

Control preventivo de legionelosis
en instalaciones de riesgo
de la CAPV

GUÍA PARA LA TOMA DE MUESTRAS

EUSKO JAURLARITZA



GOBIERNO VASCO

OSASUN SAILA

DEPARTAMENTO DE SALUD





R E D A C T O R E S

Cuetos Tuñón, Yolanda; De la Fuente Campos, Koldo; García Robles, Inmaculada; Irazabal Tamayo, Nagore; Jiménez Zabala, Ana; Maiztegi Gallastegi, Pepa; Martínez Echevarria, Leire; Otazua Font, Mónica.

C O L A B O R A D O R E S

Aldámiz-Echevarría Zulueta, Ramón; Astillero Pinilla; M^a José; Atxaga Castillo, Eneritz; Etxeberria Agirresarobe, Mikel; Iraola Garín, Alaitz; Larrucea Bernales, Iratxe; Martínez Arregui, M^a Victoria; Martínez Rueda, Teresa; Montero Sola, Andoni; Rodríguez Juliá, Marta; Sancho Bernad, M^a Antonia; Serrano Ibarbia, Elena; Zabala Arriaga, Nieves.

Un registro bibliográfico de esta obra puede consultarse en el catálogo de la red *Bibliotekak* del Gobierno Vasco: <http://www.bibliotekak.euskadi.eus/WebOpac>

Edición : 1.^a, febrero 2020* • © Administración de la Comunidad Autónoma del País Vasco. Departamento de Salud • **Edita**: Eusko Jaurlaritzaren Argitalpen Zerbitzu Nagusia / Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco (Donostia-San Sebastián, 1 - 01010 Vitoria-Gasteiz) • **Diseño**: EkipoPO

*Actualización de la guía elaborada y colgada en la web del Departamento de Salud en enero 2012.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. CONSIDERACIONES GENERALES	6
2.1. Material para el muestreo.....	6
2.2. Precauciones y medidas de higiene durante el muestreo	6
2.3. Tipos de envase y neutralización de la muestra	7
2.4. Datos recogidos en el muestreo	8
3. CARACTERÍSTICAS DEL MUESTREO.....	9
3.1. Elección de puntos de muestreo.....	9
3.2. Muestreo de biofilm / biocapa mediante torunda.....	9
4. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO EN FUNCIÓN DEL TIPO DE INSTALACIÓN	11
4.1. Circuitos de refrigeración (CRF).....	11
4.2. Agua caliente sanitaria (ACS)	12
4.3. Spas y similares (<i>vasos climatizados con aerosolización</i>).....	16
4.4. Fuentes ornamentales.....	17
4.5. Instalaciones de lavado de vehículos	17
5. TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO	19
6. CADENA DE VIGILANCIA DE LA MUESTRA	20
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1. INTRODUCCIÓN



El control de la calidad del agua es un aspecto esencial dentro de las operaciones de vigilancia y seguimiento de las instalaciones de riesgo en relación con la prevención de la legionelosis. Aspectos como la elección de los puntos de muestreo, el procedimiento de toma de muestras y su custodia hasta la recepción por el laboratorio son aspectos que incidirán en la representatividad y la calidad de los resultados y facilitarán la toma de decisiones para un buen control y correcto funcionamiento de las instalaciones.

Hay que tener siempre presente que un adecuado examen de *Legionella* va a depender de varios factores, entre los que cabe destacar:

- ▶ La identificación de los puntos de muestreo en términos de representatividad de la instalación de agua que se está estudiando.
- ▶ El momento del muestreo en relación con las operaciones de control que se llevan a cabo en la instalación, incluido el momento de dosificación del biocida y los niveles del mismo.
- ▶ La calidad de las muestras recogidas (procedimiento de muestreo).
- ▶ Adecuado transporte y almacenamiento de las muestras que asegure que estas van a sufrir el menor cambio/alteración posible antes del inicio del análisis.

Las características del muestreo van a depender del **objetivo** perseguido, así como de la naturaleza de la muestra. Es decir, en el procedimiento de toma de muestras hay que tener en cuenta si se trata de:

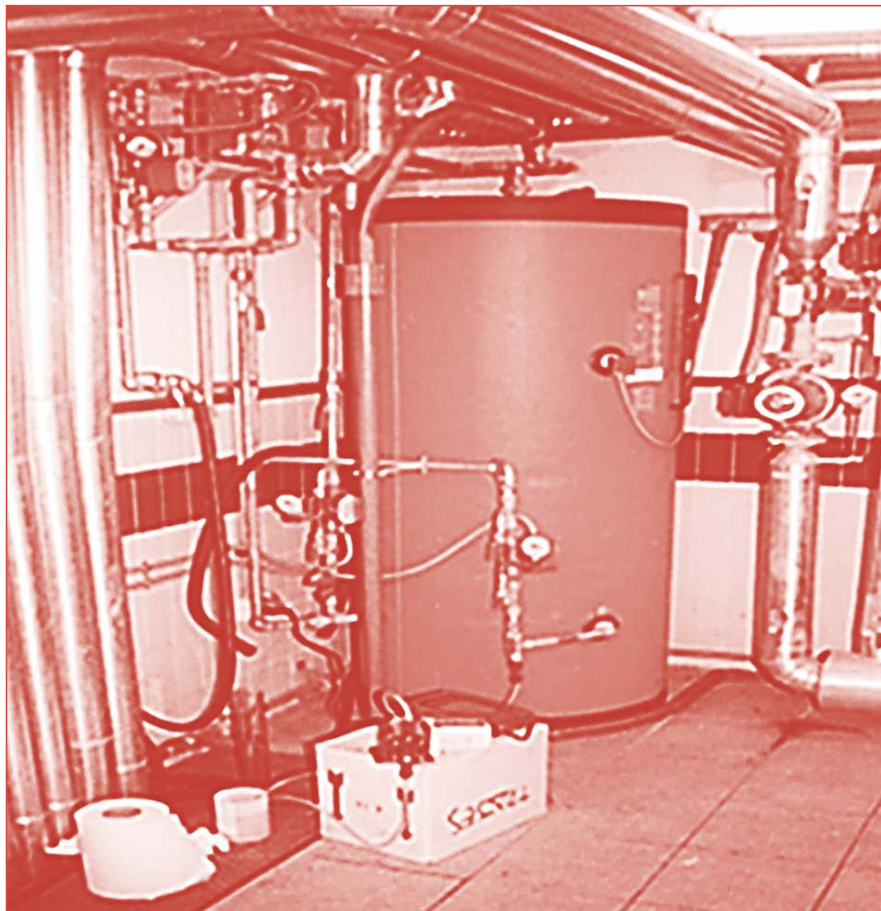
- ▶ Determinar si el agua cumple con las especificaciones de calidad reglamentarias. En nuestro caso del [Real Decreto 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis](#).
- ▶ Un control preventivo, un control para comprobar la eficacia del tratamiento o un control para comprobar el funcionamiento de un sistema.
- ▶ Identificar el origen de un brote.
- ▶ Identificar y caracterizar posibles fuentes de contaminación.
- ▶ etc.

La elección de los puntos de muestreo, por su parte, dependerá del diseño y características específicas de la instalación y de otros factores que puedan ser importantes de cara a la evaluación de riesgos de la misma. Hay que analizar el esquema hidráulico de la instalación “in situ” y buscar sus puntos críticos, que serán aquellos donde exista más posibilidad de presencia de colonias, más aquellos que sean congruentes con el buen funcionamiento del sistema.

Las personas responsables de los muestreos deben estar entrenadas para ello y deben conocer todos estos aspectos que pueden afectar a los resultados de los ensayos.

La formación y la determinación de competencia deben estar descritas para todas las personas encargadas de la toma de muestras y esta información debe estar registrada de forma apropiada dentro del plan de control y seguimiento.

La empresa responsable del muestreo deberá establecer el procedimiento correspondiente y proporcionar al interesado la documentación básica necesaria para garantizar el conocimiento y aceptación del mismo.



2. CONSIDERACIONES GENERALES



2.1. MATERIAL PARA EL MUESTREO

La persona responsable de la toma de muestras deberá disponer al menos, de:

- ▶ Nevera portátil con bloques de hielo (en caso que se necesitase refrigerar la muestra).
- ▶ Recipientes de polipropileno o similar, estériles, normalizados para ensayos microbiológicos con capacidad de 1,5 litros, de 1 litro y/o de 500 ml.
- ▶ Recipientes normalizados de polipropileno con capacidades superiores a 250 ml para ensayos físico-químicos.
- ▶ Termómetro digital con sonda calibrado y/o certificado.
- ▶ Fotómetro y reactivos para medir el biocida residual in situ o bien kit específico recogido en la resolución de inscripción del biocida en el Registro Oficial de Biocidas (ROB)^(*).
- ▶ Neutralizante apropiado para el biocida utilizado (en la resolución de inscripción del biocida en el ROB se indica el neutralizante), si el envase no lo contiene. Es indispensable el uso de neutralizante^{*}.
- ▶ Materiales para la toma de muestras: mecheros por si procede flamear el terminal o alcohol para desinfectarlo, mascarilla, guantes desechables, herramientas necesarias para facilitar la manipulación de los puntos a muestrear (destornilladores, llaves Allen, llave inglesa, ...), rotuladores y/o bolígrafos resistentes al agua, agua destilada por si fuese necesario diluir la alícuota para determinación de biocida.
- ▶ Registro de datos de la toma de muestras (punto 2.4 del documento).

2.2. PRECAUCIONES Y MEDIDAS DE HIGIENE DURANTE EL MUESTREO

Hay que tener en cuenta una serie de precauciones y medidas de higiene para minimizar la contaminación de la muestra:

- ▶ Lavarse las manos completamente o llevar guantes desechables.
- ▶ Nunca fumar, comer o beber mientras se toman muestras.
- ▶ Desinfectar el punto de toma de muestras, si procede, con un algodón impregnado en alcohol o flameando el punto con un mechero.
- ▶ En tomas por inmersión (piscinas, spas, depósitos de agua fría de consumo humano, etc.), el exterior de los envases deberá limpiarse y desinfectarse, previamente, con un algodón impregnado en alcohol, para evitar el aporte de contaminación.

^{*} El suministrador del biocida debe proporcionar tanto el kit de detección rápida de biocida residual como el neutralizante del mismo, así como la información sobre las cantidades necesarias para neutralizar dicho biocida.

- ▶ Nunca meter ningún objeto (termómetro, pH-metro, ...) dentro del recipiente que contiene la muestra para la realización de análisis microbiológico.
- ▶ Si se van a emplear agentes de conservación y/o neutralizantes, asegurarse de que no están caducados o que presentan un color o aspecto anormal.
- ▶ Las neveras en la que se transporten las muestras se mantendrán limpias, de manera que no aporten suciedad ni flora microbiana a los recipientes. A poder ser, se emplearán neveras de uso exclusivo para muestras de agua.

2.3. TIPOS DE ENVASE Y NEUTRALIZACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras se deben tomar en recipientes normalizados y adecuados para evitar que se rompan o se vierta su contenido en el transporte:

- ▶ El tipo de recipiente (polietileno, polipropileno, poliestireno, ...) debe elegirse teniendo en cuenta una serie de criterios como: resistencia a temperaturas extremas, resistencia mecánica, facilidad de cierre hermético, tamaño, forma, disponibilidad, coste, posibilidades de limpieza y de reutilización, esterilización,...
- ▶ Cuando el muestreo se realiza para ensayos microbiológicos y físico-químicos, se hará en recipientes diferentes: recipiente estéril y con neutralizante adecuado para el ensayo microbiológico y recipiente normalizado para la toma de muestras de agua para el ensayo físico-químico.
- ▶ El neutralizante debe añadirse en el recipiente en condiciones de esterilidad y teniendo en cuenta la concentración residual a la que se encuentre el biocida en el agua a muestrear (la información relativa a la cantidad de neutralizante necesario para desactivar el biocida en función de su concentración estará establecida por el fabricante).
- ▶ La capacidad de los recipientes será acorde a los ensayos a realizar, es decir, el volumen será adecuado para la realización del análisis de todos los parámetros requeridos. Especificamos la capacidad mínima, tendiendo a que el volumen muestreado se aproxime a esa cantidad teniendo en cuenta cuestiones medioambientales.

Tipo de análisis	Volumen mínimo (capacidad del envase)
Ensayo de <i>Legionella</i>	1000 ml
Ensayo de Aerobios	100 ml
Ensayos físico-químicos en Circuitos de Refrigeración	250 ml

En la mayoría de los casos se utilizan derivados clorados o biocidas oxidantes por lo que el neutralizante más universalmente utilizado es el tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Para conocer la cantidad de tiosulfato a añadir tenemos que aplicar la siguiente fórmula:

$$5 \times \text{Vol en L de agua a neutralizar} \times \text{ppm CRL} = \text{mg Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$$

Los envases normalizados comercializados 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 PUEDEN UTILIZAR estos envases, sin ningún sobreañadido de tiosulfato sódico, para aguas que contengan **hasta 4 ppm de CRL (Cloro Residual Libre)**.

Para neutralizar otros biocidas se tendrán en cuenta las especificaciones del fabricante, las cuales se recogen en la resolución de autorización del biocida. En caso de utilizar neutralizante distinto al recogido en la resolución, deberá justificarse su idoneidad.

Los envases para ensayos microbiológicos no se llenan hasta arriba. Se deja una pequeña cámara de aire para que, una vez cerrado, se pueda voltear varias veces de modo que se mezcle bien el agua con el neutralizante.

2.4. DATOS RECOGIDOS EN EL MUESTREO

Es importante que la muestra esté correctamente identificada.

La etiqueta del envase contendrá la siguiente información:

- ▶ Identificación de la muestra. Lugar/Establecimiento y punto de muestreo.
- ▶ Fecha y hora de la toma de muestra.
- ▶ Tipo de muestra (agua CRF, agua ACS, muestra biofilm,...)
- ▶ Razones/Motivos del muestreo (programación, estudio caso, seguimiento, etc.).
- ▶ Persona que ha efectuado el muestreo.
- ▶ **Temperatura de la muestra.** En el momento de la toma de muestras se medirá la temperatura del agua. En la etiqueta constará la temperatura de la muestra.
- ▶ **Biocida utilizado y concentración residual** del mismo.
- ▶ Si la muestra se ha neutralizado y neutralizante utilizado. Si la muestra tiene biocida y, excepcionalmente, no puede neutralizarse, esta información debe registrarse (se entiende, como se ha indicado anteriormente, que serían casos excepcionales).
- ▶ En el caso del agua de consumo el procedimiento de muestreo seguido: si la muestra se ha tomado pre-flush o post-flush, (estos tipos de muestreo se especifican más adelante).

Además, se recogerá toda la información de interés que nos pueda ayudar a una adecuada interpretación del resultado, como:

- ▶ Información detallada sobre el punto de muestreo. Se recogerán todos los detalles que puedan ayudar a interpretar los resultados y a implementar posibles medidas de control (presión del agua, alteraciones de temperatura en el circuito, si el grifo o la ducha gotea, presencia de sedimentos de hierro, incrustaciones, lodos, existencia de accesorios de caucho o plástico, etc.).
- ▶ En el caso del agua de consumo se anotará la temperatura del sistema de agua caliente tras abrir el grifo durante 1' o tras 2' si se trata de agua fría. Si en 1' el agua caliente no alcanza 50°C, se anotará la temperatura alcanzada en ese tiempo, así como el tiempo que tarda en estabilizarse y la temperatura de estabilización.
- ▶ En el caso de muestreos en torres de refrigeración de plantas de fabricación de plásticos, papel, etc., se recogerá que se trata de circuitos con alto riesgo de presencia de nutrientes.
- ▶ Si es posible, se anotará el tiempo transcurrido desde la dosificación de biocida al muestreo.
- ▶ Cualquier otro factor de riesgo importante (p. ej. si se trata de un sistema que no se utiliza, o sólo se pone en marcha para el mantenimiento, etc.).
- ▶ Cualquier caso o brote de legionelosis asociado al lugar ("histórico" disponible en los registros de Salud Pública).

3. CARACTERÍSTICAS DEL MUESTREO



3.1. ELECCIÓN DE PUNTOS DE MUESTREO

Las muestras deben tomarse donde es probable que la bacteria pueda estar en altas concentraciones y deben ser representativas de modo que reflejen, de la forma más precisa posible, las características del agua del circuito bajo estudio en el momento del muestreo.

Un buen plan de muestreo va a depender del conocimiento que se tenga de la instalación para poder desarrollar una buena estrategia de muestreo. La elección de los puntos de muestreo estará relacionada con el objetivo perseguido y el tipo de instalación, como hemos indicado al inicio de esta Guía, y variará dependiendo del motivo por el que se realiza el muestreo:

- ▶ **Investigación de un caso o brote de legionelosis:** desde la Administración competente se muestrearán los elementos de riesgo relacionados con el mismo;
- ▶ **Caracterización de una instalación:** se muestrearán los puntos más desfavorables;
- ▶ **Comprobación de la eficacia de la limpieza y desinfección (L+D):** para comprobar la eficacia de la misma se incluirán, si es el caso, puntos que anteriormente hayan resultado positivos a Legionella o que hayan estado relacionados con casos, además de los habituales puntos de muestreo. El muestreo se realizará transcurridos entre 15-30 días tras la L+D.
- ▶ **Control rutinario:** se priorizarán aquellos puntos terminales que lleven tiempo sin utilizar, que presenten algún problema, que hayan estado involucrados en alguna obra o reforma o aquellos puntos que hayan resultado positivos a Legionella en muestreos anteriores. Si no es el caso, se muestrearán aquellos puntos más alejados de la central de producción de calor, además de las muestras tomadas en acumuladores y retorno. Cuando sea posible, se priorizarán los muestreos en duchas antes que en grifos, al tratarse de los puntos de mayor exposición posible por la formación de aerosoles.
- ▶ La persona responsable del muestreo deberá tener en cuenta todos estos factores a la hora de elegir el punto de muestreo.

3.2. MUESTREO DE BIOFILM / BIOCAPA MEDIANTE TORUNDA

Así como las muestras de agua recogen las formas planctónicas (forma libre) de Legionella o del biofilm alterado, las muestras de biofilm recogen las formas sésiles (biocapa) de la bacteria.

Se tomará muestra de biofilm/biocapa de las instalaciones en los siguientes casos:

- a. investigación casos/brotes,
- b. en instalaciones en las que se detecten frecuentes recuentos positivos de Legionella, principalmente cuando se trate de establecimientos que pueden poner en riesgo a población sensible,
- c. muestras de confirmación de la eficacia de la L+D.

En el muestreo del biofilm mediante torunda hay que tener siempre en cuenta los siguientes aspectos:

- ▶ Se aconseja humedecer la torunda con el agua a muestrear ya que así recoge mejor el biofilm.
- ▶ Si se toman ambos tipos de muestra (biofilm y agua) en el mismo punto, se recogerá **primero la muestra de agua y después la de biofilm** mediante raspado con torunda estéril.
- ▶ Introducir la torunda en un tubo estéril con el diluyente adecuado o con una pequeña cantidad conocida de agua de **muestra neutralizada** (se seguirán las indicaciones del laboratorio que vaya a analizar la muestra).

los hisopos qcon 5 mL de diluyente. Es importante la cantidad de 5 mL, ya que los cálculo de resultados se harán teniendo en cuenta ese volumen.

En el caso de los circuitos de refrigeración

Se recogen restos de suciedad o limo de la pared de la balsa y/o depósito mediante torunda estéril, la cual se humedecerá con el agua a muestrear ya que así se recoge mejor el biofilm. Una vez recogida la muestra, la torunda se introduce en un tubo estéril con el diluyente adecuado o con una pequeña cantidad conocida de agua de muestra neutralizada (se seguirán las indicaciones del laboratorio que vaya a analizar la muestra).

En el caso del agua de consumo

Para recoger muestra de biofilm mediante torunda en grifos o duchas:

- ▶ Sin abrir el grifo o ducha se procederá a retirar el filtro (grifo) o difusor (ducha). Se introducirá la torunda lo que se pueda en el interior del flexible o manguera (o en el interior del grifo), girándola de modo que se utilice toda su superficie. Si se observa biofilm en el filtro del grifo o en el interior del difusor de la ducha, se raspará también con la torunda.
- ▶ Introducir la torunda en un tubo estéril, conteniendo el diluyente adecuado en o con una pequeña cantidad conocida de agua de muestra neutralizada (se seguirán las indicaciones del laboratorio que vaya a analizar la muestra).



4. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO EN FUNCIÓN DEL TIPO DE INSTALACIÓN



Antes de la toma de muestras hay que asegurarse que no se ha realizado la limpieza y desinfección (L+D) o ningún tratamiento de choque en, al menos, los 15 días anteriores a la fecha prevista para el muestreo.

4.1. CIRCUITOS DE REFRIGERACIÓN (CRF)

Algunos de los parámetros de control (nivel de biocida, turbidez, conductividad, pH, hierro) son indicadores del funcionamiento del sistema de tratamiento aplicado a la instalación. Dicho de otro modo, forman parte de la vigilancia de los puntos de control críticos determinados en el sistema.

Hay que tener en cuenta que cuando estos parámetros se encuentran fuera de control, en niveles extremos, pueden interferir enmascarando unos resultados que pueden poner en peligro a la población expuesta al no conseguir identificar *Legionella*, dando una falsa seguridad.

En estos casos, deberán tomarse de inmediato las medidas encaminadas a estabilizar el agua del circuito y aunque no se hubiese detectado *Legionella* en la analítica, tendrá que repetirse el muestreo tan pronto se haya estabilizado el agua del circuito y sin esperar al siguiente trimestre.

Muestras para determinación de parámetros microbiológicos

La muestra para detección de *Legionella* se tomará en alguno de los siguientes puntos, con el siguiente orden de preferencia:



► **Tubería de retorno del circuito:** Punto más idóneo. Se desinfecta el dispositivo toma-muestras por fuera con un algodón impregnado en alcohol y se coge el agua directamente. En este punto no se tomará muestra de biofilm. Si la instalación no dispone de dispositivo toma-muestras en la tubería de retorno del agua hacia la torre o condensador, se tomará la muestra de la balsa de agua o del grifo de purga o drenaje.

► **Balsa de agua refrigerada:** Si la muestra se toma directamente de la balsa, se toma en un punto lo más alejado posible del aporte de agua, así como de la inyección de biocida. Si se trata de un muestreo de control rutinario se tomará sólo muestra de agua.



Si no es posible tomar la muestra directamente de la balsa, se recogerá muestra del drenaje de la misma o de algún toma-muestras que tenga. Si disponen de autoanalizador de biocida, podría tomarse la muestra del agua que entra en el autoanalizador. Antes de muestrear, el grifo toma-muestra debe desinfectarse por fuera con un algodón impregnado en alcohol, con objeto de evitar contaminaciones no deseadas. En los grifos toma-muestras no se tomará muestra de biofilm.

La muestra para determinación de **aerobios** se tomará en los mismos puntos indicados anteriormente.



Los responsables de torres de refrigeración y condensadores evaporativos tendrán en cuenta que la frecuencia de muestreo para la determinación de Legionella tiene que ser adecuada al nivel de peligrosidad de la instalación, siendo la frecuencia mínima la establecida por la legislación vigente.

Además, tomarán muestra para determinación de, al menos, los **parámetros físico-químicos** establecidos por dicha legislación.

4.2. AGUA CALIENTE SANITARIA (ACS)

Número de muestras y periodicidad

En los establecimientos especialmente sensibles (hospitales y clínicas, residencias para personas mayores, para personas con discapacidad, comunidades terapéuticas, etc.) la periodicidad mínima de muestreo será trimestral. Esta frecuencia podrá incrementarse tanto en razón del propio Plan de Autocontrol en el caso de estimar otros riesgos o bien si ha sido marcado así por la autoridad competente.

En establecimientos lúdicos, turísticos y deportivos la periodicidad mínima de muestreo será semestral. Esta frecuencia podrá incrementarse tanto en razón del propio Plan de Autocontrol en el caso de estimar otros riesgos o bien si ha sido marcado así por la Autoridad competente.

Estas frecuencias deben ser independientes de la analítica que se efectúa para controlar la eficacia del tratamiento de limpieza y desinfección anual.

En cuanto al número de muestras por muestreo dependerá del tipo de establecimiento y de la complejidad y número de terminales que disponga la instalación. Es importante que este número de muestras sea suficiente para poder hacer una valoración del riesgo de la instalación ya que el porcentaje de puntos positivos a Legionella del muestreo nos dará información del grado de colonización de la instalación y por lo tanto del riesgo de la misma.

Para calcular el número mínimo de muestras a tomar por muestreo se utilizarán las fórmulas recogidas en la UNE 100030:2017:

Número de muestras mínimas en ACS = $0,5 \times \sqrt{n^\circ}$ de puntos terminales

Número de muestras mínimas en AFS = $0,25 \times \sqrt{n^\circ}$ de puntos terminales

Dicha UNE establece, con arreglo a estas fórmulas y por aproximación, la siguiente tabla:

Puntos terminales ⁽¹⁾	Muestras mínimas ACS ⁽²⁾⁽⁴⁾	Muestras mínimas AFC ⁽³⁾
<20	2	1
21-50	3	1
51-100	4	2
101-150	5	2
151-200	6	3
201-250	7	3
251-300	8	4
301-350	9	4

⁽¹⁾Para instalaciones en alojamientos (hoteles, hospitales, residencias geriátricas, etc.) el número de puntos terminales equivaldrá al número de cuartos húmedos.
⁽²⁾En estas muestras se deben incluir las de los acumuladores de ACS.
⁽³⁾En estas muestras se deben incluir las de los depósitos de AFS.
⁽⁴⁾Se debe tomar en todos los casos una muestra del retorno.

1. Circuito con acumulación y retorno

→ Acumuladores de ACS:

La muestra se tomará preferiblemente en la parte baja (purga) ya que así se recogen también restos de material sedimentado, si existiese. Se recogerá la primera fracción de la salida del mismo. Se dejará correr el agua unos segundos únicamente para eliminar el agua y sedimentos contenidos en la tubería de drenaje o purga. El tiempo dependerá de la longitud de la tubería.

Si se toma de la purga y esta tuviese colocado algún dispositivo tipo manguera o similar, si es posible se retirará y si no se dejará correr el agua hasta que se haya eliminado el agua retenida en el tramo de la manguera.

En acumuladores en los que el agua fría entra directamente, si al medir la temperatura del agua en la purga se obtiene un resultado próximo al del agua de red indica que está entrando agua fría por lo que la muestra no sería representativa del agua del acumulador. En estos casos, será preferible tomar la muestra en otro punto, bien en impulsión (si dispone de toma-muestra) o en el terminal más próximo al acumulador, en cuyo caso se dejará correr el agua el tiempo necesario, dependiendo de la longitud de la tubería hasta el terminal, hasta alcanzar la temperatura máxima, para asegurarnos que estamos tomando agua del acumulador. En este punto se tomará también en el caso de termos eléctricos o acumuladores que no dispongan de purga o toma-muestras.

Toma muestras en impulsión: en ocasiones, sólo es posible tomar la muestra en toma-muestra colocado en la tubería de impulsión. En este caso, se tomará también la primera fracción.

Cuando se pueda demostrar que la temperatura del agua en el acumulador se mantiene por encima

de 70°C de manera constante no sería necesario el muestreo en el acumulador, ya que a partir de esta temperatura *Legionella* no sobrevive, muriendo rápidamente. De todos modos, dependiendo de diversos factores (entrada de agua fría directamente al acumulador o no, disponibilidad de sensores de temperatura a distintos niveles, etc.) quedará a criterio del técnico-muestreador que será quien tendrá que valorar la posible estratificación de temperaturas en el acumulador y en caso de duda siempre muestrear.

No se tomarán muestras de biofilm en las muestras tomadas en acumulador.

→ Red de ACS y AFCH:

Hay establecidos 2 procedimientos de muestreo:

- **Pre-flush** (sin dejar correr el agua): su objetivo es muestrear el terminal y su tubería. Representa la colonización del terminal ya que una de las zonas donde la probabilidad de que *Legionella* crezca y se multiplique es mayor en el interior del grifo o ducha. Por lo que el primer litro tomado nada más abrir el terminal es el que tendría la mayor concentración de *Legionella* y preferiblemente se debería tomar en un terminal que haya estado horas sin utilizarse (como mínimo 2 horas).
- **Post-flush** (dejando correr el agua): su objetivo es muestrear el agua del circuito. Se deja correr el agua hasta alcanzar temperatura constante. Representa la calidad del agua circulante suministrada al grifo o la ducha.

Tipo de elemento a muestrear

- **Grifo**

Pre-flush (sin dejar correr el agua): si es posible hay que elegir grifos individuales (no monomandos) para evitar posibles contaminaciones cruzadas, que no hayan sido abiertos en, al menos, las 2 últimas horas y que no hayan sido desinfectados. Se coloca el grifo en posición de máxima temperatura (si se está muestreando ACS) y evitando generar aerosoles.

Sin dejar correr el agua se toma 1 litro de muestra en un envase estéril con tiosulfato sódico (con cuidado de no contaminar el tapón). Posteriormente, dejar correr el agua durante 1 minuto y medir la temperatura (si se trata de agua fría dejaremos correr el agua durante 2 minutos).

Si se procede también a tomar muestra de biofilm, se hará después de tomar la muestra de agua. Se introducirá la torunda en el interior del grifo lo que se pueda, girándola de modo que se utilice toda su superficie (si en el filtro se aprecia biofilm, se rasará también). Introducir la torunda en un tubo estéril con el diluyente adecuado o con una pequeña cantidad conocida de agua de la muestra neutralizada (se seguirán las indicaciones del laboratorio que vaya a analizar la muestra).

- **Ducha**

Importante: evitar los aerosoles para no exponer a riesgo al muestreador.

Ducha teléfono (muestreo pre-flush)

Siempre que se pueda, se quitará el difusor. Sin dejar correr el agua, abrir la ducha (si es mono-

mando se coloca en posición de máxima temperatura si estamos muestreando el ACS) y tomar 1 litro de muestra en un envase estéril con tiosulfato sódico, directamente desde el flexible o manguera si previamente se ha podido quitar el difusor. Es importante no perder el agua que haya podido quedar en el mismo. Se mide la temperatura transcurrido 1 minuto de la apertura de la ducha. Si se procede también a tomar muestra de biofilm, se hará después de tomar la muestra de agua. Se introducirá la torunda en el interior del flexible o manguera todo lo que se pueda, girándola de modo que se utilice toda su superficie (si en el difusor se observa biofilm, se rascará también). Introducir la torunda en un tubo estéril con el diluyente adecuado o con una pequeña cantidad conocida de agua de la muestra neutralizada (se seguirán las indicaciones del laboratorio que vaya a analizar la muestra).



Otra opción, para evitar perder el agua del difusor, es seguir el procedimiento del anexo 6 del RD 865/2003: en duchas monomando y si se está muestreando ACS, se coloca en posición de máxima temperatura de agua caliente, evitando la producción de aerosoles. Sin dejar correr el agua se cogen los primeros 100ml, aproximadamente. Se quita el difusor y se siguen los pasos indicados en el punto anterior. Se mide la temperatura transcurrido 1 minuto de la apertura de la ducha.



Ducha mural (muestreo pre-flush)

Estas duchas son más complicadas de muestrear. Si se puede quitar el difusor para evitar los aerosoles, mejor. Si no es posible, para minimizar la exposición a aerosoles, una posibilidad sería colocar una bolsa estéril alrededor del difusor, atándola con una goma. Se corta la parte inferior de la bolsa con una tijera estéril o desinfectada con alcohol y se coloca en la boca del envase. La muestra se coge como se describe para ducha teléfono, si bien en este caso, normalmente, no se puede recoger muestra de biofilm.

Otra opción más sencilla, aunque no evitaría la exposición del técnico muestreador a los aerosoles, sería utilizar los envases normalizados comercializados de boca ancha para la toma de muestras de agua para ensayos microbiológicos (se comercializan con tiosulfato sódico como los habituales) o trasvasar el agua de un anaclín estéril a un envase estéril con tiosulfato sódico.

Si se trata de un grifo MIXTO (grifo con ducha) se prioriza siempre la ducha para tomar la muestra.

Si el muestreo se debe a un seguimiento rutinario, no sería necesario tomar muestra de biofilm.

- **Retorno (muestreo post-flush)**

La muestra se toma directamente del grifo toma-muestras del retorno. Se dejará correr el agua para eliminar el agua y sedimentos contenidos en el grifo toma-muestras. El tiempo dependerá de la longitud de la tubería. No se recoge muestra de biofilm.

2. Circuito con acumulación y sin retorno

En circuitos con acumulación y sin retorno (incluyendo los circuitos con termo eléctrico), la muestra en los terminales se tomaría de dos maneras:

- ▶ En primer lugar se tomaría una muestra pre-flush (sin dejar correr el agua) tal y como se ha descrito anteriormente. Esta muestra representa la colonización del terminal.
- ▶ Una segunda muestra post-flush, dejando correr el agua hasta que la temperatura se estabilice. Representa la calidad del agua circulante. Si el grifo tiene acoplado algún accesorio tipo manguera o similar, siempre que se pueda, se quitará para tomar la muestra. Se deja correr el agua, midiendo la temperatura transcurrido 1 minuto (si se trata de agua fría, se deja correr el agua durante 2 minutos). Se sigue con el grifo abierto y una vez que se haya estabilizado la temperatura tomamos la muestra.

De todos modos, el número y tipo de muestras quedará a valoración del técnico-muestreador responsable del muestreo en función del tipo de instalación que se trate, complejidad de la misma, objetivo del muestreo, etc.

4.3. SPAS Y SIMILARES (*vasos climatizados con aerosolización*)

La muestra se toma siguiendo el procedimiento de toma de muestras de piscinas y en un punto alejado del aporte de agua. Se utilizará envase estéril (como mínimo de 1 litro) con neutralizante específico. Se sumerge el envase en el spa, piscina o similar (por lo que deberá estar limpio por fuera para evitar contaminar la muestra con flora no deseada) hasta aproximadamente la altura de la muñeca, colocándolo en posición prácticamente horizontal con la boca del envase apuntando ligeramente hacia arriba de manera que no se disperse el neutralizante del envase.

Lo ideal es tomar la muestra en los momentos más desfavorables, es decir, cuando el nivel de desinfectante es más bajo (a última hora del día o en un momento de mucho uso o justo después).

En las bañeras de hidromasaje de uso individual, para tomar la muestra de agua será necesario llenar la bañera y poner en marcha los aireadores. Después, se tomará la muestra como se indica en el párrafo anterior.

Si se está investigando algún caso/brote o se trata de un muestreo tras la L+D para verificar su eficacia, con torundas estériles se recogerán muestras de biofilm de la pared del vaso y en difusores (en este caso se seguirá el mismo procedimiento que para los terminales).

Se mide la temperatura del agua y la concentración de biocida.

Los responsables de la instalación deberán tomar las muestras con periodicidad mensual, tal y como establece para los vasos con aerosolización y climatizados el [Real Decreto 742/2013, de 27 de septiembre, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de las piscinas](#) (Artículo 11, Anexo I).

En el caso de bañeras de hidromasaje, tratamientos con chorros a presión, etc. con agua de un solo uso, se recomienda una periodicidad de muestreo semestral.

4.4. FUENTES ORNAMENTALES

La muestra se toma por inmersión del envase en un punto alejado del aporte de agua y de la adición de biocida siguiendo el procedimiento de toma de muestras de piscinas y spas. Se utilizará un envase estéril (como mínimo de 1 litro) con neutralizante específico que deberá estar limpio por fuera para evitar contaminar la muestra. Se sumergirá el envase hasta aproximadamente la altura de la muñeca, colocándolo en posición prácticamente horizontal con la boca apuntando ligeramente hacia arriba de manera que no se disperse el neutralizante contenido en el envase. En caso de tomar muestra de los chorros recoger directamente la muestra en un envase de 1 litro.

Si se está investigando algún caso/brote se recogerán los restos de suciedad e incrustaciones de cualquier superficie húmeda donde pueda acumularse el biofilm, como pueden ser las paredes de la fuente, mediante torunda estéril. Si hay presencia de dispositivos de nebulización se tomarán también muestras de las boquillas o salida de pulverización; puede ser necesario desmontarlas para acceder a las superficies interiores.

Se mide la temperatura del agua y la concentración de biocida.

La periodicidad mínima recomendable de muestreo es anual, aumentando a semestral en el caso de fuentes ubicadas en las proximidades de establecimientos sensibles.

4.5. INSTALACIONES DE LAVADO DE VEHÍCULOS

Es indispensable que el responsable o bien algún operario de la instalación de lavado de vehículos esté presente durante el muestreo para asegurarse de que el sistema esté funcionando normalmente y para que dirija al muestreador a los puntos de muestreo previamente seleccionados.

A la hora de seleccionar los puntos de muestreo de una instalación de lavado de vehículos se debe conocer detalladamente el plano general de la instalación con el fin de poder identificar los puntos críticos.

Es imprescindible contar con la siguiente información:

- ▶ Número de redes de agua del sistema y origen del agua. En estas instalaciones pueden coexistir redes que utilizan agua de red municipal o recursos propios (incluidas aguas pluviales provenientes de cubiertas y pistas) junto con otras redes con aguas recicladas o regeneradas.
- ▶ Tipo de instalación de lavado: box, puente, túnel o tren.

- ▶ Secciones de lavado: pre-lavado, lavado y acabado (aclarado, encerado y secado). Las diferentes secciones de lavado constan de varios módulos de lavado o arcos provistos de boquillas de agua a presión. Dependiendo del tipo de módulo el agua estará mezclada o no con productos químicos como espumas, champús o ceras.
- ▶ Número, volumen y localización de depósitos o tanques de agua. Además de los depósitos de almacenamiento de agua del circuito, por lo general, los módulos de agua a alta presión suelen disponer de depósitos adicionales de pequeño volumen.

La selección de los puntos de muestreo incluirá muestras en cada una de las redes de agua de la instalación. Siempre que sea posible, es recomendable tomar muestras tanto en boquillas o mangueras como en depósitos. Se priorizará la toma de muestras en los módulos que utilicen agua sin productos químicos añadidos.

Para la toma de muestra se utilizará un envase estéril con neutralizante. Sin dejar correr el agua se llenará un envase como mínimo de 1 litro. A continuación, se medirá la temperatura del agua y el nivel de biocida en el caso de que se esté utilizando.

Para la toma de muestra de las boquillas de los arcos o de la manguera se utilizará un envase estéril con boca ancha. Se tomará una muestra de un litro y se trasvasará posteriormente a un envase estéril con neutralizante. En el caso del muestreo en las boquillas de los arcos de lavado puede ser de ayuda el uso de una pértiga para agarrar el envase. También puede ser recomendable la colocación de grifos para la toma de muestras.

La periodicidad mínima recomendable de muestreo es:

- ▶ Túneles y puentes de lavado de vehículos anual, excepto si están ubicados en las proximidades de establecimientos sensibles, que sería semestral.
- ▶ Boxes, semestral.



5. TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO



Es evidente que los recipientes que contienen las muestras deben protegerse de manera que no se deterioren y no pierdan parte de su contenido durante el transporte.

Las muestras se conservan y se transportan en neveras portátiles para que queden así protegidas de la luz y de temperaturas elevadas hasta su llegada al laboratorio. El interior de la nevera se mantendrá limpio y, a ser posible, será de uso exclusivo para transportar muestras de agua.

Si se toman muestras de agua a temperaturas muy diferentes, no se transportarán en la misma nevera muestras de agua a temperaturas elevadas junto con otras de baja temperatura (por ejemplo, no transportar en la misma nevera muestras a 60° C con muestras a 20° C).

Si las muestras llegan al laboratorio en un plazo inferior a 24h desde el muestreo, se podrán transportar a temperatura ambiente, teniendo en cuenta que en el interior de la nevera se mantendrá entre 6-18° C. Pero si llegan al laboratorio entre las 24-48h tras el muestreo, deberá garantizarse que se transportan a una temperatura de $(5\pm 3)^\circ\text{C}$.

En el caso de las muestras para determinación de aerobios, deben llegar al laboratorio en un plazo inferior a 24h desde el muestreo manteniendo una temperatura de conservación de $(5\pm 3)^\circ\text{C}$.

Tal y como aclara la UNE 100030:2017, siempre que se indica una temperatura de refrigeración, se refiere a la temperatura del entorno de la muestra, no a la muestra en sí.

En caso de necesitar bloques refrigerantes, nunca estarán en contacto con los envases de las muestras.

Por otra parte, si bien Legionella no se multiplicaría significativamente durante el periodo de almacenamiento, sí podría verse afectada por la presencia de biocida remanente en la muestra. Si es probable que la muestra tenga biocida y no puede neutralizarse previamente al almacenaje, esta información debe registrarse y reducir al mínimo los tiempos de transporte y almacenaje (se entiende que serían casos excepcionales).

Hay algunos parámetros que requieren conservación (refrigeración y/o acidificación generalmente) por lo que es importante que el transporte hasta el laboratorio se haga en el menor tiempo posible (a ser posible, las muestras se procesarán completamente en las 24 horas siguientes al muestreo, principalmente cuando se trate de muestras para determinación de aerobios). Para determinación de Legionella nunca se deben sobrepasar las 48 horas desde el muestreo hasta el procesamiento de las muestras en el laboratorio, siendo recomendable que lleguen dentro de las 24 horas siguientes al muestreo.

6. CADENA DE VIGILANCIA DE LA MUESTRA



Es esencial asegurar la integridad de la muestra desde su toma hasta la emisión del informe. Ello implica hacer una relación del proceso de muestreo desde el momento de la toma hasta el de su análisis. Este procedimiento de cadena de vigilancia es útil como control rutinario de la trayectoria de la muestra.

Se considera que una muestra está bajo vigilancia personal si se encuentra en posesión física de una persona, que es la que se encarga de custodiarla y de protegerla de posibles falsificaciones, alteraciones, etc.

En caso de que las muestras se transporten al laboratorio por mensajería urgente, se deberá garantizar la custodia y trazabilidad de las mismas.

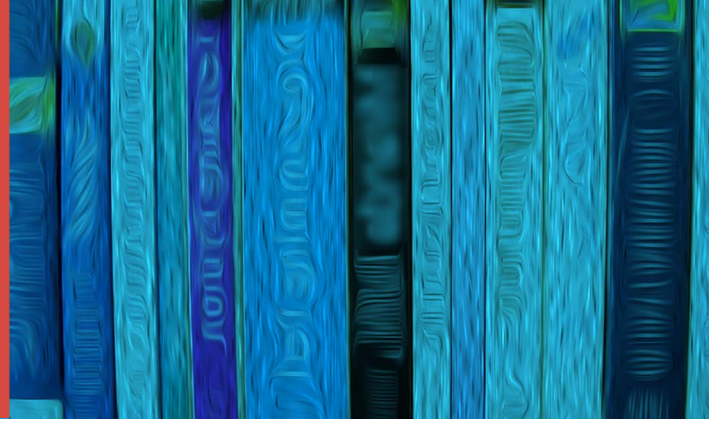
Aspectos de la cadena de vigilancia

- a. **Etiquetado de la muestra:** Se utilizarán etiquetas (que pueden ser adhesivas) para evitar falsas identificaciones de la muestra. En cada etiqueta ha de constar, al menos, la siguiente información: tipo de muestra (agua ACS, agua TORRE, biofilm, etc.), punto de muestreo, fecha de la toma y lugar de la misma (nombre del establecimiento). La etiqueta se rellena con tinta indeleble en el momento del muestreo.
- b. **Libro de registro de la cadena de vigilancia (hoja de campo):** Toda la información pertinente a un estudio de campo o toma de muestras se registrará en un libro en el que, al menos, constará lo siguiente: fecha y hora de muestreo, tipo de muestras recogidas, incidencias generales observadas durante el muestreo, nombre del muestreador, nombre y firma del supervisor del libro y observaciones del mismo respecto a la propia recogida o toma de muestras incluyendo el dato de la temperatura y concentración de biocida en el momento del muestreo. Copia de esta información quedará en el establecimiento en el que se ha muestreado. En el caso de la Administración, estos datos quedarán recogidos en un acta de inspección, dejando la copia correspondiente en el establecimiento muestreado.
- c. **Hoja de petición de análisis de la muestra:** Las muestras de agua que se toman regularmente deberán ir acompañadas de una hoja de petición de análisis en la que figurarán algunos datos obligatorios: nombre de la persona que recibe la muestra, análisis a realizar a cada tipo de muestra implicada, nombre del solicitante del análisis, origen del agua, establecimiento, punto muestreo, municipio, fecha del muestreo.
- d. **Envío de la muestra al Laboratorio:** La muestra se enviará al Laboratorio lo antes posible e irá acompañada de la hoja de petición de análisis. La muestra se entregará a la persona que deba encargarse de su custodia.
- e. **Recepción y almacenamiento de la muestra:** En el Laboratorio la persona encargada recibe la muestra e inspecciona su estado general, comprueba la información de la etiqueta y hoja de petición de análisis, seguidamente se registra en el libro y/o ficha de entradas del Laboratorio y de ella se hace cargo, en

su momento, el /la Responsable Técnico adscrito al Laboratorio , quien toma la decisión de su almacenamiento o procesamiento en las condiciones ya prefijadas, es decir, se hace responsable del cuidado y vigilancia de la misma.

El informe del ensayo deberá contener, al menos, toda aquella información que establece la ISO 11731 y el resultado deberá estar expresado en ufc/l (tanto *Legionella spp* como *L. pneumophila*) con objeto de poder comparar los resultados con los valores de referencia establecidos en la reglamentación vigente.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- ▶ AENOR. UNE-EN 25667-2:1995 - Calidad del agua – Muestreo. Parte 2: Guía para las técnicas de muestreo.
- ▶ AENOR. UNE-EN ISO 6222:1999 - Calidad del agua - Enumeración de microorganismos cultivables. Recuento de colonias por siembra en medio de cultivo de agar nutritivo.
- ▶ AENOR. UNE-EN ISO 5667-3:2019 - Calidad del agua – Muestreo. Parte 3: Guía para la conservación y la manipulación de muestras.
- ▶ AENOR. UNE-EN-ISO 19458:2007 – Calidad de agua. Muestreo para el análisis microbiológico.
- ▶ AENOR. UNE-EN-ISO 11731: 2017 - Calidad del agua - Detección y recuento de Legionella- Método de filtración directa en membrana para aguas con bajos contenidos de bacterias.
- ▶ AENOR. UNE 100030-2017 - Prevención y control de la proliferación y diseminación de Legionella en instalaciones.
- ▶ Australia. State of Victoria. Victorian Government Department of Health. Legionella risk management
<https://www2.health.vic.gov.au/public-health/water/legionella-risk-management-guidelines>
- ▶ CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Legionella.
<http://www.cdc.gov/legionella/index.html>
- ▶ CDC. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recommendations and Reports, Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities: Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Comité (HICPAC). 2003.
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5210a1.htm>
- ▶ Dufresne SF, Locas MC, Duchesne A, Restieri C, Ismail J, Lefebvre B, et al. Sporadic Legionnaires ' disease: the role of domestic electric hot-water tanks. Epidemiol. Infect. 2011 Jan; 140(1):172-81
- ▶ ECDC - ELDSNet. European Legionnaires 'Disease Surveillance Network.
<https://ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/eldsnet>
- ▶ Health Protection Surveillance Centre, Scientific Advisory Committee, Legionnaires' Disease Subcommittee. National guidelines for the control of Legionellosis in Ireland, 2009. Report of Legionnaire's Disease Subcommittee of the Scientific Advisory Committee, Health Protection Surveillance Centre.
http://www.hpsc.ie/hpsc/A-Z/Respiratory/Legionellosis/Publications/File_3936.en.pdf
- ▶ International Organization for Standardization. ISO 11731:1998- Water quality- Detection and enumeration of Legionella.

- ▶ Legionnaires Diseases- A trading Division of Industrial Water Equipment Ltd. Revised Guidelines on the Management of Legionnaires Disease in Ireland, 2008.
<http://www.legionnairesdisease.ie/legionnaires-chapter5.html>
- ▶ Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano (BOE nº 45 de 21 de febrero de 2003).
- ▶ Ministerio de Sanidad y Consumo. 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 (BOE nº 171 de 18 de julio de 2003)
- ▶ Ministerio de Sanidad y Consumo. Guía Técnica para la prevención y control de la legionelosis en instalaciones objeto del ámbito de aplicación del RD 865/2003. Madrid 2007.
- ▶ Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Decreto 742/2013, de 27 de septiembre, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de las piscinas (BOE nº 224 de 11 de octubre de 2013)
- ▶ United Kingdom. Environment Agency. The determination of Legionella bacteria in waters and other environmental samples (2005) - Part 1- Rationale of surveying and sampling.
http://www.environment-agency.gov.uk/static/documents/Research/book_200_1028650.pdf
- ▶ United Kingdom. Health Protection Agency. Water Testing for legionella explained [CD-ROM]; 2008.
- ▶ United Kingdom. Health Protection Agency. Sampling of households for Legionella species.
https://www.gov.uk/search?q=sampling+households&show_organisations_filter=true
- ▶ United States. Occupational Safety & Health Administration. Water Sampling Guidelines.
https://www.osha.gov/dts/osta/otm/otm_iii/otm_iii_7.html#app_iii:7_3
- ▶ World Health Organization. Legionella and the prevention of legionellosis, 2007.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43233/1/9241562978_eng.pdf