

Toma de muestras

1.- MATERIAL

- Nevera portátil con bloques congeladores.
- Recipientes específicos según la toma de muestra a efectuar. Para ensayos microbiológicos deberán ser estériles.
- Termómetro.
- Fotómetro y reactivos para medir el biocida residual *in situ* o bien kit específico proporcionado por el proveedor del biocida.
- Neutralizante del biocida específico.
- Otros: mascarilla, guantes desechables, torundas, herramientas para la manipulación de los puntos a muestrear (destornilladores, llaves Allen, llave inglesa...), rotuladores, bolígrafos, agua destilada, etc.

2.- ELECCIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO Y NÚMERO DE MUESTRAS

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.

La elección de los puntos de muestreo estará relacionada con lo que estamos investigando:

- **Si se está investigando un caso o brote** de legionelosis se muestrearán los elementos de riesgo relacionados con el mismo:
 - En depósitos de agua caliente y fría (acumuladores, calentadores, calderas, cisternas, aljibes, pozos, etc.), preferiblemente de la parte baja del depósito.
 - En la red de agua fría y caliente, de los puntos terminales de la red (duchas, grifos, lavamanos), preferiblemente de habitaciones relacionadas con enfermos, así como de algún servicio común, intentando elegir habitaciones no utilizadas en los días previos a la toma. En la red de agua caliente se deberán tomar muestras de la salida más cercana y de la más lejana al depósito, de la salida más cercana al punto de retorno y de otros puntos terminales considerados de interés.
 - En torres de refrigeración y condensadores evaporativos se tomarán muestras de agua del depósito (en el punto más alejado del aporte) y del retorno.
 - Se tomarán muestras de otras instalaciones como piscinas, pozos, sistemas de riego, fuentes, instalaciones termales, nebulizadores, humidificadores o equipos de



terapia personal. En estos supuestos el número de puntos a tomar muestra de agua dependerá del tipo de instalación y su accesibilidad.

- **Si se está caracterizando una instalación** se muestrearán los puntos más desfavorables.
- **En muestras tomadas tras la limpieza y desinfección (L+D)** para comprobar la eficacia de la misma se incluirán, si es el caso, puntos que anteriormente hayan resultado positivos a *Legionella* o que hayan estado relacionados con casos, además de los puntos habituales.
- **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 posible dosificación de biocida o 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.

En cuanto al número de muestras, dependerá del tipo de establecimiento, así como de la complejidad y número de terminales que tenga la instalación.

3.- MÉTODO

Las tomas de muestra se harán en recipientes estériles para los ensayos microbiológicos y en recipientes normalizados para la toma de muestras de agua para los ensayos físico-químicos.

Ensayos físico-químicos

El recipiente de muestra se debe llenar completamente y cerrarse de forma que no quede una cámara de aire por encima de la muestra. Las características del recipiente se especifican en la tabla siguiente.

Tabla 1 - Características de los envases para los ensayos

Parámetro	Recipiente	Volumen (ml)	Notas
Turbidez	P/V	100	
Conductividad	P/VB	100	Preferible <i>in situ</i>
Fe total	P/VB	100	
pH	P/V	100	Preferible <i>in situ</i>

P= polimérico, V= vidrio, VB= vidrio borosilicatado



Ensayos microbiológicos

Para ensayos microbiológicos (*Legionella* y aerobios), las muestras se toman en recipientes estériles de plástico, con cierre hermético y siempre debe dejarse una pequeña cámara de aire sobre el nivel del agua. Una vez cerrado, hay que voltear el envase varias veces para que mezcle bien el agua con el neutralizante.

Tabla 2 - Tiempo desde recogida hasta inicio del ensayo incluido transporte (t), temperatura de conservación (T^a) y volumen mínimo necesario (V) para ensayos microbiológicos.

Ensayo	t (h)	T ^a (° C)	V (ml)
Aerobios totales	<24	5±3	100
<i>Legionella</i>	<24	6-18	1000
	>24 y <48	5±3	

Neutralizantes

Para los ensayos microbiológicos la muestra debe neutralizarse. Se utilizará el envase que contenga el neutralizante adecuado al biocida utilizado o, en caso de no disponer del mismo, el neutralizante se añadirá en condiciones de esterilidad y teniendo en cuenta la naturaleza del biocida utilizado y 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.

El neutralizante más universalmente utilizado para derivados clorados o biocidas oxidantes es el tiosulfato sódico. Los envases normalizados comercializados para la toma de muestras de aguas para ensayos microbiológicos, en general, tienen una concentración de tiosulfato a razón de 20mg/L, por lo que se pueden utilizar, sin ningún sobreañadido de tiosulfato sódico, para aguas que contengan hasta 4ppm de CRL.

Para otros biocidas utilizados en torres de refrigeración se debe consultar la información que figura en la resolución de inscripción del biocida en el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. En el apartado "Aplicación" aparece el kit de medición y el neutralizante que debe utilizarse.

Medición de la temperatura (T^a) y de la cantidad de biocida residual

En el momento de la toma de muestras se mide también la temperatura del agua y la cantidad de biocida residual.



Para medir la temperatura (T^a) en agua sanitaria: una vez tomada la muestra para análisis de *Legionella*, se abre el grifo durante 1' y se anota la T^a del sistema de agua caliente. Si en 1' el agua caliente no alcanza 50 °C, se anotará la T^a alcanzada en ese tiempo y el tiempo que tarda en estabilizarse la T^a , así como la T^a de estabilización. Si se trata de agua fría se deja correr el agua durante 2' y se registra la temperatura.

Hay que tener en cuenta que no se puede introducir ningún objeto (termómetro, torunda, etc.) dentro del recipiente que contiene la muestra para la realización del análisis microbiológico.

Aspectos relativos al uso de torunda

Se pasará torunda cuando se estén investigando casos/brotos. También se puede torundar en las muestras tomadas tras la L+D para determinar la eficacia de la misma. Si el muestreo se debe a un seguimiento rutinario, se tomará sólo muestra de agua.

Para el raspado con torunda en el caso concreto de los grifos o duchas de agua de consumo, se debe seguir el siguiente procedimiento:

- Quitar el filtro o cabezal de la ducha.
- Introducir la torunda en el interior del grifo o la manguera lo que se pueda haciéndola girar sobre la superficie interna y raspar también sobre el filtro o cabezal si se aprecia biofilm de forma evidente.
- Introducir la torunda en un tubo de transporte estéril con el diluyente adecuado y cerrarlo.
- Identificar la muestra adecuadamente y remitirla al laboratorio.

Las guías¹ revisadas recomiendan para muestrear *Legionella* tomar muestras de agua y, en investigaciones de casos, tomar también muestras de biofilm (mediante torunda) por separado.

4.- PROCEDIMIENTO DE MUESTREO EN FUNCIÓN DEL TIPO DE INSTALACIÓN

Antes de la toma de muestras hay que asegurarse de 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.

¹ European Technical Guidelines for the Prevention, Control and Investigation, of Infections Caused by *Legionella* species. ECDC European Centre for Disease Prevention and Control. June 2017.
LEGIONELLA and the prevention of legionellosis. World Health Organization 2007.
Legionnaires' disease. HSE Health and Safety Executive. 2014.
Manual técnico de la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional de EEUU (OSHA).
https://www.osha.gov/dts/osta/otm/otm_iii/otm_iii_7.html#app_iii:7_3
National Guidelines for the Control of Legionellosis in Ireland, 2009.



En el Anexo 6 del RD 865/2003 se establece la recogida de muestras para aislamiento de *Legionella* en el contexto de actuaciones en las instalaciones (artículo 12) cuando se sospecha que una instalación está asociada con los casos notificados.

Torres de refrigeración/ condensadores evaporativos

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: en raras ocasiones la instalación dispone de un dispositivo toma-muestras en la tubería de retorno del agua hacia la torre.
- 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. Recoger posibles restos de suciedad e incrustaciones. 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.

La muestra para determinación de *aerobios* y de los *parámetros físico-químicos* se tomará en los mismos puntos indicados anteriormente.

Agua Sanitaria

Acumuladores de ACS:

La muestra se tomará preferiblemente en la parte baja (purga) ya que así se recogen también posibles 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). Se medirá la temperatura.

Si se toma de la purga y ésta 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 (recogiendo, en este caso, también la primera fracción) o en el terminal más próximo al acumulador. En este último 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).

Red de ACS y AFCH:

Hay establecidos 2 procedimientos de muestreo:

- *Pre-flush* (sin dejar correr el agua): su objetivo es muestrear el terminal y su tubería. Representa la colonización del terminal, ya que una de las zonas donde 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.
- *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.

Si es posible, se deben priorizar los muestreos en duchas antes que en grifos, al tratarse de los puntos de mayor exposición.

Si se toma muestra *pre-flush*: se coloca el grifo en posición máxima temperatura de agua caliente o fría, según el sistema que se desee muestrear. Abrir el grifo y tomar un litro en un envase. Posteriormente, dejar correr el agua hasta estabilización, al menos 1 minuto y medir la temperatura (si se trata de agua fría dejaremos correr el agua durante 2 minutos).

En caso de recoger muestra *post-flush*: se abre el grifo a tope dejando correr el agua cerca de un minuto o hasta que la temperatura sea estable, y se rellena el envase de recogida.

Se pasará *torunda* cuando se estén investigando casos/brotos.

Retorno: se toma directamente del grifo toma-muestras del retorno sin dejar correr el agua.

Spas y similares

La muestra se toma en un punto alejado del aporte de agua. Se sumerge el envase en el spa 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).



5.- IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS Y REGISTRO DE LAS TOMAS DE MUESTRA

Deberá reflejarse la siguiente información referente a la toma de muestras:

- Identificación de la muestra: nombre y dirección de la instalación, tipo de instalación (ACS, TR...) y punto exacto de muestreo.
- Fecha y hora de la toma de muestras.
- Tipo de análisis (rutinario, brote, seguimiento positivos...).
- Nombre de la persona que toma la muestra.
- Biocida empleado, concentración de biocida residual.
- pH y T^a de la muestra.
- Neutralizante utilizado y anotación en caso de no haberlo utilizado.
- Determinaciones solicitadas.
- Observaciones.

Copia de esta información quedará en el establecimiento en el que se ha muestreado.

6.- TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO

Las muestras deberán llegar al laboratorio lo antes posible y siempre antes de 48 horas. Si las muestras llegan el mismo día de la toma se podrán transportar a temperatura ambiente protegidas de la luz solar y evitando temperaturas extremas, en caso contrario deberán conservarse refrigeradas (2-8 °C). Las muestras de agua caliente deben refrigerarse inmediatamente después de tomadas.

7.- INFORMES DE ENSAYO

El informe de ensayo debe incluir al menos la siguiente información:

- Método analítico utilizado, especificando el límite de detección o cuantificación.
- Identificación de la entidad que emite el informe de ensayo.
- Identificación del cliente.
- Información para la identificación de la muestra incluyendo la entidad que realiza la toma de muestra, la identificación de la instalación, el tipo de instalación y el punto exacto de muestreo.
- Neutralizante utilizado y anotación en caso de no haberlo utilizado.
- Resultados de parámetros analizados *in situ*.
- Volumen de muestra examinada.
- Fecha de:
 - Toma de la muestra (fecha y hora)
 - Recepción en el laboratorio



- Examen (fecha inicio y final del ensayo) en el laboratorio
- Emisión del informe
- Cualquier circunstancia observada en el proceso de toma de muestra, transporte y ensayo que pueda influir en el resultado.
- Los resultados microbiológicos expresados de la siguiente manera:
 - Aerobios: nº de unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml) de muestra para cada temperatura de incubación.
 - *Legionella*: Se registra el número estimado confirmado de *Legionella* presente, como nº de unidades formadoras de colonias de especie de *Legionella* por litro (ufc/l) de muestra, y se informa de la ausencia con el término “no detectada” en el volumen examinado.

Bibliografía:

- 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.
- Programa de vigilancia sanitaria para la prevención y control de la legionelosis en Aragón. Actualización mayo de 2017.
- Norma UNE 100030: Prevención y control de la proliferación y diseminación de *Legionella* en instalaciones. Abril 2017.
- Control preventivo de legionelosis en instalaciones de riesgo de la CAPV. Guía para la toma de muestras. Enero 2012.