

# Utilización de métodos para la determinación de *Legionella*: de la validación a la ley

**Carlos Ferrer Torregrosa** gerente de Bioquímica Analítica  
**Mireia Lázaro Pastor** directora comercial de Bioquímica Analítica  
**Guillermo García Miralles** técnico comercial de Bioquímica Analítica  
**Guillermo Rodríguez Albalat** director de I+D de Bioquímica Analítica

Diferentes organizaciones expertas en todo el mundo han elaborado guías para la validación de métodos de ensayo por comparación con un método de referencia, que en microbiología generalmente es el cultivo. De la validación al uso efectivo de un test media el abismo de su incorporación en la ley. Aunque esa distancia pueda parecer infinita, los caminos existen. Y España ya ha recorrido alguno de ellos. Si un día, el uso de los métodos validados distintos del cultivo goza de un reconocimiento en el marco legislativo para *Legionella*, España habrá alcanzado de nuevo la modernidad.



## Validación y certificación de métodos

Un rasgo muy común de los métodos modernos de análisis de *Legionella* distintos del cultivo es que están desarrollados por tecno-científicos y, en general, son test o kits que añaden el valor de la reducción de costes, tiempos e incremento de productividad para el laboratorio usuario. El espíritu es ofrecer unos resultados precisos que permiten a los laboratorios tomar decisiones sobre salud y seguridad con más confianza y rapidez que con los métodos tradicionales.

Entre los principales órganos reguladores a escala mundial dedicados a la validación de métodos, y que proporcionan metodologías para ello, se encuentran la International Organization for Standardization (ISO) y la Association of Official Analytical Chemists (AOAC), pero también hay otras como la Association Française de Normalisation (AFNOR), el European Standardization Committee (CEN) y el Nordic System for Validation of Alternative Microbiological Methods (NordVal), que proponen esquemas para la validación de estos otros métodos.

Los prodigios técnicos deberían llegar al usuario ya validados. La publicación de la norma ISO 17025 y la interpretación que de la misma hacen los organismos de acreditación, como ENAC, reforzaron el papel de la validación. Surgieron un importante número de normas ISO (ISO 13843, ISO 16140 o ISO 17994). Desgraciadamente, todas pensadas en su momento para la aplicación a métodos basados en el crecimiento microbiano, para generar turbidez o contar colonias. Su aplicación en otros métodos no basados en el cultivo se lleva hasta donde se puede.

En el campo de la microbiología de alimentos, en la actualidad, el reglamento relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Reglamento CE nº 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005, DOCE L 338 22/12/05) recoge en su considerando 24 que "los explotadores de las empresas alimentarias pueden usar métodos analíticos diferentes a los métodos de referencia, en particular métodos más rápidos, siempre que estos métodos alternativos produzcan resultados equivalentes". Así pues, desde un punto de vista legal se reconoce el empleo de este tipo de métodos en el ámbito de la legislación actual, si bien posteriormente incluye en el artículo 5 punto 5 que "se autorizará el uso de métodos alternativos cuando los métodos estén validados con respecto al método de referencia establecido en el Anexo I y si se utiliza un método registrado, certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140 u otros protocolos similares internacionalmente aceptados".

Aunque la norma ISO 16140, tal y como está, tendría aplicabilidad en aguas para validar métodos, históricamente los comités de estandarización creados para alimentos y para aguas son distintos, una razón por la que el agua no es mencionada en el alcance de esa norma. Aun así, mientras los grupos de expertos debaten sobre el particular, algunos artículos científicos recogen validaciones de métodos en que se utiliza esta norma, como las demás, con el alcance que ha sido posible en cada caso. En alguna ocasión, el método validado ha sido luego recogido en norma de alguna organización técnica bien establecida como ISO (Colilert para coliformes y *E. coli*, de Idexx) o AOAC (Legipid para *Legionella sp.*, de Biótica), o bien se ha recogido la metodología general asumiendo que no hay correlación cuantitativa con el cultivo como la norma francesa para PCR.

Después de años de validación y estudios, de pronto estos otros métodos ya no sienten ningún complejo y son debatidos en despachos privados y oficiales, en foros nacionales e internacionales.

Lo cierto es que España ya lo ha hecho en una ocasión, porque Colilert, un test americano para la determinación de coliformes totales y *E. coli* en aguas, se incorporó en nuestro ordenamiento jurídico en marzo de 2009 me-

El sector del agua necesita métodos nuevos que cubran las expectativas de una eficiente prevención del riesgo biológico.



dianete una Orden Ministerial, no estando dicho método recogido en ese momento en norma por organismo regulador, aunque sí validado. No fue sino 3 años después, en agosto de 2012, que este método pasó a ser ISO, sentando un precedente en la historia de los test rápidos porque ISO nunca se refiere a kits comerciales, sino a metodologías. ISO retiró la norma ISO 9308-2:1990, que sigue el método de los tubos múltiples (número más probable) y lo ha sustituido por la norma ISO 9308-2:2012, que usa el método Colilert-18/Quanti-Tray.

Legipid (para la determinación de *Legionella sp* en aguas) es también un método validado por laboratorios ISO 17025, incluyendo un ejercicio colaborativo, como Colilert. Pero a diferencia de Colilert, Legipid ha alcanzado ya la certificación por organismo regulador, en este caso AOAC, antes de su posible incorporación en cualquier ordenamiento jurídico. Con su publicación por AOAC, el método Legipid obtiene un reconocimiento mundial como modo de detección fácil, rápida y precisa de *Legionella* en el agua.

### Experiencias en otros países

En Francia, se dieron cuenta primero que con el agua al cuello es importante nadar. Y la *Legionella* era una cuestión de sanidad ambiental que necesitaba una respuesta. Así que, asumiendo las limitaciones del cultivo de *Legionella*, sobre todo para una detección rápida, dispusieron una norma francesa dedicada a una técnica rápida, la PCR, tan difícil de correlacionar con el cultivo, que prescindieron del mismo como método de referencia para su validación. Solo por habilitar al usuario una técnica rápida, cuya mayor utilidad se expone cuando su resultado es negativo. Tiempo después muchos ponen empeño cartesiano en dotar al significado de su resultado un atributo que no tiene: distinguir entre células vivas y muertas. Porque el *target* de la PCR no es la célula, sino el ADN, esté o no dentro de la misma.

En congresos recientes (Berlín, 2013), tras profundas consideraciones sobre la vida y la muerte de una bacteria, sutilísimas distinciones entre lo vivo, lo viable, lo latente, lo cultivable o lo muerto, de momento solo han servido para que los microbiólogos asuman que la distinción vivo/muerto aquí es un ejercicio innecesario de soberbia. Entre la vida y la muerte, las bacterias transitan en estados intermedios. Conocer cómo estos estados se presentan y qué significan sobre las propiedades de la bacteria que se quieren medir, es muy conveniente para una correcta interpretación de resultados de una técnica *per se* y, sobre todo, al comparar técnicas entre sí cuando las propiedades que miden son distintas.

En Italia, el equivalente a ENAC en España, ACCREDIA, confirma que un método validado por un organismo de certificación competente, como AFNOR o AOAC, es reconocido por la legislación como método alternativo si está disponible un certificado de la validación que demuestre la equivalencia con el método de referencia.

En Irlanda, INAB, como ACCREDIA en Italia, dice que, como mínimo, insistiría en que el laboratorio demuestre que puede cumplir los parámetros esperados para el test. La certificación de AOAC sería un requisito, junto con información acerca del protocolo de validación seguido. No tiene conocimiento sobre la legislación.

En Noruega los métodos diferentes del cultivo ISO 11731 por la Norwegian Accreditation (NA) pueden ser presentados por el laboratorio que precise acreditarse para su utilización, si este presenta la validación del método. Ese método se considerará como método no estándar, y aparecerá en el alcance de la acreditación como método interno. De hecho, los laboratorios noruegos que están acreditados para realizar ensayos de *Legionella*, suelen estarlo para el cultivo, la PCR o ambos. No hay requerimientos oficiales sobre el uso de ninguno de esos métodos.

En Serbia huele a cerrado. No hay legislación sobre *Legionella*, y el único método aceptado es el de referencia, que no es otro que el cultivo.

En el escrito se tiene sumo cuidado en distinguir las entidades de acreditación (ENAC, ACCREDIA, INAB, NA, etc.) que acreditan la solvencia técnica de los laboratorios y de los organismos de certificación (AOAC, AFNOR, ISO, etc.) que certifican la validación de los métodos. Hay que sacudirse cualquier confusión de encima.

En este contexto, la European Co-operation for Accreditation editó una guía específica sobre la acreditación de laboratorios que realizan ensayos microbiológicos, de acuerdo con la ISO/IEC 17025. Esta Guía, referida como 'Document EA - 4/10. Accreditation in Microbiological Laboratories', especifica en el punto 4.4 (*validation of test methods*) que los laboratorios que utilicen kits comerciales deberán disponer de la validación proporcionada por el fabricante y realizada por un tercero independiente. Ese documento también puede bajarse de la red.

En otros continentes hay también experiencias interesantes, porque la legionelosis es de ámbito mundial. El Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) es una organización creada en 1965, fruto del esfuerzo conjunto de los sectores oficial y privado. Con la misión de impulsar el desarrollo sostenible del país y su inserción internacional, a través de la innovación y la transferencia de soluciones de valor en servicios analíticos, LATU utiliza también



Habrá un antes y un después de la modificación de la legislación sobre la prevención de legionelosis en España, si el abanico de nuevas posibilidades analíticas no se abre.



métodos rápidos con aprobaciones AOAC, AFNOR, etc., las cuales cuentan con una validación primaria. Por este motivo, las validaciones realizadas a los métodos aplicados por este laboratorio son de tipo secundaria, o sea la verificación de que el método se comporta de manera adecuada en sus condiciones.

Por cierto, que para evaluar ese comportamiento es muy importante que el laboratorio receptor del método incorpore la experiencia del fabricante o proveedor del método en el diseño de las pruebas. No solo es un ejercicio de sensatez, sino que ayudará a optimizar el resultado, sacando las mejores prestaciones del método. Uso de muestras mal dopadas, controles equivocados, temperaturas erróneas, etc. son solo algunos detalles que, tratados en origen, evitan sinsabores. El nuevo técnico-comercial también se imbuje del espíritu de progreso técnico, y emergerá como un sólido prescriptor técnico para acompañar al laboratorio en la incorporación eficaz de nuevos métodos.

Ahora mismo, lo importante es que los laboratorios, públicos o privados, ejerzan el derecho a la información que tienen sobre las técnicas que utilicen y que al final sepan lo que miden, porque al final, un método, sea el que sea, no es sino una forma de acercarse a una realidad biológica cambiante con el tiempo y las circunstancias: un microorganismo patógeno de importancia en salud pública. Aquí es muy conveniente señalar que en el

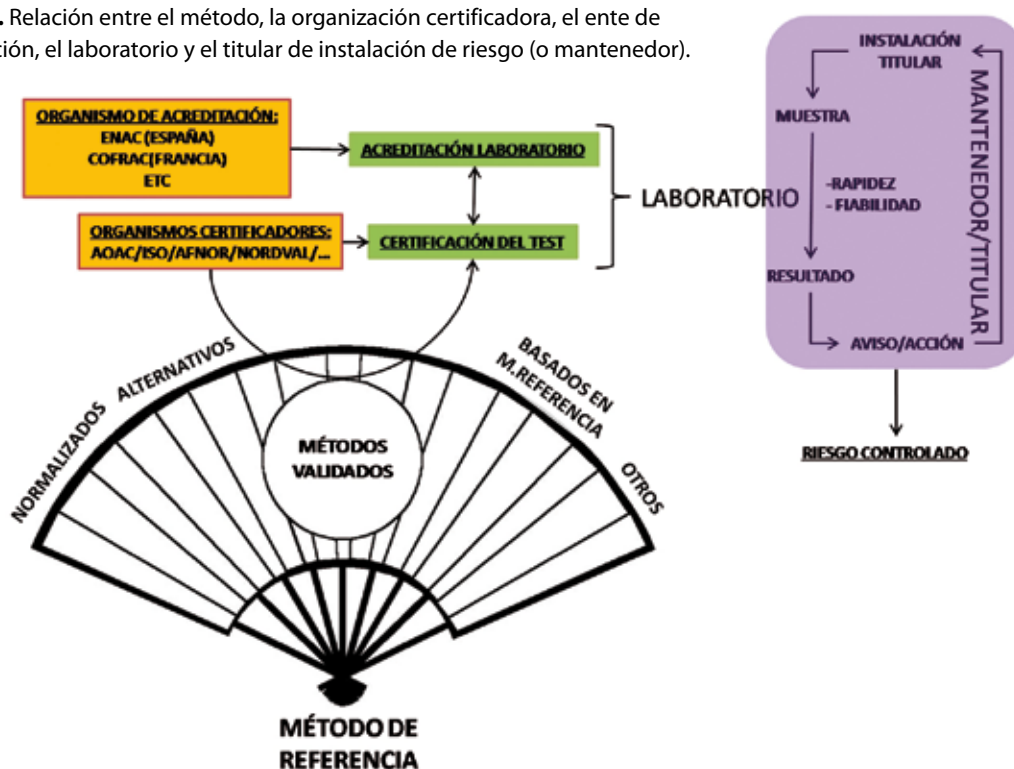
amanecer de los nuevos métodos, esa información debe tener una base estadística suficiente (la validación) como suficiente debe ser la base estadística de las pruebas de verificación. Andan sueltos depredadores de la estadística, que no deberían comprometer el resultado de las verificaciones por tomar decisiones sobre un número insuficiente de ensayos. Est  en juego aprovechar las ventajas que para su organización reporten estos otros métodos, en términos de operatividad, costes y calidad de servicio.

### El caso de España

En España, ENAC clasifica los métodos en cuatro grupos, en la versión más actualizada de abril de 2012 de su nota técnica 32, que cualquier ciudadano puede descargarse de la red. Establece unos criterios para acreditar los laboratorios que realizan ensayos microbiológicos, pero no establece una metodología de validación de métodos de ensayo, porque no es su competencia. Por eso especifica que "no debe entenderse esta nota como un documento en el que se establece una metodología para la validación de métodos de ensayo...".

La nota establece cuatro tipos de métodos con una relación inversa entre nivel de confianza decreciente del método y el nivel creciente de información que el auditor puede solicitar. Los métodos recogidos por organizaciones técnicas bien establecidas (la nota cita, entre otros, ISO, NF, NMKL, UNE, EN, AOAC y APHA) se consideran

**Figura 1.** Relación entre el método, la organización certificadora, el ente de acreditación, el laboratorio y el titular de instalación de riesgo (o mantenedor).



métodos normalizados. Son el Tipo I. El proceso de acreditación puede ser aquí más sencillo y menos costoso, porque el laboratorio dispondrá de una validación y el aval de una de esas organizaciones. La intensidad de los trabajos de implementación del método es muy baja.

Si el método está validado, pero no recogido por ninguna de esas organizaciones técnicas bien establecidas, se le asigna el Tipo II, métodos alternativos. Esa validación debe obtenerse por comparación con el método de referencia (aquí sería el cultivo según norma ISO 11731) según un estándar aceptado (ISO 16140, ISO/TR 13843, ISO 17994, etc.) y ser reconocido generalmente como equivalente a dicho método por un ente un tanto abstracto, la comunidad científica y tecnológica. En el Tipo III se hallan los métodos basados en el método de referencia. Como no pueden suponer una modificación técnica del método de referencia, y un cambio en un tiempo de incubación o una temperatura es relevante, no cabe esperar propuestas de cambios que comprometan la validez técnica de un método basado en el método de referencia. Posiblemente no merece la pena ni intentarlo, porque siendo el método de referencia el cultivo, probablemente seguirán compartiendo las mismas limitaciones vinculadas al fundamento del ensayo: el crecimiento del microorganismo diana, lento de solemnidad en el caso de *Legionella*. En el Tipo IV está todo lo demás, sin reconocimiento de organización técnica establecida ni de la comunidad científica y

tecnológica. Posiblemente, tampoco le merece la pena a un laboratorio asignar recursos humanos y materiales al desarrollo y validación de un método propio.

Por tanto, la Nota Técnica 32 es una criba dirigida a la selección preferente de métodos avalados y que, en consecuencia, acarrearán menos costes en el proceso de acreditación. Con la acreditación de la solvencia técnica del laboratorio para utilizar el método en sus condiciones (eso es una verificación), ENAC está habilitando la vía de entrada del progreso técnico en los laboratorios sobre todo de los métodos validados. Eso debería ser bueno. Generalmente, ENAC solicitará evidencias de la validación y confirmar que el laboratorio puede aplicar correctamente el método.

Dentro de las Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica en 2013, en sus Procedimientos en Microbiología Clínica (nº 48. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos), también se delimita el alcance de estos trabajos para incorporar un método, que son sustancialmente menores en el caso de métodos recogidos en norma (ISO, UNE, AOAC) que si no lo están (métodos desarrollados por el laboratorio).

Este lazo entre entidades de acreditación de laboratorios y organismos certificadores de métodos existe (**Figura 1**). Ajustarlo para que no se afloje requiere del reconocimiento de su uso en el ámbito de la ley.

**Tabla 1.** Limitaciones del método de cultivo de *Legionella* en su aplicación a muestras ambientales.

Causa	Efecto	Referencia
Selectividad diferencial de los medios de cultivo	No todas las especies de <i>Legionella</i> crecen en el medio BCYE	Lee, 1993
Liberación de células de <i>Legionella</i> por amebas	Sobreestimación del nivel de <i>Legionella</i> en la muestra	Vandenesch, 1990
Tratamientos de la muestra	Pérdida de cultivabilidad (ácido, calor, restricción de nutrientes)	Akira Ohno, 2003
Tratamiento del agua	Pérdida de cultivabilidad tras desinfección	Chang, C.W., 2007
Sobrecrecimiento de otros organismos acompañantes	Enmascaramiento o inhibición del crecimiento de <i>Legionella</i> en placa	Allegra, 2011
Presencia de células viables no cultivables	Subestimación del nivel de células infectivas	Alleron, 2013
Variabilidad	Sobredispersión creciente en niveles bajos	Bentham, 2000
Recuento de colonias similares de otras especies (por ejemplo <i>Chitinofagaceae</i> )	Sobreestimación del nivel de <i>Legionella</i>	Borges, 2012

### Progreso técnico en los nuevos métodos para determinación de *Legionella*

A quienes llevan el peso de innovar y no morir en el invento, habrá un antes y un después de la modificación de la legislación sobre la prevención de legionelosis en España, si el abanico de nuevas posibilidades analíticas no se abre, disolviéndose en la nada y obligando al sector a seguir refugiados en conceptos microbiológicos antiguos, útiles pero necesitados ya de otros prodigios técnicos en el campo de la prevención.

Quizá algunos piensan, con instinto confundido, que la armonía del método clásico de cultivo solo estará a salvo e incontaminada mientras otros métodos sean inaccesibles a la legislación. Otros, con el propósito de que otras técnicas sean recordadas hasta el fin de los tiempos, se erigirán en adalides del progreso técnico, siempre, claro está, que ese progreso se acomode a la técnica que propongan. En medio de este fuego eterno, en que se quema el esfuerzo de muchos científicos y técnicos, hay una tropa de laboratorios, tibios en general, y de ciudadanos ignorantes de que la prevención del riesgo de legionelosis tiene nuevas herramientas. Paradójicamente, estas actitudes definen el flanco más débil, por dónde los métodos nuevos tendrán cabida. Porque los métodos microbiológicos normalizados (recogidos por organizaciones técnicas bien establecidas) y alternativos (generalmente reconocidos por la comunidad científica y tecnológica), son una realidad, y pueden obtener respuestas más rápidas y exactas de la presencia o cantidad de un microorganismo determinado en la muestra sometida a análisis.

Especialmente en los últimos 30 años, la comunidad científica y tecnológica ha documentado ciertas limitaciones del cultivo, el método de referencia, en relación con el comportamiento de *Legionella* en muestras ambientales, que comprometen su utilidad en el aspecto preventivo y de mantenimiento en instalaciones donde este microorganismo prolifera, no en cuanto a su utilidad para aislar el microorganismo y obtener una colonia que, a su vez, proporciona valioso material biológico para estudios epidemiológicos. La **Tabla 1** recoge algunas de esas limitaciones.

La liberación de *Legionella* por amebas en el medio de cultivo, un evento que puede suceder especialmente con un método que requiera de un tiempo prolongado de ensayo, como ocurre en el cultivo, ha sido documentada (Vandenesch, 1990) alterando los resultados de hasta un 20% de muestras de agua potable analizadas en ese estudio. Tampoco todas las especies de *Legionella* crecen bien en el medio de cultivo BCYE (Lee, 1993). La restricción de nutrientes durante el transporte de muestras y la aplicación de pretratamientos en la muestra contemplados en norma, como el calor o el ácido, pueden producir una pérdida de cultivabilidad (Ohno, 2003), al igual que puede ocurrir tras una desinfección por estrés oxidativo, calor, radiación UV, estrés osmótico o aplicación de concentraciones subletales de biocidas (Chang, 2007). El sobrecrecimiento de microbiota acompañante (Allegra, 2011) y la presencia de organismos viables pero no cultivables (Alleron, 2013), también pueden conducir a una subestimación del nivel de *Legionella* en una instalación.

## La revisión del Real Decreto 865/2003 tiene ahora la oportunidad de permitir su adaptación al progreso técnico mediante la incorporación efectiva de nuevos métodos validados, y satisfacer la necesidad que el sector precisa para la determinación rápida y fiable de *Legionella* en aguas

La principal dificultad estriba en este caso en que el método de cultivo se basa en el crecimiento del microorganismo diana, y este crecimiento es muy lento en placa, del orden de varios días. Las acciones correctivas son así medidas reactivas a datos históricos.

Además, la forma libre e infectiva de *Legionella* en el agua, el reservorio desde el cual puede pasar a los aerosoles para su propagación, es precisamente una forma de resistencia, de metabolismo muy reducido y morfología singular caracterizada por una envoltura celular engrosada. Poco tiene que ver la forma salvaje de *Legionella* libre en el agua con la forma en fase de crecimiento exponencial de un cultivo. Y aún así, puede encontrarse un río infinito de artículos publicados sobre técnicas de detección construidas alrededor de una morfología y una fisiología alejadas de su condición natural. Meter un compuesto químico en las entrañas de esa célula salvaje para generar una medición consistente de su presencia, su estado o su concentración puede fracasar si la forma 'de prueba' (el microorganismo cultivado) se parece poco a la forma salvaje. Posiblemente sobre todo si el objetivo es alcanzar un genoma, porque los caminos a atravesar son, como se ha visto visto, distintos.

### Conclusiones

Sin menoscabar la importancia del cultivo, en la medida que el epidemiólogo necesita de la colonia para sus investigaciones, lo cierto es que bajo el punto de vista de la prevención, el sector requiere la posibilidad de utilizar métodos más rápidos y validados, y es necesario la apertura del marco legislativo español para habilitar el uso de tales métodos en nuestro país. Las acciones correctivas podrían ser aplicadas en menor tiempo y con mayor eficiencia y oportunidad. Estos métodos pueden dar soporte a programas de control y cuando se produce un episodio, pueden utilizarse también como herramientas de investigación. La incorporación de métodos que satisfagan la necesidad de una medida rápida y fiable es técnicamente posible, como resultado del esfuerzo científico y técnico de las últimas tres décadas, principalmente.

La revisión del Real Decreto 865/2003 tiene ahora la oportunidad de permitir su adaptación al progreso téc-

nico mediante la incorporación efectiva de tales métodos, y satisfacer la necesidad que el sector precisa para la determinación rápida y fiable de *Legionella* en aguas. Para facilitar la acreditación de un laboratorio frente a ENAC para el uso de un método, ya ENAC establece en su NT-32 que el nivel de trabajo requerido dependerá del nivel de confianza según al cual clasifica los métodos en cuatro tipos. En este contexto, es recomendable que los métodos estén validados por un organismo regulador competente, citados en este artículo, y aprovechar la experiencia del fabricante o proveedor del método para su eficaz implementación.

### Bibliografía

- [1] Ohno, A.; Kato, N.; Yamada, K.; Yamaguchi, K. (2003). Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* Serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl. Environ. Microbiol.*, núm. 69(5), págs. 2.540-2.547.
- [2] Allegra, S.; Girardot, F.; Grattard, F.; Berthelot, P.; Helbig, J.H.; Pozzetto, B.; Riffard, S. (2011). Evaluation of an immunomagnetic separation assay in combination with cultivation to improve *Legionella pneumophila* serogroup 1 recovery from environmental samples. *J. Appl. Microbiol.*
- [3] Alleron, L.; Khemiri, A.; Koubar, M.; Lacombe, C.; Coquet, L.; Cosette, P.; Jouenne, T.; Frere, J. (2013). VBNC *Legionella pneumophila* cells are still able to produce virulence proteins. *Water Res.*, núm. 47(17), págs. 6.606-6.617.
- [4] Bentham, R.H. (2000). Routine sampling and the control of *Legionella* spp. in cooling tower water systems. *Curr. Microbiol.*, núm. 41, págs. 271-275.
- [5] Borges, A.; Simões, M.; Martínez-Murcia, A.; Saavedra, M.J. (2012). Detection of *Legionella* spp. in natural and man-made water systems using standard guidelines. *Journal of Microbiology Research*, núm. 2(4), págs. 95-102.
- [6] Camaró, M.L.; Catalán, V.; Gimeno, C.; Martínez, R.; Olmos, P. (2013). Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- [7] Chang, C.W.; Hwang, Y.H.; Cheng, W.Y.; Chang, C.P. (2007). Effects of chlorination and heat disinfection on long-term starved *Legionella pneumophila* in warm water. *J. Appl. Microbiol.*, núm. 102, págs. 1.636-1.644.
- [8] EA - 4/10 G: 2002 Accreditation in Microbiological Laboratories, July 2002 rev02, págs. 1-26.
- [9] ENAC NT-32 Rev. 3, abril 2012. Análisis microbiológico: Documento aclaratorio.
- [10] Vandenesch, F.; Surgot, M.; Bornstein, N.; Paucod, J.C.; Marmet, D.; Isoard, P.; Fleurette, J. (1990). Relationship between free *Amoeba* and *Legionella*: Studies *in vitro* and *in vivo*. *Zentralblatt für Bakteriologie*, vol. 272-3, págs. 265-275.
- [11] International Organization for Standardization (1998). ISO 11731:1998 Water quality detection and enumeration of *Legionella*. Ginebra, Suiza.
- [12] International Organization for Standardization (2003). ISO 16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods. Ginebra, Suiza.
- [13] International Organization for Standardization (2000). ISO/TR 13843:2000(E) Water quality - Guidance on validation of microbiological methods. Ginebra, Suiza.
- [14] Lee, T.C.; Vickers, R.M.; Yu, V.L.; Wagener, M.M. (1993). Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: a comparative study. *J. Clin. Microbiol.*, núm. 31(10), pág. 2.764. 