

REVISIÓN DEL PARADIGMA ECOLÓGICO DE LA 'LEGIONELLA'. ESTRATEGIA ECOLÓGICA Y SU IMPLICACIÓN EN SALUD PÚBLICA

ECOLOGICAL PARADIGM OF LEGIONELLA: A REVISION. NEW STRATEGY AND ITS IMPLICATION IN PUBLIC HEALTH

José Bernardo Ferrer Simó

Servicio Salud Pública Área 5. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid.

RESUMEN

Algunos aspectos difícilmente explicados por el modelo ecológico descrito por Rowbothan en 1980, como son: la dosis infecciosa anormalmente baja, las largas distancias en las cuales la bacteria permanece viable en el seno del aerosol difundido, la dificultad de crecimiento en los medios de cultivo estándar, la poca eficacia de los desinfectantes antilegionela en el control de los brotes, la reinfección o sencillamente la ausencia de transmisión persona-persona, son analizados bajo el prisma de la microbiología ecológica. Centrados en la relación bacteria-protocoo, diversos estudios sugieren que la amplificación o crecimiento bacteriano podría tener lugar en dos fases o etapas, funcionalmente distintas, según la proporción o ratio bacteria-ameba (MOI-*multiplicity of infection*). En una primera fase de crecimiento rápido, en la que esta relación es sustancialmente baja, la entrada de una bacteria de legionela en la ameba originaría una única vacuola, que tras la lisis amebiana, liberaría al medio formas libres infectantes para otras amebas. La segunda etapa, de diseminación o colonización de otros nichos ecológicos, con relaciones MOI altas, se producen varias vesículas de crecimiento en el interior de la ameba que serían expulsadas por la misma sin necesidad de lisis. El enquistamiento de la ameba en esta fase, se produce tras la liberación masiva al medio de las vesículas que hubiera en el interior. Algunos autores sugieren que estas vesículas por sus características de resistencia y "empaquetamiento" de formas de vivas de legionela, constituyen el núcleo infectante en la transmisión de la legionelosis. La presencia de un biofilm específico podría ser determinante en este proceso.

Teniendo en cuenta este sistema de relación-interacción ameba-legionela, las medidas preventivas deberían ir encaminadas a mantener la relación MOI baja, siempre en conjunción con bajos niveles de biofilm. En este sentido la adición de sustancias desinfectantes antilegionela en continuo, al medio parece imprescindible. Alcanzada la fase de diseminación sólo cabe la limpieza como medida de acción. La investigación de los mecanismos específicos de invasión legionela-ameba serían fundamentales, con el fin de encontrar sustancias bloEn cuanto a la relación con el biofilm –auténtico punto crítico del

Some aspects difficultly explained by the ecological model described by Rowbothan in 1980, as the abnormally low infectious dose, the long distances in which bacteria remains viable in the aerosol, the difficulty of growth in the standard culture media, the low efficiency of the antilegionela disinfectants, in the control of the outbreaks, the reinfection or the absence of 'person to person' transmission, are analyzed from an ecological microbiology standpoint. Focused on the bacterium - protozoo relationship, several studies suggest that bacterial growth might take place in two functionally different phases or stages, according to the proportion or ratio bacterium - amoeba (MOI-multiplicity of infection). In the first phase of rapid growth, in which this relationship is substantially low, the entry of Legionella bacterium in the amoeba would originate a unique vacuole, which after amebian lyses, it would liberate free infectants forms for other amoebae. During the second stage, of dissemination or settling of other ecological niches, with high MOI ratios, several growth vesicles are produced inside the amoeba and are expelled without lyses. The deadlock of the amoeba in this phase, is produced after the massive liberation of the vesicles. Some authors suggest that these vesicles are the infectant nuclei of the legionellosis transmission because of his resistance and alive-legionela packing characteristics. The presence of a specific biofilm might be determinant in this process. Keeping in mind this amoeba - legionela relationship- interaction system, the preventive measures should go directed to supporting the MOI relation low, always in conjunction with low levels of biofilm. In this respect, the addition of in continue antilegionela disinfectants substances seems to be indispensable. Reached the phase of dissemination (only fits) the cleanliness is the unique measure of action. The research on specific mechanisms of legionela - amoeba invasion would be fundamental, in order to find block substances. Regarding the relation with the biofilm (authentic critical point of the system) its elimination or decrease to minimal levels by the utilization of specific materials, the design of devices or systems of easy cleanliness (curved corners, accessible spaces), suitable maintenance of the facilities (inlays, corroded surfaces, etc.) with frequent (phy

Correspondencia: Tel.: 914 90 41 10; Fax: 912043825 · bernardo.ferrer@salud.madrid.org

sistema— se hace necesaria la eliminación o su disminución a niveles mínimos mediante la utilización de materiales específicos, el diseño de aparatos o sistemas de fácil limpieza (esquinas curvas, espacios accesibles), mantenimiento adecuado de las instalaciones (incrustaciones, superficies corroídas, etc.) con limpiezas físicas frecuentes y la utilización de sustancias antifilmantes en continuo

PALABRAS CLAVE: *Legionella*; legionelosis; microbiología ecológica; factores de riesgo.

INTRODUCCIÓN

Se cumplen treinta años del descubrimiento de la bacteria *Legionella* y de la patología asociada, como es la enfermedad del legionario o la fiebre de Pontiac. Desde entonces se han publicado cerca de diez mil artículos que han ido conformando un modelo ecológico o paradigma aceptado por la comunidad científica, que explica gran parte de la ecología y de la biología de la bacteria, así como de su comportamiento clínico. Sin embargo, existen aspectos a primera vista confusos y paradójicos: la dosis infecciosa anormalmente baja, las largas distancias en las cuales la bacteria permanece viable en el seno del aerosol difundido, la dificultad de crecimiento en los medios de cultivo estándar, la poca eficacia de los desinfectantes antilegionela en el control de los brotes, la reinfección de sistemas vigilados y mantenidos o, sencillamente, la ausencia de transmisión persona-persona.

En el presente trabajo se pretende hacer una revisión sucinta del paradigma ecológico elaborado por Rowbothan en 1980, actualmente vigente, bajo la óptica de la microbiología ambiental²⁶. Para ello se han revisado algunos estudios recientes que intentan explicar las paradojas o contradicciones al paradigma y expondremos el nuevo modelo a la luz de tales estudios, para concluir en los aspectos prácticos en la lucha contra la legionelosis desde un punto de vista de sanidad ambiental.

MÉTODOS

Este trabajo se ha realizado mediante búsquedas bibliográficas en PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>), servicio de la Biblioteca Nacional de Medicina, de EE. UU., que incluye más de dieciséis millones de citas procedentes del MEDLINE y otras revistas científicas, así como enlaces a los textos completos de los artículos y otras fuentes relacionadas. Los descriptores utilizados han sido principalmente: *Legionella* y *Leg. pneumophila*, solos o combinados con *cooling towers*, *amoeba*, *aquatic environment*, *outbreaks*.

También se ha seguido las publicaciones de autores cuyas líneas de investigación se relacionan básicamente

(*sics*) cleanliness and the continuously utilization of substances against the film are necessary.

KEY WORDS: legionela; ecological microbiology; ecological paradigm.

te con *Legionella* como son: T. J. Rowbothan, A. L. Newsome, Sharon Berck, etc.; así como búsquedas en bibliotecas para las referencias de publicaciones en libros.

Se han revisado más de doscientos resúmenes, seleccionándose aquéllos que hicieran referencia a dosis infectante, brotes en los que hubiera estudio cuantitativo de las fuentes de infección identificadas (tanto poblacionales como nosocomiales), estudios descriptivos de amebas en torres de refrigeración, estudios cualitativos de la relación ameba-*Legionella* (estudios de prevalencia de *Legionella* en torres de refrigeración, correlacionados o no con otras bacterias y/o amebas), estudios de la relación biofilm-*Legionella*, estudios de eficacia controvertida de los principales desinfectantes, así como aquéllos que hicieran referencia a medios de cultivo o recuperación de cepas de *Legionella*, especialmente de las cepas ambientales y cocultivos con amebas, y a las técnicas de muestreo (sobre todo de aerosoles).

Se han desechado, pues, los estudios referentes a los métodos de identificación, estudios estrictamente epidemiológicos sin identificación de las fuentes de infección, estudios clínicos y estudios de bioquímica o de expresión genética.

En total se han revisado 57 artículos, de los cuales se han utilizado finalmente aquéllos que aparecen como referencias en el apartado de bibliografía.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Legionella y amebas

En 1980, Rowbothan¹ describió la habilidad de *Legionella pneumophila* de multiplicarse en el interior de ciertas amebas. En trabajos posteriores^{2,3} describe la secuencia de infección de la *Acanthamoeba polyfaga* por *L. pneumophila* serogrupo SG1, con resultados similares para *L. pneumophila* SG 6, *L. jordanis*, *L. bonzemani* y *L. gormanii*.

Básicamente, el proceso se divide en 12-13 etapas (figura 1). En la primera etapa las formas móviles de *Legio-*

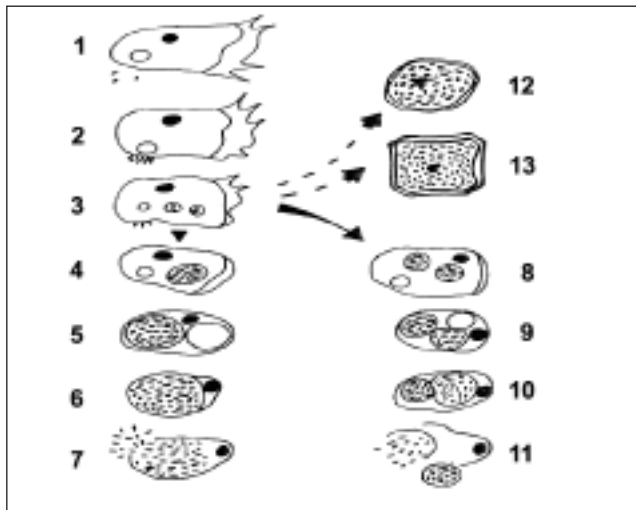


FIGURA 1. Secuencia gráfica de los distintos ciclos infectivos de legionela en amebas, según Rowbothan.

nella, libres en el medio, se aproximan a los trofozoitos de *Acanthamoeba*. En la segunda, se van reuniendo alrededor de una vacuola contráctil vacía del trofozoito. En la tercera etapa la *Legionella* es fagocitada (varias en cada vacuola). A partir de aquí se pueden seguir tres vías distintas. En una primera vía (etapas 4-7) la *Legionella* se multiplica en el interior de una sola vacuola hasta ocupar casi la totalidad del volumen citoplasmático para, finalmente, tras la lisis de la vacuola y de la misma ameba (etapa 7), liberar formas de legionela móviles al medio, cerrando de esta manera el ciclo. La segunda vía supone que raramente (etapas 8-11) se desarrollan dos o tres vacuolas en el interior citoplasmático de la ameba, librándose al medio tanto vacuolas intactas (con tamaño entre 2-8 µm) como bacterias. Tras la lisis de dichas vacuolas y liberación de legionela móvil al medio, se cerraría el ciclo.

Finalmente, la tercera vía establece que bajo ciertas condiciones la ameba puede enquistarse (etapas 12-13), conteniendo tanto formas móviles como inmóviles. Estos quistes son resistentes a la exposición de 3-5 ppm de cloro libre durante 24 horas y algunos sobreviven a 16 ppm de cloro durante 15 min. Kilvington y Price⁸ han encontrado que los quistes infectados de *Acanthamoeba polyphaga* protegen a las legionelas de hasta al menos 50 ppm de cloro libre. De esta manera, se piensa que la capacidad que tiene la legionela de vivir en el interior de estos quistes constituye un mecanismo por el cual evade la desinfección y se disemina para colonizar nuevos ambientes.

Se han identificado hasta trece tipos distintos de amebas y dos especies de protozoos ciliados, en los cuales *L. pneumophila* es capaz de multiplicarse. Entre las más usuales están: *Acanthamoeba castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *Hartmannella vermiformis*, *Tetrahymena pyriformis*; *Rosculus sp*, *Vahlkampfia sp*. Además se han identificado doce grupos filogenéti-

cos de bacterias pertenecientes a cinco especies designados como *Legionella-like amoebic pathogens* (LLAP). Estos LLAP no pueden ser cultivados *in vitro* sobre medios artificiales, necesitan obligatoriamente ser cocultivados con protozoos para su aislamiento y están relacionados con la enfermedad del legionario⁴.

Si bien resulta difíciles de cultivar o recuperar las cepas de legionela en el laboratorio, vive fácilmente en el medio, alcanzando únicamente valores poblacionales altos en diversos sistemas acuáticos antropogénicos (torres de refrigeración, sistemas de agua caliente sanitaria, *spass*, bañeras de hidromasaje, etc.).

El cultivo microbiológico estándar para la recuperación e identificación de las colonias de *Legionella* supone que tras un pretratamiento (choque ácido, golpe térmico) y una filtración posterior se pasa al cultivo en el medio α-BCYE. Medio con inhibidores como el cefamandol, para reducir el efecto de competencia, aun a riesgo de perder cepas de legionela sensibles al mismo. En estas condiciones crece lenta y difícilmente en 3-10 días.

Existe el hecho ampliamente constatado^{4,5,8} de la recuperación de colonias de *Legionella* viables en cocultivos con amebas, allá donde no se habían detectado con los medios tradicionales. Es la llamada *legionela viable pero no cultivable*.

Así mismo, diversos autores han constatado^{15,16} que la *Legionella* no se multiplica en el interior del biofilm, únicamente lo coloniza formando, de alguna manera, parte de él.

Se entiende como biofilm primario (figura 2) un agregado bacteriano embebido en una matriz polimérica de origen extracelular, adherido a una superficie viva o no. Biofilm secundario sería la colonización posterior del biofilm primario por otras bacterias y otras sustan-

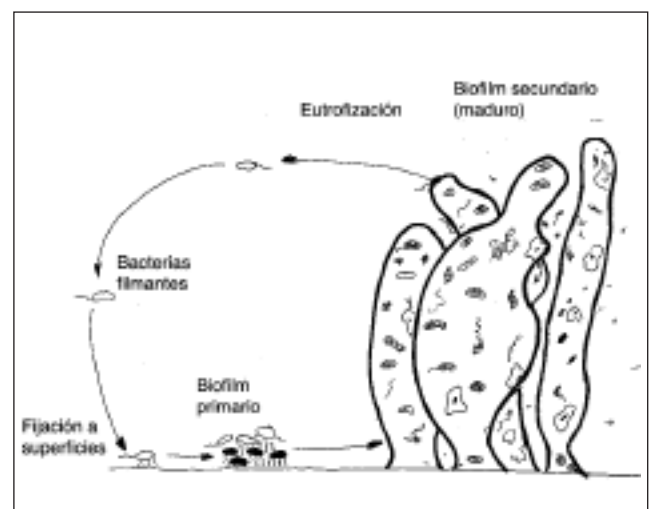


FIGURA 2. Proceso gráfico de formación del biofilm.

cias inorgánicas diversas. Obviamente, el biofilm secundario supone un grado de madurez. Una característica del biofilm secundario es su mayor resistencia a los agentes biocidas. En este sentido hay que destacar que la presencia de biocidas induce la formación de biofilm, ya que su presencia inhibe el crecimiento microbiano planctónico (en suspensión) en aras de un crecimiento biofilmante sobre superficie^{15,27}.

Muchos estudios han verificado la existencia de vacuolas conteniendo *Legionella* viable y activa en el interior de las amebas, perfilando las características de las mismas. Destacamos los siguientes hallazgos:

1. Existe un número variable de vacuolas libres en los medios de cultivo, procedentes de amebas infectadas por legionela. Posteriormente incidiremos en este aspecto.
2. El tamaño de las vacuolas oscila entre 2- 6 μm ^{1,2,6}.
3. Las vacuolas contienen bacterias de *Legionella* viables e infectantes^{6,24}.
4. Cada vacuola puede contener 2-1.000 bacterias^{1,2,6}.
5. En los cultivos microbiológicos cada vacuola se manifiesta como una UFC⁶.
6. Las vacuolas resisten la acción de biocidas, congelación descongelación y ultrasonidos^{4,6}.
7. Las amebas se enquistan como respuesta a factores estresantes como es la adición de biocidas, liberando vesículas al medio de forma masiva (Schusteren 6). En este sentido resulta ilustrativo el estudio del brote comunitario de legionela en Delaware -1994-¹³. En éste, Clive Brown, Pekka Nuorti et al. describen el incremento de bacterias de legionela tras el tratamiento de hipercloración, en las torres de refrigeración consideradas como las fuentes de infección

Tal como se ha indicado más arriba, el número de vacuolas expelidas por amebas es variable. Resultan muy interesantes los estudios de Sharon Berk et al.^{6,23} sobre la relación entre el ratio bacteria-ameba (MOI-*multiplicity of infection*) con la producción de vacuolas extraprotzoarias para diversas amebas y ciliados (*Acanthamoeba spp.*, - *Tetrahymena sp*) en adición de otras bacterias y a diversas temperaturas. En ellos, concluye, no parece existir un MOI mínimo para iniciar la infección amébrica ya que *L. pneumophila* sería capaz de penetrar en la ameba gracias a un mecanismo específico, distinto a la simple fagocitosis.

También se observa en el estudio que las tasas de crecimiento de *L. pneumophila* expresadas en CFU/ml a las 96 horas, son mucho mayores a MOI bajos (3 unidades log para diferencias de MOI 0,001:1 frente a 100:1), produciéndose la lisis total de las amebas a MOI bajos. La aparición de ciliados en cultivos estabilizados se refleja en un aumento de vesículas extraprotzoarias conteniendo legionela viva. En resumen, MOI bajos (0,001:1) presentan altas tasas de crecimiento bacteriano en el interior de la ameba, produciendo la libera-

ción de legionela al medio, a medida que este crecimiento aumenta la razón MOI (de 30 a 1000:1) aumenta la producción de vesículas extraamébicas llenas de legionela viva. Estos resultados se han observado tanto en cultivos de agua potable como en agua procedente de torres de refrigeración.

Patogénesis

La relación ameba-legionela es fundamental en la patogénesis de la bacteria. Cirillo et al.¹² han encontrado que *L. pneumophila* es más invasiva en macrófagos humanos tras cocultivos repetidos en amebas, hecho que ha sido corroborado por otros autores^{15,18,21}. Esto podría suponer que la dosis infectiva puede ser menor para bacterias que se hayan multiplicado en una misma, y específica, población amébrica. Así, se ha postulado que la invasión de legionela en amebas y su multiplicación puede ser considerada como una preadaptación a la invasión del sistema inmune humano, incrementando su virulencia.

Formas y dosis infectivas

Si bien en su trabajo inicial Rowbothan¹ postula que las partículas infectivas serían las gotas contaminadas por *Legionella*, en trabajos posteriores lanza la hipótesis de que la enfermedad se adquiere por la inhalación de "paquetes de bacterias" (vacuolas o amebas conteniendo bacterias de *Legionella*), más que por la inhalación de bacterias aisladas en las gotas del aerosol³. Posteriores trabajos abogan por esta tesis, especialmente por las de las vacuolas libres en el medio conteniendo legionela viable.

Sara O'Brien⁷ describe la paradoja que supone el paradigma de infección vía inhalación de aerosoles conteniendo bacterias libres de *Legionella*. En síntesis, establece que si diversos experimentos en animales demuestran que se requiere una gran dosis infectiva (14 millones de bacterias en humanos), avalada por el hecho de que no exista, o no se haya podido demostrar, la transmisión persona-persona; resulta paradójico que en los estudios ambientales se haya encontrado una baja concentración de legionela en los aerosoles procedentes de las fuentes de infección y que la evidencia epidemiológica indique que la infección pueda ocurrir en pacientes que se encuentran a cierta distancia de estas fuentes¹⁴. Todo ello aun teniendo en cuenta la subestimación debida a los medios de cultivo microbiológico²².

Sin embargo, concluye que la legionelosis clínica ocurre como resultado de una exposición a una dosis elevada de bacterias libres, bien por exposición continuada a un aerosol poco contaminado, o bien por una baja exposición a la *Legionella* "empaquetada" en las ame-

bas dispersas en las gotas del aerosol. La muerte de las amebas en el tracto respiratorio bajo liberaría gran número de bacterias a una temperatura (corporal) que favorecería su rápida multiplicación en el cuerpo.

CONCLUSIONES

A la luz de los resultados expuestos se podría plantear la hipótesis de que la estrategia ecológica, desde un punto de vista de microbiología ambiental, en la amplificación o crecimiento bacteriano podría tener lugar en dos fases o etapas, funcionalmente distintas, según la proporción o ratio bacteria-ameba (MOI-*multiplicity of infection*). La presencia de un biofilm específico podría ser determinante en este proceso.

En una primera fase, que podríamos llamar de *crecimiento rápido*, en la que la relación MOI es sustancialmente baja (etapa post infección con MOI < 10:1) y en conjunción con otras diferentes especies de bacterias y protozoos, la entrada de bacterias de legionela en la ameba originaría un crecimiento rápido en el seno de una única vacuola que, tras la lisis amebiana, liberaría al medio formas libres móviles, infectantes para otras amebas.

Se sugiere que legionela penetra en las amebas por mecanismos específicos y no competitivos con el resto de bacterias. Se produce así una amplificación del número de bacterias en el medio. Las posibles gotas de aerosol contendrían bacterias libres y, en principio, se requeriría un tiempo prolongado de exposición para alcanzar dosis infectantes.

Este ciclo se repetiría varias veces hasta alcanzar un número de bacterias suficientemente elevado. En esta fase, el enquistamiento de la ameba por factores estresantes originaría quistes que contendrían legionelas viables en su interior. Al no contener apenas vacuolas existirá poca liberación vacuolar al medio, en contraste con la fase posterior, más vacuolar.

La segunda fase, que podríamos llamar de *dispersión*, se inicia cuando la proporción aumenta a niveles de MOI > 10-30. En estos momentos existe un número tan elevado de bacterias en el medio que es muy probable que interaccionen varios grupos de ellas con una sola ameba; se producen varias vacuolas de crecimiento en el interior de la ameba que serían expulsadas por la misma, sin necesidad de lisar. Estas vacuolas, con tamaños inferiores a 5µ son resistentes a altas concentraciones de desinfectantes oxidantes, a la congelación-descongelación, ultrasonidos, etc. El número de vacuolas formadas depende de distintos factores ambientales (temperatura, nutrientes, presencia de factores estresantes, etc.) así como de la cantidad de bacterias que interaccionen con la ameba.

Se trata de una etapa donde lo importante sería la diseminación o colonización de otros nichos ecológicos. En este caso, el enquistamiento de la ameba se produce tras la liberación masiva al medio de las vesículas que existen en el interior. Algunos autores sugieren que estas vesículas constituyen el núcleo infectante en la transmisión de la legionelosis^{4,6}.

La presencia de biofilm secundario favorecería el mantenimiento y recontaminación de la bacteria en el medio.

Aunque expuestas de manera secuencial, estas fases pueden darse, y probablemente se den, en un mismo espacio y en el seno del biofilm. Se trataría en suma de una maduración dinámica del proceso.

En conclusión y en referencia a los factores de riesgo, habría que contemplar tres niveles biocenóticos de acción: actuaciones frente a la bacteria de legionela, actuaciones frente a la relación bacteria-protocoo y finalmente la relación bacteria-protocoo en el seno del biofilm.

Con relación al primer nivel de actuación, es decir, en relación a la bacteria de legionela tomada asiladamente, es necesaria la investigación de sustancias que bloqueen los mecanismos específicos de invasión legionela-ameba. La utilización de sustancias desinfectantes antilegionela aisladamente tiene una eficacia relativa aunque es imprescindible, especialmente en la primera fase, para eliminar la amplificación-reinfección y mantener niveles MOI bajos.

En referencia al sistema ameba-legionela, si bien resulta muy complicado evitar el crecimiento de amebas en sistemas como torres de refrigeración o similares, las medidas preventivas deberían ir encaminadas a mantener la relación MOI baja, siempre en conjunción con bajos niveles de biofilm. En el supuesto de alcanzar la fase de dispersión vacuolar (probablemente ligado a la aparición de brote y con UFC altas) debe evitarse añadir desinfectantes que favorezcan el enquistamiento, ya que se produciría, como reacción, una liberación masiva de vesículas al medio y por tanto al aerosol, con el posterior enquistamiento amebico, agravando el problema en cuanto a la carga bacteriana del aerosol y favoreciendo la reinfección posterior de la torre ya que los quistes son más resistentes a los desinfectantes y pueden permanecer en zonas o espacios de difícil acceso a la limpieza.

En su lugar debe procederse al vaciado del agua del sistema para continuar con la limpieza según se establece en la legislación. En este sentido cabe aclarar que se debería seguir escrupulosamente la indicación especificada en la legislación referente a "desconectar los ventiladores y sistemas de difusión para evitar la salida de aerosoles", ya que de no hacerse así se facilitaría la diseminación de aerosoles mucho más conta-

minantes que antes de añadir el desinfectante. Bajo ningún concepto se debería realizar una desinfección de choque, especialmente con desinfectantes oxidantes, estando los difusores (ventiladores, turbinas, etc.) en funcionamiento.

Finalmente, la eliminación física del biofilm o la utilización de productos que impidan o retarden su formación en las paredes de los distintos sistemas hídricos, constituye el elemento clave en la lucha contra la legionelosis ya que se evita, en gran parte, la formación de espacios biocénicos donde tienen lugar los procesos descritos.

El diseño de aparatos o sistemas de fácil limpieza (esquinas curvas, espacios accesibles), el mantenimiento adecuado de las instalaciones (incrustaciones, superficies corroídas, etc.) con limpiezas frecuentes, la utilización de sustancias antifilmantes de forma continua, así como evitar el estancamiento, son actuaciones que deben vigilarse con gran celo.

BIBLIOGRAFÍA

- Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol*. 1980 Dec; 33(12):1179-1183.
- Rowbotham TJ. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J Clin Pathol*. 1983 Sep;36(9):978-86.
- Rowbotham TJ. Current views on the relationships between amoebae, *Legionellae* and man. *Israel J Med Sci*. 1986;22:678-689.
- Yousef Abu Kwaik, Lian-Yong Gao, Barbara J. Stone, Chandrasekar Venkataraman, Omar S. Harb. Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl Environ Microbiol*. 1998 Sep;64(9):3127-33. Review.
- Fallon RJ, Rowbotham TJ. Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to *Legionella micdadei* associated with use of a whirlpool. *J Clin Pathol*. 1990; 43:479-483.
- Berk SG, Ting RS, Turner GW, Ashburn RJ. Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol*. 1998 Jan;64(1):279-86.
- O'Brien SJ, Bhopal RS. Legionnaires' disease: the infective dose paradox. *Lancet*. 1993 Jul 3; 342(8862):5-6.
- Kilvington S, Price J. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol*. 1990 May;68(5):519-25.
- Srikanth S, Berk SG. Stimulatory effect of cooling tower biocides on amoebae. *Appl Environ Microbiol*. 1993 October; 59(10): 3245-3249.
- Newsome AL, Baker RL, Miller RD, Arnold RR. Interactions between *Naegleria fowleri* and *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*. 1985 Nov;50(2):449-452.
- Srikanth S, Berk SG. Adaptation of amoebae to cooling tower biocides. *Microb Ecol*. 1994; 27:293-301.
- Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun*. 1994; 62:3254-4261.
- Brown CM, Nuorti PJ, Breiman RF, Hathcock AL, Fields BS, Lipman HB, Llewellyn GC, Hofmann J, Cetron M. A community outbreak of Legionnaires' disease linked to hospital cooling towers: an epidemiological method to calculate dose of exposure. *Int J Epidemiol*. 1999 Apr; 28(2):353-9.
- Addis DG, Davis JF, Martin L et al. Community-acquired Legionnaires' disease associated with cooling-tower: evidence for longer distance transport of *Legionella pneumophila*. *J Infect Dis* 1989; 159:572-75.
- Donlan RM, Forster T, Murga R, Brown E, Lucas C, Carpenter J, Fields B. *Legionella pneumophila* associated with the protozoan *Hartmannella vermiformis* in a model multi-species biofilm has reduced susceptibility to disinfectants. *Biofouling*. 2005;21(1):1-7.
- Murga R, Forster TS, Brown E, Pruckler JM, Fields BS, Donlan RM. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology*. 2001 Nov; 147(Pt 11):3121-6.
- Berger P, Papazian L, Drancourt M, La Scola B, Auffray JP, Raoult D. Ameba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia. *Emerg Infect Dis*. 2006 Feb;12(2):248-55.
- Neumeister B, Reiff G, Faigle M, Dietz K, Northoff H, Lang F. Influence of *Acanthamoeba castellanii* on intracellular growth of different *Legionella* species in human monocytes. *Appl Environ Microbiol*. 2000 Mar; 66(3):914-9.
- Winiacka-Krusnell J, Linder E. Free-living amoebae protecting *Legionella* in water: the tip of an iceberg?. *Scand J Infect Dis*. 1999;31(4):383-5. Review.
- Winiacka-Krusnell J, Linder E. Bacterial infections of free-living amoebae. *Res Microbiol*. 2001 Sep; 152(7):613-9. Review.
- Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, Abu Kwaik Y. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Jan; 71(1):20-8. Review.
- Mathieu L, Robine E, Deloge-Abarkan M, Ritoux S, Pauly D, Hartemann P, Zmirou-Navier D. *Legionella* bacteria in aerosols: sampling and analytical approaches used during the legionnaire's disease outbreak in Pas-de-Calais. *J Infect Dis*. 2006 May 1; 193(9):1333-5.
- McNealy T, Newsome AL, Johnson RA, Berck SG. Impact of amoeba, bacteria and *Tetrahymena* on *Legionella pneumophila* multiplication and distribution in an aquatic environment. En Reinhard Marre et al. *Coordinadores: Legionella*. 2002 ASM Press. Washington D.C. 170-175.
- Miller RD, Koebel DA. Prevalence of *Legionella* in whirlpool spas: correlation with total bacterial numbers. En Reinhard Marre et al. *Coordinadores: Legionella*. 2002 ASM Press. Washington D.C. 275-279.
- Fields BS. *Legionella* and Legionnaires' disease. En Hurst et al. *Coordinadores: Manual of Environmental Microbiology*. 1997. ASM Press. Washington D.C. 666-674.
- Souza V, Escalante AE, Noguez AM, Espinoza L, Cerritos R, Eguarte LE. *Ecología microbiana: una nueva ciencia para un nuevo siglo*. En Irma Rosas, Alejandro Cravioto y Exequiel Ezcurra. *Compiladores. Microbiología ambiental: 2004*. Publicaciones del Instituto Nacional de Ecología. México. Disponible en <http://www.ine.gob.mx/publicaciones/libros/440/cap5.html>.
- Kolari M. Attachment mechanisms and properties of bacterial biofilms on non-living surfaces. [Academic Dissertation in Microbiology.] Departamento de Química Aplicada y Microbiología. Universidad de Helsinki. Finlandia. 2003.