

VERIFICACIÓN DEL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Legionella* spp. EN AGUA POTABLE

Marisol Sepúlveda Sánchez¹, Magda Lucía Rodríguez López², Clara María Arboleda Baena³, Lina María Arismendy González⁴, Judith Betancur Urán⁵

¹Bióloga, analista de microbiología, marisolsepulveda66@gmail.com

²Bióloga, MSc en biología, analista de microbiología, magdarodriguezl@gmail.com

³Bióloga, analista de microbiología, claraarboledab@gmail.com

⁴Bióloga, Coordinadora de Laboratorio Área de Microbiología, linaarismendy@gmail.com

⁵Bióloga, Investigadora asociada, pabetan@gmail.com

Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental-GAIA, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia.

RESUMEN

La verificación de un método en un laboratorio de ensayo permite determinar su idoneidad y tener la capacidad de brindar resultados seguros que integren las necesidades del cliente. El objetivo principal de este estudio es realizar la verificación del método de Filtración por Membrana para la detección y cuantificación de *Legionella* spp. en agua potable, siguiendo los lineamientos de la Norma ISO 11731-2:2004 a través de la evaluación de parámetros de desempeño como límite de detección, precisión intermedia, exactitud e incertidumbre del método. Los resultados demostraron que es posible detectar desde 1 Unidad Formadora de Colonia en 100 ml de agua potable, adicionalmente los análisis realizados demostraron que el método es preciso (C.V < 2,0 %) y exacto (% R > 98 %) de acuerdo con los criterios de aceptación propuestos. En consecuencia, el método es apto para su aplicación en el laboratorio permitiendo obtener resultados confiables.

Palabras clave: *Legionella* spp., Filtración por Membrana, agua potable, Unidades Formadoras de Colonia (UFC)

Recibido: 22 de Septiembre de 2015.

Aceptado: 14 de Junio de 2016.

Received: September 22nd, 2015.

Accepted: June 14th, 2016.

VERIFICATION OF THE MEMBRANE FILTRATION METHOD FOR THE DETECTION AND QUANTIFICATION OF *Legionella* spp. IN DRINKING WATER

ABSTRACT

Method verification in a test laboratory permits to determine its suitability and own the ability to provide reliable results that integrate customer needs. The main aim of the study is to carry out the verification of the membrane filtration method for the detection and quantification of Legionella spp. in drinking water, following the guidelines of ISO 11731-2: 2004 by means of performance parameters evaluation as detection limit, intermediate precision, accuracy and uncertainty of the method. The results showed that it is possible to detect from 1 Colony Forming Unit in 100 mL of potable water, besides the performed analysis showed that the method is precise (C.V < 2.0 %) and accurate (% R > 98 %) according to acceptance criteria proposed. Consequently, the method is suitable for application in the laboratory allowing reliable results

Keywords: *Legionella* spp., Membrane Filtration, drinking water, Colony Forming Unit (CFU).

Cómo citar este artículo: M. Sepúlveda-Sánchez; M. L. Rodríguez-López; C. M. Arboleda-Baena; L. M. Arismendy-González; J. Betancur-Urán, "Verificación del método de filtración por membrana para la detección y cuantificación de *legionella* spp. en agua potable," *Revista Politécnica*, vol. 12, no. 22, pp. 95-104, 2016.

1. INTRODUCCIÓN

Diferentes bacterias del género *Legionella* han sido encontradas en aguas superficiales (lagos, ríos, estanque), en aguas de refrigeración industrial, en los sistemas de aire acondicionado, sistemas domésticos de agua caliente, piscinas y en redes de suministro de agua potable [1, 2, 3].

Este género comprende 71 serogrupos distintos procedentes de cerca de 50 especies conocidas, las cuales se consideran responsables de diversas enfermedades respiratorias en los humanos. Sin embargo, *Legionella pneumophila* serogrupo 1 es considerada la causante principal de los casos de legionelosis, enfermedad respiratoria que produce neumonía y que puede ser mortal [4, 5, 6].

La bacteria *Legionella pneumophila* fue reconocida por primera vez en 1977 después de una epidemia aguda de neumonía en Filadelfia. Desde entonces, numerosos casos aislados y brotes epidémicos han sido detectados en diferentes partes del mundo, con origen en sistemas de aerosolización de agua [6, 7].

El agua para consumo humano debe estar libre de sustancias u organismos que puedan causar irritación química, intoxicación o infección microbiológica. Durante varios años se han empleado ensayos para la determinación y cuantificación de microorganismos indicadores tales como Coliformes totales y *Escherichia coli*, pero no se han empleado análisis para la determinación de otras bacterias patógenas. No obstante, la inocuidad del agua potable no depende única y exclusivamente de la contaminación con microorganismos de origen fecal ya que se ha evidenciado que bacterias del género *Legionella* pueden permanecer en las redes de distribución del agua potable, donde la formación de biopelículas favorecen su crecimiento y los protege frente al hipercalentamiento y a la acción de agentes biocidas como el cloro, permitiendo así su establecimiento en estos puntos [8, 9].

Según la Organización Mundial de la Salud las enfermedades adquiridas por la presencia de agentes patógenos en el agua, constituyen un problema de Salud Pública que demanda un urgente control mediante la implementación de programas de protección ambiental, con el fin de evitar la aparición de enfermedades relacionadas con la calidad del recurso hídrico [10]. Esto se logra

si es posible realizar la determinación confiable de estos microorganismos en el agua.

Algunos países europeos como España han incluido en su normativa de calidad del agua que es utilizada para el consumo humano, la detección de *Legionella* spp. Sin embargo, para Colombia, la resolución 2115 de 2007, que establece las características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia de la calidad del agua potable, no contempla la detección de este indicador de calidad que puede llegar a causar infección pulmonar [11].

La difícil detección de esta bacteria en muestras de agua potable cuando las poblaciones son bajas hace que el método de Filtración por Membrana resulte una alternativa viable para la determinación, dado que es una técnica que permite la concentración de la muestra sobre un filtro con un tamaño de poro muy pequeño (0,45 µm) [8].

Aunque la Norma ISO 11731-2:2004 es un documento publicado por un organismo de normalización reconocido internacionalmente, no contempla algunos parámetros que son importantes para llevar a cabo el ensayo, haciendo necesario la confirmación y verificación del método de Filtración por Membrana para la detección y cuantificación de *Legionella* spp. En consecuencia, el objetivo principal de este estudio es verificar el método de Filtración por Membrana para la detección y cuantificación de *Legionella* spp. siguiendo los lineamientos de la norma ISO 11731-2:2004 a través de los parámetros de límite de detección, precisión, exactitud e incertidumbre.

De acuerdo con datos registrados por el ONAC para el 2015 [12], Colombia no cuenta con laboratorios de ensayo acreditados en métodos de análisis referentes a la detección y cuantificación de *Legionella* spp en agua potable, por lo cual, el proceso de verificación y acreditación de este método se ha convertido en una prioridad para el laboratorio de microbiología del grupo GAIA, el cual viene trabajando desde el 2012 en la implementación de entrega resultados confiables que se constituyen en garantía para los clientes. De otro lado, con la acreditación de este método se pretende mejorar la cobertura del servicio en análisis de calidad microbiológica del agua potable a nivel nacional.

2. METODOLOGÍA

2.1 Materiales y equipos

Las muestras de agua potable fueron tomadas del grifo del Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental GAIA. Se utilizaron cepas de referencia como *Legionella pneumophila subsp. pneumophila* ATCC (American Type Culture Collection) 33152 como control positivo y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 como control negativo, las cuales fueron suministradas por Microbiologics. Como medio de cultivo se empleó el agar BCYE (charcoal-yeast extract agar) CM0655 marca Oxoid, junto con los reactivos “suplemento para el crecimiento de *Legionella*” SR0110A y “suplemento para *Legionella* sin L-cisteína” SR0175A. Los demás reactivos empleados para la solución buffer ácida (HCl y KCl) y la solución salina (NaCl, MgSO₄, CaCl₂, Na₂HPO₄, KH₂PO₄) suministrados por Merck, cumplían con el grado analítico de acuerdo a su certificado de análisis.

Para la medición de las muestras fueron empleadas probetas de vidrio tipo A, Germany y en el proceso de filtración se utilizaron portafiltros Sartorius, filtros de nitrocelulosa de 0,45 µm de poro y con un diámetro de 47 mm, una bomba de vacío y un colector de vacío de acero inoxidable (manifold). Los ensayos se llevaron a cabo bajo una cámara de flujo vertical Esco y para la incubación de las muestras se utilizó una incubadora Binder con convección natural.

La metodología utilizada se encuentra consignada en la norma ISO 11731-2:2004 [13]. La Fig.1. muestra el procedimiento general para la verificación del método de Filtración por Membrana.

2.2. Análisis del agua potable

Previo al ensayo de verificación, se colectaron muestras de agua potable procedente del grifo del laboratorio y se realizó el análisis para la detección de *Legionella* spp.

2.3. Verificación del método

Se evaluaron los parámetros de límite de detección, precisión, exactitud e incertidumbre.

2.3.1. Límite de detección

Se utilizó una cepa certificada de *Legionella pneumophila subsp. pneumophila* ATCC 33152

como control positivo, la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 como control negativo y agua potable como control de la matriz. Se realizaron diluciones seriadas por duplicado a partir de un McFarland de concentración 1.

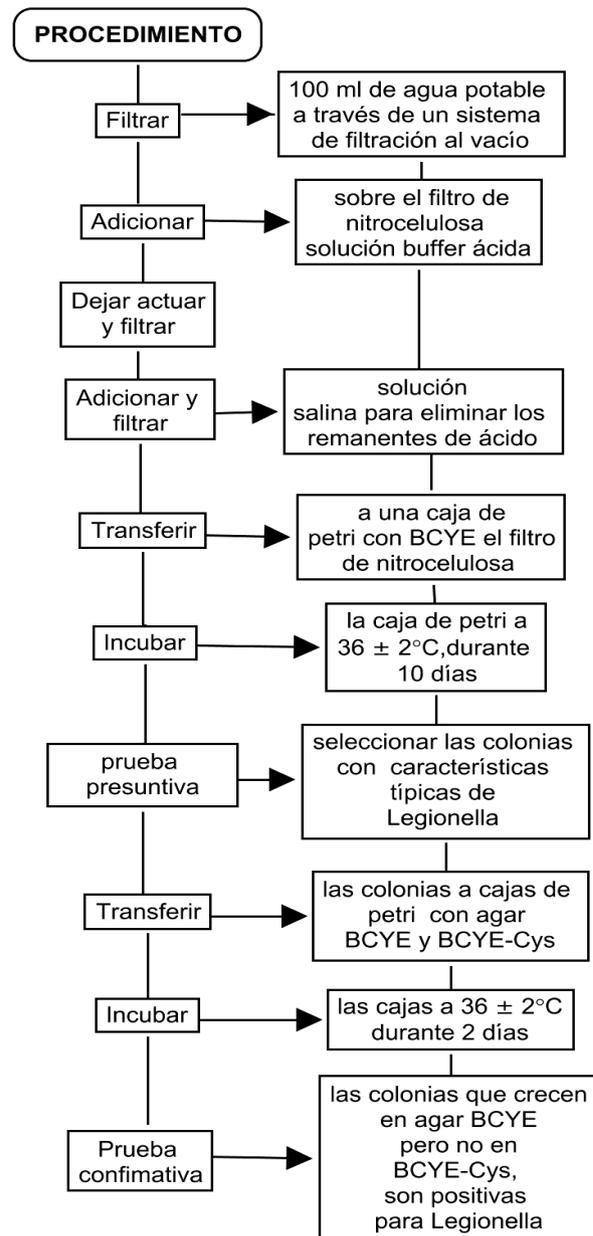


Fig.1. Procedimiento para la detección y cuantificación de *Legionella* spp. de acuerdo con la norma ISO 11731-2:2004.

Para determinar el límite de detección se utilizó la fórmula 1 [14]:

$$P(+) = 1 - e^{-m} \quad (1)$$

Donde,
 e: Es la base de logaritmo natural
 m: en el número promedio de partículas por porción analítica.

2.3.2. Precisión

La precisión se determinó como repetibilidad y precisión intermedia.

Para estimar la repetibilidad se halló el porcentaje del coeficiente de variación (% C.V) a partir del procedimiento de 13 ensayos. Para ello se seleccionó la dilución de trabajo de acuerdo a los resultados del procedimiento 2.3.1, teniendo en cuenta aquellos recuentos que estuvieron entre 20 y 100 UFC/100 ml.

$$\%CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (2)$$

Donde s , es la desviación estándar del conjunto de datos y \bar{x} es el promedio.

Para determinar el porcentaje de repetibilidad se utilizó la fórmula 3.

$$\%R = 100 - C.V \quad (3)$$

Para determinar la precisión intermedia, un segundo analista llevó a cabo 13 repeticiones bajo las mismas condiciones ambientales de laboratorio.

Teniendo en cuenta los datos del analista principal (analista 1) y del secundario (analista 2), se halló el % del C.V global para determinar la precisión intermedia del método.

2.3.3. Exactitud

Este parámetro se determinó a partir de la comparación de dos matrices distintas, como agua potable y caldo peptonado al 0,1 %. Para cada matriz se evaluaron las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} , las cuales fueron inoculadas con *Legionella pneumophila subsp. pneumophila* partiendo de una solución McFarland de concentración 1. Cada dilución se procesó 15 veces, excepto la última, la cual se filtró por triplificado.

Los porcentajes de recuperación fueron estimados utilizando la ecuación 4.

$$\% R = (\bar{X} \text{ muestra inoculada}) / (\bar{X} \text{ cepa} + \bar{X} \text{ muestra}) \times 100 \quad (4)$$

Donde %R corresponde al porcentaje de recuperación y \bar{X} es la media.

2.3.4. Incertidumbre.

La incertidumbre del método se realizó de acuerdo con el modelo global detallado en la norma ISO 29201:2012 [15]. Se establecieron los factores de incertidumbre que aportan más al resultado final del método como se observa en la Fig.2.

La incertidumbre estándar relativa se estimó con la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{S_R}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

Donde S_R es la desviación estándar del conjunto de datos hallados por los analistas y n corresponde al número de datos procesados.

La estimación de la incertidumbre relativa combinada está dada por la ecuación 6.

$$\mu_{comb} = \sqrt{(\mu'_{A1})^2 + (\mu'_B)^2 + (\mu'_C)^2 + (\mu'_D)^2} \quad (6)$$

Donde μ_{A1} es la incertidumbre estándar relativa, μ_B es la incubación de la prueba presuntiva, μ_C es la incubación de la prueba confirmativa y μ_D es el volumen de la muestra.

La incertidumbre combinada operacional de los resultados experimentales está dada por la ecuación 7.

$$\mu_{c,rel} = \sqrt{(\mu_{comb})^2 + (\mu_{d,oper})^2} \quad (7)$$

Donde, μ_{comb} es la incertidumbre relativa combinada bajo condiciones de reproducibilidad intermedia.

μ_{doper} es la incertidumbre estándar relativa intrínseca del resultado experimental, la cual se estimó con la fórmula 8.

$$\mu_{d\text{oper}} = \sqrt{\frac{1}{n_c} + \frac{(n_K + 0,5)(n_Z - n_K + 0,5)n_Z^2}{(n_Z + 1)^2 (n_Z + 2)n_K^2}} \quad (8)$$

Donde n_c es el número total de colonias presuntivas contadas, n_Z es el número total de colonias aisladas para confirmación y n_K es el número de colonias confirmadas.

Para la estimación de la incertidumbre expandida se definió un nivel de confianza del 95%, mediante el uso del factor de cobertura $K=2$ como se observa en la ecuación 9.

$$\mu_E = (\sqrt{(\mu_{comb})^2 + (\mu_{dop})^2}) * (2) \quad (9)$$

Donde μ_{comb} corresponde al resultado de la incertidumbre relativa combinada (fórmula 6), y μ_d es la incertidumbre operacional estimada con la fórmula 8 (recuentos de la prueba presuntiva y confirmativa).

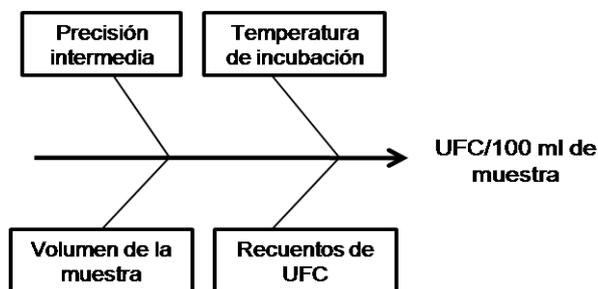


Fig. 2. Diagrama de las principales fuentes de incertidumbre consideradas en el análisis.

2.3.5. Tratamiento de los datos

Se estimaron medias, desviaciones estándar (DS) coeficientes de variación (C.V) y se realizó una ANOVA para el análisis de varianza de un factor entre los recuentos de UFC llevados a cabo por los analistas.

3. RESULTADOS

En el análisis inicial de agua potable no se detectó la presencia de *Legionella* spp. Por lo tanto, se utilizó una concentración conocida de la cepa de *Legionella pneumophila subsp. pneumophila* como inóculo de los ensayos posteriores.

Los resultados de las diluciones para determinar el límite de detección se muestran en la **tabla 1**.

Tabla 1. Estimación del límite de detección del método de Filtración por Membrana.

DILUCIÓN	Recuentos UFC/100 ml	<i>Legionella pneumophila</i> P(+) = 1 - e ^{-m}
1 X 10 ⁻⁶	208	1
1 X 10 ⁻⁷	31	1
1 X 10 ⁻⁸	5	0,993262053
1 X 10 ⁻⁹	1	0,632120559

Los resultados permitieron determinar las concentraciones de las diluciones, las cuales se clasificaron como alta (10⁻⁶), media (10⁻⁷), baja (10⁻⁸) y el límite de detección (10⁻⁹).

Este parámetro contempla la probabilidad de que la detección del analito sea del 95 %, p (+) = 0,95. Los resultados mostraron que el límite de detección se presentó en la dilución 10⁻⁸ para la determinación de *Legionella* spp. ya que en 10⁻⁹ la probabilidad de detección fue menor al 95 %.

Los resultados de repetibilidad realizados por dos analistas se muestran en las **tablas 2 y 3**.

Tabla 2. Resultados del análisis de repetibilidad del analista 1.

AGUA POTABLE	<i>Legionella pneumophila subsp pneumophila</i>
Media	8,04
DS	0,07
C.V	0,85

Tabla 3. Resultados del análisis de repetibilidad del analista 2.

AGUA POTABLE	<i>Legionella pneumophila subsp pneumophila</i>
Media	7,97
DS	0.16
C.V	2,05

Los datos de cada analista mostraron un C.V < 3,0 %. El Analista 1 obtuvo un 99.15 % de repetibilidad, mientras que el analista 2 obtuvo un 97,95 % de

repetibilidad para la determinación de *Legionella* sp. en una matriz de agua potable por el método de Filtración por Membrana.

En la **tabla 4** se muestran los resultados del análisis de precisión intermedia

Tabla 4. Resultados de la evaluación de precisión intermedia para la detección de *Legionella* spp.

AGUA POTABLE	<i>Legionella pneumophila</i> <i>subsp pneumophila</i>
Media	8
DS	0,11
C.V	1,45

La evaluación de este parámetro que se realizó por los analistas 1 y 2, obtuvo un 98.55 % de confianza para la detección de *Legionella* sp en una matriz de agua potable. Adicionalmente, se determinó un C.V < 2,0 % indicando concordancia entre los resultados de los recuentos de *Legionella* spp. cuando hay variación de operador o analista bajo las mismas condiciones del ensayo. Así mismo, permitió determinar que el método es reproducible.

De otro lado, cuando se realizó el análisis de varianza de un factor para los recuentos de UFC en 100 ml de agua potable para la detección de *Legionella* spp. en las 13 repeticiones realizadas por cada analista, se obtuvo un valor de F ($F < F$ crítico), indicando que se acepta la igualdad de medias y que por lo tanto no existen diferencias que sean significativas entre analistas. De igual manera, el resultado del coeficiente de variación global fue menor al promedio global del analista 1 ($C.V_{global} < \bar{X}_{global}$) como se observa en la **tabla 5**, indicando que el método es preciso y que no existe diferencia entre los analistas para la aplicación del método.

Tabla 5. Análisis del coeficiente de variación global.

\bar{X}_{global}	S_{global}	$C.V_{global}$
8,01	0,12917796	1,61348526

Los resultados de la evaluación de exactitud del método se muestran en la **tabla 6**, donde se

observan los porcentajes de recuperación para la concentración alta, media y baja.

Tabla 6. Porcentaje de recuperación de *Legionella* spp. en una matriz de agua potable.

DILUCIÓN	<i>Legionella pneumophila subsp pneumophila</i>			
	Media	DS	C.V (%)	R (%)
10^{-6}	8,40	0,04	0,53	98,87
10^{-7}	8,67	0,05	0,62	100,58
10^{-8}	8,75	0,15	1,72	99,46

Los datos obtenidos muestran un porcentaje de recuperación entre el 98 y el 100 %.

Los resultados obtenidos para la incertidumbre del Método de Filtración por membrana para la detección de *Legionella* spp. en agua potable se muestran en la **tabla 7**.

Tabla 7. Valores estimados de la incertidumbre para la determinación de *Legionella* spp. en agua potable.

Volumen de muestra	μ	$\mu_{C, rel}$	μ_E
100	0,021	0,299	0,844

* μ = incertidumbre estándar relativa

* $\mu_{C, rel}$ = incertidumbre combinada operacional

* μ_E = incertidumbre expandida

4. DISCUSIÓN

La implementación de métodos normalizados en los laboratorios de ensayo, constituyen una herramienta fundamental para desarrollar una eficiente aplicabilidad de métodos, que a su vez permiten obtener resultados confiables asegurando la calidad de los ensayos. Es importante desarrollar pruebas que satisfagan los requerimientos del cliente, por lo tanto, una verificación como la que se llevó a cabo en este estudio permite demostrar que se cumplen los requisitos fundamentales que se requieren para asegurar la confiabilidad en los resultados [16].

Los resultados del límite de detección demostraron que es posible detectar desde 1 UFC/100 ml con una probabilidad del 63 % hasta 200 UFC/100 ml de agua potable para la detección y cuantificación

de *Legionella* sp. No obstante, se debe tener en cuenta que en los recuentos cercanos a 200 UFC se pueden presentar falsos positivos debido a que cuando hay mayor número de colonias sobre el filtro se observan colonias aglomeradas y sobrepuestas, lo cual dificulta el conteo y consecuentemente el resultado. Se recomienda que para el método de Filtración por Membrana, el número de colonias con características típicas debe estar entre 20 y 100 UFC cuando se utilizan filtros de 47-50 mm de diámetro [16]. Sin embargo, se debe tener en cuenta que en el proceso de verificación se trabajó con muestra adicionada, lo cual admitía mayor presencia de UFC, comparada con una muestra de agua potable sin inóculo.

De otro lado, la evaluación de la precisión bajo condiciones de repetibilidad, demostró que no hubo diferencias significativas entre los analistas, los cuales obtuvieron un C.V < 2,0 %, indicando que el método es preciso, ya que el C.V propuesto como criterio de aceptación debía ser menor al 4,0 %. De este modo, se evidenció que existe concordancia entre los resultados de ambos analistas y que por lo tanto se acepta el criterio señalado ya que el método es ciertamente reproducible lo cual permite determinar que el cambio de analista no afecta el desarrollo microbiológico del método.

Así mismo, los porcentajes de recuperación para determinar la exactitud fueron superiores al 98 %, lo cual demuestra que el método de Filtración por Membrana para la determinación de *Legionella* spp. en agua potable es exacto.

Algunos métodos utilizados para concentrar muestras tienen tasas de recuperación muy variables. Sin embargo, el método de Filtración por Membrana es más eficiente cuando se trata de concentrar muestras con bajo contenido de bacterias como es el agua potable [17]. No obstante, la recuperación y la detección de *Legionella* spp. en una muestra de agua potable real puede ser baja, por lo tanto, se esperaría que los resultados presenten variaciones. Por ello, es importante establecer criterios de aceptación del método y así saber cuándo se admite, se rechaza o se repite un ensayo, ya que la finalidad de una verificación de un método normalizado es precisamente la de brindarle al cliente unos resultados confiables, que estén dentro de los parámetros que el laboratorio establece.

Por otra parte, otros estudios han reportado la pérdida de viabilidad de *Legionella* spp, cuando se utilizan medios selectivos y acidificación para eliminar microbiota acompañante [17,18]. Sin embargo, un estudio realizado por Boulanger (1995), donde se evaluaron técnicas de filtración y de centrifugación para hallar la precisión y la exactitud en la recuperación de *Legionella pneumophila* encontraron que el uso de medios selectivos no disminuyó la eficiencia de la recuperación [8]. En este estudio tampoco se observó insuficiencia en la selectividad y acidificación de cada ensayo y aunque no era uno de los objetivos de la verificación de este método, los resultados de los analistas demostraron la similitud en los recuentos realizados. Además, con el uso del control negativo se comprobó la reducción de bacterias por la acción del ácido.

Aunque Colombia no cuenta con parámetros normativos para detectar y cuantificar *Legionella* spp. en agua potable, el Real Decreto 865 de 1993 del 4 de julio, establece los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis, así mismo, propone realizar un seguimiento a las diferentes instalaciones donde se hayan encontrado concentraciones de *Legionella* mayores a 100 UFC/l [19]. De acuerdo a los resultados obtenidos se comprobó que el método de Filtración por Membrana según la norma ISO 11731-2:2004 es una herramienta importante que permite detectar y cuantificar la presencia de *Legionella* spp, en agua potable, incluso en concentraciones bajas.

5. CONCLUSIÓN

El método de Filtración por Membrana para la detección y cuantificación de *Legionella* spp. en agua potable permitió determinar desde 1 hasta 200 UFC. Se obtuvo un C.V < 4,0 % demostrando que el método es preciso, mientras que el porcentaje de recuperación fue > 98 %, evidenciando la exactitud para la aplicación del método en el laboratorio. Adicionalmente, la incertidumbre expandida obtuvo un valor de 0,844, indicando que los resultados se pueden expresar en recuentos de UFC/100 ml \pm 0,844

Los resultados confiables derivados de la verificación de este método garantizan que pueda ser aplicado a diferentes matrices teniendo en cuenta factores de dilución y procedencia de la muestra. Adicionalmente, es un método que brinda

información importante sobre la calidad del agua, facilitando la implementación de estrategias encaminadas al monitoreo y el control de microorganismos patógenos en el agua.

6. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental GAIA de la Universidad de Antioquia, a Colciencias por la financiación del proyecto 1115-561-36074 "Validación y Acreditación de la Metodología de Filtración por Membrana para la determinación de *Legionella* sp. y *Clostridium* sp. en una Matriz de Agua Potable Para el Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental-Gaia", a la profesora Esperanza Arenas por sus asesorías técnicas y a todas aquellas personas que apoyaron la realización de este trabajo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Morris, G.K., Patton, J., Feeley, S., Johnson, G., Gorman, W., Martin, P., Skaliy, G., Mallison, B., Politi, D. y Mackel, D. Isolation of the Legionnaires' disease bacterium from environmental samples. *Intern Medical.*, 90, 664-666, 1979.
- [2] Orrison, L.H., Cherry, W.B. y Milan, D. Isolation of *Legionella pneumophila* from cooling tower water by filtration. *Applied Environment. Microbiology.*, 41,1202-1205, 1981.
- [3] Tobin, J.O., Swann, R.A. y Bartlett, C.L. Isolation of *Legionella pneumophila* from water systems: methods and preliminary results. *Medical Journal.*, 282, 515-517, 1981.
- [4] Kuroki, H., Miyamoto, H., Fukuda, K., Iihara, H., Kawamura, Y., Ogawa, M., Wang, Y., Ezaki, T. y Taniguchi, H. *Legionella impletisoli* sp. nov. and *Legionella yabuuchiae* sp. nov., isolated from soils contaminated with industrial wastes in Japan. *System Applied Microbiology.*, 30, 273-279, 2007.
- [5] Tronel, H. y Hartemann, P. Overview of diagnostic and detection methods for legionellosis and *Legionella* spp. *Lett Applied Microbiology*, 48, 653-656, 2009.
- [6] Gea-Izquierdo, E. Prevención de la legionelosis en sistemas de refrigeración de agua. *Revista Dyna.*, 78, 9-17, 2011.
- [7] Fraser, D.W., Tsai, T.R. y Orenstein, W. Legionnaires' disease. Description of an epidemic of pneumonia. *Medical Journal.*, 297, 1189-1197, 1977.
- [8] Boulanger C.A. y Edelstein, P.H. Precision and Accuracy of Recovery of *Legionella pneumophila* from Seeded Tap Water by Filtration and Centrifugation. *Applied and Environmental Microbiology.*, 61, 1805-1809, 1995.
- [9] Lin, Y.E., Vidic, R.D., Stout, J.E. y Yu, V.L. *Legionella* in water. Distribution systems. Regular culturing of distribution systems. Samples is the key to successful disinfection. *Journal Awwa.*, 90, 112-122, 1998.
- [10] OMS. Organización Mundial de la Salud. Guía para la calidad del agua potable. Primer apéndice de la tercera edición. Volumen 1. 2006.
- [11] República de Colombia. Resolución 2115 de 22 de junio de 2007. Características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. Ministerio de la Protección Social, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Bogotá. 2007.
- [12] ONAC. Organización Nacional de Acreditación en Colombia. Disponible en: [http://www.onac.org.co/modulos/contenido/default.asp?idmodulo=211&pagina=1&idmoduloreferer=208&tiporeferer=areas&objid=C8&objnombre=Aguas%20Potables%20\(envasadas%20y%20de%20consumo\)](http://www.onac.org.co/modulos/contenido/default.asp?idmodulo=211&pagina=1&idmoduloreferer=208&tiporeferer=areas&objid=C8&objnombre=Aguas%20Potables%20(envasadas%20y%20de%20consumo)) [consultado el 30 de julio de 2015].
- [13] International Standards Organization, ISO. Water quality- Detection and enumeration of *Legionella*- Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts. Norma ISO 11731-2. Suiza. 2004.
- [14] IDEXX. Validación del método Colilert-18/Quanti-Tray para el recuento de *E. coli* y de bacterias coliformes en muestras de agua. One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092. US. 2008.
- [15] International Standards Organization, ISO. Water quality. The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods. Primera Edición. 2012.

[16] AEAS. Asociación Española de Abastecimiento de Agua y Saneamiento. Guía para el funcionamiento de laboratorios de ensayo. Parte II. Criterios para la validación de los métodos de ensayos físicoquímicos y microbiológicos. Disponible en: <http://www.aeas.es/documentos/guiafuncionamientoLaboratoriosEnsayoAguas2.pdf> [consultado el 3 de agosto de 2015].

[17] Wadowsky, R.M., Wolford, R., McNamara M.A. y Yee, R.B. Effect of Temperature, pH, and Oxygen Level on the Multiplication of Naturally Occurring *Legionella pneumophila* in Potable Water Applied and Environment Microbiology., 49, 1197-1205, 1985.

[18] Shelton, B.G., Morris G.K. y Gorman, G.W. Reducing risks associated with *Legionella* bacteria in building water systems, p. 279–281. en. Barbaree J.M., Breiman, R.F. y Dufour, A.P. *Legionella*: current status and emerging perspectives. American Society for Microbiology, 1993.

[19] Ministerio de Sanidad y Consumo: Real Decreto 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. BOE-A-2003-14408. España, 2003.

