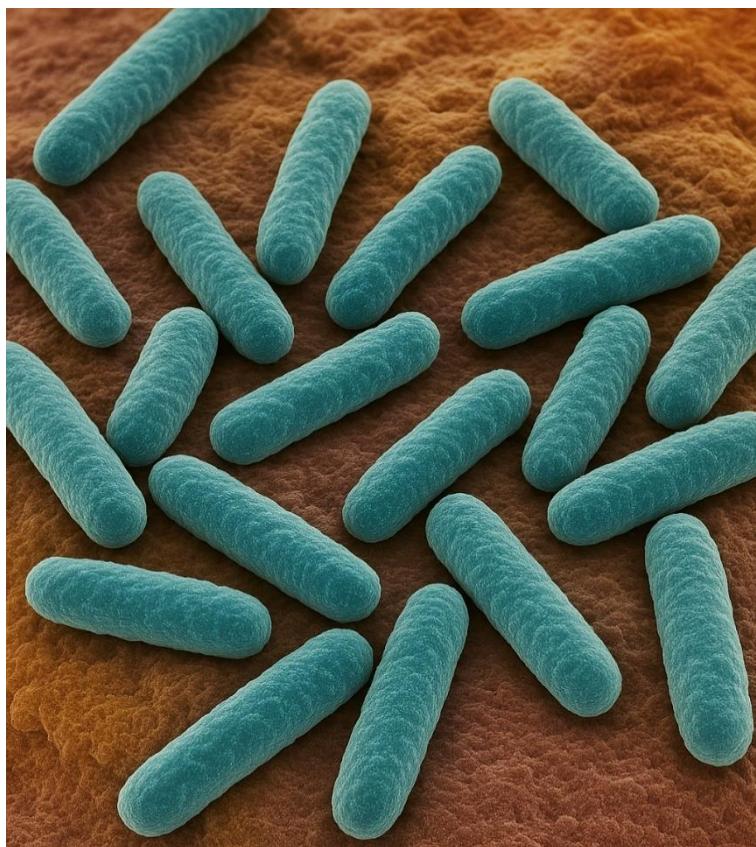


TEMA 21:

LEGIONELLA



Microbiología clínica

Grado en Bioquímica
Departamento de Biología Molecular
JMRR-UAM © 2025

Alba Crespo Antón

Lucía Jiménez Ballesteros
Olivia Luna Solórzano

ÍNDICE

1. Introducción.....	2
2. Patogénesis.....	6
3. Métodos de detección y diagnóstico.....	8
4. Legionella se multiplica dentro de una vacuola en la célula hospedadora.....	10
4.1. La maquinaria Dot/Icm y el tráfico vesicular de la célula hospedadora.	12
4.1.1. Ubiquitinación no canónica y sistemas miméticos del huésped.	16
4.1.2. Metaefectores.	17
4.2. Modulación del sistema de autofagia por parte de Legionella.....	17
4.3. Inhibición de la apoptosis de la célula hospedadora.....	20
5. Invasión de protozoos por L. pneumophila.....	21
6. Referencias.....	24

1. Introducción.

El género *Legionella*, y la especie *L. pneumophila*, fue inicialmente descubierto por su asociación a un brote de neumonía que tuvo lugar durante la convención de la Legión americana celebrada en el verano de 1976 en un hotel de Filadelfia (Pensilvania). Se produjeron 221 casos, 34 de ellos con un desenlace fatal. Por esta razón, la enfermedad recibe el nombre de legionelosis o enfermedad de los legionarios.

Se llevó a cabo una intensa búsqueda sobre la posible causa, descartándose que fuera causada por metales pesados (se analizaron más de 30) y se testó la presencia de 77 patógenos conocidos. Tampoco se consiguió crecer ningún microorganismo en los medios de crecimiento convencionales de microorganismos o en las células hospedadoras típicamente empleadas para la multiplicación de virus. Finalmente, el investigador Joseph McDade y sus colaboradores fueron capaces de identificar un microorganismo en cobayas que habían sido expuestas a tejido pulmonar de pacientes; se trataba de un nuevo género de bacterias que fue bautizado como *Legionella*. Al ponerse a punto métodos de cultivo, y el organismo pudo ser aislado, se pudieron desarrollar métodos de diagnóstico, lo que permitió hacer estudios retrospectivos sobre muestras histológicas de pacientes que habían mostrado síntomas clínicos de neumonía. Así se pudo demostrar la presencia del microorganismo en muestras hasta de 1947. Y estudios serológicos pudieron identificar este organismo como responsable de un brote febril (no pneumónico) que ocurrió en 1965 en la ciudad de Pontiac que afectó a 144 personas, aunque ninguna murió. Esta observación llevó a distinguir dos procesos clínico-patológicos en la legionelosis: la fiebre Pontiac (un proceso agudo, autolimitado, con síntomas similares a una gripe) y la legionelosis pneumónica.

No obstante, se piensa que la legionelosis ha emergido como una enfermedad importante en la segunda mitad del siglo XX como consecuencia, en parte, de las alteraciones del entorno producidas por el hombre. Con relativa frecuencia, se producen brotes de enfermedad en poblaciones localizadas. Por ejemplo, en 2002, en la ciudad de Murcia se detectó un brote que afectó a 750 personas, se sospechó que la fuente de la infección era una torre de refrigeración. Afortunadamente, sólo se produjo un fallecimiento.

La incidencia anual de legionelosis es de 1-2 casos por 100.000 personas, aunque se observa una tendencia al aumento de casos en los últimos años.

La identificación de *Legionella pneumophila* abrió el camino para la caracterización de unas 50 especies dentro del género *Legionella*, de las que 24 de ellas se han asociado a procesos

patológicos en humanos (figura 1). Si bien, alrededor del 90% de los casos de legionelosis son causados por *L. pneumophila*. En Australia y Nueva Zelanda, el 50% de los casos de legionelosis son producidos por la especie *Legionella longbeacheae*, que se encuentra en grandes cantidades en el estiércol que se utiliza para abonar la tierra, afectando principalmente a las personas (jardineros y agricultores) que se encargan de estas labores.

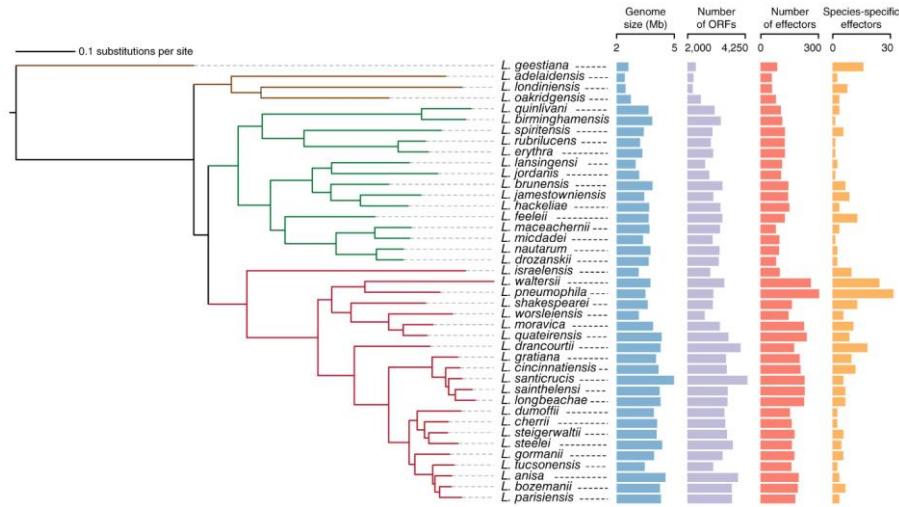


Figura 1. Árbol filogenético de 41 especies de *Legionella*. Para cada una de ellas se representa en azul el tamaño del genoma, en lila el número de ORFs, en rojo el número de efectores y en naranja el número de efectores únicos. Sacada de Burstein et al. (2015)

Es una bacteria Gram-negativa, que tiene unos requerimientos nutricionales muy complejos, incluyendo un inusualmente alto requerimiento de hierro. *Legionella* está presente en bajo número en lagos, ríos y suelos, formando parte de los ecosistemas microbianos naturales (figura 2). Es relativamente resistente al calor (puede resistir temperaturas de hasta 80 °C) y a la cloración y, por ello, también se puede distribuir a través de los sistemas de abastecimiento de aguas. Se encuentra con frecuencia en grandes cantidades en torres de refrigeración y condensadores de evaporación de los grandes sistemas de aire acondicionado. Esto explica que la mayoría de los brotes han ocurrido en grandes edificios o sus alrededores como hoteles, fábricas y hospitales, que cuentan con enormes sistemas de refrigeración. Estos sistemas producen gotas de agua contaminada que son inhaladas por las personas que pasan por las proximidades. En resumen, es un patógeno que se transmite por el agua, normalmente en aerosoles más que por el agua de bebida o de recreo.

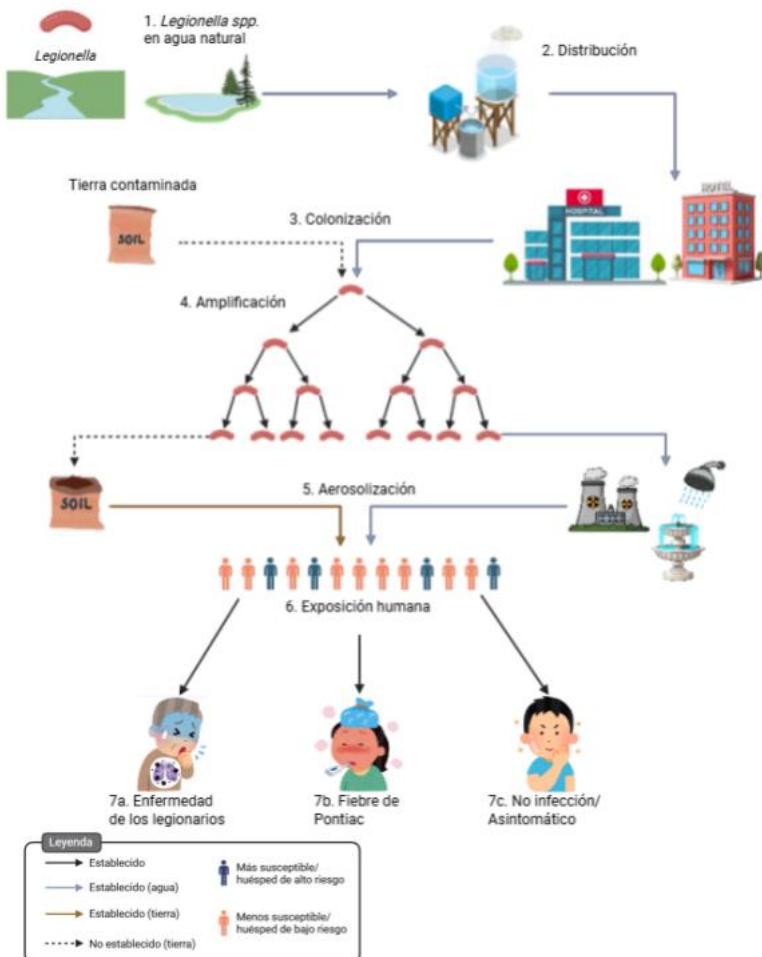


Figura 2. Ruta de diseminación de *Legionella* desde aguas naturales hasta el desarrollo de la enfermedad del legionario y/o la fiebre de Pontiac. La *Legionella* procedente de fuentes de agua dulce (1) se distribuye en bajas concentraciones desde los puntos de purificación del agua (2), colonizando las redes locales de fontanería y los sistemas de refrigeración, entre otros lugares (3), y se amplifica bajo condiciones ambientales favorables (4). La posterior aerosolización (5) expone a la población humana, que puede incluir individuos con mayor susceptibilidad (6), lo que da lugar a un posible espectro de enfermedades. Las personas más susceptibles (por edad o condiciones médicas subyacentes) tienen un mayor riesgo de enfermedad del legionario que aquellas menos susceptibles, y ambos grupos están en riesgo de padecer fiebre de Pontiac. La vía de la enfermedad del legionario causada por suelo contaminado se comprende menos, pero también parece deberse a la exposición a aerosoles. Imagen creada con BioRender, a partir de Mercante & Winchell et al. (2015)

El agua es el mayor reservorio de *Legionella* y la bacteria se encuentra en sitios con agua fresca de todo el mundo. En la naturaleza, *Legionella* se encuentra con frecuencia como parásito de protozoarios, entre ellos numerosas especies de amebas que parecen ser el reservorio ambiental. También puede encontrarse asociado con “biofilms” (biopelículas). Así, se piensa que *Legionella* sobrevive dentro de biofilms en los sistemas de agua de los edificios. Su replicación en este hábitat depende de la presencia de protozoos “comedores de bacterias”, pues no parece tener la capacidad de replicarse de forma extracelular.

La infección en humanos se produce a través de gotitas de aerosoles en el aire. *L. pneumophila* no se transmite de persona a persona (solo se ha reportado un caso de transmisión

entre personas) y, en consecuencia, se considera sólo un patógeno oportunista de humanos. Múltiples brotes de legionelosis tienden a ocurrir en los últimos meses del verano, cuando los aparatos de aire acondicionado son extensivamente empleados. Lógicamente, las personas que se encargan de mantener los sistemas de refrigeración en edificios tienen un riesgo aumentado de adquirir esta infección. También, aunque menos frecuente, *L. pneumophila* se puede adquirir junto a una infección con amebas cargadas con la bacteria.

Teniendo en cuenta la gran prevalencia de *L. pneumophila* en la naturaleza y la destacable capacidad que tiene la bacteria para replicarse dentro de células puede llamar la atención de que la enfermedad de la legionelosis no sea más frecuente. La razón es que el sistema inmunitario de la mayoría de las personas es capaz de controlar las infecciones producidas por los pequeños números de bacterias que normalmente se encuentran en los ambientes naturales.

La presencia constante de *Legionella* en ecosistemas acuáticos naturales refleja una larga adaptación evolutiva asociada a protozoos de agua dulce, especialmente amebas. Esta relación ha permitido que la bacteria desarrolle mecanismos muy eficaces para sobrevivir dentro de vacuolas intracelulares, lo que posteriormente facilita su capacidad de infectar células humanas. Además, su ciclo ambiental favorece transiciones entre formas replicativas y formas más resistentes, lo que le permite persistir en sistemas artificiales de agua y colonizar biofilms con gran eficiencia.

2. Patogénesis.

Las infecciones son a menudo asintomáticas o producen síntomas leves, tal es el caso de la dolencia conocida como fiebre Pontiac, que es una enfermedad autocurante con síntomas similares a una gripe. Sin embargo, infecciones más serias que desencadenan casos de neumonía pueden ocurrir, sobre todo, en pacientes de edad avanzada o personas con problemas de inmunosupresión. Algunos serotipos de *Legionella* están estrechamente relacionados con la producción de neumonía. Los procesos de neumonía tienen asociados una alta mortalidad (> 10%). En la mayoría de los casos, las infecciones por *L. pneumophila* permanecen confinadas al pulmón.

L. pneumophila es un patógeno intracelular facultativo. Las bacterias sobreviven y se multiplican en las células fagocíticas en el interior de vacuolas, que no van a ser fusionadas a

lisosomas. La muerte de las células alveolares y la respuesta inflamatoria que la infección produce son las causas que pueden conducir a un fallo respiratorio fatal.

El éxito de *L. pneumophila* como patógeno intracelular se basa en su capacidad para remodelar profundamente la vacuola en la que se encuentra. Tras la fagocitosis, la bacteria transforma rápidamente el compartimento inicial en un nicho replicativo altamente especializado, reclutando vesículas derivadas del retículo endoplásmico y modulando la actividad de orgánulos cercanos, como mitocondrias. Esta remodelación se lleva a cabo mediante una extensa batería de proteínas que la bacteria inyecta en la célula hospedadora y que alteran múltiples procesos celulares, incluyendo el tráfico vesicular, la señalización, la ubiquitinación y la autofagia.

Durante la infección, la bacteria alterna entre dos estados fisiológicos: uno replicativo, adaptado al crecimiento activo dentro de la célula, y otro transmisivo, resistente al estrés, preparado para sobrevivir en el ambiente y volver a infectar nuevos hospedadores. Esta diferenciación está estrechamente ligada a cambios metabólicos y a la disponibilidad de nutrientes dentro de la célula hospedadora, lo que permite a la bacteria ajustar su comportamiento en función del entorno.

Un aspecto clave del proceso infeccioso es la capacidad de *L. pneumophila* para bloquear la maduración del fagosoma hacia el lisosoma y evitar su degradación. Paralelamente, la bacteria secuestra membranas del retículo endoplásmico para construir una vacuola con características similares a este orgánulo. Esta manipulación simultánea de la autofagia y del retículo endoplásmico crea un equilibrio funcional que facilita tanto la protección frente a mecanismos celulares defensivos como la provisión de nutrientes necesarios para la replicación bacteriana.

La infección es tratada con altas dosis de eritromicina. Sin embargo, *L. pneumophila* es resistente a penicilinas y cefalosporinas al producir el enzima β -lactamasa. Afortunadamente, hasta ahora, no se ha descrito ninguna cepa de *Legionella* con resistencia a antibióticos.

En general, una fuerte y rápida respuesta inflamatoria va a controlar la replicación bacteriana, mientras que una inmunidad mediada por células contribuirá a la resolución de la infección y la eliminación de la bacteria. Así, la mayoría de las personas expuestas a *L. pneumophila* permanecen asintomáticos o experimentan sólo infecciones suaves autocurantes.

Los humanos son considerados hospedadores accidentales, y punto final en la transmisión, pues no van a propagar la bacteria.

3. Métodos de detección y diagnóstico.

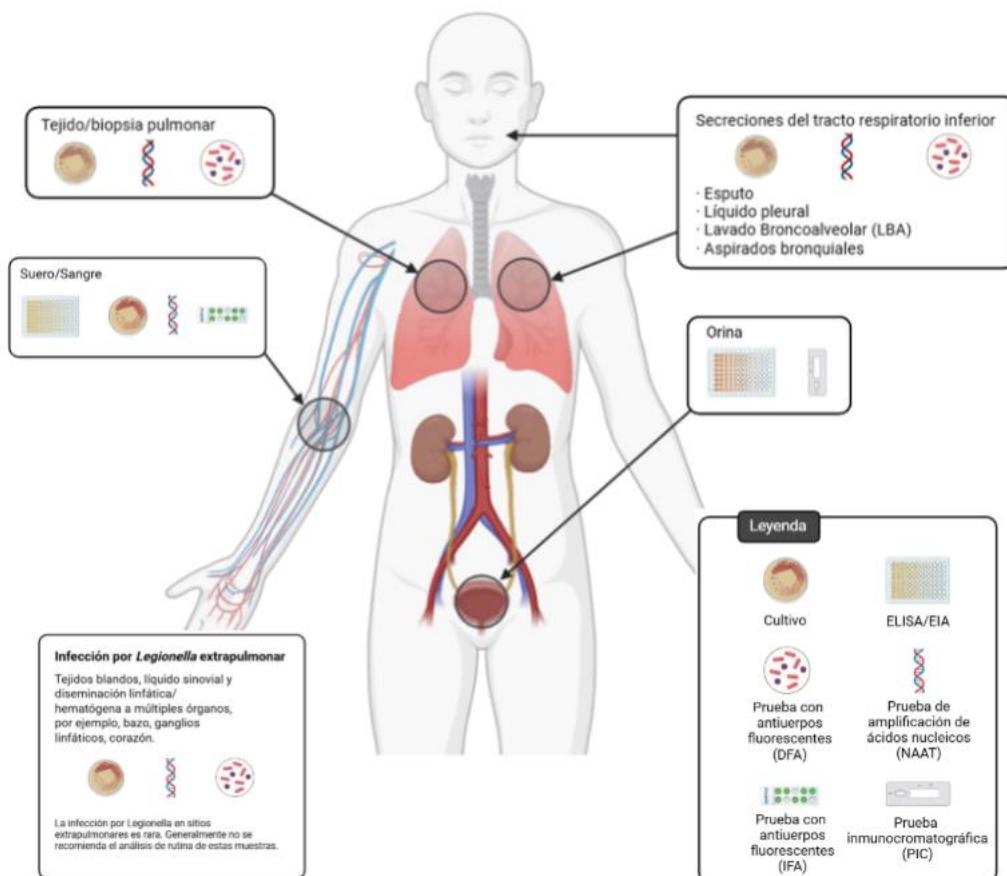


Figura 3. Tipos de muestras, pruebas diagnósticas y localizaciones anatómicas para determinar una infección actual o reciente por *Legionella*. Algunos ensayos pueden aplicarse a varios tipos de muestras, como el cultivo y la amplificación de ácidos nucleicos. En general, el éxito en la detección de *Legionella* depende de la gravedad de la enfermedad, la integridad de la muestra, la competencia técnica del laboratorio y las características específicas de cada prueba. Métodos y tecnologías emergentes recientes, como la espectrometría de masas, también pueden emplearse, aunque puede que no estén ampliamente disponibles o accesibles. La infección por *Legionella* en localizaciones extrapulmonares, como tejidos blandos u órganos (por ejemplo, bazo o corazón), es poco frecuente. Imagen propia. Imagen creada con BioRender, a partir de Mercante & Winchell et al. (2015).

El diagnóstico será prescrito cuando el paciente muestre síntomas clínicos compatibles con legionelosis (fiebre, mialgia, tos y neumonía) o exista algún brote epidemiológico. En la figura 3 se ilustran los principales métodos de diagnóstico. Uno de los test más utilizados, por su rapidez, es el de detección de antígeno en orina (UAT, *urine antigen test*). En la mayoría de los pacientes, 2 o 3 días después de la aparición de síntomas se detectan antígenos de *Legionella* en la orina. La detección se puede hacer mediante la técnica ELISA o mediante un ensayo

immunocromatográfico (ICT, *immunochromatographic test*). La especificidad de estos métodos es superior al 95% y sus sensibilidades varían entre el 70 y el 90%.

Otros métodos frecuentemente utilizados son el cultivo bacteriano y la detección de antígenos de *Legionella* (o la bacteria completa) en secreciones del tracto respiratorio.

El cultivo y aislamiento de *Legionella* se considera la prueba diagnóstica más concluyente (*gold standard*) para el diagnóstico de la legionelosis. Para el cultivo se suelen utilizar muestras procedentes del tracto respiratorio inferior: esputos, fluido pleural y aspirado bronquial.

Los ensayos serológicos diseñados para detectar anticuerpos IgG e IgM frente a *Legionella* tuvieron una gran aplicación para determinar la etiología del brote que tuvo lugar en Filadelfia y se llegó a utilizar para el estudio de otros brotes posteriores. Sin embargo, no es una técnica que tenga mucha utilidad en el diagnóstico clínico habitual, por varias razones. Por un lado, dependiendo de la edad y de la localización geográfica, entre el 1 y el 30% de los individuos sanos tienen títulos significativos de anticuerpos frente a *Legionella*. Por otro lado, no se va a observar un incremento en los niveles de anticuerpos, que sería una prueba de infección activa, hasta pasadas 4-8 semanas de la infección, demasiado tiempo para retrasar el tratamiento.

Las técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos se vienen utilizando desde hace mucho tiempo (mediados de los años 80 del siglo pasado) tanto para el diagnóstico como la tipificación de especie y cepas. Estos métodos son más rápidos y sensibles que las técnicas basadas en el cultivo, pero tienen la desventaja de que no permiten deducir si se trata de restos procedentes de bacterias muertas o de bacterias viables.

Los avances recientes en técnicas diagnósticas han permitido mejorar notablemente la identificación de *Legionella* en muestras clínicas y ambientales. Las pruebas basadas en amplificación de ácidos nucleicos ofrecen una alta sensibilidad y permiten distinguir entre diferentes especies y cepas de *Legionella*, lo cual es especialmente útil en investigaciones de brotes. Además, los métodos combinados que integran cultivo, detección antigenica y técnicas moleculares proporcionan un enfoque más completo, reduciendo el riesgo de falsos negativos y facilitando una respuesta rápida ante casos sospechosos.

Aunque el cultivo sigue siendo el método de referencia para confirmar la infección, su lentitud y la exigencia de condiciones especiales han impulsado el uso creciente de pruebas más rápidas como el test de antígeno urinario y la PCR. Estas herramientas permiten un

diagnóstico temprano que resulta crucial para iniciar el tratamiento adecuado y prevenir complicaciones graves.

4. *Legionella* se multiplica dentro de una vacuola en la célula hospedadora.

La entrada en los macrófagos parece ser mediada por la proteína MOMP (*Major outer membrane protein*) de *L. pneumophila*. MOMP une al componente del complemento C3b y la bacteria es interiorizada a través de la interacción con los receptores del complemento CR1 y CR3.

Un microorganismo que se replica en una vacuola debe enfrentarse a tres importantes problemas:

1. Las estructuras membranosas que se forman a partir de la superficie de la célula normalmente entran en la red lisosomal antimicrobiana, que es un ambiente muy inhóspito.
2. Los microorganismos deben adquirir nutrientes a través de la membrana de la vacuola.
3. Los microorganismos se van a encontrar con limitación de espacio una vez que comienzan a multiplicarse.

L. pneumophila solventa estos problemas secuestrando y modificando este particular compartimento de tal manera que queda fuera del tráfico normal endocítico. Por otro lado, la LCV (*Legionella containing vacuole*) se asocia de forma estrecha al sistema secretor celular, que le va a proveer de nueva membrana para satisfacer las necesidades de una población en crecimiento.

En las figuras 4 y 5 se esquematizan las etapas en la formación de vacuola y su establecimiento como nicho de replicación de *L. pneumophila*.

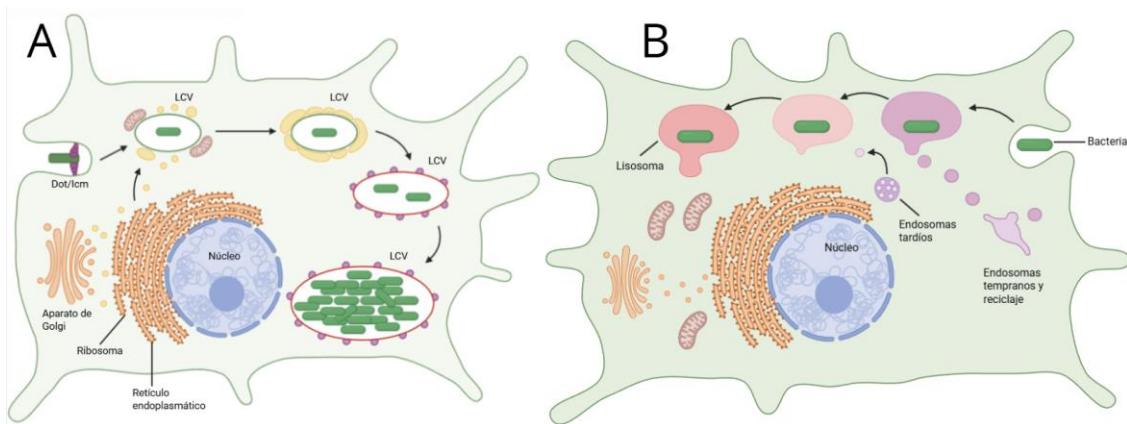


Figura 4. *Legionella pneumophila* modula el transporte de su vacuola para establecer un nicho replicativo.
A) Formación de la vacuola de replicación. Tras ser ingerida por amebas diana o macrófagos, la vacuola que contiene *Legionella* (LCV) evita el transporte hacia la red lisosomal y queda secuestrada en un compartimento distinto al observado en microorganismos no patógenos. A los pocos minutos de la internalización, vesículas derivadas del retículo endoplasmático (RE; compartimentos amarillos) y de las mitocondrias aparecen muy próximas a la superficie de la LCV. Las vesículas que rodean la LCV parecen anclarse y extenderse por su superficie, y finalmente las membranas que rodean a la bacteria adoptan una apariencia similar al RE rugoso y se cubren de ribosomas. Dentro de este compartimento similar al RE, la bacteria se replica en grandes cantidades y finalmente lisa la célula hospedadora. **B)** Ruta por defecto en el transporte de un microorganismo no patógeno. Tras la internalización bacteriana, el compartimento rodeado por membranas adquiere las características de endosomas tempranos y luego de endosomas tardíos, antes de entrar en la red lisosomal. Imagen creada con BioRender, a partir de Isberg et al. (2009).

Una vez que la bacteria es tomada por los macrófagos, la LCV evade el transporte hacia la red lisosomal. Poco después de la entrada (figura 5), una serie de vesículas derivadas del retículo endoplasmático (RE) y mitocondrias se observan en estrecha proximidad a la LCV. Existen datos que implican a la chaperonina HtpB (o HSP60) en el reclutamiento de mitocondrias a las proximidades de la LCV. Su expresión se incrementa tras la entrada en la célula eucariótica y la proteína se acumula en la LCV. Además, la membrana de la LCV adquiere una estructura similar al RE rugoso debido a la asociación de ribosomas con este compartimento. En consecuencia, este compartimento es muy rico en polipéptidos que servirán de fuente de energía para la replicación de la bacteria. Dentro de la LCV la bacteria se multiplica hasta alcanzar grandes números, que terminan lisando a la célula hospedadora.

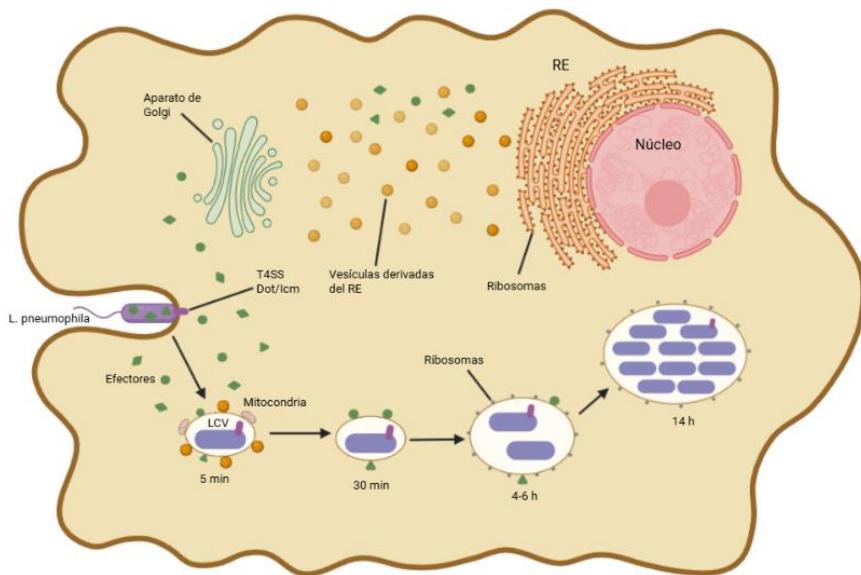


Figura 5. Rutas de transporte de *Legionella pneumophila* en fagocitos. La vacuola que contiene *Legionella* (LCV) evita la fusión con endosomas y remodela rápidamente su membrana fagosómica mediante interacciones estrechas con el retículo endoplásmico (RE), vesículas derivadas del RE y mitocondrias, creando así un compartimento que se asemeja al RE y que permite la supervivencia y replicación intracelular bacteriana. Los efectores de *L. pneumophila* (representados por formas geométricas verdes) inyectados por el T4SS Dot/Icm modulan procesos de la célula hospedadora para permitir la maduración del fagosoma en la LCV. En fases tardías de la infección, la superficie de la LCV expuesta al citoplasma se recubre de ribosomas. Imagen creada con BioRender, a partir de Qui & Luo et al. (2017).

Todos los cambios que conducen a la formación de la LCV, a partir de la vacuola endocítica donde es introducida la bacteria durante la fagocitosis, es mediado por un número importante de moléculas efectoras que son inoculadas al citoplasma de la célula a través del aparato de secreción Dot/Icm.

4.1. La maquinaria Dot/Icm y el tráfico vesicular de la célula hospedadora.

Para la formación de la LCV y el crecimiento de *L. pneumophila* en su interior se requiere de un complejo multiproteico constituido por unas 27 proteínas diferentes (figura 6). Esta estructura está evolutivamente relacionada con los sistemas de secreción tipo IV, encargados de la transferencia conjugativa de DNA entre bacterias.

El sistema de secreción tipo IV Dot/Icm de *Legionella pneumophila* constituye una nanomáquina multiproteica altamente organizada, cuyo núcleo estructural está formado por los componentes DotC, DotD, DotF, DotG y DotH ensamblados en un complejo transmembrana que atraviesa de manera continua la membrana interna y externa de la bacteria. La arquitectura global del sistema revela una disposición estratificada que incluye una cámara periplásmica y una región externa en forma de domo, proporcionando un armazón estable capaz de soportar la translocación de un amplio repertorio de efectores. La integración precisa de sus subunidades y la morfología definida del canal sugieren un mecanismo de secreción especializado, adaptado

para facilitar el transporte eficiente de proteínas hacia el interior de la célula hospedadora durante el proceso infeccioso.

Mutantes de *L. pneumophila*, que carecen de un sistema de secreción Dot/Icm (Defective organelle trafficking/Intracellular multiplication), tras la fagocitosis, son conducidos a compartimentos endosomales/lisosomales en menos de 5 min.

La proteína IcmS, junto con IcmW o, alternativamente, LvgA, está encargada de coordinar la presentación de muchos de los substratos de translocación a la maquinaria de secreción Dot/Icm.

Las proteínas DotL-N constituyen un complejo ATPasa, encargado de aportar la energía necesaria para el proceso de translocación.

Cinco componentes Dot/Icm (DotC, DotD, DotF, DotG y DotH) interaccionan para formar un canal que se extiende a través de las membranas bacterianas interna y externa.

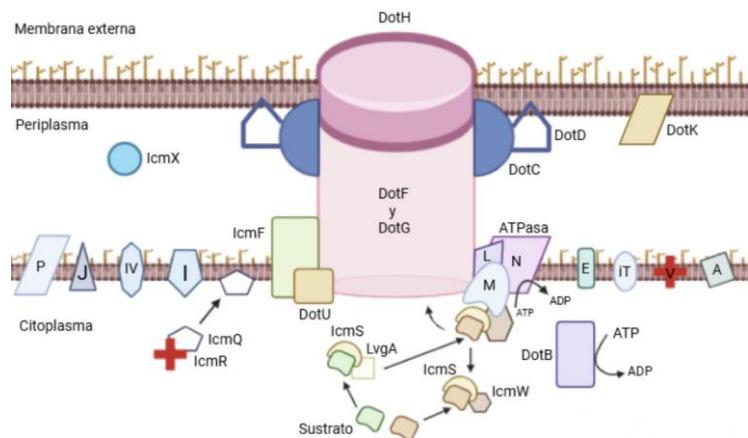


Figura 6. El sistema de translocación Dot/Icm. Las ubicaciones y las relaciones topológicas de los distintos componentes Dot/Icm en la envoltura de *Legionella pneumophila* se muestran basadas en un estudio de la estabilidad de proteínas individuales en presencia de mutaciones de delección definidas. Las letras individuales representan nombres de proteínas Dot, mientras que las letras precedidas por una “I” indican nombres de proteínas Icm. Imagen creada con BioRender, a partir de Isberg et al. (2009).

Hasta el momento, unas 330 proteínas bacterianas se han postulado como candidatos a ser transportados por este sistema de secreción. Muchas de las proteínas bacterianas secretadas se asocian a la membrana de la LCV, promoviendo el reclutamiento de una serie de factores reguladores y efectores de la célula hospedadora (figuras 7 y 8). Muchas de estas proteínas están implicadas en la manipulación del tráfico vesicular. El tráfico vesicular es el responsable del movimiento de moléculas entre los compartimentos celulares. Este proceso, altamente organizado, puede dividirse en dos ramas: la vía secretoria que transporta lípidos y proteínas

desde el RE hasta el aparato de Golgi a través de vesículas que están recubiertas por proteínas adaptadoras específicas. La otra rama es la rama de tráfico endosomal, que se encarga de llevar material internalizado por las células al aparato de Golgi, la membrana plasmática, los endosomas o los lisosomas. Proteínas claves del proceso son:

- Sec22b, cuya función en la célula es la de dirigir las vesículas derivadas del RE hacia el aparato de Golgi.
- Rab1, otra proteína implicada en el tráfico y fusión de vesículas es reclutada a la LCV por su asociación con la proteína bacteriana SidM (DrrA). Las proteínas Rab son GTPasas pequeñas que regulan procesos de transporte vesicular. Rab1 está encargada de dirigir el tráfico de vesículas entre el RE y el aparato de Golgi. Rab1 es una de las primeras proteínas que son reclutadas a la LCV poco después de la infección. Ensayos bioquímicos han mostrado que SidM actúa como GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*). Se ha visto que se une a la forma inactiva (unida a GDP) de Rab1, promoviendo el rápido intercambio de GDP por GTP, lo que conduce a su activación. SidM, además, regula la actividad de Rab1 mediante ‘AMPilación’, lo que bloquea a Rab1 en un estado de continua activación al impedir el acceso de las GAPs al sitio de unión a GDP/GTP. Este estado favorece una continua adquisición de vesículas procedentes del RE. No obstante, existen otras moléculas efectoras (SidD y LepB; figura 8) que se encargan de modular este estado de activación.
- Arf1 (*ADP-ribosylation factor 1*), una GTPasa pequeña que está implicada en la regulación del transporte de vesículas entre el RE y el aparato de Golgi es reclutada a la LCV por RalF. Ensayos bioquímicos han mostrado que RalF actúa como GEF de Arf. La activación de Arf1 promueve el reciclaje de proteínas desde la LCV y el aparato de Golgi de vuelta al RE, lo que permite una continua biogénesis y secreción de vesículas desde el RE, y que resulta clave para la expansión de la LCV.

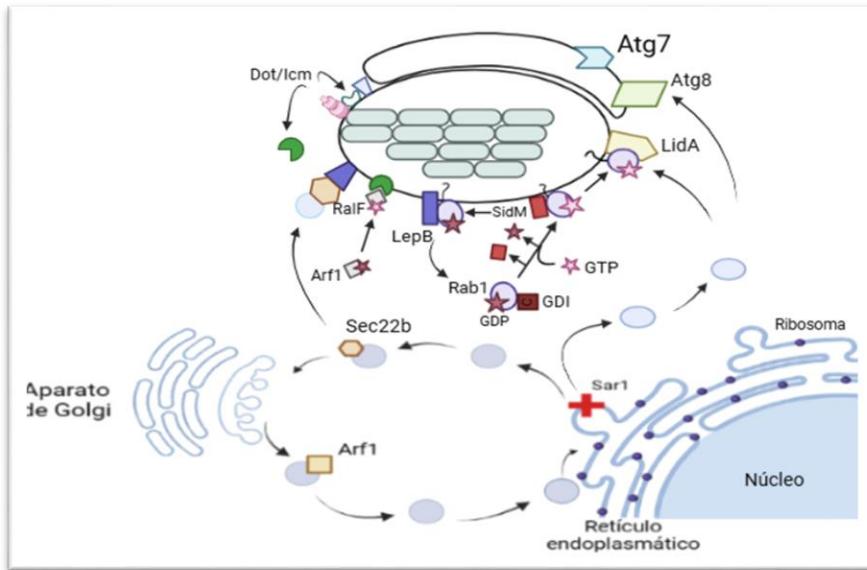


Figura 7. La vacuola que contiene a *Legionella*. Las proteínas de *Legionella* secretadas mediante el sistema Dot/Icm se asocian con la LCV y reclutan proteínas del hospedador que están involucradas en el tráfico vesicular a través de la vía secretora temprana. Sec22b, que participa en el acoplamiento de vesículas derivadas del RE en el Golgi, es reclutado a la LCV, aunque el mecanismo de su reclutamiento no está claro. Rab1, otra proteína de acoplamiento y fusión vesicular es reclutada a la LCV por la proteína SidM (también conocida como DrrA), que funciona como factor de disociación del GDI de Rab1 (inhibidor de la disociación de guanina) y como un factor GEF de Rab1 (factor de intercambio nucleotídico de guanina). LidA actúa junto con SidM para secuestrar Rab1 activado en la membrana de la LCV. LebP es una RabGAP (proteína activadora de Rab GTPasa) y podría estar involucrada en la disociación de Rab1 de la membrana vacuolar. El factor 1 de ADP-ribosilación (Arf1), que participa en la gemación y reciclaje vesicular en el Golgi, es reclutado a la LCV por RalF, que funciona como un GEF de Arf1. El reclutamiento de membranas del hospedador a la LCV podría involucrar un proceso relacionado con la autofagia, ya que también se localizan en la LCV las proteínas de autofagia Atg7 y Atg8. Imagen creada con BioRender, a partir de Isberg et al. (2009).

Por otro lado, hay otras moléculas efectoras cuya misión es evitar que la LCV interaccione con la vía endocítica, que conduciría a la fusión de lisosomas y la destrucción de la bacteria. Así, por ejemplo, la proteína efectora VipD tiene actividad fosfolipasa e hidroliza el fosfatidil-inositol-3-fosfato (PtdIns3P) de las vesículas endocíticas, lo que va a impedir que estas se fusionen a la LCV (figura 8).

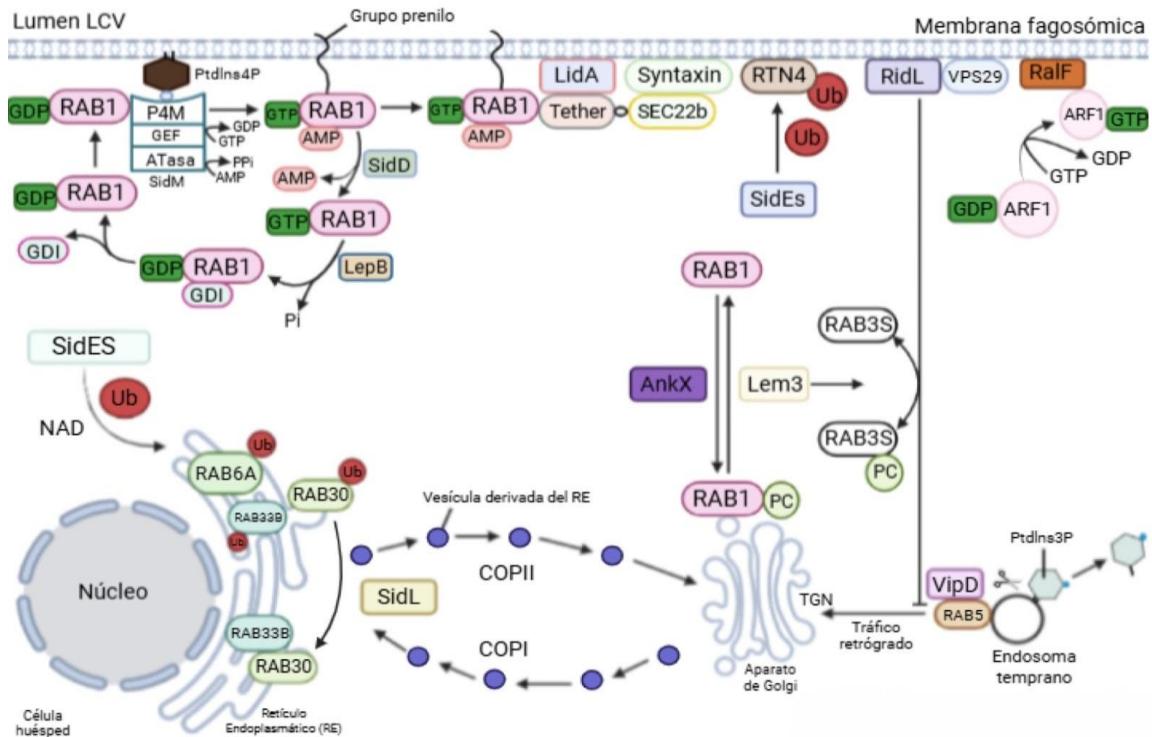


Figura 8. Modulación del tráfico vesicular del hospedador por efectores Dot/Icm de *Legionella*. Los efectores Dot/Icm de *Legionella* manipulan diversas GTPasas y componentes del tráfico vesicular del hospedador para remodelar la vacuola que contiene a la bacteria (LCV). Entre ellos, SidM activa y recluta la GTPasa RAB1, mientras que LidA estabiliza su unión y SidD revierte su modificación para permitir su ciclo normal. Otros efectores como RidL, RalF, AnkX y VipD interfieren en rutas específicas del transporte vesicular (incluyendo tráfico retrógrado, reclutamiento de ARF1, modificación de RAB1 y RAB35, y desactivación de lípidos señalizadores) para desviar vesículas hacia la LCV o bloquear el tráfico celular. Además, la familia Side ubiquitina varias GTPasas asociadas al retículo endoplásmico, modificación que SidJ revierte más tarde. En conjunto, estos efectores reprograman las rutas de transporte del hospedador para favorecer la supervivencia de *Legionella*. Imagen creada con BioRender, a partir de Qiu & Luo et al. (2017).

La proteína efectora SidK impide la acidificación de LCV al inhibir la actividad de la ATPasa vacuolar, que es una bomba de protones. La acidificación de las vesículas endocíticas es un pre-requisito para su entrada en la red lisosomal.

4.1.1. Ubiquitinación no canónica y sistemas miméticos del huésped.

Legionella pneumophila ha desarrollado un conjunto de efectores especializados capaces de modificar el sistema de ubiquitinación del huésped mediante mecanismos completamente distintos a los que emplean las enzimas celulares. Entre ellos destaca la familia SidE (SidE, SdeA, SdeB, SdeC), cuyo mecanismo de acción constituye un sistema de ubiquitinación no canónica. Estos efectores catalizan una reacción en dos pasos que implica primero la ADP-ribosilación de la ubiquitina y posteriormente la transferencia del grupo fosforibosilo-ubiquitina al sustrato, un proceso que no requiere las enzimas E1 ni E2 del huésped. Este tipo de modificación genera enlaces atípicos y confiere a *Legionella* la capacidad de ubiquitinuar proteínas del hospedador de manera independiente de la maquinaria

convencional, alterando su función y su estabilidad. El uso de esta vía alternativa proporciona ventajas claras durante la infección, permitiendo a la bacteria introducir modificaciones rápidas y difíciles de revertir, y creando formas de ubiquitina que no se integran en las rutas habituales de reconocimiento y procesamiento celular.

4.1.2. Metaefectores.

En los últimos años se ha caracterizado un subgrupo particular de proteínas llamadas metaefectores, que son efectores bacterianos cuyo blanco no es la célula huésped, sino otros efectores de *Legionella*. Su función es modular, apagar o revertir la actividad de efectores previos cuando ya no son necesarios o cuando un exceso de actividad resultaría perjudicial para la LCV.

Un ejemplo sería LubX, una ligasa E3-U-box que se dirige específicamente a SidH, otro efecto de *Legionella*. LubX promueve la ubiquitinación proteica de SidH, lo que conduce a su degradación por el proteasoma del huésped. Este mecanismo permite a *Legionella* controlar temporalmente los niveles de SidH: LubX aparece más tarde durante la infección para “apagar” SidH cuando su actividad ya no es deseable.

Es decir, los metaefectores actúan como reguladores finos dentro de la red de efectores de *Legionella*, asegurándose de que la actividad de ciertos efectores no se descontrola y mantenga un equilibrio adaptado a las diferentes fases de la infección.

4.2. Modulación del sistema de autofagia por parte de Legionella.

La autofagia es un proceso celular que inicialmente se asoció a la supervivencia celular en momentos de falta de nutrientes. Posteriormente se han ido añadiendo otras funciones relevantes. Por ejemplo, la autofagia se considera como uno de los primeros sistemas de defensa desarrollados por las células eucarióticas para combatir a los patógenos intracelulares. Así, en los mamíferos, ya forma parte del sistema de inmunidad innata como mecanismo de defensa frente a infecciones intracelulares. Y que conectaría la inmunidad innata con la adquirida, dado que en el proceso de destrucción del patógeno se generan péptidos que van a ser presentados en el contexto de moléculas MHC-II para la activación de linfocitos específicos frente al patógeno.

El reconocimiento de moléculas propias de las bacterias parece actuar de desencadenante del proceso de autofagia. Así, por ejemplo, el reconocimiento del lipopolisacárido (LPS) bacteriano por la molécula TLR4 desencadena la autofagia a través del

reclutamiento de la proteína Beclin a determinados puntos de la membrana del RE, donde va a interaccionar con las proteínas VPS15 y VPS34 del complejo PI3K (figura 9). La activación de PI3K conduce a generar un subdominio rico en PI3P llamado omegasoma. A continuación, la conjugación de proteínas ATG8 (LC3-I en el ejemplo mostrado en la figura 9) al lípido fosfatidiletanolamina (PE) va a promover la morfogénesis de la ‘copa’ autofágica, que finalmente terminará rodeando al patógeno invasor y cerrándose para favorecer la subsiguiente destrucción proteolítica del mismo.

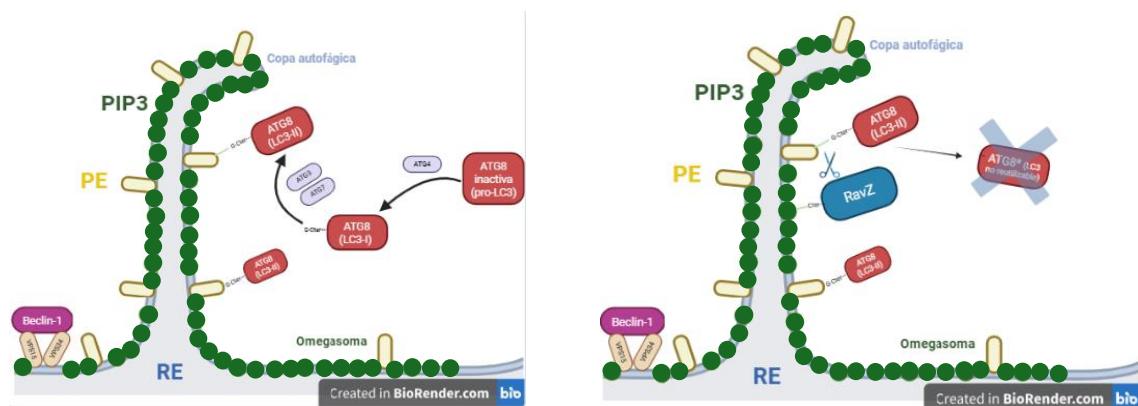


Figura 9. Biogénesis del autofagosoma y su inhibición por *Legionella pneumophila*. (Izquierda) Representación esquemática de la biogénesis del autofagosoma. Beclin-1 se asocia con VPS15 y VPS34, del complejo PI3K, en dominios específicos de la membrana del retículo endoplasmático (RE), donde genera microdominios enriquecidos en PIP3 conocidos como omegasomas. En estos sitios se inicia la formación de la copa autofágica. La maduración de la membrana aislante requiere la conjugación de proteínas ATG8 (conocido también como LC3-I) al lípido fosfatidiletanolamina (PE). Para ello, la forma inactiva de ATG8 (pro-LC3) es primero procesada por ATG4 para exponer la glicina C-terminal, necesaria para conjugararse con PE. Posteriormente, la maquinaria de conjugación dependiente de ATG7 y ATG3 cataliza la unión covalente de ATG8 a PE, produciendo LC3-II, esencial para la elongación y cierre de la membrana autofágica. (Derecha) Mecanismo de inhibición de la biogénesis autofágica por *L. pneumophila* a través del efecto RavZ. Esta cisteína proteasa bacteriana reconoce ATG8 conjugado a PE en la membrana naciente y lo escinde para generar una forma irreversiblemente deslipidada que no puede reincorporarse al proceso de autofagia. De este modo, RavZ bloquea la elongación de la membrana aislante y su maduración hacia un autofagosoma funcional. Imágenes creadas con Biorender, a partir de Sherwood y Roy (2016).

Una búsqueda intensiva de proteínas de la bacteria con capacidad para inhibir el proceso de autofagia condujo al descubrimiento de la proteína RavZ, expresada de forma ectópica en células de mamífero, es suficiente para bloquear la autofagia celular durante la infección. Se ha demostrado que RavZ tiene actividad desconjugante y es capaz de retirar las proteínas ATG8 unidas a membrana mediante lipidación (figura 9). Es una proteasa que actúa de forma muy específica que rompe la proteína justo por arriba del punto de unión de ATG8 a su lípido conjugado (figura 9). RavZ solo es activa frente a las proteínas ATG8 que están asociadas a la membrana mediante lipidación, como consecuencia de la activación de maquinaria de conjugación del proceso de autofagia.

La estructura de la proteína RavZ cristalizada se ha resuelto recientemente, y en ella se distinguen dos dominios (figura 10). El dominio de unión a ATG8 se localiza en la región amino-terminal, y en la parte C-terminal se encuentra el dominio de unión a PI3P. Se piensa que es a través de este segundo dominio por el que RavZ interacciona con la membrana a través de PI3P, experimentando entonces un cambio conformacional que permite el reconocimiento de la proteína ATG8 lipidada y que conduce a su rotura proteolítica. En resumen, RavZ es una enzima muy sofisticada que está diseñada para bloquear la autofagia en la célula hospedadora a través de una desconjugación irreversible de ATG8.

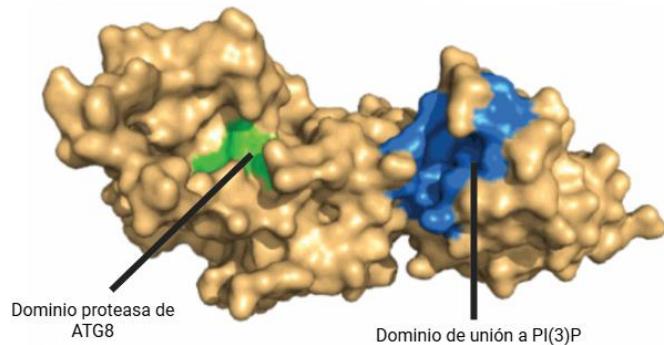


Figura 10. La estructura cristalina de RavZ. La estructura de RavZ se muestra con la superficie que interactúa con la membrana del retículo endoplásmico. Los residuos catalíticos del dominio proteasa que rompe ATG8 están coloreados en verde y los residuos del bolsillo de unión a PI(3)P en azul. Imagen adaptada de Sherwood & Roy (2016).

Aunque la proteína RavZ, expresada de forma ectópica en las células, es capaz de bloquear la autofagia frente a la bacteria, mutantes de *L. pneumophila* deficientes en RavZ son capaces de replicarse intracelularmente. Esto sugiere que, además de RavZ, *Legionella* debe contar con otros mecanismos para bloquear la autofagia.

Una proteína efectora, LpSpl, también se ha visto que es capaz de inhibir la autofagia inducida por falta de nutrientes. La proteína parece estar implicada en la regulación de los niveles de esfingosina, molécula que actúa de señalización para diversos procesos celulares. Pero, de nuevo, mutantes de *L. pneumophila* deficientes en RavZ y LpSpl, siguen manteniendo la capacidad de replicarse intracelularmente, lo que indica que la bacteria debe tener otras proteínas adicionales destinadas a evadir la autofagia.

4.3. Inhibición de la apoptosis de la célula hospedadora.

Además de la modificación del tráfico vesicular y del proceso de autofagia, otra función del sistema de secreción Dot/Icm es la de aumentar la supervivencia de la célula hospedadora. Como el éxito replicativo de la *L. pneumophila* requiere de una célula hospedadora viva, la bacteria posee mecanismos encargados de asegurar la supervivencia de la célula hospedadora frente a los efectos deletéreos de los productos microbianos tóxicos y del ataque del sistema inmunitario.

Se ha visto que *L. pneumophila* va a interferir con el proceso de muerte celular a través de mecanismos que requieren del sistema de secreción Dot/Icm (figura 11). Ante una infección bacteriana, las células de mamíferos tienden a desencadenar un proceso de muerte celular como medio de impedir la replicación del patógeno. Sólo algunos de los factores secretados por *L. pneumophila* para interferir con el proceso apoptótico han sido identificados. Uno de estos factores es SdhA, que parece ejercer un efecto inhibidor de la apoptosis actuando a múltiples niveles. La importancia de esta proteína queda demostrada en el hecho de que un mutante deficiente en el correspondiente gen va a inducir una muerte celular poco después de la entrada en la célula hospedadora.

Por otro lado, a través de un efecto no caracterizado, *L. pneumophila* va a activar al factor transcripcional NF-κB del hospedador para promover la expresión de proteínas anti-apoptóticas, que van a retrasar la muerte celular (figura 11).

En fases avanzadas de la infección, SidF inhibe la vía apoptótica interfiriendo con las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl2 (en concreto, las proteínas BNIP3 y Bcl-rambo).

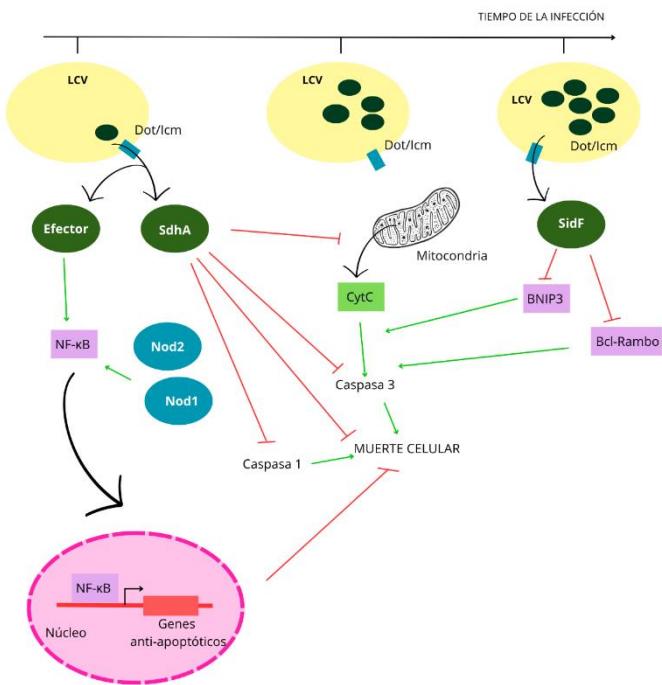


Figura 11. Mecanismos de *Legionella pneumophila* para inhibir la apoptosis de la célula hospedadora durante la infección. Tras la internalización en la célula hospedadora, *L. pneumophila* establece una vacuola replicativa (LCV) mediante su sistema de secreción Dot/Icm. Aunque el contacto inicial con la bacteria activa rutas celulares que amenazan con inducir muerte celular, *L. pneumophila* despliega diversos efectores para contrarrestarlas y asegurar su replicación intracelular. Durante las primeras fases de la infección, el efecto SdhA bloquea múltiples vías proapoptóticas y contribuye al mantenimiento de la integridad de la LCV. Paralelamente, la activación de los receptores Nod1 y Nod2 conduce a la activación de NF-κB, lo que promueve la expresión de genes antiapoptóticos en el núcleo y retraza la muerte celular del hospedador. En etapas tardías, el efecto SidF interfiere directamente con proteínas pro-muerte de la familia Bcl-2, como BNIP3 y Bcl-Rambo, inhibiendo la liberación mitocondrial de citocromo c y la activación de caspasas efectoras. De este modo, *L. pneumophila* suprime tanto rutas intrínsecas como extrínsecas de apoptosis, permitiendo una prolongada supervivencia celular y la expansión bacteriana dentro de la LCV. Imagen creada con BioRender, a partir de Isberg et al. (2009).

5. Invasión de protozoos por *L. pneumophila*.

El patógeno *L. pneumophila* se encuentra ampliamente distribuido en ambientes de agua fresca donde se replica en el interior de protozoos de vida libre; hasta el momento se ha encontrado que son capaces de multiplicarse en 14 especies de ameba, tal como *Acanthamoeba castellanii*, y en 2 especies de protozoos ciliados. La bacteria, una vez fagocitada por protozoos que se alimentan de bacterias, es capaz de impedir su destrucción y multiplicarse en el interior de sus presuntos depredadores.

Cuando es inhalado por los humanos, puede replicarse dentro de macrófagos alveolares y, si la respuesta inmunitaria no es lo suficientemente fuerte, causar una neumonía grave. Así, se trata de un patógeno oportunista de humanos, que probablemente evolucionó para sobrevivir en el interior de protozoos, y que encuentra en los macrófagos alveolares un nicho ecológico similar al que tiene dentro de los protozoos.

Dado que *L. pneumophila* no es capaz de expandirse de persona a persona, los humanos no han desempeñado un parte importante en la evolución de su virulencia. Este hecho ha llevado a generar un nuevo precepto en microbiología: una bacteria parásita de protozoos puede emplear los mismos mecanismos para infectar a humanos. Así, el crecimiento intracelular de *L. pneumophila* dentro de protozoos acuáticos parece haber generado un conjunto de factores de virulencia a lo largo de la evolución que preadaptaron a esta bacteria para también infectar células humanas. De hecho, los ciclos biológicos en la ameba y en los macrófagos son muy parecidos.

En fuentes naturales de agua fresca, *L. pneumophila* reside fundamentalmente en comunidades de “biofilms”, donde es presa de las amebas que se alimentan de bacterias. Una vez ingerida, el microbio puede resistir el proceso de digestión, multiplicándose activamente hasta provocar la muerte del hospedador, volviendo así al medio ambiente. Como consecuencia de este tránsito entre las células fagocíticas y el agua, el ciclo de *L. pneumophila* consta de dos formas: la forma replicativa y la forma de transmisión, que es flagelada (figura 12).

Cuando las condiciones son favorables para la replicación (la bacteria se encuentra en una vacuola rica en nutrientes), se activan los genes implicados en la multiplicación de la bacteria. Cuando los nutrientes de la vacuola comienzan a escasear, las bacterias se diferencian en la fase de transmisión, donde se para la multiplicación y se comienzan a expresar las funciones que le van a permitir salir de la célula hospedadora y sobrevivir en el medio acuático (motilidad, resistencia a luz ultravioleta y presión osmótica, etc.) hasta poder establecer de nuevo un nicho replicativo en un nuevo fagocito (figura 12). Las formas de transmisión desarrollan un largo flagelo y presentan citotoxicidad, con capacidad de lisar las membranas de la célula hospedadora. Dos proteínas, LepA y LepB, secretadas por el sistema Dot/Icm, se han visto que son necesarias para la liberación de las bacterias de los hospedadores protozoos, pero no para la salida de los hospedadores mamíferos. Se ha sugerido que estas proteínas van a favorecer un mecanismo exocítico (no lítico) que implica la fusión de la vacuola que contiene a *L. pneumophila* con la membrana plasmática de la célula hospedadora. Esto refleja su adaptación evolutiva con su célula hospedadora, a la que parece no querer lisar.

Las formas liberadas, conocidas como MIF (*mature intracellular form*), son especialmente infecciosas para nuevos fagocitos. Si *L. pneumophila* no encuentra inmediatamente un nuevo fagocito, se instala en biofilms en sistemas acuáticos y charcas,

donde son capaces de resistir a los agentes biocidas empleados habitualmente para el tratamiento de aguas (figura 12).

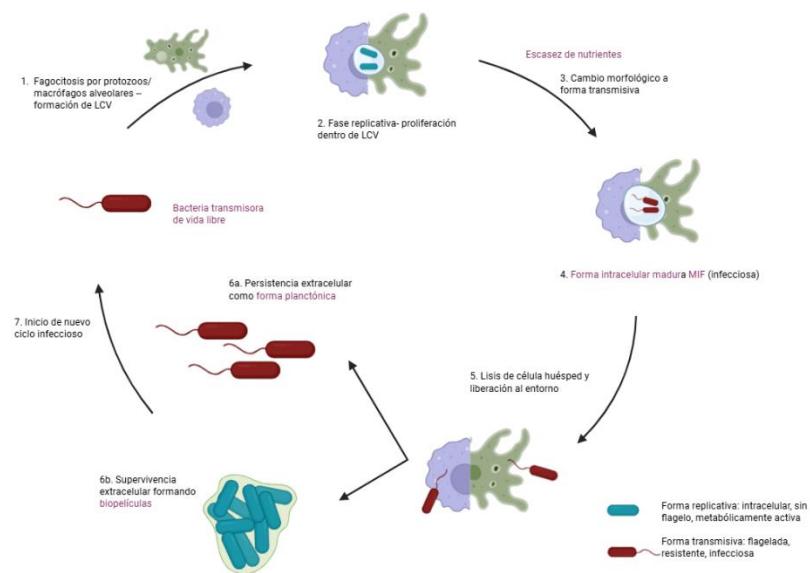


Figura 12. Ciclo de vida de *Legionella pneumophila* y transición entre sus estados morfológicos. Esquema general de los eventos clave y las formas morfológicas adoptadas por *L. pneumophila* durante su ciclo de vida. **1)** La bacteria es fagocitada por protozoos o macrófagos alveolares, formándose la vacuola que contiene *Legionella* (LCV). **2)** Tras la internalización, la bacteria evita la fusión fagolisosomal y entra en una fase replicativa en el interior de la LCV, carente de flagelo y metabólicamente activa. **3)** La escasez de nutrientes activa una respuesta que desencadena la transición hacia la forma de transmisión **4)**, caracterizada por la aparición de un flagelo, mayor resistencia y citotoxicidad. **5)** La forma madura intracelular (MIF) es capaz de lisar la membrana vacuolar y salir al medio extracelular. Una vez liberadas, las bacterias transmisivas pueden **7)** iniciar un nuevo ciclo infeccioso o **6a)** persistir como forma planctónica en el ambiente. **6b)** Alternativamente, *L. pneumophila* puede integrarse en biopelículas presentes tanto en hábitats acuáticos naturales como en sistemas artificiales. Imagen creada con BioRender, a partir de Olivia et al. (2009).

En medio rico, la bacteria establece una curva de crecimiento bifásico, que mimetiza los estadios de forma replicativa (durante la fase logarítmica) y de transmisión (fase estacionaria). Las formas replicativas no son móviles y tienen una morfología alargada. Las formas de transmisión son más pequeñas y redondeadas, y presentan paredes celulares más gruesas. Estas formas no se replican, pero acumulan en su citoplasma unos gránulos de polihidroxibutirato (PHB, *poly-3-hydroxybutyrate*). El PHB es una fuente de carbono que la bacteria utiliza para sobrevivir durante períodos prolongados en el medio ambiente.

Una molécula importante en la señalización para el cambio de fase es el (p)ppGpp, conocido como alarmona. Cuando la fuente de nutrientes comienza a disminuir, *L. pneumophila* acumula (p)ppGpp. En respuesta a un aumento de tRNAs no cargados, la sintasa RelA, que está asociada al ribosoma, convierte GTP en (p)ppGpp. También la enzima SpoT es capaz de sintetizar esta alarmona en respuesta a la falta de ácidos grasos. El (p)ppGpp, a su vez, va a interaccionar con el factor sigma predominante o habitual (σ^D o σ^{70}), desestabilizando

su unión al “core” de la RNA polimerasa. Como consecuencia, una serie de factores sigma alternativos (entre ellos RpoS) pueden ahora interaccionar con la RNA polimerasa, dirigiéndola a las regiones promotoras de los genes que van a expresar los determinantes asociados a la fase de transmisión (figura 13).

Además, (p)ppGpp activa al sistema de dos componentes LetA/LetS, que van a inducir la transcripción de tres RNAs cortos (RsmZ, RsmX y RsmY), que actúan como “esponjas” para secuestrar a la proteína de unión a RNA, cuya función es la de reprimir la expresión de las proteínas implicadas en los caracteres relacionados con la virulencia y la movilidad de las bacterias (figura 13).

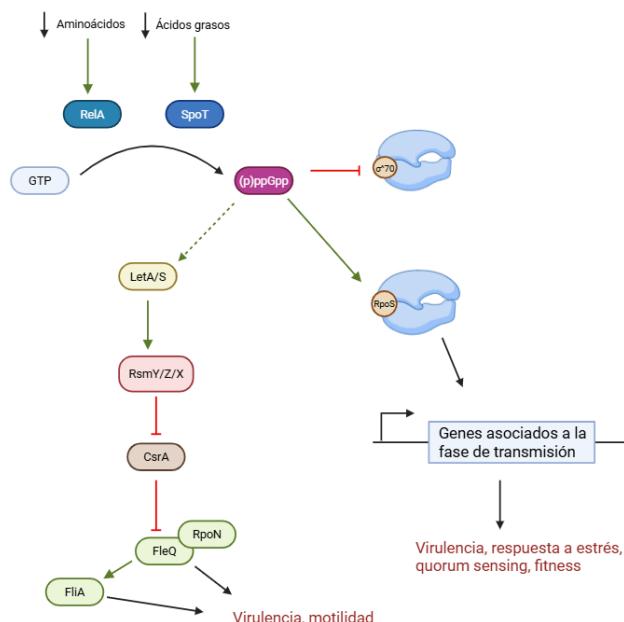


Figura 13. Red reguladora de la respuesta que controla la diferenciación de *Legionella pneumophila* hacia su forma de transmisión. La escasez de aminoácidos y ácidos grasos activa a las proteínas RelA y SpoT, que catalizan la síntesis del alarmón (p)ppGpp. La acumulación de este nucleótido señala la activación del factor sigma de estrés RpoS y del sistema de dos componentes LetA/LetS, lo que induce la transcripción de los ARN pequeños reguladores RsmY, RsmZ y RsmX. Estos sRNAs funcionan como “esponjas” que secuestran al regulador post-transcripcional CsrA, aliviando su represión sobre factores clave de virulencia y motilidad como RpoN, FleQ y FliA. La reorganización de esta red reguladora impulsa la transición hacia el estado transmisible de *L. pneumophila*, caracterizado por un aumento de la virulencia, la capacidad de respuesta al estrés, y al quorum sensing. Las flechas discontinuas indican interacciones propuestas, pero aún no completamente demostradas. Imagen creada con BioRender, a partir de Oliva et al. (2018).

6. Referencias

- Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., and Buchrieser, C.** (2007). *Legionella pneumophila* - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 432-448.
- Durie, C.L., Sheedlo, M.J., Chung, J.M., Byrne, B.G., Su, M., Knight, T., Swanson, M., Lacy, D.B. and Ohi, M.** (2020). Structural analysis of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm type IV secretion system core complex. *eLife* 9: e59530.
- Fields, B.S., Benson, R.F. and Besser, R.E.** (2002). *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 506-526.
- Isberg, R.R., O'Connor, T.J. and Heidtman, M.** (2009). The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:13-24.
- Kitao, T., Nagai, H. and Kubori, T.** (2020). Divergence of *Legionella* effectors reversing conventional and unconventional ubiquitination. *Microbiology* 166: 1–13.
- Luo, J., Wang, L., Song, L. and Luo, Z.-Q.** (2021). Exploitation of the host ubiquitin system: means by *Legionella pneumophila*. *Front. Microbiol.* 12: 790442.
- Mercante, J.W. and Winchell, J.M.** (2015). Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clin. Microbiol. Rev* 28: 95-133.
- Molofsky, A.B. and Swanson, M.S.** (2004). Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol. Microbiol.* 53: 29-40.
- Newton, H.J., Ang, D.K.Y., van Driel, I.R. and Hartland, E.L.** (2010). Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin. Microbiol. Rev.* 23: 274-298.
- Qiu, J. and Luo, Z.Q.** (2017). Legionella and Coxiella effectors: strength in diversity and activity. *Nat Rev Microbiol* 15: 591-605.
- Jeong, M., Jeon, H., & Shin, D.** (2022). Ubiquitin-regulating effector proteins from Legionella. *BMB reports*, 55(7), 316–322.
- Oliva, G., Sahr, T. and Buchrieser, C.** (2018). The Life Cycle of *L. pneumophila*: Cellular Differentiation Is Linked to Virulence and Metabolism. *Front. Cel. Infect. Microbiol.* 8: 3
- Sherwood, R.K. and Roy, C.R.** (2016). Autophagy Evasion and Endoplasmic Reticulum Subversion: The Yin and Yang of Legionella Intracellular Infection. *Annu Rev Microbiol* 70: 413-433.

En la Internet.

<http://youtu.be/swr9zW065kc> [Video histórico sobre el brote de legionelosis que llevó a la identificación del agente causante]