

Detección de especies de *Legionella* en el agua utilizada en las unidades dentales. Maracaibo-Venezuela

Detection of the Legionella Species in Water used in Dental Units. Maracaibo, Venezuela

**Sandrea-Toledo, Lisette¹; Paz-Montes, América¹;
Piña-Reyes, Eyilde¹; Sandra-Ferreira, María C.²;
Navarro, Javiera² y Chacín, María Paula²**

¹ Cátedra Práctica Profesional de Bacteriología, Centro de Referencia Bacteriológica. Hospital Universitario de Maracaibo, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia.

² Odontólogos. Universidad del Zulia.
E-mail: lsandrea@cantv.net

Resumen

La presencia de cualquier microorganismo en las aguas utilizadas en las unidades dentales constituye un grave peligro tanto para el paciente como para el personal que labora en dichas unidades. La presente investigación planteó dos objetivos: 1) Implementar y comparar dos técnicas de Análisis Microbiológico del agua para el estudio de las especies de *Legionella*; y 2) Detectar la presencia de *Legionella* en el agua utilizada en las piezas de mano de las clínicas odontológicas utilizadas por los estudiantes de Odontología de la Universidad del Zulia. Se estandarizaron dos técnicas comparativas: CDC y la ISO-11731, mediante el uso de muestras preparadas con una cepa de *Legionella pneumophila* ATCC 33155 y se realizó un estudio bacteriológico de 40 muestras del agua de cuatro (4) clínicas odontológicas docentes ubicadas en la Facultad de Odontología de LUZ, utilizando las dos metodologías antes mencionadas. Los resultados mostraron que ambas técnicas resultaron sensibles para el aislamiento de *Legionella* en muestras de agua, siendo el tratamiento ácido más efectivo que el calentamiento. A pesar del uso de estas dos técnicas no se detectó la presencia de *Legionella* en ninguna de las muestras de agua analizadas. La presente investigación sirvió de base para la implementación de control de calidad relacionado con el aislamiento de *Legionella* en las aguas utilizadas a nivel hospitalario.

Palabras clave: *Legionella pneumophila*, agua, calidad microbiológica, unidades dentales.

Recibido: 13-03-08 / Aceptado: 20-10-08

Abstract

The presence of any microorganism in the water used in dental units constitutes a serious danger for both the patient and the personnel that work there. The present investigation had two aims: 1) To implement and compare two microbiological water analysis techniques for studying the *Legionella* species; and 2) To detect the presence of *Legionella* in the water used for hand-held equipment in dental clinics used by dentistry students at the University of Zulia. Two comparative techniques were standardized: CDC and ISO-11731, using samples prepared with the *Legionella pneumophila* strain ATCC 33155 and a bacteriological study of 40 water samples from four (4) dentistry teaching clinics located in the Faculty of Dentistry at LUZ, using the two aforementioned methodologies. Results showed that both techniques were sensitive to isolating *Legionella* in water samples, but the acid treatment was more effective than warming. Despite the use of both techniques, the presence of *Legionella* was not detected in any of the water samples analyzed. This study served as a basis for implementing quality control related to isolating *Legionella* in the waters used on a hospital level.

Key words: *Legionella pneumophila*, water, microbiological quality, dental units.

Introducción

Las especies que integran al género *Legionella* son responsables de diferentes cuadros que van desde una simple rinitis hasta neumonías graves y muerte. *Legionella pneumophila* con sus diferentes serogrupos, es el microorganismo mayormente implicado como el causante de la Legionelosis o enfermedad de los legionarios.

No obstante, existen otras presentaciones de estos microorganismos, como son la fiebre de Pontiac, la neumonía de Pittsburg, Sinusitis, infecciones de heridas, de válvulas cardíacas, pericarditis, peritonitis y Guillain-Barré (1); siendo las especies de *Legionella pneumophila* serogrupo 1, la más comúnmente implicada, aunque pueden también aislarse otras especies como *L. bosemanii*, *L. micdadei*, entre otras.

La legionelosis es una enfermedad de baja incidencia, pero en algunos países ha adquirido importancia epidemiológica debido a su frecuencia de aislamientos en brotes tanto de la comunidad como del medio ambiente intrahospitalario, donde se presente como

una enfermedad nosocomial grave principalmente en pacientes inmunocomprometidos.

Legionella se encuentra normalmente en ambientes acuáticos y desde ellos accede a instalaciones construidas por el hombre, como enfriadores, tuberías de enfriamiento, humidificadores, entre otros, a través del cual se distribuye a diferentes sistemas que utilizan agua para su funcionamiento, acumulándose en algunas partes de estos sistemas que permita su multiplicación y luego son diseminados en forma de aerosoles a través de diferentes mecanismos productores de estos aerosoles como son las duchas, llaves, así como también las piezas de mano utilizadas en los equipos odontológicos, que permite de esta manera su transmisión al hombre (2).

Debido al hábitat natural de *Legionella*, este microorganismo no solo tiene importancia desde el punto de vista clínico, sino también desde el punto de vista ambiental, por lo que se requiere que las aguas utilizadas en los diferentes ambientes donde *Legionella* puede habitar sean estudiadas, con el fin de detectar tempranamente la presencia del microorganismo, evitándose de esta manera po-

sibles brotes que puedan llevar a muerte de muchas personas.

Diversas investigaciones han demostrado que las aguas utilizadas en las unidades odontológicas pueden transmitir numerosos patógenos humanos, tales como las especies de *Legionella*, *Pseudomonas* y *Mycobacterium*, ya que los conductos de agua de estas unidades proporcionan el ambiente propicio para que prolifere, principalmente en aquellas unidades odontológicas que han tenido un uso prolongado (3).

Aunque no hay evidencias epidemiológicas claras que demuestren un problema de salud pública, la presencia de patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella* y diferentes especies de *Mycobacterium* no tuberculosos proporcionan razones suficientes para instaurar un control rutinario de dichas líneas de agua.

De hecho, en España la concentración máxima de gérmenes totales permitida para considerarse un agua de consumo humano está en 100 ufc/mL para aguas a la salida de las estaciones de tratamiento de agua potable mientras que en la red de distribución no deben producirse cambios anómalos de la concentración de gérmenes totales (4). Un estudio europeo reciente indica que las concentraciones medias de gérmenes totales en 40 instalaciones analizadas en todo el territorio español, variaron entre 102-103 ufc/ mL. y en algunas de las instalaciones se aislaron bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* (en un 24 por ciento de las instalaciones estudiadas), *Legionella pneumophila* serogrupo 1 (en un 4 por ciento de las instalaciones estudiadas) y algunas especies de *Mycobacterium* (en el 51 por ciento de las muestras analizadas) (5,6).

De igual modo, los trabajos realizados por diversos manifiestan como las muestras de aguas son fuente importante de infecciones por *Legionella sp*, tal es el caso de la in-

vestigación realizada en Pittsburgh, Pennsylvania, donde se realiza un estudio comparativo de tres tipos de técnicas: la recomendada por el CDC, la del Instituto de Higiene (Austria) y el Laboratorio donde los autores trabajaban. Los autores estudiaron diferentes variables entre los que se nombran: método de muestreo (hisopado y recolección directa de la muestra de agua), Método de concentración (ninguna, filtración y centrifugación), tratamiento ácido (tratamiento no ácido, tratamiento por tres minutos y por quince minutos y la utilización de varios medios de cultivos para el aislamiento de las especies de *Legionella*. Los autores encontraron que la mejor muestra es la obtenida de manera directa, siendo el tratamiento ácido con tres minutos, fue necesario para reducir la flora comensal y permitir el crecimiento de las cepas de *Legionella*, mientras que la recuperación de *Legionella* después del tratamiento ácido de la muestra de agua durante 15 minutos, fue menor (19).

Resultados similares a los anteriores fueron encontrados por otros autores en el Centro médico de Pittsburghs, donde fueron analizadas 20 muestras de aguas provenientes de los sistemas de aguas de un hospital, los autores encontraron elevados porcentajes de positividad (70%), siendo las especies de mayor aislamiento *Legionella pneumophila* y *Legionella anisa* (20).

Recientemente, ha emergido la preocupación por las unidades dentales como una fuente de infección (7,8). No obstante, la carencia de evidencia epidemiológica a nivel de Salud Pública, principalmente en nuestro país, quizás debido a la falta de standardización e implementación de técnicas requeridas para el aislamiento e identificación de especies de *Legionella*, como parte de la bioseguridad en las aguas utilizadas en los laboratorios dentales, y la inexistencia de estadísti-

cas, no ha permitido la discusión adecuada sobre el tema. Por lo tanto, no se puede aclarar si hay presencia o no de *Legionella*, por lo que es recomendable tomar unas acciones pertinentes, como estudios bacteriológicos, uso de conservadores, desinfectantes, y dispositivos de esterilización que permitan controlar el riesgo de infecciones cruzadas en los laboratorios odontológicos (9).

Por lo anteriormente expuesto, la presente investigación, plantea dos objetivos: 1) Implementar y comparar dos técnicas de Análisis Microbiológico del agua para el estudio de las especies de *Legionella*; y 2) detectar la presencia de *Legionella* en las aguas utilizadas en las piezas de mano de las clínicas frecuentadas por los estudiantes de Odontologías de la Universidad del Zulia.

Materiales y Métodos

Recolección de las muestras

De Mayo a Junio de 2007, fueron tomadas para su procesamiento bacteriológico, un total de 40 muestras de agua provenientes de las clínicas dentales utilizadas para la docencia de sus estudiantes de la Facultad de Odontología de La Universidad del Zulia. Las muestras fueron colocadas en envases de orina estériles y transportadas al Centro de Referencia Bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo-Venezuela, en cavas con hielo para la preservación del microorganismo a estudiar.

Control de Calidad de los Medios

Las placas de Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE), fueron preparadas en el momento del procesamiento de las muestras, siguiendo un estricto control de calidad, mediante los siguientes pasos (1,10):

1. Se ajustó el pH del medio, mediante el uso KOH 1N o HCL 1N, optimizando este en 6,90.

2. Se chequeó el crecimiento del microorganismo, utilizando para ello una cepa de *Legionella pneumophila* subespecie *pneumophila*, ATCC N° 33155 cepa donada por el Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (10).

Muestras para la estandarización de las metodologías (estudio piloto)

Se realizó una prueba piloto, recolectándose 30 muestras de agua al azar provenientes de diferentes unidades dentales de diversas clínicas dentales de la ciudad de Maracaibo. Dichas muestras fueron contaminadas con una cepa ATCC de *Legionella pneumophila* subespecie *pneumophila*, ATCC N° 33155, de Atlanta, a una concentración de 100 células/ml, concentración esta que fue comparada utilizando el nefelómetro de Macfarlán (18). Estas fueron posteriormente cultivadas, incubadas y examinadas diariamente, siguiéndose las estrictas normas de Bioseguridad, señaladas por el CDC. Para el procesamiento de las muestras de agua se utilizó dos métodos a modo de comparación: Metodología sugerida por el CDC (11) y la Metodología de la ISO11731 (12).

Metodología CDC

Se tomaron 50 mL de muestras de agua, recolectadas a partir de las piezas de mano utilizadas por los estudiantes de la Facultad de Odontología de LUZ, durante su asistencia a las clínicas dentales. Dichas muestras fueron concentradas por filtración de membrana, con el uso de un filtro millipore de polycarbonato. El filtro de membrana fue resuspendido en 10 mL de la muestra original y mezclado en un vortex durante 10 min. Posteriormente este fue calentado a 50°C por 30 min en un baño de María, con el fin de reducir la contaminación con otros microorganismos presente en el agua (13).

Una vez calentado, se tomaron 0,1 mL tanto de la muestra original, como la muestra concentrada, y cultivadas en placas de buffered charcoal yeast extract agar con cysteine (Oxoid), sin antibióticos (BCYG) y con antibióticos (PAV) e incubadas a 37°C en atmósfera húmeda con 2,5% de CO₂ hasta un máximo de 10 días, observando diariamente las placas a partir del 3er día, con el uso de un microscopio de iluminación para detectar la presencia de colonias sospechosas. Las colonias compatibles con las especies de *Legionella* (superficie moteada e iridiscente, con apariencia de vidrio partido), fueron subcultivadas en otras placas de BCYG. Las colonias sospechosas fueron posteriormente identificadas por Pruebas de Aglutinación en Latex (OXOID), que permite la identificación de *L. pneumophila* serogrupo 1 y serogrupos 2 a 14 y detección de otras especies de *Legionella*, tales como, *L. bozemanii*, *L. domoffii* y *L. micdadeii*. Los resultados son reportados en ufc/mL de agua.

Metodología ISO 11731

Las muestras de agua fueron concentradas por centrifugación a 300 RPM durante 30 minutos. Pasado el tiempo, se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 5 mL de Solución Salina estéril. La muestra concentrada, fue dividida en dos alícuotas, una de 0,9 mL el cual recibió un tratamiento ácido (KOH/HCL) y agitado durante 5 min. Una segunda alícuota de 1ml el cual fue sometido a un tratamiento térmico (50°C), durante 2 min.

Una vez que las muestras recibieron tratamiento, fueron sembradas por triplicado en placas de GVPC (BCYG con antibióticos), tomando 0,1 a 0,5 mL de la muestra. De igual forma, se sembraron tres placas del mismo medio a partir de la muestra de agua sin concentrar. Las placas fueron incubadas a 37°C

en atmósfera de CO₂, y estas fueron examinadas cada 2 a 4 días, para observar el crecimiento de colonia característica de *Legionella*. Posteriormente, las colonias sospechosas fueron subcultivadas a tres medios de cultivos: BCYG con cisterna; BCYG sin cisterna y Agar Sangre. *Legionella* creció en el primer medio y no así en los dos últimos. Posteriormente, de las colonias compatibles con *Legionella sp*, se practicó las pruebas de aglutinación respectivas, para su identificación definitiva. Los resultados son expresados en UFC/ml de agua.

Resultados

Los resultados obtenidos del procesamiento de las muestras de agua del estudio piloto, procesadas con las técnicas sugeridas por el CDC y la ISO 11731 son señaladas en la Tabla 1. Se puede observar, que ambas metodologías resultaron ser sensibles, ya que el 100% de las muestras analizadas permitieron el crecimiento de *Legionella*.

Se calcularon las medias para cada método en relación a los contajes, notándose que las medias observadas en ambas metodologías no presentaron diferencias significativas desde el punto de vista estadístico ($P < 0,05$) con una media de 128 y 122 respectivamente.

En relación a la metodología ISO 11731, se observa en la tabla 1 que el tratamiento ácido fue menos agresivo que el calentamiento, ya que el primero permitió mayor número de aislamientos (22 casos) que las muestras que fueron sometidas al calor (8 casos).

En relación a las muestras de agua obtenidas en las clínicas dentales, no se detectó la presencia de especies de especies de *Legionella* en ninguna de las 40 muestras procesadas.

Tabla 1. Metodologías: CDC y ISO 11731.
Monitoreo de especies de *Legionella* en muestras de agua.
Estudio Piloto

Metodología	Resultados n=30		
	Positivos	Negativos	Media (ufc/ml)
CDC	30	-	128
ISO 11731			
Tratamiento ácido	22	8	122
ISO 11731			
Tratamiento por calentamiento	8	22	

Discusión

La existencia de diversas metodologías utilizadas para el aislamiento de *Legionella* a partir de muestras de agua, ha permitido en muchos países, la estandarización de estas técnicas de manera rutinaria. No obstante en nuestro país, es escasa o nula la existencia de estas metodologías, por lo que es importante su implementación en nuestro medio para así lograr la obtención de estadísticas que permitan plantear con propiedad la presencia o no de dicho microorganismo.

Como muchos otros microorganismos, las especies de *Legionella* son relativamente resistentes a pH ácido. De hecho, en la presente investigación se observa que dicho tratamiento, enmarcado en la metodología señalada por la ISO 11731, resultó ser más efectiva para el aislamiento de *Legionella*, en comparación al tratamiento con calor, lo cual concuerda con otros autores (15, 16) quienes señalan además que dicho tratamiento permite inhibir de manera importante otros microorganismos competitivos que pueden interferir y de esa manera enmascarar el crecimiento de *Legionella*.

De igual modo, en la presente investigación, como se puede notar en la tabla 1, la filtración del agua (Metodología CDC), resultó altamente sensible en comparación con las

otras metodologías realizadas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por otros autores (15,16), quienes concluyen que la metodología de filtración permite la recuperación de otros microorganismos altamente patógenos en el agua.

A pesar de las metodologías utilizadas en la presente investigación, no se detectó la presencia de especies de *Legionella*. En atención a ello, es conocido que *Legionella* sp. es capaz de reproducirse intracelularmente en amibas de vida libre, así como también en los monocitos y los macrófagos humanos (16), por lo que ello podría representar una de las causas de la no detección del microorganismo.

Los resultados obtenidos en la presente investigación no concuerdan con los señalados por otros autores (19), donde aislaron cepas de *Legionella* en el 83% de las aguas estudiadas. Estas aguas procedían de tanques, grifos y regaderas y fueron analizadas siguiendo la metodología descrita por CDC. Es de hacer notar que la investigación antes mencionada fue realizada en Pensilvania, donde el clima es un factor importante para el crecimiento de las especies de *Legionella*.

No obstante, es importante destacar que, la presente investigación, además de servir como base para futuras investigacio-

nes, sirvió para la estandarización de las técnicas para la identificación de especies de *Legionella*, en el centro de Referencia Bacteriológico del Hospital Universitario de Maracaibo, lo que permitirá un seguimiento del control de las aguas utilizadas en las clínicas dentales de la Facultad de Odontología, y de otras clínicas odontológicas de la ciudad de Maracaibo, y así, asegurar la salud de los pacientes, con respecto a la posible contaminación con esta bacteria, que resulta de suma importancia en la salud preventiva.

Por lo tanto, debido a la no existencia de cultivos rutinarios de esta prueba en nuestro medio, los resultados abrirán una puerta a la disponibilidad de estos procedimientos para el control y prevención en diferentes muestras de aguas. Como es señalado por Barbeau (2000), es importante detectar tempranamente la presencia del microorganismo, evitándose de esta manera posibles brotes que puedan llevar a muerte de muchas personas y para ello el estudio preventivo, juegan un importante papel, ya que es interesante resaltar la existencia de evidencias que indican que el personal que trabaja en clínicas dentales está más expuesto a los patógenos del agua que el resto de la población. Prueba de ello es, por ejemplo, la prevalencia de anticuerpos de *L. pneumophila* es significativamente mayor entre el personal que trabaja en clínicas dentales que entre la población general (34 y 50 por ciento respectivamente) (3).

Es importante reconocer que, la ausencia de *Legionella* en estas aguas estudiadas, no representa un signo evidente de la no presencia de la Enfermedad de los Legionarios o la Fiebre de Pontiac en nuestro medio, ya que no existen estadísticas al respecto que permitan corroborar estos, por que se recomienda dar a conocer a los diferentes laboratorios dentales la disponibilidad de estas metodologías y de esta manera

permitir el seguimiento de las guías de prevención de infecciones en clínicas dentales editado anualmente por el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) cuyo objetivo es el controlar el riesgo de infecciones en las unidades dentales (14).

Conclusiones

Se implementaron y se compararon dos metodologías para el aislamiento de especies de *Legionella* a partir de muestras de agua. Se observó que ambas metodologías fueron 100% sensibles para este microorganismo.

En la presente investigación, a pesar de haberse aplicado dos metodologías distintas para el procesamiento de las muestras de agua, no se detectó la presencia de especies de *Legionella spp.* No obstante, como es señalado por la Sociedad española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, la búsqueda de *Legionella* en una muestra de agua puede tener diferentes finalidades: 1) Detectar las fuentes de infección implicadas en brotes/casos de legionelosis; 2) Determinar la eficacia de tratamientos aplicados en las instalaciones, o incluidas en los planes de mantenimiento, en cumplimiento de la legislación de prevención de legionelosis vigente; y 3) Conocer la situación de las instalaciones de riesgo en los hospitales en relación a *Legionella*, en cumplimiento de los programas de prevención de legionelosis, con independencia de su relación con casos.

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento de esta investigación a través del Proyecto CC-0177-05.

Referencias Bibliográficas

- (1) Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover FC, Tenover MC. Manual of Clinical Microbiology. 9na ed. American Society for Microbiology. Washington, DC. USA. 2007; vol. 1.
- (2) Bopp C., Summer J, Morris G, and Wells J. Isolation of *Legionella* spp. From environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium. J. Clinical Microbiol. 1981; 13:714-719.
- (3) Barbeau J. Waterborne biofilms and dentistry: The changing face in infection control. J. Can. Dent. Assoc. 2000; 60: 539-41.
- (4) Walker J, Bradshaw D, Finney M, Fulford M, Frandsen E, Ostergaard E, Teb Cate J, Roorer W, Schel A, Mavridou A, Kamma J, Mandilana G, Stösser L., Kneist S, Araujo R, Contreras N, Goroncy-Bermes P, O'Mullane D, Burke F, Forde A, O'Sullivan M, Marsh PD. Microbiological evaluation of dental unit water systems in general dental practice in europe. Eur. J. Oral. Sci. 2004; 112: 412-418.
- (5) Walker J, Bradshaw D, Fulford M, Marsh P. Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water systems. Appl. Environ. Microbiol. 2003; 69: 3327-3332.
- (6) Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano (BOE n.º45, de 21 de febrero de 2003). Disponible en: www.noticias.juridicas.com/base_datos/Admin/rd140-2003.html
- (7) Putnins E, Di Giovanni D, Bhullar A. Dental unit waterline contamination and its possible implications during periodontal surgery. J Periodontol; 2001; 72:393-400.
- (8) Pederson E, Stone M, Ragain J, Simecek J. Waterline biofilm and the dental treatment facility: a review. Gen Dent ; 2002; 50:190-195.
- (9) Ito I, Souza-Gugelmin M, Lima S. Assepsia e anti-sepsia em endodontia. Biossegurança: controle de infecção. In: Endodontia. Tratamento de canais radiculares. Leonardo MR, Leal JM. ed. 3rd ed. São Paulo: Panamericana. 1998; p. 261-297.
- (10) Ausina V, Catlán V, Cercenado E, Pelaz-Antolin C. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico y control de la legionelosis. Documento Científico. 2005; Disponible en: http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/prcto_down.htm
- (11) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Procedures for the recovery of *Legionella* from the environment. National Center for Infectious Diseases. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Respiratory Disease Laboratory Section. U.S. Department of Health and Human Services. 2005.
- (12) Manero A. Detección de *Legionella* spp.: método oficial. ISO 11731. Mina Pública d'Aigues de Terrassa S.A. Disponible en: www.aiguesdeterrassa.es
- (13) Borella P, Montagna M, Romano-Spica V, Stampi S, Stancanelli G, Triassi M, et al. *Legionella* infection risk from domestic hot water. Emerg Infect Dis [serial online] Mar. 2004. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol10no3/02-0707.htm>
- (14) Kohn W, Collins A, Cleveland J, Harte J, Eklund K, Malvitz D. Guidelines for infection Control in Dental Health-Care Setting CDC. 2003; 52 (RR17); 1-61.
- (15) Kusnetsov J, Jousimi-Somer H, Nevalainenm A, Martikainenm P. Isoaltion of *Legionella* from water samples using varices culture methods. J. Appl. Bacteriol. 1994; 76:155-162.
- (16) Rainthaler F, Sattler J, Schalfeler-Dullning R, Weinmayr and Matrh E. Comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella pneumophila* from tap water in hospitals. J. Clin. Microbiology. 1983; 31:1213-1216.
- (17) Breiman R, Butter J, Legionnaires'disease: clinical epidemiological, and public helth perspectives. Am. J. Infect. Control. 1998; 26:8-11.
- (18) Center and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-S17. Vol 27, Nro. 1. Performance Standards for Antimicrobial Suscepti-

- bility Testing; Seventeenth Informational Supplement. January 2007.
- (19) Alyssa C, Stout J, Yu, V, and Wagener M. Comparison of Culture Methods for monitoring *Legionella* species in Hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. *J. Clin. Microbiol.* 1995; p.2118-2123.
- (20) Goetz A, Stout J, Jacobs S, Fisher M, Ponzer R, Drenning S, Yu V. Nosocomial legionnaires disease discovered in community hospitals following cultures of the water system: Seek and ye shall find. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2007. 28:818-824.