



## **CONTROL PREVENTIVO DE LEGIONELOSIS EN INSTALACIONES DE RIESGO DE LA CAPV.**

### **GUÍA PARA LA TOMA DE MUESTRAS**

#### **GRUPO COORDINADOR**

Cuetos Tuñón, Yolanda; De la Fuente Campos, Koldo; Etxeberria Agirresarobe, Mikel; Jiménez Zabala, Ana; Larrucea Bernales, Iratxe.

#### **GRUPO DE TRABAJO**

Astillero Pinilla; M<sup>a</sup> José; Atxaga Castillo, Eneritz; García Robles, Inmaculada; Iraola Garín, Alaitz; Irazabal Tamayo, Nagore; Maiztegi Gallastegi, Pepa; Martínez Arregui; M<sup>a</sup> Victoria; Martínez Rueda, Teresa; Montero Sola, Andoni; Rodríguez Juliá, Marta; Otazua Font, Mónica; Serrano Ibarbia, Elena; Zabala Arriaga, Nieves.

**Enero 2012**

# INDICE

1.- CONSIDERACIONES GENERALES.....	3
2.- CRITERIOS PARA EL MUESTREO. MATERIAL Y MÉTODO.....	3
3.- ELECCIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO Y N° DE MUESTRAS.	6
4.- PROCEDIMIENTO DE MUESTREO EN FUNCIÓN DEL TIPO DE INSTALACIÓN.....	7
• CIRCUITOS DE REFRIGERACIÓN (crf)	
• AGUA CALIENTE SANITARIA	
○ CIRCUITO CON ACUMULACIÓN Y RETORNO	
○ CIRCUITO CON ACUMULACIÓN Y SIN RETORNO	
• SPAS Y SIMILARES	
5.- TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO.....	10
6.- CADENA DE VIGILANCIA DE LA MUESTRA.....	11
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12

## 1.- CONSIDERACIONES GENERALES

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, 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, lo que puede conllevar una toma de decisiones que no sea la mejor 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 localización 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).
- Adecuado transporte y almacenamiento de las muestras que asegure que las muestras 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 RD 865/2003.
- Un control preventivo o de un control para comprobar la eficacia del tratamiento o bien para comprobar el funcionamiento de un sistema.
- De un control para 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

Las personas **responsables del muestreo** 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.- CRITERIOS PARA EL MUESTREO. MATERIAL Y METODO

### **Material**

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

- Nevera portátil con bloques de hielo (en caso que se necesite 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 500 ml para ensayos fisicoquímicos.
- Termómetro digital con sonda verificada.
- Fotómetro y reactivos para medir el biocida residual in situ o bien kit específico proporcionado por el proveedor del biocida.
- Neutralizante específico del biocida utilizado.
- Registro de toma de muestras.
- Materiales para la toma de muestras: mecheros, mascarilla, guantes desechables, herramientas necesarias para facilitar la manipulación de los puntos a muestrear (destornilladores, llaves Allen, llave inglesa,...), rotuladores, bolígrafos, agua destilada.

## Procedimiento

1. Las muestras se deben tomar en recipientes normalizados y adecuados para evitar que se rompan o se vierta su contenido en el transporte.
  - o 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,...
  - o Cuando la toma se realiza para ensayos microbiológicos y fisicoquímicos, se hará en dos recipientes: una en recipiente estéril (para ensayo microbiológico) y otra en recipiente normalizado para la toma de muestras de agua (para ensayo físico-químico).
  - o 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	500 ml.

Las muestras para **ensayos microbiológicos** se toman en recipientes estériles de plástico, con cierre hermético. Se añadirá el neutralizante adecuado al biocida utilizado. Existen recipientes normalizados y comercializados para examen microbiológico.

El envase no se llena hasta arriba (se deja una pequeña cámara de aire). Una vez cerrado, hay que voltear el envase varias veces para que mezcle bien el agua con el neutralizante.

El neutralizante se debe añadir en condiciones de esterilidad y teniendo en cuenta:

- i. la naturaleza del biocida utilizado.
- ii. la concentración residual a la que se encuentre en el agua a muestrear.

**Se debe solicitar al suministrador del biocida, tanto el kit de medida del biocida residual, como el neutralizante del mismo y las concentraciones necesarias para su neutralización.**

En la mayoría de los casos se utilizan derivados clorados o biocidas oxidantes (piscinas, potabilidad, aguas sanitarias y en numerosos circuitos de refrigeración), por lo que el neutralizante más universalmente utilizado es el tiosulfato sódico (**Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**).

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)**.

En el control de prevención de legionelosis, para otros biocidas utilizados en circuitos de refrigeración se debe consultar la información que figura en la Resolución de Inscripción del biocida en el Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. En el apartado "Aplicación" aparece el kit de medición y el neutralizante que debe utilizarse.

2. En el momento de la toma de muestras se mide la temperatura del agua y la cantidad de biocida residual y se anota.
3. Si se va a tomar muestra de biofilm en un terminal, la muestra con torunda se coge antes que la muestra de agua. Antes de introducir la torunda en el envase hay que cortar la parte que se ha tocado con la mano.
4. Los datos de las muestras deben contener como mínimo:
  - o **Identificación de la muestra.** Lugar y punto de muestreo.
  - o **Fecha y hora de la toma de muestra.**
  - o **Razones/Motivos del muestreo** (programación, estudio caso, seguimiento, etc.).
  - o **Persona que ha efectuado el muestreo.**
  - o **Temperatura de la muestra.** (Tª 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 Tª alcanzada en ese tiempo y el tiempo que tarda en estabilizarse la Tª así como cuál es la Tª de estabilización).
  - o **Concentración del biocida residual** y momento de la dosificación en relación al muestreo.
  - o **Si la muestra se ha neutralizado y neutralizante utilizado.**
  - o 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 Tª 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.).
  - o Alto riesgo de que haya nutrientes, como en el caso de plantas de fabricación de plásticos, papel, etc.
  - o Cualquier otro factor de riesgo importante (p. ej. que se trata de un sistema que no se utiliza y sólo se abre o pone en marcha para el mantenimiento, etc.).
  - o Cualquier caso o brote de legionelosis asociado al lugar.
  - o Procedimiento de muestreo seguido: por ejemplo, si la muestra se ha tomado pre-flush, es decir, sin dejar correr el agua o post-flush, dejando correr el agua (estos tipos de muestreo se especifican más adelante) y si se incluye torunda o no.

#### **Aspectos relativos al uso de la torunda:**

- o Si sólo se toma muestra para aerobios hay que tener en cuenta que también tienen que tomarse con el neutralizante específico y sin torunda.
- o Cuando se torunda se aconseja humedecer antes la torunda con el agua a muestrear ya que así recoge mejor el biofilm.
- o **Circuitos de Refrigeración (CRF).** Se torundará sólo en muestras tomadas en balsa cuando: a) se estén investigando casos/brotes, b) en las muestras tomadas tras las L+D y c) en aquellos CRF que presenten frecuentes recuentos positivos de legionella.
- o **Instalaciones ACS.**
  1. Se torundará siempre en duchas en las siguientes situaciones: a) investigaciones de casos/brotes, b) en las muestras tomadas tras la Limpieza y Desinfección (L+D) de la instalación.

2. En las muestras tomadas en dispositivos toma-muestras de acumulador o tubería de purga así como en retorno no se torunda.

Por último, hay que tener en cuenta una serie de precauciones para minimizar la contaminación:

- o Lavarse las manos completamente o llevar guantes desechables.
- o Nunca fumar, comer o beber mientras se toman muestras.
- o Desinfectar el punto de toma de muestras si procede (por ejemplo, con un algodón impregnado con alcohol).
- o 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 flora no deseada.
- o Nunca meter ningún objeto (termómetro, pH-metro,...) dentro del recipiente que contiene la muestra para la realización de análisis microbiológico.
- o Si se van a emplear agentes de conservación, asegurarse de que no están caducados o que presentan un color anormal.
- o 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 este tipo de muestras.

### **3.- ELECCIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO Y NÚMERO DE MUESTRAS**

#### **Elección de Puntos de Muestreo**

Un muestreo correcto es importante porque si no podría llegar a invalidar un resultado.

Las muestras deben tomarse donde es probable que la bacteria pueda estar a altas concentraciones y deben ser representativas de modo que reflejen, en 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, siendo necesario identificar todos los terminales de la misma para poder desarrollar una buena estrategia de muestreo.

Una vez caracterizada la instalación e identificados todos los terminales, la elección de los puntos de muestreo estará relacionada con lo que estamos investigando:

- o **Si se está investigando un caso o brote** de legionelosis se muestrearán los elementos de riesgo relacionados con el mismo;
- o **Si se está caracterizando una instalación** se muestrearán los puntos más desfavorables;
- o **En muestras tomadas tras la 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 puntos habituales;
- o **Si se trata de un seguimiento 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 es posible, se priorizarán los muestreos en duchas antes que en grifos, al tratarse de los puntos de mayor exposición posible.

La persona responsable del muestreo deberá tener en cuenta todos estos factores a la hora de elegir el punto de muestreo.

## Número de Muestras y Periodicidad

En los establecimientos especialmente sensibles (hospitales y clínicas, residencias de ancianos y de disminuidos psíquicos, centros penitenciarios, etc.) el Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad recomienda una periodicidad de muestreo mínima trimestral. En establecimientos lúdicos, turísticos y deportivos la recomendación es semestral.

En cuanto al número de muestras, dependerá del tipo de establecimiento así como de la complejidad y número de terminales que tenga la instalación. En establecimientos de especial riesgo, aparte de las muestras tomadas en retorno y acumulador, puede servir de orientación la siguiente recomendación de la *National guidelines for the Control of Legionellosis in Ireland, 2009*:

### Número de muestras de agua recomendadas en establecimientos de especial riesgo

Número de terminales	Número de muestras en red de distribución y por período de muestreo
< 50	2
51-100	4
101-200	6
201-400	8
401-800	10
801-1600	12
>1600	14

En el resto de establecimientos se recomienda 2 muestras por cada 100 puntos terminales y por periodo de muestreo (aparte de las de acumulador y retorno).

## 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 los 15 días anteriores a la fecha prevista para el muestreo.***

### CIRCUITOS DE REFRIGERACIÓN (CRF)

Algunos de los parámetros de control 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 los usuarios de la instalación 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 de *Legionella* 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: Sería lo ideal. En raras ocasiones la instalación dispone de un dispositivo toma-muestras en la tubería de retorno del agua hacia la torre. Se desinfecta el grifo por fuera, con un algodón impregnado en alcohol, y se coge el agua directamente del grifo. No se torunda.

- \* 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 seguimiento se tomará sólo muestra de agua. Se torundará cuando:
- a) se estén investigando casos/brotes,
  - b) en las muestras tomadas tras la L+D para comprobar su eficacia.

Para ello, se recogen restos de suciedad o limo de la pared de la balsa mediante torunda estéril, la cual se introducirá en el envase que contiene la muestra de agua para detección de *Legionella*.

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. No se torundará.

La muestra para determinación de **aerobios** se tomará en los mismos puntos indicados anteriormente. Se tendrá en cuenta la necesidad de neutralizar la muestra con el neutralizante específico.

Además se tomará muestra para determinación, al menos, de los parámetros físico-químicos que establece el RD 865/2003.

La periodicidad de los muestreos será adecuada al nivel de peligrosidad de la instalación, teniendo en cuenta que la frecuencia mínima de muestreo para torres de refrigeración y condensadores evaporativos es la establecida por la legislación vigente.

## AGUA CALIENTE SANITARIA

### a- 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 existiesen. Se recogerá la primera fracción de la salida del mismo (se dejará correr el agua unos segundos únicamente para eliminar el agua contenida 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. 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 este caso se dejará correr el agua el tiempo necesario (dependiendo de la longitud de la tubería hasta el terminal) hasta que se establezca la temperatura (en este punto se tomaría 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 la temperatura del agua en el acumulador es superior a 70 °C no se recomienda el muestreo, ya que a partir de esta temperatura *Legionella* no sobrevive, muriendo rápidamente. De todos modos, quedará a criterio del técnico-muestreador que será quien tendrá que valorarlo.

En las muestras tomadas en acumuladores no se torunda.



## RED DE ACS Y AFCH:

Hay establecidos 2 procedimientos de muestreo:

- o **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 es mayor la probabilidad de que *Legionella* crezca y se multiplique es 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.
- o **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 con tiosulfato sódico (con cuidado de no contaminar el tapón, etc.). 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).

#### Ducha

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

#### Ducha teléfono:

1. Quitar el difusor. Si se procede también a tomar muestra del biofilm torundar el interior del flexible o manguera, introduciendo la torunda en el interior del flexible lo que se pueda y girándola de modo que se utilice toda su superficie. Meter la torunda dentro del envase. Sin dejar correr el agua, se abre la ducha (si es monomando se coloca en posición de máxima temperatura si estamos muestreando el ACS) y se llena el envase desde el flexible o manguera (es decir, sin colocar el difusor). Es importante no perder el agua que haya podido quedar en el difusor. Se mide la temperatura transcurrido 1 minuto de la apertura de la ducha.
2. 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 como en el punto 1.). Se mide la temperatura transcurrido 1 minuto de la apertura de la ducha.

**Ducha mural:** 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, se coloca 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 no se puede torundar.

Otra opción más sencilla, si bien no evitarían la exposición del técnico muestreador a los aerosoles, sería coger la muestra en envase estéril con boca ancha (*anaclín*) adicionando posteriormente el neutralizante o trasvasar el agua del *anaclín* a un envase estéril con tiosulfato sódico.

Si se trata de un grifo MIXTO (grifo con ducha) la muestra se toma de la ducha.

Si el muestreo se debe a un seguimiento rutinario, se tomará sólo muestra de agua. **Se torundará cuando:**

- a) se estén investigando casos/brotos,
- b) en las muestras tomadas tras las L+D para determinar la eficacia de la misma.

## RETORNO

La muestra se toma directamente del grifo toma-muestras del retorno, sin dejar correr el agua y sin torundar.

## b- 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, se quita antes. 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.

## SPAS Y SIMILARES

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 (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).

Si se está investigando algún caso/brote o se trata de un muestreo tras la L+D para verificar su eficacia, con torunda estéril se recogerán posibles restos de suciedad de la pared del vaso y se introducirá en el envase.

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

La periodicidad mínima de los muestreo será semestral y en instalaciones de establecimientos especialmente sensibles (hospitales y clínicas, residencias de ancianos y disminuidos psíquicos, balnearios, etc.) la periodicidad mínima recomendada es trimestral.

## **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 mezclar muestras a 60°C con muestras a 20°C). Si las muestras llegan al laboratorio el mismo día de su toma se podrán transportar a temperatura ambiente pero si llegan al laboratorio entre las 24-48h tras la toma, deberá garantizarse que se transportan a una temperatura de (5±3)°C.

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 deben realizarse en menos de 6 horas (caso del pH) y otros 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). Para *Legionella* nunca se deben sobrepasar las 48 horas desde el muestreo hasta el procesamiento de las muestras en el laboratorio.

## **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 custodiaria y de protegerla de posibles falsificaciones.

### **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: origen del agua (ACS, AFCH, CRF, 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 recogido 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 cinco 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 11731:1998 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.***

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **AENOR**. UNE-EN 25667-2: 1995 - Calidad del agua – Muestreo. Parte 2: Guía para las técnicas de muestreo.
2. **AENOR**. UNE-EN ISO 6622:1999 - Calidad del agua - Enumeración de microorganismos cultivables. Recuento de colonias por siembra en medio de cultivo de agar nutritivo.
3. **AENOR**. UNE-EN ISO 5667-3: 2004 - Calidad del agua – Muestreo. Parte 3: Guía para la conservación y la manipulación de muestras.
4. **AENOR**. UNE-EN-ISO 19458: 2007 – Calidad de agua. Muestreo para el análisis microbiológico.
5. **AENOR**. UNE-EN-ISO 11731-2: 2008 - Calidad del agua- Detección y recuento de *Legionella*- Método de filtración directa en membrana para aguas con bajos contenidos de bacterias.
6. **Australia. State of Victoria**. Victorian Government Department of Health. Guidance document. Controlling Legionella in warm water systems 2010 (Draft). [en línea]. Melbourne, Victoria. [Consulta 2011-11-03]. Disponible en:  
[www.health.vic.gov.au/environment/legionella](http://www.health.vic.gov.au/environment/legionella)
7. **CDC**. Centers for Disease Control and Prevention. Legionellosis Resource Site. 2011. [en línea]. [Consulta 2011-11-03]. Disponible en:  
<http://www.cdc.gov/legionella/index.htm>
8. **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. [en línea]. [Consulta 2011-02-08]. Disponible en:  
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5210a1.htm>
9. **Departamento de Sanidad del Gobierno Vasco**. Decreto 32/2003, de 18 de febrero, por el que se aprueba el reglamento sanitario de piscinas de uso colectivo (BOPV núm. 88 de 8 de mayo de 2003).
10. **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
11. **EWGLINET**. European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires' Disease, 2005. [en línea]. [Consulta 2011-06-14]. Disponible en:  
[www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)
12. **Health Protection Surveillance Centre**, Scientific Advisory Committee, Legionnaires' Disease Subcommittee. National guidelines for the control of Legionellosis in Ireland, 2009. [en línea]. Report of Legionnaire's Disease Subcommittee of the Scientific Advisory Committee, Health Protection Surveillance Centre. [Consulta 2011-10-31]. Disponible en:  
<http://www.hpsc.ie/hpsc/A-Z/Respiratory/Legionellosis/Publications/File,3936,en.pdf>
13. **International Organization for Standardization**. ISO 11731:1998- Water quality- Detection and enumeration of *Legionella*.
14. **Legionnaires Diseases- A trading Division of Industrial Water Equipment Ltd**. Revised Guidelines on the Management of Legionnaires Disease in Ireland, 2008. [en línea]. Dublin. [Consulta 2011-06-14]. Disponible en:  
<http://www.legionnairesdisease.ie/legionnaires-chapter5.html>
15. **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 núm. 45 de 21 de febrero de 2003).

16. **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 núm. 171 de 18 de julio de 2003)
17. **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.
18. **United Kingdom. Environment Agency.** The determination of *Legionella* bacteria in waters and other environmental samples (2005) - Part 1- Rationale of surveying and sampling. [en línea]. [Consulta 2011-02-08]. Disponible en:  
[http://www.environment-agency.gov.uk/static/documents/Research/book\\_200\\_1028650.pdf](http://www.environment-agency.gov.uk/static/documents/Research/book_200_1028650.pdf)
19. **United Kingdom. Health Protection Agency.** Water Testing for legionella explained [CD-ROM]; 2008.
20. **United Kingdom. Health Protection Agency.** Sampling of households for Legionella species. 2011. [en línea]. [Consulta 2011-02-08] Disponible en:  
[http://www.hpa.org.uk/web/HPAweb&HPAwebStandard/HPAweb\\_C/1195733811324](http://www.hpa.org.uk/web/HPAweb&HPAwebStandard/HPAweb_C/1195733811324)
21. **United States. Occupational Safety & Health Administration.** Water Sampling Guidelines. [en línea]. Washington. [Consulta 2011-04-14]. Disponible en:  
<http://www.osha.gov/dts/osta/otm/legionnaires/sampling.html>
22. **World Health Organization.** Legionella and the prevention of legionellosis, 2007. [en línea]. [Consulta 2011-06-24]. Disponible en:  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/emerging/legionella.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf)