

Utilidad y necesidad de la inspección intermedia de las placas de cultivo de legionela durante el periodo de incubación

Adrie Atsma (Vitens N.V.), Esther van Harmelen-Vrins (SGI Compliance Environmental Control), Jo Klaessens (StatAlike), Laura Mout (Stichting Koninklijk Nederlands Normalisatie Instituut)

H2O-Online / 9 julio 2021

Una de las modificaciones de la norma internacional para la detección de Legionella en el agua es la introducción de una inspección intermedia de las placas de cultivo. La conclusión de este estudio es que este procedimiento no tiene ningún valor añadido en Holanda.

La norma para la detección de Legionella en el agua es el método de cultivo descrito en la norma NEN-EN-ISO 11731:2017 "Water - Counting of Legionella" [1]. Como explicación de esta norma, en 2019 se publicó la Guía de Práctica Holandesa (NPR 6278) [2]. Una de las modificaciones es la aplicación de una inspección provisional de las placas de cultivo de legionela. Por inspección intermedia se entiende que las placas de cultivo se inspeccionan durante el periodo de cultivo para detectar el crecimiento excesivo de "*especies no legionela*", también conocidas como flora interferente. Esta flora puede dificultar el crecimiento de las especies de legionela posiblemente presentes (véase la figura 1).



Figura 1. Ejemplos de placas de cultivo con mucha flora de interferencia, lo que impide que cualquier bacteria de legionela presente crezca en el medio de cultivo.

Cuando, durante la inspección intermedia, una muestra de cultivo resulta contener mucha flora interferente, se puede informar como "No se puede determinar" (NTB). El cliente puede tomar una nueva muestra del lugar en cuestión y hacer que se repita el análisis de legionela. Esto podría ahorrar de dos a cinco días en comparación con la situación en la que no se realiza ninguna inspección intermedia. La conclusión final sólo se comunica una vez que ha transcurrido el periodo de incubación completo del cultivo de legionela, incluso si la muestra resultó ser BNT en la inspección intermedia.

Dudas sobre la utilidad y necesidad de las inspecciones provisionales

Durante la revisión de la norma NEN-EN-ISO 11731:2017 y, en particular, durante la redacción de la norma NPR 6278, surgió un debate en los laboratorios holandeses (de agua potable) sobre la utilidad y la necesidad de la mencionada inspección provisional. Los laboratorios indicaron que esta acción tiene efectos adversos en las operaciones comerciales y cuesta una cantidad de tiempo desproporcionada. Las horas de trabajo extra que se realizaron fueron aproximadamente 1.300 al año, repartidas proporcionalmente entre quince laboratorios diferentes (véase el recuadro).

Explicación de la cantidad de esfuerzo que supone la realización de una inspección intermedia

Para poder responder a la pregunta de cuánto tiempo dura la inspección intermedia, el Centro de Expertos del Agua de Vitens N.V. ha registrado la duración de la inspección intermedia durante un mes. Esta inspección fue realizada por 10 analistas para aproximadamente 3.500 muestras procedentes de la matriz A (muestras con poca interferencia de la flora, como el agua potable) y de la matriz B (muestras con mucha interferencia de la flora, como el agua de proceso). Se puede concluir que una inspección intermedia dura aproximadamente 20 minutos de media por cada 100 muestras. Anualmente, una inspección intermedia equivaldría entonces a lo siguiente (basado en el número total de muestras de los 15 laboratorios participantes):

Matrix A:	$\frac{370.500 \text{ monsters per jaar}}{100 \text{ monsters}} \times 20 \text{ minuten} = \frac{74.100 \text{ minuten}}{60 \text{ minuten}} = 1.235 \text{ uur}$
Matrix B:	$\frac{26.100 \text{ monsters per jaar}}{100 \text{ monsters}} \times 20 \text{ minuten} = \frac{5.220 \text{ minuten}}{60 \text{ minuten}} = 87 \text{ uur}$

En total, supone una inspección intermedia de aproximadamente 1.322 horas al año, repartidas proporcionalmente entre los 15 laboratorios participantes. A modo de ejemplo: para un laboratorio que utiliza aproximadamente 6.000 muestras de legionela al año, esta acción requiere 20 horas al año y para un laboratorio que utiliza 60.000 muestras al año, requiere unas 200 horas al año.

Además, un estudio anterior realizado en 2018 por cuatro laboratorios holandeses (de agua potable) mostró que para la matriz A, el porcentaje de muestras con flora intereferente es inferior al 1%. Según esta misma investigación, el porcentaje en la matriz B es mayor, concretamente entre el 0 y el 5,2%. Cabe señalar que estos porcentajes se han obtenido en cultivos que se pusieron en marcha con la norma NEN 6265:2007 "Agua - Detección y recuento de Legionella", por lo que se trata de la "antigua situación" y antes de la introducción de la nueva norma. Con esta introducción se ha añadido un tratamiento ácido al método de análisis. Este tratamiento ácido tiene por objeto eliminar cualquier flora interferente, dando a cualquier bacteria de la Legionella presente la oportunidad de formar colonias en el medio de cultivo. Se espera que el uso del tratamiento ácido dé lugar a una flora de

interferencia aún menor, lo que reducirá el porcentaje de muestras con flora de interferencia molesta según el método descrito en la norma NEN-EN-ISO 11731.

A raíz de este estudio, el valor añadido de la inspección intermedia de las placas de cultivo se ha debatido en el subcomité de normas de la NEN sobre parámetros microbiológicos [3], a iniciativa de los laboratorios de agua potable. Se ha acordado determinar el porcentaje de muestras de exceso de peso obtenidas durante la inspección intermedia, con el fin de utilizar las estadísticas para corroborar si la inspección intermedia tiene realmente un valor añadido. Este estudio nacional se inició tras la introducción de la norma NEN-EN-ISO 11731:2017.

Plan de investigación

El objetivo de este estudio es conocer si la inspección intermedia tiene un valor añadido para la identificación temprana de una infección por legionela en el contexto de la prevención de la legionela en los Países Bajos. Para determinarlo, en 2019 se recogieron datos de quince laboratorios holandeses que aplican la norma NEN-EN-ISO 11731.

Para las matrices A y B (ver recuadro) para el periodo comprendido entre el 1 de enero y el 31 de agosto de 2019, estos laboratorios han puesto a disposición la siguiente información:

- Origen del agua analizada (agua potable, agua de piscina, agua superficial, agua de torre de refrigeración, etc.).
- Número de horas de incubación de los cultivos sobre los que se realizó la inspección intermedia.
- Tipo de medio utilizado para el cultivo.
- Número total de análisis de legionela utilizados.
- Número de muestras consideradas como excesivas (NTB) durante la inspección intermedia.

Los laboratorios han suministrado los datos al Real Instituto de Normalización de los Países Bajos (NEN), que ha organizado esta información en tablas con información anónima. A partir de estos datos, se determinaron los porcentajes de BNA en la inspección intermedia y en la evaluación final. A continuación, todos los datos obtenidos fueron evaluados de forma independiente y valorados estadísticamente por la oficina de estadística StatAlike.

Resultados

Los quince laboratorios indicaron que el 99% de las muestras analizadas procedían de los Países Bajos. Los Países Bajos apenas utilizan la desinfección con cloro para la distribución de agua potable, como ocurre en Gran Bretaña o Francia. Lo que se espera es que, sin la desinfección con cloro, la probabilidad de que haya flora perturbadora sea mayor.

Los procedimientos en los que se utiliza el cultivo de legionela se nombran en una "tabla de matriz de decisión" J.1 de la norma NEN-EN-ISO 11731:2017 [1]. Todos los laboratorios utilizaron los

procedimientos 8, 9 y 10 de esta "matriz de decisiones" al realizar el cultivo de legionela en el momento de este estudio.

El número total de muestras y el número de muestras BNT en la inspección intermedia, procedentes de los quince laboratorios, figuran en las tres primeras líneas del cuadro 1.

Para estimar el número total de muestras recogidas para todo el año 2019, se determinaron las cifras anuales de las muestras de legionela para todo el año 2019 del Centro de Expertos del Agua de Vitens N.V. en enero de 2020. El estadístico de StatAlike utilizó estos datos como guía para calcular el número total de muestras de legionela en los Países Bajos y extrapolarlos ponderadamente a los demás laboratorios. Esto se debe a que el período de recogida de datos puede diferir entre los laboratorios (por ejemplo, un laboratorio puede recoger datos durante 7 meses y el otro durante 6 meses). También hay laboratorios que han analizado relativamente pocas muestras, pero tienen una alta puntuación de BNT. Estos "valores atípicos" también se ponderan con respecto a los laboratorios que utilizan muchas muestras. Esto genera diferencias en los porcentajes entre la inspección intermedia hasta agosto de 2019 y los porcentajes calculados para todo 2019. Por cierto, las diferencias son pequeñas y no afectan al resultado final.

Los datos de todo 2019 se muestran en las tres últimas líneas del cuadro 1. A partir de ahí, el estadístico ha calculado el número de muestras de cultivo de legionela en la inspección intermedia BNA.

Tabla 1. Resultados del inventario de BNA en la inspección intermedia

Op basis van inventarisatie laboratoria, van 1 januari 2019 tot en met augustus 2019		
	Matrix A	Matrix B
Aantal monsters ingezet	199.158	16.832
Aantal monsters NTB bij tussentijdse inspectie	251	138
% NTB bij tussentijdse inspectie	0,13%	0,82%
Geschatte hoeveelheden over geheel 2019		
Aantal monsters ingezet	370.500	26.100
Aantal monsters NTB bij tussentijdse inspectie	334	230
% NTB bij tussentijdse inspectie	0,09%	0,88%

Determinar el beneficio y la necesidad de una inspección intermedia

Para determinar la utilidad y la necesidad de la inspección intermedia, hay que tener en cuenta los ingresos y los costes correspondientes (véase el recuadro). Los ingresos se basan en el objetivo de esta inspección de legionela: obtener una indicación de si las medidas adoptadas para controlar la legionela son eficaces. La frecuencia de muestreo se ajusta a este objetivo. Esta frecuencia suele ser de dos veces al año por término medio, es decir, con un intervalo de 183 días. El rendimiento real de la inspección intermedia es que, en caso de un cultivo con una BNT, se sabe por término medio tres días antes que no se puede hacer ninguna declaración sobre la eficacia de las medidas de

control de la legionela. El rendimiento de la inspección intermedia debe estar relacionado con estos 183 días, por lo que el rendimiento se limita a los casos con resultado positivo. Al fin y al cabo, si nunca se producen resultados positivos, el rendimiento de la inspección intermedia es cero.

Los cálculos para determinar el rendimiento (ahorro de tiempo relativo) se detallan en el cuadro 2. Para este cálculo, el Centro de Experiencia del Agua de Vitens N.V. ha determinado el porcentaje de muestras de cultivo positivas a la legionela para 2019. El rendimiento de la inspección intermedia, expresado como ahorro de tiempo relativo, es del 0,00046% para la matriz A y del 0,0039% para la matriz B.

Cuadro 2. Resultados de la investigación y cálculo del valor añadido de la inspección intermedia en el caso de las infecciones relacionadas con la legionela

T*	Gebruikte gegevens	Matrix A	Matrix B
-	totaal aantal monsters ingezet in 2019	370.500	26.100
-	percentage NTB bij de tussentijdse inspectie over 2019	0,09%	0,88%
-	percentage legionella aangetroffen in monster	30,9%	27,2%
1	aantal monsters positief	114.484	2.556
2	aantal monsters met NTB en potentiële aanwezigheid legionella	103	62
3	som aantal dagen winst na 4 dagen inspectie	309	186
-	frequentie bemonsteringen per jaar	2	2
4	aantal dagen tussen 2 bemonsteringen	183	183
5	totaal aantal dagen tussen 2 bemonsteringen × aantal monsters	6,76E+07	4,76E+06
6	Percentage opbrengst tussentijdse inspectie bij legionella	0,00046%	0,0039%

*Explicación sobre el cálculo de las cifras de la tabla:

- 1: número de muestras positivas = porcentaje de muestras positivas en cultivo sobre el número total de muestras en 2019 (datos de Vitens; confirmados por otros laboratorios participantes como representativos).
- 2: número de muestras con una posible infección por Legionella, pero en las que la muestra contiene tal cantidad de flora perturbadora que las colonias de Legionella no tienen la oportunidad de crecer. Es el porcentaje de BNT en la inspección intermedia de 2019 sobre el número de muestras positivas.
- 3: suma del número de días de ganancia tras 4 días de inspección (la duración total de la incubación es de 7 días). El tiempo medio en que se realiza una inspección intermedia es de 4 días. Esto significa que se obtienen 3 días de ganancia. Estos 3 días se utilizan para calcular la suma del número de días de ganancia tras 4 días de inspección, por lo que estos 3 días se multiplican por el número de muestras con BNT y presencia potencial de legionela.
- 4: el número de días entre dos muestreos es el número total de días en un año/frecuencia de muestreos por año (es 2) = 183 días.

- 5: total de días entre 2 muestreos de todas las muestras = 183 días × número total de muestras desplegadas en 2019.

- 6: rendimiento porcentual de la inspección intermedia =

Discusión y conclusión del estudio.

El rendimiento de la inspección intermedia en términos de ahorro de tiempo relativo es insignificante. No justifica los costes adicionales de aplicación que conlleva la inspección intermedia. La conclusión de este estudio es que el valor añadido de la inspección intermedia es, por tanto, insignificante.

Los ingresos procedentes de las inspecciones intermedias definidas aquí se refieren únicamente a los análisis realizados para la inspección rutinaria de las instalaciones. En el caso de un brote de legionela esto es diferente; entonces cada ganancia de tiempo es de vital importancia. Es crucial distinguir entre estas situaciones.

En el caso de la inspección rutinaria, el número de resultados positivos determina en parte el rendimiento de la inspección intermedia. Esto lleva a la observación de que el rendimiento de la inspección intermedia disminuye cuanto más eficaces son las medidas de gestión adoptadas (es decir, cuanto menos resultados positivos se obtienen). Esto es fácil de imaginar: en el caso ideal de que se hayan tomado medidas totalmente efectivas en todas partes, no importa si la confirmación periódica de esto se obtiene tres días antes o después.

Este estudio ha demostrado que una inspección intermedia, en la que se comprueba la presencia de flora perturbadora en los cultivos de legionela tres días antes de que expire el periodo de cultivo, no tiene ningún valor añadido. Las conclusiones anteriores se aplican únicamente a las matrices A y B, utilizando los procedimientos 8, 9 y 10 (con los medios: MWY, GVPC, BCYE y BCYE+AB), como se nombra en la tabla J.1 de la norma NEN-EN-ISO 11731:2017. Los resultados de la investigación y las conclusiones de este estudio serán tenidos en cuenta por los miembros del Subcomité de Parámetros Microbiológicos de la Norma NEN en una futura posible revisión de la norma NEN-EN-ISO11731:2017.

Referencias:

1. Koninklijk Nederlands Normalisatie Instituut (2017). *NEN-EN-ISO 11731:2017 'Water - Telling van Legionella'*. <https://www.nen.nl/nen-en-iso-11731-2017-en-234878>
2. Koninklijk Nederlands Normalisatie Instituut (2019). *NPR 6278:2019 'Water - Toelichting bij de telling van Legionella volgens NEN-EN-ISO 11731'*. <https://www.nen.nl/npr-6278-2019-nl-255078>
3. NEN-normsubcommissie Microbiologische parameters. <https://www.nen.nl/normcommissie-microbiologische-parameters>
4. Stichting ISSO, jan. 2020. *BRL6010 Legionella risicoanalyse en beheersplan* <https://open.issso.nl/publicatie/brl-6010/2018?query=6010>
5. J.F.M. Versteegh, J.F.M. et al. (2009). *Betekenis van Legionella-soorten voor preventiebeleid van*

