

# NOTAS SOBRE LA ECOLOGÍA DE LEGIONELLA: “EL CABALLO DE TROYA”

JAVIER REINARES ORTIZ DE VILLAJOS [1]  
BERNARDO FERRER SIMÓ [2]

[1] Centro de Salud Pública de Alcalá de Henares. Comunidad de Madrid. javier.reinares@salud.madrid.org

[2] Centro de Salud Pública de Alcobendas. Comunidad de Madrid. bernardo.ferrer@salud.madrid.org

## INTRODUCCIÓN

Aún sorprende que, hasta mediados de los años setenta, se desconociera el origen bacteriano de un tipo de neumonía grave y frecuente como es la Enfermedad del Legionario. No fue hasta enero de 1977, tras un impresionante brote en el hotel Bellevue-Stradford en Filadelfia que ocasionó 221 casos y 34 muertes, cuando Joseph E. McDade y Charles C. Shepard, dos microbiólogos de los Centros para el Control de Enfermedades (CDC), consiguieron aislar un bacilo Gram negativo, a partir de muestras de algunos de los enfermos. Para su recuperación emplearon cobayos y embriones de pollo, técnicas de laboratorio habituales para la detección de rickettsias, pero inusuales para el aislamiento de bacterias. Aquella desconocida patología fue bautizada por la prensa como la “Enfermedad de los Legionarios”, ya que la gran mayoría de los afectados pertenecían a la Legión Americana, que había celebrado en aquel hotel su convención anual. En recuerdo de los fallecidos y por la afinidad pulmonar que había mostrado el patógeno, el agente se denominó *Legionella pneumophila*. (Figura 1)

Hoy en día, gracias a medios de cultivo como el BCYE o a las técnicas de PCR, recuperamos bacterias de la familia *Legionellaceae* en multitud de ecosistemas naturales, como lagos, manantiales o tierra, y artificiales como fuentes, spas o torres de refrigeración (Borrella et al, 2005). Excluyendo el medio marino, *Legionella* está presente en casi cualquier medio hídrico donde la busquemos. Por otra parte, el avance de los métodos de diagnóstico de la Enfermedad del Legio-

nario, y especialmente la progresiva implantación desde los años noventa de la técnica de detección del antígeno en orina, nos permiten saber que se trata de una infección de distribución mundial, con una incidencia anual estimada de 2-20 casos/100.000 habitantes, que cada año da lugar a decenas de miles de casos tanto en EEUU como en Europa.

## PARADOJAS SIN EXPLICACIÓN

¿Cómo se entiende el retraso en el hallazgo de un agente bacteriano con esa relevancia médica? McDade contestaba a esta paradoja por los exigentes requerimientos nutritivos de la bacteria (elevada concentración de hierro y cisteína), por la

dificultad en su tinción y porque la enfermedad es clínicamente similar a otras neumonías no bacterianas “atípicas”, por lo que a las muestras recogidas de los enfermos, solían incorporarse antibióticos para disminuir su contaminación bacteriana. Otro factor que retrasó el “debut” de la legionelosis en el mundo de la microbiología es la relación de esta bacteria con dispositivos asociados a cierto grado de desarrollo tecnológico como torres de refrigeración, condensadores evaporativos, grandes equipos de preparación de agua caliente sanitaria, etc. Así pues, todos estos factores que pueden explicar el retraso en la identifica-

**“La compleja asociación entre la bacteria y los protozoos se convierte en el principal factor en la persistencia de *Legionella* en el ambiente, por lo que su erradicación debería comenzar por la prevención de la infección protozoaria”**

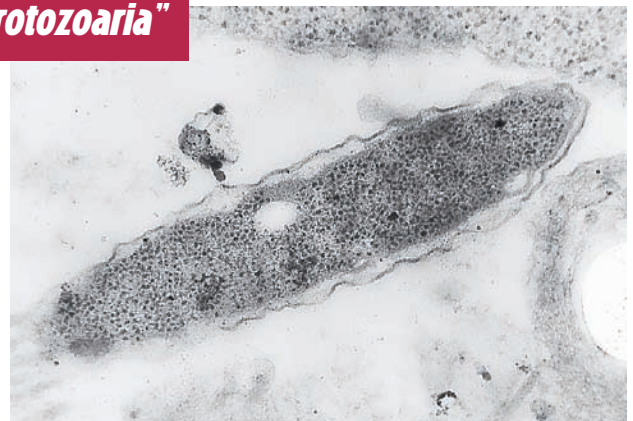
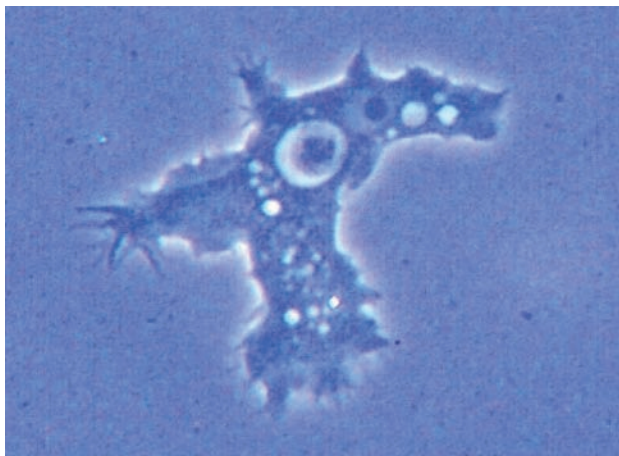


Figura 1. *Legionella pneumophila*. Microscopio electrónico de transmisión. Fuente: CDC. Public Health Image Library



**Figura 2. Trofozoito de Acanthamoeba. Microscopio óptico con contraste de fase. Cortesía Dr. Pérez-Serrano J. Universidad de Alcalá**

ción del patógeno y, en cierta manera, podrían explicar que una bacteria tan ubicua, no se hubiese identificado y clasificado mucho antes a partir de muestras ambientales, sin embargo, no responden a otra contradicción: ¿cómo es posible que sea tan exigente *Legionella* para crecer en el laboratorio cuando se encuentra tan difundida y en tantos ecosistemas en el ambiente?

Quizás una parte de la respuesta está en los LLAPs (*Legionella*-like amoebal pathogens o patógenos amebianos *símil Legionella*). Estos microorganismos son, posiblemente, nuevas especies del género *Legionella*, y ni siquiera crecen en los medios de cultivo enriquecidos, teniendo que hacerlo en cocultivo con protozoos (Fields, 2002). Muchos de estos LLAPs han sido también asociados con la Enfermedad del Legionario.

**Otra paradoja que aún permanece sin resolver tiene que ver con la dosis infectiva (O'Brien y Bhopal, 1993).** Así, tras la investigación de brotes de legionelosis en los que llegó a determinarse la identidad de los microorganismos aislados en pacientes y muestras ambientales, sin embargo los estudios encontraron bajas concentraciones de *Legionella* en los aerosoles de las fuentes de infección, o, en algunos brotes se asociaron casos de legionelosis a enormes distancias de los dispositivos involucrados (Addis et al, 1989). La incógnita surge cuando tratamos de equiparar las concentraciones de *Legionella* halladas en las fuentes implicadas y las elevadas dosis infectivas calculadas mediante experimentación animal. Algunos autores han conseguido dar una explicación coherente a este hecho a través de la singularidad ecológica de esta bacteria.

#### LA "VIDA SOCIAL" DE LEGIONELLA

Progresivamente se va desvelando la compleja "vida social" de *Legionella* (Fields, 2002), y, aunque con lagunas, hoy estamos en condiciones de resolver antiguos interro-

gantes y/o explicar los anómalos resultados que ocasionalmente obtenemos cuando procuramos la derrota de este patógeno. De la ecología de la bacteria podemos encontrar claves para reorientar los actuales métodos de lucha y las tareas de prevención.

Vamos conociendo las interacciones de *Legionella* con otras poblaciones bacterianas con las que mantiene efectos antagonistas o sinérgicos. Por ejemplo, en ecosistemas deficientes en cisteína o sales de hierro, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* o *Acinetobacter* favorecen el sostenimiento de *Legionella*, o, gracias a la presencia de cianobacterias o algas verdes, puede crecer en ambientes salinos, inviábiles en principio a la bacteria por sí sola. Pero quien merece una atención especial por su enorme trascendencia, es la interacción de *Legionella* con algunos protozoos de vida libre.

#### Legionella y protozoos

En la última década se ha avanzado notablemente en desentrañar la resistencia de algunos microorganismos a su predación natural por protozoos, acuñándose el término ARB (Bacterias Resistentes a Amebas), o, más recientemente, el de microorganismos resistentes a amebas. Esta resistencia varía desde asociaciones simbióticas hasta el parasitismo (Winiacka-Krusnell y Linder, 2001). Patógenos tan relevantes como *Coxiella burnetii*, *Escherichia coli* O157, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella spp.*, etc. (Greub y Raoult, 2004) disponen de mecanismos de resistencia cuya comprensión plantea importantes implicaciones clínicas y epidemiológicas (Winiacka-Krusnell y Linder, 2001) en ámbitos como la seguridad alimentaria, la seguridad quirúrgica, la sanidad ambiental, etc.

**De todos los microorganismos resistentes a amebas, la relación que *Legionella* establece con ciertos protozoos de vida libre, es sin duda la mejor conocida.**

Se han descrito 14 diferentes especies de amebas y dos de protozoos ciliados en los que *Legionella* es capaz de multiplicarse (Borrella et al, 2005), entre los que destacan los géneros *Acanthamoeba* (Figura 2), *Naegleria*, *Tetrahymena* y *Hartmannella*, cuya presencia en el agua y suelo es muy frecuente, especialmente los dos primeros en ambientes hídricos termales. (Figura 3)

**Una vesícula grande o muchas pequeñas respirables**

Rowbotham, al inicio de los años ochenta, hizo una detallada descripción muy novedosa para su tiempo. Observó que *Legionella*, tras su fagocitación por amebas, contrariamente a lo esperado, iniciaba su replicación en el interior del fagosoma o vacuola digestiva, aumentando consecuentemente de tamaño hasta ocupar todo el espa-

**"Es necesario seguir avanzando y profundizando en el conocimiento de la ecología microbiana a fin de resolver algunos aspectos que aún no han podido ser demostrados definitivamente"**

cio citoplasmático. La lisis final de la ameba, con la liberación masiva de bacterias al medio, iniciaría nuevamente el ciclo en otras amebas. También, advirtió que en ocasiones se formaba en vez de una sola vacuola grande, diversas vesículas de menor tamaño y que tras la lisis del protozoo se liberaban, no solo bacterias, sino también vesículas sin romper llenas de bacterias. (Figuras 4 y 5)

No pudo, a pesar de todo, discernir en que casos se producían vesículas y en cuales se formaba una sola vacuola. Pero planteó la hipótesis que estas vesículas, de tamaño respirable menor de 5 micras, que contenían formas viables de *Legionella*, podían constituir las partículas infectivas de la Enfermedad del Legionario, lo que explicaba entre otros interrogantes, porque la enfermedad no se transmitía entre personas. Estudios posteriores, en 1998, detallaron como más del 90% de las vesículas cargadas de bacterias expelidas por *Acanthamoeba*, tenían un tamaño entre 1 y 5 micras, y eran por tanto capaces de inhalarse y alcanzar el alveolo pulmonar. Estas vesículas cargadas de *Legionella* son muy resistentes a la acción de los biocidas y a tratamientos físicos (Berk et al, 1998).

Las amebas de vida libre presentan básicamente dos estados: el trofozoito, o forma de vida metabólicamente activa, y el quiste, o forma de resistencia, generado cuando las condiciones medioambientales son adversas. Rowbotham también describió la habilidad de *Legionella* de permanecer en el interior de los quistes nacidos a partir de trofozoitos infectados, manteniéndose viables durante largos periodos de tiempo. Estudios posteriores, confirmaron como amebas infectadas con *Legionella*, antes de su enquistamiento, liberaban al medio gran parte de las vesículas presentes en el trofozoito, cargadas de bacterias (Berk et al, 1998). (Figura 6)

Pero ¿cuándo se originan en el interior del protozoo numerosas vesículas de pequeño tamaño y en que casos se forma una única vacuola de gran tamaño?

Berk, y su grupo de investigación en la Universidad de Tennessee, han comprobado que es de suma importancia la relación numérica que haya entre bacterias y protozoos, ratio que se conoce con el nombre de MOI (multiplicity of infection). Así, cuando el número de bacterias libres aumenta en relación al número de amebas, hasta alcanzar ratios de 1.000 a 1 (MOI mayor de  $10^3$ ), el número de vesículas producidas por cada ameba también aumenta. Valores bajos del ratio (MOI menor a  $10^2$ ) parece que llevan a la formación de un escaso número de vesículas o una sola vacuola de gran tamaño con gran número de formas móviles de *Legionella*. Parece como si la estra-

tegia utilizada por la bacteria fuera la de aumentar su número cuando la población de protozoos a infectar es grande, para pasar a formar vesículas conforme el número de protozoos infectados disminuye. (Berk et al, 1998)

### LEGIONELLA EN UN FILM: LA VIDA EN UNA BIOPELÍCULA

Las biopelículas microbianas son comunidades integradas por organismos procariotas y eucariotas, como bacterias, algas, hongos y protozoos, en el seno de una estructura o matriz polimérica, que se asocian estableciendo interacciones que contribuyen al man-

tenimiento de las mismas (Atlas y Bartha, 2002). La formación de las biopelículas nace con poblaciones microbianas específicas, hasta desarrollar una estructura que suministra una interfase entre las células y el medio, influyendo en el intercambio químico y la disponibilidad de nutrientes (Atlas y Bartha, 2002). La estructura así creada se va repoblando con otras formas procariotas y eucariotas que constituyen los organismos de la biopelícula y que se benefician de la protección que ofrece la matriz polimérica contra las perturbaciones externas (Fletcher, 1984), como una barrera de exclusión que impide la acción directa de biocidas o antibióticos. La arquitect-

**"Si como parece se confirma el papel de las vesículas cargadas de Legionella como elemento principal en la transmisión de la enfermedad, evitar las causas que favorecieran la producción y el aumento en la liberación de las vesículas por los protozoos, cobra gran importancia en la prevención"**



Figura 3. *Legionella pneumophila* (verde) prendida mediante un pseudópodo a la ameba *Hartmannella vermiformis* (naranja). Microscopio electrónico de barrido. Fuente: CDC. Public Health Image Library. Dr. Barry S. Fields

tura de las biopelículas es heterogénea, de modo más común las microcolonias adquieren una morfología conforme o en forma de hongo, entre las que se encuentran canales por los que circula el agua, funcionando de un modo similar a lo que sería un sistema circulatorio primitivo, permitiendo la llegada de nutrientes, la eliminación de desechos y la comunicación interbacteriana. (Figura 7)

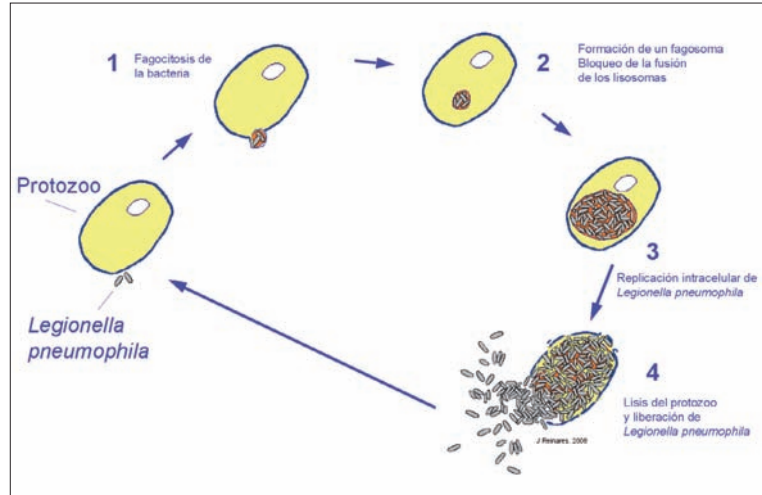
En estas comunidades se ha encontrado la asociación *Legionella* -protozoo y también la bacteria libre. De hecho, la amplia disponibilidad de nutrientes en las biopelículas ha llevado a algunos investigadores a plantear que esta forma de *Legionella* sétil podría sobrevivir y multiplicarse extracelularmente en ausencia de protozoos hospedadores (Rogers y Keevil, 1992), de modo similar a otras bacterias de multiplicación facultativa intracelular. De ser cierta esta posibilidad de multiplicación extracelular en el seno de biopelículas, podría tener importantes repercusiones en las estrategias de control (Fields et al, 2002). Pero hoy, sin embargo, se acepta de modo generalizado que esta bacteria, en ausencia de protozoos, puede persistir en biopelículas durante largos periodos, pero no multiplicarse.

Algunas biopelículas estudiadas, como son las asociadas a implantes médicos como catéteres, válvulas artificiales, lentes de contacto, etc., generan gran preocupación, ya que pueden ser hasta 500 veces más resistentes a los antibióticos que las células plactónicas o de flotación libre. De hecho en ecosistemas acuáticos, muchos de los tratamientos químicos sobre las biopelículas tienen un efecto limitado, viéndose afectados los microorganismos que residen en las biocapas superficiales.

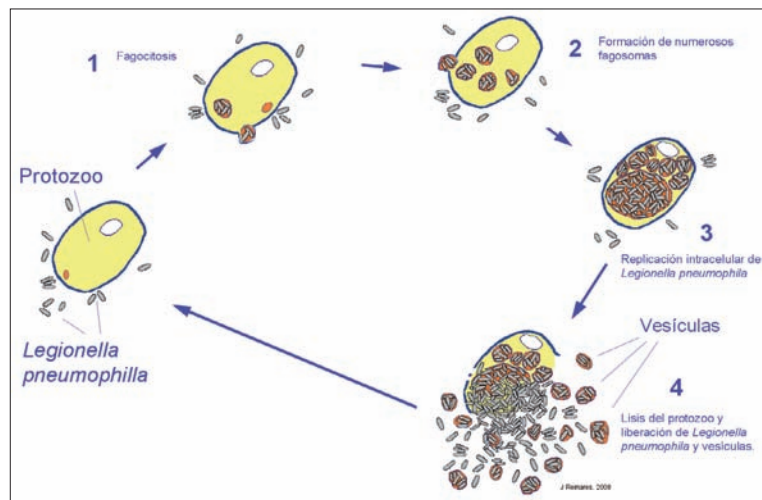
**LAS MATEMÁTICAS DE LEGIONELLA**

**Aprendiendo a contar de nuevo**

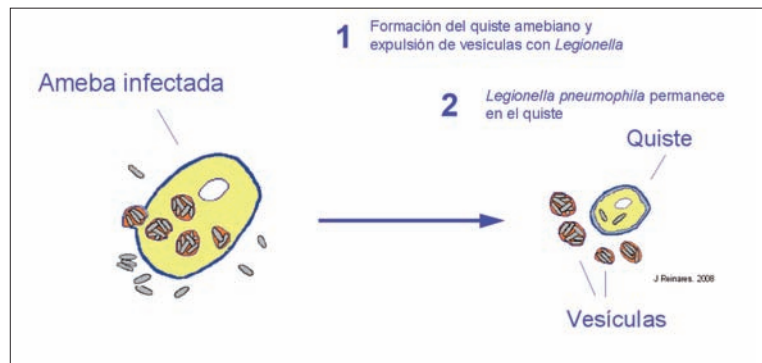
La singular relación entre la bacteria y los protozoos, ha llevado a algunos autores a alertar ante la posibilidad de subestimar, en algunas muestras, la población de *Legionella* en los recuentos tras su cultivo. Esto se debe a que a diferencia de bacterias planctónicas, parte de la población de *Legionella* se encuentra agregada, localiza en el interior de los protozoos, sus quistes o vesiculada. En un estudio tras someter un cocultivo de amebas y *Legionella* a tres ciclos de congelación-descongelación y ultrasonidos, consiguió la total dispersión de los trofozoitos amebianos en tanto que las vesículas permanecían inalteradas. Cálculos realizados sobre el tamaño de las vesículas han permitido hacer estimaciones sobre el número de bacterias contenidas: Rowbotham con-



**Figura 4. Replicación intraprotzoaria de Legionella pneumophila y liberación al medio**



**Figura 5. Replicación intraprotzoaria de Legionella pneumophila y liberación de vesículas y bacterias libres al medio**



**Figura 6. Enquistamiento de una ameba infectada por Legionella pneumophila**

tabilizó entre 365-1.483 bacterias por vacuola de 5 micras, si bien otros estudios reducen el número a 20-200 bacterias (Berk et al, 1998). No obstante cuando se lleva a cultivo en placa, cada vesícula dará lugar a una sola unidad formadora de colonias (UFC), por lo que la subestimación del riesgo en una muestra ambiental puede ser muy marcada (Berk et al, 1998). Este hecho ha servido para que algunos autores aporten una solución a la paradoja sobre la dosis infectiva (Berk et al, 1998). (Figura 8)

### Legionella “durmiente”

A lo anterior debemos de sumar un segundo factor. Cuando se producen determinadas situaciones de estrés ambiental algunas poblaciones bacterianas entran en un estado temporal en el que no son cultivables, conocido como “viable pero no cultivable”. *Legionella* también puede emplear esta estrategia y entrar en ese estado, de modo que no es recuperable por medio de cultivo pero puede visualizarse mediante técnicas de inmunofluorescencia (Borrella et al, 2005). Se conoce que ante condiciones de escasez de nutrientes y elevación de la temperatura, *Legionella* entra en el estado de viable pero no cultivable (Husson et al, 1987). Más recientemente se ha demostrado que *Legionella pneumophila* puede pasar rápidamente del estado de célula viable pero no cultivable al de cultivable, tras ser cocultivada en el protozoo *Acanthamoeba* (Steinert et al, 1997). Este hecho sugiere que puede ser muy interesante la utilización de cocultivos para aislar *Legionella* spp. de muestras sospechosas, aparentemente negativas tras su cultivo en medio selectivo. Probablemente *Legionella* viable pero no cultivable representa un elevado porcentaje de la población de la bacteria en los ambientes naturales y artificiales, y constituye un reservorio desconocido del patógeno (Steinert et al, 1997).

### “EL CABALLO DE TROYA”

Estudios sobre la respuesta de las poblaciones amebianas ante factores estresantes como la elevación de la temperatura o ante productos oxidantes, mostraron como estos microorganismos son capaces de modificar algunas proteínas como mecanismo de adaptación y protección celular ante condiciones adversas en la naturaleza (Pérez-Serrano et al, 2000). *Legionella*, en su ubicación intraprotzoaria, se aprovecha de este y

**“Debemos mantener un principio de precaución con los resultados de los recuentos microbiológicos de *Legionella*, planteando la posibilidad de que, si la bacteria está en su forma vesiculada, se estuviera subestimando de una manera notable el riesgo real de una instalación”**

del resto de mecanismos de resistencia de un organismo más evolucionado, que le permiten colonizar ecosistemas hídricos hostiles, que otras poblaciones bacterianas, o ella misma por si sola, no podrían soportar, sirviéndose de los eucariotas, como caballo de Troya, para alcanzar nuevos ambientes.

La localización intracelular de la *Legionella*, sumado a la vida en el seno de biopelículas, permite eludir condiciones adversas tales como desecación, altas temperaturas, osmolaridad, pH o biocidas, destacando especialmente el enquistamiento de la ameba, ya que esta forma representa el estado de mayor resistencia del protozoo (Kwaik et al, 1998).

Estudios de la ameba *Naegleria* spp. in vitro han mostrado que es capaz de tolerar amplios rangos de pH (4,6-9,5), e incluso sus quistes soportan hasta un pH de 2,1. Los quistes de *Acanthamoeba*, pueden llegar a sobrevivir momentáneos calentamientos de hasta 80° C (Aheam y Gabriel, 1997) y los de *Acanthamoebae polyphaga* son capaces de resistir 3,5 ppm de cloro residual libre durante 24 horas, incluso quistes infectados de esta ameba protegieron a *Legionella* hasta 50 ppm de cloro libre (Kilvington y Price, 1990). Quistes de *Acanthamoebae culbertsoni* resistieron 40 ppm durante 3 horas (De Jonckheere, 1976). De hecho los tratamientos rutinarios de cloración de las aguas en los abastecimientos pueden favorecer la selección de aquellas especies de protozoos resistentes a la cloración, como ocurre con *Acanthamoebae* (Rowbotham, 1986). También las vesículas cargadas de *Legionella* son muy resistentes a la acción de los biocidas y a tratamientos físicos (Berk et al, 1998).

### CONCLUSIONES

Algunas de las habilidades ecológicas de *Legionella* tienen una gran significación en las tareas de control de la enfermedad. Nos enfrentamos a una bacteria con capacidades de resistencia muy superiores de las que dispondría por sí sola. Por ello, es necesario seguir avanzando y profundizando en el conocimiento de la ecología microbiana a fin de resolver algunos aspectos que aún no han podido ser demostrados definitivamente y que nos permitirían desarrollar medidas más efectivas de prevención de la legionelosis (Borrella et al, 2005).

La compleja asociación entre la bacteria y los protozoos se convierte en el principal factor en la persistencia de *Legionella* en el ambiente, por

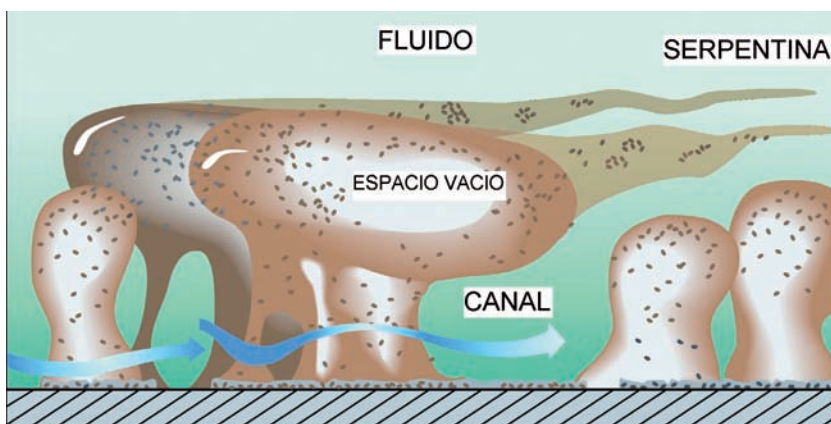
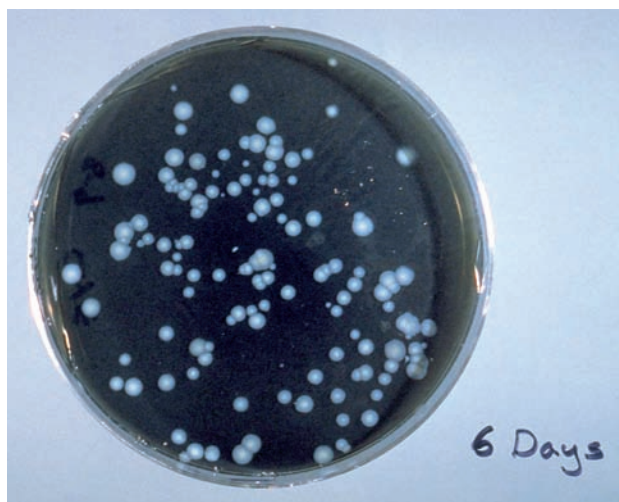


Figura 7. Modelo conceptual de la estructura de una biopelícula. Con autorización de Peg Dirckx. Montana State University. Center for Biofilm Engineering



**Figura 8. Colonias de *Legionella pneumophila* en medio BCYE. Fuente: CDC. Public Health Image Library**

lo que su erradicación debería comenzar por la prevención de la infección protozoaria (Kwaik et al, 1998), ya que la vida extracelular de la bacteria es mucho más susceptible a las condiciones ambientales adversas y entre ellas a los desinfectantes (Kwaik et al, 1998). En ese sentido debemos de reorientar nuestros actuales métodos de control, centrados básicamente sobre la bacteria, dirigiéndolos hacia el binomio bacteria-protocoo y hacia la reducción de las biopelículas.

**Así, si como parece se confirma el papel de las vesículas cargadas de *Legionella* como elemento principal en la transmisión de la enfermedad, evitar las causas que favorecieran la producción y el aumento de la liberación de las vesículas por los protozoos, cobra gran importancia en la prevención. En definitiva evitar aquellos factores que pudieran inducir a la destrucción de trofozoitos infectados o a su enquistamiento, especialmente tras una etapa previa con un MOI elevado (que hubiera favorecido la producción de múltiples vesículas por ameba).**

Por último, debemos mantener un principio de precaución con los resultados de los recuentos microbiológicos de *Legionella*, planteando la posibilidad de que, si la bacteria está en su forma vesiculada, se estuviera subestimando de una manera notable el riesgo real de una instalación.

## BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Atlas RM. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. Environ Microbiol (1999) 1(4), 283-293
- Atlas RM y Bartha R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Madrid. Pearson Educacion.
- Berk SG, Ting RS, Turner GW y Ashburn RJ. Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. Appl Environ Microbiol 1998 Jan;64(1):279-286
- Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M y Messi P. Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. Biotechnol Annu Rev. 2005;11:355-380.
- Diederer BMW. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. J Infect. 2008. Jan; 56(1):1-12
- Fields BS, Benson RF y Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev, July 2002, p. 506-526 Vol. 15, No. 3
- Fliermans CB. Ecology of *Legionella*: from data to knowledge with a little wisdom. Microb Ecol (1996) 32:203-228
- Greub G y Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. Clin Microbiol Rev, Apr. 2004, p. 413-433 Vol. 17, No. 2
- Kwaik YA, Gao LY, Stone BJ, Venkataraman C y Harb OS. Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. Appl Environ Microbiol 1998 Sept;64(9):3127-3133.
- Lucas CE, Brown E y Fields BS. Type IV pili and type II secretion play a limited role in *Legionella pneumophila* biofilm colonization and retention. Microbiology (2006), 152, 3569-3573
- Mampel J, Spirig T, Weber SS, Haagenen JAJ, Molin S y Hilbi H. Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. Appl Environ Microbiol 2006 Apr;72(4): 2885-2895
- Mandell GL, Bennet JE y Dolin R. Enfermedades infecciosas: principios y práctica. Editorial Médica Panamericana. 5ª Edic. 2002
- 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
- O'Brien SJ y Bhopal RS. Legionnaires' disease: the infective dose paradox. Lancet. 1993 Jul 3; 342(8862):5-6.
- Pérez-Serrano J, Martínez J, Pérez B, Bernadina WE y Rodríguez-Caabeiro F. In vitro shock response to different stressors in free living and pathogenic *Acanthamoeba*. Int J Parasitol. 2000 Jun;30(7):829-35.
- Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J Clin Pathol 33:1179-1183. 1980
- Rowbotham TJ. Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. Isr J Med Sci 22:678-689. 1986
- Srikanth S, Berk SG. Stimulatory effect of cooling tower biocides on amoebae. Appl Environ Microbiol 1993 Oct; 59(10):3245-9
- Steinert M, Emödy L, Amann R y Hacker J. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. Appl Environ Microbiol 1997 May;63(5):2047-2053
- Varios. *Legionella* and the prevention of legionellosis. World Health Organization. Ed Bartram J, Chartier Y, Lee JV, Pond K y Surman-Lee S. 2007
- Winiecka-Krusnell J y Linder E. Bacterial infections of free-living amoebae. Res. Microbiol. 152 (2001) 613-619