

MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL ESTUDIO DE *LEGIONELLA*

METHODS FOR LEGIONELLA DETECTION

Carmen Pelaz Antolín

Centro Nacional de Microbiología

RESUMEN

Los ensayos para la determinación de *Legionella* en muestras de agua son uno de los aspectos contemplados en la legislación española sobre prevención de legionelosis. La periodicidad de estos ensayos en función del tipo de instalación, los laboratorios que los realizan, y las acciones correctoras que derivan de ellos en función de los recuentos bacterianos son acciones incluidas en los planes de mantenimiento preventivo de las instalaciones consideradas de riesgo (Real Decreto 865/2003). La comparación de nuestra legislación con otras legislaciones o recomendaciones adoptadas en otros países (Reino Unido, Francia, Australia, América) permite conocer nuestro grado de exigencia en relación a algunos de los parámetros contemplados. El cultivo de la bacteria es el método de referencia para la detección de *Legionella* en muestras de agua y existen varios ensayos normalizados, como los estándares ISO 11731/98 y 2004 y NF T 90-431/2003 (AFNOR). Para ayudar a la interpretación de los resultados, los ensayos deben reflejar el estándar en el que se basan y el límite de detección del método, que no debe ser superior a 100 ufc/L. Además, los laboratorios que realizan estos ensayos deben estar acreditados por nuestra entidad de acreditación ENAC. En los últimos años se han desarrollado métodos rápidos de detección de la bacteria basados en la amplificación de ADN cromosómico en muestras de agua mediante reacciones de PCR. El desarrollo científico de estos métodos va por delante del desarrollo reglamentario, y los ensayos de PCR no deben desplazar a los ensayos de cultivo en cumplimiento de las normativas vigentes, sino que deben complementarlo.

PALABRAS CLAVE: *Legionella*, agua, ensayo normalizado, cultivo, límite de detección, laboratorio acreditado, toma de muestras, actividad bactericida.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, en España se ha hecho un gran esfuerzo en el abordaje de la prevención de legionelosis. Entre las medidas adoptadas se pueden citar:

Amplia implantación en los servicios de microbiología de los hospitales de métodos de diagnóstico basados en la detección de antígeno de *L. pneumophila* en muestras

SUMMARY

Assays for *Legionella* detection in water samples are one of the aspects included in the Spanish legislation on prevention of Legionnaires' disease. The frequency of these assays, laboratories that carry out them, and the required actions that derive from them, regarding colony counts, are included in the maintenance plans when *Legionella* prevention is carried out in water installations (Real Decree 865/2003). The comparison of our legislation with other legislations or recommendations adopted in other countries (United Kingdom, France, Australia, America) allows to know our degree of demand of some parameters. Bacteria culture is the gold standard method for *Legionella* detection in water samples, and there are several normalized assays, such as ISO 11731/98 and 2004 or NF T 90-431/2003 (AFNOR). To help the interpretation of the results, *Legionella* assays should reflect the standard in which they are based and the limit of detection of the method, that should not be over 100 ufc/L. Moreover, laboratories that carry out these assays should be accredited by our national accreditation body (ENAC). In the last years, fast methods have been developed for *Legionella* detection based on the amplification of chromosomal DNA in water samples by PCR reactions. PCR assays should not be used alone, but it should be a complement of culture assays, when normative actions are implemented in water installations.

KEY WORDS: *Legionella*, water, standardized assay, culture, detection limit, accredited laboratory, sampling, bactericidal activity.

de orina, lo que permite diagnosticar las neumonías debidas a *Legionella*.

La Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica incluye a la legionelosis entre las enfermedades de declaración obligatoria, por lo que todos los casos diagnosticados deben ser notificados.

Se dispone de legislación específica de prevención y control de legionelosis a nivel nacional desde 2001 (RD

909/2001 reemplazado por RD 865/2003), y de legislación complementaria en al menos 8 CCAA (Madrid, Cataluña, Comunidad Valenciana, Aragón, Galicia, Extremadura, Cantabria, Andalucía,...). En cumplimiento de esta normativa todas las torres de refrigeración deben ser registradas, además, las instalaciones de agua consideradas de riesgo deben tener implantado un plan de mantenimiento que incluye la aplicación de tratamientos de limpieza y desinfección, y muestreos periódicos para determinación de la bacteria.

A pesar de estas medidas, casos y brotes de legionelosis siguen ocurriendo en nuestro país, como el brote que está ocurriendo estos días en Pamplona, que afecta de momento a 140 personas. Por ello, sería bueno plantearse en este momento la revisión de algunos de los procedimientos que se están utilizando cuando se llevan a cabo los planes de mantenimiento, como por ejemplo la evaluación del riesgo, los métodos de desinfección, o los ensayos y/o muestreos realizados para las determinaciones analíticas de *Legionella*.

Métodos analíticos para el estudio de Legionella

Los métodos analíticos disponibles para el estudio de *Legionella* en muestras de origen ambiental que más nos interesan hoy día son el cultivo de la bacteria y la amplificación genómica mediante técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). La inmunofluorescencia directa (IFD) realizada sobre el concentrado de una muestra de agua puede ser un método presuntivo rápido para detectar la bacteria en una muestra de agua, y de hecho se contempla en algunos documentos técnicos como la guía americana ASTM (ASTM 2002), sin embargo no es un método muy recomendable ya que pueden aparecer reacciones cruzadas con otros microorganismos que pueden producir resultados falsamente positivos. También se ha utilizado en años anteriores un ensayo de detección de antígeno de *L. pneumophila* en agua, aunque su sensibilidad resultó más baja de lo esperado, y hoy no está disponible comercialmente.

El cultivo de la bacteria es el método de elección ya que permite la detección e identificación de cualquier especie o serogrupo del género y hacer estudios posteriores que ayudan a mejorar el conocimiento de la bacteria, como las investigaciones epidemiológicas para detectar las posibles fuentes de infección, o la realización de estudios de sensibilidad frente a productos desinfectantes.

En los últimos años también se han desarrollado métodos de detección de *Legionella* basados en la amplificación del ADN cromosómico en muestras de agua mediante PCR. Los ensayos se han dirigido fundamentalmente a las mismas dianas utilizadas con muestras respiratorias, el gen *mip* y los genes ribosómicos 5S ARNr y 16S ARNr. Básicamente, la investigación de *Legionella* por PCR se efectúa en 3 fases: 1) Concentración por filtración o centrifugación. 2) Lisis bacteriana, extracción y purificación de los ácidos nucleicos. 3) Amplificación de una o varias secuencias específicas mediante PCR. La visualización de los productos amplificados se realiza en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio o mediante hibridación o secuenciación.

Legislación para el control de Legionella en sistemas de agua

Nuestra legislación sobre prevención y control de *Legionella* en instalaciones de agua, el RD 865/2003, establece una serie de criterios en relación a los análisis para detectar la presencia de la bacteria. En el plan de mantenimiento de instalaciones interiores de agua caliente sanitaria (Anexo 3) se establece una determinación de *Legionella* anual, aunque no se contemplan niveles mínimos que requieran una acción correctora. En el caso de las torres de refrigeración y condensadores evaporativos (Anexo 4) se establece una periodicidad trimestral para los ensayos de *Legionella*, y unos niveles mínimos de entre 100 y 1.000 ufc/L (unidades formadoras de colonia por litro) de la bacteria para que se inicien acciones correctoras. También se detalla que los análisis se realizarán según la norma ISO 11731, parte 1, 1998 (ISO 11731/98), por laboratorios acreditados para la realización de estos ensayos o laboratorios con un sistema de calidad implantado.

Comparando los niveles mínimos de *Legionella* que desencadenan una acción correctora con los niveles contemplados en otras guías o códigos de buenas prácticas de otros países, el RD 865/2003 es de los más exigentes en el caso de torres de refrigeración, marcando estos niveles entre 100 y 1.000 ufc/L, al igual que el Reino Unido (HSE 2000). La guía europea de prevención de legionelosis asociada a viajes (EWGLI 2005) marca estos niveles entre 1.000 y 10.000 ufc/L, la guía francesa (Guide Ministère de la Santé, France 2005) entre 1.000 y 100.000 ufc/L, la australiana (CPNSW, 1991) marca estos límites por encima de 100 ufc/ml (100.000 ufc/L) para cualquier sistema de agua, y la ASHRAE (ASHRAE 2000) americana no establece límites.

En el caso de los sistemas de agua caliente sanitaria, el RD865/2003 es menos restrictivo que otros ya que no establece niveles mínimos de bacteria que desencadenan una acción, como algunas de las guías citadas, que marcan estos límites generalmente por encima de 1.000 ufc/L (Francia, Reino Unido, EWGLI).

Ensayos normalizados para la detección de Legionella en muestras de agua mediante cultivo

Los ensayos de cultivo de *Legionella* en muestras de agua constan básicamente de 5 fases (Pelaz y cols 2005):

1. Concentración de la muestra de agua original, para facilitar la recuperación de la bacteria. Este proceso se puede realizar mediante filtración por membrana o mediante centrifugación en el caso de aguas sucias o turbias.
2. Descontaminación del concentrado, ya que en ocasiones la bacteria va acompañada de otra microbiota que dificultará el reconocimiento de la misma en los medios de cultivo. Se utilizan dos métodos, tratamiento térmico (50°C durante 30 min) y tratamiento ácido (con un tampón de pH 2,2 y 5 min de contacto. Ambos tratamientos se realizan antes de la siembra en los medios de cultivo.
3. Siembra en los medios de cultivo, que llevan adicionados antibióticos y antifúngicos para ayudar a eliminar flora acompañante.

4. Incubación de los medios sembrados a 36°C durante 10 días, en condiciones de humedad.
5. Recuento, confirmación de las colonias y expresión de resultados.

El ensayo para el cultivo de *Legionella* en muestras de agua más ampliamente utilizado en los laboratorios es el Estándar Internacional ISO 11731 de 1998, pero algunos laboratorios pueden estar utilizando AFNOR NF T 90-431, ya que fue el primero en normalizarse por AFNOR (Asociación Francesa de Normalización) en 1993. Algunos otros ensayos normalizados y publicados por otras entidades de normalización de otros países se detallan a continuación:

- NF T 90-431 (Noviembre de 1993): Essais des eaux. Recherche et dénombrement des *Legionella* et *Legionella pneumophila*. Méthode générale par ensemencement direct et filtration sur membrane. AFNOR 1993.
- NF T 90-431 (Septiembre de 2003): Qualité de l'eau. Recherche et dénombrement de *Legionella* spp. et *Legionella pneumophila*. Méthode par ensemencement direct et après concentration par filtration sur membrane ou centrifugation. AFNOR 1993.
- NF T 90-431/A1 (Avril 2006): Amendement A1 á la norme homologuée NF T 90-431 de septembre 2003. AFNOR 2006.
- ISO 11731/98. Estándar Internacional ISO 11731. Water quality - detection and enumeration of *Legionella*. Part 1, 1998. AENOR.
- ISO 11731. Water quality - detection and enumeration of *Legionella*. Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts, 2001. AENOR.
- AS/NZS 3896: 1998. Waters - Examination for legionellae including *Legionella pneumophila*. Australian / New Zealand Standard, 1998.
- AS/NZS 5024 (Int): 2005. Potting mixes, compost and other matrices - Examination for legionellae. Australian / New Zealand Standard, 2005.

Los ensayos ISO 11731/98 y 2004 y NF T 90-431 son bastante completos, pero presentan algunas diferencias remarcables. ISO 11731 aporta detalles útiles en relación a la recogida, transporte y conservación de muestras de agua o concentrados, es bastante flexible con los volúmenes de agua de partida, concentración, tratamientos de descontaminación o siembra, contempla el procesamiento de aguas con poca microbiota, sin embargo es escueto en las explicaciones detalladas para calcular los recuentos de colonias y expresión de resultados. NF T 90-431 contempla la siembra de más placas de cultivo por muestra de agua analizada, es menos flexible en los volúmenes, contempla la posibilidad de combinar los dos tratamientos de descontaminación en el caso de muestras consideradas sucias, e incluye 4 anexos normativos o informativos: A: Placas a sembrar en función del tipo de agua, B: Tabla conteniendo cálculos y comentarios para

la expresión de resultados en función de los volúmenes analizados, las placas elegidas para el recuento y el nº de colonias confirmadas. C: Ejemplos de recuentos de *Legionella* y *L. pneumophila*, en muestras de agua caliente sanitaria y de torres de refrigeración. D: Variaciones estadísticas y expresión de resultados (Ley de poisson), incluyendo 5 tablas informativas.

Interpretación de resultados de cultivo de *Legionella* utilizando la norma ISO 11731/1998

En ocasiones se pueden detectar discrepancias cuando se analizan resultados obtenidos por cultivo en muestras de agua, incluso utilizando la misma normativa (ISO 11731). En este sentido, hay dos hechos que inciden directamente en los resultados de los análisis. De un lado la toma de muestra, que generalmente no es realizada por el laboratorio que realiza el ensayo. De otro lado el ensayo utilizado, ya que la norma ISO 11731 permite la utilización de distintos volúmenes durante el procesamiento de las muestras de agua, y el recuento final dependerá de ellos. Por ejemplo, utilizando la ISO 11731/98, el recuento de ufc/L se puede calcular utilizando la siguiente fórmula:

$$C = \frac{N \times V}{J} \times \frac{1}{S}$$

Donde :

- C es el número de ufc por litro de la muestra original
- N el número de colonias en la placa de GVPC con mayor número de colonias
- V el volumen (ml) del concentrado utilizado
- J el volumen (ml) inoculado en la placa
- S el volumen (litros) que fue usado del litro original

Teniendo en cuenta que el volumen de agua original (0,2-1L), el volumen de concentrado (5-25 ml), y el volumen inoculado en los medios de cultivo (0,1-0,5 ml) pueden variar, la variación del límite de detección teórico podría oscilar entre 10 y 1,2 x 10³ ufc/L. Además, el procedimiento de concentración (filtración o centrifugación) y los tratamientos de descontaminación (térmico y ácido) también afectan a *Legionella* que perderá viabilidad en el proceso. Los límites de detección reales se pueden obtener procesando muestras de agua simuladas conteniendo distintas concentraciones de la bacteria, y tendrán un valor superior al calculado de manera teórica con la aplicación de la fórmula.

Por ello, los ensayos de cultivo de *Legionella* presentados por los laboratorios deberían reflejar el estándar en el que se basan, el límite de detección real del método seguido, y además este límite debería ser igual o inferior a 100 ufc/L.

Laboratorios que realizan los análisis de *Legionella*

El RD 865/2003 contempla que los laboratorios que deben realizar los análisis de *Legionella* serán laboratorios acreditados para la realización de estos ensayos o la

laboratorios con un sistema de calidad implantado. Esta frase es redundante para los laboratorios acreditados por ENAC, ya que la acreditación de un ensayo implica tener un sistema de calidad implantado en el laboratorio y participar en ejercicios de intercomparación o controles de calidad externos, sin embargo, para el resto de los laboratorios es insuficiente, ya que la implantación de un sistema de calidad no garantiza la capacidad técnica de un laboratorio para la realización de los ensayos.

La página web de ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) refleja que los laboratorios de ensayo acreditados para ensayos de detección y recuento de *Legionella* en aguas se acreditan según la norma ISO 11731 o por un procedimiento interno. En el primer caso la norma se sigue exactamente, pero en el segundo caso se introducen modificaciones a la norma (ISO ó AFNOR). Se podrían admitir modificaciones a la norma (ISO 11731) siempre que éstas mejoren el método o ayuden a calcular los recuentos, por ejemplo introducir algún aspecto contemplado en la norma AFNOR NF T 90-431. Pero no se deberían admitir modificaciones que disminuyan las posibilidades de detección de la bacteria, como por ejemplo la eliminación de un tratamiento de descontaminación.

En este sentido, ENAC juega un papel muy importante si garantiza la competencia técnica de los laboratorios para la realización de los ensayos. Para ello, ENAC necesitaría normas en las que se basen los ensayos y criterios técnicos bien definidos.

Detección de Legionella mediante ensayos de amplificación genómica (PCR)

Sin entrar en detalles específicos de los ensayos de amplificación genómica para la detección de *Legionella* en muestras de agua, cabe mencionar la reciente publicación de un proyecto de norma experimental contemplando este tipo de ensayos: XP T90-471 (Abril 2006). Qualité de l'eau. Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). AFNOR 2006. Este documento no incluye detalles metodológicos específicos, sino que describe las exigencias metodológicas generales y las exigencias para la evaluación de los resultados y de los controles de calidad de los ensayos.

En la introducción del documento se especifica que los resultados de los análisis basados en este método proporcionarán información complementaria a los resultados obtenidos mediante cultivo, y se reflejan los 3 objetivos del documento:

- Responder a las expectativas analíticas, particularmente en términos de plazos, de los clientes y la administración cuando se enfrentan a la gestión de los riesgos asociados a *Legionella*.
- Permitir la utilización de nuevas tecnologías.
- En el marco de los controles reglamentarios para la búsqueda de *Legionella* y/o *Legionella pneumophila*, el presente método NO PUEDE SER UTILIZADO. La reglamentación estipula que la norma NF T 90-431

(cultivo) debe ser utilizada para los controles reglamentarios.

El desarrollo científico de la PCR va por delante del desarrollo reglamentario. Los ensayos de PCR no deben desplazar a los ensayos de cultivo sino que deben complementarlos.

Toma de muestras de agua para el estudio de Legionella

Uno de los aspectos que incide directamente en los ensayos para determinación de *Legionella* es la toma de muestra. El éxito de un ensayo detectando la bacteria depende de la calidad de la muestra.

Básica y resumidamente, y utilizando algunas guías como referencia (ASHRAE 2000; Environmental Agency, UK, 2005; Circulaire DGS, France, 1997), la toma de muestras de agua para determinación de *Legionella* debe diseñarse en función de la finalidad del ensayo, debe ser representativa de aquello que queremos analizar, todos los pasos deben ser optimizados (incluyendo tiempo y lugar) para conseguir el mayor recuento posible, y las condiciones de la muestra deben variar lo menos posible entre la toma y el comienzo del ensayo. Por ello, es necesario contar con guías consensuadas para la toma de muestras para determinación de *Legionella* en función de la finalidad de los análisis.

En una instalación que contiene *Legionella*, un ensayo positivo permite conocer la situación en el momento del ensayo, analizar el riesgo asociado y aplicar las medidas correctoras que se consideren necesarias, incluso evaluarlas. Por el contrario, un ensayo negativo no refleja la realidad de la situación y transmite una falsa y temporal sensación de seguridad.

En investigaciones de brotes epidémicos

En estas situaciones es necesario insistir en la necesidad de contar con el mayor número posible de cultivos de pacientes. Los ensayos de detección de antígeno en orina están desplazando al cultivo como método diagnóstico, lo que hace que en ocasiones, desde los Servicios de Salud Pública, haya que insistir para contar con los cultivos humanos. Los ensayos de epidemiología molecular con los cultivos humanos y ambientales son necesarios para buscar las fuentes ambientales de infección.

Así mismo es necesario contar con cultivos ambientales, en los que se deben analizar, incluso con métodos moleculares, el mayor número de colonias posible de cada muestra de agua analizada, ya que en una instalación pueden coexistir diferentes tipos de *Legionella*.

Ensayos de actividad bactericida de productos desinfectantes frente a Legionella pneumophila

Por último, mencionar los ensayos destinados a valorar la actividad bactericida de los productos desinfectantes frente a *Legionella pneumophila* (Draft prEN 13623, June 1999). La actividad bactericida frente a *Legionella pneumophila* se define como la capacidad del producto

para producir una reducción en el número de células viables de la cepa de referencia, en al menos 4 unidades logarítmicas (10^4), a 30°C y en las condiciones especificadas, en 60 minutos (los productos con efecto rápido) y en 24 h (los productos de efecto lento).

Estos ensayos generalmente demuestran la actividad bactericida "in vitro" de los productos desinfectantes, sin embargo los resultados obtenidos no parecen extrapolables, y algunos productos se muestran ineficaces cuando son aplicados en torres de refrigeración. En estas instalaciones hay otros factores que pueden afectar a la actividad de los biocidas, pH, cambios de temperatura, tiempos de contacto, presencia de materia orgánica, presencia de biofilms,... etc.

Sería bueno contar con análisis de datos tras la vigilancia continuada de torres de refrigeración, incluyendo datos fiables sobre la dosificación del/los biocidas y las operaciones de mantenimiento.

Conclusiones

1. Algunos de los procedimientos que se están utilizando cuando se llevan a cabo los planes de mantenimiento deben ser revisados, como por ejemplo la evaluación del riesgo, los métodos de desinfección, los ensayos y/o muestreos realizados para las determinaciones analíticas de *Legionella*.
2. Comparando los niveles mínimos de *Legionella* que desencadenan una acción correctora con los niveles contemplados en otras guías o códigos de buenas prácticas de otros países, el RD 865/2003 es de los más exigentes en el caso de torres de refrigeración, marcando estos niveles entre 100 y 1.000 ufc/L. En el caso de los sistemas de agua caliente sanitaria es menos restrictivo que otros ya que no establece niveles mínimos de bacteria.
3. Los ensayos de cultivo de *Legionella* presentados por los laboratorios deben reflejar el estándar en el que se basan (ISO 11731/1998, 2004 ó NF T 90-431/3003), el límite de detección real del método seguido, y además este límite debería ser igual o inferior a 100 ufc/L. Los laboratorios deben estar acreditados por ENAC para la realización de estos ensayos.
4. ENAC juega un papel muy importante si garantiza la competencia técnica de los laboratorios para la realización de los ensayos. Para ello, ENAC necesitaría normas en las que se basen los ensayos y criterios técnicos bien definidos.
5. Los ensayos de PCR deben ser utilizados como complemento de los ensayos de cultivo. Aunque existe una norma AFNOR estos ensayos no deberían utilizarse en solitario en la búsqueda de *Legionella* en muestras de agua.
6. Es necesario contar con guías consensuadas para la toma de muestras para determinación de *Legio-*

nella, estableciendo criterios bien definidos en función de la finalidad de los análisis.

7. En investigaciones de brotes epidémicos, es necesario insistir en la necesidad de contar con el mayor número posible de cultivos de pacientes. Y analizar, incluso con métodos moleculares, el mayor número de colonias posible de cada muestra de agua analizada, ya que en una instalación pueden coexistir diferentes tipos de *Legionella*.
8. Sería bueno contar con análisis detallados de la vigilancia continuada de torres de refrigeración, incluyendo datos fiables sobre la dosificación del/los biocidas y las operaciones de mantenimiento. Biocidas que se muestran activos en ensayos "in vitro" no demuestran su eficacia cuando son aplicados en torres de refrigeración.

REFERENCIAS CITADAS

- ASTM, D 5952-02. Standard Guide for inspecting water system for Legionellae and investigating possible outbreaks of legionellosis (Legionnaires' Disease or Pontiac Fever). 2002.
- Draft prEN 13623: 1999 E. Chemical disinfectants and antiseptics – Bactericidal activity of products against Legionella pneumophila–Test method and requirements (phase 2 / step 1).
- Real Decreto 865/2003, de 18 de Julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. BOE nº 171, 18-7-2003.
- ISO 11731/98. Estándar Internacional ISO 11731. Water quality - detection and enumeration of *Legionella*. Part 1, 1998. Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts, 2004.
- CPNSW. Code of Practice for the control of legionnaires' disease. New South Wales. Sidney: NSW Health Department, ISBN: 0 7305 3453 7. 1991.
- HSE book. Legionnaires' Disease: The control of Legionella bacteria in water systems. Approved Code of Practice and Guidance (L8). 3ª Ed. ISBN: 0 7176 1772 6. 2000.
- European guidelines for control and prevention of travel associated Legionnaires' Disease. EWGLI and EWGLINET (<http://www.eugli.org>), 2005.
- ASRHAEGuideline 12-2000. Minimizing the risk of legionellosis associated with building water systems. Atlanta, GA: American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers, 1-17, 2000.
- The determination de *Legionella* bacteria in waters and other environmental samples (2005). Part 1: Rationale of surveying and sampling. Standing Committee of Analysts, Environmental Agency, UK, (<http://www.environment-agency.gov.uk/nls>). 2005.
- Guide d'investigation d'un ou plusieurs cas de légionellose. Bulletin épidémiologique Hebdomadaire (BHE), Circulaire DGS nº 97/311, Francia, 1997.
- Guide Ministère de la Santé. Le risque lié aux légionelles. Guide d'investigation et d'aide à la gestion. Ministère de la Santé et des Solidarités, Direction Générale de la Santé, France, 2005.
- C Pelaz, V Ausina, V Catalán y E Cercenado. Diagnóstico microbiológico y control de la legionelosis. Procedimientos en Microbiología Clínica nº 20, ed: E Cercenado y R Cantón, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (<http://www.seimc.org>), ISBN: 84-609-9044-3, 2005.