

ORIGINALES BREVES**AGREGACIÓN DE CASOS DE NEUMONÍA POR *LEGIONELLA*
EN TRABAJADORES RELACIONADOS CON LA INDUSTRIA
DE LA CERÁMICA EN CASTELLÓN EN 2006**

Juan B Bellido-Blasco (1), Carmen Pelaz-Antolín (2), M^a Ángeles Delas-González (3), Javier Sarrión-Martínez(4), M^a Rosario Moreno-Muñoz (3), Concha Herrero-Carot (1)

- (1) Sección de Epidemiología. Centro de Salud Pública de Castellón.
(2) Servicio de Bacteriología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.
(3) Laboratorio de Microbiología. Hospital General de Castellón.
(4) Sección de Calidad Ambiental de Castellón. *Conselleria de Territori i Habitatge*.

RESUMEN

Fundamento. Los casos de la legionelosis en ocasiones se presentan en forma de agregaciones que son difíciles de interpretar. Analizamos aquí una de estas agrupaciones ocurrida durante un verano en Castellón.

Métodos. Se aplicaron métodos microbiológicos, clínicos y de epidemiología de campo.

Resultados. En pocos días hubo 5 casos de neumonía por *Legionella* en trabajadores relacionados con varias industrias de la cerámica, en un área donde existe una alta concentración de estas fábricas. Dos de ellos, constituyeron un pequeño brote. Mediante técnicas de biología molecular de las cepas se descartó el origen común de tres de los casos.

Conclusiones. Se discute si este episodio de un brote surgido en el contexto de un cluster más amplio de casos de origen multifocal fue un hecho casual o fue la expresión de un riesgo relacionado con esa actividad industrial que pudiera repetirse.

Palabras clave: *Legionella*, epidemiología, agregación, brote.

ABSTRACT**Aggregation of Cases of Legionella Pneumonia in Workers Related to the Ceramic Industry in Castellon, Spain, 2006**

Background. Cases of legionellosis sometimes arise in the form of aggregations which are difficult to interpret. This study provides an analysis of these groupings having arisen one summer in Castellon.

Methods. Microbiological, clinical and epidemiological field methods were employed.

Results. Within a few days, there were five (5) cases of legionella pneumonia in workers related to various ceramic industries within an area where a large number of these plants are located. Two constituted a minor outbreak. By means of molecular biology techniques performed on the strains, the common origins of three of the cases were ruled out.

Conclusions. It is debated whether this episode of an outbreak having arisen within the context of a broader-ranging cluster of cases of a multi-focal origin was a chance event or whether it was the manifestation of a risk related to this industrial activity which might repeat itself.

Key words: *Legionella*. Epidemiology. Cluster. Outbreak.

Correspondencia:
Dr. Juan B. Bellido-Blasco
Avda. del Mar 12
12003-Castellón
correo electrónico: bellido_jua@gva.es

INTRODUCCIÓN

Desde que se utiliza la detección del antígeno en orina para el diagnóstico de la neumonía por *Legionella pneumophila* serogrupo 1 (*Lp*SG1) el número de casos notificados al sistema de Vigilancia Epidemiológica (SVE) se ha visto incrementado de forma muy notable^{1,2}. Por otra parte, dado el potencial de diseminación que puede tener este microorganismo tanto en el interior de edificios como en ambientes exteriores, la detección precoz de agregaciones de casos es un elemento fundamental del SVE. En ocasiones, algunos de estos brotes están relacionados con circunstancias laborales diversas.

El área del Centro de Salud Pública de Castellón (CSP), con 409.000 habitantes, concentra el mayor número de empresas de la cerámica de toda España. Durante el quinquenio 2002-2006 en el CSP hubo un promedio de aproximadamente 21 casos anuales de neumonía por *Legionella* notificados (rango 13-34). Presentamos aquí un pequeño brote acaecido en el contexto de una agregación temporal de casos más amplia observada entre trabajadores relacionados con este tipo de industrias.

SUJETOS Y MÉTODOS

Dos casos de neumonía por *Legionella* fueron notificados el día 21 de agosto de 2006. Como definición de caso se aplicó la contemplada en los formularios de notificación de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica³. La encuesta epidemiológica realizada ese mismo día reveló que ambos habían trabajado en la misma empresa de cerámica (empresa A) durante el periodo de incubación. Se sospechó el diagnóstico de brote y se comenzó la investigación ambiental correspondiente, manteniendo la vigilancia epidemiológica en los días siguientes. La investigación

ambiental la llevó a cabo el Servicio de Calidad Ambiental en colaboración con Salud Pública. Se tomaron muestras de agua de puntos localizados en un radio de algo más 500 metros del lugar de trabajo de los dos casos, lo que incluía a dos empresas del sector colindantes a la anterior (empresas B y C). En total se muestrearon 20 puntos diferentes de las tres empresas (2 torres de refrigeración, 3 filtros *scrubbers*, 2 pozos, 11 aspersores, 1 ducha, 1 manguera). Se revisaron los registros de control analítico de las torres de refrigeración las empresas B y C; en la empresa A no había instalaciones de este tipo. Los muestreos se realizaron los días 23 y 25 de agosto, en la inspección inicial, 22 de septiembre para control y el 27 de octubre se incorporaron 3 puntos no incluidos en la inspección inicial (2 aspersores, 1 manguera). Las cepas de *Legionella* aisladas en los laboratorios clínicos y medioambientales locales fueron remitidas al laboratorio de referencia del Centro Nacional de Microbiología para su identificación y caracterización molecular. Las cepas de *L. pneumophila* SG1 fueron comparadas mediante anticuerpos monoclonales⁴ (July 1986) y tres métodos de genotipificación: AFLP⁵ (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), PFGE-*Sfi*I⁶ (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* usando *Sfi*I como enzima de restricción) y SBT⁷ (secuenciación de 6 genes).

RESULTADOS

Identificación de la agrupación de casos y del brote

Entre los días 21 de agosto y 8 de septiembre de 2006 se recibió la notificación de cinco casos consecutivos de neumonía por *Legionella*, diagnosticados mediante detección de antígeno en orina, que trabajaban en cuatro empresas de la cerámica. A los dos casos iniciales que trabajaban en la empresa A, se les unió otro que trabajaba en

otra empresa cerámica (D), muy alejada de la anterior (unos 8 Km), pero que durante el periodo de incubación circulaba frente a la empresa A varias veces a la semana en su vehículo. Los otros dos casos restantes trabajaban en empresas de la cerámica (E, F) de distintos municipios alejados entre sí y de los anteriores. La media de edad de estos pacientes fue de 37.6 años, la del resto de casos notificados en el año 2006 (22) fue de 64.2 años. En un principio se consideró que, por su relación espacio-temporal, el brote lo formaban los casos 1, 2 y 3. Las características de los casos se muestran en la tabla 1.

Se aisló LpSG1 subgrupo Pontiac en tres de los cinco enfermos, dos de ellos del brote. Sin embargo, estas cepas se mostraron claramente diferentes con los tres métodos moleculares utilizados (tabla 1 y figura 1).

Resultados ambientales

De las 20 muestras de agua analizadas solo se recuperó *Legionella* de una torre

de refrigeración de la empresa B, el 23 de agosto (1500 ufc/L); el resto fueron resultados negativos. Esta cepa fue identificada como *L. pneumophila* SG 1 Pontiac, pero fue diferente de la que infectó a los 3 pacientes anteriores: AFLP tipo CNM 075, PFGE tipo D (Figura 1) y SBT (2,3,9,10,2,1).

En las muestras tomadas en primer lugar en todas las empresas no se detectó cloro libre en ninguno de los puntos, excepto en un filtro de la empresa B (0.2 mg/L). Como resultado de las recomendaciones propuestas, en los controles posteriores ya se detectó cloro en concentraciones de 0,2 mg/L. Una muestra tomada el día 22 de septiembre en la torre que había sido positiva a *Legionella*, fue negativa (cloro 6 mg/L).

Las dos torres de refrigeración inspeccionadas permanecieron en parada por vacaciones de las empresas desde el 10 de agosto hasta el 4 de septiembre; a lo largo de año 2006, habían presentado dos resultados positivos a LpSG1 en los días 8 de junio y 11 de julio, ambos con 50 ufc/L. Desafortunadamente estos cultivos no

Tabla 1
Características de los pacientes notificados entre el 21 de agosto y el 8 de septiembre de 2006.
Todos los pacientes varones, con diagnóstico radiológico de neumonía, con antígeno de *Legionella* en orina positivo y el único factor de riesgo ser fumador

Caso	Edad	Municipio de residencia	Empresa # (municipio)	Trabajo (ubicación)	Fecha de inicio	Fecha de ingreso	Fecha de notificación	Fecha de alta	Cultivo	AFLP tipo	PFGE tipo	SBT
1*	44	Burriana	cerámica A (Sant Joan de Moró)	encofrador (exterior)	13-8	20-8	21-8	25-8	negativo			
2*	37	Castellón	cerámica A (Sant Joan de Moró)	soldador (exterior e interior)	15-8	16-8	21-8	25-8	LpSG1 Pontiac	050 CNM	A	3,4,1,1, 14,9
3*	41	Vall d'alba	cerámica D (Borriol)	cerámica (interior)	16-8	22-8	23-8	29-8	LpSG1 Pontiac	074 CNM	B	3,10,1,12,1 4,9
4	27	Vila-real	cerámica E (Vila-real)	cerámica (interior)	18-8	20-8	24-8	1-9	negativo			
5	39	Castellón	cerámica F (Castellón)	cerámica (interior)	2-9	6-9	8-9	19-9	LpSG1 Pontiac	076 CNM	D	6,10,19,3, 9,4

* Casos relacionados epidemiológicamente (brote); el caso 3 circulaba frecuentemente junto a la empresa A durante el periodo de incubación

Las empresas B y C, colindantes con A, no presentaron casos.

AFLP = *Amplified Fragment Length Polymorphism*

PFGE-*Sfi*I = *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (usando *Sfi*I como enzima de restricción)

SBT = SBT (secuenciación de 6 genes).

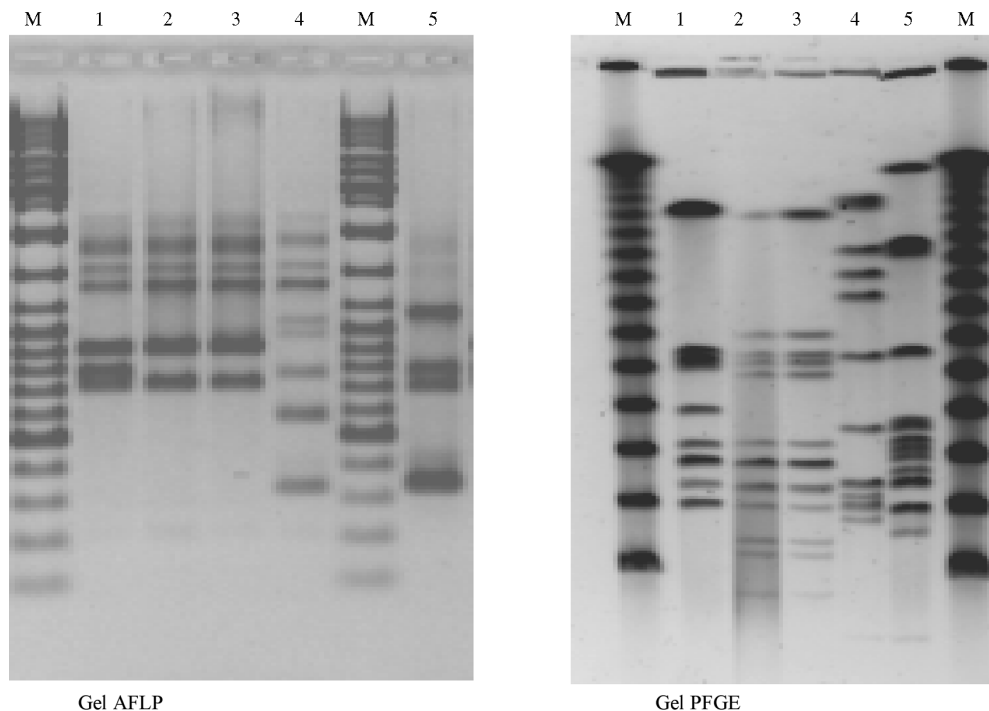
LpSG1 = *Legionella pneumophila* serogrupo 1

CNM = Centro Nacional de Microbiología

Fechas = día-mes

Figura 1

Geles de AFLP y PFGE con las cepas de *L. pneumophila* serogrupo 1 humanas y ambientales. El carril 1 cepa del caso 2, carriles 2 y 3 cepas del caso 3, carril 4 cepa del caso 5 y carril 5 la única cepa ambiental. M carriles conteniendo el control de peso molecular, Molecular weight marker (100–10000 pb), Ladder Mix, MBI Fermentas, para AFLP, y concatemeris del fago λ (48.5-1000 Kpb), Boeringher-Manheim, para PFGE



podieron ser analizados con los métodos de genotipificación.

Entre las medidas adoptadas, además de la inspección y desinfección de posibles focos ambientales inmediatos a la identificación de los casos, se advirtió de la situación a los servicios médicos de empresa. A lo largo del año 2006 no hubo otros casos en trabajadores relacionados con la cerámica.

DISCUSIÓN

En apenas quince días se notificaron de manera consecutiva 5 casos de neumonía por *Legionella* en trabajadores previamen-

te sanos que tenían relación con empresas de la cerámica. Los dos primeros –un encofrador y un soldador– en la misma fábrica y el mismo día, lo que desató la alerta ante un posible brote. Contrariamente a estos casos, los otros tres eran trabajadores específicos de la cerámica en el interior de fábricas, pero no tenían relación entre sí y sus empresas distaban más de 6 Km unas de otras. Uno de estos tres pacientes fue inicialmente asignado al brote por su relación como transeúnte frente a la misma empresa. Sin embargo, los análisis microbiológicos descartaron esa posibilidad. Tampoco se pudo identificar el foco del brote que, en todo caso, no se prolongó más allá del día 8 de septiembre, tras las medidas adoptadas.

En este episodio, dos casos realizaban tareas en el exterior y tres en el interior; ninguno de ellos pertenecía al grupo de trabajadores administrativos. En el interior de las naves de estas industrias se desempeñan actividades en las que es común el empleo de mangueras de agua a presión. En el exterior, no es rara la presencia de torres de refrigeración y otros dispositivos capaces de generar aerosoles en los polígonos industriales en las que se asientan las empresas. Actividades como la jardinería han sido señaladas como ocupaciones de riesgo por su relación con riego de aspersión⁸.

Los estudios sobre microepidemias, incluso con solo dos⁹ o tres¹⁰ casos, contribuyen al conocimiento de la epidemiología de *Legionella*. Exigen una estrecha colaboración entre neumólogos, microbiólogos, epidemiólogos y técnicos de sanidad ambiental. En este estudio se logró aislar *Legionella* en 3 de 5 muestras de pacientes y solo una de 20 muestras ambientales en el entorno de la empresa A. Los análisis microbiológicos fueron de enorme utilidad. Así, lo que inicialmente podría parecer una agregación de casos, quedó reducida a dos, como máximo; descartándose la eventualidad de que hubiera un foco ambiental único para todos los pacientes.

Hay que señalar algunas limitaciones del estudio. Es posible que el muestreo realizado fuese insuficiente o tardío en alguno de los puntos de la empresa A. Tal vez el foco estuviera en un lugar más alejado. Se han descrito alcances de varios Km. de los aerosoles contaminados¹¹. Otra posibilidad es que la selección de colonias del cultivo ambiental debería haber sido mayor. Se ha propuesto la toma de al menos 3 colonias de cada muestra¹², y en caso de brote deberían ser picadas 5 o 6 colonias, para evitar que la cepa eventualmente responsable del brote escape a los análisis específicos de biología molecular. Pereira et al¹³ analizan los resultados de un pequeño cluster de 8 casos en el que no identificaron un origen común, y

concluyen que focos múltiples, domésticos y ambientales, pudieron ocasionar la agregación que observaron. Nos quedaría la interpretación más radical de que se tratara solo de un brote aparente; es decir, que la coincidencia de casos en torno a una empresa no fuese más que un hecho casual, en el contexto de una agregación más amplia en trabajadores de la cerámica de varios municipios, hecho para el que, por ahora, también es difícil encontrar una explicación clara. Quizás la influencia del ritmo de la actividad industrial en agosto, parada y nueva puesta en marcha, pudo tener relación con la cronología de este episodio, significando un riesgo general en este tipo de polígonos industriales, en los que la presencia de torres de refrigeración es relativamente alta.

En coincidencia con otros autores¹³, podemos resaltar las dificultades que se plantean cuando la investigación microbiológica no confirma la hipótesis inicial. Asimismo, cuando los casos aparecen geográficamente dispersos se hace evidente la necesidad de realizar un muestreo ambiental amplio, que incluya el entorno laboral y residencial de los enfermos, junto con la aplicación de métodos de genotipificación de las cepas. Finalmente, ciñéndonos a este caso concreto, la posibilidad de que la actividad industrial de la cerámica durante el verano pueda presentar un riesgo para las personas que trabajan en ese entorno es un hecho que conviene vigilar en el futuro para extraer conclusiones más firmes sobre si existe un fondo de peligro real o bien esta agregación de casos simplemente fue un hecho circunstancial y difícilmente repetible.

AGRADECIMIENTOS

A Mireia Coscollá Devís, del Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva (Valencia) por su contribución continuada al estudio de cepas de *Legionella* en nuestra área.

BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez J, Codony F. Vigilancia epidemiológica de la legionelosis. *Med Clin (Barc)*. 2002; 119 (Supl): 46-9.
2. Bellido JB, Moreno MR, Canós M, Arnedo A, Safont L, Herrero C. Impacto de las peticiones de detección de antígeno en orina y su porcentaje de positividad en la incidencia de casos esporádicos de neumonía por *Legionella* en Castellón. *Enf Emerg*. 2005;7:83-101.
3. Centro Nacional de Epidemiología. Definiciones de caso y formularios de notificación a nivel central de las enfermedades de declaración obligatoria. 2ª ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 2001.
4. Joly JR, McKinney RM, Tobin JO'H, Bibb WF, Watkins ID and Ramsay D. Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*. 1986; 23: 768-71.
5. Fry NK, Bangsberg JM, Bergmans A, Bernander S, Etienne J, Franzin L, Gaia V, Hasenberger P, Baladron-Jimenez B, Jonas D, Lindsay D, Mentula S, Papoutsi A, Struelens M, Uldum SA, Visca P, Wannet W, and Harrison TG. Designation of the European Working Group on *Legionella* Infection (EWGLI) amplified fragment length polymorphism types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and results of intercentre proficiency testing Using a standard protocol. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002;21:722-8.
6. Lück PC, Helbig H, Günter U, Assmann M, Blau R, Koch H, et al. Epidemiologic investigation by macrorestriction analysis and by using monoclonal antibodies of nosocomial pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 10. *J Clin Microbiol*. 1994; 32:2692-7.
7. Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R, Harrison TG. A consensus sequence-based epidemiological typing scheme for clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2047-52.
8. Stojek NM, Dutkiewicz J. *Legionella* in sprinkling water as a potential occupational risk factor for gardeners. *Ann Agric Environ Med*. 2002;9:261-4.
9. Cayla JA, Maldonado R, González J, Pellicer T, Ferrer D, Pelaz C, et al. A small outbreak of Legionnaires' disease in a cargo ship under repair. *Eur Respir J*. 2001;17:1322-7.
10. Brown J, Hort K, Bouwman R, Capon A, Bansal, Goldthorpe I et al. Investigation and control of a cluster of cases of legionnaires disease in western Sidney. *Comm Dis Intell*. 2001;25:63-6.
11. Nhu Nguyen TM, Ilef D, Jarraud S, Rouil L, Campese C, Che D et al. A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to an industrial cooling towers. How far can contaminated aerosols spread? *J Infect Dis*. 2006;193:102-11.
12. Velonakis EN, Uldum SA, Giakoupi P, Loukousias S, Nielssen SS, Spala G et al. Typing of *Legionella* isolates during an epidemiological investigation can be helpful but also misleading: an example from Greece: <http://www.eurosurveillance.org/ew/2006/060824.asp>
13. Pereira AJ, Broadbent J, Mahgoub H, Morgan O, Bracebridge S, Reacher M et al. Legionnaires' disease: when an outbreak is not an outbreak. *Euro Surv*. [revista electrónica] 2006;11: E061130 [consultado 1-12-2006]: <http://www.eurosurveillance.org/ew/2006/061130.asp>