

## Distribución y frecuencia de las diferentes especies y serogrupos de *Legionella* aisladas por cultivo en instalaciones de riesgo por legionelosis. La experiencia del Laboratorio de Salud Pública de L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona)

### Distribuição e frequência das diferentes espécies e serogrupos de *Legionella* isolados por cultura em estabelecimentos de risco para legionelose. A experiência do Laboratório de Saúde Pública de L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona)

### *Distribution and frequency of the different species and serogroups of Legionella isolated by culture in facilities at risk for legionellosis. The experience of the Public Health Laboratory of L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona)*

Javier Checa, Rafael del Hoyo, Iago Carbonell, Inés Martí

Sección de Salud Ambiental y Laboratorio. Ayuntamiento de L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona, ESPAÑA.

**Cita:** Checa R, del Hoyo R, Carbonell I, Martí I. Distribución y frecuencia de las diferentes especies y serogrupos de *Legionella* aisladas por cultivo en instalaciones de riesgo por legionelosis. La experiencia del Laboratorio de Salud Pública de L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona). Rev Salud ambient. 2024(1):16-29.

**Recibido:** 17 de octubre de 2022. **Aceptado:** 11 de diciembre de 2023. **Publicado:** 15 de junio de 2024.

**Autor para correspondencia:** Javier Checa Raya  
Correo e: jchecar@l-h.cat

**Financiación:** No se ha contado con financiación para el desarrollo de este trabajo.

**Declaración de conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existen conflictos de intereses que hayan influido en la realización y preparación de este trabajo.

**Declaraciones de autoría:** Todos los autores contribuyeron al diseño del estudio y la redacción del artículo. Asimismo, todos los autores aprobaron la versión final.

## Resumen

La *Legionella* es la bacteria causante de la legionelosis y constituye un notable problema de salud pública. El objetivo de este estudio es establecer la distribución y frecuencia de las diferentes especies y serogrupos de *Legionella* obtenidos de las muestras analizadas en el Laboratorio de Salud Pública de L'Hospitalet durante el período 2002-2019. Se analizaron 3 935 muestras de agua procedentes de instalaciones con probabilidad de proliferación y dispersión de *Legionella* mediante el método ISO 11731:1998. Se determinaron número y porcentaje de *Legionella* spp., *L. pneumophila* serogrupo Sg 1 y *L. pneumophila* Sg 2-14 por tipo de instalación y por año. Los resultados indican que las instalaciones con mayor presencia de *Legionella* son las que incluyen sistemas de agua caliente sanitaria (ACS), (36,4 %). Los sistemas de agua fría sanitaria (AFS) también han de ser considerados lugares propicios para el crecimiento de *Legionella* (17 %), junto con los sistemas de riego por aspersión (13,5 %). De la totalidad de las muestras positivas halladas en las instalaciones (21,5 %), *L. pneumophila* es la más aislada en cultivos (70,5 %) y el serogrupo más frecuentemente encontrado es el 2-14 (34,2 %), seguido del Sg 1 (26,4 %). Esto es contrario a lo encontrado en la mayoría de estudios publicados, ya que citan al Sg 1 como el más frecuente en muestras ambientales. Estos aspectos avalarían la necesidad de ampliar el espectro de diagnóstico de la enfermedad en pacientes ya que la mayoría de hospitales utilizan antígeno en orina, cuya principal limitación es que solo detecta *L. pneumophila* Sg 1.

**Palabras clave:** *Legionella*; *L. pneumophila*; serogrupos; cultivo bacteriológico; agua sanitaria.

## Resumo

A *Legionella* é a bactéria causadora da legionelose e constitui um importante problema de saúde pública. O objetivo deste estudo é estabelecer a distribuição e frequência das diferentes espécies e sorogrupos de *Legionella* obtidos das amostras analisadas no Laboratório de Saúde Pública de L'Hospitalet durante o período 2002-2019. Foram analisadas 3 935 amostras de água de instalações com probabilidade de proliferação e dispersão de *Legionella*, segundo o método ISO 11731:1998. O número e a porcentagem de *Legionella* spp., *L. pneumophila* sorogrupo Sg 1 e *L. pneumophila* Sg 2-14 foram determinados por tipo de instalação e por ano. Os resultados indicam que as instalações com maior presença de *Legionella* são as que integram sistemas de água quente sanitária (AQS, 36.4 %). Os sistemas de água sanitária fria (SAF) também devem ser considerados locais propícios ao crescimento da *Legionella* (17 %), juntamente com os sistemas de irrigação por aspersão (13.5%). De todas as amostras positivas encontradas nas unidades (21.5 %), a *L. pneumophila* é a mais isolada nas culturas (70.5 %) e o sorogrupo mais encontrado é o 2-14 (34.2 %), seguido do Sg 1 (26.4 %). Isso é contrário ao encontrado na maioria dos estudos publicados, pois citam o Sg 1 como o mais frequente em amostras ambientais. Esses aspectos sustentariam a necessidade de ampliar o espectro diagnóstico da doença nos pacientes, uma vez que a maioria dos hospitais utiliza antígeno na urina, cuja principal limitação é detectar apenas *L. pneumophila* Sg 1.

**Palavras-chave:** *Legionella*; *L. pneumophila*; sorogrupos; cultura bacteriológica; água sanitária.

## Abstract

*Legionella* is the bacterium that causes legionellosis and constitutes a notable public health problem. The objective of this study is to establish the distribution and frequency of the different species and serogroups of *Legionella* obtained from the samples analyzed at the L'Hospitalet Public Health Laboratory during the period 2002-2019. 3 935 water samples from facilities with a probability of proliferation and spread of *Legionella* were analyzed using the ISO 11731:1998 method. Number and percentage of *Legionella* spp., *L. pneumophila* serogroup Sg 1 and *L. pneumophila* Sg 2-14 were determined by facility type and year. The results indicate that the facilities with the highest presence of *Legionella* are those that include sanitary hot water systems (ACS, 36.4 %). Sanitary cold-water systems (AFS) must also be considered favorable places for the growth of *Legionella* (17 %), along with sprinkler irrigation systems (13.5 %). Of all the positive samples found in the facilities (21.5 %), *L. pneumophila* is the most isolated in cultures (70.5 %) and the most frequently found serogroup is 2-14 (34.2 %), followed by Sg 1 (26.4 %). This is innovative, since most published studies cite Sg 1 as the most frequent in environmental samples. These aspects would support the need to broaden the diagnostic spectrum of the disease in patients, since most hospitals use urine antigen, whose main limitation is that it only detects *L. pneumophila* Sg 1.

**Keywords:** *Legionella*; *L. pneumophila*; serogroups; bacteriological culture; sanitary water.

## INTRODUCCIÓN

### 1. *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* Y LA LEGIONELOSIS

El género *Legionella* comprende más de 70 especies diferentes<sup>1-6</sup> y se han reportado hasta 31 especies patógenas en humanos (tabla 1). Entre estas especies patógenas destaca *L. pneumophila* serogrupo (Sg) 1<sup>7-9</sup> ya que es la bacteria responsable de entre el 90-96 % de los casos de legionelosis reportados, tanto en la enfermedad grave de neumonía o enfermedad del legionario como en la manifestación aguda autolimitada denominada fiebre de Pontiac<sup>10</sup>. Otros serogrupos de *L. pneumophila* y otras especies como *L. longbeachae*, *L. bozemanii*, *L. micdadei* o *L. dumoffii*<sup>11-14</sup>, producen los casos restantes de legionelosis.

La legionelosis es una enfermedad de distribución mundial con casos descritos en África, Asia, Australia, Europa, Norteamérica y Sudamérica. Esta enfermedad

tiene una mayor incidencia en los países desarrollados y se convierte en un notable problema de salud pública<sup>14,18</sup>. La incidencia identificada de la legionelosis varía ampliamente según el nivel de vigilancia y notificación. Así, en EE.UU., Europa y Australia la incidencia notificada está situada entre 10-15 casos por millón de habitantes por año<sup>19-21</sup>.

Durante 2017, cuatro países de la UE (Francia, Alemania, Italia y España) concentraron el 70,3 % de todos los casos notificados. Italia y Francia presentaron la primera y segunda tasa de prevalencia más alta de Europa con 22,3 y 21,2 %, respectivamente, seguidos de España con un 14,5 % de casos positivos<sup>14</sup>. El serogrupo (Sg) 1 de *L. pneumophila* fue el patógeno identificado con mayor frecuencia, con 801 de 1 014 casos confirmados por cultivo (79 %)<sup>14</sup>. Las infecciones por *Legionella* en España se han descrito en prácticamente toda la geografía peninsular e insular, pero la distribución entre comunidades autónomas y provincias es heterogénea.

De esta forma, la notificación de los casos de legionelosis a las autoridades sanitarias es obligatoria en Cataluña desde 1987 y en el resto de España desde 1995<sup>22</sup>, siendo Cataluña la región española con mayor número de casos reportados con una tasa de incidencia media de 3,7 por 100 000 habitantes durante el periodo 2008-2016<sup>23</sup>.

Tabla 1. Detalle de las 31 especies de *Legionella* que pueden causar enfermedad en los seres humanos

	<b>Especie</b>
1	<i>L. anisa</i>
2	<i>L. birminghamensis</i>
3	<i>L. bozemanii</i>
4	<i>L. cardiaca</i>
5	<i>L. cherrii</i>
6	<i>L. cincinnatiensis</i>
7	<i>L. clemsonensis</i>
8	<i>L. dumoffii</i>
9	<i>L. erythra</i>
10	<i>L. feelei</i>
11	<i>L. gormanii</i>
12	<i>L. hackeliae</i>
13	<i>L. indianapolisensis</i>
14	<i>L. jordanis</i>
15	<i>L. lansingensis</i>
16	<i>L. londiniensis</i>
17	<i>L. rubrilucens</i>
18	<i>L. longbeachae</i>
19	<i>L. lytica</i>
20	<i>L. maceachernii</i>
21	<i>L. micdadei</i>
22	<i>L. monrovica</i>
23	<i>L. nagasakiensis</i>
24	<i>L. oakridgensis</i>
25	<i>L. parisiensis</i>
26	<i>L. pneumophila</i>
27	<i>L. sainthelensis</i>
28	<i>L. steelei</i>
29	<i>L. tucsonensis</i>
30	<i>L. wadsworthii</i>
31	<i>L. waltersii</i>

Elaboración propia a partir de diversas informaciones de carácter científico detalladas en la bibliografía<sup>15-17</sup>.

## 2. **NORMATIVA Y ACTUACIONES EN L'HOSPITALET DE LLOBREGAT (BARCELONA)**

En España, el marco legislativo de actuaciones de control de las instalaciones de riesgo por legionelosis viene dado por el Real Decreto (RD) 487/2022. Anteriormente, otras normativas y especificaciones técnicas se han empleado para controlar este tipo de instalaciones como el RD 865/2003<sup>24</sup>, plenamente vigente hasta el 02-01-2023, la Guía Técnica del Ministerio de Sanidad<sup>25</sup> y la Norma UNE 100030:2017<sup>26</sup>. En Cataluña se aplica también el Decreto (D) 352/2004<sup>27</sup>, que amplía algunas actuaciones de control sobre estas instalaciones. En todas estas normativas encontramos los límites paramétricos de *Legionella* para los diferentes tipos de instalaciones.

La Sección de Salud Ambiental y Laboratorio de L'Hospitalet de Llobregat inspecciona, toma muestras de agua y analiza *Legionella* en las instalaciones de riesgo contempladas por este marco legislativo<sup>24-27</sup> de esta ciudad desde 2002<sup>28</sup>. El Laboratorio de Salud Pública de L'Hospitalet utiliza los protocolos que se incluyen en las normas ISO 11731:1998 e ISO 11731:2017 para detectar las diferentes especies de *Legionella*, entre las que se encuentra *L. pneumophila* y sus diferentes serogrupos (Sg 1-14).

## 3. **OBJETIVOS**

El objetivo de este estudio es establecer la distribución y frecuencia de las diferentes especies y serogrupos de *Legionella* obtenidos a partir de las muestras analizadas en el Laboratorio de Salud Pública de L'Hospitalet durante el periodo 2002-2019. Con este estudio podemos establecer la variabilidad de positivos por *Legionella* en función de las instalaciones de riesgo y plantear aspectos colaterales en la investigación de brotes y casos de legionelosis según los resultados obtenidos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. **TIPOLOGÍA DE MUESTRAS ANALIZADAS**

El Laboratorio de Salud Pública de L'Hospitalet de Llobregat analizó un total de 3 935 muestras de agua de instalaciones de riesgo por legionelosis entre 2002 y 2019 (tabla 2).

Las instalaciones con toma de muestras relacionadas con agua caliente sanitaria (ACS) y agua fría sanitaria (AFS) comprendían una gran variedad de edificios e instalaciones: polideportivos, campos de fútbol, piscinas, oficinas, teatros, centros culturales, escuelas, mercados, etc. Las muestras de ACS se obtuvieron de 83 instalaciones con acumulador de agua y, de estas, el 60 %

**Tabla 2.** Número de muestras durante el período de estudio (2002-2019) según su procedencia

ACS	TR	CE	RA	J	VLV	AFS	FO	SA	NA	LV	Total
1940	681	112	346	547	89	45	107	11	17	40	3935

ACS: Agua caliente sanitaria; TR: Torre de refrigeración; CE: Condensador evaporativo; RA: Riego por aspersión; J: Jacuzzi; VLV: Vehículos de limpieza viaria; AFS: Agua fría sanitaria; FO: Fuente ornamental; SA: Sistema antiincendios; NA: Nebulizador alimentario; LV: Lavado de vehículos.

también presentaban sistema de retorno. Las muestras se tomaban de las duchas al ser puntos terminales de ACS y en contacto con los usuarios, pero también directamente del acumulador e incluso del sistema de retorno.

Las muestras de agua de torres de refrigeración (TR) y condensadores evaporativos (CE) se tomaron directamente de la balsa de acumulación de agua de estas instalaciones y de un punto alejado del aporte de agua. En el caso de los *jacuzzis*, la legislación de referencia para las piscinas (RD 742/2013)<sup>29</sup> establece analíticas mensuales de *Legionella ssp.* para estas instalaciones y justificaría el número elevado de muestras analizadas en el laboratorio municipal (10 %). La toma de muestras se realiza directamente sobre el vaso o sobre el sistema de impulsión en el caso de cuellos de cisne y otros dispositivos análogos. El riego por aspersión comprende tanto las zonas verdes urbanas (parques y jardines) como las instalaciones deportivas con césped (campos de fútbol, rugby y atletismo). Las muestras se han tomado directamente de las boquillas de los difusores y aspersores. Para los vehículos de limpieza pública, se tomaron muestras de las pistolas de presión de agua, de los depósitos de los vehículos y, excepcionalmente, de los puntos de suministro de agua para llenar los depósitos de este tipo de vehículos. En los sistemas de limpieza de vehículos se incluyen puentes, túneles y boxes de lavado, y aquí se ha optado por una toma de muestras directamente de los rodillos de cepillos y las boquillas de agua a presión con la ayuda de un sistema telescópico de toma de muestras. El agua a analizar de las fuentes ornamentales se tomaba directamente del sistema de impulsión y, por tanto, muy cerca de la boquilla que conecta con el sistema de recirculación o bombeo. La toma de muestras de los sistemas antincendios se ha realizado en el punto donde se genera el almacenamiento de agua, es decir, en los depósitos que alimentarán rociadores, bocas de incendio equipadas u otros elementos finales del sistema. Finalmente, en los nebulizadores para el mantenimiento de la humedad de productos frescos, utilizados tanto en pescaderías como en fruterías y verdulerías, las tomas de muestras se han realizado en puntos de purga de las boquillas pulverizadoras del sistema.

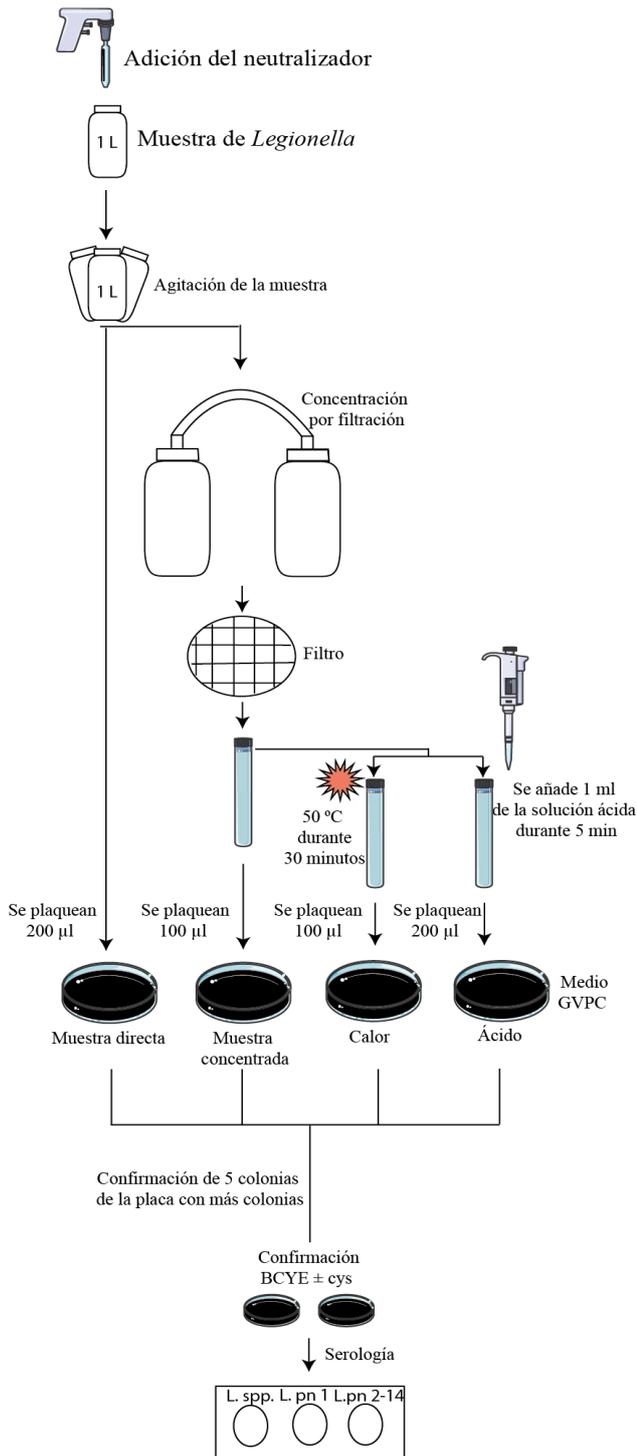
La toma de muestras ha seguido las especificaciones del Anexo 6 del RD 865/2003. En el caso de torres de

refrigeración, condensadores evaporativos y en la red de ACS se ha utilizado una torunda estéril durante la recogida de muestras para la posterior investigación y aislamiento de *Legionella*.

## **2. MÉTODO ESTÁNDAR PARA LA DETECCIÓN Y RECUENTO DE LEGIONELLA MEDIANTE ISO11731:1998**

Los ensayos basados en cultivo para detectar y cuantificar *Legionella* en placas de agar se realizaron de acuerdo con el método estándar<sup>30</sup> en nuestro laboratorio con certificación ISO 9001:2015 (núm. cert.: 34/5200/18/1360) (figura 1). Las muestras llegaron con tiosulfato 3 % añadido previamente por el laboratorio para neutralizar el desinfectante. La concentración de la muestra de agua a través del filtro de membrana se realizó mediante una bomba peristáltica. De acuerdo con el RD 865/2003 y la norma ISO 11731:1998, se filtró 1 litro de agua, aunque en algunas ocasiones se filtraron porciones de ensayo y el resultado final se extrapoló a 1 litro. Posteriormente, los filtros se manipularon con pinzas y tijeras estériles, se cortaron para evitar la retención de material y se colocaron en un tubo estéril con 10 ml de diluyente estéril, solución de Ringer diluida 1:40 (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). El tubo se colocó individualmente en un baño ultrasónico durante 7,5 minutos. Los filtros sumergidos en los diluyentes se agitaron vigorosamente con un agitador vórtex durante dos minutos para facilitar la elución. De esta muestra concentrada se sembró una alícuota de 0,1 ml en una placa GVPC (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Para el tratamiento térmico, 1 ml de la muestra concentrada se calentó en un baño de agua a  $50 \pm 1$  °C durante  $30 \pm 2$  minutos e inmediatamente se sembró 0,1 ml en GVPC. Para el tratamiento con ácido, 1 ml de la muestra concentrada y un 1ml de la parte de la solución ácida se mezclaron en un tubo estéril y se incubaron durante  $5 \pm 0,5$  minutos. De este tubo, se extendieron 0,2 ml en una placa GVPC. Para la muestra directa, se sembró una alícuota de 0,2 ml de la muestra de agua original directamente sobre una placa de medio GVPC. Las placas se incubaron en posición invertida a  $36 \pm 1$  °C durante un mínimo de 10 días en atmósfera húmeda. Durante la incubación, las placas se examinaron al menos tres veces a intervalos de 2-3 días. Las colonias de *Legionella* en agar GVPC son grises y brillantes.

Figura 1. Representación esquemática de la metodología utilizada en este estudio (Método estándar basado en la norma ISO 11731:1998). Se concentra la muestra mediante filtración y posteriormente se eluye este filtro. También se lleva a cabo la siembra directa de la muestra sin tratamiento. Las confirmaciones se realizan a través de placas de BCYE con y sin cisteína. Adicionalmente, el test de aglutinación de Oxoid (*Legionella* Latex Test Kit) se utilizó para distinguir las tipologías de la *Legionella*: *Legionella* spp., *L. pneumophila* Sg 1 o *L. pneumophila* Sg 2-14.



De las placas que mostraban crecimiento de *Legionella*, se tomaron al menos 3 colonias de la placa que contenía el número máximo de colonias por volumen de muestra. Para cada colonia a confirmar, en aislamiento, se inocularon una placa BCYE-cisteína (BCYE-cys) y una placa BCYE+cisteína (BCYE+cys, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) en ese orden. Las placas se incubaron a  $36 \pm 1$  °C durante al menos 48 horas. Si había crecimiento en BCYE+cys pero no en BCYE-cys, el resultado se consideró positivo para *Legionella* spp. independientemente de los resultados de confirmación de látex. El serogrupo de cada colonia de *Legionella* confirmada se determinó utilizando el kit Oxoid *Legionella* Latex Test. Se eligieron al menos 5 colonias para determinación serológica a partir de una única muestra de agua, tres de ellas seleccionadas de la placa BCYE+cys y las otras dos directamente de las placas GVPC originales. El resultado se consideró positivo si había aglutinación. Para las placas con crecimiento de *Legionella*, se consideró en primer lugar la placa inoculada con la muestra directa si el número de colonias confirmadas como *Legionella* era superior a cuatro en dicha placa. En este caso se dividió el número de colonias contadas y confirmadas por el volumen de muestra inoculado en la placa para determinar la concentración. Si el número era inferior a cuatro, se seleccionaba la placa que daba el mayor número de colonias confirmadas de las placas inoculadas con la muestra concentrada y sus tratamientos. En consecuencia, y teniendo en cuenta el volumen inoculado en cada tipo de placa, se calculó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por litro de muestra. Los resultados se informaron de acuerdo con los serogrupos de *Legionella* identificados.

Respecto al análisis de porciones del concentrado de muestra sin estar sometidas a ningún tratamiento, tratadas con calor y tratadas con ácido, el recuento de colonias resultante se multiplicó por 100. Por otro lado, para el análisis directo de muestras de agua sin concentrar se multiplicó por 5 000. Las fórmulas utilizadas para expresar los resultados en UFC por litro se muestran en la tabla 3.

### 3. EL PORCENTAJE DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE *LEGIONELLA*

Del total de muestras analizadas se calculó el porcentaje de las tres tipologías referidas de *Legionella* (*Legionella* spp, *L. pneumophila* Sg 1 y *L. pneumophila* Sg 2-14) por año y por tipo de instalación. Adicionalmente, para las muestras que eran *Legionella* spp. (con crecimiento en BCYE+cys pero no en BCYE-cys) se ha calculado el porcentaje de las que aglutinaban con la serología mediante látex, pero incluyendo solo las muestras de 2016 a 2019.

Tabla 3. Fórmulas para calcular el número de colonias según el método empleado

Método	Fórmula
Placa directa	$C_s = \frac{a}{V_{tot}} \times V_s$
Concentración y posterior elución del filtro	$C_s = \frac{a \times V_c}{V \times V_{tot}} \times V_s$

$C_s$  es el número de *Legionella* en UFC/L;  $a$  es el número calculado de las colonias confirmadas de *Legionella*:

$$a = \frac{\text{fracción positiva confirmada}}{\text{fracción total confirmada}} \times \text{recuento total}$$

$V_c$  es el volumen de la muestra concentrada en mililitros (mL);  $V$  es el volumen de muestra inoculada por placa o conjunto de placas (del mismo medio de cultivo) en mililitros (mL);  $V_{tot}$  es el volumen total de muestra analizada en mililitros (mL);  $V_s$  es el volumen de referencia elegido para expresar la concentración de los microorganismos en la muestra (normalmente 1000 mL).

## RESULTADOS

### 1. MUESTRAS POSITIVAS POR *LEGIONELLA*

Las muestras de agua de las instalaciones con probabilidad de proliferación y dispersión de *Legionella* llegadas al Laboratorio de Salud Pública de L'Hospitalet de Llobregat han presentado un porcentaje de positividad en *Legionella* del 21,5 % (n=846/3 935). Entre las muestras positivas por *Legionella* se consideran: las especies de *Legionella* (*L. spp.*), *L. pneumophila* Sg 1 y *L. pneumophila* Sg 2-14. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2A-D.

*L. pneumophila* Sg 2-14 es la bacteria dominante en los cálculos porcentuales de los años 2002, 2003, 2005, 2010, 2012, 2014, 2018 y 2019 con una media de 34,2 % (n=289/846) frente a los valores de *L. pneumophila* Sg 1, que presentan una media de 26,4 % (n=223/846). El porcentaje de *L. pneumophila* Sg 2-14 es también superior al porcentaje de muestras positivas por *Legionella ssp.* (26,4 %, n=223/846). Por tanto, uno de los resultados más significativos del estudio es un mayor porcentaje de muestras positivas de *L. pneumophila* pertenecientes al serogrupo 2-14 frente a *L. pneumophila* Sg 1.

El estudio comparativo entre las proporciones de *Legionella spp.* y *L. pneumophila* durante 18 años (2002-2019, ver figura 2), muestra que en 2015 se presentó el mayor porcentaje de *Legionella spp.* (50 %; n=15/30). En 2010 fue cuando se registró el menor porcentaje de *L. spp.* 9,1 % (n=3/33).

### 2. DISTRIBUCIÓN DE LAS MUESTRAS CON PRESENCIA DE *LEGIONELLA* EN LAS DIFERENTES INSTALACIONES

Las instalaciones con mayor número de muestras analizadas son las instalaciones de ACS. Casi la mitad de

las muestras (49,3 %, n=1940/3 935) proceden de estas instalaciones, seguido de las torres de refrigeración y condensadores evaporativos (20 %, n=793/3 935), jacuzzis (14 %, n=547/3 935) y riego por aspersión (9 %, n=346/3 935).

*L. pneumophila* Sg 1 alcanza porcentajes a considerar en jacuzzis (37,5 %, n=9/24) y en el riego por aspersión (32,4 %, n=12/37). Esta es la única especie observada en los nebulizadores para el mantenimiento de la humedad de productos frescos. *L. pneumophila* Sg 2-14 es la especie dominante en torres de refrigeración (51,2 %, n=20/39) y en jacuzzis el (50 %, n=12/24) y presenta porcentajes altos en los sistemas de ACS (33,7 %, n=238/706) y más bajos en riego por aspersión (10,8 %, n=4/37).

En algunas instalaciones como en los vehículos de limpieza viaria o en los nebulizadores alimentarios *Legionella spp.* no fue detectada. Por otra parte, las muestras analizadas de los sistemas anticendios fueron todas negativas para *Legionella* (figura 3).

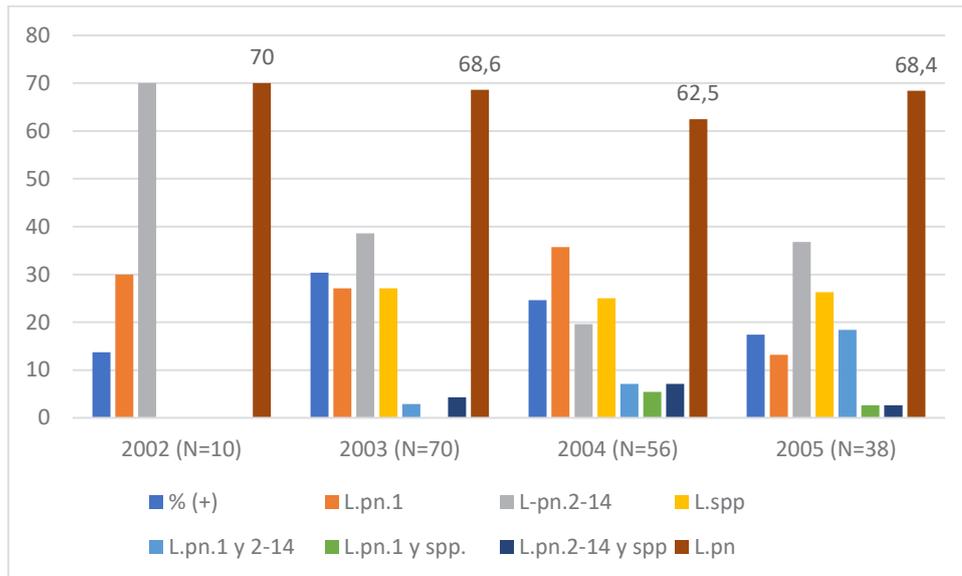
En diversas instalaciones de ACS con acumulador y sistema de retorno se ha constatado la persistencia de las mismas especies y serogrupos de *Legionella* incluso después de efectuados los tratamientos basados en una desinfección térmica o química, tal y como observamos en la tabla 4.

### 3. AGLUTINACIÓN DE ESPECIES DE *LEGIONELLA*

Finalmente, se ha realizado un estudio sobre la aglutinación de *Legionella spp.* El estudio incluye muestras de 2016 a 2019, y la distribución es la presentada en la tabla 4. En este caso, aproximadamente un 26,6 % (n=69/259) son positivos para *Legionella spp.* Pero de este 26,6 %, y según los resultados que se muestran en la tabla 5 hasta el 12 % (n=10/83) de las muestras durante

Figura 2. Porcentajes de muestras positivas detectadas para *Legionella* entre 2002-2005 (A), 2006-2009 (B), 2010-2014 (C) y 2015-2019 (D) y 2011-2019: *Legionella* spp (L. spp), *L. pneumophila* Sg 1 (L. pn.1), *L. pneumophila* Sg 2-14 (L.pn.2-14), porcentaje de muestras positivas sobre el total de muestras [% (+)]. En las gráficas está representado el porcentaje también en forma numérica en el caso de la *Legionella pneumophila*

### A



### B

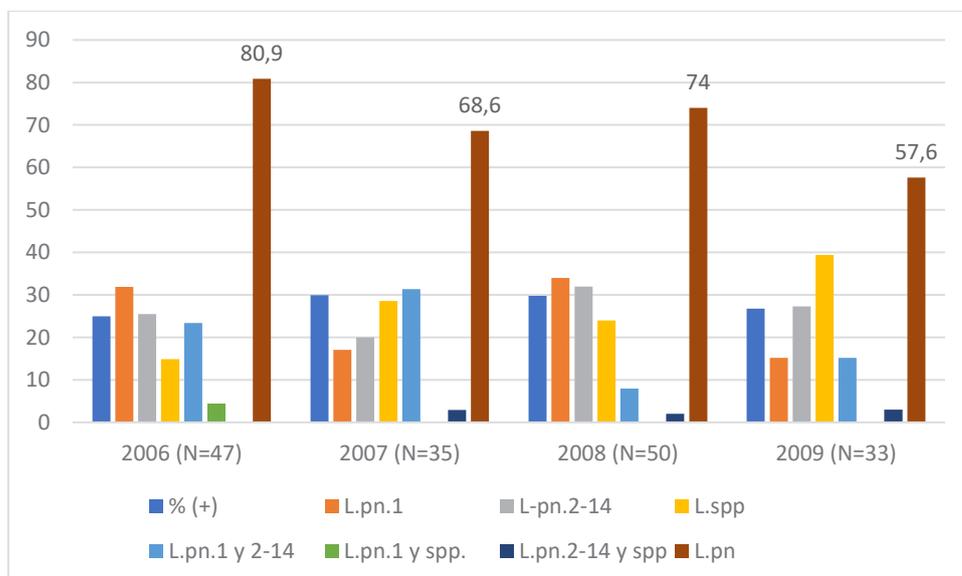
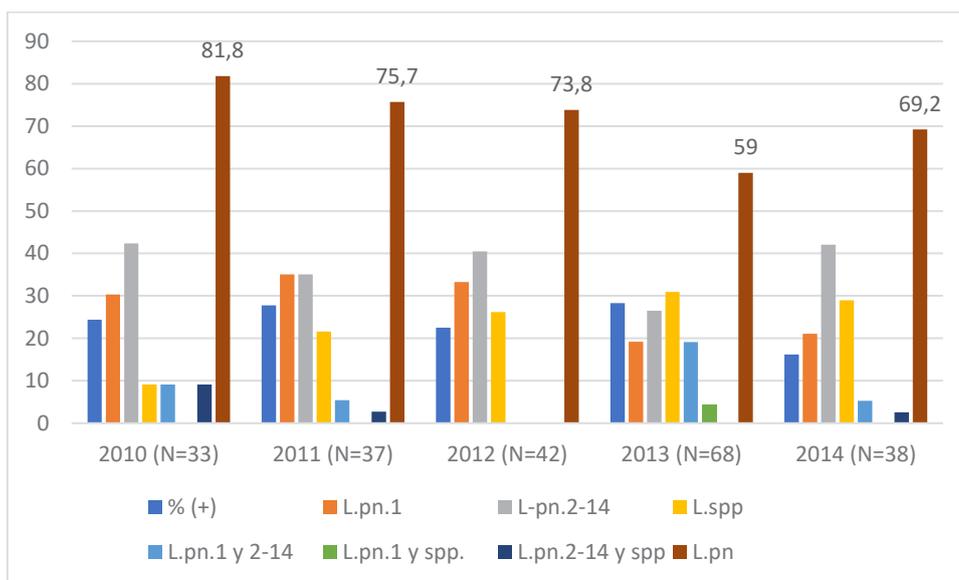


Figura 2 (continuación). Porcentajes de muestras positivas detectadas para *Legionella* entre 2002-2005 (A), 2006-2009 (B), 2010-2014 (C) y 2015-2019 (D) y 2011-2019: *Legionella* spp (L. spp), *L. pneumophila* Sg 1 (L. pn.1), *L. pneumophila* Sg 2-14 (L.pn.2-14), porcentaje de muestras positivas sobre el total de muestras [% (+)]. En las gráficas está representado el porcentaje también en forma numérica en el caso de la *Legionella pneumophila*

**C**



**D**

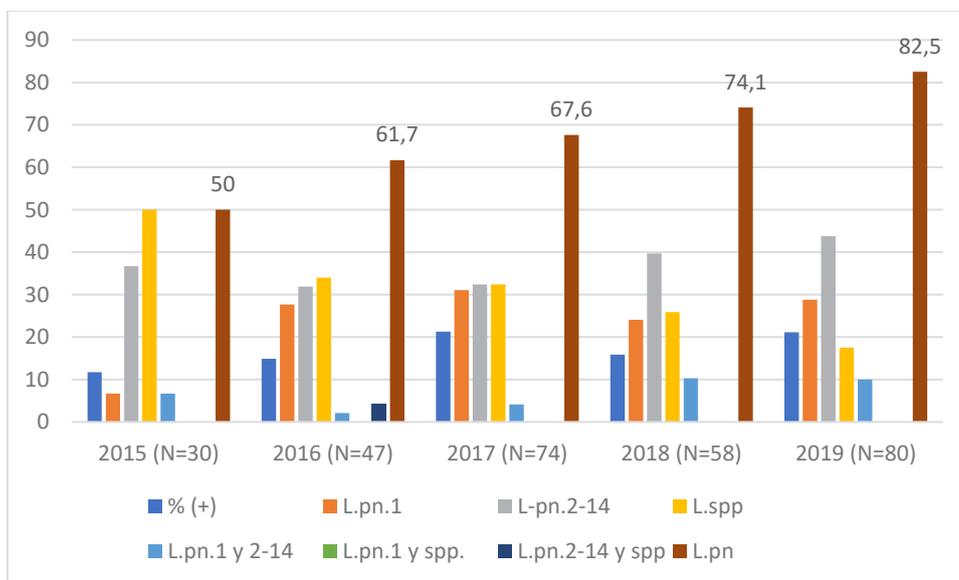


Figura 3. Detalle del número de muestras positivas de *Legionella* por cada instalación. Entre paréntesis, el número de muestras positivas de cada instalación, y su porcentaje con respecto al total. ACS: Agua caliente sanitaria; TR: Torre de refrigeración; CE: Condensador evaporativo; VLV: Vehículos de limpieza viaria; NA: Nebulizador alimentario; AFS: Agua fría sanitaria; RA: Riego por aspersión; FO: Fuente ornamental; J: Jacuzzi; LV: Lavado de vehículos

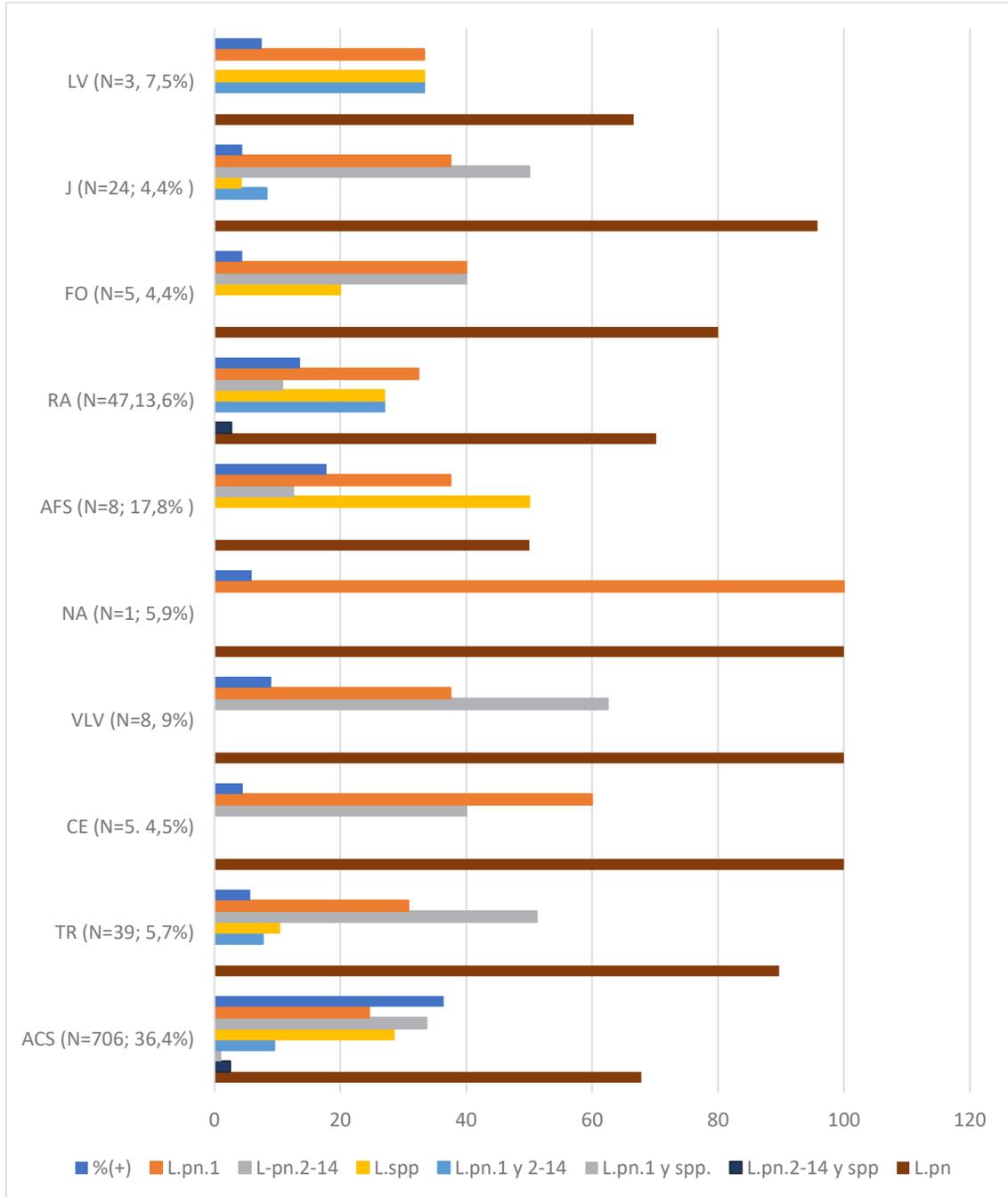


Tabla 4. Persistencia de las mismas especies y serogrupos de muestras positivas para *Legionella* entre 2002-2019 en cuatro instalaciones de ACS con acumulador y sistema de retorno. *Legionella* spp. (L. spp), *L. pneumophila* Sg 1 (L.pn.1) y *L. pneumophila* Sg 2-14 (L.pn.2-14)

Años	ACS 1	ACS 2	ACS 3	ACS 4
2002	-	-	-	-
2003	-	L.pn.1	L.pn.2-14	L.pn.1
2004	L.spp	L.pn.1	L.pn.2-14	L.pn.1, L.pn.2-14 + L.spp
2005	L.spp	L.pn.1	L.pn.2-14	L.pn.1 + L.pn.2-14
2006	L.spp	-	-	L.pn.1, L.pn.2-14 + L.spp
2007	L.spp	-	L.pn.2-14	L.pn.1, L.pn.2-14 + L.spp
2008	L.spp	L.pn.1 + L.spp	L.pn.2-14	L.pn.1, L.pn.2-14 + L.spp
2009	L.spp	L.pn.1	L.pn.2-14	L.pn.1, L.pn.2-14 + L.spp
2010	L.spp	L.pn.1	L.pn.2-14 + L.spp	L.pn.2-14 + L. spp
2011	-	L.pn.1 + L.spp	L.pn.2-14 + L.spp	L.pn.1, L.pn.2-14 + L.spp
2012	-	-	L.pn.2-14	L.pn.1 + L.spp
2013	L.spp	L.pn.1	L.pn.2-14	L.pn.1, L.pn.2-14 + L.spp
2014	L.spp	-	L.pn.2-14	L.pn.1 + L.pn.2-14
2015	L.spp	L.pn.1	L.pn.2-14	-
2016	-	-	-	L.pn.1, L.pn.2-14 + L.spp
2017	L.spp	-	L.pn.2-14	L.pn.2-14 + L. spp
2018	-	-	L.pn.1	L.pn.1, L.pn.2-14 + L. spp
2019	-	-	L.pn.2-14	L.pn.1, L.pn.2-14 + L.spp

Tabla 5. Porcentaje de muestras que dan una aglutinación negativa para *Legionella* spp.

Años	2016	2017	2018	2019	2016-2019	% Total
<i>Legionella</i> negativa	0	1	4	5	10	12
Total	17	25	15	15	83	

el periodo 2016-2019 dieron negativas en la prueba de aglutinación para *Legionella* spp. y *L. pneumophila* Sg 2-14, siendo 2019 el año con mayor porcentaje de *Legionella* y 2016 el año con el porcentaje más bajo.

## DISCUSIÓN

En el estudio realizado en la Sección de Salud Ambiental y Laboratorio del Ayuntamiento de L'Hospitalet de Llobregat se observa que las muestras de agua de las instalaciones con probabilidad de proliferación y dispersión de *Legionella* analizadas han presentado un porcentaje de positividad en *Legionella* del 21,5 % y que más de 2/3 de las muestras analizadas que son positivas para *Legionella* pertenecen a la especie *L. pneumophila* (70,5 %).

Este alto porcentaje de *L. pneumophila* se mantiene a través de los años. En algunos estudios realizados en torres de refrigeración, se ha observado que la abundancia relativa de la familia *Legionellaceae* está positivamente correlacionada con la diversidad de especies<sup>3</sup> lo que sugiere que las interacciones microbianas son esenciales para el crecimiento de *L. pneumophila*. Por otra parte, algunas publicaciones refuerzan la importancia de las torres de refrigeración como reservorio ambiental de *L. pneumophila*<sup>31,32</sup>. La mayoría de las torres de refrigeración parecen contener un núcleo comunitario de *Legionella* spp. pero *L. pneumophila* podría ser capaz de proliferar en detrimento de otras especies de *Legionella*. Estos aspectos pueden explicar la mayor presencia de *L. pneumophila* frente a las demás especies en nuestro análisis para las torres de refrigeración y que fuera la más frecuente (89,7 %) para este tipo de instalaciones, de las cuales el

30,8 % pertenecía al Sg1 y el 51,2 % al Sg 2-14. Por otra parte, de acuerdo con Paranjape y cols<sup>33</sup>, la desinfección química con hipoclorito sódico genera un cambio en la comunidad de *Legionella*, pero *L. pneumophila* puede recuperarse más rápido después del tratamiento y puede dominar la comunidad de *Legionella*<sup>32</sup>.

*L. pneumophila* Sg 2-14 es más frecuente que *L. pneumophila* Sg 1 en algunas de las instalaciones con resultado positivo (ACS, TR, VLV y J). Además, 2-14 es el serogrupo más frecuentemente encontrado (34,2 %) en el total de muestras analizadas con resultado positivo.

En nuestro estudio, si nos centramos en los circuitos de ACS, los resultados muestran que el 33,7 % pertenece a *L. pneumophila* Sg 2-14 y es más abundante que *L. pneumophila* Sg 1 (24,6%). El porcentaje de *L. pneumophila* Sg 2-14 es aún mayor si se añaden cultivos mixtos: 9,5 % pertenece a *L. pneumophila* Sg 1 + *L. pneumophila* Sg 2-14, y el 2,5 % pertenece a *L. pneumophila* Sg 2-14 + *Legionella* spp. Esta alta frecuencia del Sg 2-14 también se ha observado en otros estudios, especialmente en circuitos de ACS en hoteles y hospitales<sup>34,35</sup>, así como en otros estudios en polideportivos<sup>36-38</sup>.

En las diferentes estructuras del circuito hidráulico del ACS (duchas, conductos de agua, acumuladores, etc.) se puede formar un nicho biológico adecuado para el crecimiento de *Legionella* y en muchas ocasiones se forman biopelículas o biofilms<sup>39</sup>, aspecto que favorece la persistencia de *Legionella* en el circuito. La temperatura es otro factor a considerar ya que la mayoría de las muestras positivas para *L. pneumophila* generalmente están relacionadas con aguas con temperaturas superiores a los 30 °C<sup>40,41</sup>. Además, la presencia de *Legionella* es significativamente mayor en los puntos que no se utilizan a diario. En consecuencia, algunos centros presentan una colonización persistente por *Legionella* a pesar de los diferentes tratamientos basados en la normativa vigente y de algunas medidas correctoras estructurales realizadas. En la tabla 4, se observan algunas instalaciones de ACS colonizadas con las mismas especies de *Legionella* año tras año a pesar de los tratamientos efectuados. Se trata de instalaciones con circuitos hidráulicos complejos que requieren una profunda modificación estructural, bien sea por la presencia de puntos con estancamiento de agua o por la existencia de zonas en las que es difícil realizar una purga o en las que el tratamiento de desinfección es menos efectivo<sup>40</sup>. Diferentes estudios de simulación muestran que *Legionella* prolifera fácilmente en aguas estancadas porque se favorece el crecimiento de biopelículas<sup>42,43</sup>. Una solución propuesta por Patrizia De Filippis y cols<sup>38</sup> y que ha resultado eficaz según su experiencia para este tipo de instalaciones consiste en utilizar de forma combinada dos tratamientos de desinfección: hipercloración e hipertermia a 60 °C.

Respecto a las instalaciones analizadas, destaca la mayor frecuencia de *Legionella* en los sistemas de ACS (36,4 %), muy por encima del binomio torres de refrigeración-condensadores evaporativos (TR-CE: 5,7 % y 4,5 %, respectivamente). Las TR y los CE se han identificado con un buen número de brotes y en L'Hospitalet de Llobregat fue la causa de uno de los brotes comunitarios declarado en el año 2002<sup>28</sup>. En L'Hospitalet de Llobregat, la reducción de TR y CE ha sido constante y ha implicado un menor número de instalaciones a considerar para la proliferación de *Legionella*. Por otra parte, los controles y las inspecciones realizadas con toma de muestras han ejercido una cierta presión en este tipo de instalaciones que ha podido influir en el menor porcentaje de positividad encontrado para TR y CE.

En función de los resultados obtenidos, los sistemas de AFS también han de ser considerados como lugares propicios para el crecimiento de *Legionella* (17,8 %) al igual que los sistemas de riego por aspersión (13,6 %) donde existen estudios limitados de *Legionella* en entornos urbanos o naturales y la información sobre su presencia en las aguas subterráneas es escasa. El resto de instalaciones como vehículos de limpieza viaria, lavado de vehículos, fuentes ornamentales, nebulizadores para el mantenimiento de la humedad de productos frescos y jacuzzis dan resultados que oscilan entre el 9 % y el 4 % de positividad de *Legionella* para las muestras analizadas. No obstante, todas las instalaciones estudiadas son susceptibles de generar brotes de *Legionella* como demuestra la gran cantidad de artículos científicos publicados que analizan los resultados obtenidos de las investigaciones ambientales y epidemiológicas de estos brotes<sup>44-50</sup>.

El análisis de aglutinación de *Legionella* spp. muestra que un bajo porcentaje de estas especies podrían ser patógenas, ya que la prueba de aglutinación no las detecta. El test de aglutinación incluye antígenos para las especies de *Legionella* que no son *L. pneumophila* potencialmente más patógenas. Por tanto, si no aglutinan con este test significa que no pertenecen a dichas especies patógenas de *Legionella*. Esto no significa que el método ISO 17731 genere falsos positivos, sino que la prueba de aglutinación no detecta todas las especies de *Legionella*. El porcentaje de *Legionella* que no es detectada por el kit de aglutinación durante los años 2016-2019 es del 12 %. Los métodos de confirmación comúnmente utilizados en los laboratorios tampoco detectan todas las especies patógenas de *Legionella*. Sin embargo, el método Oxoid, que consiste en aglutinación en látex, es capaz de identificar las siguientes especies patógenas de *Legionella*: *L. pneumophila* Sg 1-15, *L. longbeachae* Sg 1 y Sg 2, *L. jordanis*, *L. bozemanii* Sg 1 y Sg 2, *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. gormanii* y *L. anisa*. Así pues, este método puede detectar 8 de las 31 especies patógenas para seres humanos. Otras especies del género *Legionella* también aisladas de pacientes diagnosticados de legionelosis entre 2011

a 2015 en Europa son *L. longbeachae* (1 %), *L. micdadei* (0,3 %), *L. bozemanii* (0,4 %), *L. macaechernii* (<1 %), *L. sainthelensi* (<1 %), otras especies de *Legionella* (<1 %) y especies no identificadas de *Legionella* (1 %)<sup>51</sup>. La mayoría de las infecciones confirmadas que involucran especies diferentes de *L. pneumophila*, como *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* y *L. longbeachae*, ocurren en personas gravemente inmunodeprimidas<sup>52</sup>.

La segunda especie de *Legionella* más abundante epidemiológicamente es *L. longbeachae*. Aunque representa aproximadamente el 1 % de los casos en todo el mundo, se han notificado hasta el 50-60 % de los casos en Australia y Nueva Zelanda<sup>53</sup>. No obstante, durante los últimos 10 años, los casos causados por la infección por *L. longbeachae* también se han notificado cada vez más en Europa<sup>54</sup>. Pero es importante destacar que *L. longbeachae* se encuentra en tierra húmeda y mezclas para macetas y, por tanto, las infecciones con *L. longbeachae* se asocian comúnmente con la exposición a compost contaminado o abonos para macetas, suelos y jardinería siendo estos los únicos factores de riesgo<sup>55,56</sup>.

Aunque se ha de tener en cuenta que la detección en el laboratorio de *Legionella* spp. tiene sobre todo un carácter indicador del peligro microbiológico, los resultados obtenidos en este estudio proporcionan datos significativos de la mayor frecuencia de *L. pneumophila* dentro de las especies positivas para *Legionella* y pueden facilitar el desarrollo de nuevos métodos que se centren en detectar y cuantificar *L. pneumophila*, o reforzar los que ya existen.

Algunas debilidades observadas en la ISO 11731 para el ensayo de *Legionella* spp., como la posible aparición de falsos negativos y los elevados tiempos de espera para obtener resultados, refuerzan la implementación de estos métodos alternativos, como pueden ser el método de cultivo líquido basado en el número más probable para la detección de *L. pneumophila* (Legiolert®)<sup>8</sup> o la separación inmunomagnética y cuantificación por colorimetría de *Legionella* spp. (Legipid®)<sup>57</sup>.

Por otra parte, las concentraciones de *Legionella* que desencadenan las acciones legalmente requeridas varían ampliamente en Europa y el mundo<sup>58</sup>. A nivel europeo, EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections) establece niveles de actuación a partir de  $1 \times 10^3$  UFC/L para *L. pneumophila*. La Directiva (UE) 2020/2184<sup>59</sup>, relativa a la calidad de aguas destinadas al consumo humano se refiere a *Legionella* spp. en lugar de *L. pneumophila* pero también indica un valor paramétrico de actuación a partir de  $1 \times 10^3$  UFC/L. Mientras que la mayoría de los países se refieren a *Legionella* en general, entre ellos España, otros como Francia consideran en su contenido legal citar tanto *Legionella* spp. como *L. pneumophila*. Así pues, sería muy productiva la unificación

normativa en materia *Legionella* y el establecimiento de guías técnicas que ayuden a dar una correcta lectura del RD 487/2022.

Es importante destacar que la recuperación en GVPC para *L. pneumophila* es mayor que para el resto de especies de *Legionella* y que la mayoría de los diagnósticos hospitalarios de pacientes con un cuadro clínico compatible con la legionelosis se realizan con pruebas antigénicas que identifican solo *L. pneumophila* Sg 1. Este hecho avalaría la necesidad de ampliar el espectro de diagnóstico de la enfermedad en pacientes, ya que la mayoría de hospitales utilizan antígeno en orina, cuya principal limitación es que solo detecta *L. pneumophila* Sg 1<sup>60</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

- Burillo A, Pedro-Botet ML, Bouza E. Microbiology and Epidemiology of Legionnaire's Disease. *Infect. Dis. Clin. North Am* 2017; 31:7-27.
- Gomez-Valero L *et al.* More than 18,000 effectors in the *Legionella* genus genome provide multiple, independent combinations for replication in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2019; 116:2265-73.
- Llewellyn A *et al.* Distribution of *Legionella* and bacterial community composition among regionally diverse US cooling towers. *PLoS One* 12, e0189937 (2017).
- Palmer A *et al.* *Legionella clemsonensis* sp. nov.: a green fluorescing *Legionella* strain from a patient with pneumonia. *Microbiol. Immunol.* 2016; 60:694-701.
- Hookey JV, Saunders NA, Fry NK., Birtles RJ, Harrison TG. Phylogeny of *Legionellaceae* based on small-subunit ribosomal DNA sequences and proposal of *Legionella lytica* comb. nov. for *Legionella*-like amoebal pathogens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996; 46:526-31.
- Graells T. Estudi epidemiològic i dels patrons antimicrobians del bacteri intracel·lular facultatiu *Legionella* a l'ambient. *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)* (Universitat Autònoma de Barcelona, 2018).
- Kozak-Muiznieks NA *et al.* Prevalence of sequence types among clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in the United States from 1982 to 2012. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52:201-11.
- Checa J, Carbonell S, Manero N, Martí I. Comparative study of Legiolert with ISO 11731-1998 Standard method- Conclusions from a Public Health Laboratory. *J. Microbiol. Methods.* 2020; 186:106242.
- Cattan S *et al.* *Legionella* spp: An update. *Revue de Medecine Interne.* 2019; 40:791-8.
- Eisenreich W, Heuner K. The life stage-specific pathometabolism of *Legionella pneumophila*. *FEBS Lett.* 2016; 590:3868-86.
- Garrity GM, Brown A, Vickers RM. *Tatlockia* and *Fluoribacter*: Two new genera of organisms resembling *Legionella pneumophila*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1980; 30:609-14.
- McKinney RM *et al.* *Legionella longbeachae* species nova, another etiologic agent of human pneumonia. *Ann. Intern. Med.* 1981; 94:739-43.

13. Phin N *et al.* Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14:1011–21.
14. Beauté J. Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. *Eurosurveillance* 22, (2017).
15. Mcdade JE *et al.* Legionnaires' Disease: Isolation of a Bacterium and Demonstration of Its Role in Other Respiratory Disease. *N. Engl. J. Med.* 1997; 297:1197–203.
16. Fraser DW *et al.* Legionnaires' Disease: Description of an Epidemic of Pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 1977; 297:1189–97.
17. *Legionella* Species - Special Pathogens Laboratory. Disponible en: <https://specialpathogenslab.com/legionella-species/>.
18. Health A.G.D. of Australia's notifiable disease status, 2014: Annual report of the National Notifiable Diseases Surveillance System: Part 1. *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.* 40, (2016).
19. Dooling KL *et al.* Active bacterial core surveillance for legionellosis - United States, 2011–2013. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2015; 64:1190–3.
20. ECDC. Legionnaires' disease Annual epidemiological report for 2017. *Eur. Cent. Dis. Prev. Control* 7 (2019).
21. World Health Organization. Legionellosis. Newsroom, Fact sheet, Detail. 2018. Disponible en: <https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/legionellosis>.
22. Departament de Sanitat i Seguretat Social. *Guia per a la prevenció i el control de la legionel·losi.* (2002).
23. García-Nuñez M *et al.* Characterization of unrelated clinical *Legionella pneumophila* isolates in Catalonia by monoclonal subgrouping and sequence-based typing. *Future Microbiol.* 2016; 11:865–75.
24. España. 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. Boletín Oficial del Estado, 4 de julio de 2003, núm. 171, pp. 28055 a 28069.
25. España. Guía técnica para la Prevención y Control de la Legionelosis en instalaciones. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. (2005).
26. Asociación Española de Normalización, 2017. Norma Española UNE 100030:2017. Prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones. AENOR Internacional, Madrid.
27. España. Decreto 352/2004, de 27 de julio, por el que se establecen las condiciones higienico-sanitarias para la prevención y el control de la legionelosis. Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya, 27 de julio de 2004, nú. 4185, pp. 14726 a 14732.
28. Del Hoyo R, Manero N. Programa de control de torres de refrigeración y condensadores evaporativos en el municipio de L'Hospitalet para la prevención de la legionelosis. *Rev. Salud Ambient.* 5, 11 (2005).
29. España. Real Dereto 742/2013, de 27 de septiembre, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de las piscinas. Boletín oficial del Estado, 11 de octubre de 2013, nú. 244, pp. 83123 a 83135.
30. Asociación Española de Normalización, 1998. Norma Española UNE ISO 11731, 1998. Calidad del Agua-Detección y enumeración de *Legionella*. AENOR Internacional, Madrid.
31. Wéry N *et al.* Dynamics of *Legionella* spp. and bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in a cooling tower facility. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74:3030–7.
32. Pereira RPA, Peplies J, Höfle MG, Brettar I. Bacterial community dynamics in a cooling tower with emphasis on pathogenic bacteria and *Legionella* species using universal and genus-specific deep sequencing. *Water Res.* 2017; 122:363–76.
33. Paranjape K *et al.* Presence of *Legionella* spp. in cooling towers: the role of microbial diversity, *Pseudomonas*, and continuous chlorine application. *Water Res.* 2020; 169:115252.
34. Abdalla Al, Saidan MN, Alami N Al, Al-Naimat H. Comparative assessment of *Legionella pneumophila* prevalence among hospitals and hotels water systems. *Desalin. Water Treat.* 193, 432–41 (2020).
35. Sepin Özen N, Tuğlu Ataman Ş, Emek M. Exploring the *Legionella pneumophila* positivity rate in hotel water samples from Antalya, Turkey. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017 24(13) 24, 12238–42 (2017).
36. Bonadonna L *et al.* Microbial characterization of water and biofilms in drinking water distribution systems at sport facilities. *Cent. Eur. J. Public Health.* 2009; 17:99–102.
37. Napoli C *et al.* *Legionella* spp. and legionellosis in southeastern Italy: Disease epidemiology and environmental surveillance in community and health care facilities. *BMC Public Health.* 2010; 10:660.
38. De Filippis P *et al.* Occurrence of *Legionella* in showers at recreational facilities. *J. Water Health.* 2017; 15:402–9.
39. Declerck P *et al.* Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol. Res.* 2009; 164:593–603.
40. Borella P. *et al.* *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71:5805–13.
41. Leoni E *et al.* *Legionella* waterline colonization: Detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems. *J. Appl. Microbiol.* 2005; 98:373–9.
42. Ciesielski CA, Blaser MJ, Wang WLL. Role of stagnation and obstruction of water flow in isolation of *Legionella pneumophila* from hospital plumbing. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984; 48:984–7.
43. Lipphaus P. *et al.* Microbiological tap water profile of a medium-sized building and effect of water stagnation. *Environ. Technol.* 2014; 35:620–8.
44. Valero N *et al.* Street Cleaning Trucks as Potential Sources of *Legionella pneumophila*. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23:1880–2.
45. Haupt TE *et al.* An Outbreak of Legionnaires Disease Associated with a Decorative Water Wall Fountain in a Hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2012; 33:185–91.
46. Barrabeig I *et al.* Outbreak of Legionnaires' disease associated with a supermarket mist machine. *Epidemiol. Infect.* 2010; 138:1823–8.
47. Euser SM *et al.* Legionnaires' disease associated with a car wash installation. *Lancet.* 2013; 382:2114.
48. García-Fulgueiras A. *et al.* Legionnaires' Disease Outbreak in Murcia, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9:915.
49. Parrilla F, Chacón S, Pérez A. Estudio de las torres de refrigeración asociadas a brotes comunitarios de legionelosis. *Gac. Sanit.* 2007; 21:357–60.

50. Sabria M *et al.* A community outbreak of Legionnaires' disease: evidence of a cooling tower as the source. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006; 12:642–7.
51. Legionnaires' disease - Annual Epidemiological Report for 2017. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report-2017> (2017).
52. Vaqué Rafart J, Martínez Gómez X. Epidemiología de la legionelosis. *Med. Clin. (Barc)*. 2002; 119:14–24.
53. Currie SL, Beattie TK. Compost and *Legionella longbeachae*: An emerging infection? *Perspect. Public Health*. 2015; 135:309–15.
54. Amodeo MR, Murdoch DR, Pithie AD. Legionnaires' disease caused by *Legionella longbeachae* and *Legionella pneumophila*: comparison of clinical features, host-related risk factors, and outcomes. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16:1405–7.
55. Kenagy E *et al.* Risk factors for *Legionella longbeachae* Legionnaires' disease, New Zealand. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23:1148–54.
56. Whitley H, Bentham R. *Legionella longbeachae* and legionellosis. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17:579–83.
57. Álvarez Merchán E, Fernández Gallego JM, Montero Rubio JC. Verificación de un método alternativo de detección y cuantificación de *Legionella* spp. en un laboratorio de salud pública: separación inmunomagnética (SIM) e identificación mediante reacción colorimétrica. *Rev. Salud Ambient. ISSN-e 1697-2791, Vol. 21, Nº. 1, 2021 (Ejemplar Dedic. a Salud y bienestar en el entorno construido una Perspect. Integr. págs. 4-15 21, 4–15 (2021).*
58. Van Kenhove E, Dinne K, Janssens A, Laverge J. Overview and comparison of *Legionella* regulations worldwide. *Am. J. Infect. Control.* 2019; 47:968–78.
59. Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council on the quality of water intended for human consumption. *OJ L 435*, 1–62 (2020).
60. Ito A *et al.* Evaluation of a novel urinary antigen test kit for diagnosing *Legionella pneumoniae*. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 103:42–7.