Obtenido de Informe de casos de Legionelosis 2017 por el ECDC: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report-2017>

EMLAB P&k. (2020). *EUROFINS*. Obtenido de EMLAB P&K LABORATORIO: <https://www.emlab.com/>

Fitzhenry et al. (2007). (Weiss, D., Cimini, D., Balter, S., Boyd, C., Alleyne, L., Stewart, R., McIntosh, N., Econome, A., Lin, Y., Rubinstein, I., Passaretti, T., Kidney, A., Lapiere, P., Kass, D., & Varma, J. K.). *Legionnaires' Disease Outbreaks and Cooling Towers, New York City, New York*,. USA: Emerging infectious diseases, 23(11), 1769–1776. <https://doi.org/10.3201/eid2311.161584>.

Garrison et al. (07 de junio de 2016). CDC-. *Informe semanal de morbilidad y mortalidad (MMWR)*. Estados Unidos, Semanal / 10 de junio de 2016/65 (22); 576 - 584: CDC.

Herrera, Jorge. (2020). *UNAM, Facultad de Química*. Obtenido de PCR Tiempo Real: <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/usaii/pcr-en-tiempo-real/>

IDEXX LABORATORIES. (2015). *IDEXX-WATER- SIMPLATE HPC- UNIT DOSIS-METODO APROBADO SM 9215 E*-. Obtenido de [https://idexxcom-live-b02da1e51e754c9cb292133b-9c56c33.aldryn-media.com/filer\\_public/3c/82/3c82d00e-44b0-4f71-8ce3-8d06627e4ba3/simplite-for-hpc-unit-dose-procedure-en.pdf](https://idexxcom-live-b02da1e51e754c9cb292133b-9c56c33.aldryn-media.com/filer_public/3c/82/3c82d00e-44b0-4f71-8ce3-8d06627e4ba3/simplite-for-hpc-unit-dose-procedure-en.pdf)

IDEXX-LABORATORIES. (JUNIO de 2019). *LEGIOLERT METHODS-Detecció de Legionella pneumophila*. Obtenido de Aprobació AFNOR IDX 33/06: <https://www.idexx.co.uk/files/legiolert-procedure-insert.pdf>

INSTRUMENTS, HANNA. (2020). Obtenido de Programa de tratamiento de agua en instalaciones de riesgo ante la LEGIONELLA: <https://www.hannainst.es/blog/1544/tratamiento-agua-riesgo-legionella>

J. Vaqué Rafart y X. Martínez Gómez. (2002). Epidemiología de la legionelosis. *Med Integral , Hospital Universitario Vall d'Hebron-Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.*, 40(6):271-81 Link: <file:///C:/Users/exper/Downloads/13038561.pdf>.

Manzanares Gaudy y Montiel Norma. (2014). Detección de Legionella pneumophila en los sistemas de agua. *Revista ADM* , 71(5):216-220. [www. Medigraphic.com/adm](http://www.Medigraphic.com/adm).

MICROGEN BIOPRODUCTS. (marzo de 2020). *GMM-153-EN, Revision-1*. Obtenido de Identification of Legionella pneumophila using Microgen Bioproducts®: [https://microgenbioproducts.com/wp-content/uploads/sites/8/2020/06/LOW-REZ-WEB-SCREEN-PDF-RGB\\_NovaCYT-Microgen-Legionella-Latex-Technical-Bulletin-138\\_SCREEN-RGB-1.pdf](https://microgenbioproducts.com/wp-content/uploads/sites/8/2020/06/LOW-REZ-WEB-SCREEN-PDF-RGB_NovaCYT-Microgen-Legionella-Latex-Technical-Bulletin-138_SCREEN-RGB-1.pdf)

NEW YORK CITY DEPARTMENT OF HEALTH AND MENTAL HYGIENE . (09 de mayo de 2016). *Notice of Adoption of Chapter 8 (Cooling Towers) of Title 24 of the Rules of the City of New York*. New York, Estados Unidos: <https://www.lawinsider.com/documents/iU4bOG1WyNp>.

OMS. (16 de FEBRERO de 2018). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Legionelosis: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/legionellosis>

Plá, F. J. (2017). *La Legionelosis y Sistemas de refrigeración*. Obtenido de Aniorte-nic.net: [http://www.aniorte-nic.net/archivos/Legionella\\_2.pdf](http://www.aniorte-nic.net/archivos/Legionella_2.pdf)

Rice W., Eugene y Baid B. Rodger. (2018). Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater. En *Simplate HPC (SM9215 E) y Detección de Legionella (SM9260J)* (págs. (pp 9-169 al 9-173),). Publicado en conjunto con APHA, WEF y AWWA. Edición N°23.

Sanchez, Luis. (13 de abril de 2016). *Enfriamiento evaporativo por AEFYT*. Obtenido de AEFYT entrevista a Luis A. Sánchez, especialista en legionella: <https://torresderefrigeracion1.wordpress.com/2016/04/13/aefyt-entrevista-a-luis-a-sanchez-especialista-en-legionella/>

Sandrea et al. (2015). Legionella spp. como agente etiológico de neumonía. *Kasmera*, 130-138.

STANDARD ASHRE. (2000). Guía 12-2000. *Minimizando el Riesgo de Legionelosis asociado a las instalaciones de agua del Edificio*. Estados Unidos, Atlanta, ATECYAR: SSN 1041-2336.

UNE100030. (ABRIL de 2017). *Prevención y control de la proliferación y diseminación de Legionella en instalaciones*. Madrid, España: Asociación Española de Normalización y Certificación.

UNE-CEN/TR16355. (Septiembre de 2014). Recomendaciones para la prevención del crecimiento de la legionela en las instalaciones de distribución de agua de consumo humano en el interior de los edificios. MADRID, ESPAÑA: Asociación Española de Normalización.

UNE-EN-ISO11731-2. (diciembre de 2008). Calidad del agua-Detección y recuento de Legionella. Parte2: Método de filtración directa en membrana para aguas con bajos contenido de bacteria. Madrid, España: Asociación Española de Normalización.

WTB-148, C. G. (JULIO de 2008). *COOLING TECHNOLOGY INSTITUTE*. Obtenido de Legionellosis. Guideline: Best Practices for Control of Legionella: <https://www.cti.org/downloads/WTP-148.pdf>

## 9. ANEXOS

*ANEXO 1: Carta de invitación al Proyecto de Torres de enfriamiento en Instalaciones*

Personal de Contacto  
Gerente de Mantenimiento  
Empresa

E. S. D.

Reciba un cordial saludo y nuestros más sinceros deseos de éxitos en sus delicadas funciones.

El Laboratorio Expert-Lab Inc, interesado y preocupado con el tema de *Legionella pneumophila* por su importancia en la Salud Pública, ha adquirido insumos de la marca IDEXX LABORATORIES para la implementación del Método Legiolert que es usado para la detección y cuantificación de *Legionella pneumophila*. IDEXX LABORATORIES, es una empresa mundialmente conocida por contar con todos sus productos aprobados internacionalmente y en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 23<sup>RD</sup> Edition.

*Legionella pneumophila*, microorganismo que produce infección pulmonar, mejor conocida como enfermedad de Legionario, caracterizada por ser una neumonía con fiebre alta, que puede llevar hasta la muerte. El contagio suele producirse por el contacto con el vapor de agua contaminado; este vapor infectado suele provenir del entorno como: bañeras, duchas calientes, Spa, Jacuzzi y Torres de Enfriamiento.


El Laboratorio Expert-Lab Inc conjuntamente con IDEXX LABORATORIES, estará realizando un estudio de evaluación de *Legionella pneumophila* en aguas de Torres de Enfriamiento en los periodos de marzo-abril y agosto-septiembre, este estudio incluye evaluación de las condiciones fisicoquímicas (pH, conductividad, cloro residual, hierro, bromo y turbiedad). En Panamá actualmente no contamos con una legislación, sin embargo, en el marco internacional existen Normas: UNE 100030:2017 (Europea) y Estándar ANSI / ASHRAE 188-2018, Legionelosis (Estados Unidos) que son aplicables a nuestro país por su posición geográfica siendo un país en tránsito para el comercio y el turismo internacional.

El Laboratorio Expert Lab Inc ha escogido a su empresa para realizarle de manera de cortesía estos análisis de *Legionella pneumophila*, manteniendo en todo momento la confidencialidad de la información que se genere de este trabajo.

En espera de su confirmación para realizar este estudio y optar por el beneficio de contar con documentación de control de calidad de las Torres de Enfriamiento que tenga su organización.

Sin más,  
Atentamente,  
Laboratorio de Microbiología de Alimentos Aguas y Ambiente.

ANEXO 2: Certificados de calidad de productos e insumos utilizados para el proyecto



## QUALITY CONTROL CERTIFICATE

---

**Legiolert\***

---

<b>Product and Company Contact Information</b>	
<b>Product Catalog Number:</b> WLGT-100	<b>Lot Number:</b> AR212
<b>Part Number:</b> 98-0005738-00	<b>Expiration date:</b> 29 April 2020
	<b>Store At:</b> 2-25 °C

<b>Technical Support Inquiries:</b> 1-207-556-4496 1-800-321-0207 (US/CAN) 00-800-4339-9111 (Europe) Email: water@idexx.com	<b>Manufacturer:</b> IDEXX Laboratories, Inc. One IDEXX Drive Westbrook, ME 04092 USA Fax: 1-207-556-4630 idexx.com/water
---	--

---

<b>Physical Properties</b>		<u>Results</u>
Powder Appearance	Very light to light tan, free flowing, granulated powder, free of foreign particles.	Passed
pH	Tested for pH range 6.6 - 6.9.	Passed

**Product Performance**

Representative samples of this lot have been tested at 37 ± 0.5°C and 39 ± 0.5°C with the organisms listed below. Ten samples per target organism are incubated and results are read on the 7th day. The inoculum level for target bacteria is approximately 50-300 CFU/100 mL. Quantitative testing is performed on all target organisms using IDEXX Quanti-Tray\*/Legiolert\* MPN compared to spread plate counts using BCYE. Productivity ratio is the average MPN / average plate count. The passing range is ≥ 0.5 (i.e. greater than or equal to 0.5).

*Note: Testing performed in accordance with ISO 11133:2014.*


Target Bacteria	Quantitative Result	Productivity Ratio
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33152 (WDCM 00107)	Confirmation plate counts are within 95% confidence limits of Quanti-Tray/Legiolert MPN.	Passed
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33156 (WDCM 00180)	Confirmation plate counts are within 95% confidence limits of Quanti-Tray/Legiolert MPN.	Passed

---

\*Legiolert and Quanti-Tray are trademarks or registered trademarks of IDEXX Laboratories, Inc. or its affiliates in the United States and/or other countries.

IIm-QA-145\_A\_CD #06053, Effective Date: 07/11/2016  
 Page 1 of 2

**Tuesday, March 5, 2019**



ISO 9001 CERTIFIED  
 ISO 14001 CERTIFIED

Certificado de Control de calidad de Legiolert- Detección de *L. pneumophila*

## QUALITY CONTROL CERTIFICATE

### SimPlate\* for HPC Unit Dose

#### Product and Company Contact Information

**Product Catalog Number:** WHPC-25  
**Part Number:** 98-05760-01  
**Lot Number:** MP728

**Expiration date:** 23 April 2020  
**Store At:** 2-30 °C

#### Technical Support Inquiries:

1-207-556-4496  
1-800-321-0207 (US/CAN)  
00-800-4339-9111 (Europe)  
Email: water@idexx.com

#### Manufacturer:

IDEXX Laboratories, Inc.  
One IDEXX Drive  
Westbrook, ME 04092 USA  
Fax: 1-207-556-4630  
idexx.com/water

#### Physical Properties

Powder Appearance**	Fine powder, free of foreign particles.	<u>Results</u> Passed
pH	Tested for pH range 6.7 - 7.3.	Passed

#### Product Performance

Representative samples of this lot have been tested with the organisms listed below. Duplicate samples for each organism are incubated at 35 ± 0.5°C for 48 hours. The target inoculum level is 30-300 cfu/mL. Quantitative testing is performed using IDEXX SimPlate MPN compared to pour plate counts using Standard Methods Agar. Productivity ratio is the average MPN / average plate count. The passing range is ≥ 0.7 to ≤ 1.4 (i.e. greater than or equal to 0.7 to less than or equal to 1.4).

Note: Testing performed in accordance with ISO 11133:2014.

Target Bacteria	Result	Productivity Ratio
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (WDCM 00013)	Confirmation pour plate counts within 95% confidence limits of SimPlate MPN.	Passed
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145 (WDCM 00024)	Confirmation pour plate counts within 95% confidence limits of SimPlate MPN.	Passed
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 35654	Confirmation pour plate counts within 95% confidence limits of SimPlate MPN.	Passed
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 (WDCM 00087)	Confirmation pour plate counts within 95% confidence limits of SimPlate MPN.	Passed

**Sterility** No turbidity or fluorescence after 72 hours incubation at 35 ± 0.5 °C in sterile water. Frequency on a per lot basis: random cross lot production testing (minimum 10 replicates).

Note: The World Data Center for Microorganisms (WDCM) number refers to the same bacterial strain as the culture collection number listed for the American Type Culture Collection (ATCC).

This product was performance tested and has met all quality control specifications required for release.

This information is released by IDEXX Quality Assurance:

Name: Tom Bannen, QA Specialist III

Signature:



Date: 25 March 2019

\*SimPlate is a registered trademark of BioControl Systems, Inc. and is used by IDEXX under license from BioControl Systems, Inc.

\*\*Parameter does not fall under the IDEXX ISO/IEC 17025:2017 Scope of Accreditation



IDEXX Water QC Lab is accredited to  
ISO/IEC 17025:2017



Testing Laboratory  
Accreditation #AT-1931

fm-QA-131\_B\_CD #111106, Effective Date: 03/12/2019

Certificado de Control de calidad de Simplate HPC- Recuento de Heterotrofos

## QUALITY CONTROL CERTIFICATE

### 290mL Sterile Vessels

#### Product and Company Contact Information

**Product Catalog Number:** WV290SBST-100

**Lot Number:** BM009

**Part Number:** 98-09588-00

**Expiration date:** 31 January 2019

#### **Technical Support Inquiries:**

1-207-556-4496  
1-800-321-0207 (US/CAN)  
00-800-4339-9111 (Europe)  
Email: water@idexx.com

#### **Manufacturer:**

IDEXX Laboratories, Inc.  
One IDEXX Drive  
Westbrook, ME 04092 USA  
Fax: 1-207-556-4630  
idexx.com/water

#### Physical Properties

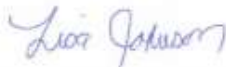
<b>Fill Line Accuracy</b>	Lot has been tested using the gravimetric method. The 100 mL, 200 mL or 250 mL fill lines are accurate to within $\pm 2.0\%$ .
<b>Sterility</b>	Lot has been subjected to gamma irradiation. In accordance with ISO 11137-02, post-irradiated product has a minimum sterility assurance level (SAL) of $10^{-3}$ . No growth after 48 hours incubation at $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ with sterile Tryptic Soy Broth.
<b>Appearance</b>	Absence of nicks, scratches, and cracks.
<b>Sodium Thiosulfate Content</b>	Lot is able to neutralize 250 mL of 10 mg/L chlorine solution
<b>Fluorescence Test</b>	Result: Negative

**This product was performance tested and has met all quality control specifications required for release.**

**This information is released by IDEXX Quality Assurance:**

**Name:** Lisa Johnson, Sr. Quality Assurance Specialist

**Signature:**



Certificado de control de calidad de Envases con tiosulfato de sodio- neutralizante para el agente desinfectante de 290 mL.

## QUALITY CONTROL CERTIFICATE

### 120mL Sterile Vessels w/Sodium Thiosulfate

#### Product and Company Contact Information

**Product Catalog Number:** WV120SBST-200

**Lot Number:** CP023

**Part Number:** 98-09221-00

**Expiration date:** 03 April 2021

#### **Technical Support Inquiries:**

1-207-556-4496  
1-800-321-0207 (US/CAN)  
00-800-4339-9111 (Europe)  
Email: [water@idexx.com](mailto:water@idexx.com)

#### **Manufacturer:**

IDEXX Laboratories, Inc.  
One IDEXX Drive  
Westbrook, ME 04092 USA  
Fax: 1-207-556-4630  
[idexx.com/water](http://idexx.com/water)

#### Physical Properties

<b>Fill Line Accuracy</b>	Lot has been tested using the gravimetric method. The 100 mL fill line is accurate to within $\pm 2.0\%$ .
<b>Sterility</b>	Lot has been irradiated. In accordance with ISO 11137-02, post-irradiated product has a minimum sterility assurance level (SAL) of $10^{-3}$ . No growth after 48 hours incubation at $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ with sterile Tryptic Soy Broth.
<b>Appearance</b>	Absence of nicks, scratches, and cracks.
<b>Sodium Thiosulfate Content</b>	Lot is able to neutralize a 100 mL sample with up to 15 mg/L chlorine per <i>Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater</i> section 9060A.2.
<b>Fluorescence Test</b>	Result: Pass

**This product was performance tested and has met all quality control specifications required for release.**

**This information is released by IDEXX Quality Assurance:**

**Name:** Abel Plaud, QA Specialist II

**Signature:**



Certificado de control de calidad de Envases con tiosulfato de sodio- neutralizante para el agente desinfectante de 120 mL

## QUALITY CONTROL CERTIFICATE

### Legiolert\* Pretreatment

#### Product and Company Contact Information

**Product Catalog Number:** WLGT-PRE  
**Part Number:** 98-0007740-00

**Lot Number:** CR334  
**Expiration date:** 10 April 2020  
**Store At:** 15-30 °C

#### **Technical Support Inquiries:**

1-207-556-4496  
1-800-321-0207 (US/CAN)  
00-800-4339-9111 (Europe)  
Email: water@idexx.com

#### **Manufacturer:**

IDEXX Laboratories, Inc.  
One IDEXX Drive  
Westbrook, ME 04092 USA  
Fax: 1-207-556-4630  
idexx.com/water

#### Physical Properties

		<u>Results</u>
Appearance	White to off-white powder or white to slightly yellow crystals or crystalline powder.	Passed
pH	Tested for pH range 1.50 - 1.75.	Passed
<i>Legionella pneumophila</i> -Free	No growth of <i>Legionella pneumophila</i> after 7 days incubation at $37 \pm 0.5$ °C in 100 mL sterile, deionized water with 0.1 mL pretreatment and Legiolert*.	Passed

This product was performance tested and has met all quality control specifications required for release.

This information is released by IDEXX Quality Assurance:

Name: Paula Guerrette, Quality Associate SR 1

Signature:



Item-QA-091\_B\_CO #067741, Effective Date: 5/29/2013

Monday, April 29, 2019

**IDEXX**

ISO 9001 CERTIFIED  
ISO 14001 CERTIFIED

Pretratamiento de Legiolert para la disminución de la flora acompañante.

IDEXX Laboratories, Inc.  
One IDEXX Drive  
Westbrook, ME 04092 USA  
Email: [water@idexx.com](mailto:water@idexx.com)

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**  
**IDEXX-QC *LEGIONELLA PNEUMOPHILA***

**Part # 98-0009287-00**  
**Catalogue # WQC-LP**

**Lot # 061118**

**Kit Expires: 31-Jul-2019**

*Legionella pneumophila*  
*Enterococcus faecalis*

NCTC 11192 Lot # 050418-1 Expires: 31-Jul-2019  
NCTC 12697 Lot # 050318 Expires: 30-Nov-2019

Lot Activity:

*Legionella pneumophila*: 345 MPN/100 mL with Quanti-Tray\*/Legiolert\*  
Verified by Quanti-Tray/Legiolert with n=30; Acceptable Range = 62 - 628

*Enterococcus faecalis*: <1 MPN/100 mL with Quanti-Tray/Legiolert  
Verified by Quanti-Tray/Legiolert

*Enterococcus faecalis*: 1600 MPN/100 mL with Enterolert\* Quanti-Tray/2000  
Verified by Quanti-Tray/2000, Acceptable range = 200-3000

Other methods may give results outside of the ranges stated above.

**Storage Conditions:** Frozen ( $\leq -10^{\circ}\text{C}$ )

This product was performance tested and has met all quality control specifications required for release.  
This information is released by NSI.

Name: Lauren Deese

Signature: *Lauren Deese*

Date: 06/12/18

Quality Assurance

**Technical Support Inquiries:**

IDEXX  
1-207-556-4496  
1-800-321-0207 (US/CAN)  
00-800-4339-9111 (Europe)

**Manufactured by:**  
NSI Lab Solutions, Inc.†  
7212 ACC Blvd  
Raleigh, NC 27617 USA

**Tested Under:**



**Produced Under:**



†This CRM was produced and certified under a quality system accredited to ISO Guide 34:2009 (Certificate #AR-1571) and ISO/IEC 17025:2005 (Certificate # AT-1690)

\*Legiolert Quanti-Tray and Enterolert are registered trademarks of IDEXX Laboratories, Inc. or its affiliates in the United States and/or other countries.

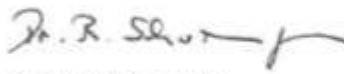
Cepas de control de calidad (QC) para evaluación de la verificación del método Legiolert

# Certificate of Analysis

**SIGMA-ALDRICH**

<b>Product Name</b>	Legionella (GVPC) Selective Supplement, for microbiology
<b>Product Number</b>	61025
<b>Product Brand</b>	SIAL

<b>TEST</b>	<b>SPECIFICATION</b>	<b>LOT BCCC0394 RESULTS</b>
<b>PDF</b>		<a href="#">Click here</a> : Certificate of Analysis and Specifications only available in PDF format



Dr. Reinhold Schwenninger  
Quality Assurance  
Buchs, Switzerland

Certificado de Calidad de Suplemento GVPC aplicado al BCYE para inhibir la flora acompañante fúngica y bacteriana.

**CERTIFICATE OF CONFORMITY**

Name of Product: Microscreen Legionella latex kit  
 Product Code: M45 CE marked  
 Components: One of each:- M45a (CE), M45b (CE), M45c (CE), M45d (CE), Two of M40 (CE)

1. All components in this kit comply with current Microgen Bioproducts approved specifications.
2. Performance complies with current release specifications

**KEY DATA SUMMARY**


Component	Part Number	Lot	Expiry	Label code, correct SOP 314	Lot, expiry correct SOP 340	Component PMP reviewed SOP 337
Legionella 1 Latex reagent	M45a	16801	2021-09	CEM45a	PASS	PASS
Legionella 2-15 Latex Reagent	M45b	16601	2021-08	CEM45b	PASS	PASS
Positive Control	M45c	16801	2021-07	CEM45c	PASS	PASS
Legionella species latex reagent	M45d	10501	2021-08	CEM45d	PASS	PASS
Saline	M40	16602	2021-08	CEM40	PASS	PASS
Packaged Kit	M45	15691	2021-08	CEM45	PASS	PASS

Overall Expiry Date: 2021-08

SIGNATURE: *[Handwritten Signature]*

DATE: 23 Sep 2019

MicroKit *Legionella* para la detección del serogrupo S1 y S2-S15 para la detección de *Legionella pneumophila* y *Legionella spp*

Verificación de Termómetros							
 <b>Termómetro</b> <b>Patrón</b> <b>Próx. Cal.</b> <b>Patrón</b>		<b>EL-182</b> <b>EL-72</b> <b>2020 nov</b>	<b>Cód. Fab.</b> <b>Cód. Fab.</b> <b>Próx. Cal.</b> <b>Termómetro</b>	<b>122600267</b> <b>4439</b> <b>2021 Mayo</b>	<b>Cód. Lab.</b> <b>EL-182</b>		
No. Medición	Hora	Fecha					
		04/5/2020 EL-91		04/5/2020 Agua destilada		/5/2020 Baño María EL-94	
		Calibrado	No Calibrado	Calibrado	No Calibrado	Calibrado	No Calibrado
1		4.0	4.0	27.0	27	44	44
2		4.0	4.0	27.0	27	44	44
3		4.0	4.0	27.0	27	44	44
4		4.0	4.0	27.0	27	44	44
5		4.0	4.0	27.0	27	44	44
6		4.0	4.0	27.0	27	44	44
7		4.0	4.0	27.0	27	44	44
8		4.0	4.0	27.0	27	44	44
9		4.0	4.0	27.0	27	44	44
10		4.0	4.0	27.0	27	44	44

Corrección de Termómetro Calibrado (-10=0.2°C; 0.0=0.1; 35.0=-0.1°C; 38=-0.1°C; 41.0=-0.3°C; 55.0=-0.7; 100°C=-1.0)

No. Medición	Hora	Fecha					
		04/5/2020 EL-91		04/5/2020 Agua destilada		/5/2020 Baño María EL-94	
		Corregido	No Calibrado	Corregido	No Calibrado	Corregido	No Calibrado
1		4.1	4	26.9	27	43.7	44
2		4.1	4	26.9	27	43.7	44
3		4.1	4	26.9	27	43.7	44
4		4.1	4	26.9	27	43.7	44
5		4.1	4	26.9	27	43.7	44
6		4.1	4	26.9	27	43.7	44
7		4.1	4	26.9	27	43.7	44
8		4.1	4	26.9	27	43.7	44
9		4.1	4	26.9	27	43.7	44
10		4.1	4	26.9	27	43.7	44
Prom		4.1	4	26.9	27	43.7	44
Diferencia			0.1		-0.1		-0.3

### Verificación de la termometría utilizada para la medición de temperatura

ESTUDIO DE PERDIDA DE HUMEDAD A LA T°C = 37 POR 7 DIAS  
EQUIPOS: BALANZA Y THERMOHIGROMETRO CALIBRADOS  
PRIMER DE ESTUDIO: 17-09-2018 FECHA DE FINALIZADO EL ESTUDIO: 24-09-2018

N°1 DE CHAROLAS	PESO SIN AGUA CHAROLA	PESO CON H2O	PESO CON H2O	PESO CON H2O	PESO CON H2O	% DE PERDIDA
		17/9/2018	19/9/2018	21/9/2018	24/9/2018	
1	29.2	131.2	128.4	125.3	121.6	126.625
2	28.9	132.1	130.4	127.8	124.4	128.675
3	28.8	130.5	128.8	126.4	123.7	127.35
4	29.1	126.8	124.7	122.4	119.8	123.425
5	29.3	129.9	127.5	124.5	121.3	125.8
PROMEDIO% DE VOLUMEN INICIAL DE LAS CHAROLAS		130.1			PROMEDIO % DE PERDIDA FINAL	126.375

9.3.6. Determine the % weight loss using the equation below.  

$$\frac{\text{Weight before incubation} - \text{Weight after incubation}}{\text{Weight before incubation}} \leq 15\%$$

9.3.7. If the weight loss during incubation is  $\leq 15\%$  then the incubation conditions are acceptable for Legiolert.

% DE PERDIDA DE HUMEDAD DE LEGIOLERT	$\frac{130.1-126.375}{130.1}$	0.02863182 2.86318217
--------------------------------------	-------------------------------	--------------------------

Evaluación del % humedad en las incubadoras de 37 °C para un adecuada incubación de la muestra Legiolert.

ESTUDIO DE PERDIDA DE HUMEDAD A LA T°C = 39 POR 7 DIAS  
 EQUIPOS: BALANZA Y THERMOHIGROMETRO CALIBRADOS  
 PRIMER DE ESTUDIO: 27-09-2018 FECHA DE FINALIZADO EL ESTUDIO: 10-09-2018

N°1 DE CHAROLAS	PESO SIN AGUA CHAROLA	PESO CON H2O	PESO CON H2O	PESO CON H2O	PESO CON H2O	% DE PERDIDA
		27/9/2018	29/9/2018	1/10/2018	3/10/2018	
1	29.2	125.9	123	120.2	117	121.525
2	28.9	125.8	123.5	120.6	118.2	122.025
3	28.8	124.2	122.2	119.4	117.4	120.8
4	29.1	125.5	123.3	120.2	117.8	121.7
5	29.3	125	122.9	119	116.4	120.825
PROMEDIO% DE VOLUMEN INICIAL DE LAS CHAROLAS		125.28			PROMEDIO % DE PERDIDA FINAL	121.375


9.3.6. Determine the % weight loss using the equation below.

$$\frac{\text{Weight before incubation} - \text{Weight after incubation}}{\text{Weight before incubation}} \leq 15\%$$

9.3.7. If the weight loss during incubation is  $\leq 15\%$  then the incubation conditions are acceptable for Legiolert.

% DE PERDIDA DE HUMEDAD DE LEGIOLERT	$\frac{125.28 - 121.375}{1325.28}$	0.03117018 3.11701788
--------------------------------------	------------------------------------	--------------------------


Evaluación del % humedad en las incubadoras de 39°C para un adecuada incubación de la muestra Legiolert.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> Microorganism Name: Legionella longbeachae Catalog Number: 01003 Lot Number: 1003-11 Reference Number: ATCC® 33462™* Purity: > 99.9% of Total Pellet CFU Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2017/12/31 Release Information: Quality Control Technologist: Marie M Howe Release Date: 2016/2/24
--	--

Performance	
<b>Macroscopic Features:</b> Small, circular, convex, entire edge, white, smooth, and glistening. <b>Microscopic Features:</b> Slender gram negative bacilli with rounded ends.	<b>Medium:</b> BCYE <b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MEI None See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive Color Under Long-Wave UV Light: pale yellow-green

  
 Amanda Kuperus  
 Quality Control Manager  
 AUTHORIZED SIGNATURE

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

Certificado de calidad de cepa de *Legionella longbeachae* ATCC 33462

# Certificate of Analysis

Certified Reference Material

**Legionella bozemanii**



Number RQC02908-10EA

Lot LRAA2311

Solvent (Matrix) Vitroid™

Hazard Risk Group II (WHO)

Storage & Handling Store at 0 to -20°C.

Expiration Date December 31, 2018

Certified By:  Christopher Rucinski - QA Director

Certification Date: September 30, 2015

Analyte	Units	Certified Value <sup>1,5</sup>	$\pm$ K
Legionella 121212	CFU	101000 ± 5800	2.00

## Additional Information

### Description

The organism is *Legionella bozemanii*, NCTC strain number 11368.

# of passages: 2

If stored properly at -18°C, the organism is stable through the expiration date listed on the product label. Both accelerated and 2 year stability tests have been conducted on similar lots.

The organism is stabilized in a dry tablet, known as a Vitroid™. The Vitroid™ is extremely sensitive to moisture. The packaging vials contain a silica gel desiccant with a color indicator, yellow desiccant indicates a dry environment, clear (opaque) desiccant indicates the silica gel capacity has been depleted and is no longer effective. It is suggested that once a tube is opened it is used within 30 days. If an unopened tube shows clear desiccant prior to the expiration date contact RTC and a replacement will be supplied to you at no cost.

### Sample Preparation

Open vial and aseptically remove one Vitroid™. Each Vitroid™ contains the CFU listed above.

The Vitroid™ can be hydrated in as little as 100µL of water, but generally the Vitroid™ is rehydrated with 100mL of laboratory grade dilution or phosphate buffered water. The Vitroid™ will dissolve completely within 15 minutes. Shaking gently will help the Vitroid™ dissolve.

Alternatively the Vitroid™ can be placed directly on a spread plate. Allow the Vitroid™ to contact the media for 15 minutes and spread with a sterile loop.

1. Certified value is analytically verified by RTC with associated uncertainties from the preparation and analytical procedures.

4. The assigned value is the "prepared" value.

5. Expanded Uncertainty - All uncertainty values in this document expressed as  $\pm$  value are expanded uncertainties. The uncertainty of the certified value includes the uncertainties associated with the gravimetric preparation, sample homogeneity and sample stability (if significant).

6.  $k$  is Coverage factor derived from a t-distribution table, based on the degrees of freedom of the data set. Confidence Interval = 95%

Traceability: The standard was manufactured under an ISO/IEC 17025:2005 certified quality system. The balance used to weigh raw materials is accurate to  $\pm$  0.0001g and calibrated regularly using mass standards traceable to NIST. All dilutions were performed gravimetrically. Additionally, individual analytes are traceable to NIST SRMs where available and specified above.

THIS PRODUCT WAS DESIGNED, PRODUCED AND VERIFIED FOR ACCURACY AND STABILITY IN ACCORDANCE WITH ISO/IEC 17025:2005 (Aclass Cert AT-1467) and ISO GUIDE 34:2009 (Aclass Cert AR-1470).

MSDS reports for components comprising greater than 1.0% of the solution or 0.1% for components known to be carcinogens are available upon request.

ATCC® is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

<sup>1</sup>The ATCC Licensed Derivative® emblem signifies ATCC®-derived products are endorsed by ATCC®. Products displaying the emblem are the only ones for which the quality of the ATCC® ingredient can be properly assured. ATCC® does not endorse products including ATCC® ingredients from companies that are not members of the LDP program. **Look for the ATCC Licensed Derivative® Emblem for products derived from ATCC® cultures.**



REFERENCE MATERIAL PRODUCER



TESTING

Page 1 of 1

SIGMA-ALDRICH

2551 Selder Springs Rd. Laramie, Wyoming 82070 USA  
1 307-742-5452  
cetesgroup@sigmaaldrich.com



www.sigmaaldrich.com

Certificado de calidad de cepa de *Legionella bozemanii* ATCC 11368




301081011  
LD

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Legionella pneumophila subsp. pneumophila <b>Catalog Number:</b> 0211 <b>Lot Number:</b> 211-49** <b>Reference Number:</b> ATCC® 33152™* <b>Purity:</b> Pure <b>Passage from Reference:</b> 2	<b>Expiration Date:</b> 2021/5/31 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Kieshia L. Negen <b>Release Date:</b> 2019/7/16
--	---

<b>Performance</b>	
<b>Macroscopic Features:</b> Small to medium, circular, convex, entire to erose edge, both blue/white and light pink colonies, glistening, translucent	<b>Medium:</b> BCYE
<b>Microscopic Features:</b> Gram negative rods; varying lengths, many filamentous forms present	<b>Method:</b> Gram Stain (1)

<b>ID System:</b> MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): weak positive Longwave UV fluorescence: dull yellow-green
	 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE

\*\*Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



Certificado de calidad de cepa de Legionella pneumophila ATCC 33152

## Product Specification

**Product Name:**

Bovine Serum Albumin - lyophilized powder, ≥96% (agarose gel electrophoresis)

**Product Number:** A2153  
**CAS Number:** 9048-46-8  
**MDL:** MFCD00130384

**Storage Temperature:** 2 - 8 °C

TEST	Specification
Appearance (Color)	White to Yellow to Beige
Appearance (Form)	Powder
Solubility (Color)	Faint Yellow to Yellow
Solubility (Turbidity)	Clear to Slightly Hazy
40 mg/ml, H <sub>2</sub> O	
Loss on Drying	< 6.0 %
Nitrogen	14.5 - 16.5 %
Identity	Bovine Origin
Agarose Electrophoresis	≥ 96 %
% Albumin	
pH	6.5 - 7.5
1% in 0.15 M NaCl	
Inactivation	Pass
pH not more than 5.0 for at least 2 hours	
Recommended Retest Period	-----
5 years	
VSV and BT Virus	None Detected

Specification: PRD.2.ZQ5.10000037660

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at [Sigma-Aldrich.com](http://Sigma-Aldrich.com). For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

**BCYE AGAR BASE**  
**Catalog No. 7728**

**Lot No.: 111380**  
**Exp. Date: Dec 31, 2022**

A representative sample of this lot was tested according to Acumedia Standard Test Methods. Testing was performed in compliance with ISO/TS 11133-1 and BS EN 12322:1999 + A1:2001 standards. This product met or exceeded established performance specifications as listed below.

**PHYSICAL CHARACTERISTICS**

<u>SPECIFICATION</u>	<u>EXPECTED RESULTS</u>	<u>ACTUAL RESULTS</u>
<u>Dehydrated:</u> Appearance	Homogenous, free-flowing powder	Homogenous, free-flowing powder
Color	Grey-Black	Grey-Black
<u>Prepared:</u> Appearance	Opaque	Opaque
Color	Black	Black
pH:	6.9 ± 0.2 @ 25°C	6.75 @ 25°C

**CULTURAL RESPONSE**

The medium was prepared according to label directions and inoculated as listed below. Cultures were incubated aerobically at 35 ± 2°C and examined for growth and fluorescence under long-wave UV light at 66-72 hours.

<u>MICROORGANISM</u>	<u>ATCC</u>	<u>APPROX. INOCULUM (CFU)</u>	<u>EXPECTED</u>		<u>ACTUAL</u>	
			<u>GROWTH</u>	<u>REACTION</u>	<u>GROWTH</u>	<u>REACTION</u>
<i>Legionella bozemanii</i>	33217	10-300	Growth	Blue-white	Meets Expected Result	
<i>Legionella dumofii</i>	33279	10-300	Growth	Blue-white	Meets Expected Result	
<i>Legionella pneumophila</i>	33152	10-300	Growth	Yellow green	Meets Expected Result	
<i>Escherichia coli</i>	25922	10-300	Growth	-	Meets Expected Result	
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	10-300	Growth	-	Meets Expected Result	

**ANIMAL DERIVED MATERIAL COUNTRY OF ORIGIN INFORMATION**

<u>ANIMAL DERIVED MATERIAL</u>	<u>TISSUE SOURCE/ RISK CATEGORY*</u>	<u>ANIMAL SPECIES</u>	<u>COUNTRY OF ORIGIN</u>	<u>CERTIFICATE OF SUITABILITY</u>
--------------------------------	--------------------------------------	-----------------------	--------------------------	-----------------------------------

THIS PRODUCT DOES NOT CONTAIN ANY MATERIALS OF ANIMAL ORIGIN

\* Risk Categories as defined by the European Pharmacopea.

\*\* Not Applicable. "Non-TSE-relevant animal species."

  
 Mike Anderson  
 Quality Control  
 Supervisor

Thursday, January 24, 2019

Page 1 of 1

PRINTED: 1/24/2019

CofA-7728  
 Rev. 02  
 Effective: 5/24/16



620 Leshier Place, Lansing, MI 48912 USA  
 800/234-5333 (USA/Canada) • 517/372-9200 • Fax: 517/372-2006  
 E-mail: foodsafety@neogen.com • www.neogen.com

Certificado de calidad de medios de cultivo para el medio BCYE

ANEXO 3: Registro de Control de calidad de reactivos con cepas positivas y negativas.



CONTROL DE CALIDAD DE REACTIVOS IDEXX

AÑO: \_\_\_\_\_

1. Fecha: 30/07/19		2. Fecha: 30/7/19		3. Fecha: 30/7/19		4. Fecha: 30/7/19		
Reactivo: Legionella		Reactivo: Legionella		Reactivo: Legionella		Reactivo: Legionella		
Realizado por: MF		Realizado por: MF		Realizado por: MF		Realizado por: MF		
Supervisado por: JH		Supervisado por: JH		Supervisado por: JH		Supervisado por: JH		
	CEL/PC	NMP		CEL/PC	NMP		CEL/PC	NMP
C+	6/18	112.7	C+	6/29	196.4	C+	6/30	644
C+*	/	/	C+*	/	/	C+*	/	/
C-	0/0	< 2	C-	0/0	< 2	C-	0/0	< 2
C-	/	/	C-	/	/	C-	/	/
	Lote	F. Exp.		Lote	F. Exp.		Lote	F. Exp.
RC	061118	31 Jul 19	RC	061118	31 Jul 19	RC	061118	31 Jul 19
QC+	050418-1	31 Jul 19	QC+	050418-1	31 Jul 19	QC+	050418-1	31 Jul 19
QC+*	/	/	QC+*	/	/	QC+*	/	/
QC-	050318	30 Nov 19	QC-	050318	30 Nov 19	QC-	050318	31 Nov 19
QC-	/	/	QC-	/	/	QC-	/	/
ICA	C+(62-628) Ct(200-3000)		ICA	C+(62-628) Ct(200-3000)		ICA	C+(62-628) Ct(200-3000)	
Res.	Aceptable (C+ y C-)		Res.	Aceptable (C+ y C-)		Res.	Aceptable (C+ y C-)	
AC	Ninguna		AC	Ninguna		AC	Ninguna	

C+: Control positivo (Enterolert "Enterococcus faecalis", Pseudolert "Pseudomonas aeruginosa", SimPlate HPC "Enterococcus faecalis" y Colliert "Klebsiella pneumoniae" (en el caso de control positivo coliformes totales), Legiolert "Legionella pneumophila").

C+\*: Control positivo [Colliert "Escherichia coli" (en el caso de control positivo de Escherichia coli)].

C-: Control negativo (Enterolert "Escherichia coli y Streptococcus bovis", Pseudolert "Escherichia coli y Pseudomonas fluorescens", SimPlate HPC "Agua destilada + reactivo" y Colliert "Pseudomonas aeruginosa", Legiolert "Enterococcus faecalis").

NMP: Número más probable/ 100 ml (Enterolert, Pseudolert, Colliert y Legiolert) o mL (solo SimPlate HPC)

QC: Lote/Fecha de expiración (F.Exp) de los QC usado

RC: Lote/Fecha de expiración (F.Exp) de los reactivos verificados Res: Resultado (aceptable o inaceptable) AC: Acción Correctiva (si el resultado es inaceptable)

ICA: Intervalo de cuantificación aceptable. CEL: Celdas PC: pocillos

NOTA: Los resultados obtenidos deben estar dentro intervalos de cuantificación aceptables (ICA) para los C+ y C- (estará dado por el Certificado de calidad del proveedor). C- siempre debe dar <1 NMP/100ml. Si el resultado es Aceptable el lote de reactivo será aprobado para su uso. Si el resulta es Inaceptable se procederá a realizar una prueba nuevamente. Si es Aceptable se procede a aprobar para su uso y si es Inaceptable nuevamente, se desecha el lote del reactivo. (Notificándole al Proveedor).

Tabla de Observaciones

Fecha	T°C Ambiental EL-122-aap	T°C Refrigeradora EI-93-app	T°C Incubadora	Código de la incubadora	Fecha	T°C Ambiental EL-122-aap	T°C Refrigeradora EI-93-app	T°C Incubadora	Código de la incubadora
1. 30/07/19	24°C, 44%	4-2	35 ± 0.5°C	EL-29aar	3. 30/07/19	24°C, 44%	4-2	35 ± 0.5°C	EL-29aar
2. 30/07/19	24°C, 44%	4-2	35 ± 0.5°C	EL-29aar	4. 30/07/19	24°C, 44%	4-2	35 ± 0.5°C	EL-29aar

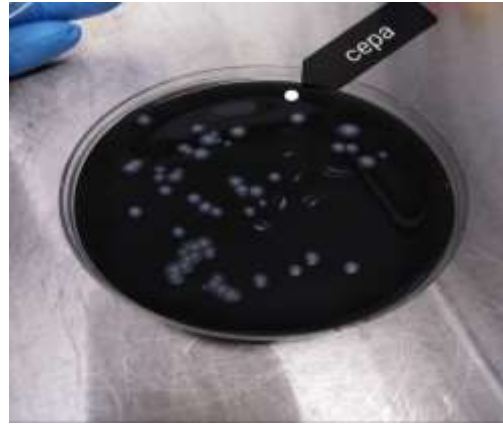
ANEXO 4: Fotos del muestreo de Legionella en Torres de Enfriamiento

 <p>Torres de Enfriamiento</p>	 <p>Conductímetro y pH</p>
 <p>Medidores de Cloro Total</p>	 <p>Medidor de Turbiedad</p>
 <p>Medidor de la temperatura</p>	 <p>Equipo multiparámetro.</p>

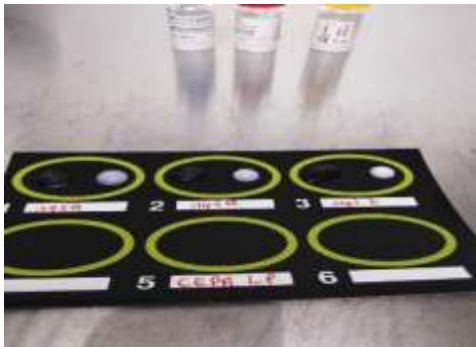
ANEXO 5: Fotos del análisis realizado en el proyecto de Legionella para torres de enfriamiento



Muestras positivas para *Legionella pneumophila* color de los pocillos marrón.



Cepa de LP ATCC 33152 en placas de agar BCYE+ GVPC



Control de calidad del Microgen Kit *Legionella pneumophila* ATCC 33152



Microgen Kit- Evaluación de muestras con código 2083 resultados positiva para LP en serogrupo S1



Muestra positiva de LP en muestra 2056 Torres de Enfriamiento



Muestra positiva de LP en muestra 2057 Torres de Enfriamiento

<b>Tabla 5 - Resumen del programa de Actuación de torres de refrigeración, condensadores evaporativos y sistemas análogos</b>			
<b>Operación</b>	<b>Periodicidad mínima</b>	<b>Observaciones</b>	
<b>Programa de tratamiento continuado del agua</b>			
Ajustar dosis de productos de tratamiento en función de los análisis del agua del sistema	Mensual	Antiincrustantes, anticorrosivos, etc. La periodicidad puede ser menor en función de las indicaciones del fabricantes	
<b>Programa de muestreo y análisis del agua</b>			
Determinar la concentración de biocida	Diario	La periodicidad puede modificarse según el tipo de biocida y los resultados analíticos microbiológicos	
Tomar muestras para determinación de <i>Legionella</i> spp	Mensual	Según tabla F.5 del anexo F	
Determinar parámetros fisicoquímicos y recuento de aerobios	Mensual	Según tabla 4	
Verificar los equipos de medida	Mensual	Verificación en función del uso del equipo y según las instrucciones del fabricante	
Calibrar los equipos de medida	Anual	Seguir instrucciones del fabricante	
Realizar un análisis físico- químico del agua de aporte	Trimestral	En aguas de río se recomienda análisis mensuales Según análisis indicado en el programa La periodicidad puede modificarse según criterio del responsable técnico	
<b>Programa de limpieza y desinfección de la instalación</b>			
Realizar un tratamiento de limpieza y desinfección preventiva	Semestral	En instalaciones de uso anual	No se considera necesario el desmontaje del relleno y/o el separador de gotas salvo criterio del Responsable Técnico o de la Autoridad Sanitaria
	Anual	En instalaciones de uso estacional (funcionamiento inferior a seis meses)	
<b>Programa de revisión de instalaciones</b>			
Revisar el intercambiador del condensador evaporativo	Semestral		
Revisar el relleno de torre de refrigeración	Semestral		
Revisar la bandeja	Mensual		
Inspeccionar visualmente el estado exterior de conservación y la colocación del separador de gotas	Mensual	Hay instalaciones en las que no es posible realizar la revisión si no se paran previamente	
Revisar el sistema de dosificación, sistema de purga y reserva de producto.	Mensual		
Realizar una revisión general del funcionamiento de la instalación	Anual	Incluyendo todos los elementos, reparando o sustituyendo aquellos elementos defectuosos	
<b>Otras actuaciones</b>			
Realizar una evaluación periódica del Programa de Actuación	Anual	Por el responsable técnico del Programa Incorporar preferiblemente indicadores	
Posibilidad de realizar voluntariamente una auditoría externa de la instalación y del Programa de Actuación	Bienal	Por Entidad externa independiente	

Fuente: (UNE100030, 2017)

ANEXO 7: Acciones correctivas utilizadas en los procesos de L+D.

**Tabla E.2 - Acciones a realizar frente a resultados positivos de *Legionella spp* en torres de refrigeración y condensadores evaporativos, centrales humidificadoras industriales, humidificadores, equipos de enfriamiento evaporativo y equivalentes**

UFC/L	Acción a desarrollar y observaciones
No detectada o $\leq 1000$	Seguir con el Programa de Actuación (1)
$> 1\ 000$ y $\leq 10\ 000$	Revisar el Programa de Actuación Asegurar que el sistema de tratamiento del agua esté funcionando correctamente Ajustar la dosis de biocida y adoptar las medidas correctoras apropiadas El responsable técnico debe valorar la necesidad de realizar una desinfección preventiva sin parada según el apartado H.3.1.2. o con parada según el apartado H.3.1.1 Muestrear nuevamente pasados aproximadamente 15-30 días tras la realización de las posibles medidas correctivas
$< 10\ 000$ y $\leq 100\ 000$	Se requieren acciones inmediatas Hacer un tratamiento de limpieza y desinfección preventiva con parada, según el apartado H.3.1.1 Revisar el Programa de Actuación Adoptar las medidas correctoras apropiadas Muestrear nuevamente pasados aproximadamente 15-30 días tras la realización del tratamiento de limpieza y desinfección y de otras posibles medidas correctivas
$> 100\ 000$	Parar el funcionamiento de la instalación hasta realizar un tratamiento de limpieza y desinfección de choque según el apartado H.3.2 Incrementar la concentración de biocida hasta disponer de nuevos resultados de <i>Legionella spp</i> Revisar y replantear el Programa de Actuación Adoptar las medidas correctoras apropiadas Muestrear nuevamente pasados aproximadamente 15-30 días tras la realización del tratamiento de limpieza y desinfección y otras posibles medidas correctivas
(1) En el caso de detectar <i>Legionella</i> el titular o responsable técnico valorará si realiza otro muestreo o realiza alguna medida preventiva adicional o correctiva.	

Fuente: (UNE100030, 2017)

ANEXO 8: Tablas de cuantificación de los Métodos Simplate HPC y Legiolert

Dosis Unitaria SimPlate de RPH Tabla de NMP			
# Pocillos positivos	NMP	Límites de confianza del 95%	
		inferior	superior
0	<0,2	<0,03	<1,4
1	0,2	0,0	1,4
2	0,4	0,1	1,6
3	0,6	0,2	1,9
4	0,8	0,3	2,2
5	1,0	0,4	2,5
6	1,2	0,6	2,7
7	1,5	0,7	3,0
8	1,7	0,8	3,3
9	1,9	1,0	3,6
10	2,1	1,1	3,9
11	2,3	1,3	4,2
12	2,6	1,5	4,5
13	2,8	1,6	4,8
14	3,0	1,8	5,1
15	3,3	2,0	5,4
16	3,5	2,2	5,8
17	3,8	2,3	6,1
18	4,0	2,5	6,4
19	4,3	2,7	6,7
20	4,5	2,9	7,0
21	4,8	3,1	7,4
22	5,1	3,3	7,7
23	5,3	3,5	8,0
24	5,6	3,8	8,4
25	5,9	4,0	8,7
26	6,2	4,2	9,1
27	6,5	4,4	9,4
28	6,8	4,7	9,8
29	7,1	4,9	10,2
30	7,4	5,1	10,6
31	7,7	5,4	10,9
32	8,0	5,6	11,3
33	8,3	5,9	11,7
34	8,6	6,2	12,1
35	9,0	6,4	12,6
36	9,3	6,7	13,0
37	9,7	7,0	13,4
38	10,0	7,3	13,9
39	10,4	7,6	14,3
40	10,8	7,9	14,8
41	11,2	8,2	15,2
42	11,6	8,5	15,7
43	12,0	8,8	16,2
44	12,4	9,1	16,7
45	12,8	9,5	17,3
46	13,2	9,8	17,8
47	13,7	10,2	18,3
48	14,1	10,6	18,9
49	14,6	10,9	19,5
50	15,1	11,3	20,1
51	15,6	11,7	20,7
52	16,1	12,1	21,3
53	16,6	12,5	22,0
54	17,1	13,0	22,7
55	17,7	13,4	23,4
56	18,3	13,9	24,1
57	18,9	14,4	24,9
58	19,5	14,9	25,7
59	20,2	15,4	26,5
60	20,9	15,9	27,3
61	21,6	16,5	28,2
62	22,3	17,1	29,2
63	23,1	17,7	30,2
64	23,9	18,3	31,2
65	24,8	19,0	32,3
66	25,7	19,7	33,5
67	26,6	20,4	34,7
68	27,6	21,2	36,1
69	28,7	22,0	37,5
70	29,9	22,9	39,0
71	31,1	23,8	40,7
72	32,4	24,8	42,5
73	33,9	25,8	44,4
74	35,5	27,0	46,6
75	37,2	28,2	49,1
76	39,2	29,6	51,9
77	41,4	31,1	55,1
78	44,0	32,8	58,9
79	47,0	34,8	63,6
80	50,7	37,1	69,5
81	55,5	39,8	77,5
82	62,3	43,2	89,9
83	73,8	47,6	114,6
84	>73,8	>47,6	>114,6

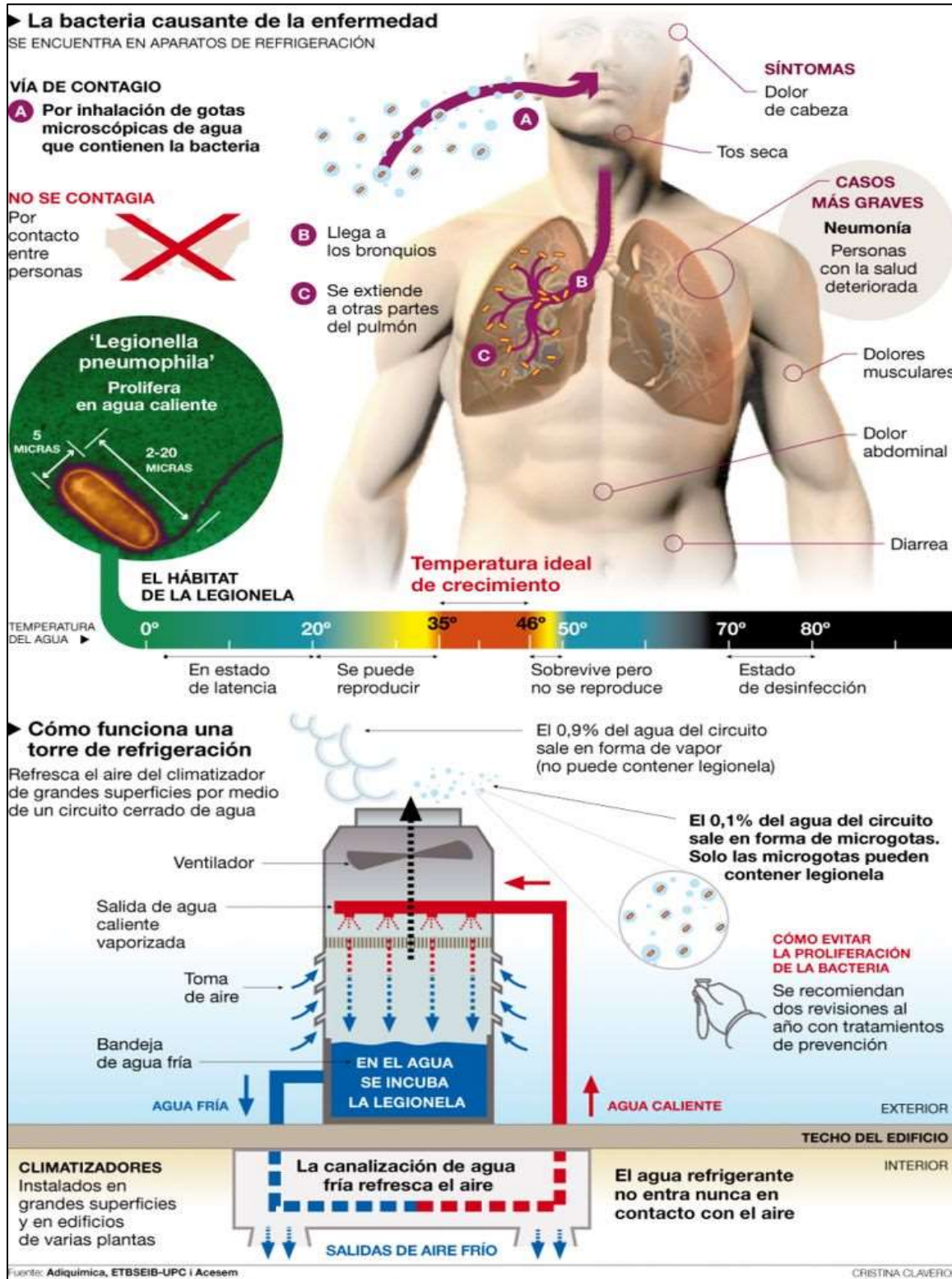
Fuente: <https://www.idexx.es/files/simplate-for-hpc-unit-dose-procedure-en.pdf>

**Tabla NMP para Quanti-Tray®/Legiolert® de 96 pocillos**

N.º de pocillos pequeños positivos	N.º de pocillos grandes positivos							
	0	1	2	3	4	5	6	7
0	<1	1,1	2,3	3,9	5,8	8,4	12,6	18,9
1	1,0	2,2	3,5	5,2	7,4	10,4	15,5	22,8
2	2,0	3,2	4,7	6,8	9,0	12,4	18,7	27,3
3	3,0	4,3	5,9	7,9	10,6	14,8	22,3	32,6
4	4,0	5,4	7,2	9,4	12,3	16,9	24,4	35,6
5	5,0	6,5	8,4	10,8	14,1	19,4	28,4	41,6
6	6,0	7,7	9,7	12,3	15,9	21,9	32,1	46,4
7	7,0	8,9	10,9	13,8	17,8	24,6	35,4	50,6
8	8,1	9,9	12,2	15,3	19,8	27,5	40,4	57,3
9	9,1	11,0	13,5	16,8	21,7	30,5	43,4	61,6
10	10,1	12,1	14,8	18,4	23,8	33,5	46,6	66,6
11	11,1	13,3	16,1	20,0	25,9	36,7	50,0	71,6
12	12,1	14,5	17,5	21,8	28,0	40,0	53,3	76,6
13	13,2	15,6	18,8	23,3	30,2	43,3	56,6	81,6
14	14,2	16,8	20,2	24,9	32,4	46,7	60,0	86,6
15	15,2	18,0	21,5	26,6	34,7	50,1	63,3	91,6
16	16,3	19,1	22,9	28,3	37,0	53,6	66,6	96,6
17	17,3	20,3	24,3	30,1	39,3	57,1	70,0	101,6
18	18,3	21,5	25,7	31,8	41,6	60,6	73,3	106,6
19	19,4	22,7	27,1	33,6	44,0	64,2	76,6	111,6
20	20,4	23,9	28,5	35,3	46,4	67,8	80,0	116,6
21	21,4	25,1	30,0	37,1	48,8	71,5	83,3	121,6
22	22,5	26,3	31,4	38,9	51,2	75,1	86,6	126,6
23	23,5	27,5	32,9	40,7	53,7	78,8	90,0	131,6
24	24,6	28,7	34,3	42,6	56,1	82,5	93,3	136,6
25	25,6	29,9	35,8	44,4	58,6	86,3	96,6	141,6
26	26,7	31,1	37,2	46,2	61,1	90,1	100,0	146,6
27	27,7	32,4	38,7	48,1	63,6	93,9	103,3	151,6
28	28,8	33,8	40,2	49,9	66,1	97,7	106,6	156,6
29	29,9	34,8	41,7	51,8	68,6	101,6	110,0	161,6
30	30,9	36,1	43,1	53,7	71,1	105,5	113,3	166,6
31	32,0	37,3	44,6	55,6	73,7	109,4	116,6	171,6
32	33,1	38,5	46,1	57,5	76,2	113,3	120,0	176,6
33	34,1	39,8	47,6	59,4	78,8	117,3	123,3	181,6
34	35,2	41,0	49,2	61,3	81,4	121,3	126,6	186,6
35	36,3	42,3	50,7	63,2	84,0	125,4	130,0	191,6
36	37,3	43,5	52,2	65,1	86,6	129,5	133,3	196,6
37	38,4	44,8	53,7	67,1	89,3	133,6	136,6	201,6
38	39,5	46,1	55,3	69,0	91,9	137,7	140,0	206,6
39	40,6	47,3	56,8	71,0	94,5	141,8	143,3	211,6
40	41,7	48,6	58,3	72,9	97,2	146,1	146,6	216,6
41	42,8	49,9	59,9	74,9	99,9	150,4	150,0	221,6
42	43,8	51,1	61,4	76,8	102,6	154,7	153,3	226,6
43	44,9	52,5	63,0	78,8	105,4	159,0	156,6	231,6
44	46,0	53,7	64,5	80,8	108,1	163,4	160,0	236,6
45	47,1	55,0	66,1	82,8	110,9	167,8	163,3	241,6
46	48,2	56,3	67,7	84,8	113,6	172,3	166,6	246,6
47	49,3	57,6	69,3	86,8	116,4	176,7	170,0	251,6
48	50,4	58,9	70,8	88,8	119,2	181,2	173,3	256,6
49	51,5	60,2	72,4	90,9	122,0	185,7	176,6	261,6
50	52,6	61,5	74,0	92,9	124,8	190,4	180,0	266,6
51	53,6	62,8	75,6	94,9	127,6	195,1	183,3	271,6
52	54,9	64,1	77,2	97,0	130,5	199,7	186,6	276,6
53	56,0	65,5	78,8	99,1	133,4	204,5	190,0	281,6
54	57,1	66,8	80,4	101,1	136,2	209,3	193,3	286,6
55	58,2	68,1	82,1	103,2	139,2	214,1	196,6	291,6
56	59,3	69,4	83,7	105,3	142,1	218,9	200,0	296,6
57	60,5	70,8	85,3	107,4	145,0	223,9	203,3	301,6
58	61,6	72,1	86,9	109,5	148,0	228,8	206,6	306,6
59	62,7	73,4	88,6	111,6	150,9	233,8	210,0	311,6
60	63,9	74,8	90,2	113,7	153,9	238,9	213,3	316,6
61	65,0	76,1	91,9	115,9	156,9	244,0	216,6	321,6
62	66,1	77,5	93,5	118,0	160,0	249,2	220,0	326,6
63	67,3	78,8	95,2	120,1	163,0	254,4	223,3	331,6
64	68,4	80,2	96,8	122,3	166,1	259,7	226,6	336,6
65	69,6	81,5	98,5	124,5	169,2	265,0	230,0	341,6
66	70,7	82,9	100,2	126,6	172,3	270,4	233,3	346,6
67	71,9	84,3	101,9	128,8	175,4	275,9	236,6	351,6
68	73,0	85,6	103,6	131,0	178,5	281,4	240,0	356,6
69	74,2	87,0	105,3	133,2	181,7	287,0	243,3	361,6
70	75,3	88,4	107,0	135,4	184,9	292,6	246,6	366,6
71	76,5	89,8	108,7	137,7	188,1	298,3	250,0	371,6
72	77,7	91,2	110,4	139,9	191,3	304,0	253,3	376,6
73	78,8	92,6	112,1	142,1	194,5	309,9	256,6	381,6
74	80,0	93,9	113,8	144,4	197,8	315,8	260,0	386,6
75	81,2	95,3	115,5	146,7	201,1	321,7	263,3	391,6
76	82,3	96,7	117,3	148,9	204,4	327,6	266,6	396,6
77	83,5	98,2	119,0	151,2	207,7	333,6	270,0	401,6
78	84,7	99,6	120,8	153,5	211,0	340,0	273,3	406,6
79	85,9	101,0	122,5	155,8	214,4	346,5	276,6	411,6
80	87,1	102,4	124,3	158,1	217,8	353,0	280,0	416,6
81	88,3	103,8	126,0	160,5	221,2	359,5	283,3	421,6
82	89,5	105,2	127,8	162,8	224,6	366,0	286,6	426,6
83	90,7	106,7	129,6	165,2	228,1	372,5	290,0	431,6
84	91,9	108,1	131,4	167,5	231,6	379,0	293,3	436,6
85	93,1	109,5	133,2	169,9	235,1	385,5	296,6	441,6
86	94,3	111,0	135,0	172,2	238,6	392,0	300,0	446,6
87	95,5	112,4	136,8	174,7	242,2	398,5	303,3	451,6
88	96,7	113,9	138,6	177,1	245,8	405,0	306,6	456,6
89	97,9	115,3	140,4	179,5	249,4	411,5	310,0	461,6
90	99,1	116,8	142,2	181,9	253,0	418,0	313,3	466,6

Fuente: <https://ca.idexx.com/files/quant-tray-legiolert-insert.pdf>

ANEXO 9: Proceso de contaminación de un Huésped por la inhalación de aerosoles en Torre de Enfriamiento.



Fuente: <https://www.pinterest.es/pin/454230312392398051/>

ANEXO 10: Proceso de sensibilización de las instalaciones del proyecto de Legionella en Torres de Enfriamiento.

## **ENFERMEDAD DE LOS LEGIONARIOS: El Riesgos, manejo y su impacto en Instalaciones de Hoteles, Edificios, Hospitales y Cruceros.**

### DESCRIPCIÓN GENERAL DE OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

Este seminario proporcionará información sobre cómo los planes actuales de seguridad del agua a instalaciones (Hoteles, Hospitales, Edificios, Cruceros y otros) se pueden beneficiar las medidas para reducir la exposición a la *Legionella* y la enfermedad del legionario tanto para los clientes y el personal. Este seminario será presentada por el Dra. Jennifer Clancy de ESPRI, una experta en la materia altamente respetada con muchos años de experiencia en la calidad del agua, patógenos en el agua y las medidas de reducción de riesgos. Cada control preventivo en las instalaciones tiene un papel que desempeñar en la reducción de la exposición de la *Legionella* y la enfermedad del legionario, se unen a nosotros para aprender las mejores prácticas de la industria que se pueden implementar en sus instalaciones.

#### ¿CUÁNDO?

28 de Agosto de 2019  
8:30 a.m. - 3:30 p.m.

#### ¿CÓMO?

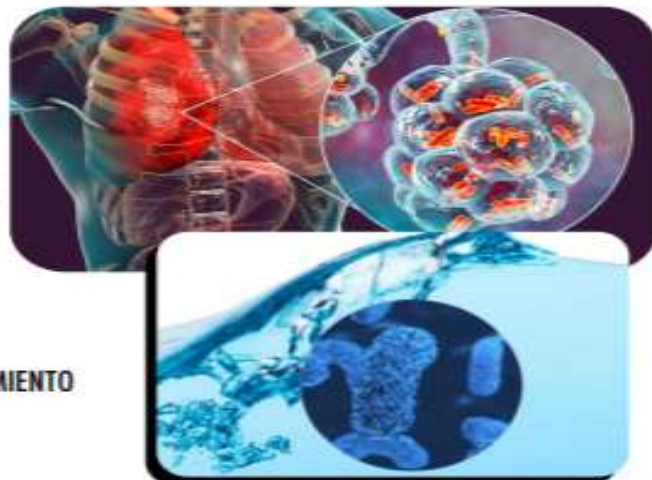
Registrarse via email:  
laboratorio@expertlab.co  
Tel. 226-6087 / 399-3582

#### ¿DÓNDE?

Club Unión,  
Calle Tomás Gabriel  
Duque Fina; Paitilla,  
Apdo. 081602959,  
Ciudad de Panamá

#### QUIÉN DEBE ASISTIR?

- ✓ LOS GESTORES DE SALUD PÚBLICA
- ✓ EPIDEMIOLOGOS
- ✓ FUNCIONARIOS DE SALUD AMBIENTAL
- ✓ ADMINISTRADORES DE HOTELES
- ✓ ADMINISTRADORES DE HOSPITALES
- ✓ DIRECTOR INGENIERÍA Y DE MANTENIMIENTO
- ✓ ADMINISTRADORES DE NAVIERAS



## DESCRIPCIÓN DEL CURSO

Este curso ofrecerá a los participantes una comprensión fundamental de cómo revisar los planes de gestión de la seguridad del agua actual para incluir elementos de las normas ANSI / ASHRAE 188, que son las mejores prácticas estándares de la industria y para gestionar mejor el control de *Legionella* en su instalación.

## EXPOSITORA



Jennifer Clancy, Ph. D., M S. Law, Presidente BCES  
President/ Executive Director ESPRI

La Dra. Jennifer Clancy es una microbióloga reconocida internacionalmente y experta en tratamiento y calidad del agua. En su papel actual como presidenta y miembro fundadora del Instituto de Ciencia, Política e Investigación Ambientales (ESPRI), la Dra. Clancy dirige el laboratorio de investigación aplicada que se centra en los patógenos del sistema de distribución siendo oportunistas. Trabaja con agencias estatales y federales, propietarios de edificios y administradores, hoteles y hospitales en la detección y control de *Legionella* en la construcción de suministros de agua, torres de enfriamiento y elementos decorativos de agua. El Dr. Clancy tiene más de 60 publicaciones revisadas en revistas reconocidas internacionalmente y es autora de varios capítulos de libros sobre microbiología y tratamiento del agua.

### Afiliaciones y Asociaciones Profesionales:

American Water Works Association (AWWA)

American Society of Microbiology (ASM))

Water Works Association de Canadá (CWWA)

Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater (SMWW)

Renuncia: Los fondos para esta conferencia fue posible gracias a IDEXX Laboratories Inc., Exppert-Lab y Biosolutions S.A. Las opiniones expresadas en forma escrita, materiales de conferencias o publicaciones y por los ponentes y moderadores no reflejan necesariamente las políticas oficiales de los organismos enumerados aquí, ni la mención de nombres comerciales.

# Agenda del Seminario



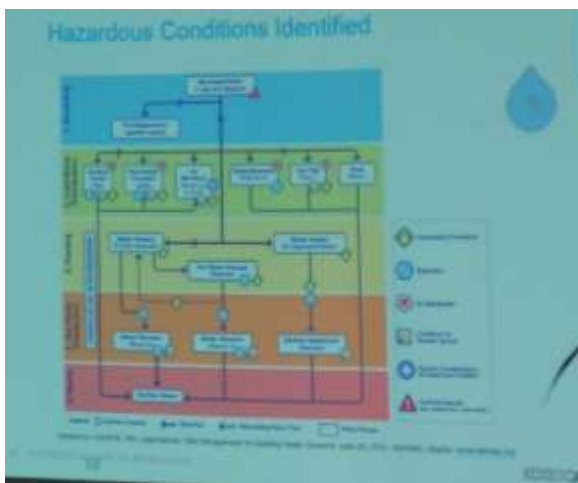
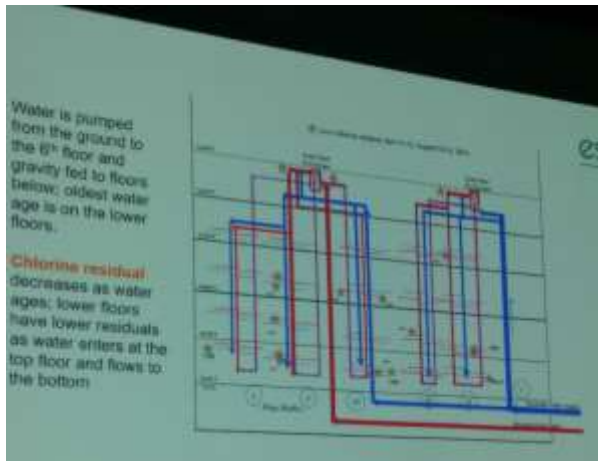
Tema 1	Actualización de la Norma de Calidad de Agua Potable. <i>Legionella pneumophila</i> : Normas Aplicables
Tema 2	<i>Legionella pneumophila</i> enfoque internacional y su interés sanitario. <ul style="list-style-type: none"> <li>- Una visión general de la enfermedad del Legionario.</li> <li>- ¿Por qué estamos aquí hablando de la enfermedad de los Legionarios?</li> <li>- Cómo diseñar y ejecutar un plan de gestión del agua para reducir el riesgo de enfermedad de los legionarios.</li> </ul>
Tema 3	Pruebas para garantizar la calidad del agua y validar la efectividad del plan.
Tema 4	El control de calidad microbiológico en agua con prevención a los Riesgos que afectan a la Salud Pública.

## “ ENFERMEDAD DE LOS LEGIONARIOS: RIESGO, MANEJO Y SU IMPACTO EN INSTALACIONES DE HOTELES, EDIFICIOS, HOSPITALES Y CRUCEROS ”


08:30 - 09:15	Inscripción
09:15 - 09:30	Licda. Liz Valenzuela Y Ing. Jose Morris
09:30 - 10:00	Ing. Joseph Gallardo-DGNTI (MINISTERIO DE COMERCIO E INDUSTRIAS)- Tema N° 1
10:00 - 10:30	Coffee
10:30 - 12:30	Dra. Jennifer Clancy- Presidenta/ Directora Ejecutiva de ESPRI (Instituto de Ciencias, Política y Investigación Ambientales) - Tema N° 2
12:30 - 1:15	Buffet
1:15 - 01:30	Kristin Majeska- Senior Manager, Strategic Initiatives, IDEXX LABORATORIES-Tema N° 3
01:30 - 01:50	Sonia O Donell- Regional Sales Manager IDEXX Water LAD -IDEXX LABORATORIES Tema N° 4
01:50 - 03:15	Dra. Jennifer Clancy- Presidenta/ Directora Ejecutiva de ESPRI (Instituto de Ciencias, Política y Investigación Ambientales) -Tema N° 2
03:15 - 03:30	Cierre Sesión de preguntas.

Fecha: 28 de agosto del 2019  
Lugar: Club Unión, Salón Ensenada  
Calle 56 Este, Punta Paitilla

Seminario de Enfermedad del *Legionella* -Efectuado en el mes de octubre con un total de 80 personas de Instalaciones que cuenta con torres de enfriamiento.



Seminario de la NSF para actualización de *Legionella pneumophila* a nivel de mundo para generar una inducción individual a las instalaciones que manejan Torres de enfriamiento.



## Organizing *Legionella* Outbreak Investigations

Tuesday, September 10 | 9 AM - 5 PM

**Presented by:** NSF International, Ron George, CFD, Harb-Tech Design & Consulting Services, LLC

**Overview:** This pre-conference workshop will provide public health officials and inspectors with the tools necessary to perform an environmental investigation of a healthcare facility during an outbreak of a waterborne disease, such as Legionnaires' disease. Participants will gain an understanding of how to evaluate the implementation of a water management program, how to use a flow diagram to follow the path of water, and how to identify potentially hazardous conditions in a facility.

### AGENDA



- 8:00 - 10:00 AM:** Introduction and background
  - What outbreak of Legionella
  - Response strategies of public health agencies
  - Water management plans - Making a sufficient determination of the plan and its implementation - Common gaps that drive risk
- 10:00 - 11:45 AM:** Flow diagrams - where is water moving, what systems are involved
- 11:00 AM - 12:00 PM:** Organizing the walkthrough for potable, efflu, and medical water systems
- 12:00 - 12:30 PM:** Tracing systems - Identifying risk factors - Examples of well-maintained and poorly maintained systems - Examples of poor design that drive risk factors
- 12:30 - 2:00 PM:** Lunch (participants on their own)
- 2:00 - 2:30 PM:** Tracing systems (Cont.)
- 2:30 - 3:00 PM:** Medical device/medical engineering - Breaking down the systems and their risk profiles
- 3:00 - 3:30 PM:** Tailoring strategies for different types of water systems and developing the consulting plan based on environmental assessment
- 3:30 - 5:00 PM:** Moderated questions applying what was learned - Real world examples of environmental investigators



Seminario en apoyo de Expositor en controles de calidad para *Legionella* a la compañía BIOMAX (encargada del proceso de L+D de las torres de enfriamiento)



ANEXO 11: Resultados de muestras de Legionella pneumophila positivas detectadas en agua de la Torre de enfriamiento a los laboratorios externos de LRSP (Instituto Gorgas- Panamá) y Eurofins- EMLab P&K (Laboratorio ubicado en USA-Aprobado por a CDC).

		<b>EMLab P&amp;K</b>
<b>Report for:</b>		
<b>MSGT ICELA TEJEIRA DE PALMA</b> <b>Expert-Lab., Inc. - Grupo BTG</b> AN FRANCISCO, CASA N 5, PLANTA BAJA FRENTE A MULTIPLAZA, RIBA MISTH, ENTRE MYTA KYOCERA Y EL DEPOSRTISTA Y LA NOTA. PANAMA, 0830-01351 PA		
<hr/>		
<b>Regarding:</b>	Project: N/A EML ID: 2441719	
<b>Approved by:</b>	<b>Dates of Analysis:</b> Legionella-ISO method: 07-31-2020	
		
Technical Manager Ariunaa Jalsrai		
Service SOPs: Legionella-ISO method (EM-BT-S-1045) AIHA-LAP, LLC accredited service, Lab ID #103005		
<hr/>		
All samples were received in acceptable condition unless noted in the Report Comments portion in the body of the report. Due to the nature of the analyses performed, field blank correction of results is not applied. The results relate only to the samples as received.		
Eurofins EMLab P&K ("the Company") shall have no liability to the client or the client's customer with respect to decisions or recommendations made, actions taken or courses of conduct implemented by either the client or the client's customer as a result of or based upon the Test Results. In no event shall the Company be liable to the client with respect to the Test Results except for the Company's own willful misconduct or gross negligence nor shall the Company be liable for incidental or consequential damages or lost profits or revenues to the fullest extent such liability may be disclaimed by law, even if the Company has been advised of the possibility of such damages, lost profits or lost revenues. In no event shall the Company's liability with respect to the Test Results exceed the amount paid to the Company by the client therefor.		
Eurofins EMLab P&K's LabServe® reporting system includes automated fail-safes to ensure that all AIHA-LAP, LLC quality requirements are met and notifications are added to reports when any quality steps remain pending.		
EMLab P&K, LLC		EMLab ID: 2441719, Page 1 of 2

**Eurofins EMLab P&K**3000 Lincoln Drive East, Suite A, Marlton, NJ 08053  
(866) 871-1984 Fax (856) 334-1040 www.emlab.comClient: Expert-Lab., Inc. - Grupo BTG  
C/O: MSGT ICELA TEJEIRA DE PALMA  
Re: N/ADate of Sampling: 07-12-2020  
Date of Receipt: 07-15-2020  
Date of Report: 07-31-2020**QUANTITATIVE LEGIONELLA REPORT**

Location:	3023		3055		3438		3674		3675	
Comments (see below)	A		B		A		A		A	
Lab ID-Version‡:	11645793-1		11645803-1		11645804-1		11645805-1		11645806-1	
Analysis Date:	07/31/2020		07/31/2020		07/31/2020		07/31/2020		07/31/2020	
Sample type	Swab sample		Swab sample		Swab sample		Swab sample		Swab sample	
Volume filtered (ml)	N/A		N/A		N/A		N/A		N/A	
Reporting Units	1 swab		1 swab		1 swab		1 swab		1 swab	
Detection Limit†	< 100		< 100		< 100		< 100		< 100	
Analytical Sensitivity†	< 2,000		< 2,000		< 2,000		< 2,000		< 2,000	
	raw ct.	cfu*/unit	raw ct.	cfu*/unit	raw ct.	cfu*/unit	raw ct.	cfu*/unit	raw ct.	cfu*/unit
<i>L. pneumophila</i> serotype 1					500	1,000,000				
<i>L. pneumophila</i> serotype 5	500	1,000,000	210	420,000			500	1,000,000	500	1,000,000
Other Legionella species										
<b>§TOTAL Legionella</b>	<b>500</b>	<b>1,000,000</b>	<b>210</b>	<b>420,000</b>	<b>500</b>	<b>1,000,000</b>	<b>500</b>	<b>1,000,000</b>	<b>500</b>	<b>1,000,000</b>

\*cfu = colony forming units ND = none detected

**Comments:** A) Out of holding time - method deviation. Enumeration greater than 500 cfu/plate was observed but cannot be accurately reported. B) Out of holding time - method deviation.

For water samples, the submitted volume affects dilution factor and limit of detection. A sample volume of at least 200ml is recommended for potable water samples for environments with high-risk populations and some other applications. Guidance on sampling, action thresholds and other relevant information can be found at (<https://www.osha.gov>) as well as other international, national and local agencies.

Identifiers listed without a count or data entry were not detected during the course of the analysis for the respective sample.

"Other Legionella species" include, but are not limited to, the following organisms: *Legionella anisa*, *Legionella bozemanii*, *Legionella dumoffii*, *Legionella gormanii*, *Legionella jordanii*, *Legionella longbeachae 1 and 2*, and *Legionella micdadei*.

† The limit of detection is a raw count of 1 at the lowest dilution plated, represented here as a theoretical detection limit of 1 raw count/ reporting unit x the dilution factor on the lowest dilution plated. The analytical sensitivity is represented as being equal to 1 raw count/ reporting unit x the dilution factor, but on the on the lowest reportable (or countable) dilution plated.

§ Total CFU/unit has been rounded to two significant figures to reflect analytical precision.

‡ A "Version" indicated by "-x" after the Lab ID# with a value greater than 1 indicates a sample with amended data. The revision number is reflected by the value of "x".



**República de Panamá**  
**Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud**  
**Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública**

*Reporte de Resultados*

**Datos Generales**

Orden: 201905280060  
 Fecha de Ingreso: 2019-05-28  
 Fecha Toma: Sin Dato

Servicio: DIAGNOSTICO DE REFERENCIA  
 Evento: Diagnóstico y Confirmación

**Procedencia de la muestra**

Región: Panamá  
 Referida por: EXPERT LAB. INC / MSC.ICELA TEJE  
 Instalación: OTROS

**Datos del Paciente**

Paciente: 2501 2501  
 Cédula: 2501  
 Sexo: Sin Dato  
 Teléfono: S/N  
 Dirección:

Tipo Identificación: Código  
 Edad: SIN DATO

Distrito: Panamá  
 Provincia: Panamá  
 Corregimiento:

**MICROBIOLOGÍA CLÍNICA****Diagnóstico y Confirmación****Detección de Bacterias por PCR-PF****RESULTADO:**

PCR Positiva para *Legionella pneumophila*

Metodología: PCR Convencional (Punto final)  
 Tipo de muestra: Ambiental (Torre de enfriamiento)

Fecha Recepción de la Muestra : 2019-05-28 15:09

Fecha Procesamiento de Muestra : 2019-05-31

Tecnólogo Médico  
 Responsable:

Lic./Rubén D. Ramos C.  
 Tecnólogo Médico  
 Registro 1159

Validado por:

Licda. Marilyn Pérez  
 Tecnóloga Médica  
 Reg. 1933 Fole 337

Registro: 1159

Registro:

1933

Usuario: Ruben Ramos

Usuario:

Marilyn Pérez

Fecha de Informe de Resultado : 2019-06-07 08:44

**Observaciones :**

"LÍDERES DE LA INVESTIGACIÓN, COMPROMETIDOS CON LA SOLUCIÓN DE LOS PROBLEMAS DE LA SALUD"  
 Ave. Justo Arosemena y Calle 35 · Tel.: (507) 527-4800/4868/4834  
 Apartado Postal N° 0816-02593, Panamá, República de Panamá.  
 correo electrónico: microbiologiaclinica@gorgas.gob.pa  
 www.gorgas.gob.pa



República de Panamá  
 Instituto Comemorativo Gorgas de Estudios de la Salud  
 Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública

## Reporte de Resultados

**Datos Generales**

Orden:	201905280059	Servicio:	DIAGNOSTICO DE REFERENCIA	Región:	Panamá
Fecha de Ingreso:	2019-05-28	Evento:	Diagnóstico y Confirmación	Referida por:	EXPERT LAB, INC / MSC.ICELA TEJE
Fecha Toma:	Sin Dato	Instalación:	OTROS		

**Procedencia de la muestra****Datos del Paciente**

Paciente :	2500 2500	Tipo Identificación:	Código	Distrito:	Panamá
Cédula:	2500	Edad:	SIN DATO	Provincia:	Panamá
Sexo:	Sin Dato			Corregimiento:	
Teléfono:	S/N				
Dirección:					


**MICROBIOLOGÍA CLÍNICA****Diagnóstico y Confirmación****Detección de Bacterias por PCR-PF****RESULTADO:**PCR Positiva para *Legionella pneumophila*

Metodología: PCR Convencional (Punto final)  
 Tipo de muestra: Ambiental (Torre de enfriamiento)

Fecha Recepción de la Muestra : 2019-05-28 15:10

Fecha Procesamiento de Muestra : 2019-05-31

Tecnólogo Médico  
Responsable:

  
 Lic. Rubén D. Ramos C.  
 Tecnólogo Médico  
 Registro 1159

Validado por:

  
 Licda. Marilyn Pérez  
 Tecnóloga Médica  
 Reg. 1933 Falso 337

Registro: 1159  
 Usuario: Ruben Ramos

Registro: 1933  
 Usuario: Marilyn Pérez

Fecha de Informe de Resultado : 2019-06-06 14:59

**Observaciones :**

"LÍDERES DE LA INVESTIGACIÓN, COMPROMETIDOS CON LA SOLUCIÓN DE LOS PROBLEMAS DE LA SALUD"

Ave. Justo Arosemena y Calle 35 - Tel.: (507) 527-4800/4866/4834  
 Apartado Postal N° 0816-02593, Panamá, República de Panamá.  
 correo electrónico: microbiologiaclinica@gorgas.gob.pa  
 www.gorgas.gob.pa



República de Panamá  
**Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud**  
 Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública

Reporte de Resultados

**Datos Generales**

Orden: 201905280057  
 Fecha de Ingreso: 2019-05-28  
 Fecha Toma: Sin Dato

Servicio: DIAGNOSTICO DE REFERENCIA  
 Evento: Diagnóstico y Confirmación

**Procedencia de la muestra**

Región: Panamá  
 Referida por: EXPERT LAB. INC / MSC.ICELA TEJE  
 Instalación: OTROS

**Datos del Paciente**

Paciente : 2146 2146  
 Cédula: 2146  
 Sexo: Sin Dato  
 Teléfono: S/N  
 Dirección:

Tipo Identificación: Código  
 Edad: SIN DATO

Distrito: Panamá  
 Provincia: Panamá  
 Corregimiento:

**MICROBIOLOGÍA CLÍNICA**

**Diagnóstico y Confirmación**

**Detección de Bacterias por PCR-PF**

**RESULTADO:**


PCR Positiva para *Legionella pneumophila*

Metodología: PCR Convencional (Punto final)  
 Tipo de muestra: Ambiental (Torre de enfriamiento)


Fecha Recepción de la Muestra : 2019-05-28 15:10

Fecha Procesamiento de Muestra : 2019-05-31

Tecnólogo Médico  
 Responsable:

  
 Lic. Rubén D. Ramos C.  
 Tecnólogo Médico  
 Registro 1159

Validado por:

  
 Licda. Marilyn Pérez  
 Tecnóloga Médica  
 Reg. 1933 Fmlo 337

Registro: 1159

Usuario: Ruben Ramos

Fecha de Informe de Resultado : 2019-06-06 14:58

Registro:

Usuario:

1933

Marilyn Pérez



**Observaciones :**



Validation of analysis methods  
NF148 - Application to water

# Certificate

Certificate No.: **IDX 33/06-06/19**  
Validation decision dated: **18-06-2019**  
Expiry date: **18-06-2023**

The Company:

**IDEXX Laboratories, Inc.**  
1 IDEXX Drive  
Westbrook, Maine 04092 - Etats-Unis

Is authorized to affix the NF VALIDATION mark on the analysis method cited below, in accordance with the NF VALIDATION general rules and the certification rules NF148 - Validation of alternative analysis methods (Application to water):

## Legiolert / QuantiTray-Legiolert

Validated for the enumeration of *Legionella pneumophila*

Technical sheet  
reference's

Legiolert : 06-0005740-08  
Quanti-Tray Legiolert : 06-0005757-01

This decision attests that the analysis method has been assessed by AFNOR Certification and found to conform to the standards cited in page 2/2 and complementary requirements, as specified in the certification reference document. The principal certified characteristics are the "analytical performances" as defined in the associated validation study summarized report (relative sensitivity and linearity, detection limit...), available on the certification dedicated website <http://nf-validation.org/en>.

This NF VALIDATION certificate, included 2 pages, is valid until June 18<sup>th</sup>, 2023. It is subject to the results obtained upon regular controls carried out by AFNOR Certification. Appropriate decision is made by AFNOR Certification in accordance with the NF VALIDATION general rules and certification rules NF148 - Validation of alternative analysis methods (Application to water).



  
Managing Director  
Franck LEBEUGLE

Issue dated: 18/06/2019

Page: 1/2

ANEXO 13: Registros de cadena de custodia realizada durante el muestreo del proyecto de análisis de LP en torres de enfriamiento

R.U.C. 43173-0021-290700 D.V. 23  
 Via Israel Casa No. Oficina No.2  
 San Francisco, Multiplaza  
 Telefax: (507)226-8067 / 399-3582  
[laboratorio@expertlab.co](mailto:laboratorio@expertlab.co)  
[www.expertlab.co](http://www.expertlab.co)



**Expert-Lab., Inc.**  
 Registro de Recibo de Muestra y Cadena de Custodia

Código: Exp-Lab-RL-01  
 Versión 4  
 Página 2 de 3

Parámetros físico químicos

N°	Tipo	CR	CONDUCTIMETRO			TURBIDIMETRO	Hach test kit hierro y manganeso		Hanna total clorine	Hanna free clorine	All clear test kit		
			pH	Cond. ( $\mu\text{S/cm}^2$ )	T° (°C)	Turb. (NTU)	Fe (mg/L)	Mn (mg/L)	Cl-T (ppm)	Cl-L (ppm)	pH	Cl	Br
1	APN	4188	8.50	904	31.7	2.49	0	0.2	0.06	0.00	8.2	10.6	1.3
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													

CR: código de recibo; pH: Potencial de Hidrogeno; Cl-T: cloro total; Cl-L: cloro libre; cond.: conductividad; turb.: turbiedad; Fe: Hierro; Mn: manganeso; ppm: partes por millón; Br: Bromo.

ANEXO 14: Tabla que muestra las normas internacionales sobre el control de Legionella en agua potable y agua no potable

Country	Body	Type of Rule	Potable limit	Nonpotable limit
United States	CDC	Guidance	Depends on Risk Management Plan	
	ASHRAE	Guidance	Depends on Risk Management Plan	
	AIHA	Guidance	≥ 10 cfu/mL	≥ 100 cfu/mL
	OSHA	Guidance	≥ 10 cfu/mL	≥ 100 cfu/mL
	VA Directive 1061	Guidance	Any positive	NA
	New York State Dept. of Health	Law	≥ 30% "positive" outlets (healthcare only)	≥ 10 cfu/mL
France	Ministry of Health	Law	≥ 1 cfu/mL	
Germany	Trinkwasserverordnung - TrinkwV 2001	Law	≥ 1 cfu/mL	
Canada	Quebec	Law	NA	≥ 10 cfu/mL

	Entity	Type of rule	Potable water limit
United States	CDC	Guidance	Depends on Risk Mgmt Plan
	ASHRAE	Guidance	Depends on Risk Mgmt Plan
	AIHA	Guidance	≥ 10 cfu/mL
	OSHA	Guidance	≥ 10 cfu/mL
	VA Directive 1061	Guidance	Any positive
	New York State Dept. of Health	Legislation	≥ 30% "positive" outlets (healthcare facilities only)
France	Ministry of Health	Legislation	≥ 1 cfu/mL
Germany	Trinkwasserverordnung - TrinkwV 2001	Legislation	≥ 1 cfu/mL

Fuente: IDEXX LABORATORIES/PPT

*ANEXO 15: Laboratorio a nivel de Panamá que han implementado técnicas de detección de Legionella*

<b>ANALISIS</b>	<b>Expert-Lab., INC*</b>	<b>ITS FOODS</b>	<b>LATEQ</b>
<i>P/A Legionella sp</i>	•	•	•
<i>Enumeracion de Legionella pneumophila</i>	•		
<i>Deteccion de L.pneumophila S1</i>	•		
<i>Deteccion de L.pneumophila S2-S15</i>	•		
<i>Aprobaciones</i>	MINSA <sup>++</sup> y CAN*	MINSA	MINSA

**Tiempo de Experiencia en hacer el análisis:**

- EXPERT-LAB., INC: Desde el 2007
- ITS FOODS: Desde el 2018
- LATEQ: Desde el 2019

A través de los años con las implementaciones generadas, cada día más es solicita estos análisis de *Legionella pneumophila* por los clientes. Este microorganismo que forma partes de legislaciones internacionales incluyendo controles solicitados por el área del turismo internacional. Marcas Hoteles internacional contemplan dentro del programa de seguridad de agua (PSA) los controles de *Legionella* en diversas fuentes como: agua de ducha, agua caliente, Agua fría y aguas de las torres de enfriamiento.

ANEXO 16: Factores de riesgo que promueve el crecimiento de Legionella.



Biofilm incrustado en las torres de enfriamiento, contribuye al crecimiento y protección de la *Legionella pneumophila*



Temperatura de 29.5 °C de las torres de enfriamiento ideal para la *proliferación de Legionella pneumophila*



Biofilm en las torres de enfriamiento promueve la protección y crecimiento de *Legionella pneumophila*



Infraestructura con deterioro puede promover el crecimiento de *L. pneumophila*



Biofilm incrustado en las torres de enfriamiento, contribuye al crecimiento y protección de la *Legionella pneumophila*



*Factores extrínsecos puede promover la proliferación de Legionella pneumophila (LP).*



Dosificadores automáticos de biocidas están dañado. Torres con ausencia de un biocida.

Presencia de sedimentos en las torres de enfriamiento que contribuye al crecimiento de LP.

*ANEXO 17: Factores Extinticos e Intrínsecos que pueden promover el crecimiento de Legionella*

**Factores externos a los edificios que pueden conducir a crecimiento de *Legionella*:**

- **Construcción:** Las vibraciones y los cambios en la presión del agua pueden desplazar la biofilm y liberarla la *Legionella* en el agua que ingresa a su edificio.
- **Saltos principales de agua:** Los cambios en la presión del agua pueden desalojar la biofilm y liberarla la *Legionella* en el agua, mientras que la suciedad y otros materiales pueden introducirse en el agua y entrar en contacto con el desinfectante.
- **Cambios en la calidad del agua municipal:** Los cambios en la calidad del agua pueden aumentar los sedimentos, disminuir los niveles de desinfectante, aumentar la turbidez o hacer que el pH estén fuera de los rangos recomendados. Los cambios en el tipo de desinfectante pueden afectar cómo debe monitorear su programa

**Factores internos de los edificios que pueden conducir a crecimiento *Legionella*:**

- **Biofilm:** Protegen la *Legionella* del calor y desinfectante; proporciona comida y refugio a los gérmenes; crece en cualquier superficie que esté constantemente húmeda y pueda durar décadas
- **Escama y sedimento:** Utiliza desinfectante y crea un hogar protegido para *Legionella* y otros gérmenes
- **Fluctuaciones de temperatura del agua:** Proporcionar condiciones donde *Legionella* crece mejor (77 ° F – 108 ° F); *Legionella* todavía puede crecer fuera de este rango
- **Cambios en la presión del agua:** Puede hacer que la biofilm se desaloje, colonizando dispositivos aguas abajo.
- **pH:** Los desinfectantes son más efectivos dentro de un rango estrecho (aproximadamente 6.5 a 8.5) Muchas cosas pueden hacer que la temperatura del agua caliente caiga dentro del rango donde *Legionella* puede crecer, incluyendo configuraciones bajas en calentadores de agua, pérdida de calor a medida que el agua viaja a través de largas tuberías lejos de la fuente de calor, mezclando agua fría y caliente dentro del sistema de plomería, transferencia de calor (cuando las tuberías de agua fría y caliente están demasiado juntas), o pérdida de calor debido al estancamiento del agua. En climas cálidos, el agua fría en las tuberías puede calentarse en este rango.

Fuente: (CDC, 2017)

### Anexo G (Informativo)

#### Eficacia del hipoclorito sódico en función del pH

Cuando para la desinfección se utilice cloro, en forma de hipocloritos hay que tener en cuenta que su acción biocida depende del pH y de la temperatura del agua, la acción desinfectante del cloro disminuye mucho a  $\text{pH} \geq 9,0$ .

El hipoclorito sódico disuelto en el agua se encuentra principalmente en forma de ácido hipocloroso e ión hipoclorito, denominado cloro libre. Ambas formas están en equilibrio, pero la capacidad desinfectante del ácido hipocloroso (también llamado cloro activo) es bastante mayor que la del ión hipoclorito. En función del valor del pH del agua este equilibrio se desplaza según puede verse en la figura G.1:

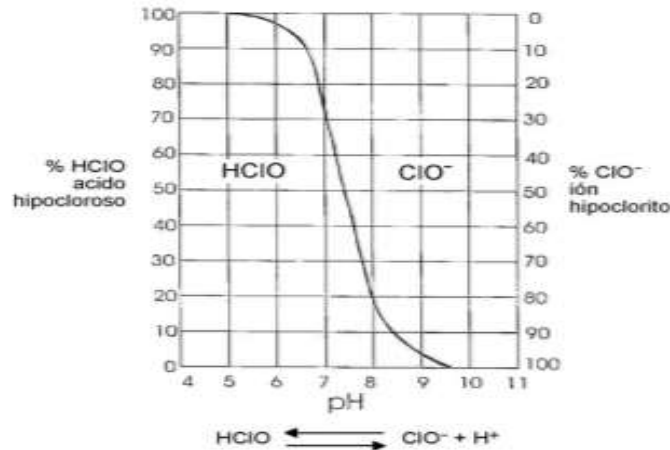


Figura G.1 - Curva de equilibrio del ácido hipocloroso con el ion hipoclorito

Teniendo en cuenta que el agente desinfectante es el ácido hipocloroso, a  $\text{pH} = 7,0$  aproximadamente el 75% del cloro libre está en forma de ácido hipocloroso, con un buen efecto de desinfección, mientras que a  $\text{pH} = 8,0$  solamente el 20% del cloro libre está en forma de ácido hipocloroso, con una capacidad de desinfección muy reducida.

Si el pH del agua es superior a 8 se deben usar elevadas dosis de cloro con un importante riesgo de que se formen derivados clorados.

Así pues, en todo sistema de desinfección en continuo, basado en hipoclorito sódico es necesario disponer además, de un control y una regulación automática del valor de cloro, y en ocasiones también del pH.

La adición de cloro, en cualquiera de sus formas, primero oxida las sustancias susceptibles de ser oxidadas (materia orgánica, etc.). Por ello, conseguir una buena cloración, hay que rebasar el "punto de ruptura" ("break point" o punto de ruptura por demanda de cloro), en función de las características de cada agua.

Por otra parte, hay que tener presente que la aplicación de hipoclorito incrementa los fenómenos de corrosión sobre los elementos metálicos del sistema. Por tanto, cuando se utilice cloro para desinfección en continuo o en desinfecciones preventivas o de choque es recomendable utilizar productos anticorrosivos compatibles y autorizados para su uso.

Las concentraciones de cloro libre residual que se citan en esta norma se refieren a un agua que tiene un pH entre 7,0-8,0.

Fuente: (UNE100030, 2017)