

Detección de *Legionella pneumophila* en los sistemas de agua de la Facultad de Odontología de la UAEM.

Detection of Legionella pneumophila in the water supply systems at the Autonomous University of the State of Mexico's (UAEM) Faculty of Dentistry.

Gaudy Lizeth Manzanares Leal,* Norma Margarita Montiel Bastida,** Sara Gabriela María Eugenia del Real Sánchez,***
Rosa Isela Flores Chávez****

RESUMEN

Antecedentes: Los sistemas de agua, incluidos los de unidades dentales, son sitios propicios para el establecimiento de biopelículas que pueden estar colonizadas por microorganismos patógenos oportunistas tan importantes como *Legionella pneumophila*, bacteria causante de enfermedades pulmonares graves. **Objetivo:** Determinar por primera vez la presencia de *Legionella pneumophila* en los sistemas de agua de la Facultad de Odontología de la UAEM. **Material y métodos:** Estudio observacional, transversal, para el cual fueron recolectadas 120 muestras de agua de la Facultad de Odontología de la UAEM, incluyendo líneas de agua de unidades dentales, filtros y llaves de abastecimiento público. Se cultivaron en agar BCYEα con L-cisteína y confirmación en agar sangre, se contaron UFC/mL y se aplicó una prueba de ANOVA y test de Bonferroni con el paquete SPSS 21 para su análisis estadístico. **Resultados:** El 100% de las muestras tuvo crecimiento en agar BCYEα y ausencia en agar sangre. Hubo diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en todas las evaluaciones. **Conclusiones:** Se propone un monitoreo semestral para realizar correcciones oportunas que eviten el aumento de la bacteria y la consecuente producción de enfermedad.

Palabras clave: *Legionella pneumophila*, biopelícula, unidades dentales.

ABSTRACT

Background: Water supply systems, including those of dental units, are prone to the development of biofilms that may be colonized by opportunistic pathogens such as *Legionella pneumophila*, a type of bacteria that can cause severe lung diseases. **Objective:** To determine, for the first time, whether *Legionella pneumophila* is present in the water supply systems of the Faculty of Dentistry at the UAEM. **Material and methods:** An observational, cross-sectional study was performed in which 120 water samples were collected from the Faculty of Dentistry of the UAEM, including from the water supply lines of dental units, the filters, and the publicly-used faucets. These were then cultivated in BCYEα agar with L-cysteine and verified using blood agar. CFU/mL were counted and an ANOVA test and a Bonferroni test were applied with the help of SPSS.21 software package for statistical analysis. **Results:** 100% of the samples displayed growth in BCYEα agar and an absence in blood agar. There were statistically significant differences ($p \leq 0.05$) in all of the tests. **Conclusions:** Six-monthly monitoring is recommended in order to allow timely corrections to be made and to avoid any increase in the bacteria and the development of disease.

Key words: *Legionella pneumophila*, biofilm, dental units.

INTRODUCCIÓN

En odontología, el uso de instrumentos rotatorios y jeringa triple produce aerosoles que pueden ser fuente de infección, y tanto el equipo de atención dental como los pacientes están expuestos a ellos. De acuerdo con la Asociación Dental Americana (ADA), los sistemas de agua de la unidad dental son sitios propicios para el establecimiento de biopelículas colonizadas por microorganismos que se encuentran comúnmente en el agua potable, incluyendo especies de *Legionella*. La *Legionella* es una bacteria perteneciente a la familia *Legionellaceae*, que incluye 42 especies que habitan normalmente el

* Cirujana Dentista. Alumna de la Maestría en Ciencias Odontológicas. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología.

** Doctora en Odontología. Coordinadora de Planeación de la Facultad de Odontología de la UAEM. Investigadora del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología.

*** Maestra en Ciencias de la Salud. Coordinadora de Postgrado del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología.

**** Maestra en Docencia y Administración en la Educación Superior. Jefa del Departamento de RPBI. Facultad de Odontología.

Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM).

Recibido: Febrero 2014. Aceptado para publicación: Agosto 2014.

suelo y el agua. *L. pneumophila* es la más importante de ellas; este microorganismo tolera el cloro y por ello, sobrevive a los procedimientos de tratamiento del agua. El método estándar para una detección adecuada se basa en el cultivo de los especímenes en agar extracto de levadura y carbón amortiguado (pH 6,9) enriquecido con L-cisteína, hierro y a-cetoglutarato (BCYEα) por un periodo de 3 a 7 días.^{1,2}

La mayoría de las infecciones causadas por *L. pneumophila* se deben a la inhalación de organismos dispersados: la bacteria penetra en las vías respiratorias superiores cuando se aspira el líquido que la contiene o se inhala un aerosol contaminado, de ahí su importancia en odontología. Si el cuerpo no la elimina, llega a los pulmones, donde se multiplica causando alguno de dos tipos de infecciones: Legionelosis o «enfermedad del legionario», caracterizada por una neumonía lobular atípica grave con síntomas polisistémicos, con una tasa de muerte entre el 5 y 30%; o fiebre de Pontiac, enfermedad parecida a la influenza, que se manifiesta con fiebre, dolor muscular, mareos y afectación general del organismo. Los factores que determinan en qué forma se presentará la enfermedad no se conocen, aunque probablemente el estado del huésped influye en ello.³

Aproximadamente 1,000 casos de legionelosis se reportan anualmente a los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), pero se estima que más de 25,000 casos de esta enfermedad ocurren cada año en el mundo, causando más de 4,000 muertes. En México, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica publicó en 2005 el reporte de dos casos con diagnóstico clínico de neumonía por *Legionella*, sin pruebas de laboratorio confirmatorias y ninguno por aislamiento del agente causal; estos casos fueron del Estado de México y Guerrero. Pero hasta el momento, no ha sido notificado ningún brote ni la bacteria ha sido aislada de ningún caso de neumonía; sin embargo, de acuerdo con este sistema, es necesario investigar su presencia en nuestro país para iniciar las medidas que permitan controlar su aparición.^{4,5}

Por tanto, siendo los sistemas de agua de las unidades dentales y de agua potable, reservorios aptos para la proliferación de *Legionella*, el presente trabajo de investigación se centró en determinar, por primera vez, la presencia de *Legionella pneumophila* en los sistemas de agua de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México; con ello, se proveerá de un panorama más amplio de la presencia de dicho microorganismo para implementar estrategias de control y prevención de posibles contagios.

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio de tipo observacional, transversal, donde se seleccionaron cuatro clínicas odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México (clínicas 1, 3, 4 y 5); de ellas fueron tomadas 120 muestras de agua: 48 provenientes de las líneas de agua de alta velocidad de las unidades dentales, 48 de las llaves de agua de los lavabos y 24 de los filtros que abastecen a dichas clínicas. Fueron recolectados en bolsas plásticas estériles 5 mL de agua proveniente de cada una de las fuentes; las muestras se mantuvieron en frío para ser transportadas y sembradas en menos de dos horas en un medio aséptico, por la misma persona. Las muestras fueron filtradas para eliminar posibles sedimentos provenientes de las mangueras y tuberías y, posteriormente a ello, se tomó 0.1 mL y se sembró por difusión en placas de agar *Buffered Charcoal Yeast Extract* alfa adicionado con L. cisteína (BCYEα). Se incubaron a 37 °C por un periodo de 3 a 10 días con revisión diaria para observar el crecimiento de las colonias.

Una vez transcurrido el periodo de incubación y después de la observación de las colonias características de *Legionella*, se realizó la confirmación de cinco colonias típicas de cada placa sembrándolas en agar sangre. Se consideraron como *Legionella* colonias que pueden crecer en agar BCYE, pero que no crecen en agar sangre. Una vez verificados los crecimientos, se contaron las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) y se les realizó tinción de Gram para observar morfología microscópica y comprobar el Gram negativo propio de *Legionella*, modificando el protocolo tradicional al aumentar el tiempo de la fucsina de 30 seg a 1 min.

Para los resultados, se realizó el cálculo de estadísticos descriptivos y comparación de medias mediante una prueba de ANOVA y posteriormente, un test de Bonferroni de las UFC/mL, y se obtuvieron frecuencias de la presencia de dicho microorganismo mediante el paquete estadístico SPSS versión 21.

RESULTADOS

De las 120 muestras de agua, el 100% tuvo crecimiento en agar BCYEα con L-cisteína y ausencia del mismo en agar sangre. Los cultivos presentaron las características morfológicas propias de *Legionella*: colonias puntiformes de hasta 3 a 4 mm, brillantes, convexas, circulares y con margen entero (Figura 1). Al observarlas al microscopio, presentaron estructuras de tipo «vidrio esmerilado».

A través de la tinción de Gram, se observaron bacilos Gramnegativos largos y finos (*Figura 2*).

En cuanto al conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro, el valor mínimo encontrado fue de 19 UFC/mL, proveniente de la línea de agua de alta velocidad de la clínica número tres; el valor máximo encontrado fue de 1,000 UFC/mL, distribuidos en las líneas de agua y las llaves (*Cuadro I*).

A través de una prueba de análisis de la varianza (ANOVA), se determinó que había diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las clínicas, las llaves y los filtros, por lo que se aplicó un test de

Bonferroni para comparación por pares, resultando muy significativa la diferencia entre el número de unidades formadoras de colonias por mililitro encontradas en las clínicas en comparación con las llaves, así como en aquellas encontradas en llaves, en comparación con los filtros (*Cuadro II*).

DISCUSIÓN

La presencia de especies de *Legionella*, en específico de *Legionella pneumophila*, se encuentra ampliamente documentada en países europeos e incluso en Estados Unidos de Norteamérica; sin embargo, en Sudamérica –y en especial en México–, no existen reportes concretos de la incidencia y prevalencia de dicho microorganismo, por lo que el objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *Legionella pneumophila* en los sistemas de agua de la Facultad de Odontología de la UAEM mediante su aislamiento a partir de muestras de agua a través de la técnica de cultivo, ya que ésta sigue siendo hasta ahora el estándar de oro para la determinación de dicha bacteria.⁶

Por medio del cultivo en agar BCYEα adicionado con L. cisteína, se encontró crecimiento bacteriano en el 100% de las muestras analizadas, contrastando con los resultados obtenidos por diversos autores⁷⁻⁹ que reportan frecuencias de entre el 10 y 80% de los ejemplares obtenidos del agua de unidades dentales y de agua potable; esta diferencia puede deberse a factores como la temperatura del medio ambiente, el medio de cultivo, el tiempo de incubación e incluso, el tratamiento ácido que generalmente se realiza en muestras ambientales y que se ha documentado que disminuye hasta en un 50% la cantidad de bacterias.¹⁰ Exner y colaboradores informan que de existir crecimiento en más del 30% de las muestras, el agua está claramente contaminada.¹¹ Este estudio, por lo tanto, confirma que una gran parte de los sistemas de agua de la Facultad de Odontología están infectados con *Legionella*, y esto puede jugar un papel clave como factor de riesgo en la seguridad de los pacientes y el personal que labora en la misma.

Kusnetsov y su grupo¹² sugieren que una concentración de 1,000 UFC/L es un límite teórico aceptable para el desarrollo de la enfermedad; en la presente investigación, se obtuvieron conteos de 19 a 1,000 UFC/mL, contrastando con los resultados obtenidos en diversos estudios.^{13,14} Atlas y su equipo⁷ encontraron concentraciones de *Legionella* spp. de 10,000 UFC/mL, pero *Legionella pneumophila* nunca superó las 1,000 UFC/mL. Williams y sus colaboradores,¹³ por su parte, encontraron concentra-



Figura 1. Aspecto macroscópico de colonias de *Legionella pneumophila*.



Figura 2. Aspecto microscópico de *Legionella pneumophila*.

Cuadro I. Estadísticos descriptivos de las UFC/mL de *L. pneumophila* encontradas en sistemas de agua de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México. 2013.

	N	Mínimo		Máximo		Media	DE
		Líneas de agua de alta velocidad					
Clínica 1	12	97		480		212.50	155.272
Clínica 3	12	19		1,000		314.08	344.869
Clínica 4	12	27		1,000		386.42	321.691
Clínica 5	12	100		1,000		500.92	240.947
Llaves							
Clínica 1	12	100		500		323.42	133.478
Clínica 3	12	276		1,000		465.58	192.963
Clínica 4	12	286		1,000		473.92	202.218
Clínica 5	12	365		1,000		513.58	181.880
Filtros							
Filtro 1	12	45		200		96.92	43.023
Filtro 2	12	33		250		104.58	56.318

UFC/mL = Unidades formadoras de colonias por mililitro.

DE = Desviación estándar.

Cuadro II. Test de Bonferroni para diferencia de medias de las UFC/mL de *Legionella* en clínicas, llaves y filtros de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México. 2013.

Pares evaluados	Diferencia de medias	Desviación estándar	t	g.l.	Significancia
Clínicas-llaves	-90.64583	314.74971	-1.995	47	.052*
Clínicas-filtros	162.54167	280.44964	2.839	23	.009**
Llaves-filtros	293.75000	148.88813	9.665	23	.000**

* p ≤ .05, ** p ≤ .01

ciones que no excedían las 100 UFC/mL. De acuerdo con el Instituto de Seguridad e Higiene del Trabajo Español,¹⁴ se sugiere que en instalaciones con concentraciones de >100 UFC/L y <1,000 UFC/L de *Legionella* spp., se debe revisar el programa de mantenimiento y realizar las correcciones oportunas que disminuyan su concentración, y que la presencia de dichas cantidades de bacterias no limita el uso del agua excepto en personas con alto riesgo (inmunocomprometidos), por lo que se debe monitorear anualmente el número de colonias presentes.

Las concentraciones encontradas por clínicas, llaves y filtros tienen diferencias estadísticamente significati-

vas, lo que nos lleva a valorar que a través del uso de los filtros, la cantidad de microorganismos se mantiene al mínimo, y que la cloración del agua potable, como sabemos, no es un tratamiento adecuado para el control de *Legionella pneumophila*; por ello, los niveles encontrados en las llaves fueron superiores. En cuanto a los conteos provenientes de las unidades dentales, éstos se mantuvieron similares a los de las llaves, aunque con diferencias muy significativas respecto a los de los filtros, lo que nos sugiere que la presencia de biopelículas en las líneas de agua promueve la proliferación de *Legionella pneumophila*.

CONCLUSIONES

- Mediante el presente estudio se comprobó, por primera vez, la presencia de *Legionella pneumophila* en el 100% de las muestras tomadas.
- Los conteos fueron menores a 100 UFC/L, lo cual nos sugiere que la presencia de estas bacterias no limita el uso del agua, pero se propone que se mantenga un monitoreo semestral para realizar las correcciones oportunas que eviten el aumento de la presencia de la misma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barbeau J, Gauthier C, Payment P. Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: a review. *Can J Microbiol.* 1998; 44: 1019-1028. doi: 10.1139/w98-101.
2. Bonadonna L, Briancesco R, Della Libera S, Lacchetti I, Paradiso R, Semproni M. Microbial characterization of water and biofilms in drinking water distribution systems at sport facilities. *Cent Eur J Public Health.* 2009; 17 (2): 99-102.
3. Prescott LM, Halley JP, Klein DA. *Microbiología*. 4a ed. Madrid: McGraw Hill Interamericana; 2004.
4. Craun GF, Brunkard JM et al. Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23 (3): 507-28.
5. Secretaría de Salud, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Vigilancia Epidemiológica. 2005; 22 (8).
6. Koneman EW, Allen S. *Diagnóstico microbiológico/microbiológico diagnosis: Texto y atlas*. 6^a edición. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2006.
7. Atlas RM, Williams JF, Huntington MK. *Legionella* contamination of dental-unit waters. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61: 1208-1213.
8. Ma'ayeh SY, Al-Hiyasat AS, Hindiyeh MY, Khader YS. *Legionella pneumophila* contamination of a dental unit water line system in a dental teaching centre. *Int J Dent Hyg.* 2008; 6: 48-55. doi: 10.1111/j.1601-5037.2007.00280.x.
9. Szymanska J. Risk of exposure to *Legionella* in dental practice. *Ann Agric Environ Med.* 2004; 11: 9-12.
10. Rodríguez E, Gamboa MM, Arias ML. *Legionella* spp. ¿Ausente en los hospitales de Costa Rica? *Rev Biomed.* 2002; 13: 165-169.
11. Exner M, Kramer A, Lajoie L et al. Prevention and control of health care associated waterborne infections in health care facilities. *Am J Infect Control.* 2005; 33: S26-S40.
12. Kusnetsov J, Torvinen E, Perola O et al. Colonization of hospital water systems by *Legionella*, mycobacteria and other heterotrophic bacteria potentially hazardous to risk group patients. *APMIS.* 2003; 111: 546-556.
13. Williams JF, Johnston AM, Johnson B, Huntington MK, Mackenzie CD. Microbial contamination of dental unit waterlines: prevalence, intensity, and microbial characteristics. *J Am Dent Assoc.* 1993; 124: 59-65.
14. Real Decreto 865/2003, de 4.7 (M. San. y Cons., BOE 18.7.2003), por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis.

Correspondencia:

Dra. en O. Norma Margarita Montiel Bastida

Facultad de Odontología.
Universidad Autónoma del Estado de México.
Jesús Carranza esquina Paseo Tollocan, 50130,
Toluca, México.
E-mail: montiel74@hotmail.com