

INFORME BREVE

Presencia de *Legionella* spp. en depósitos domiciliarios de agua potable en Resistencia, Chaco, Argentina. Informe preliminar



Liliana S. Lösch^{a,b,*} y Luis A. Merino^{a,b}

^a Área de Bacteriología, Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Chaco, Argentina

^b Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina

Recibido el 4 de abril de 2016; aceptado el 5 de julio de 2016

Disponible en Internet el 28 de octubre de 2016

PALABRAS CLAVE

Legionella spp.;
Cultivo;
Agua potable;
Tanques de
almacenamiento

Resumen *Legionella* spp. es una bacteria ambiental capaz de sobrevivir en un amplio intervalo de condiciones fisicoquímicas y puede colonizar los sistemas de distribución y almacenamiento del agua potable. *Legionella pneumophila* es el principal patógeno transmitido por el agua y produce el 90% de los casos de legionelosis. El objetivo del presente trabajo fue detectar por cultivo la presencia de *Legionella* spp. en depósitos domiciliarios de agua potable de la ciudad de Resistencia, Chaco. La detección de *Legionella* en las muestras de agua se realizó por cultivo según lo establecido en la norma ISO 11731:1998. Se analizaron 32 muestras de agua y de 12 (37,5%) de ellas se recuperaron cepas de *Legionella* spp. La vigilancia de este microorganismo en el agua de consumo humano representa el primer paso para controlar su diseminación hacia huéspedes susceptibles.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Legionella spp.;
Culture method;
Drinking water;
Storage tanks

Presence of *Legionella* spp. in household drinking water reservoirs in Resistencia, Chaco, Argentina. Preliminary report

Abstract *Legionella* spp. is an environmental bacterium that can survive in a wide range of physicochemical conditions and may colonize distribution systems of drinking water and storage tanks. *Legionella pneumophila* is the major waterborne pathogen that can cause 90% of Legionnaires' disease cases. The aim of this study was to detect the presence of *Legionella* spp. in household drinking water tanks in the city of Resistencia, Chaco. The detection of *Legionella* in water samples was performed by culture methods as set out in ISO 11731:1998.

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: silvinalosch@gmail.com, silvinalosch@yahoo.com.ar (L.S. Lösch).

Thirty two water samples were analyzed and *Legionella* spp. was recovered in 12 (37.5%) of them. The monitoring of this microorganism in drinking water is the first step towards addressing the control of its spread to susceptible hosts.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

El género *Legionella* engloba a 54 especies y más de 70 serogrupos^{2,5}. Si bien más de la mitad de las especies causan enfermedades en el hombre, es *Legionella pneumophila* la que origina la mayor proporción de las infecciones (más del 90%). Esta especie fue relacionada por primera vez con cuadros de neumonía en 1977. Dentro de esta especie, el serogrupo 1 es el agente etiológico del 80% de los casos de legionelosis. Las infecciones por *Legionella* pueden presentarse como casos esporádicos o bien como brotes, pero en ambas circunstancias resulta difícil determinar la fuente de infección^{11,14}.

Legionella es un bacilo gramnegativo ampliamente distribuido en los ecosistemas acuáticos, donde puede sobrevivir en un amplio rango de condiciones fisicoquímicas². A partir del ambiente puede pasar a colonizar los sistemas de abastecimiento de aguas de las ciudades y, a través de la red de distribución, incorporarse a los sistemas de almacenamiento del agua potable o bien a otros sistemas que requieren agua para su funcionamiento, como las torres de refrigeración⁵. Si en la instalación existe un mecanismo productor de aerosoles, la bacteria puede dispersarse en el aire y, de hecho, la inhalación de aerosoles es la vía más frecuente de infección¹⁶.

La legionelosis afecta particularmente a personas con el sistema inmunitario debilitado y se puede presentar en 2 formas clínicas diferenciadas: la infección pulmonar (o «enfermedad del legionario») y la forma no neumónica, conocida como «fiebre de Pontiac»^{2,16}.

Las infecciones por este microorganismo son un importante problema de salud pública en Estados Unidos y Europa; se ha registrado un aumento de casos en los últimos años que han dado origen a importantes brotes, tanto en la comunidad como asociados a hospitales y hoteles^{3,6,12,13}.

Se desconoce la incidencia de legionelosis en Latinoamérica y son pocos los trabajos existentes en nuestro país, situación posiblemente atribuible a la presentación en forma de casos esporádicos y no de brotes; se ha informado una incidencia de aproximadamente el 2% de todas las neumonías^{9,10}.

El reconocimiento del nicho ecológico de *Legionella* es el primer paso para poder abordar el control de su diseminación y la prevención de la legionelosis; para ello se requiere implementar una normativa internacional en relación con este tema^{5,16}.

Los métodos de detección de *Legionella* en aguas incluyen el cultivo y la identificación, el enzoinmunoanálisis y la amplificación de un fragmento específico del genoma bacteriano mediante las técnicas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR) y en tiempo

real (qPCR). El cultivo permite la detección y la identificación de cualquier especie y realizar estudios posteriores, y es el método de referencia para el cual existen varios ensayos normalizados, como la norma ISO 11731. No obstante, posee una serie de limitaciones dadas por la naturaleza fastidiosa de este microorganismo, que lleva a que se requieran períodos prolongados de incubación; la presencia de flora acompañante, que dificulta su aislamiento; y la secuencia de preparación de la muestra ambiental, que puede disminuir su concentración inicial. Otra limitación es la imposibilidad de detectar células viables no cultivables, las que mantienen su capacidad infectiva. Por otro lado, los métodos más rápidos y sensibles, como lo son las técnicas moleculares, permiten la detección de *Legionella* a muy bajas concentraciones y de material genético proveniente de células muertas, viables no cultivables, o de legionelas presentes en amebas. Un resultado positivo por esta técnica tan sensible no siempre podría implicar algún riesgo para la salud. Además, la presencia de inhibidores en la muestra ambiental, que pueden llevar a un resultado falso negativo, constituye otra limitación de orden práctico^{2,5,7}.

En la Argentina, el agua destinada al consumo humano debe cumplir con los requisitos de aptitud microbiológica establecidos por el Código Alimentario Argentino; sin embargo, *Escherichia coli* o los coliformes no son indicadores adecuados de la presencia o ausencia de *Legionella*^{1,16}.

El objetivo del presente trabajo fue detectar mediante cultivo la presencia de *Legionella* spp. en depósitos domiciliarios de agua potable de la ciudad de Resistencia, Chaco.

El muestreo se realizó entre los meses de abril y diciembre de 2015. Se analizó el agua procedente de los depósitos domiciliarios de agua potable de la ciudad de Resistencia. La detección de *Legionella* en las muestras de agua se realizó por cultivo, según lo establecido en la norma ISO 11731:1998. En cada vivienda se seleccionó el grifo conectado directamente al tanque de almacenamiento que no hubiera sido utilizado durante las 12-24 h previas al muestreo. En cada punto se tomó el primer litro de agua en un recipiente estéril (muestra proximal), el cual se transportó a temperatura ambiente al laboratorio, donde se inició su procesamiento de manera inmediata.

Las muestras se concentraron por filtración, usando membranas de 0,45 µm. Posteriormente, las membranas se transfirieron a 10 ml de buffer Ringer 1/40 y se agitaron durante 2 min con vórtex. Alícuotas de 0,5 ml se sembraron en placas con medio selectivo GVPC (Oxoid), el que fue preparado adicionando cisteína, glicina, vancomicina, polimixina B y cicloheximida (suplementos SR0110A y SR0152E Oxoid) al agar Buffered Charcoal Yeast Extract,

BCYE (Oxoid). Paralelamente, otra alícuota de 0,5 ml se sometió a tratamiento térmico (50 °C durante 30 min) y se sembró en el mismo medio.

Se utilizó como control positivo una muestra de agua inoculada con la cepa *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* (ATCC® 33152™). La concentración del inóculo fue de 3×10^8 UFC/ml. Las placas se incubaron durante 7 días. En aquellos casos en los que se evidenció crecimiento bacteriano, se seleccionaron colonias características, que fueron subcultivadas en agar BCYE con cisteína o sin esta (suplementos SR0110A y SR0175A Oxoid)^{2,8,14}.

Se definió como muestra positiva aquella de la cual se recuperaron cepas que crecieron en el subcultivo en agar BCYE con cisteína y no crecieron en el mismo medio sin el agregado de cisteína; estas se identificaron como *Legionella* spp. siguiendo la normativa internacional.

Se analizaron 32 muestras obtenidas de depósitos domiciliarios de agua potable de Resistencia. El número de muestras analizadas representó el 0,03% de los hogares conectados a la red pública del departamento San Fernando, del cual Resistencia es su capital. En 12 (37,5%) de las muestras se aislaron colonias de *Legionella* spp. El rango de concentraciones encontradas fue de 40 UFC/l a $1,4 \times 10^3$ UFC/l.

La presencia de *L. pneumophila* y otras especies de *Legionella* fue reportada en sistemas de distribución y almacenamiento de agua potable en diferentes países. Los resultados preliminares de aislamiento de *Legionella* spp. con la técnica de referencia obtenidos en este trabajo difieren de los datos comunicados por investigadores de otras partes del mundo. Así, Serrano-Suárez et al. informaron un 27% de muestras positivas para *L. pneumophila* en el sistema de agua caliente de hoteles de Cataluña, España¹⁴. En la evaluación de 2 sistemas de distribución de agua potable de Estados Unidos, Wang et al. reportaron un 2% de muestras positivas para *Legionella* spp.¹⁵. Por su parte, Borella et al. encontraron un 22,6% de muestras positivas en un estudio multicéntrico realizado en sistemas de distribución de agua caliente domiciliarios en Italia⁴. En ese mismo país, Bonetta et al. informaron un 42% de muestras positivas para *L. pneumophila*³ en hoteles. No se hallaron estudios similares realizados en la Argentina.

La presencia de *Legionella* spp. en los depósitos domiciliarios origina la necesidad de contar con técnicas que permitan identificar la especie. Además de *L. pneumophila*, las especies *Legionella anisa*, *Legionella dumoffii*, *Legionella micdadei*, *Legionella bozemani* y *Legionella longbeachae* fueron implicadas como agentes etiológicos de enfermedad humana y recuperadas de sistemas de agua¹². En los aislamientos del presente trabajo se realizó la extracción de ADN para la posterior confirmación de especie por técnicas moleculares (fuera del alcance del presente informe).

El cultivo de *Legionella* spp. es el método de referencia que permite su detección, a partir del cultivo es posible la identificación de cualquier especie y la realización de estudios posteriores. A su vez, la aplicación de esta técnica en la muestra proximal resultó ser la adecuada para la búsqueda de este microorganismo, dato coincidente con lo consignado en trabajos previos de otros autores^{14,15}. De la revisión bibliográfica realizada surge que la combinación del cultivo con técnicas moleculares

optimiza la detección de este patógeno en las muestras de agua^{3,7,12}.

La desinfección del agua por cloración representa la última etapa del tratamiento convencional del agua potable utilizado en la provincia del Chaco. El Código Alimentario Argentino estipula una concentración mínima de cloro activo residual de 0,2 mg/l. No obstante, la misma normativa establece que en las aguas ubicadas en los reservorios domiciliarios —objeto de estudio del presente trabajo— no es obligatoria la presencia de cloro activo. Esta situación podría ser uno de los factores que esté favoreciendo la presencia de *Legionella* en los depósitos domiciliarios¹.

Los resultados encontrados en este trabajo, que confirman la capacidad de *Legionella* spp. de desarrollar en el agua tratada, sumados al brote de enfermedad respiratoria aguda relacionada con este patógeno que se produjo en un hospital en enero del 2013 señalan la necesidad de encarar nuevas líneas de investigación en muestras ambientales. Estas deberían evaluar los sistemas de circulación de agua fría y caliente, los sistemas de refrigeración de edificios y establecimientos de salud y la presencia de *biofilms* en las cañerías como potenciales reservorios de *Legionella* spp. La vigilancia de este microorganismo en el agua de consumo humano representa el primer paso en cualquier esquema de control de su diseminación hacia huéspedes susceptibles.

Este trabajo constituye el primer aporte en el estudio de la presencia de *Legionella* spp. en muestras ambientales, en este caso, en depósitos domiciliarios de agua potable de una ciudad de la región noreste de Argentina (NEA).

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Investigación financiada por el Programa de Becas Carrillo-Oñativia, Comisión Nacional Salud Investiga, Ministerio de Salud de la Nación y por la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste. PI17/12L003

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A las Dras. Rosa Araujo y Silvia Cervero-Aragó, del Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universitat de Barcelona.

Bibliografía

1. Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica. Código Alimentario Argentino. Capítulo XII. Bebidas Hídricas, Agua y Agua Gasificadas. 2012 [On-line] [consultado 6 Nov 2015]. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigos/CAPITULO_XII.pdf
2. Ausina V, Vicente C, Cercenado E, Antolín CP. En: Cercenado Emilia CR, editor. Diagnóstico microbiológico y control de legionelosis. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2005. Report N.º. 20.
3. Bonetta SA, Bonetta SI, Ferretti E, Balocco F, Carraro E. Evaluation of *Legionella pneumophila* contamination in Italian hotel water systems by quantitative real-time PCR and culture methods. J Appl Microbiol. 2010;108:1576–83.
4. Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V, Stampi S, Stancanelli G, Triassi M, Neglia R, Marchesi I, Fantuzzi G, Tato D, Napoli C, Quaranta G, Laurenti P, Leoni E, de Luca G, Ossi C, Moro M, Ribera D'Alcala G. *Legionella* infection risk from domestic hot water. Emerg Infect Dis. 2004;10:457–64.
5. Buse HY, Schoen ME, Ashbolt NJ. Legionellae in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure. Water Res. 2012;46:921–33.
6. Delgado-Viscogliosi P, Solignac L, Delattre JM. Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cells in environmental water samples. Appl Environ Microbiol. 2009;75:3502–12.
7. Díaz-Flores A, Montero J, Castro F, Alejandres E, Bayón C, Solís I, Fernandez-Lafuente R, Rodríguez G. Comparing methods of determining *Legionella* spp. in complex water matrices. BMC Microbiol. 2015;15:91.
8. International Organization for Standardization. Water quality detection and enumeration of *Legionella*. ISO. 1998;11731:1998.
9. Lopardo G, Sturba E, Martinez M, Roel J, Gamba A, Biondi H, Stambouliau D. Detección de infección aguda por *Legionella pneumophila* en pacientes con neumonía adquirida en la comunidad en la ciudad de Buenos Aires. Medicina (B Aires). 2002;62:145–8.
10. Luna C, Brea Folco J, Aruj P, Rebora K, Balsebre C, Absi R, Vay C, Mier C, Famiglietti A. Neumonía por *Legionella pneumophila*. Experiencia en un hospital universitario de Buenos Aires. Medicina (B Aires). 2004;64:97–102.
11. Morio F, Corvec S, Caroff N, le Gallou F, Drugeon H, Reynaud A. Real-time PCR assay for the detection and quantification of *Legionella pneumophila* in environmental water samples: Utility for daily practice. Int J Hyg Environ Health. 2008;211(3-4):403–11.
12. Nazarian EJ, Bopp DJ, Saylor A, Limberger RJ, Musser KA. Design and implementation of a protocol for the detection of *Legionella* in clinical and environmental samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;62:125–32.
13. Rhoads WJ, Ji P, Pruden A, Edwards MA. Water heater temperature set point and water use patterns influence *Legionella pneumophila* and associated microorganisms at the tap. Microbiome. 2015;3:67 [Online].
14. Serrano-Suárez A, Dellundé J, Salvadó H, Cervero-Aragó S, Méndez J, Canals O, Blanco S, Arcas A, Araujo R. Microbial and physicochemical parameters associated with *Legionella* contamination in hot water recirculation systems. Environ Sci Pollut Res. 2013;20:5534–44.
15. Wang H, Edwards M, Falkinham JO, Pruden A. Molecular Survey of the occurrence of *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and amoeba hosts in two chloraminated drinking water distribution systems. Appl Environ Microbiol. 2012;78:6285–94.
16. World Health Organization. Guidelines for Drinking-Water Quality. 3rd edi. Geneva: World Health Organization; 2008.