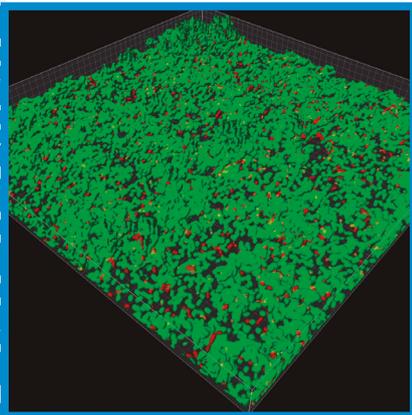
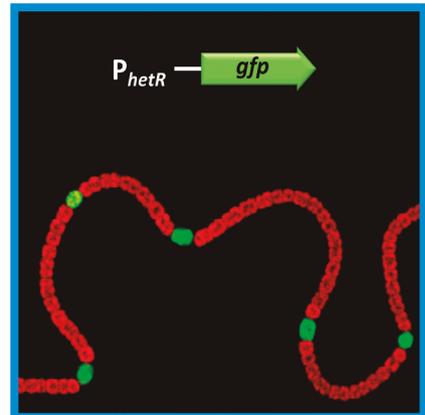
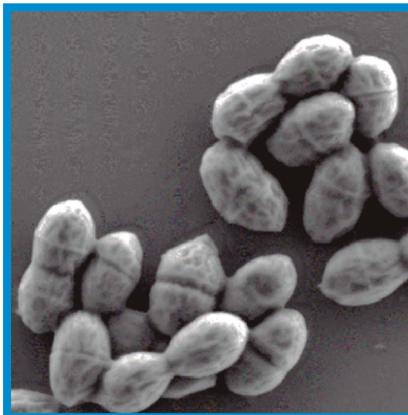
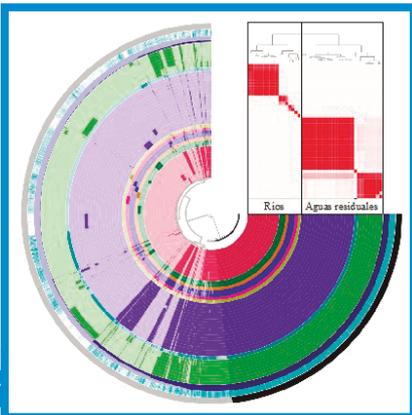


# SEM@foro

Revista de la Sociedad Española de Microbiología

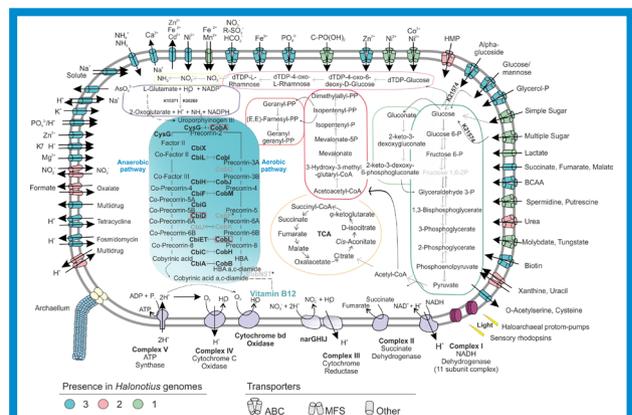
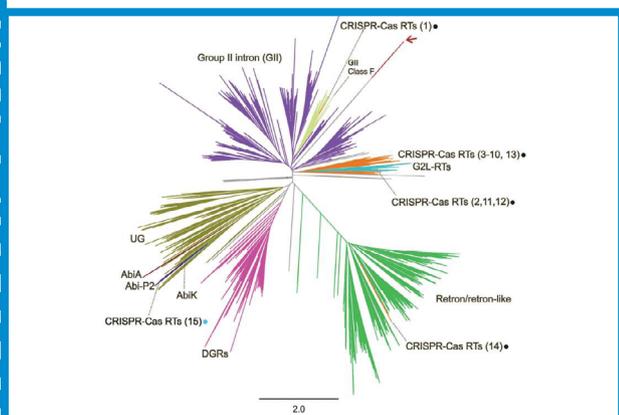
DICIEMBRE 2019

N.º 68



## 25 años del grupo de MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

www.semicrobiologia.org



LISTERIOSIS EN ESPAÑA

## Presidente

Antonio Ventosa Uchero

Dpto. Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia.  
Universidad de Sevilla.  
C/ Prof. García González, 2. 41012 Sevilla.  
ventosa@us.es

## Vice-Presidente

Rafael Giraldo Suárez

Laboratorio de Amiloides Bacterianos Sintéticos  
Departamento de Biotecnología Microbiana  
Centro Nacional de Biotecnología. CNB-CSIC  
C/ Darwin nº 3, 28049 Madrid  
rgiraldo@cnb.csic.es

## Secretario

Juan Alfonso Ayala Serrano

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.  
CSIC-Universidad Autónoma de Madrid.  
C/ Nicolás Cabrera, 1. 28043 Madrid.  
jayala@cbm.csic.es

## Secretaría Electa

Alicia Prieto Orzanco

Centro de Investigaciones Biológicas  
CSIC. C/Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid

## Tesorero

Víctor Jiménez Cid

Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia.  
Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid.  
vicjid@ucm.es

## Editores de publicaciones

### International Microbiology

José Berenguer

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.  
Departamento de Biología Molecular.  
CSIC-Universidad Autónoma de Madrid.  
C/ Nicolás Cabrera, 1. 28043 Madrid.  
jberenguer@cbm.uam.es

### SEM@foro

Manuel Sánchez Angulo

Departamento de Producción Vegetal y Microbiología.  
Universidad Miguel Hernández.  
03202 Elche (Alicante).  
m.sanchez@umh.es

### NoticiaSEM

Inmaculada Llamas Company

Departamento de Microbiología.  
Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.  
Campus de Cartuja. 18071 Granada.  
illamas@ugr.es

## Directora de la Colección Española de Cultivos Tipo

Rosa Aznar Novella

Dpto. Microbiología y Ecología.  
Facultad de Ciencias Biológicas. Univ. de Valencia.  
C/ Dr. Moliner 50. 46100 Burjassot (València).  
rosa.aznar@uv.es

## Responsable Cursos de Formación Continua on-line

Diego Alejandro Moreno Gómez

Universidad Politécnica de Madrid.  
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales.  
José Gutiérrez Abascal, 2. E-28006 Madrid.  
diego.moreno@upm.es

## Vocales

M<sup>a</sup> José Figueras Salvat

Unitat de Biologia i Microbiologia. Facultat de Medicina i  
Ciències de la Salut. Universitat Rovira i Virgili.  
C/ Sant Llorenç, 21. E-43201 Reus (Tarragona).  
mariajose.figueras@urv.cat

Inés Arana Basabe

Dpto. de Inmunología, Microbiología y Parasitología.  
Facultad de Ciencias y Tecnología.  
Universidad del País Vasco (UPV/EHU).  
C/ Barrio Sarriena s/n. E-48940 Leioa (Bizkaia).  
ines.arana@ehu.es

Montserrat Llagostera Casas

Dpto. de Genètica i Microbiologia. Universitat Autònoma  
de Barcelona. Cerdanyola del Vallès. 08193 Barcelona.  
montserrat.llagostera@uab.cat

Ignacio Belda Aguilar

Unidad de Biodiversidad y Conservación  
Departamento de Biología y Geología, Física  
y Química Inorgánica  
Universidad Rey Juan Carlos  
28933-Mostoles, Madrid.  
ignacio.belda@urjc.es

## Presidentes de Grupos

### Biodeterioro, Biodegradación y Biorremediación

Ana M. García Ruiz

Universidad Politécnica de Madrid.  
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales.  
C/ José Gutiérrez Abascal, 2 - 28006 Madrid.  
ana.garcia.ruiz@upm.es

### Hongos Filamentosos y Levaduras (Micología)

Humberto Martín Brieva

Dpto. Microbiología II. Facultad de Farmacia.  
Universidad Complutense.  
Pza. Ramón y Cajal s/n. 28040 Madrid.  
humberto@ucm.es

### Biología de Microorganismos Patógenos

Oscar Zaragoza

Centro Nacional de Microbiología. Servicio Micología.  
Ctra. Majadahonda-Pozuelo, km. 2.  
28220 Majadahonda-Madrid.  
E-mail: ozaragoza@isciii.es

### Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana

José Antonio Gil Santos

Dpto. Biología Molecular. Facultad Biología.  
Universidad de León. 24004 León.  
jose.a.gil@unileon.es

### Microbiología de los Alimentos

Gonzalo García de Fernando Minguillón

Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología  
de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, UCM.  
Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040 Madrid.  
e-mail: mingui@vet.ucm.es

### Microbiología Molecular

Adela González de la Campa

CSIC-ISCIII, Centro Nacional de Microbiología.  
Cta. Pozuelo km. 2. 28220 Majadahonda (Madrid)  
agcampa@isciii.es

### Microbiología del Medio Acuático

Alicia Estévez Toranzo

Departamento de Microbiología.  
Facultad de Biología / CIBUS.  
Universidad de Santiago de Compostela.  
Campus Universitario Sur, s/n.  
15782 Santiago de Compostela - (A Coruña).  
alicia.estevez.toranzo@usc.es

### Microbiología de Plantas

Emilia López Solanilla

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP).  
Dpto Biotecnología-Biología Vegetal. ETSIAAB.  
Campus Montegancedo  
Universidad Politécnica de Madrid  
28223 Pozuelo de Alarcón  
emilia.lopez@upm.es

### Protistología

Ana Martín González

Dpto. Microbiología III. Facultad de Biología.  
Universidad Complutense.  
C/ José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid.  
anamarti@bio.ucm.es

### Taxonomía, Filogenia y Diversidad

Jesús López Romalde

Dpto. Microbiología y Parasitología.  
Facultad de Farmacia. Univ. de Santiago de Compostela.  
15706 Santiago de Compostela (A Coruña).  
jesus.romalde@usc.es

### Docencia y Difusión de la Microbiología

Inés Arana Basabe

Dpto. de Inmunología, Microbiología y Parasitología.  
Facultad de Ciencias y Tecnología.  
Universidad del País Vasco (UPV/EHU).  
C/ Barrio Sarriena s/n. E-48940 Leioa (Bizkaia).  
ines.arana@ehu.es

**SEM@foro** es una publicación semestral de la **Sociedad Española de Microbiología (SEM)**

Director: **Manuel Sánchez Angulo**. E-mail: [m.sanchez@umh.es](mailto:m.sanchez@umh.es).

Co-editor de la Sección de Microbiología Molecular: **Adela González de la Campa**

Webmaster de la SEM: **Jordi Urmeneta Masó**. E-mail: [jurmeneta@ub.edu](mailto:jurmeneta@ub.edu). Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Avda. Diagonal, 645. E-08028 Barcelona.

La SEM y el Director no comparten necesariamente las opiniones que puedan aparecer en artículos, informaciones o cartas enviados por los socios, ni se responsabilizan de su veracidad.

ISSN: 2254-4399

Depósito Legal: M-12838-2013

Maquetación e Impresión: **Diseño y Control Gráfico, S.L.**. Tel.: 91 731 05 13.

E-mail: [info.dcg@design2aa.com](mailto:info.dcg@design2aa.com) • [www.design-2aa.com](http://www.design-2aa.com)

[www.semicrobiologia.org/sec/SEM@FORO](http://www.semicrobiologia.org/sec/SEM@FORO)

# SUMARIO

SEM@FORO

NUM. 68 | DICIEMBRE 2019



Collage realizado a partir de las imágenes de los diferentes artículos de los miembros del Grupo de Microbiología Molecular.

Visite la página web de la SEM:  
[www.sem@microbiologia.org](http://www.sem@microbiologia.org)  
Encontrará información actualizada sobre congresos, reuniones, cursos y becas

## Socios protectores de la SEM:

Francisco Soria Melguizo, S.A.



Fundación Medina



Para solicitar más información, inscripciones o publicidad, diríjase a la Secretaría de la

**Sociedad Española de Microbiología**

CIB-CSIC

c/ Ramiro de Maeztu, 9

28040-Madrid

Tel.: 686716508

[secretaria.sem@sem@microbiologia.org](mailto:secretaria.sem@sem@microbiologia.org)

## NOTA DEL PRESIDENTE

Antonio Ventosa ..... 2

## NUESTROS GRUPOS

Informes de los grupos especializados ..... 4

## ARTÍCULOS

Alerta sanitaria por listeriosis en España. Enfoques preventivos basados en un esquema de Evaluación de Riesgos ..... 7  
"El jarabe de la calle Relator (Barrio de La Macarena, Sevilla) para aliviar la tosferina" ..... 11

## REUNIONES Y CONGRESOS

2<sup>nd</sup> International Meeting on New Strategies in Bioremediation Processes-BioRemid-2019 .... 15  
REDESMI en marcha: progresando en la conservación y revalorización de los recursos genéticos españoles ..... 17

## ESPECIAL 25 AÑOS DEL GRUPO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

- 25 años del grupo de Microbiología Molecular ..... 19
- Bases moleculares de la acción de antimicrobianos en estreptococos ..... 21
- Grupo de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Biosanitarias de la Universidad Francisco de Vitoria (IIB-UFV) ..... 23
- Grupo de Genética de Micobacterias ..... 25
- RNAs reguladores de cianobacterias ..... 27
- Biología y evolución de plásmidos bacterianos ..... 29
- *Quorum sensing* y resistencia a antibióticos en *Stenotrophomonas maltophilia*: ¿Están conectados estos mecanismos? ..... 31
- Grupo de Infecciones bacterianas y terapias antimicrobianas (BIAT Group) ..... 33
- Mecanismos de defensa y de evasión de defensa y virulencia en la interacción de *Pseudomonas syringae* con su planta huésped ..... 35
- Grupo de Bases Moleculares de la Adaptación ..... 37
- Actividad de antimicrobianos y resistencia en bacterias corineformes causantes de infecciones en humanos ..... 39
- Impacto en salud pública y patogénesis molecular de la enfermedad neumocócica ..... 41
- Parecidos razonables entre patógenos bacterianos oportunistas: el curioso caso de *Haemophilus influenzae* y *Helicobacter pylori* ..... 43
- Estructura, Dinámica y Función de Genomas de Rizobacterias – Sistemas CRISPR asociados a Reverso Transcriptasas ..... 45
- Sistemas de Secreción Tipo IV bacterianos. Biología y aplicaciones ..... 47
- Microbioma animal y humano ..... 49
- Efectores de los sistemas de secreción tipo III de *Salmonella enterica* ..... 51
- Mecanismos de adaptación de las bacterias al ambiente rizosférico. Caracterización de consorcios bacterianos para tecnologías agrícolas y de medio ambiente (RIZOSFERA-UAM) ..... 53
- Grupo de Microbiología Molecular: Resistencia a los antibióticos ..... 55
- Microbiota nasal y enfermedades respiratorias porcinas ..... 57
- Filogenómica y genómica comparativa de arqueas y bacterias halófilas ..... 59
- Grupo MICROMOL: Identificación de dianas terapéuticas y desarrollo de estrategias alternativas para el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas ..... 61
- Grupo de Biología Molecular de la Patogenicidad de *Brucella* ..... 63
- Interacciones huésped-parásito en infecciones neumocócicas ..... 65
- *Photobacterium damsela*: investigación básica y aplicada de patógenos de la acuicultura marina ..... 67
- Antimicrobial Resistance Unit (ARU). Unidad de Resistencia a Antibióticos ..... 69

## ENTREVISTA JISEM

Ernesto García. Consejos para jóvenes microbiólogos ..... 71

## NUESTRA CIENCIA

..... 74

## TESIS

Resúmenes de tesis doctorales ..... 75

## Nota del Presidente

Antonio Ventosa

*Presidente de la SEM*



Quando me dirijo a todos los socios de la Sociedad Española de Microbiología (SEM) a finales de 2019, hago algunas reflexiones acerca de este pasado año, que considero ha sido muy relevante y de gran trascendencia en cuanto a las actividades de la SEM. Nuestra cita bienal, el XXVII Congreso Nacional de Microbiología, en esta ocasión celebrado en la bella ciudad de Málaga, ha marcado en gran medida un punto de inflexión en cuanto a la celebración de nuestros congresos. Aunque todavía queda en nuestras mentes el magnífico congreso celebrado en Valencia hace dos años, celebrado conjuntamente con FEMS, los microbiólogos que tuvimos la oportunidad de participar en esta última edición, la número veintisiete, coincidiremos en la opinión de que fue un congreso memorable, con una excelente organización. Mi enhorabuena a los organizadores del congreso, especialmente al Prof. Juan José Borrego, Presidente del Comité Organizador, y mi reconocimiento a todos los implicados en su organización, así como a los participantes en el mismo. El marco incomparable fue la ciudad de Málaga, que albergaba un congreso nacional de la SEM por primera vez, con una adecuada programación de todos los elementos que podemos esperar de un magnífico congreso: un programa científico excepcional, con sesiones de actualidad, transversales y de enorme interés e impacto, con conferenciantes de grandísimo nivel, tanto jóvenes como seniors y acompañado de un programa social del que destacaría la copa de bienvenida en el Jardín Botánico de la Universidad de Málaga y la cena de

clausura en el histórico marco del palacio de la Concepción, con su magnífico jardín botánico, cedido específicamente por el Excmo. Ayuntamiento de Málaga. Me gustaría destacar especialmente la asistencia a este congreso y la participación activa de los jóvenes microbiólogos, tanto en las sesiones de presentación de trabajos orales y en paneles, como en actividades de mentoring, etc...

La próxima cita será en Burgos en 2021 y serán el Prof. David Rodríguez Lázaro y sus colaboradores los responsables de la organización del próximo congreso nacional, que coincidirá con la celebración del 75 Aniversario de la fundación de la SEM. Desde aquí quisiera hacer un llamamiento a todos los miembros de la SEM para que nos hagan llegar sus sugerencias y propuestas, tanto de temáticas como de posibles conferenciantes, siguiendo la dinámica del congreso anterior, con la finalidad de contar con un programa científico de la altura que se merece la Microbiología española.

Aprovechando la oportunidad que me brinda esta ventana abierta a todos los socios de la SEM, quisiera hacer algunos comentarios en cuanto al papel y relaciones de nuestra sociedad con respecto a las instituciones a las cuales pertenecemos: FEMS (Federación Europea de Sociedades de Microbiología), IUMS (Unión Internacional de Sociedades de Microbiología), ALAM (Asociación Latinoamericana de Microbiología) y COSCE (Confederación de Sociedades Científicas de España). Nuestra situación y relación con FEMS se

puede resumir en excelente. Tenemos una presencia y participación activa en las diferentes actividades de FEMS, entre las cuales destacaría, en primer lugar, una ya tradicional y altísima participación de los microbiólogos españoles en los congresos organizados por dicha federación. A esto habría que sumar que de los ocho congresos de FEMS, dos se han celebrado en España: el segundo congreso celebrado en Madrid (2006) y más recientemente el ya mencionado en Valencia en julio de 2017.

Por otro lado, destacaría la alta tasa de éxito de nuestros socios más jóvenes en la obtención de ayudas de estancias cortas en otros centros de investigación europeos, o para la asistencia a congresos. En este sentido, somos la sociedad miembro de FEMS que obtiene un mayor retorno, por parte de nuestros asociados jóvenes, en cuanto a la concesión de ayudas. Entre los factores que justifican este éxito, yo apuntaría algunos de ellos: la publicidad que desde los foros de comunicación de la SEM (NoticiaSEM, SEM@foro) venimos haciendo periódicamente de las diferentes convocatorias, o la escasez de convocatorias nacionales, autonómicas y locales que padecemos en los últimos años debido a la crisis económica y el escaso apoyo de la investigación en nuestro país, pero muy especialmente este altísimo porcentaje de éxito se debe a la calidad de las solicitudes que presentan nuestros jóvenes investigadores, que son tremendamente competitivos en el contexto de la investigación en Europa.

Por último, me gustaría destacar la excelente relación e interacción de nuestra sociedad con FEMS, tanto con su anterior presidente, Prof. Bauke Oudega, como con la nueva presidenta, Prof<sup>a</sup>. Hilary Lappin-Scott, que registró el destino de dicha Federación Europea de Microbiólogos durante los próximos años. También es de destacar la fluida y directa relación con la oficina central de FEMS en Delft (Holanda) y la participación activa de miembros de SEM en comités y actividades organizadas desde FEMS.

Con respecto a IUMS y a ALAM, nuestra participación e interacción con ambas instituciones es buena, pero creo que es mejorable. En cuanto a IUMS (International Union of Microbiological Societies), aun siendo la organización de mayor rango en cuanto a la Microbiología, ha ido perdiendo protagonismo y visibilidad en las últimas décadas, prácticamente desconocida por parte de muchos microbiólogos y que se limita a actividades de escasa relevancia, a excepción de los congresos que, por otra parte, han ido también perdiendo interés entre los investigadores de las tres divisiones que cubre la misma: Bacteriología y Microbiología Aplicada, Micología y Virología. La actual presidenta de IUMS, Prof<sup>a</sup> Eliora Ron, con quien la SEM ha venido manteniendo una estrecha colaboración durante muchos años y otros miembros de

IUMS, como el Dr. Miguel Vicente, vienen trabajando intensamente por recuperar el papel y prestigio de IUMS. Quisiera indicar que existe la posibilidad de que un futuro congreso de IUMS se pudiera celebrar en España por primera vez.

Por su parte, la Asociación Latinoamericana de Microbiología (ALAM), a la cual la SEM pertenece como miembro de pleno derecho gracias a los esfuerzos realizados hace algunos años por el Prof. Ricardo Guerrero, es un vehículo importante de interacción científica entre los países latinoamericanos y la SEM está llamada a servir como vehículo de interacción entre Latinoamérica y Europa. Tal vez uno de los aspectos menos conocidos por parte de los microbiólogos españoles es la calidad científica de los congresos organizados por ALAM y la participación tan masiva de microbiólogos latinoamericanos en dichos eventos, si bien es muy escasa la participación de microbiólogos españoles, aspecto que creo deberíamos mejorar. En este sentido, la contribución de la SEM, dentro de nuestras posibilidades, es importante y así en el pasado congreso ALAM en Chile nuestra sociedad aportó unas 25 ayudas de inscripción al congreso de jóvenes investigadores latinoamericanos.

Por último, en cuanto a nuestra participación e interacción en las actividades de COSCE

(Confederación de Sociedades Científicas de España), me gustaría destacar que recientemente hemos nombrado a dos representantes de SEM en la Comisión COSCE del Estudio del Uso de Animales en Experimentación Científica, coordinada por Margarita del Val, que es Vocal de la Junta de Gobierno de COSCE del área de las Ciencias de la Vida y de la Salud. Esta comisión se creó en virtud de un acuerdo de COSCE, de transparencia sobre el uso de animales en experimentación científica en España, firmado hace 3 años, que actualmente cuenta con 140 instituciones adheridas, entre ellas la SEM. Aunque como sociedad científica no realizamos directamente experimentación animal, nuestra participación implica un compromiso institucional sobre experimentación animal y nuestra preocupación por trasladar a la sociedad la necesidad del uso de animales de experimentación en investigación científica y las condiciones en las que dicha experimentación se realiza. Además, participamos en debates, acuerdos y difusión de informes, como los relacionados con los informes DECIDES, de seguimiento y análisis de las políticas científicas del gobierno español, que periódicamente hacemos llegar a nuestros socios.

Antonio Ventosa  
Presidente de la Sociedad Española  
de Microbiología



**XVIII TAXON**  
XVIII Reunión del Grupo de  
Taxonomía, Filogenia y  
Biodiversidad.  
Puerto de Soller (Mallorca) del 22 al 24 de abril de 2020

<http://agenda.uib.es/go/XVIII-TAXON>

UIB  
Universitat  
de les Illes Balears

SEM  
Sociedad Española de Microbiología

## BIODETERIORO, BIODEGRADACIÓN Y BIORREMEDIACIÓN



**Ana M. García**  
Presidenta del Grupo

El pasado 3 de julio tuvo lugar la Asamblea General del Grupo BBB durante el XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología, celebrado en Málaga. La sesión dedicada a nuestro Grupo fue el 4 de julio, de 18:00 a 19:30, en el aula 3 de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga y contó con la asistencia de un alto número de participantes, constituyendo una oportunidad para que los miembros del Grupo nos reuniéramos y pudiéramos debatir sobre las distintas temáticas presentadas.

Como viene siendo habitual, el Grupo concedió dos premios a jóvenes investigadores, seleccionados tras la evaluación de los posters y ponencias presentados en el Congreso en el área de Biodeterioro, Biodegradación y Biorremediación. El Premio THOR Especialidades fue para María R. Martínez-Gallardo por el trabajo titulado "Biodescontaminación de sedimentos de alpechín mediante landfarming y fitorremediación asistidas por bioaugmentación" y el premio del Grupo para Inés Aguilar por el trabajo titulado "Nueva técnica de bioaugmentación basada en extractos líquidos aireados procedentes de sistemas de biopurificación".

Nuestro Grupo propuso dos ponentes que presentaron sendas conferencias el día 4 de julio, de 16:00 a 18:00 en el simposio VIII, sobre Biotecnología Microbiana: el Dr. Lukas Y. Wick, del UFZ Helmholtz Centre for Environmental Research (Alemania), que presentó el trabajo titulado "Mycosphere processes for contaminant degradation" y el Dr. Juan Luis Ramos, de la Estación Experimental del Zaidín-CSIC, con el trabajo titulado "Circular economy and microbial biotechnology".

El Grupo también ha participado de forma activa en la segunda edición del International Meeting on New Strategies in Bioremediation Processes (BioRemid2019) celebrado en Oporto (Portugal) el pasado 24 y 25 de Octubre (Resumen en página 14). Miembros de nuestro Grupo han presentado comunicaciones orales en varias sesiones del congreso. A destacar, la participación de la Dra. Concepción Calvo (Instituto de Investigación del Agua, Universidad de Granada), Secretaria de nuestra Junta Directiva, que impartió una conferencia plenaria, inaugurando el congreso, y las Dras. Balbina Nogales (Universidad de las Islas Baleares), Elisabet Aranda (Instituto de Investigación del Agua, Universidad de Granada) y Ángeles Prieto-Fernández (Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia) que participaron como *Keynote Speaker* en 3 de las 7 sesiones del evento. Nuestro Grupo ha concedido un premio a la mejor contribución entre las presentadas por jóvenes investigadores.

## DOCENCIA Y DIFUSIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA



**Inés Arana Basabe**  
Presidenta del Grupo

Os presentamos un breve resumen de las actividades realizadas, en este último semestre, por el grupo de Docencia y Difusión de la Microbiología.

En primer lugar, debemos resaltar la enorme actividad de los grupos integrados en el proyecto de aprendizaje-servicio **MicroMundo**. El proyecto, inicialmente denominado Small World Initiative (SWI) e ideado como una estrategia para fomentar la vocación por la investigación científica en los jóvenes preuniversitarios, fue importado por el Prof.

Víctor Jiménez Cid y, en pocos años, ha ido creciendo y logrando cotas de excelencia.

Así son de mencionar los premios a la divulgación científica recibidos por los nodos, aunque destacamos el **Antibiotic Guardian Awards 2019** (categoría Public Engagement) otorgado por Public Health England a MicroMundo. Enhorabuena a los grupos implicados y, en especial, al dinamizador del proyecto, el Prof. Víctor J. Cid.

Por otra parte, el **XXIII Curso de Iniciación a la Investigación en Microbiología Prof. J. R. Villanueva** se ha celebrado en Málaga. El responsable de la organización ha sido el Prof. Diego Romero y ha contado con la colaboración del grupo **JISEM** tanto en la difusión del mismo, como en la selección de I@s candidat@s y con la participación de vari@s ponentes. La participación como ponentes de investigadores jóvenes pero con una reconocida carrera ha resultado muy atractiva para el alumnado seleccionado. Del atractivo de estos cursos da cuenta el gran número de solicitudes recibidas y, lo que quizá es más importante, la participación en el **XXVII Congreso SEM** de vari@s alumn@s del curso anterior que presentaron trabajos propios.

En julio, en el marco del **XXVII Congreso SEM** se presentaron posters y comunicaciones orales en la sesión del grupo que estuvo muy animada y con numerosa participación de asistentes. Además, en el stand de SEM se colgó el póster **Bacterias: La historia más pequeña jamás contada** (podéis descargar el cómic en este enlace: <https://drive.google.com/file/d/1FgNaT67v-Q1vJ3duMEJC60GFTgH0vIUx/view>) elaborado por Susana Deus Álvarez. Queremos dar las gracias a la organización y a la SEM por ceder este espacio. También, en el contexto del **Premio Federico Uruburu de Fotografía**, un jurado compuesto por varios miembros de la Junta del grupo, seleccionó 12 fotografías que, junto con la ganadora por votación popular, formarán parte del calendario 2020 de la SEM. Se celebró la Asamblea general del Grupo, aunque entristece indicar la escasa participación de socios.

Kika Colom nos representa en la **división de docencia de FEMS** para establecer unos contenidos de Microbiología consensuados. Ya en la primera reunión que tuvo lugar en

Varsovia a principios de verano presentó un resumen muy completo con la información aportada por profesor@s de universidades españolas. Próximamente habrá una nueva reunión para avanzar en estos contenidos.

Como es habitual, D+D sigue recibiendo consultas de diferentes medios de comunicación que están siendo atendidos por miembros del grupo o se derivan a profesor@s que amablemente atienden estas consultas. También se continúa con la participación en televisiones públicas, ferias de divulgación, etc. y en la edición de SEM@foro (director Manuel Sánchez Angulo) y NoticiaSEM (directora Inmaculada Llamas).

Y recordaros que ya nos hemos puesto con la organización de **V Reunión del Grupo D+D SEM** que se celebrará en Leioa (Vizcaya) del 15 al 17 de Julio de 2020 y que está en marcha el **II Concurso Científico-Literario de Narración Corta SEM** (<https://www.semicrobiologia.org/secciones/cursos/premios>). ANIMAOS!!!!

## MICROBIOLOGÍA DEL MEDIO ACUÁTICO



Alicia Estévez Toranzo  
Presidenta del Grupo

La participación de los miembros del grupo de MMA durante el XXVII Congreso Nacional de Microbiología en Málaga entre 2-5 de julio, fue exitosa. Se presentaron un total de 43 comunicaciones, de las cuales 18 fueron orales y 25 en formato póster. Debido al elevado número de comunicaciones, el grupo decidió otorgar dos Premios, uno en cada modalidad. El premio a la mejor comunicación oral recayó en Marta Afonso Lages de la Universidad de Santiago de Compostela con la presentación titulada "Variaciones en la temperatura

de cultivo inducen cambios en el patrón de expresión de factores de virulencia en *Vibrio anguillarum*", y el premio al mejor póster que lleva por título "la Microbiología de los agregados flotantes en el litoral malagueño" recayó en Marta Domínguez-Maqueda de la Universidad de Málaga.

En la Reunión del Grupo de MMA celebrada durante el Congreso Nacional, se presentó la nueva Junta Directiva tras las elecciones celebradas entre marzo y abril de este año y se aprobó que la sede del próximo XIII Congreso del Grupo sea Granada, el cual tendrá lugar durante los días 1 y 2 de octubre de 2020.

## TAXONOMÍA, FILOGENIA Y DIVERSIDAD



Jesús López Romalde  
Presidente del Grupo

Tal como se acordó en la reunión del grupo de Taxonomía, Filogenia y Biodiversidad celebrada el julio pasado durante el congreso de la SEM en Málaga, la próxima reunión científica, **XVIII Taxon** (<https://agenda.uib.es/go/XVIII-TAXON>), se celebrará en la localidad del Puerto de Soller (Mallorca) del 22 al 24 de abril de 2020. Todas las actividades vinculadas a la reunión se celebrarán en la sala del oratorio de Santa Catalina de Alejandría en el Museo del Mar de dicha localidad. El periodo de presentación de resúmenes de las comunicaciones será del 15 de diciembre de 2019 al 15 de enero de 2020. En las próximas semanas se enviará una circular con información detallada sobre el alojamiento, el boletín y los precios de inscripción.

El comité organizador formado por Elena García-Valdés, Margarita Gomila y Jorge Lalucat nos pide que reservéis estas fechas en el calendario.

Por otro lado, informar que recientemente el presidente del grupo, Jesús López Romalde, ha sido designado como Editor Invitado para la actualización de los capítulos de las Familias *Vibrionaceae* y *Alteromonadaceae* del Bergey's Manual of Systematics of Bacteria and Archaea (BMSAB).

## PROTISTOLOGÍA



Ana Martín González  
Presidenta del Grupo

Del 28 de julio al 2 de agosto de 2019 se celebró el VIII European Congress of Protistology- International Society of Protistologists (ECOP-ISOP) Joint Meeting, en la ciudad de Roma, organizado por la Sociedad Italiana de Protistología (SIP). A este Congreso conjunto asistieron más de 450 participantes de muy diversas partes del mundo; Estados Unidos, Canadá, China, Japón Corea, Brasil, Argentina, incluyendo muchos países europeos (Italia, Alemania, Austria, Suiza, República Checa, Francia, España, etc.). Algunos miembros del grupo Especializado de Protistología de la SEM participaron en este congreso, presentando diversas comunicaciones. Cabe destacar la participación, en la sección de apertura, del Dr. Aurelio Serrano (Universidad de Sevilla-CSIC), como el pasado secretario general de la FEPS (Federación Europea de Sociedades de Protistología).

El programa científico, de gran interés, incluyó la celebración de 4 Conferencias Plenarias, 12 simposios y numerosos workshops. Se presentaron 231 comunicaciones orales y en panel de temática muy diversa, pero muy especialmente sobre filogenómica, *metabarcoding*, protistas marinos, interacciones de protistas con otros organismos, evolución hacia la pluricelularidad y aplicaciones biotecnológicas de los protistas. Por su interés

y novedad, ya que era la primera vez que se contemplaban estas temáticas en estos congresos, hay que destacar dos workshops: uno dedicado principalmente a los investigadores jóvenes, sobre futuras posibilidades de financiación, y proyectos, con temática protistológica, que han obtenido financiación (ERC Grants, Goodon y Betty Moore Foundation, Proyectos Life). El segundo workshop estaba centrado en las diferentes estrategias de difusión y diseminación del mundo de la Protistología, a muy diferentes niveles; público en general, niños y/o estudiantes universitarios. También hubo una ponencia de gran relevancia sobre los protistas en los museos, y más concretamente en el Natural History Museum de Londres. Se expusieron experiencias prácticas que han dado excelentes resultados en distintos países europeos, cuyo principal objetivo era el conocimiento del mundo de los protistas y el fomento de vocaciones científicas. El próximo Congreso de la Federación Europea de Sociedades de Protistología (FEPS) será en Austria, probablemente en Viena, y estará organizado por las investigadoras Bettina Sonntag, Julia Walochnik y Sabine Ágatha.

fechas, porque además del atractivo de la sedes y en general de Valencia, en el programa habrá sesiones con títulos y aspectos tan interesantes como:

- Los otros hongos
- Micología aplicada
- La mucormicosis en nuestros días
- Mecanismos moleculares de respuesta y adaptación en hongos
- Aspergilosis pulmonar crónica
- Señalización y morfogénesis
- Candidiasis invasiva en el 2020
- Biómica en la virulencia de hongos filamentosos
- Revisando/reposicionando las *guidelines*
- Genómica y proteómica de levaduras

- Las otras micosis también son importantes

La conferencia inaugural será impartida por Joaquín Ariño, de la Universidad Autónoma de Barcelona, y el ponente de la charla de clausura será el ganador del premio Fleming 2020. Estad atentos a la convocatoria, que se publicará en marzo del año que viene. Este premio se otorga al mejor trabajo de investigación presentado a concurso en el ámbito de la Micología, realizado en un laboratorio de España, y publicado en cualquiera de los dos años previos (2018 y 2019). Como es habitual, los cinco miembros de la Junta Directiva del Grupo actuarán como jurado.

**HONGOS, FILAMENTOS Y LEVADURAS**



**Humberto Martín**  
*Presidente del Grupo*

Os recordamos que el próximo Congreso Nacional de Micología será organizado en Valencia por Eulogio Valentín, del 9 al 11 de septiembre de 2020, en colaboración con la Asociación Española de Micología (AEM). La sede principal será el Palacio de Pineda, sede de la Universidad Internacional Menéndez Pelayo, y como co-sede dispondremos del "Centro Cultural Convento del Carmen". Os animamos a que vayáis reservando esas

**XV CONGRESO NACIONAL DE MICOLOGÍA**

**9-11 SEPTIEMBRE VALENCIA 2020**

# Alerta sanitaria por listeriosis en España. Enfoques preventivos basados en un esquema de Evaluación de Riesgos

Valero A., García-Gimeno R.M., Carrasco E., Pérez-Rodríguez F., Posada-Izquierdo G.D., Zurera G.

Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba.  
Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3). Crta. Madrid-Cádiz km 396A, 14014, Córdoba.



## INTRODUCCIÓN

La alerta sanitaria declarada el pasado verano debida al brote de listeriosis en carne mechada ha puesto de manifiesto la enorme relevancia de la correcta implementación de los sistemas preventivos de aseguramiento de la calidad en las industrias alimentarias. La patología asociada a este microorganismo y las graves consecuencias sobre la salud pública, han hecho que se revisen los actuales controles y procedimientos de seguridad alimentaria por parte de la Autoridad Sanitaria. La actual normativa comunitaria establece que las empresas sean garantes de la calidad y seguridad de sus productos a través de los requisitos establecidos en los sistemas de autocontrol. En relación a *Listeria monocytogenes*, el Reglamento (CE) N° 2073/2005 establece en su artículo 3 que los explotadores de empresas alimentarias responsables de la fabricación de alimentos listos para el consumo tienen la obligación legal de realizar estudios de vida útil para investigar el cumplimiento de los criterios microbiológicos cuando dichos alimentos puedan suponer un riesgo para la salud pública en relación con dicho patógeno. El presente artículo describe los principales hitos acontecidos en el brote de listeriosis en España en 2019, los principales factores asociados a la presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos, sus mecanismos de infectividad así como los enfoques de prevención basados en el Análisis de Riesgos (Reglamento CE 178/2002) y en el uso de modelos de microbiología predictiva.

## DESCRIPCIÓN Y CRONOLOGÍA DEL BROTE DE LISTERIOSIS EN ESPAÑA

La alerta sanitaria fue decretada por primera vez el 15 de agosto de 2019 en Andalu-

ucía, relacionada con el consumo de carne mechada. Dicha alerta ha generado el mayor brote de listeriosis producido en España con 217 casos notificados. Si bien la mayoría de los casos se han descrito en Sevilla (173), también han afectado a otras provincias como Huelva (18), Cádiz (13), Granada (6), y Málaga (6). El alimento implicado en el brote fue comercializado en otras Comunidades Autónomas en las que se han confirmado casos de listeriosis: 7 por laboratorio (2 en Aragón, 1 en Castilla y León, 1 en Extremadura, 1 en Castilla-La Mancha y 2 en Madrid, incluyendo una mujer embarazada) y 3 casos confirmados por vínculo epidemiológico (1 en Extremadura y 2 en Aragón).

Según el informe del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social (CCAES Informe 27/9/2019), el 57 % de los afectados fueron mujeres, con una edad media de 45 años, mientras que la edad media en los hombres fue mayor (50 años). Los casos confirmados en embarazadas fueron 37, lo que representa un 17% de los casos, de entre los cuales se produjo aborto en 2 de los casos (previo a la semana 20 de gestación); en 3 casos se produjo muerte fetal (después de la semana 20 de gestación) y en 6 casos hubo parto prematuro, lo que se corresponde con un 30% de alteración en el desarrollo normal del embarazo. El 77 % de los casos confirmados presentó un periodo de incubación inferior a 3 días, presentando el resto un máximo de hasta 30 días. En cuanto a la mortalidad, se han registrado tres defunciones: dos personas mayores de 70 años con morbilidades previas graves y una persona mayor de 90 años (CCAES, Informe 27/9/2019).

El origen del brote alimentario fue la carne mechada marca "La Mechá" de la empresa Magrudis S.L. (Sevilla), de la que se pudo aislar

*L. monocytogenes* serovariedad Ib, ST-388, CC388, CT-8466. Se ha demostrado la asociación de varios lotes de este alimento con los casos declarados (CCAES). Posteriormente a esta alerta se detectó que en muestras prospectivas de carne mechada marca "Sabores de Paterna" contenían una elevada concentración del patógeno, sospechoso de ser el causante de un caso de listeriosis detectado en la Comunidad de Madrid el 19 de agosto, por consumo de este producto en Conil de la Frontera (Cádiz). Asimismo, fue declarado un nuevo brote de toxoinfección alimentaria en una familia de 8 personas, relacionado con el consumo de chicharrón especial de la marca "La Montanera Del Sur" (Málaga), en los que también pudo aislarse esta bacteria.

En cuanto a la exportación de casos de listeriosis a otros países, en Francia se notificó el pasado 23 de agosto por medio del Sistema de Alerta Precoz y Respuesta de la UE (EWRS, Early Warning and Response System), un caso confirmado de listeriosis en un ciudadano inglés y con antecedente de consumo de una carne fría de cerdo en Sevilla el día 13 de agosto. El producto fue consumido por 4 personas más durante una comida en Sevilla y todas ellas enfermaron.

La alerta sanitaria se dio por concluida el pasado 17 de octubre de 2019 por la Junta de Andalucía.

## FACTORES QUE AFECTAN AL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE *L. MONOCYTOGENES* EN ALIMENTOS

*L. monocytogenes* es un microorganismo resistente a un amplio rango de factores ambientales. Este hecho, unido a su ubicuidad, hacen que sea uno de los principales

patógenos transmitidos por los alimentos. Los alimentos listos para el consumo donde se ha encontrado una mayor prevalencia de *L. monocytogenes* en Europa en 2017 son pescado y productos derivados (6%), ensaladas (4,2%), carnes y productos cárnicos (1,8%), quesos semi-curados y de pasta blanda (0,9%), frutas y vegetales (0,6%) y quesos curados (0,1%) (EFSA, 2018).

En cuanto a la temperatura, *L. monocytogenes* es un microorganismo psicrotrofo, capaz de crecer a temperaturas de refrigeración (entre 2 y 4°C) habitualmente utilizadas para almacenar y conservar alimentos listos para el consumo (AESAN, 2011). La supervivencia de *L. monocytogenes* a temperaturas de refrigeración puede producir una mejor adaptación y resistencia a posteriores tratamientos con calor o a condiciones de estrés ácido, osmótico y oxidativo (Lado y Yousef, 2007). Sin embargo, es un microorganismo sensible al tratamiento térmico, inactivándose habitualmente a temperaturas por encima de 65° C.

Si se consideran otros factores ambientales, los rangos en los que se puede presentar crecimiento o supervivencia de *L. monocytogenes* son: i) pH (HCl como acidulante: 4,2 – 9,5); ii) actividad de agua (NaCl como humectante: 0,90 a 0,99); iii) concentración de sal (% NaCl en fase acuosa: < 0,5 a 16). Asimismo, presenta habilidad para crecer en condiciones de microaerofilia, condiciones aeróbicas y anaeróbicas y con concentraciones de dióxido de carbono elevadas de hasta un 30%. Las concentraciones mínimas inhibitorias de los ácidos más frecuentemente utilizados en la industria alimentaria varían de 3,8 a 5,4 mM para el ácido láctico; de 10,3 a 20 mM para el ácido acético y de 1,6 a 3 mM para el ácido cítrico (ICMSF, 1996; Sauders y Wiedmann, 2007).

Atendiendo al origen de la contaminación que dio lugar al brote, *L. monocytogenes* presenta una gran capacidad para formar biofilms, lo cual promueve su alta persistencia. Chavant *et al.* (2002) estudiaron este fenómeno en superficies de acero inoxidable, goma, teflón, vidrio y polipropileno, mostrando que *L. monocytogenes* se adhiere a superficies de acero inoxidable en cortos periodos de tiempo generando material extracelular (EPS). Una vez que el patógeno coloniza dichas superficies, puede persistir durante

largos periodos de tiempo siendo difícil su erradicación.

Esta alta capacidad de supervivencia y diseminación hace que se pueda encontrar en diversos ambientes alimentarios, pudiendo estar implicado en múltiples rutas de contaminación a través de materias primas o superficies de trabajo. De hecho, los fenómenos de contaminación cruzada posteriores al procesado pueden aumentar su prevalencia a valores considerados suficientes para causar listeriosis humana (De Candia *et al.*, 2015).

### MECANISMOS DE INFECTIVIDAD Y RELACIONES DOSIS-RESPUESTA DE *L. MONOCYTOGENES*

*L. monocytogenes* es considerado un microorganismo intracelular facultativo, no adaptado al hombre, y con múltiples rutas de infección y presentaciones de la enfermedad, por lo que posiblemente no exista una única dosis infectiva.

Los principales grupos de riesgo de listeriosis son las mujeres embarazadas, neonatos, ancianos y enfermos inmunodeprimidos. Las manifestaciones clínicas pueden variar desde gastroenteritis febril hasta formas invasivas más graves, que incluyen sepsis, meningitis, rombencefalitis, infecciones perinatales y abortos (Allerberger y Wagner, 2010).

La principal fuente de infección es la alimentaria, habitualmente con una dosis elevada del patógeno en el alimento (McLauchlin *et al.*, 2004), que, tras superar la barrera gástrica, es capaz de invadir y colonizar el intestino delgado. *L. monocytogenes* penetra en las células del hospedador por fagocitosis o a través de endocitosis mediada por receptores en el hospedador para las proteínas de superficie internalina A e internalina B del patógeno (Mengaud *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 2000). Inicialmente, es encapsulado dentro una vacuola del hospedador, segregando la denominada listeriolisina O (LLO), una toxina que crea poros, así como la fosfolipasa C, que le permiten su salida de la vacuola al citosol (Marquis *et al.*, 1995). Es en el citosol donde *L. monocytogenes* sintetiza la proteína que induce la formación de la actina, promoviendo así su motilidad y paso entre células, donde se replica haciendo uso de metabolitos propios y

del hospedador (Chen *et al.*, 2017), y donde genera nucleomodulinas, una nueva generación de efectores bacterianos que provocan cambios en el hospedador de distinta índole, desde la modificación morfológica de organelos hasta cambios en la transcripción genética, con el objeto de evadir la respuesta inmune del hospedador (Radoshevich y Cossart, 2018). En estudios recientes (Bierne *et al.*, 2018), se ha demostrado que *L. monocytogenes*, clásicamente considerada como *patógeno citosólico*, también puede crear nichos en vacuolas, esto es, *patógeno vacuolar*, donde permanece en un estado de no crecimiento y de resistencia, pudiendo así explicar los casos de portadores asintomáticos, los largos periodos de incubación en multitud de ocasiones, la mayor resistencia a la acción de fármacos, e incluso la mayor dificultad encontrada para el análisis de rutina del patógeno.

Caracterizar la relación dosis-respuesta entre el patógeno y el hospedador ha recibido gran interés en los últimos años con el objeto de evaluar el riesgo de listeriosis. Modelos matemáticos dosis-respuesta como el logístico-exponencial (FDA/FSIS, 2003) o el exponencial (FAO/WHO, 2004) han gozado de mayor reconocimiento por presentar un mejor ajuste a las observaciones. Sin embargo, recientemente, Pouillot *et al.* (2015) incorporaron una importante mejora en el modelo exponencial reflejando la variabilidad existente en la dosis, virulencia entre cepas, susceptibilidad del hospedador y el rol de la matriz alimentaria, describiendo del parámetro *r* mediante una distribución log-normal; este modelo estimaría que el mayor riesgo de listeriosis procede de las cepas más virulentas y de los individuos más susceptibles (Buchanan *et al.*, 2017).

### EL ANÁLISIS DE RIESGOS COMO HERRAMIENTA DE CONTROL PARA LA GESTIÓN DE ALERTAS

La utilización de enfoques de tipo preventivo, facilitan la implementación de las medidas de control a lo largo de la cadena de producción-distribución, y permite el desarrollo de sistemas de respuesta rápida, que faciliten una correcta toma de decisiones. En un contexto gubernamental, estas medidas de control deben estar basadas en un esquema de Análisis de Riesgos, un proceso formado por

tres elementos interrelacionados: evaluación del riesgo, gestión del riesgo y comunicación del riesgo (Reglamento CE 178/2002). La evaluación de riesgos es el componente científico-técnico del análisis de riesgos, y consiste en un procedimiento sistematizado que se lleva a cabo con el fin de determinar los efectos adversos para la salud de los consumidores que pueden producirse como consecuencia de su exposición a peligros transmitidos por los alimentos. Los resultados derivados de una evaluación de riesgos constituyen una herramienta valiosa para la toma de decisiones, detección de puntos críticos en la cadena agroalimentaria, evaluación de estrategias de mitigación (gestión de riesgos) y elaboración de normativas o estándares que faciliten el comercio de alimentos (FAO/WHO, 2006).

Aunque la evaluación de riesgos tiene su principal uso en Salud Pública y Salud Comunitaria, la industria agroalimentaria puede también beneficiarse de su aplicación, y para ello, requiere de herramientas que faciliten su adopción sin necesidad de un profundo conocimiento científico ni de una extensa recopilación de información.

Las herramientas de predicción son un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas que permiten estimar eventos, basándose en la representación adecuada de un sistema y en el conocimiento de los factores/variables que lo rigen. En el ámbito alimentario, estas técnicas pueden aplicarse para predecir cambios (bio)químicos, microbiológicos y sensoriales de un producto alimenticio bajo ciertas condiciones de producción-distribución-consumo. Específicamente, el área de la Microbiología Predictiva se centra en el estudio de la respuesta microbiana en entornos alimentarios, proporcionando modelos matemáticos capaces de determinar el comportamiento de los microorganismos en función de ciertos factores, intrínsecos y extrínsecos al alimento. Aunque incipiente, hoy en día, estas herramientas tienen un número amplio de aplicaciones, en algunos casos reconocidas legalmente, como es para la evaluación del criterio de *L. monocytogenes* recogido en Reglamento CE 2073/2005. También pueden utilizarse, por ejemplo, para la determinación de vida útil, evaluación de la seguridad microbiológica de formulaciones alimentarias, identificación de Puntos de Control Crítico o definición de límites críticos dentro de un sistema

de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC). Son, además, base para el desarrollo de estudios de evaluación de riesgos, uno de los componentes del esquema de Análisis de Riesgos, y principal pilar científico en los procesos de toma de decisiones para la gestión de riesgos alimentarios. A partir de las predicciones de un modelo, pueden diseñarse políticas alimentarias, estrategias de control, o medidas de reducción del riesgo. Sin embargo, estas herramientas también cobran relevancia en la gestión de brotes y alertas alimentarias, sobre todo debido a que pueden utilizarse de manera rápida y sin necesidad de realizar experimentación o trabajos de laboratorio.

En el caso de un brote, como el de *L. monocytogenes* ocurrido recientemente en Andalucía, la recopilación y gestión de datos en los primeros estadios del brote es un aspecto crítico para garantizar una respuesta adecuada al mismo. Sin embargo, no en todos los casos existe esta disponibilidad de información. La falta de datos de presencia del patógeno y la identificación de las principales rutas y variables de transmisión es una de las principales dificultades en la gestión de un brote como el de *Listeria*. En estas situaciones, el uso de herramientas de predicción puede ayudarnos a obtener una información valiosa en los primeros momentos de la aparición de un brote; por ejemplo, evaluando la probabilidad de qué rutas son las relacionadas con el brote. Para ello, el modelo aplicado puede hacer uso de los datos de trazabilidad recopilados, incluyendo variables del proceso de producción y distribución del producto (por ej. tiempo, temperatura, pH, etc.), y con ellas estimar si el peligro microbiológico pudo sobrevivir bajo tales condiciones o incluso incrementarse. De esta manera, las primeras actuaciones pueden aplicarse sobre aquellos lineales o canales de distribución identificados, por el modelo, como de mayor riesgo, optimizando recursos y proporcionando una respuesta rápida que lleve al control efectivo del brote. Además, permite determinar aquellas condiciones de riesgo en el proceso, y por tanto, establecer o recomendar medidas preventivas y correctoras a las empresas implicadas en el brote. Por ejemplo, existen modelos de transferencia que representan y predicen matemáticamente los fenómenos de contaminación cruzada. Con ellos se podría evaluar si los datos obtenidos dentro del estudio epidemiológico del brote podrían

corresponder con este tipo de contaminación, proporcionando así cierta evidencia sobre el origen del brote. Otro aspecto importante es el uso de los datos de predicción para conocer los valores de concentración final. Esta información es, a veces, difícil de investigar debido a la falta de disponibilidad del producto implicado porque o bien ha sido ya consumido o por el largo tiempo transcurrido entre la exposición y la aparición de la enfermedad, característico, por ejemplo, de microorganismos como *L. monocytogenes*, que tienen un largo tiempo de incubación. Estos datos de concentración, traducidos en términos de probabilidad de enfermar en un esquema de evaluación de riesgos, y considerando el impacto en diferentes grupos poblacionales, puede ser clave para determinar los colectivos más susceptibles dentro del brote y derivar recomendaciones específicas a las poblaciones de riesgo.

Si bien estas herramientas requieren ciertos conocimientos matemáticos, su incorporación en aplicaciones informáticas ha mejorado su accesibilidad y facilitado su aplicación, como en el caso de la gestión de brotes alimentarios, por personas no especializadas. A continuación, presentamos una tabla donde se recoge, de manera resumida, un conjunto de aplicaciones informáticas de predicción con potencial en la gestión de alertas y brotes alimentarios, asociados a microorganismos patógenos.

Las consecuencias derivadas de la reciente alerta sanitaria por listeriosis han puesto de relieve la necesidad de crear y/o actualizar los procedimientos de seguridad alimentaria y determinación de vida útil en alimentos listos para el consumo. A este respecto la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en colaboración con la Red de Excelencia de priorización y evaluación cuantitativa de riesgos biológicos en España, BIOQURA, han publicado recientemente un documento de orientación para la verificación de estudios de vida útil en relación a *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (AESAN, 2019). Se pretende que dicho documento sea utilizado por las autoridades competentes de inspección para verificar la idoneidad de los estudios de vida útil en relación con *L. monocytogenes* elaborados por los operadores de empresas alimentarias dedicadas a la fabricación, envasado y reenvasado de alimentos listos para el consumo.

**Tabla 1.** Principales aplicaciones informáticas y repositorios existentes relacionados con Evaluación de Riesgos Microbiológicos y Microbiología Predictiva

Aplicación	Descripción	Enlace o repositorio
MicroHibro	Aplicación gratuita online, en español, que predice la vida útil, evalúa el riesgo microbiano y se emplea como herramienta para el diseño de planes de muestreo.	<a href="http://www.microhibro.com">www.microhibro.com</a>
Food chain lab	Recopilación, manejo y análisis de grandes cantidades de datos en la investigación de brotes alimentarios	<a href="https://foodrisklabs.bfr.bund.de/foodchain-lab/">https://foodrisklabs.bfr.bund.de/foodchain-lab/</a>
Combase	Base de datos sobre la respuesta microbiana en alimentos. Herramienta online que permite realizar predicciones de muerte y crecimiento de microorganismos alimentarios.	<a href="http://www.combase.cc">www.combase.cc</a>
FDA-iRISK	Disponible en internet., Realiza evaluaciones de riesgos microbiológicos y químicos	<a href="https://irisk.foodrisk.org/">https://irisk.foodrisk.org/</a>

Todas estas herramientas pueden integrarse en los procedimientos de seguridad alimentaria basados en el Análisis de Riesgos con objeto de prevenir y, en su caso, gestionar de forma más eficiente las alertas sanitarias producidas por la presencia de patógenos en alimentos.

## REFERENCIAS

- AESAN, 2019. Documento de orientación para la verificación de estudios de vida útil en relación con *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Accedido el 29/10/2019. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/noticias/2019/verificacion\\_vida\\_util.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/noticias/2019/verificacion_vida_util.pdf)
- AESAN, 2011. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios. Accedido el 29/10/2019. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/evaluacion\\_riesgos/informes\\_comite/LISTERIA\\_M.VIDA\\_UTIL.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/LISTERIA_M.VIDA_UTIL.pdf)
- Allerberger, F., & Wagner, M. 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 16-23.
- Bierne, H., Milohanic, E., Kortebi, M. 2018. To be cytosolic or vacuolar: the double life of *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 8, n. 136.
- Buchanan, R.L., Gorris, L.G.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C., Whiting, R.C. 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1-13.
- CCAES (Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias). Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Informe de fin de seguimiento del brote de listeriosis. 27 de septiembre de 2019. Accedido el 29/10/2019 Disponible en: [https://www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listeriosis/docs/Informe\\_cierre\\_Listeriosis\\_20190927.pdf](https://www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listeriosis/docs/Informe_cierre_Listeriosis_20190927.pdf)
- Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M.N., Hebraud, M. 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 728-737
- Chen, G.Y., Pensinger, D.A., Sauer, J.D. 2017. *Listeria monocytogenes* cytosolic metabolism promotes replication, survival, and evasion of innate immunity. *Cellular microbiology*, v. 19.
- De Candia, S., Morea, M., Baruzzi, F. 2015. Eradication of high viable loads of *Listeria monocytogenes* contaminating food-contact surfaces. *Frontiers in microbiology*. 6. 733. 10.3389/fmicb.2015.00733
- EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* 2018;16(12):5500, 262 pp.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization). 2004. Microbiological risk assessment series 5: Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Technical report. Accedido el 22 de octubre de 2019. Disponible en: <http://www.fao.org/3/y5394e/y5394e.pdf>
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization). 2006. Food Safety Risk 3949 Analysis: A Guide for National Food Safety Authorities, FAO Food and Nutrition Papers-87, 3950 FAO, Rome. ISSN 0254-4725.
- FDA/FSIS (U.S. Department of Health and Human Services, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration and U.S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service). 2003. Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Accedido el 22 de octubre de 2019. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/cfsan-risk-safety-assessments/quantitative-assessment-relative-risk-public-health-foodborne-listeria-monocytogenes-among-selected>
- ICMSF. 1996. Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. Londres: Blackie Academic & Professional.
- Lado BH, Yousef AE. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. A: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. 3a ed. Boca Raton: CRC Press; 2007. p. 157-213.
- Marquis, H., Doshi, V., Portnoy, D.A. 1995. The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infection and Immunity*, 63, 4531-4534.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., Jewell, K. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 15-33.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.-M., & Cossart, P. 1996. Ecadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*, 84, 923-932.
- Pouillot, R., Gallagher, D., Tang, J., Hoelzer, K., Kause, J., & Dennis, S. B. 2015. *Listeria monocytogenes* in retail delicatessens: An interagency risk assessment model and baseline results. *Journal of Food Protection*, 78, 134-145.
- Radoshevich, L., Cossart, P. 2018. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 1, 32-46.
- Reglamento (CE) nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Accedido el 15 de octubre de 2019. Disponible en: <http://data.europa.eu/eli/reg/2002/178/oj>
- Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea L 338 de 22 de diciembre de 2005*, 1-32
- Sauders BD, Wiedmann M. Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. A: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. 3a ed. Boca Raton: CRC Press; 2007. p. 21-53.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., Ireton, K. 2000. InB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the met receptor tyrosine kinase. *Cell*, 103, 501-510.

## “El jarabe de la calle Relator (Barrio de la Macarena, Sevilla) para aliviar la tosferina”

Eduardo Villalobo Polo

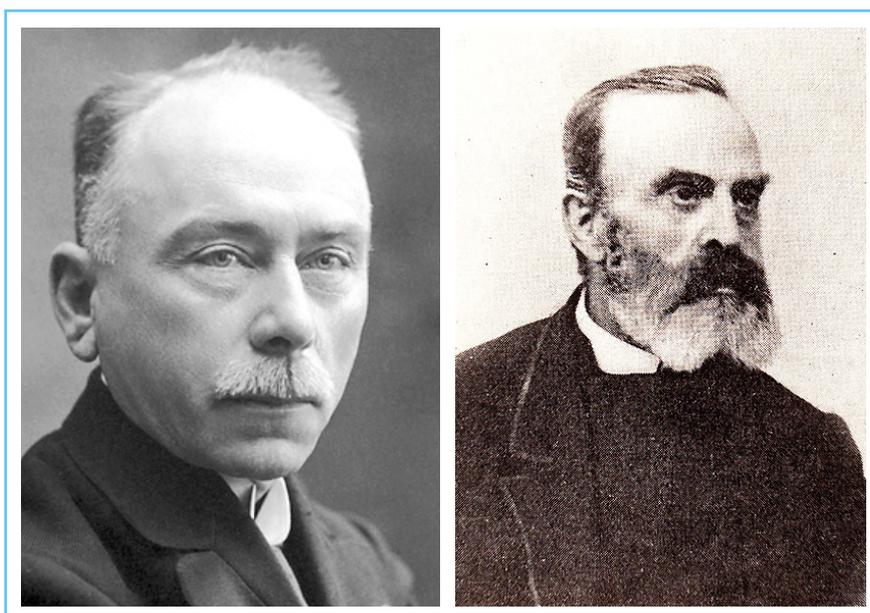


Profesor titular del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla.

*Quererte como nadie se imagina  
es la única enfermedad que he tenido  
desde que pasé la tos ferina  
Quererte es innarrable  
(O quiero que lo sea)*

Gloria Fuertes (1917-1998)

Este año 2019 se celebra el centenario del Premio Nobel en Fisiología y Medicina otorgado a Jules Bordet por su contribución al avance en el conocimiento del sistema inmunitario. Pero no es exactamente por su contribución a la inmunología por lo que traigo aquí a Bordet, sino por sus aportaciones en el campo de la bacteriología y, concretamente, en el aislamiento del microorganismo responsable de la tosferina. El propósito último de esta comunicación no es escribir exclusivamente sobre Bordet, sino usar como excusa el centenario de su “Nobel” para hablar de la tosferina, del microorganismo que la produce y, por último, de un remedio usado para aliviar los síntomas de la tosferina que fue muy popular en la España de principios del siglo XX. Todo salpicado con mucha microbiología y anécdotas históricas.



**Panel 1.** Fotografía de los principales protagonistas de esta historia. A la izquierda Jules Bordet y a la derecha Francisco Palomares. Tomadas de la Wikipedia.

### EL EMINENTE BORDET

Jules Jean Baptiste Vincent Bordet (panel 1, izquierda) era belga, a pesar de que su nombre pueda sonar a francés. Nació en 1870 en la localidad valona de Soignies. Tras superar la enseñanza secundaria, un joven Bordet de 16 años ingresa en la Facultad de Medicina de la *Université Libre de Bruxelles*, donde se graduó en 1892. En 1894, gracias a una ayuda del Gobierno belga, se trasladó a París al *Institut Pasteur* para trabajar con Élie Metchnikoff, con quien empieza a interesarse por el sistema inmunitario e investigar sobre

éste. En el año 1900 regresa a Bruselas, encargado de la dirección del *Institut Antirabique et Bactériologique du Brabant*, posteriormente *Institut Pasteur de Bruxelles*. Allí trabajó para desentrañar los aspectos más controvertidos de la inmunología de la época y empieza a colaborar con Octave Gengou. En el curso de sus trabajos, ambos aislaron el microorganismo causante de la tosferina, llamado originalmente el bacilo Bordet-Gengou. Su nombre científico actual es *Bordetella pertussis*. El nombre del Género de la bacteria,

*Bordetella*, hace referencia a Bordet, mientras que el específico, *pertussis*, hace referencia a la enfermedad, más concretamente a uno de los síntomas de la enfermedad, la tos violenta, pues *pertussis* quiere decir eso. Este término lo acuñó Thomas Sydenham en 1679. En español se usa tosferina, palabra que refiere que la enfermedad produce una tos parecida al “aullido de las fieras”, una tos *ferina*. Algo similar sucede con el nombre de la enfermedad en otros idiomas, por ejemplo, en italiano se llama “tosse canina”, en inglés “whooping

cough”, que se traduciría como “tos chillona”. En el artículo original de Bordet y Gengou, publicado en 1906 en *Annales de l'Institut Pasteur*, se habla sin embargo de [*le microbe de la coqueluche*, que es como se conoce a la enfermedad en francés. Coqueluche en francés es capucha y se usa ese nombre porque allí, en el pasado, los enfermos de tosferina estaban obligados a cubrirse con una. Coqueluche también se usa en castellano, pero se usa más frecuentemente en América del Sur que en España. Sea como fuere, en todos los idiomas nos entenderán si llamamos a la enfermedad pertussis. Bordet dejaría la dirección del Instituto en 1940, aunque siguió activamente trabajando, “contagando” su entusiasmo y pasión científica a los jóvenes. Bordet moriría en 1961.

## EL PREMIO NOBEL

Después de 4 años sin otorgarse por quedar desierto (de 1915 a 1918), Bordet recibe en 1919 el Premio Nobel “*por sus descubrimientos sobre la inmunidad*”. Concretamente, por su aportación al conocimiento sobre la inmunidad innata o, si se prefiere, el sistema del complemento. La inmunidad innata, el primer sistema que aparece en la evolución, es la primera línea de defensa que nos protege frente a los microorganismos que nos rodean. Este sistema defensivo está constituido, más allá de la barrera fisicoquímica que suponen los tejidos, por dos pilares básicos: el celular y el humoral. Sucintamente, el componente humoral está formado por un conjunto de proteínas, algunas de las cuales son termoestables y otras termolábiles; esa sutil pero importante diferencia de estabilidad es precisamente una de las muchas contribuciones hechas por Bordet al conocimiento del sistema inmunitario y que le hicieron merecedor del “Nobel”. El componente termoestable está constituido por los anticuerpos, caracterizados por su especificidad, mientras que el componente termolábil está constituido por el complemento, caracterizado por su inespecificidad. Al complemento se le llamó originariamente “alexina” por Hans Buchner; así también lo llamaría Bordet. Buchner sería el que describiera que las alexinas tenían capacidad bacteriolítica. El cambio del nombre de alexina a complemento lo hizo otro gran científico: Paul Ehrlich. Hoy en día se reconocen más de 30 proteínas diferentes del

complemento (la palabra alexina ha quedado en desuso), clasificadas en 9 grandes grupos, designados desde C1 a C9. Las proteínas del complemento sólo son funcionales tras su activación, lo que puede ocurrir por tres vías diferentes, denominadas clásica, alternativa y de unión a lectinas.

## EL MICROORGANISMO RESPONSABLE DE LA TOSFERINA

Como ya dije más arriba, al agente etiológico de la tosferina es *B. pertussis*. Se trata de una bacteria gramnegativa de pequeño tamaño (0,8X0,4 µm; por comparación, una *Escherichia coli* mide 1X2 µm), forma cocobacilar y aerobia estricta. Como es patógena, su material genético contiene numerosos genes relacionados con la virulencia, quizá el más conocido sea la toxina pertussis. La toxina tiene naturaleza proteica, en concreto es una hexámero; 5 de las 6 proteínas del hexámero son diferentes (se denominan de S1 a S5, estando una S4 repetida). *B. pertussis*, como muchos otros microorganismos patógenos, produce varios efectos fisiológicos, los más interesantes los inmunológicos. Se cree que, si no todas, la mayor parte de las actividades biológicas desencadenadas por el patógeno se deben a la toxina pertussis. La toxina es capaz de unirse a unos receptores que están presentes en la membrana de muchas células humanas diferentes. Además de esta toxina, la bacteria posee otras toxinas y otros determinantes de patogenia que contribuyen también a la virulencia del microorganismo.

## LA TOSFERINA

La enfermedad suena a pasado, a enfermedad erradicada. A esa percepción de inexistencia contribuye el hecho de que, en nuestro país, se registre un bajo número de casos anualmente, lo que en definitiva se debe a que hay una vacuna efectiva contra la misma y que su cobertura en la población española es casi del 100%. Es decir, afortunadamente la tosferina pasa desapercibida; ni siquiera sale en los medios. No obstante, en nuestro país y otros de nuestro entorno se ha detectado en los últimos años un aumento del número de casos. Se podría hablar de una reemergencia de la enfermedad, ya que en el pasado su prevalencia era muchísimo mayor.

La razón de esta reemergencia en España no se debe, a diferencia de otros países, a la bajada en la cobertura vacunal a la que están desgraciadamente avocando las intolerables, injustificables, infundadas y sin rigor científico sugerencias de los movimientos antivacunas, sino a otros factores. Debido a que el no vacunar entraña muchos riesgos, no está de más recordar que es un hecho constatado científicamente que las vacunas funcionan, son eficaces y seguras y que, desde que se vienen utilizando, han posibilitado la disminución de la mortalidad y morbilidad en la población, como demuestran los datos estadísticos. Así mismo, es necesario insistir en que al vacunar no sólo se protege a la persona que recibe la vacuna, sino que también se está protegiendo a todas aquellas personas que, por una razón u otra, no pueden vacunarse. Por eso no es exagerado decir que la vacunación es uno de los actos de solidaridad más grandes que podemos hacer.

La enfermedad es causada por la infección con la bacteria *Bordetella pertussis*. El contagio por la bacteria suele ser por el aire, a través de aerosoles conteniendo la bacteria. Hasta el 75% de las personas susceptibles a la enfermedad pueden contraerla, necesitando muy poca carga bacteriana para ello, tan poco como 140 células. La tosferina es especialmente grave en bebés, pues su sistema inmune está en desarrollo y no ataca eficientemente al microorganismo. La enfermedad cursa de la siguiente manera:

- INCUBACIÓN: durante esta fase, como en muchas infecciones microbianas, la enfermedad es asintomática; suele durar 10 días.
- CATARRAL: como su nombre indica, esta fase se confunde frecuentemente con un resfriado común, de ahí la dificultad para diagnosticar la enfermedad. Es en ese momento cuando los síntomas de la enfermedad están comenzando, caracterizados por falta de apetito, moqueo y tos leve. Suele durar entre 2 y 7 días. Esta es la fase más contagiosa.
- PAROXISMAL: es la fase grave porque es cuando aparece la tos violenta, convulsa, que suele acompañarse de vómitos. Es en este momento en el que las toxinas bacterianas se diseminan por el cuerpo del enfermo. Puede durar una semana e incluso varios meses. La tos

convulsa, característica de la tosferina, se puede observar en el siguiente video: <https://www.facebook.com/lightforriley/videos/1538734389770670/>

- CONVALECIENTE: en los casos favorables, la tos va desapareciendo poco a poco hasta que el paciente se recupera. Puede durar de varias semanas a meses.

La historia de la vacunación frente a *B. pertussis* es larga y tiene su inicio poco después del aislamiento de la bacteria, a principios del siglo XX. Al desarrollo de las sucesivas vacunas contribuyeron numerosas personas, sin embargo, hay que mencionar el trabajo de dos científicas, Pearl Kendrick y Grace Edlering quienes, en 1934, habían conseguido un preparado de vacuna obtenido a partir de la bacteria crecida en agar Bordet-Gengou y desactivada con thimerosal (un compuesto basado en mercurio). Las primeras vacunas disponibles fueron, por tanto, de células enteras, pero se sustituyeron por las acelulares, usando principalmente las diferentes toxinas del bacilo como subunidades. En España, actualmente, el calendario de vacunación de la tosferina incluye 5 dosis espaciadas en el tiempo. La vacuna es triple porque incluye, también, a la difteria y el tétano; es la vacuna conocida como DTPa (desde hace unos años la vacuna administrada en España es acelular para *B. pertussis*). LA DTPa está basada en los toxoides de los tres microorganismos: *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani* y *B. pertussis*.

No hay un tratamiento definitivo contra la enfermedad, sólo la prevención mediante vacunación. Para los aquejados de tosferina, el tratamiento más efectivo es la administración de antibióticos macrólidos (eritromicina, azitromicina, etc), aunque sólo suelen ser efectivos si la enfermedad se diagnostica y trata en sus primeras etapas. La antibioterapia se debe realizar también a las personas cercanas al paciente, para evitar que se infecten o que la infección se extienda en cadena a más individuos. Los pacientes con tosferina son infectivos desde la fase catarral hasta la tercera semana, más o menos, del comienzo del paroxismo. Si la enfermedad cursa, sus síntomas no se alivian fácilmente, así que, una vez más, la mejor opción es prevenir la enfermedad, es decir, mantener una alta tasa de cobertura vacunal en la población, sobre

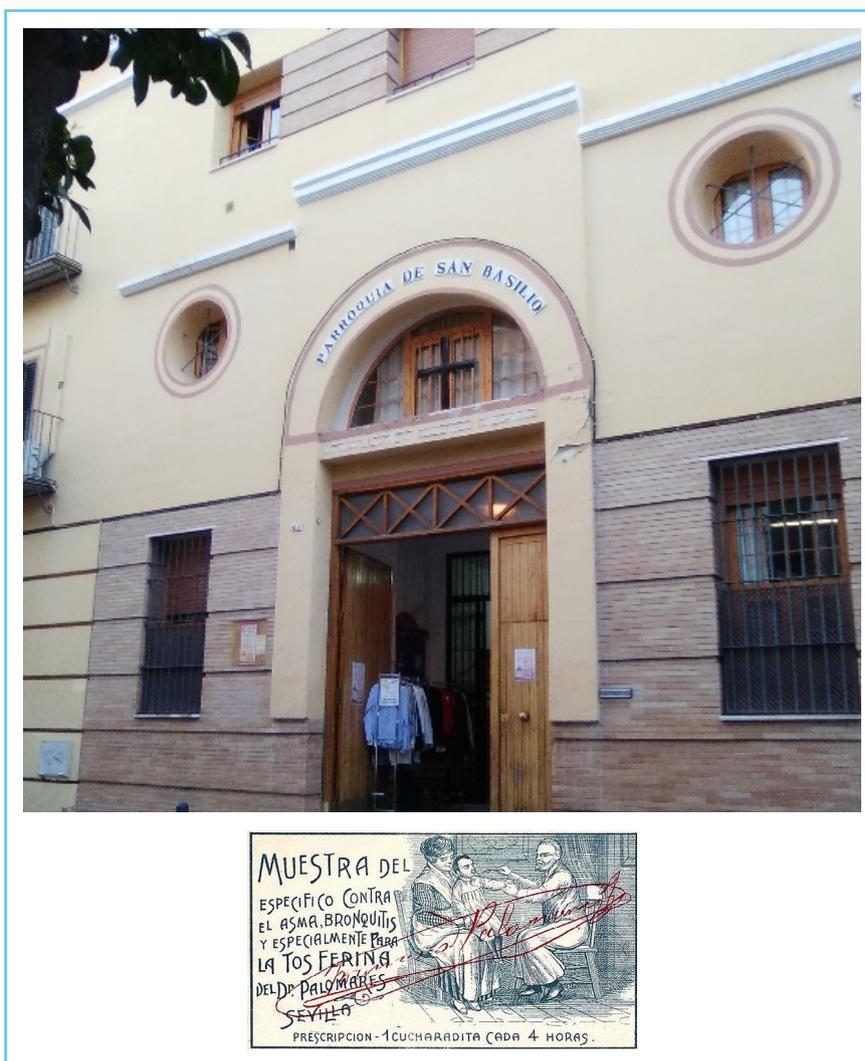
todo en bebés, niños y ancianos. La clave, por tanto, es la primovacunación y sus refuerzos.

### EL REMEDIO DE LA CALLE RELATOR

Espero haber dejado claro que aliviar los síntomas de la tos convulsa es difícil, a veces ni si quiera se consigue con los modernos anti-tusivos, corticoides o broncodilatadores más comunes. Antes de disponer de estos modernos medicamentos, los pacientes eran tratados usando remedios conteniendo plantas medicinales. Muchos de esos remedios se basaban en viejas recetas que se transmitían oralmente, otros eran formulaciones más o menos fundadas en cierto conocimiento científico. Sea

como fuere, uno de esos remedios se hizo muy popular en la España de principios del siglo XX y fue conocido como el “jarabe protestante” o “de la calle Relator”. Se conocía por esos nombres porque la persona que formuló el popular remedio fue un médico y pastor protestante que lo dispensaba en su Iglesia, sita en la calle Relator de Sevilla. Su nombre Francisco Palomares García (panel 1, derecha).

Palomares, el pastor protestante, nace en Requena (Valencia) en 1835 y muere en Sevilla en 1915. Ejerció su pastorado en la Iglesia de San Basilio (panel 2, arriba), tras la compra en 1871 del, en ruinas por aquella época, Convento de San Basilio. Situado en la calle Relator, fue en ese Convento/Colegio



**Panel 2.** El remedio de la calle Relator y la Iglesia de San Basilio. En la parte superior, fotografía de la Iglesia de San Basilio, donde se dispensaba el jarabe, que fue donde se fundó la Hermandad de la Macarena de Sevilla y es sede actual de la Iglesia Española Reformada Episcopal. En la parte inferior, fotografía de una de las etiquetas que se ponían al frasco del jarabe del doctor Palomares. Nótese la firma de Palomares, inscrita en la etiqueta de cada uno de los frascos que vendía.

de los Basilio donde se fundó en 1595 la Hermandad popularmente conocida como la Macarena. Esta Hermandad, mundialmente conocida, siempre ha procesionado por la calle Relator, excepto durante un tiempo corto coincidente con la Guerra Civil Española. Además de religioso, Palomares fue también un destacado médico en Sevilla. De hecho, estudió Medicina en la ciudad, obteniendo su título con 47 años. Parece que el religioso se hizo especialista en enfermedades respiratorias, no es extraño, por tanto, que formulara el jarabe. Como decía en su etiqueta (panel 2, abajo) [el jarabe es] “*específico contra el asma y la bronquitis y específicamente contra la tosferina*”. Se supone que el jarabe debió ser efectivo contra la tosferina (esto no ha podido ser comprobado, como tampoco ha sido posible obtener la receta) porque sevillanos y personas de lugares cercanos se acercaban a comprar el mencionado jarabe y a “*precio de costo*”. Palomares nunca hizo distinción entre personas, fueran protestantes, católicos o de otras religiones, siempre vendió su jarabe a precio de costo y con su firma manuscrita en el envoltorio (panel 2, abajo). El jarabe se hizo muy famoso y pronto fue conocido en Sevilla como el jarabe de la calle Relator o jarabe protestante. Para entender el porqué del éxito del jarabe protestante es necesario conocer, de forma sucinta, el contexto histórico de la Sevilla de finales del siglo XIX y principios del XX. Paradójicamente, ese contexto no dista mucho, salvando las distancias, del contexto actual, pues la España de la época, como la de ahora, estaba inmersa en una crisis con tres patas: económica, política y social. Las tres cosas, evidentemente, hacían que España fuera un país retrasado y poco modernizado. La higiene era pésima porque los servicios más básicos, como los de suministro de agua y alcantarillado urbano, eran pésimos. Todo eso, sumado a la incultura, falta de moralidad y hábitos de vida poco saludables, hacía que enfermedades como la fiebre tifoidea, la tuberculosis, la difteria o la tosferina, todas ellas producidas por bacterias, camparan a sus anchas. La tosferina, de hecho, llegó a ser considerada en la época una enfermedad endémica en las grandes urbes españolas, como Sevilla. Además, se producían también epidemias que generalizaban el padecimiento de la población. Así, la mortalidad y morbilidad de la España de la época era muy altas. La ciudad de Sevilla

de la época no era una excepción. A finales del siglo XIX y principios del XX alrededor del 65% de los sevillanos eran analfabetos y tenían una esperanza de vida de 35 años y una mortalidad infantil de vértigo. La ciudad era considerada una ciudad peligrosa para vivir, quizá, la tercera peor ciudad para vivir después de Bombay y Madrás, ambas en la India. En suma, no es de extrañar que en una Sevilla empobrecida y con una alta prevalencia de la tosferina, un remedio “barato”, a veces regalado, como el del doctor Palomares, tuviera éxito. Si bien, como se ha mencionado más arriba, no queda constancia de la receta del jarabe del doctor Palomares contra la tosferina, Antonio Caravaca Ramírez, en su trabajo fin de Grado titulado “El jarabe de la calle Relator”, se aventura a decir que “*Podría [el jarabe] estar compuesto de algún ingrediente narcótico (heroína, cocaína, opio, etc.), o antiespasmódico como la belladona o la grindelia, o de antipirina (usado por el señor Burgos Nevado en su jarabe contra la tos ferina) que aliviaran los espasmos de la tos, además de otros ingredientes expectorantes o suavizantes de las vías respiratorias como extractos de hierbas balsámicas y miel.*” Poco más se puede añadir. Volviendo a Palomares, queda por mencionar que dos de sus proyectos, la fundación de un Hospital y de un Museo de la Inquisición, nunca llegaron a término. Palomares creía en la necesidad de tener un Hospital, aunque fuera pequeño, un dispensario para protestantes, precisamente en un edificio donde los protestantes hubieran sufrido tormento por parte de la Inquisición. Este sueño no se hizo realidad porque los fondos que obtenía de la venta del jarabe eran, a todas luces, insuficientes. El museo de la Inquisición, como tal, tampoco llegó a existir, si bien Palomares llegó a recopilar numerosos objetos relacionados con la Inquisición y que se exponían en la sacristía de San Basilio. En la Iglesia están enterrados unos inquisidores bajo una lápida de mármol. Las piezas del “Museo” no se han conservado; ni siquiera hay constancia de que en el actual Museo de la Inquisición de Sevilla, situado en el Castillo de San Jorge, en Triana, se conserven piezas provenientes de la colección de Palomares. El doctor Palomares llegó a ser una persona muy conocida y querida en Sevilla. Por eso, el ayuntamiento de la II República le dedicó una calle (la antigua calle del Laurel, hoy Bordaador Rodríguez Ojeda), que la intolerancia de

los franquistas acabó por renombrar. Ya en democracia, el Ayuntamiento de Sevilla daría el nombre de “Doctor Palomares García” a una calle en el barrio de Sevilla Este. Si bien el doctor Palomares García fue muy conocido en Sevilla, no menos lo fue su hijo Francisco Palomares del Pino, conocido como el “Marino”. El hijo fue capitán de corbeta, torero, coleccionista, poeta y autor teatral, inventor o fundador del periódico republicano El País. Por ser fue hasta soldado voluntario en la I Guerra Mundial, la de 1914, junto al ejército francés en Verdún. Por mencionar una anécdota más del hijo, decir que inauguró la iluminación eléctrica de la Plaza de toros de la Maestranza, compartiendo cartel y haciendo el paseíllo con Lagartijo Chico y Corchaíto. Los Palomares, padre e hijo, se encuentran enterrados en el cementerio “protestante” de Sevilla. Ambos genios y figuras.

#### LECTURA ADICIONAL RECOMENDADA

Además de en la Wikipedia, podéis encontrar más información en:

- Caravaca Ramírez, A. 2016. Trabajo Fin de Grado “El jarabe de la calle relator”. Accesible a través del Depósito de Investigación de la Universidad de Sevilla en formato PDF en la dirección Web <https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/50488/Caravaca%20Ram%c3%adrez%2c%20Antonio.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bordet, J; O, Gengou. 1906. Le microbe de la coqueluche. Annales de l'Institut Pasteur 2, pp. 731-741. Accesible en <https://www.biusante.parisdescartes.fr/histoire/medica/resultats/index.php?cote=annee190604&p=1&do=page>
- Jules Bordet Biographical, The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1919. Accesible en <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1919/bordet/biographical/>
- Finger, H, von Wirsing Koenig, CH. 1996. *Bordetella*. Chapter 31, Medical Microbiology, 4th edition. Accesible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7813/>
- Nieves, DJ; Heining, U. 2016. *Bordetella pertussis*. Microbiol Spectrum 4. doi:10.1128/microbiolspec.E110-0008-2015
- Melvin, JA; Scheller, EV; Miller, JF; Cotter, PA. 2014. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. Nat Rev Microbiol 12, pp 274-288.
- Francisco Palomares García. Real Academia de la Historia. Accesible en <http://dbe.rah.es/biografias/35023/francisco-palomares-garcia>
- Zoido, A. 2017. Los dos protestantes de la calle Feria. El Correo de Andalucía. Accesible en <https://elcorreoweb.es/sevilla/los-dos-protestantes-de-la-calle-feria-YA3662274>
- La Iglesia de San Basilio. Accesible en <https://iglesiasanbasilio.es/>

## 2<sup>nd</sup> International Meeting on New Strategies in Bioremediation Processes- BioRemid-2019

Ana M. García

*Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales. Universidad Politécnica de Madrid.*



Acto inaugural de BioRemid 2019: miembros del comité organizador y científico, ponentes e investigadores participantes en el evento.

El pasado 24 y 25 de octubre se celebró con gran éxito la segunda edición del "International Meeting on New Strategies in Bioremediation Processes - BioRemid 2019" en Porto (Portugal). El lugar elegido para la reunión fue el Auditorio de la Biblioteca Municipal Almeida Garrett, situada en los Jardines del Palacio de Cristal, muy cerca del centro de la ciudad.

En esta ocasión, la organización del congreso ha sido a cargo de la Dra. Olga C. Nunes y su equipo, pertenecientes al Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Oporto (FEUP), a quien le cedió el testigo la Dra. Concepción Calvo, del Instituto de Investigación del Agua de la Universidad de Granada y miembro del grupo de Biodeterioro, Biodegradación y Bioremediación de la SEM, en la primera edición de este congreso internacional organizado hace dos años en Granada.

La reunión ha constituido el punto de encuentro de más de ciento cuarenta investigadores y representantes del sector industrial y académico, relacionados con la biorremediación de ambientes contaminados, procedentes de 16 países diferentes pertenecientes a 4 de los 6 continentes, Europa, América, Asia y África.

Durante estos dos días los asistentes han podido disfrutar del orden de 9 conferencias plenarias, 18 comunicaciones orales y más de 100 comunicaciones en formato póster, de las que se seleccionaron 9 para comunicaciones orales cortas por jóvenes investigadores. La temática, muy amplia y variada, ha cubierto aspectos como la identificación y monitoreo de contaminantes, nuevas tecnologías de biotratamiento, nuevos agentes biodegradadores y estrategias basadas en consorcios microbianos, degradación y biorremediación de contaminantes prioritarios y emergentes,

bioprosos para la recuperación de residuos destinados a la producción de materiales y energía, impactos antropogénicos en las comunidades microbianas, y modelos matemáticos para procesos de biorremediación. Todas ellas de alta calidad científica y en torno a las cuales se ha generado intenso debate.

El congreso cerró con una maravillosa conferencia abierta impartida por el Dr. Kenneth Timmis, del Instituto de Microbiología de la Universidad Técnica de Braunschweig (Alemania) en la que presentó diferentes aspectos relacionados con la necesidad urgente de educar a la sociedad en Microbiología y los beneficios que ello supondría de cara a un futuro sostenible.

El grupo de Biodeterioro, Biodegradación y Biorremediación de la SEM ha apoyado nuevamente esta iniciativa, concediendo además un premio de 300 euros a la mejor comunicación oral corta presentada por investigadores

jóvenes, titulada “Enrichment of bacterial consortia capable of biodegrading two persistent fluorinated fungicides” presentada por Diogo A. M. Alexandrino de la Universidad de Oporto (Figura 1).

Otros dos premios a comunicaciones orales cortas, de 200 euros cada uno, han sido concedidos por dos de las empresas patrocinadoras del evento, Lipor y Adventech, a Ana S. Oliveira, de la Universidad Católica Portuguesa, por la comunicación titulada “Specialized degrading granules effective for bioaugmentation of Aerobic Granular Sludge reactor treating 2-fluorophenol in wastewater” y a Roberto E. Durán, de la Universidad Técnica Federico Santa María (Chile), por la comunicación titulada “Genomic and physiological characterization of *Alcaligenes aquatilis* QD168 reveals a robust adaptive response to polluted marine environments”.

Gracias a las relaciones del Grupo BBB de la SEM con la International Biodeterioration and Biodegradation Society (IBBS), la revista International Biodeterioration and Biodegradation tiene previsto publicar un número especial dedicado al congreso recogiendo algunas de las comunicaciones presentadas en el mismo.

Continuando con la reciente tradición, la Dra. Olga C. Nunes anunció en el acto de clausura la celebración de la próxima edición de este congreso, en 2022, cuya organización correrá a cargo del Dr. Philippe Corvini, del Instituto de Ecoemprendimiento de la Univer-



Figura 1. Entrega del premio del Grupo de Biodeterioro, Biodegradación y Biorremediación de la SEM a la mejor comunicación oral corta presentada por jóvenes investigadores a Diogo A. M. Alexandrino por Ana M. García, Presidenta del Grupo.

sidad de Ciencias Aplicadas del Noroeste de Suiza, y que tendrá lugar en Basilea (Suiza).

Esperamos que esta tercera edición sea tan fascinante como ha sido BioRemid 2019.

## Nuevos socios de la SEM

- Aguilar Romero, Inés María
- Conde Martín, Ana
- Couceiro Núñez, Noelia
- Estrella González, M<sup>a</sup> José
- Fernández López, Raúl
- Gómez Limia, Lucía
- Hernández Piñeiro, Sara Belén
- Jurado Martín, Irene
- Ladero Auñón, Iraia
- Limón Mirón, M. Carmen
- López Garrido, Javier
- López Moreno, Ana
- Mari Tur, Miguel
- Martínez Gallardo, María Rosa
- Menéndez Muntaner, Ana
- Pardo Medina, Javier
- Ramírez-Durán, Ninfa
- Rodríguez Moreno, Luis
- Schäfer, Sebastian
- Siles Castellano, Ana Belén
- Toribio Gallardo, Ana Josefa

**Altas desde 30/04/2019 hasta 21/10/2019**

## REDESMI en marcha: progresando en la conservación y revalorización de los recursos genéticos españoles

Lidia Rodrigo-Torres<sup>1</sup>, Aurora Zuzuarregui Miró<sup>2</sup>,  
José Miguel López Coronado<sup>3</sup> y Rosa Aznar Novella<sup>4</sup>

*Colección Española de Cultivos Tipo. <sup>1</sup>Gestora REDESMI. <sup>2</sup>Gestora recursos microbianos CECT. <sup>3</sup>Responsable de informática y patentes. <sup>4</sup>Directora de la CECT y REDESMI*



El pasado 2 de octubre la CECT organizó la Jornada de Formación “Conservación y Gestión de Recursos Microbianos” en el Parc Científic de la Universitat de València, dirigida a los miembros de la Red Española de Microorganismos “REDESMI”. La jornada contó con 29 asistentes, representando a 18 colecciones de investigación de las 41 que

actualmente forman parte de la red (colecciones REDESMI). Dichas colecciones albergan más de 90.000 cepas de arqueas, bacterias, levaduras, hongos filamentosos, virus y microalgas.

REDESMI está apoyada por el proyecto RMP2015-00001-00-00 “Conservación

sostenible de recursos microbianos españoles bajo estándares de calidad mediante una aproximación integradora y potenciando su visibilidad”, financiado por la Agencia Estatal de Investigación a través del INIA con fondos FEDER, siendo esta Jornada de Formación una de las tareas planteadas en dicho proyecto. Además, actualmente REDESMI

está integrada en la web de MicroBioSpain ([www.microbiospain.org](http://www.microbiospain.org)), una Red de Excelencia financiada por el proyecto CGL2016-81969-REDT "MicroBioSpain, integración de la red española de microorganismos "REDESMI" en la Infraestructura Europea de Investigación "Microbial Resource Research Infrastructure, MIRRI" que tiene como objetivo la creación del nodo español de MIRRI (Microbial Resource Research Infrastructure, [www.mirri.org](http://www.mirri.org)) y en la que participan 8 instituciones (BEA-ULPGC, CECT-UV, CIAL, IATA, INIA, IPLA, IRTA y CNTA), todas ellas cuentan con CC públicas y/o de investigación. MIRRI es una Infraestructura de Investigación Europea encaminada a facilitar el acceso a los recursos microbianos e impulsar la investigación e innovación de base microbiológica. La visión de MIRRI es ser una plataforma única, paneuropea y de alto rendimiento que aporte valor añadido a la biodiversidad microbiana y que facilite la explotación de recursos y conocimientos para impulsar la bioeconomía y las biociencias.

En línea con MIRRI, a nivel nacional REDESMI tiene como objetivo situar en el mapa las colecciones de microorganismos que guardan los investigadores en sus laboratorios y hacerlas visibles tanto a la comunidad científica como a la industria agroalimentaria y biotecnológica, en general. En este sentido, la CECT, como líder del proyecto, se encarga de: i) buscar dichas colecciones, contactando con los investigadores, ii) dar apoyo y formación en buenas prácticas y aspectos legales, para su manejo y iii) desarrollar herramientas para facilitar su gestión, así como visibilizar las cepas que conservan. La Jornada de Formación se centró en estos dos últimos puntos, con charlas impartidas por el personal de la CECT.

Ma Carmen Macián ([macianro@cect.org](mailto:macianro@cect.org)) y Laura López ([hongos@cect.org](mailto:hongos@cect.org)), *curator*

de procariotas y eucariotas, respectivamente (CECT-UV), explicaron las diferentes metodologías de conservación empleadas en la CECT como "**Buenas prácticas en la conservación de Microorganismos**" para preservar la viabilidad de las cepas en el tiempo, evitando en lo posible la deriva genética, y comentaron las buenas prácticas de conservación y gestión que exigen las normativas en cuanto a gestión de calidad, bioseguridad y bioprotección.

Aurora Zuzuarregui ([azuzuarregui@cect.org](mailto:azuzuarregui@cect.org)), gestora de recursos microbianos (CECT-UV), centró su charla sobre "**Aspectos legales del uso de recursos microbianos**" en el Protocolo de Nagoya, describiendo la normativa española y europea derivadas del mismo, y que tratan sobre el acceso a los recursos genéticos para su utilización, con fines comercial y no comercial, y al reparto justo y equitativo de los beneficios que se deriven de ella. "Utilización" en este contexto se entiende como la realización de investigación sobre la composición genética o bioquímica del recurso. Se presentaron los tres documentos fundamentales para el cumplimiento de la legislación y que se deben conservar durante al menos 20 años después de la última utilización: i) PIC "*Prior Informed Consent*", o solicitud de acceso; ii) MAT "*Mutually Agreed Terms*", o condiciones mutuamente acordadas; iii) IRCC "*Internationally Recognized Certificate of Compliance*", que recopila la información del PIC y el MAT y es accesible a través de la plataforma de absch (<https://absch.cbd.int/>). Toda la información referida al Convenio de la Diversidad Biológica, al Protocolo de Nagoya y a la normativa española y europea está disponible en la página web del Ministerio de Transición Ecológica, apartado Biodiversidad, subapartado [Recursos Genéticos](#).

José Miguel López ([jmlopez@cect.org](mailto:jmlopez@cect.org)), responsable de informática y patentes (CECT-UV), presentó la "**Aplicación web**", desarrollada en el marco del proyecto, con la que se generará un catálogo público de cepas disponible a través de [www.microbiospain.org/servicios-cepas/](http://www.microbiospain.org/servicios-cepas/) (de modo similar al catálogo de la CECT). En este catálogo, los interesados podrán: i) buscar cepas con alguna característica biotecnológica de interés; ii) conocer el grupo de investigación y centro que custodia dichas cepas y, con ello; iii) contactar directamente con el grupo para solicitar la cepa, establecer colaboración, etc. Además, permitirá la gestión interna de las colecciones i.e. localización de la cepa, datos sobre la viabilidad, conservación, etc., lo que es imprescindible cuando se maneja un número elevado y creciente de cepas, y que las asistentes recibieron con gran interés. La aplicación estará disponible públicamente y mostrará los "Términos de Uso" que deberán ser aceptados previamente al acceso. Será de uso gratuito para las colecciones de REDESMI, mientras dure el proyecto, y se prevé establecer una tarifa mínima para garantizar su mantenimiento sostenible a largo plazo.

Desde la CECT animamos a los investigadores que conservan colecciones de microorganismos en sus centros a que se unan a REDESMI, beneficiándose de este modo de los resultados de este proyecto, y al mismo tiempo, contribuyan a la conservación y revalorización de los recursos microbianos españoles. Puedes encontrar más información en [www.microbiospain.org](http://www.microbiospain.org), y en Facebook y twitter: @MicroBioSpain.

\*Las presentaciones de la jornada estarán disponibles en la página web de MicroBioSpain ([www.microbiospain.org](http://www.microbiospain.org)).

# 25 años del grupo de Microbiología Molecular

Adela González de la Campa

Presidenta del grupo



Figura.1. Lugar y año de celebración de las reuniones del grupo desde su creación.



El grupo de Microbiología Molecular está compuesto por grupos que estudian procesos microbiológicos desde el punto de vista molecular. Los microorganismos y los procesos

estudiados son diversos, aunque el enfoque y los métodos de estudio confluyen. Esto hace que se establezcan colaboraciones e interacciones continuas entre los grupos. El grupo especializado comenzó su actividad el 11 de abril de 1995. Dentro de la SEM es uno de los grupos más numerosos. Su número de socios es actualmente de 334, cifra que ha ido aumentando constantemente desde su creación. La mayoría de los socios del grupo trabajan en Universidades (63%) y un 23% en Organismos Públicos de Investigación. El resto está dividido entre hospitales (5%),

Presidente	Lugar de trabajo	Fecha
Josep Casadesús Pursal	Sevilla	1995 – 2000
Antonio Juárez Giménez	Barcelona	2000 – 2004
Juan M <sup>a</sup> García Lobo	Cantabria	2005 – 2008
María Molina Martín	Madrid	2009 – 2013
Bruno González Zorn	Madrid	2014 – 2018

empresas (4%), centros extranjeros (3%), o fundaciones (2%).

A lo largo de estos años el grupo ha tenido cinco presidentes (Tabla) que han sido un estímulo para el mismo y a los que todos agradecemos su dedicación. Es un grupo muy activo, que ha celebrado doce reuniones (Figura 1), gracias a la excelente disposición y duro trabajo de sus organizadores. La próxima reunión se celebrará en Granada en

septiembre de 2020 (Figura 2), estáis todos invitados a participar.

En todas estas reuniones ha habido una amplia participación, con charlas invitadas para científicos establecidos y charlas de trabajo para los investigadores más jóvenes, todo ello en un ambiente cordial, amigable y estimulante.

Además, se han concedido 5 premios financiados por la empresa Biomedal para

artículos originales publicados durante los dos años previos a la reunión, realizados total o parcialmente en un laboratorio ubicado en España. Las publicaciones seleccionadas, todas excelentes fueron las siguientes:

- I. **Barcelona 2010. Selva L, Viana D, Regev-Yochay G, Trzcinski K, Corpa JM, Lasa I, Novick RP, Penadés JR.** (2009). Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 1234-1238.
- II. **Palma de Mallorca 2012. Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A, Pignatelli M, Mira A.** (2012). The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* 2012 6:46-56.
- III. **Segovia 2014. MA Sánchez-Romero y J Casadesús** (2014). Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:355-60.
- IV. **Sevilla 2016. Cota I, Sánchez-Romero MA, Hernández SB, Pucciarelli MG, García-del Portillo F, Casadesús J.** Epigenetic control of *Salmonella enterica* O-antigen chain length: a tradeoff between virulence and bacteriophage resistance. *PLoS Genet* 11:e1005667.
- V. **Zaragoza 2018. Castañeda-García A, Prieto AI, Rodríguez-Beltrán J, Alonso N, Cantillon D, Costas C, Pérez-Lago L, Zegeye ED, Herranz M, Płociński P, Tonjum T, García de Viedma D, Paget M, Waddell SJ, Rojas AM, Doherty AJ, Blázquez J.** A non-canonical mismatch repair pathway in prokaryotes. *Nature Comm* 8: 14246.

**SEM**

**ANUNCIO**

**La próxima reunión de Microbiología Molecular se celebrará en Granada los días 7 al 9 de septiembre de 2020**

**MICROBIOLOGÍA MOLECULAR**

**Granada 2020**  
XIII Reunión

Para más info: [micromol2020.eez.csic.es](http://micromol2020.eez.csic.es)  
Estáis todos invitados!  
(o seréis todos bienvenidos, para que no haya confusión...)

Figura 2. Anuncio de la próxima reunión del grupo.

En este número especial se presenta la actividad de 26 grupos, algunos representados en el especial de 2014 y otros no representados entonces. El interés y la cali-

dad del trabajo realizado por los diferentes grupos queda patente en estas presentaciones y está avalada por las publicaciones presentadas.

# Bases moleculares de la acción de antimicrobianos en estreptococos

Adela González de la Campa

Unidad de Genética Bacteriana, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Crtra Majadahonda-Pozuelo Km 2, 28220 Madrid



Foto del grupo: De izquierda a derecha. Detrás: María José Ferrándiz, Mónica Amblar, Adela González de la Campa, María Teresa García. Delante: Miriam García López, Patricia Rabanal

Nuestro grupo estudia desde hace más de 20 años los mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias patógenas Gram-positivas, especialmente *Streptococcus pneumoniae* (SPN), mediante una combinación de estudios moleculares básicos y otros más aplicados (epidemiología, emergencia *in vivo* de resistencia durante el tratamiento antibiótico), incluyendo tanto antimicrobianos utilizados para el diagnóstico (optoquina) como otros utilizados en el tratamiento de infecciones (principalmente las fluoroquinolonas levofloxacin y moxifloxacin), o no utilizados todavía como la seconeolitsina. Los objetivos

del grupo son conocer las bases moleculares de la acción de antimicrobianos así como buscar nuevos compuestos y nuevas dianas de acción. El grupo está formado actualmente por un Investigador Científico del CSIC (Adela González de la Campa), dos Científicas Titulares del ISCIII (María José Ferrándiz y Mónica Amblar), una profesora contratada doctor de la UCM (María Teresa García), una contratada predoctoral (Miriam García López) y una estudiante TFG (Patricia Rabanal).

En los últimos diez años nos hemos centrado en el estudio de la organización topo-

lógica del cromosoma de SPN, un aspecto fundamental para el desarrollo de nuevos antimicrobianos y para la mejora del tratamiento antibiótico. El cromosoma presenta una compactación (de hasta 1000-veces) óptima para armonizar su replicación, segregación cromosómica y expresión génica. Dicha compactación está mediada tanto por el nivel de superenrollamiento del DNA (SC) como por la asociación de proteínas de unión al nucleóide (NAPs). El nivel de SC en SPN depende principalmente de las actividades enzimáticas de sus DNA topoisomerasas, alcanzándose un equilibrio homeostático por

las actividades opuestas de las topoisomerasas que relajan el DNA (topoisomerasas I y IV), y de la girasa, que introduce SC negativo. Las fluoroquinolonas (FQs) inhiben la girasa y la Topo IV formando un complejo ternario enzima-DNA-FQ que produce roturas de cadena doble. La resistencia a FQs se origina principalmente por la alteración de sus dianas moleculares, bien por mutación puntual o por transferencia horizontal intraespecífica o interespecífica con estreptococos comensales. La expulsión de FQs fuera de la célula juega también un papel en la resistencia en SPN. Hemos demostrado que alteraciones en una estructura de tipo tallo-lazo localizada en posición 3' de *patAB*, que codifica un transportador de tipo ABC, confieren expresión aumentada de dichos genes e incremento de la resistencia a FQs.

El genoma de SPN es relativamente pequeño (~2 Mb para SPN frente a ~4.6 Mb para *Escherichia coli*), rico en AT (60%), y codifica muy pocas NAPs. Nosotros hemos caracterizado la proteína HU, la única NAP clásica descrita en SPN, que contribuye a la compactación cromosómica. El cromosoma se organiza en varios niveles de compactación según el tamaño de las unidades que los constituyen: macrodominios (rango de megabase) y dominios de SC (rango de Kb, bucles aislados). La disponibilidad de fármacos que inhiben cada una de las topoisomerasas de SPN, nos ha permitido analizar el transcriptoma de SPN en condiciones de cambio local o global del nivel de SC y definir dominios de SC, cuyos genes presentan transcripción coordinada y funciones similares. Las FQs producen cambios locales del SC que inducen alteraciones en el transcriptoma que afectan al 5.2% (levofloxacina) y 6.5% (moxifloxacina) del genoma. Ambas FQs, mediante la regulación de la transcripción de rutas metabólicas diferentes, producen un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) que contribuyen a la letalidad, de acuerdo con el modelo general de acción de antibióticos bactericidas. Estas ROS son fundamentales en el efecto post-antibiótico de las FQs. Por otra parte, la inducción de cambios globales

en SC por novobiocina (inhibidor de GyrB), o por seconolitsina (inhibidor de Topo I), nos ha permitido definir dominios de SC. Los cambios globales del SC incluyen la regulación de los genes de sus topoisomerasas: su disminución activa la transcripción de los genes de la girasa (*gyrA*, *gyrB*) e inhibe los de la de Topo IV (*parEC*) y la Topo I (*topA*); el aumento del SC regula la expresión de *topA*. La disminución del SC afecta al 37% del genoma, con >68% de los genes agrupados en 15 dominios. El incremento del SC afecta al 10% del genoma, con 25% de los genes agrupados en 12 dominios. Los dominios definidos en estas situaciones opuestas solapan en su mayoría, lo que indica que el cromosoma está organizado en dominios de SC con localización fija. Según su respuesta a disminución de SC, el cromosoma de SPN está organizado en 5 tipos de dominios: activados (UP), inhibidos (DOWN), no regulados con posición conservada (pcNR), no regulados con posición variable (pvNR), y ricos en AT (ATr). El contenido en AT en el genoma se correlaciona con los dominios, siendo más alto en los dominios UP que en los DOWN. Los dominios ATr contienen los genes menos transcritos y podrían tener una función estructural. Los genes de los diferentes dominios muestran características funcionales específicas, lo que sugiere que han estado sometidos a una presión selectiva de carácter topológico que ha llevado a definir la localización de genes implicados en metabolismo, virulencia y competencia.

En cuanto a la regulación del SC, la transcripción de *gyrB* y *topA* en SPN está regulada por su localización estratégica en el cromosoma en dominios: *topA* en un dominio DOWN y *gyrB* en un dominio UP. Sin embargo, la transcripción de *parEC* y de *gyrA* depende de señales específicas en sus regiones promotoras. La región promotora de *gyrA* presenta una curvatura intrínseca que actúa como un activador *per se* y es un sensor del nivel de SC, que regula su transcripción. Además, Topo I se une a la curvatura del promotor de *gyrA*. Por tanto, Topo I, cuya transcripción está regulada por niveles de SC, parece ser el ele-

mento clave en la regulación de la expresión de *gyrA*.

## PUBLICACIONES RECIENTES REPRESENTATIVAS DEL GRUPO

**Ferrándiz MJ, de la Campa AG.** (2014). The fluoroquinolone levofloxacin triggers the transcriptional activation of iron transport genes that contributes to cell death in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:247-257.

**Domenech A, Tirado-Vélez JM, Fenoll A, Ardanuy C, Yuste J, Liñares J, de la Campa AG.** (2014). Fluoroquinolone-resistant Pneumococci: dynamics of serotypes and clones in Spain in 2012 compared with those from 2002 and 2006. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:2393-2399.

**Ferrándiz MJ, Arnanz C, Martín-Galiano AJ, Rodríguez C, de la Campa AG.** (2014). Role of global and local topology in the regulation of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS ONE.* 9: e101574

**Ferrándiz MJ, Martín-Galiano AJ, Arnanz C, Zimmerman T, de la Campa AG.** (2016). Reactive oxygen species contribute to the bactericidal effects of the fluoroquinolone moxifloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 60:409-417

**Ferrándiz MJ, Martín-Galiano AJ, Arnanz C, Camacho-Soguero I, Tirado-Vélez JM, de la Campa AG.** (2016). An increase in negative supercoiling in bacteria reveals topology-reacting gene clusters and a homeostatic response mediated by the DNA topoisomerase I gene. *Nucl Acids Res.* 44:7292-7303 (2016).

**Brito L, Wilton J, Ferrándiz MJ, Gómez-Sanz A, de la Campa AG, Amblar M.** (2017). Absence of tmRNA has a protective effect against fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae* *Front Microbiol.* 7:2164.

**Martín-Galiano AJ, Ferrándiz MJ, de la Campa AG.** (2017). Bridging chromosomal architecture and pathophysiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Genome Biol Evol.* 9:350-361.

**Alvarado M, Martín-Galiano AJ, Ferrándiz MJ, Zaballos A, de la Campa AG.** (2017). Upregulation of the PatAB transporter confers fluoroquinolone resistance to *Streptococcus pseudopneumoniae*. *Front Microbiol.* 8:2074.

**Ferrándiz MJ, Carreño D, Ayora S, de la Campa AG.** (2018). HU of *Streptococcus pneumoniae* is essential for the preservation of DNA supercoiling. *Front Microbiol.* 9:493

**García MT, Valenzuela MV, Ferrándiz MJ, de la Campa AG.** (2019). Reactive oxygen species production is a major factor directing the post-antibiotic effect of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 63:e00737-19

# Grupo de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Biosanitarias de la Universidad Francisco de Vitoria (IIB-UFV)

Olga Zafra; Alba Blesa; Estela Pérez-Lago; María Arroyo-Hernández; Raquel Francisco; Daniel García; Cruz Santos



Instituto de Investigaciones Biosanitarias, Universidad Francisco de Vitoria,  
Carretera Pozuelo-Majadahonda Km 1.8, Pozuelo de Alarcón (Madrid), 28223, España



Miembros del grupo de investigación. Investigador principal Dr. Cruz Santos (en el extremo derecho). En la fotografía, de izquierda a derecha: Daniel García, Dra. Estela Pérez-Lago, Raquel Francisco, Dra. María Arroyo, Dra. Olga Zafra, Dra. Alba Blesa y Dr. Cruz Santos

Colaboradores: Dra. Fátima López Fabal (Hospital Universitario de Móstoles, Madrid), Marina Peñuelas (Hospital San José, Madrid) y Dr. Francisco Javier Candel (Hospital Clínico San Carlos, Madrid)

El grupo de Biotecnología Microbiana, creado hace 10 años, es un grupo estable de investigación dentro del Instituto de Investigaciones Biosanitarias adscrito a la Facultad de Ciencias Experimentales de la UFV (IIB-UFV). El grupo se ha centrado en el empleo y estudio de microorganismos de interés en el sector alimentario y en el clínico.

## INVESTIGACIÓN EN EL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA

Los proyectos asociados al área de microbiología alimentaria giran en torno a la función y aplicación de levaduras durante la elaboración del vino y en la determinación de compuestos funcionales.

El proyecto de levaduras “Estudio del potencial fermentativo y biotecnológico de levaduras vínicas de tipo no *Saccharomyces*”, ha permitido desarrollar un procedimiento de diferenciación de especies y cepas en base al uso de marcadores moleculares AFLP. Además, se ha diseñado un método para identificar levaduras en muestras complejas de

mosto de uva sin necesidad de aislamiento y cultivo microbiológico previo. Este procedimiento ha sido patentado en la Oficina Española de Patentes y Marcas con referencia nº 201500058. Este proyecto ha dado lugar a la tesis doctoral titulada "Identificación de levaduras indígenas mediante AFLP y estudio de su influencia en fermentaciones dirigidas para la obtención de vinos de autor" que defendió el Dr. Ignacio Baselga en la UFV en 2017.

Esta técnica se está aplicando en otro proyecto dirigido a la caracterización molecular de variedades de hongos comestibles. El proyecto se realiza con financiación y en colaboración con la empresa Gurelan S. Coop. y el objetivo es definir patrones moleculares que permitan diferenciar variedades de champiñón de la especie *Agaricus bisporus*.

En colaboración con la empresa Mostos Españoles S. A se está realizando un proyecto dirigido a caracterizar y cuantificar el contenido en polifenoles del mosto de uva concentrado de aplicación en alimentación. Este producto natural se utiliza como base en muchos productos alimentarios, siendo especialmente demandado en los productos infantiles. Por ello, el objetivo de este proyecto es determinar cómo afecta el proceso de concentración del mosto al contenido en polifenoles, compuestos naturales antioxidantes altamente demandados en el sector alimentario. Este trabajo constituye la investigación de tesis doctoral de Daniel García.

## INVESTIGACIÓN EN EL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

En el año 2017 se inició un proyecto de investigación cuyo objetivo es la caracterización genotípica y fenotípica de bacterias entéricas multirresistentes a antibióticos. El proyecto aborda el estudio de enterobacterias patógenas resistentes a carbapenemos, antibióticos de última generación, aisladas en la Comunidad de Madrid. La diseminación de

genes de resistencia a antimicrobianos entre las bacterias patógenas es un grave problema de salud pública, de ahí la necesidad creciente de investigar en esta área. Se ha trabajado con 30 aislados hospitalarios de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenemos. El objetivo del proyecto reside en incrementar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares que permiten la adquisición y diseminación de factores de resistencia a antibióticos en bacterias patógenas y el papel que pueden jugar otros factores de virulencia. A partir de los datos fenotípicos obtenidos mediante el sistema VITEK-2 (Biomérieux) en el hospital de Móstoles, se han seleccionado 11 cepas de *K. pneumoniae* y se ha realizado la caracterización molecular mediante PCR. Los datos obtenidos han permitido identificar cepas que portan más genes de resistencia de los que inicialmente se pensaba. El análisis fenotípico ha mostrado que algunas cepas forman más biopelícula y tienen mayor resistencia a radiación UV que la cepa control sin resistencias antibióticas, pero en ningún caso estos fenotipos se asocian a un coste de *fitness* ni una mejora de la resistencia a antibióticos. Este trabajo se amplió con cepas resistentes a carbapenemos del género *Enterobacter* provenientes también del Hospital de Móstoles en Madrid y la caracterización de aislados panresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, potencialmente portadores de una metalocarbapenemasa en los que se sospecha una interacción sinérgica entre este enzima y la expresión de la  $\beta$ -lactamasa AmpC.

Actualmente se está avanzando en la caracterización de los aislados de *K. pneumoniae* y *P.aeruginosa* centrándonos en el análisis de expresión de genes de resistencia a antibióticos y genes relacionados con capacidades ecológicas importantes en la patogénesis como son la formación de biofilm, la expresión de competencia, la resistencia a ROS, etc. Se pretende determinar si estas características se relacionan con la resisten-

cia a antibióticos y su grado de implicación en la supervivencia de unos aislados clínicos frente a otros. Todo ello se está realizando en distintas condiciones de crecimiento, algunas de ellas simulando tratamientos antibióticos fallidos o abandonados por los pacientes (cantidades subinhibitorias de antibióticos) para poder recrear en cierta manera el comportamiento de los patógenos ante posibles escenarios de infección.

Además, se está iniciando un proyecto de producción de anticuerpos bifuncionales de tipo *nanobody* para uso terapéutico, en sistemas bacterianos, concretamente en *E.coli*. Este tipo de anticuerpos se están utilizando como fármacos en tratamientos altamente específicos frente a determinados tipos de cáncer. El proyecto se está desarrollando con el apoyo de la Cátedra Merck-UFV recientemente creada.

## REFERENCIAS SEÑALADAS

- García, D.J., Calzada, J., Martín Saborido, C., Santos, C.** (2019) Grape polyphenols arrest *in vitro* proliferation of human leukemia cells. A systematic review and meta-analysis. Enviado a publicar.
- Baselga, I., Zafra, O., Pérez Lago, E., Francisco-Álvarez, R., Rodríguez-Tarduchy, G., Santos, C.** (2017). An AFLP based method for the detection and identification of indigenous yeast in complex must samples without a microbiological culture. *Int. J. Food Microbiol.* 241: 89-97.
- Calzada, J., Baselga, I., Lago, E. P., Francisco-Álvarez, R., González, A., Rodríguez-Tarduchy, G., Santos, C.** (2013). Influence of indigenous non-Saccharomyces yeast on the aromatic profiles of red wines. *Proceedings of the 36th World Congress of Vine and Wine.*
- Baselga, I., Lago, E. P., de Laorden, E. H., Francisco-Álvarez, R., Rodríguez-Tarduchy, G., Iglesias, M., Santos, C.** (2012). Molecular characterization of indigenous yeast strains isolated from Ribera de Duero Spanish wineries. *Oeno* 2011. pp. 529 - 534. Dunod Ed.

**Patente Nacional 201500058:** Método de identificación de cepas de levaduras vínicas a partir de muestras de mosto. Fecha concesión: 18-02-2017.

## Grupo de Genética de Micobacterias

Carlos Martín<sup>1</sup>, Jesús Gonzalo-Asensio<sup>1</sup>, José Antonio Aínsa<sup>1</sup>,  
Santiago Ramón-García<sup>2</sup>, Nacho Aguiló<sup>1</sup>, Sofía Samper<sup>3</sup> e Isabel Otal<sup>1</sup>

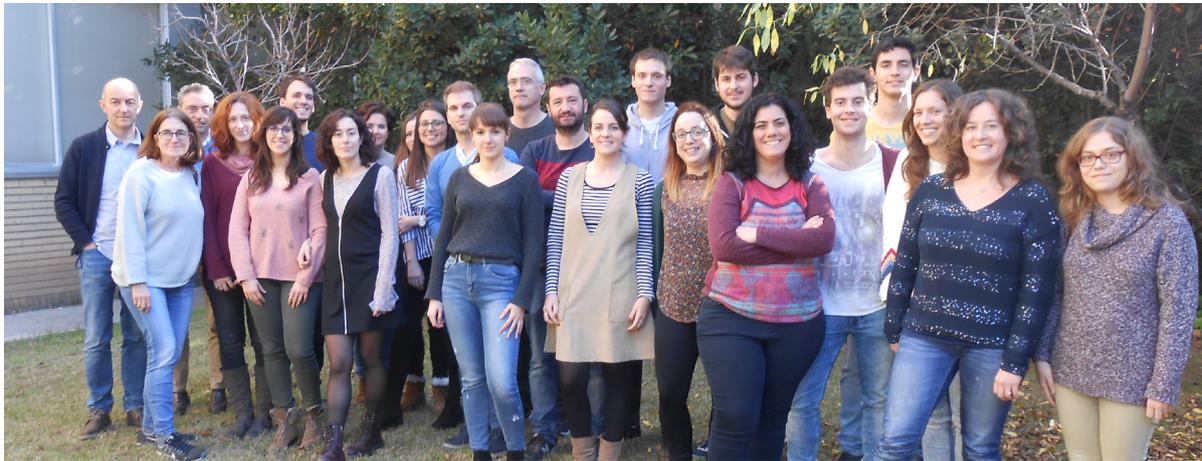
carlos@unizar.es  
jagonzal@unizar.es  
ainsa@unizar.es  
santiramon@unizar.es  
naguilo@unizar.es  
ssamper.iacs@aragon.es  
otali@unizar.es

<sup>1</sup>Universidad de Zaragoza

<sup>2</sup>Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID)

<sup>3</sup>Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud

De izquierda a derecha: José Antonio Aínsa, Sofía Samper, Carlos Martín, Ainhoa Lucia, Marta Gómara, Santiago Ramón-García, Lara Muñoz, Isabel Otal, Dessislava Marinova, Ana Cristina Millan, Jesús Gonzalo-Asensio, Elena Mata, Santiago Uranga, Nacho Aguiló, Clara Aguilar, José Manuel Ezquerro, Esther Broset, Eduardo Moreo, Begoña Gracia, Ernesto Anoz, Juan Calvet, Ana Picó, Ana Belén Gómez y Jessica Comín.



El Grupo de Investigación “Genética de Micobacterias” de la Universidad de Zaragoza, y perteneciente al CIBER de Enfermedades Respiratorias del Instituto de Salud Carlos III y al Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón, está formado por cinco equipos de investigación coordinados e interdisciplinarios que trabajan en descifrar aspectos clave de la biología de *Mycobacterium tuberculosis*, la bacteria que causa la tuberculosis, y de otros microorganismos patógenos.

### SITUACIÓN ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis (TB) ha sido a lo largo de la historia la enfermedad infecciosa más mortal, hoy lo sigue siendo al cobrarse 1,6 millones de vidas. Además, 1.700 millones de personas, la cuarta parte de la población mundial, está infectada de forma latente y tiene el riesgo de poder reactivarse en cualquier momento de la vida. Aún más alarmante es la aparición de cepas resistentes a los, ya de por sí escasos, fármacos antituberculosos que hacen que el tratamiento sea difícil o incluso imposible.

A este hecho hay que sumarle la dificultad para encontrar nuevos fármacos y la relativa facilidad con que la bacteria de la tuberculosis desarrolla resistencia a los mismos. La epidemia de la TB se mantiene a pesar de existir una vacuna, denominada BCG. Esto se debe a la eficacia de BCG en la prevención de la tuberculosis pulmonar en niños, pero a su gradual pérdida de eficacia en adolescentes y adultos (WHO 2018).

### EQUIPO “NUEVAS VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS” IP: CARLOS MARTÍN

Después de casi 20 años de descubrimiento, caracterización y desarrollo preclínico, MTBVAC es la única vacuna viva atenuada basada en el patógeno humano (*M. tuberculosis*) que ha entrado en ensayos clínicos como vacuna preventiva contra la tuberculosis (TB). Nuestros estudios están enfocados a descifrar los mecanismos moleculares de atenuación y protección de MTBVAC, tratando de identificar posibles biomarcadores de protección que puedan ayudar a acelerar los ensayos de eficacia. Tras los buenos resultados sobre seguridad

en adultos en Suiza (Fase clínica 1a) (Spertini *et al.*, 2015), se ha demostrado que MTBVAC es además una vacuna segura y más inmunogénica que BCG en recién nacidos en un país endémico de TB como Sudáfrica (Fase 1b) (Tameris *et al.*, 2019). En 2019, MTBVAC han comenzado dos Fases clínicas 2a en recién nacidos y adolescentes en Sudáfrica y esperamos que en 2021 MTBVAC puedan comenzar los ensayos de eficacia de Fase 3.

Completa el equipo Dessislava Marinova.

### EQUIPO “EVOLUCIÓN PATO-ADAPTATIVA DEL COMPLEJO M. TUBERCULOSIS A SU HOSPEDADOR” IP: JESÚS GONZALO-ASENSIO

La TB afecta a humanos pero también a varias especies de mamíferos. Sus agentes causales se engloban dentro del Complejo *M. tuberculosis* (MTBC). El MTBC comprende 8 linajes con una homología mayor al 99.95% a nivel genómico. Esto unido a la ausencia de factores de virulencia “clásicos” o la falta de eventos de transferencia genética horizon-

tal, hace que comprender los mecanismos de adaptación patógeno-hospedador sea un reto. Nuestro equipo ha descifrado como un polimorfismo en el sistema de virulencia PhoPR ocasiona su pérdida de funcionalidad en la bacteria causante de la TB bovina (*M. bovis*) respecto al patógeno humano (*M. tuberculosis*) (Gonzalo-Asensio *et al.*, 2014). Paralelamente hemos observado cómo la dinámica de transposición del transposón IS6110 es específica de cada linaje del MTBC (Gonzalo-Asensio *et al.*, 2018). Ambos hallazgos nos han permitido descifrar las bases moleculares de la adaptación de una extraña cepa de *M. bovis* capaz de transmitirse entre humanos.

Completan el equipo Irene Pérez, Juan Calvet, Elena Campos y Ana Picó.

### EQUIPO “D<sup>2</sup>AMR: DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE ANTIMICROBIANOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA” IPS: JOSÉ ANTONIO AÍNSA CLAVER Y SANTIAGO RAMÓN-GARCÍA

Una de las formas efectivas de hacer frente a las enfermedades infecciosas es mediante la administración de terapias antimicrobianas, aunque la aparición de bacterias resistentes a antimicrobianos está poniendo en peligro esta opción terapéutica. Las principales líneas de investigación del equipo D<sup>2</sup>AMR incluyen la caracterización de mecanismos de resistencia intrínseca a antimicrobianos, descubrimiento y desarrollo pre-clínico de compuestos bio-activos como nuevos antimicrobianos, reposicionamiento de fármacos con aplicaciones antimicrobianas basado en el sinergismo, nanopartículas como vehículos de fármacos antimicrobianos y el desarrollo de modelos farmacológicos dinámicos para el estudio de la actividad de los antimicrobianos (Gómara *et al.*, 2019; Aguilar-Pérez *et al.*, 2018)

Nuestras investigaciones se centran principalmente en *M. tuberculosis*, en micobacterias no-tuberculosas como *M. abscessus*, *M. kansasii* y *M. ulcerans*, y en bacterias Gram-positivas o Gram-negativas con resistencia múltiple a antibióticos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter pylori* y *Klebsiella pneumoniae*, entre otras.

Completan el equipo Ainhoa Lucía, Begoña Gracia, Ernesto Anoz, Lara Muñoz, Ana

Cristina Millán, Marta Gómara, José Manuel Ezquerro, y M<sup>a</sup> Pilar Arenaz.

### EQUIPO “INMUNO-PATOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS” IP: NACHO AGUILÓ

Además del desarrollo de nuevas vacunas de tuberculosis, existe en el campo un interés por estudiar nuevas rutas de inoculación para hacer más efectivas las vacunas existentes. En este sentido, la vía de inoculación pulmonar ha demostrado en diferentes modelos animales ser más efectiva que la intradérmica, que es la utilizada en la actualidad con la BCG. El hecho de mimetizar con la vacunación la vía de infección de tuberculosis hace que se estimulen en los pulmones diferentes mecanismos inmunes a nivel local que frenan eficientemente la infección. Nuestro grupo ha estudiado en modelos de ratón el uso de vacunas vivas atenuadas, como BCG o MTBVAC, administradas por vía intranasal, observando que esta vía de administración estimula en los pulmones una respuesta inmune local que no se obtiene cuando los ratones se vacunan por vía intradérmica, destacando el papel de la IL17 y las inmunoglobulinas secretoras (Aguilo *et al.*, 2014; Aguilo *et al.*, 2016). Estos resultados fueron recientemente demostrados en un modelo de tuberculosis en primates no humanos.

Completan el equipo Santiago Uranga, Raquel Tarancón, Elena Mata, Eduardo Moreo, Claudia Guerrero y Ana Belén Gómez.

### EQUIPO “EPIDEMIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS Y MECANISMOS DE LATENCIA” IPS: SOFÍA SAMPER E ISABEL OTAL

Mediante estudios moleculares somos capaces de diferenciar las distintas cepas del MTBC (tipificación genómica), clasificarlas en distintos linajes y analizar su evolución. Esto tiene numerosas aplicaciones como los estudios de brotes, diferenciar transmisión reciente de reactivación, estudios poblacionales y vigilancia epidemiológica. Con el fin último de disminuir la tasa de incidencia de la TB, colaboramos con las autoridades sanitarias tipificando las cepas aisladas en Aragón y coordinamos la red “Grupo Español de Trabajo sobre Tuberculosis Multirresistente”, destinada a detectar la posible difusión de la

multirresistencia en España en colaboración con la Unión Europea. Aquellas cepas que presentan mayor transmisibilidad, que permanecen en estado de latencia y se reactivan, y aquellas que presentan resistencia son objeto de un estudio detallado (Pérez-Lago *et al.*, 2019). Utilizando la mutagénesis por transposición para detectar genes implicados en latencia, hemos podido aislar un mutante con características fenotípicas nuevas y diferencialmente expresadas en fase estacionaria y en crecimiento en colesterol como única fuente de carbono (Otal *et al.*, 2017).

Completan el equipo Jessica Comín, María José Iglesias y Daniel Ibarz.

### REFERENCIAS

- Aguilar-Pérez, C., B. Gracia, L. Rodrigues, A. Vitoria, R. Cebrián, N. Deboosère, O.R. Song, P. Brodin, M. Maqueda, and J.A. Aínsa. (2018) “Synergy between circular bacteriocin AS-48 and ethambutol against *Mycobacterium tuberculosis*”. *Antimicrob Agents Chemother.* 62(9): e00359-18.
- Aguilo N, A.M. Toledo, E.M. Lopez-Roman, E. Perez-Herran, E. Gormley, J. Rullas-Trincado, I. Angulo-Barturen and C. Martin (2014). “Pulmonary *Mycobacterium bovis* BCG vaccination confers dose-dependent superior protection compared to that of subcutaneous vaccination”. *Clin Vaccine Immunol.* Apr;21(4):594-7.
- Aguilo N., S. Alvarez-Arguedas, S. Uranga, D. Marinova, M. Monzón, J. Badiola and C. Martin (2016). “Pulmonary but Not Subcutaneous Delivery of BCG Vaccine Confers Protection to Tuberculosis-Susceptible Mice by an Interleukin 17-Dependent Mechanism”. *J Infect Dis.* Mar 1;213(5):831-9.
- Gómara, M., and S. Ramón-García. (2019) “The FICI paradigm: correcting flaws in antimicrobial *in vitro* synergy screens at their inception”. *Biochem Pharmacol.* 163:299-307.
- Gonzalo-Asensio, J., I. Perez, N. Aguilo, S. Uranga, A. Pico, C. Lampreave, A. Cebollada, I. Otal, S. Samper and C. Martin (2018). “New insights into the transposition mechanisms of IS6110 and its dynamic distribution between *Mycobacterium tuberculosis* Complex lineages.” *PLoS Genet* 14(4): e1007282.
- Gonzalo-Asensio, J., W. Malaga, A. Pawlik, C. Astarrie-Dequeker, C. Passemar, F. Moreau, F. Laval, M. Daffe, C. Martin, R. Brosch and C. Guilhot (2014). “Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(31): 11491-11496.
- Otal I., E. Pérez-Herrán, L. García-Morales, M.C. Menéndez, J.A. Gonzalez-Y-Merchand, C. Martín and M.J. García (2017). “Detection of a Putative TetR-Like Gene Related to *Mycobacterium bovis* BCG Growth in Cholesterol Using a gfp-Transposon Mutagenesis System”. *Front Microbiol.* Mar 6;8:315.
- Pérez-Lago, L., M.I. Campos-Herrero, F. Cañas, R. Copado, L. Sante, B. Pino, M. Lecuona, O.D. Gil,

**C. Martín, P. Muñoz, D. García-de-Viedma and S. Samper** (2019). "A *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain persists at high rates and extends its geographic boundaries 20 years after importation". *Sci Rep. Mar* 18;9(1):4687.

**Spertini, F., R. Audran, R. Chakour, O. Karoui, V. Steiner-Monard, A. C. Thierry, C. E. Mayor, N. Rettby, K. Jaton, L. Vallotton, C. Lazor-Blanchet,**

**J. Doce, E. Puentes, D. Marinova, N. Aguilo and C. Martin** (2015). "Safety of human immunisation with a live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine: a randomised, double-blind, controlled phase I trial." *Lancet Respir Med* 3(12): 953-962.

**Tameris, M., H. Mearns, A. Penn-Nicholson, Y. Gregg, N. Bilek, S. Mabwe, H. Geldenhuys, J. Shenje, A. K. K. Luabeya, I. Murillo, J. Doce, N. Aguilo,**

**D. Marinova, E. Puentes, E. Rodriguez, J. Gonzalo-Asensio, B. Fritzell, J. Thole, C. Martin, T. J. Scriba, M. Hatherill and M. C. T. Team** (2019). "Live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine MTBVAC versus BCG in adults and neonates: a randomised controlled, double-blind dose-escalation trial." *Lancet Respir Med* 7(9): 757-770.

**WHO** (2018). "Global Tuberculosis Report 2018."

## RNAs reguladores de cianobacterias

Alicia M. Muro Pastor



Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (CSIC-Universidad de Sevilla)



De izquierda a derecha: Manuel Brenes Álvarez, Alicia M. Muro Pastor, Agustín Vioque Peña, Elvira Olmedo Verd e Isidro Álvarez Escribano.

Las cianobacterias son un grupo de microorganismos fotosintéticos con requerimientos nutricionales muy reducidos y una enorme capacidad de adaptación a entornos cambiantes, por lo que son objeto de interés biotecnológico para la producción sostenible de distintos compuestos, incluyendo biocombustibles. Los mecanismos de adaptación de las cianobacterias a la deficiencia de nitrógeno están controlados por el regulador transcripcional NtcA, que regula el uso de distintas fuentes de nitrógeno, incluyendo en última instancia la posibilidad de fijar nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) mediante la nitrogenasa, una enzima extremadamente sensible al oxígeno cuya actividad es incompatible con

la fotosíntesis oxigénica. En cianobacterias complejas, como nuestro organismo modelo *Nostoc* sp. PCC 7120, esta incompatibilidad se resuelve confinando la nitrogenasa en unas células especializadas denominadas heterocistos. En condiciones de fijación de nitrógeno los filamentos se comportan como organismos pluricelulares con división de tareas entre dos tipos celulares interdependientes, las células vegetativas y los heterocistos (figura 1) (Muro-Pastor & Hess 2012). La diferenciación de heterocistos, que está en última instancia controlada por NtcA, depende también de HetR, un regulador específico de diferenciación celular. Nuestro trabajo se centra en el estudio de la partici-

pación de RNAs reguladores, tanto pequeños RNAs (sRNAs) como RNAs antisentido en los procesos de adaptación al estrés de carencia de nitrógeno y la diferenciación de heterocistos.

Hemos definido el "paisaje transcripcional" de nuestro organismo modelo mediante una metodología de RNASeq que evidenció abundante transcripción no codificante. La inclusión de una estirpe mutante *hetR*, que no es capaz de diferenciar heterocistos, nos permitió clasificar las respuestas transcripcionales a la deficiencia de nitrógeno en dos grandes regulones, el regulón NtcA, de respuestas globales, y el regulón HetR, que

incluye respuestas específicamente relacionadas con la diferenciación de heterocistos (Mitschke *et al.*, 2011). En ambos regulones hemos identificado moléculas de RNA potencialmente reguladoras.

Utilizando la información derivada del análisis transcriptómico hemos diseñado un acercamiento informático para la predicción de secuencias transcritas como sRNAs a partir de regiones intergénicas (Brenes-Álvarez *et al.*, 2016). Este acercamiento implementa un análisis de conservación filogenética que sugiere que algunos de los sRNAs predichos se transcribirían de hecho como RNAs funcionales. Así, por ejemplo, NsrR1 (nitrogen stress-repressed RNA 1) es un sRNA de 45 nucleótidos, codificado en todos los genomas de estirpes formadoras de heterocistos, cuya expresión es reprimida por NtcA y que participa en la regulación de la expresión de la proteína NblA, implicada en el reciclaje de aminoácidos en condiciones de carencia de nitrógeno (Álvarez-Escribano *et al.*, 2018). De esta forma, la regulación de los niveles de la proteína NblA estaría operada por un circuito mixto en el que participan un regulador transcripcional (NtcA) y un sRNA (NsrR1). También hemos analizado NsiR4 (nitrogen stress-induced RNA 4), que se transcribe desde un promotor activado por NtcA y que participa en la regulación de la asimilación de amonio a través de la modulación de la traducción de la proteína IF7, un factor inactivante de la glutamina sintetasa (Klähn *et al.*, 2015).

Hemos diseñado también un acercamiento global a la identificación de transcritos específicos de los heterocistos, entre los que hemos encontrado tanto sRNAs como RNAs antisentido que podrían ejercer un papel regulador. Para ello hemos hibridado microarrays que incluyen todas las secuencias genómicas que se transcriben en nuestro organismo modelo, ya sean estas codificantes o no codificantes, con una serie de muestras de RNA correspondientes a la estirpe silvestre y la estirpe mutante *hetR* cultivadas con distinta disponibilidad de nitrógeno. A partir de los datos resultantes hemos construido una red de co-expresión y llevado a cabo un análisis de “clustering” en el que los diferentes transcritos aparecen agrupados en función de patrones transcripcionales comunes (Brenes-Álvarez *et al.*, 2019). Entre los

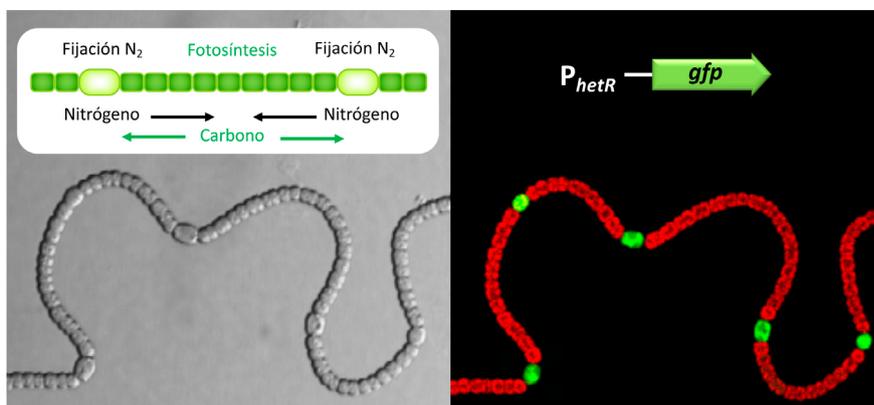


Figura 1. Las cianobacterias formadoras de heterocistos son organismos multicelulares con división de tareas metabólicas. Se muestran las relaciones funcionales entre heterocistos (células especializadas en la fijación de nitrógeno atmosférico) y células vegetativas (que llevan a cabo la fijación fotosintética del CO<sub>2</sub>). La expresión de la proteína testigo GFP desde el promotor del regulador de la diferenciación *HetR* ilustra la existencia de patrones transcripcionales exclusivos de heterocistos. La fluorescencia roja corresponde a los pigmentos fotosintéticos de las células vegetativas.

transcritos transcripcionalmente agrupados con los de genes implicados en diferenciación de heterocistos aparece por ejemplo NsiR1 (nitrogen stress-induced RNA 1), un sRNA de 60 nucleótidos que se puede considerar un marcador muy temprano de células en diferenciación (Muro-Pastor 2014) y cuyo papel regulador estamos actualmente analizando. Asimismo, entre los transcritos que se expresan exclusivamente en heterocistos aparecen varios transcritos antisentido, como el *as\_glpX*, que se transcribe en la hebra contraria del gen que codifica la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, una enzima requerida para la fijación fotosintética de CO<sub>2</sub>. La transcripción de este RNA antisentido específicamente en los heterocistos contribuiría a la reprogramación metabólica que acompaña la diferenciación de estas células especializadas (Olmedo-Verd *et al.*, 2019).

En resumen, en los últimos años hemos contribuido a definir circuitos reguladores mixtos que implican a los reguladores transcripcionales NtcA y *HetR* y a moléculas de RNA no codificantes cuya expresión está bajo control de los mismos. Nuestro trabajo se lleva a cabo en colaboración con el laboratorio dirigido por Wolfgang R. Hess (Genetics and Experimental Bioinformatics, Universidad de Freiburg, Alemania) y está financiado actualmente por el Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia (BFU2016-74943).

[http://www.ibvf.us-csic.es/en/RNAbiology/Regulatory\\_RNAs](http://www.ibvf.us-csic.es/en/RNAbiology/Regulatory_RNAs)

## BIBLIOGRAFÍA

- Olmedo-Verd E, Brenes-Álvarez M, Vioque A, Muro-Pastor AM.** (2019). A heterocyst-specific antisense RNA contributes to metabolic reprogramming in *Nostoc* sp. PCC 7120. *Plant Cell Physiol* 60: 1646-1655.
- Brenes-Álvarez M, Mitschke J, Olmedo-Verd E, Georg J, Hess WR, Vioque A, Muro-Pastor AM.** (2019). Elements of the heterocyst-specific transcriptome unravelled by co-expression analysis in *Nostoc* sp. PCC7120. *Environ Microbiol* 21: 2544-2558.
- Hou S, Brenes-Álvarez M, Reinmann V, Alkhabzahi OS, Backofen R, Muro-Pastor AM, Hess WR.** (2019). CRISPR-Cas systems in multicellular cyanobacteria. *RNA Biol* 16: 518-529.
- Álvarez-Escribano I, Vioque A, Muro-Pastor AM.** (2018). NsiR1, a nitrogen stress-repressed sRNA, contributes to the regulation of *nblA* in *Nostoc* sp. PCC 7120. *Front Microbiol* 9: 2267.
- Muro-Pastor AM, Brenes-Álvarez M, Vioque A.** (2017). A combinatorial strategy of alternative promoter use during differentiation of a heterocystous cyanobacterium. *Environ Microbiol Rep* 9: 449-458.
- Brenes-Álvarez M, Olmedo-Verd E, Vioque A, Muro-Pastor AM.** (2016). Identification of conserved and potentially regulatory small RNAs in heterocystous cyanobacteria. *Front Microbiol* 7: 48.
- Klähn S, Schaal C, Georg J, Baumgartner D, Knippen G, Hagemann M, Muro-Pastor AM, Hess WR.** (2015). The sRNA NsiR4 is involved in nitrogen assimilation control in cyanobacteria by targeting glutamine synthetase inactivating factor IF7. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: E6243-6252.
- Muro-Pastor AM.** (2014). The heterocyst-specific NsiR1 small RNA is an early marker of cell differentiation in cyanobacterial filaments. *mBio* 5: e01079-14.
- Muro-Pastor AM, Hess WR.** (2012). Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches. *Trends Microbiol* 20: 548-557.
- Mitschke J, Vioque A, Haas F, Hess WR, Muro-Pastor AM.** (2011). Dynamics of transcriptional start site selection during nitrogen stress-induced cell differentiation in *Anabaena* sp. PCC7120. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 20130-20135.

# Biología y evolución de plásmidos bacterianos

Álvaro San Millán



alvsanmillan@gmail.com

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal,  
Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria. 28034, Madrid.



Figura 1. Miembros del PBE lab.  
De izquierda a derecha: Jon Sicilia,  
Jerónimo Rodríguez, Carmen de la Vega,  
Cristina Herencias, Álvaro San Millán, Aida  
Alonso, Ricardo León, Javier de la Fuente y  
Laura Toribio.

El grupo *Plasmid Biology and Evolution* (PBE lab, [www.pbelab.es](http://www.pbelab.es)) nació en enero de 2016 y desde entonces ha crecido de forma sostenida hasta alcanzar su composición actual (Figura 1). El PBE lab pertenece al Área de Microbiología, Inmunología e Infección del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, en el Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid). En el PBE lab, nuestro principal interés es el estudio de las dinámicas evolutivas de los plásmidos en las poblaciones bacterianas. Los plásmidos son elementos genéticos que replican independientemente del cromosoma y que son capaces de transferir información genética horizontalmente entre bacterias en un proceso conocido como conjugación. De este modo, los plásmidos juegan un papel clave en la evolución y ecología bacteriana porque permiten a las bacterias acceder a nuevos caracteres adaptativos. El ejemplo más ilustrativo de la capacidad de los plásmidos para potenciar la evolución

bacteriana es el papel clave que han jugado en la diseminación de mecanismos de resistencia a antibióticos. Este fenómeno ha contribuido de manera estratégica al desarrollo de la crisis global de resistencia antibiótica que afrontamos actualmente (MacLean and San Millan, 2019).

En nuestro grupo desarrollamos principalmente dos grandes líneas de investigación:

## EVOLUCIÓN EN TIEMPO REAL DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN EL HOSPITAL

Los plásmidos conjugativos juegan un papel esencial en la diseminación de la resistencia a antibióticos en escenarios de relevancia clínica (San Millan, 2018). Uno de los factores principales que comprometen el éxito de la diseminación de los plásmidos con-

jugativos es el coste biológico que imponen en sus hospedadores bacterianos, lo que se traduce en una disminución de la capacidad reproductiva de las bacterias portadoras del plásmido (San Millan and MacLean, 2017). El origen de estos costes, y de la evolución compensatoria responsable de mitigarlos, continúan siendo en gran parte desconocidos. Estas dinámicas evolutivas son extremadamente relevantes, porque van a ser al menos parcialmente responsables de la aparición de las asociaciones bacteria-plásmido exitosas que se diseminan incontroladamente en los hospitales (San Millan, 2018).

En nuestro grupo intentamos comprender cuales son las bases genéticas y evolutivas que determinan el establecimiento de estas asociaciones exitosas en el hospital. Para ello, y gracias a la colaboración con los excelentes microbiólogos clínicos del hospital, estudiamos la evolución de cepas de enterobacte-

rias portadoras de plásmidos de resistencia a antibióticos aisladas de la microbiota intestinal de pacientes hospitalizados (Figura 2). Combinamos técnicas de genómica, transcriptómica, edición genética con tecnología CRISPR, cribados CRISPRi y citometría de flujo con modelización matemática para caracterizar la epidemiología y evolución las bacterias portadoras de plásmidos de resistencia a antibióticos (DelaFuente *et al.*, 2020; San Millan *et al.*, 2014b; San Millan *et al.*, 2018; San Millan *et al.*, 2015). Nuestros resultados ayudan a predecir, y potencialmente contener, las diseminación de asociaciones bacteria-plásmido de interés clínico en nuestro hospital.

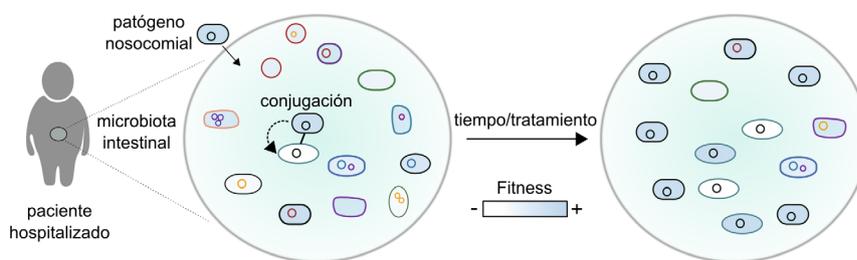


Figura 2. Evolución de la resistencia a antibióticos mediada por plásmidos. Modificada de (San Millan, 2018). Dinámicas evolutivas de asociaciones bacteria-plásmido en la microbiota intestinal de un paciente hospitalizado. Un patógeno nosocomial portador de un plásmido de resistencia a antibióticos coloniza la microbiota intestinal y transfiere el plásmido a bacterias residentes en esta microbiota. El plásmido puede producir un coste biológico (i.e. reducción de *fitness*). Legenda: blanco, *fitness* bajo; azul, *fitness* alto), pero es seleccionado por un tratamiento con antibióticos. Con el tiempo, este coste desaparece gracias a mutaciones compensatorias.

## PAPEL DE LOS PLÁSMIDOS MULTICOPIA EN LA EVOLUCIÓN BACTERIANA

Los plásmidos se pueden dividir de manera general entre aquellos de gran tamaño y bajo número de copias y los de pequeño tamaño y alto número de copias. Aunque el límite de tamaño varía entre familias bacterianas, esta distribución bimodal de tamaños y copias se mantiene constante a través de la filogenia (San Millan *et al.*, 2014a; Smillie *et al.*, 2010). Los plásmidos conjugativos de gran tamaño juegan un papel decisivo en la diseminación de la resistencia a antibióticos y por lo tanto se han estudiado exhaustivamente durante las últimas décadas. Los plásmidos pequeños multicopia son extremadamente comunes en los procariontes, pero su papel en la biología y evolución bacteriana se ha estudiado en menor medida.

En nuestro laboratorio investigamos las posibles ventajas evolutivas asociadas a los plásmidos multicopia. Una de las características más destacadas de estos plásmidos es el hecho de que representan una isla de poliploidía en el genoma haploide de la mayoría de las bacterias. En estudios recientes, hemos demostrado que la poliploidía provista por estos plásmidos tiene al menos dos consecuencias importantes: (i) acelerar la evolución de los genes que codifican (San Millan *et al.*, 2016) y (ii) mantener la diversidad alélica de los mismos en las bacterias hospedadoras (Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2018) (Figura 3).

En resumen, en nuestro grupo intentamos comprender la biología de poblaciones de los plásmidos de resistencia a antibióticos com-

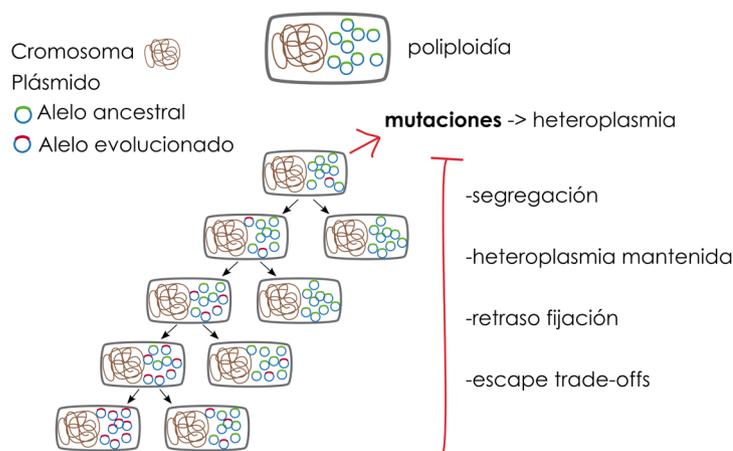


Figura 3. Dinámicas evolutivas de los plásmidos multicopia.

binando técnicas avanzadas de biología molecular y biología evolutiva. Nuestro objetivo último es aplicar los conceptos que aprendemos del estudio de la evolución de la resistencia antibióticos mediada por plásmidos al desarrollo de estrategias más racionales de control de las enfermedades infecciosas.

## REFERENCIAS

DelaFuente, J., Rodríguez-Beltrán, J., San Millan, A., 2020. Methods to Study Fitness and Compensatory Adaptation in Plasmid-Carrying Bacteria. *Methods Mol Biol* 2075, 371-382.

MacLean, R.C., San Millan, A., 2019. The evolution of antibiotic resistance. *Science* 365, 1082-1083.

Rodríguez-Beltrán, J., Hernández-Beltrán, J.C.R., DelaFuente, J., Escudero, J.A., Fuentes-Hernández, A., MacLean, R.C., Peña-Miller, R., San Millan, A., 2018. Multicopy plasmids allow bacteria to escape from fitness trade-offs during evolutionary innovation. *Nat Ecol Evol* 2, 873-881.

San Millan, A., 2018. Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context. *Trends Microbiol* 26, 978-985.

San Millan, A., Escudero, J.A., Gifford, D.R., Mazel, D., MacLean, R.C., 2016. Multicopy plasmids potentiate the evolution of antibiotic resistance in bacteria. *Nature Ecology & Evolution* 1, 0010.

San Millan, A., Heilbron, K., MacLean, R.C., 2014a. Positive epistasis between co-infecting plasmids promotes plasmid survival in bacterial populations. *ISME J* 8, 601-612.

San Millan, A., MacLean, R.C., 2017. Fitness Costs of Plasmids: a Limit to Plasmid Transmission. *Microbiology Spectrum* 5.

San Millan, A., Peña-Miller, R., Toll-Riera, M., Halbert, Z.V., McLean, A.R., Cooper, B.S., MacLean, R.C., 2014b. Positive selection and compensatory adaptation interact to stabilize non-transmissible plasmids. *Nat Commun* 5, 5208.

San Millan, A., Toll-Riera, M., Qi, Q., Betts, A., Hopkinson, R.J., McCullagh, J., MacLean, R.C., 2018. Integrative analysis of fitness and metabolic effects of plasmids in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *ISME J* 12, 3014-3024.

San Millan, A., Toll-Riera, M., Qi, Q., MacLean, R.C., 2015. Interactions between horizontally acquired genes create a fitness cost in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun* 6, 6845.

Smillie, C., Garcillán-Barcia, M.P., Francia, M.V., Rocha, E.P., de la Cruz, F., 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 434-452.

# Quorum sensing y resistencia a antibióticos en *Stenotrophomonas maltophilia*: ¿Están conectados estos mecanismos?

Daniel Yero, Pol Huedo, Xavier Coves, Sonia Martínez-Servat, Oscar Conchillo-Solé, Celeste Gómez, Xavier Daura, Isidre Gibert



Grupo de Patogénesis Bacteriana y Antimicrobianos (PatoBAnt).  
Institut de Biotecnologia i de Biomedicina y Departament de Genètica i de Microbiologia Universitat Autònoma de Barcelona.  
Edifici Mòdul B, Parc de Recerca UAB. Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona.



Foto de los integrantes actuales del grupo. De izquierda a derecha: Xavier Daura, Sara Segura, Òscar Conchillo-Solé, Daniel Yero, Celeste Gómez, Xavier Coves, Belén Mahía, Pol Huedo, Marina Bataller e Isidre Gibert.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

*Stenotrophomonas maltophilia* es una especie metabólica y genéticamente diversa que habita en una amplia gama de ambientes, particularmente en la rizosfera, considerada su hábitat principal en la naturaleza. Es el único miembro de la familia *Xanthomonadaceae* conocido por ser un patógeno humano oportunista. Su prevalencia e incidencia global han aumentado significativamente en la última década, especialmente en pacientes con fibrosis quística (Hatziaorou *et al.*, 2019). La

amenaza que representa *S. maltophilia* para la salud humana es su baja susceptibilidad a casi todas las clases de antibióticos (Sánchez, 2015). Por estas razones, se ha clasificado como uno de los principales organismos multirresistentes (MDR) en entornos hospitalarios, y se ha incluido recientemente en la lista de los diez microorganismos resistentes prioritarios en UCIs (Rello *et al.*, 2019).

En *S. maltophilia* se han reconocido varios factores de virulencia que podrían contribuir a la colonización de tejidos humanos,

que incluyen, entre otros, varias enzimas extracelulares y la formación de *biofilm*. Es sabido que *S. maltophilia* forma *biofilm* en una amplia gama de superficies bióticas y abióticas, incluidos dispositivos médicos como catéteres, prótesis, etc. La formación de *biofilm* facilita la persistencia bacteriana y la resistencia a la acción de los antimicrobianos, por lo que se ha considerado como una forma de resistencia fenotípica (Sánchez, 2015). Al igual que para muchas bacterias gramnegativas, el sistema de *quorum sensing* (QS) se ha considerado también un importan-

te factor regulador de la virulencia en *S. maltophilia* (Huedo *et al.*, 2018). En general, los sistemas de QS son redes de comunicación que coordinan poblaciones y comunidades bacterianas a través de moléculas conocidas como autoinductoras (AI). Estas redes son uno de los principales mecanismos que controlan la patogénesis de muchas especies de importancia clínica (Rutherford and Bassler, 2012). Estudiar cómo estas redes controlan los aspectos relacionados con la virulencia, la persistencia y la tolerancia a antibióticos en *S. maltophilia*, es uno de los objetivos de nuestro grupo de investigación.

## RESULTADOS CIENTÍFICOS DEL GRUPO Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En el sistema de QS principal de *S. maltophilia* la molécula AI es el ácido graso cis-11-metil-2-dodecanoico, conocido como DSF (del inglés *diffusible signal factor*). Los genes para la síntesis y percepción del DSF, así como el inicio de la cascada de regulación mediada por esta señal, forman parte de un clúster denominado *rpf*. Nuestro grupo ha demostrado que en *S. maltophilia* se pueden distinguir dos sub-poblaciones basadas en las diferencias en la secuencia de este clúster (Huedo *et al.*, 2014). Estas diferencias genotípicas se traducen en una significativa diversidad funcional entre las cepas del tipo *rpf-1* o *rpf-2*. Por ejemplo, las cepas de tipo *rpf-2* no producen niveles detectables de DSF en condiciones de laboratorio y son más virulentas en un modelo animal con nematodos. Sin embargo, estas cepas son capaces de producir su propio DSF y activar los mecanismos mediados por el QS, cuando perciben el DSF producido por cepas *rpf-1* (Huedo *et al.*, 2015). Por otro lado, cepas *rpf-1* mutantes en la sintasa del DSF dejan de secretar DSF, producen más *biofilm* y son menos virulentas (Huedo *et al.*, 2014). Todo esto demuestra que la coordinación de la virulencia mediada por el DSF en *S. maltophilia* es más compleja y multifactorial de lo que se pensaba.

Más recientemente nuestro grupo ha demostrado, usando un panel de 79 cepas clínicas, que las cepas de tipo *rpf-2* son efectivamente más virulentas en modelos animales, probablemente porque producen más *biofilm*. Sorprendentemente el tipo de clúster *rpf* también influencia el perfil de resistencia

de las cepas, lo que nos hace pensar en una conexión entre el sistema de QS mediado por DSF y la resistencia a antibióticos. Sabemos que una de las variantes del clúster *rpf* fue adquirida por *S. maltophilia* mediante transferencia horizontal (Huedo *et al.*, 2015), por tanto, no descartamos la hipótesis que durante estos eventos se hayan adquirido determinantes de resistencia. Nuestro grupo está ahora inmerso en estudiar con más profundidad el mecanismo de QS mediado por DSF en *S. maltophilia* e identificar los determinantes de virulencia y resistencia que podrían estar controlados por este sistema. Para ello estamos estudiando la expresión global de los genes en condiciones de cultivos que activan los sistemas de QS, como por ejemplo el inicio de la fase estacionaria o la presencia de moléculas AI. Por otro lado, se sabe ahora que *S. maltophilia* tiene mecanismos para inhibir o degradar moléculas AI secretadas por otras bacterias de su entorno (Huedo *et al.*, 2018), y tenemos indicios que algunos tipos de ácidos grasos pueden interferir con el sistema DSF de la propia célula (Huedo *et al.*, 2015). Todo esto nos ha hecho pensar en estrategias antimicrobianas alternativas basadas en la inhibición del QS. El grupo cuenta además con la experiencia de bioinformáticos que participan en buscar aquellos determinantes que podrían ser dianas atractivas para eliminar o inhibir estas bacterias.

En cuanto a la búsqueda de estrategias antimicrobianas basadas en la inhibición del QS, nuestro grupo ha dado los primeros pasos en colaboración con un grupo de la University College Cork en Irlanda (Huedo *et al.*, 2019). En este trabajo se sintetizaron y evaluaron, entre otros, compuestos químicos basado en la molécula de DSF de *S. maltophilia*. Algunas de estas moléculas fueron capaces de interferir con la comunicación célula-célula alterando la formación de *biofilm* y potenciando la actividad de la colistina, uno de los antibióticos de último recurso contra patógenos gramnegativos MDR. Esta prueba de concepto valida la estrategia de interferir con el QS bacteriano para combatir infecciones difíciles de tratar causadas por organismos MDR formadores de *biofilm*. Por otro lado, abre una puerta en la búsqueda de estrategias que potencien el efecto de antibióticos como la colistina, para la cual se detectan cada vez más cepas resistentes. Nuestro grupo ha descrito recientemente que en *S. mal-*

*tophilia* existe de manera casi generalizada el fenómeno de heteroresistencia a la colistina (Martínez-Servat *et al.*, 2018). Hemos visto que en una población de células susceptibles a la colistina, coexiste o surge rápidamente una subpoblación de células muy resistentes. La heteroresistencia a los antibióticos es de una gran trascendencia clínica porque es responsable del fallo de muchos tratamientos y de la persistencia de algunas infecciones. Esta subpoblación resistente tiene además mayor capacidad para formar *biofilm*, lo que refuerza nuestra hipótesis de si el sistema de QS y la resistencia a algunos antibióticos tienen elementos en común en *S. maltophilia*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Hatziagorou, E., Orenti, A., Drevinek, P., Kashirskaya, N., Mei-Zahav, M., De Boeck, K., *et al.* (2019). Changing epidemiology of the respiratory bacteriology of patients with cystic fibrosis-data from the European cystic fibrosis society patient registry. *J. Cyst. Fibros. S1569-1993(19)30838-0*.
- Huedo, P., Coves, X., Daura, X., Gibert, I., and Yero, D. (2018). Quorum Sensing Signaling and Quenching in the Multidrug-Resistant Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Cell Infect Microbiol* 8, 122.
- Huedo, P., Kumar, V. P., Horgan, C., Yero, D., Daura, X., Gibert, I., *et al.* (2019). Sulfonamide-based diffusible signal factor analogs interfere with quorum sensing in *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia*. *Future Med Chem* 11, 1565–1582.
- Huedo, P., Yero, D., Martínez-Servat, S., Estibariz, I., Planell, R., Martínez, P., *et al.* (2014). Two different *rpf* clusters distributed among a population of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains display differential diffusible signal factor production and virulence regulation. *J. Bacteriol.* 196, 2431–2442.
- Huedo, P., Yero, D., Martínez-Servat, S., Ruys, A., Roher, N., Daura, X., *et al.* (2015). Decoding the genetic and functional diversity of the DSF quorum-sensing system in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Microbiol* 6, 761.
- Martínez-Servat, S., Yero, D., Huedo, P., Marquez, R., Molina, G., Daura, X., *et al.* (2018). Heterogeneous Colistin-Resistance Phenotypes Coexisting in *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates Influence Colistin Susceptibility Testing. *Front Microbiol* 9, 2871.
- Rello, J., Kalwaje Eshwara, V., Lagunes, L., Alves, J., Wunderink, R. G., Conway-Morris, A., *et al.* (2019). A global priority list of the TOP TEN resistant Microorganisms (TOTEM) study at intensive care: a prioritization exercise based on multi-criteria decision analysis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 38, 319–323.
- Rutherford, S. T., and Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2, a012427.
- Sánchez, M. B. (2015). Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Microbiol* 6, 658.

## Grupo de Infecciones bacterianas y terapias antimicrobianas (BIAT Group)

Eduard Torrents, Maria del Mar Cendra, Swapnil Sanmukh, Lucas Pedraz, Núria Blanco-Cabra, Laura Moya, Alba Rubio-Canalejas, Victor Campo



Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC), Barcelona



Foto de grupo de izquierda a derecha: Alexandra Cunnanan, Alba Rubio-Canalejas, Swapnil Sanmukh, Lucas Pedraz, Domingo Marchan, Eduard Torrents, Núria Blanco-Cabra, Maria del Mar Cendra, Laura Moya, Berta Torrecilla.

Las enfermedades infecciosas constituyen un grave y persistente problema de salud pública. La aparición y prevalencia de cepas bacterianas multirresistentes a antibióticos (AMR) implora el descubrimiento de nuevas estrategias terapéuticas. Además, existe una necesidad urgente de detectar infecciones bacterianas de manera rápida y fiable, y de entender los procesos de resistencia a antibióticos, infección y formación de biopelículas (biofilm).

El grupo de investigación, Infecciones bacterianas y terapias antimicrobianas (**BIAT Group**) ([www.ibecbarcelona.eu/bactinf/](http://www.ibecbarcelona.eu/bactinf/) [@Torrentslab](http://www.torrentslab.eu/twitter), liderado por el Dr. Eduard Torrents está formado por dos investigadores postdoctorales, 5 estudiantes pre-doctorales y diferentes estudiantes de máster y de grado. El grupo arrancó su andadura en la Universidad de Estocolmo (Suecia) y, tras la concesión de un contrato de investigación Ramón y Cajal al Dr. Torrents (2008), se trasladó al Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC), centro que recientemente ha recibido su segunda acreditación Centro de Excelencia Severo Ochoa por parte del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

Nuestra actividad científica se centra en: (i) comprender el mecanismo molecular de las infecciones bacterianas y la formación de biopelículas, (ii) identificar, caracterizar y estudiar nuevas moléculas y dianas antimicrobianas y (iii) aplicar la bioingeniería y nanomedicina a la microbiología, desarrollando terapias antimicrobianas basadas en nanopartículas y sistemas de diagnóstico basados en tecnología lab-on-a-chip.

Nuestras líneas de investigación se resumen a continuación:

### 1 DESCIFRAR LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DURANTE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y LA VIRULENCIA BACTERIANA, Y ENTENDER LA FISIOLÓGÍA DE LAS BACTERIAS QUE CRECEN BAJO ESTAS CONDICIONES

Este objetivo busca comprender el papel de diferentes genes durante la formación de biofilm y el proceso de infección. Se subdivide en tres subobjetivos diferentes:

**1.1)** Estudiar diferentes genes involucrados en la síntesis del ADN bacteriano. Las **RiboNucleotidil Reductasas (RNR)** son enzimas vitales que catalizan la conversión de ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos, esenciales para la síntesis y reparación del ADN. Hasta el momento se han descrito tres clases de RNR: clase I (subdividida en Ia, Ib, Ic y Id), II y III. La distribución de las RNR que presentan los microorganismos es muy compleja, pudiéndose encontrar cualquier combinación de las diferentes RNR en un mismo genoma. Por ejemplo, en *Pseudomonas aeruginosa* encontramos RNR de clase I, II y III, lo que le confiere al microorganismo una gran ventaja adaptativa. Nuestro grupo de investigación ha elucidado los factores transcripcionales involucrados en la transcripción de las distintas clases de RNR en *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* durante el crecimiento en condiciones de laboratorio, formación de biofilm y el proceso de infección. Actualmente estudiamos cómo los reguladores transcripcionales AlgR, NrdR, FNR, ANR, DNR, NarL afectan a la transcripción de los genes que codifican las RNR.

**1.2)** Estudiar la variación entre aislados clínicos y las cepas de laboratorio de *Pseudomonas aeruginosa* dependiendo del nicho ecológico en el que crezcan. Recientemente hemos demostrado que las cepas bacterianas de laboratorio han sido mal utilizadas en todo el mundo, pues los aislados clínicos presentan una mayor diversidad en comparación con las cepas de laboratorio. Queremos comprender la base molecular de la regulación transcripcional en aislados clínicos y sus implicaciones en la virulencia y la formación de biopelículas para desarrollar tratamientos específicos y diseñar estrategias antibacterianas apropiadas para cada tipo de infección.

**1.3)** Explorar la dependencia entre perfiles transcripcionales y gradientes de concentración de oxígeno. En la compleja estructura 3D de biofilm, aparece un gradiente de concentración de oxígeno, por lo que la adaptación bacteriana es esencial para la maduración completa del biofilm y el establecimiento de una infección bacteriana crónica. Para este fin, hemos desarrollado un biorreactor similar a un quimiostato acoplado a un sistema de detección de oxígeno basado en un microsensor, capaz de caracterizar la expresión de genes en condiciones variables y controladas de oxígeno.

## 2 DESCUBRIR NUEVAS TERAPIAS ANTIMICROBIANAS EMPLEANDO TÉCNICAS DE NANOMEDICINA Y DISEÑO DE NANOPARTÍCULAS ENFOCADAS AL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES CRÓNICAS

Muchos medicamentos antibacterianos disponibles actualmente no son efectivos contra las infecciones crónicas, pues no pueden penetrar en los biofilms bacterianos. El objetivo del grupo es mejorar las estrategias de liberación de antibióticos para combatir infecciones, por ejemplo, modificando nanopartículas (NP) para que degraden el biofilm y mejorar así la liberación de fármacos antibacterianos. Estamos desarrollando diversas NP (metálicas, sílice, dextrano, nanorrobots, grafeno, etc.) para combatir infecciones por *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Mycobacterium* y sus respectivas biopelículas. También estamos desarrollando terapias específicas para biofilms en heridas (wound healing).

En colaboración con el Hospital de la Vall d'Hebrón estamos desarrollando terapias

basadas en el uso de NP junto con calor y/o electricidad para tratar infecciones bacterianas (dos patentes registradas).

Finalmente, estamos desarrollando una plataforma de microfluídica para analizar y tratar biopelículas bacterianas, lo que ayudará al tratamiento de infecciones bacterianas crónicas. Hemos desarrollado este dispositivo, en colaboración con el Prof. Samitier (IBEC), y gracias a la financiación del programa CaixaImpulse (La Caixa).

## 3 DESARROLLAR SISTEMAS DE CO-CULTIVO BACTERIANO EN FORMA DE BIOFILM

Hemos comenzado a desarrollar un sistema para co-cultivar diferentes especies bacterianas que imita las biopelículas formadas durante una infección pulmonar o un proceso de curación de heridas. Estos cultivos se combinan con células del epitelio pulmonar para cribar fármacos antibacterianos.

## 4 DESARROLLAR VACUNAS ANTIBACTERIANAS

Estamos desarrollando un nuevo método para engañar al sistema inmunitario y desencadenar una respuesta inmune protectora efectiva (tanto humoral como celular). Hemos seleccionado como prueba de concepto las infecciones causadas por *S. aureus* y *P. aeruginosa*, pero a priori, podría utilizarse con diversas patologías infecciosas o para prevenir el crecimiento y la acción de bacterias AMR. Este proyecto es en colaboración con el profesor Ruiz del grupo de Materiales nanoestructurados y funcionales (NONOSFUN-ICN2) del Instituto Catalán de Nanomedicina (ICN2) en un proyecto financiado por BIST-IGNITE.

## 5 IDENTIFICAR Y DETECTAR NUEVOS FÁRMACOS ANTIBACTERIANOS. DESARROLLO DE NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA PROBAR COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS

Para superar la situación actual con las bacterias multirresistentes y las infecciones crónicas no tratables, es esencial centrarse en el descubrimiento y desarrollo de nuevas

moléculas antimicrobianas, antibiofilm y que tengan como diana diferentes componentes y enzimas bacterianos. Estamos optimizando el uso de *Galleria mellonella* para estudios de infección bacteriana y para identificar *in vivo* la actividad antimicrobiana de nuevas moléculas.

## PUBLICACIONES RECIENTES MÁS RELEVANTES DE LOS ÚLTIMOS 4 AÑOS

**Blanco-Cabra N, Vega-Granados K, Moya L, Vukomanovic M, Parra A, de Cienfuegos LA, Torrents E.** (2019). Novel oleanolic and maslinic acids derivatives as a promising treatment against bacterial biofilms in nosocomial infections: as in vitro and in vivo study. *ACS Infectious Diseases*. 5 (9):1581-1589.

**Vukomanovic M, Torrents E.** (2019). High time resolution and high signal-to-noise monitoring of the bacterial growth kinetics in the presence of plasmonic nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*. 17(1):21.

**Crespo A, Blanco-Cabra N, Torrents E.** (2018). Aerobic vitamin B<sub>12</sub> biosynthesis is essential for *Pseudomonas aeruginosa* class II ribonucleotide reductase activity during planktonic and biofilm growth. *Frontiers in Microbiology*. 9: 986.

**Basas J, Palau M, Ratia C, del Pozo JL, Mari MT, Gomis, X, Torrents E, Almirante B, Gavaldà J.** (2018). High-dose daptomycin is effective as an antibiotic-lock therapy in rabbit model of *Staphylococcus epidermidis* catheter-related infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 62(2): e01777-17.

**Crespo A, Pedraz L, Hofstadt MVdH, Gomila G, Torrents E.** (2017). Regulation of ribonucleotide synthesis by the *Pseudomonas aeruginosa* two-component system AlgR in response to oxidative stress. *Scientific Reports*. 7:17892.

**Crespo A, Gavaldà J, Julián E, Torrents E.** (2017). A single point mutation in class III ribonucleotide reductase promoter renders *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inefficient for anaerobic growth and infection. *Scientific Reports*. 7: 13350.

**Crespo A, Pedraz L, Astola J, Torrents E.** (2016). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits deficient biofilm formation in the absence of class II and class III ribonucleotide reductases due to hindered anaerobic growth. *Frontiers in Microbiology*. 7:688.

**Noguera-Ortega E, Rabanal RM, Secanella-Fandos S, Torrents E, Luquin M, Julián E.** (2016).  $\gamma$ -irradiated mycobacteria enhance survival in bladder tumor-bearing mice although they are less efficacious than live mycobacteria. *Journal of Urology*. 195(1):198-205.

**Baelo A, Levato R, Julian E, Crespo A, Astola J, Gavaldà J, Engel E, Mateos-Timoneda MA, Torrents E.** (2015). Degrading bacterial ECM with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections. *Journal of Controlled Release*. 209:150-158.

**Cendra, MdM., Blanco-Cabra, N., Pedraz, L., Torrents, E.** (2019). Facing the in vitro challenge in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* coexistence. *Scientific Reports*. 9:16284.

# Mecanismos de defensa y de evasión de defensa y virulencia en la interacción de *Pseudomonas syringae* con su planta huésped

Javier Ruiz Albert y Carmen R. Beuzón López



Dpto. de Biología Celular, Genética y Fisiología, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Campus de Teatinos, 29071-Málaga (Spain)



Miembros del grupo: (de izquierda a derecha) Javier Ruiz Albert, Diego López Márquez, Carmen R. Beuzón López, Javier Rueda Blanco, Nieves López Pagán, y Ángel del Espino Pérez.

## HISTORIA DEL GRUPO

El grupo comenzó su andadura en el Área de Genética de la Universidad de Málaga (UMA) en 2003, dirigido por Carmen R. Beuzón y Javier Ruiz Albert, formados en la Universidad de Sevilla (US), y procedentes del Imperial College London tras una estancia postdoctoral en un grupo líder en la interacción molecular entre *Salmonella enterica* y su huésped. Centrado en la contribución a la virulencia del Sistema de Secreción Tipo III (T3SS), su regulación, y sus efectores asociados, este trabajo generó numerosas publicaciones, algunas de ellas de referencia en el campo.

La transición a la UMA, determinó un cambio a una temática análoga centrada en

la interacción molecular de la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* con sus huéspedes vegetales, adaptándonos al nuevo entorno, pero aprovechando la experiencia de etapas previas. El grupo desarrolla investigación a nivel molecular, combinando patosistemas modelo planta-bacteria (*Arabidopsis*) con patosistemas de relevancia agronómica (tomate; judía). El grupo forma parte del núcleo fundador del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM-UMA-CSIC). Hemos obtenido financiación ininterrumpida desde 2003 (6 proyectos consecutivos del Plan Nacional, tres proyectos de excelencia y uno FEDER de la Junta de Andalucía, y un contrato con la Fundación Genoma España).

Disfrutamos de numerosas colaboraciones que han dado lugar a publicaciones con

investigadores de diversos centros nacionales como el propio IHSM-UMA-CSIC, IBM-CP-CSIC, EEZ-CSIC, o la US; y numerosos centros internacionales como INRA-CNRS y LRSV-Université de Toulouse, Francia; FORTH, Grecia; CNR, Italia; SIBS, China; Imperial College London, CRIB-UWE, y WISB-University of Warwick; UK; o CIBIO-InBIO-Universidade do Porto, Portugal. Estas colaboraciones se amplían mediante nuestra participación en redes nacionales (REDFLAG) e internacionales (HUPLANT-COST Action 16110 y SUSTAIN-COST Action FA1208).

El grupo constituye un excelente entorno para la formación de personal investigador, contribuyendo a iniciar la carrera investigadora de numerosos alumnos mediante TFGs y TFMs experimentales (>30 defendidos y

varios en progreso), y Tesis Doctorales (8 defendidas, 3 con premio extraordinario de doctorado, y cuatro en progreso), incluyendo numerosas estancias externas de investigación y con una considerable producción científica por doctorando. Todos los doctores egresados continúan en activo en investigación básica o aplicada, algunos con destacable éxito.

## LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Nuestra investigación se centra en la interacción entre la bacteria patógena *P. syringae* y la planta, abordando los procesos moleculares relevantes tanto por parte del patógeno como del huésped. Mantenemos una aproximación experimental abierta e interdisciplinar que evoluciona conforme a las necesidades de los proyectos desarrollados, que nos permite abordar preguntas novedosas que abren el campo de investigación. La co-evolución patógeno-huésped ha dado lugar a estrategias de invasión y colonización bacterianas, con sistemas dedicados a la introducción de proteínas de virulencia (T3SS) para evadir y suprimir los correspondientes mecanismos de defensa de la planta. Nuestro trabajo ha incluido la caracterización funcional de efectores y su relación con las defensas de la planta, así como la regulación de la expresión del sistema de virulencia. Entre otros hitos, hemos determinado la contribución a la virulencia del repertorio de T3Es de *P. syringae* 1448a, una de las principales estirpes modelo (1, 2), mejorando técnicas de generación de mutantes y desarrollando técnicas de análisis genético *in planta* (*competitive index*, CIs) (3) y referencias incluidas). Hemos sido los primeros en describir la capacidad de supresión de todos los niveles de defensa de la planta (PTI, ETI, y SAR) por parte de un efector, HopZ1, analizando las rutas de transducción de señal implicadas en su reconocimiento en plantas resistentes (4), y caracterizado en su patosistema natural la capacidad de supresión de defensas del efector de la misma familia HopZ3 (5).

Hemos descrito mecanismos de regulación positiva y negativa de la expresión de los genes del T3SS en Pph1448a (6, 7), y colaborado en establecer un enlace entre regulación de la expresión y secreción (8). Hemos descrito por vez primera en un fitopatógeno

heterogeneidad fenotípica en la expresión del T3SS (9) y del flagelo, que da lugar a linajes bacterianos que difieren en la expresión de estos aspectos clave de la virulencia de *P. syringae*. También hemos descrito la dinámica, clonalidad e interacciones de poblaciones mixtas *in planta* (10).

Líneas adicionales en colaboración con otros grupos, en torno a la caracterización de la interferencia entre geminivirus y sumoilación en planta, en colaboración con Eduardo R. Bejarano (IHSM-UMA-CSIC) y Herlander Azevedo (Universidade do Porto) ha dado lugar a cinco artículos, mientras que el desarrollo de herramientas genómicas en olivo y su aplicación a calidad del fruto y aceite, y caracteres de interés agronómico, dentro del consorcio OLEAGEN (Genoma España), ha dado lugar a otros cinco artículos.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

En nuestro actual proyecto del Plan Nacional (RTI2018-095069-B-I00) estamos analizando el metiloma de *P. syringae* en condiciones de laboratorio y en planta y buscando loci candidatos a presentar heterogeneidad fenotípica. Hemos identificado y estamos caracterizando las metilasas de DNA potencialmente asociadas a dicha regulación. Estamos ampliando nuestra caracterización del papel de la heterogeneidad fenotípica en la adaptación de *P. syringae* a la planta, explorando potenciales aplicaciones biotecnológicas.

Dentro del mismo proyecto, y en colaboración con el grupo de Josep Casadesús (US), analizamos el papel de la heterogeneidad fenotípica durante la colonización de la planta por *Salmonella*, asociado a más del 25% de los brotes epidémicos de salmonelosis (CDC-USA), por contaminación interna de fruta y verdura fresca destinada al consumo. Esta línea aprovecha la experiencia en *Salmonella* de los investigadores principales previa a la formación del grupo, combinada con su experiencia en patogénesis en plantas acumulada desde entonces.

Finalmente, en el contexto de un proyecto FEDER y nuestra colaboración con el grupo de Eduardo R. Bejarano (IHSM-UMA-CSIC), estamos caracterizando un mecanismo de

regulación en la planta que controla la expresión de genes TIR-NBS-LRR en ausencia de patógenos, limitando su impacto en *fitness* de la planta, permitiendo su activación en dos oleadas en presencia de patógenos. Este mecanismo de defensa inducible, no ligado a un único gen de avirulencia, tiene gran potencial para el desarrollo de estrategias de resistencia eficaces y robustas.

## REFERENCIAS

- Zumaquero A, Macho AP, Rufián JS, Beuzón CR** (2010) Analysis of the role of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448a in interaction with the plant. *J Bacteriol.* 192(17):4474-88.
- Macho AP, Zumaquero A, Gonzalez-Plaza JJ, Ortiz-Martín I, Rufián JS, Beuzón CR** (2012) Genetic Analysis of the Individual Contribution to Virulence of the Type III Effector Inventory of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *PLoS ONE* 7: e35871.
- Macho AP, Rufián JS, Ruiz-Albert J, Beuzón CR** (2016) Competitive Index: Mixed Infection-Based Virulence Assays for Genetic Analysis in *Pseudomonas syringae*-Plant Interactions. In: Botella J., Botella M. (eds) *Plant Signal Transduction. Methods in Molecular Biology*, 1363: 209-17, Humana Press, New York, NY
- Macho AP, Guevara CM, Tornero P, Ruiz-Albert J, Beuzón CR** (2010) The *Pseudomonas syringae* effector protein HopZ1a suppresses effector-triggered immunity. *New Phytologist.* 187:1018-1033.
- Rufián JS, Lucía A, Rueda-Blanco J, Zumaquero A, Guevara CM, Ortiz-Martín I, Ruiz-Aldega G, Macho AP, Beuzón CR, Ruiz-Albert J** (2018) Suppression of HopZ Effector-triggered Plant Immunity in a natural pathosystem. *Front Plant Sci* 14:977.
- Ortiz-Martín I, Thwaites R, Mansfield JW, Beuzón CR** (2010) Negative Regulation of the Hrp Type III Secretion System in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Mol Plant-Microbe Interact.* 23:682-701.
- Ortiz-Martín I, Thwaites R, Macho AP, Mansfield JW, Beuzón CR** (2010) Positive Regulation of the Hrp Type III Secretion System in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Molecular Plant -Microbe Interactions.* 23:665-681.
- Charova SN, Gazi AD, Mylonas E, Pozidis C, Sabarit B, Anagnostou D, Psatha K, Aivaliotis M, Beuzón CR, Panopoulos NJ, Kokkinidis M** (2018) Migration of Type III Secretion System Transcriptional Regulators Links Gene Expression to Secretion. *mBio* 31:9 pii: e01096-18.
- Rufián JS, Sánchez-Romero M-A, López-Márquez D, Macho AP, Mansfield JW, Arnold DL, Ruiz-Albert J, Casadesús J, Beuzón CR** (2016) *Pseudomonas syringae* differentiates into phenotypically distinct subpopulations during colonization of a plant host. *Environ microbiol.*
- Rufián JS, Macho AP, Corry DS, Mansfield JW, Ruiz-Albert J, Arnold DL, Beuzón CR** (2018) Confocal microscopy reveals in planta dynamic interactions between pathogenic, avirulent and non-pathogenic *Pseudomonas syringae* strains. *Mol Plant Pathol.*

## Grupo de Bases Moleculares de la Adaptación

Carlota Pintado, Alberto Hipólito, Filipa Trigo da Roza, Ester Vergara, Paula Blanco, Lucía García-Pastor, José Antonio Escudero



Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET).  
Universidad Complutense de Madrid.



Equipo de MBA. De izquierda a derecha: Paula Blanco, Ester Vergara, José Antonio Escudero (IP), Carlota Pintado, Lucía García Pastor, Filipa Trigo da Roza y Alberto Hipólito.

El grupo de Bases Moleculares de la Adaptación (MBA, por sus siglas en inglés) es un grupo de reciente creación en la Facultad de Veterinaria de la UCM ([www.ucm.es/mbalab](http://www.ucm.es/mbalab)). Actualmente se compone de 7 miembros cuyo trabajo se centra en el estudio de los integrones, una de las plataformas genéticas más importantes en el mundo de la resistencia a antibióticos. La importancia de los integrones radica en su elevada prevalencia en Gram negativos, en el poder adaptativo que confieren a su hospedador y en la sin-

cronización sutil con las necesidades de la bacteria, que permite limitar su coste biológico (Escudero *et al.*, 2015).

Los integrones son capaces de captar y de incorporar al genoma bacteriano nuevos genes que vienen embebidos en una estructura movilizable denominada *cassette*. La integración de estos cassettes se produce a través de la recombinación entre su sitio *attC* y el sitio de integración *attI* en el integrón (Mazel, 2006). Estas reacciones son

llevadas a cabo por la integrasa que está codificada en el único gen de la plataforma del integrón. Los genes de los cassettes están generalmente desprovistos de promotor, y se vuelven funcionales al integrarse en el sitio *attI*, ya que el integrón posee un promotor dedicado para su transcripción: el Pc. Los integrones pueden captar y acumular una cantidad variable de cassettes, y el nivel de expresión de cada uno dependerá de su distancia con el Pc. La colección de cassettes es estable en condiciones normales por la falta

de expresión de la integrasa. Sin embargo, en condiciones de estrés, la integrasa (cuya transcripción se encuentra controlada por la respuesta SOS [Guerin *et al.*, 2009]) es expresada y puede producir, además de la integración de nuevos cassettes si los hubiera, la escisión y reordenación de cassettes de la colección. Esto permite acercarse al Pc cassettes que estén alejados y aumentar así su expresión. Esta capacidad de adquisición y acumulación de nuevas funciones, sumada a la expresión diferencial de los cassettes y la posibilidad de su reordenación, hace de los integrones memorias adaptativas bacterianas de bajo coste.

Si bien los integrones más conocidos son los relacionados con la resistencia a antibióticos y portados por plásmidos (los llamados integrones móviles), estos no son en realidad la forma nativa de integron, sino el resultado de la movilización estocástica de algunos integrones desde los cromosomas de bacterias medioambientales. En efecto, encontramos integrones en los cromosomas de más del 10% de las bacterias de las bases de datos, lo que demuestra que son estructuras con un origen evolutivo lejano (Cury *et al.*, 2016; Rowe-Magnus *et al.*, 2001). Estos integrones cromosómicos sedentarios (ICS) contienen en general cassettes de función desconocida y generalmente no relacionada con la resistencia a antibióticos. Se deduce que algunos de estos ICS han sido movilizados por transposones a plásmidos, y han llegado a bacterias de interés clínico, donde la capacidad de capturar cassettes de resistencia ha resultado gran valor adaptativo a sus hospedadores, dando lugar a los integrones móviles.

A los miembros de MBA nos interesan muchas facetas diferentes de los integrones, desde la capacidad de adaptación que confieren a las bacterias hasta su origen evolutivo. Por un lado, trabajamos en intentar obtener una visión general clara y cuantificada del valor adaptativo de los integrones de resistencia para las bacterias clínicas. Para ello, Alberto Hipólito mide estos parámetros de todos los genes de resistencia descritos hasta la fecha (¡más de 170!). Por otro lado, Filipa Trigo da Roza trabaja en el desarrollo de una herramienta biotecnológica que nos permita captar e identificar el contenido de cassettes de resistencia en muestras de ADN de pacientes, de animales o del medio ambiente. Pero hay cosas muy interesantes de los integrones fuera del campo de la resistencia. Carlota Pintado estudia el origen evolutivo de las integrasas de integron y el papel del dominio I2 de la integrasa. Este dominio solo se encuentra en las integrasas de integron y permite reconocer los sitios *attC* de los cassettes, pero desconocemos su papel cuando las integrasas hacen reacciones de tipo ancestral en las que no hay *attCs* (Escudero *et al.*, 2016). Por su parte, Paula Blanco estudia las funciones de los cassettes de integrones cromosómicos, a las que se les presupone un valor evolutivo importante, pero se desconoce completamente su función (Escudero and Mazel, 2017); y Lucía García-Pastor trabaja en dilucidar como se generan los cassettes *de novo*, fenómeno fundamental del funcionamiento de los integrones para el cual no hay un modelo claro, pero que puede tener una conexión directa con el origen evolutivo de los integrones (Escudero *et al.*, 2015). Y para

que no nos falte de nada, a todos nosotros nos asiste Ester Vergara, nuestra técnico de laboratorio.

El objetivo de MBA, en definitiva, es entender el valor adaptativo de los integrones en los hospitales y fuera de ellos. Contamos para ello con el apoyo financiero del Plan de Atracción de Talento de la Comunidad de Madrid; del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades a través de sus proyectos de I+D Excelencia; y del European Research Council a través de una Starting Grant. A todos ellos les estamos muy agradecidos.

## REFERENCIAS

- Cury, J., Jove, T., Touchon, M., Neron, B., and Rocha, E.P. (2016). Identification and analysis of integrons and cassette arrays in bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 44, 4539-4550.
- Escudero, J.A., Loot, C., Nivina, A., and Mazel, D. (2015). The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiol Spectr* 3, MDNA3-0019-2014.
- Escudero, J.A., Loot, C., Parissi, V., Nivina, A., Bouchier, C., and Mazel, D. (2016). Unmasking the ancestral activity of integron integrases reveals a smooth evolutionary transition during functional innovation. *Nat Commun* 7, 10937.
- Escudero, J.A., and Mazel, D. (2017). Genomic Plasticity of *Vibrio cholerae*. *Int Microbiol* 20, 138-148.
- Guerin, E., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbe, J., Ploy, M.C., and Mazel, D. (2009). The SOS response controls integron recombination. *Science* 324, 1034.
- Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 4, 608-620.
- Rowe-Magnus, D.A., Guerout, A.M., Ploncard, P., Dychinco, B., Davies, J., and Mazel, D. (2001). The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 652-657.

## Actividad de antimicrobianos y resistencia en bacterias corineformes causantes de infecciones en humanos

Jesús Navas<sup>1,2</sup>, Sana Alibí<sup>1</sup>, Marta Fernández Martínez<sup>2</sup>, Carlos Ruiz de Alegría<sup>2,3</sup>, Itziar Chapartegui<sup>2</sup>, José Ramos-Vivas<sup>2</sup>, Concepción Pérez del Molino<sup>2,3</sup>, Alexis Dorta<sup>1</sup>, Carlos Salas<sup>3</sup>, María Eliecer Cano<sup>2,3</sup>, Jesús Agüero<sup>2,3</sup>, Jorge Calvo<sup>2,3</sup>



<sup>1</sup>Grupo "BIOMEDAGE". Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria. Santander

<sup>2</sup>Grupo "Epidemiología y mecanismos patogénicos y moleculares de enfermedades infecciosas y Microbiología clínica". Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL). Santander

<sup>3</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Santander



Grupo "Epidemiología y mecanismos patogénicos y moleculares de enfermedades infecciosas y microbiología clínica".

El equipo está formado por profesores de la universidad de Cantabria, facultativos del hospital Universitario Marqués de Valdecilla e investigadores del IDIVAL. Forma parte de la Red Nacional de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI).

Las principales líneas de investigación son:

- Mecanismos de resistencia a antimicrobianos y epidemiología molecular de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas de interés médico.

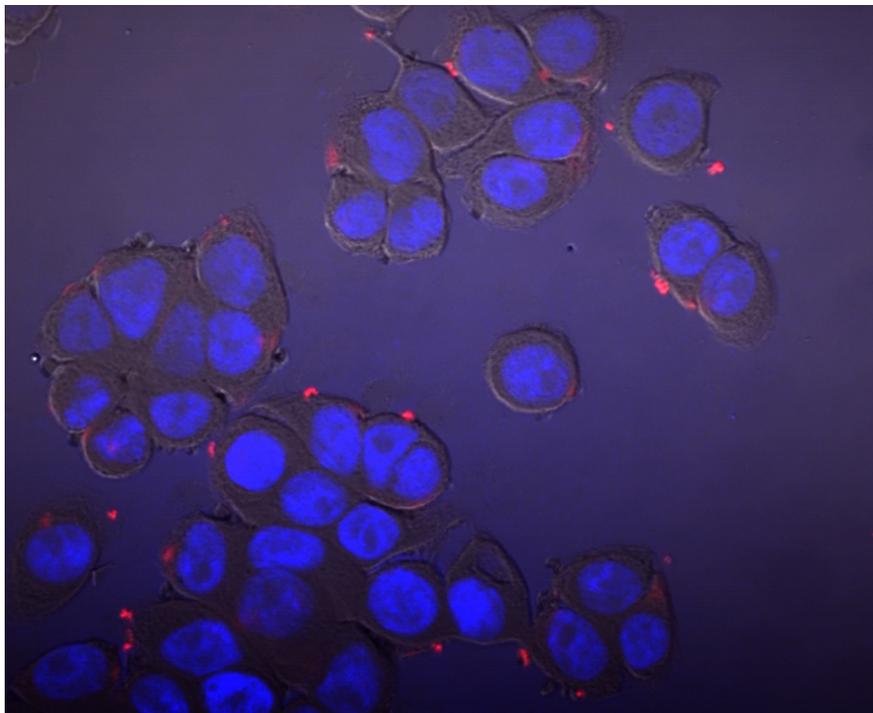
- Nuevos métodos para el diagnóstico microbiológico basados en la genómica y la proteómica.
- Interacción patógeno-hospedador.

Se presenta un resumen de trabajos recientes realizados con cepas de corinebacterias de origen clínico.

Las corinebacterias pertenecen al género *Corynebacterium* spp. y poseen una morfología en forma de maza. Son Gram-positivos, no esporulados, catalasa-positivos y su genoma

es rico en guanina y citosina. Algunas son bacterias ambientales, pero la mayoría forman parte de la flora de piel y mucosas en humanos y otros mamíferos. Las corinebacterias clínicamente relevantes son *Corynebacterium diphtheriae* (causante de la difteria) y las corinebacterias no diftéricas. Entre estas destacamos *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium amycolatum* y *Corynebacterium urealyticum* (Bernard, 2012).

La identificación a nivel de especie se realiza mediante técnicas fenotípicas, quimiotaxo-



Interacción entre *Corynebacterium striatum* y células de epitelio pulmonar humano.

nómicas y moleculares. El sistema comercial API-Coryne es muy utilizado, pero en ocasiones hay que recurrir a pruebas bioquímicas complementarias para la diferenciación a nivel de especie. Desde hace algunos años se ha implementado la tecnología de espectrometría de masas MALDI-TOF para la identificación bacteriana gracias a su rapidez, fiabilidad y bajo coste. En un estudio preliminar realizado en colaboración con el grupo del profesor Jordi Vila (hospital Clínico, Barcelona) demostramos la efectividad de la aplicación de esta tecnología para la identificación a nivel de especie de una colección de cepas clínicas de *Corynebacterium* spp, *Listeria monocytogenes* y *Rhodococcus equi* (Vila *et al.*, 2012). Los resultados se confirmaron en un estudio realizado con cepas de *Corynebacterium* spp. aislados en el hospital F. Hached de Sousse (Túnez) (Alibi *et al.*, 2017) y en otro con cepas de *Rhodococcus equi* de nuestra colección (Ruiz de Alegría *et al.*, 2017). Más del 95% de las cepas se identificaron a nivel de especie correctamente. Cuando no se puede precisar la especie se identifican por secuenciación de los genes *rpoB* y ARNr 16S. Por otra parte, hay que destacar que la secuenciación del genoma bacteriano es el método más resolutivo para la identificación a nivel de especie, aunque no puede ser aplicado como método

de rutina actualmente por la complejidad que conlleva el análisis de los resultados y su elevado coste.

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los desafíos más importantes a los que se enfrenta la medicina a escala global. El estudio de los mecanismos de la resistencia bacteriana a los antibióticos y su propagación es una línea de investigación prioritaria en nuestro grupo. En relación a la actividad de antimicrobianos y la resistencia, hemos realizado estudios en *Corynebacterium striatum*, un patógeno oportunista emergente que puede producir una amplia variedad de infecciones en humanos: bacteriemia, endocarditis, meningitis, vaginitis e infecciones del tracto urinario, del tracto respiratorio, heridas, piel y ojos. *C. striatum* se reconoce como un verdadero patógeno cuando se aísla de muestras tomadas repetidas veces en partes del organismo humano estériles o en catéteres u otros dispositivos. La consideración de si un aislado representa infección, colonización o contaminación se realiza en base al criterio del facultativo. Las infecciones por *Corynebacterium* spp. se tratan con glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina). El linezolid constituye una buena alternativa, porque hasta ahora no se han reportado resistencias. Sin

embargo, estos antimicrobianos no siempre están disponibles en todos los hospitales. En un estudio que realizamos en el hospital F. Hached de Sousse (Túnez), nos informaron que el tratamiento de elección para las infecciones por *C. striatum* en ese hospital es la ampicilina. Sin embargo, analizando la sensibilidad a 16 antimicrobianos de 63 cepas de *C. striatum* aisladas en ese hospital, encontramos altos niveles de resistencia a beta-lactámicos (el 82,5% de las cepas eran resistentes a penicilina) (Alibi *et al.*, 2017). El tratamiento de una infección debe pautarse en función de los resultados del antibiograma. Aplicando este criterio, se aconseja que las infecciones por *C. striatum* no sean tratadas de forma empírica con un beta-lactámico. En otro estudio realizado con 64 cepas de *C. striatum*, aisladas en el hospital Marqués de Valdecilla (Santander), mostramos que la amikacina y la netilmicina (aminoglucósidos) presentaban buena actividad (Navas *et al.*, 2016), por lo que pueden ser prescritos como tratamiento alternativo o complementario de las infecciones por *C. striatum*, aunque vigilando su toxicidad.

## REFERENCIAS

- Bernard K.** (2012). The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 50(10):3152-3158 (<https://doi.org/10.1128/JCM.00796-12>).
- Vila J. et al.** (2012). Identification of clinically relevant *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium haemolyticum*, and *Rhodococcus equi* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 50(5):1745-1747 (<https://doi.org/10.1128/JCM.05821-11>).
- Alibi S. et al.** (2017). Evaluation of the VITEK-MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry system for the identification of clinical *Corynebacterium* species. *Revista Española de Quimioterapia* 30(1):57-58.
- Alibi S. et al.** (2017). Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. *Scientific Reports*. 7(1):9704 (<https://doi.org/10.1038/s41598-017-10081-y>).
- Ruiz de Alegría et al.** (2017). Comparison of the Vitek MS and Bruker Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry systems for identification of *Rhodococcus equi* and *Dietzia* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 55(7):2255-2260 (<https://doi.org/10.1128/JCM.00377-17>).
- Navas J. et al.** (2016). Susceptibility to aminoglycosides and distribution of *aph* and *aac(3)-XI* genes among *Corynebacterium striatum* clinical isolates. *PLoS One*. 2016 Dec 9;11(12):e0167856 (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167856>).

# Impacto en salud pública y patogénesis molecular de la enfermedad neumocócica

José Yuste, Fernando González-Camacho y Mirian Domenech

[jyuste@isciii.es](mailto:jyuste@isciii.es)  
[fgonzalez@isciii.es](mailto:fgonzalez@isciii.es)  
[mdomenech@isciii.es](mailto:mdomenech@isciii.es)

Unidad de Neumococos. Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Bacterianas Prevenibles por Vacunas.  
 Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Ctra Majadahonda-Pozuelo Km 2. 28220. Majadahonda, Madrid.



Miembros del laboratorio (de izquierda a derecha):  
 José Yuste, Idoia del Río, Beatriz López, Julio Sempere, Mirian Domenech, Fernando González, María Dolores Vicioso.

El Laboratorio de Referencia de Neumococos (LRN) se dedica desde el año 1979 a la vigilancia microbiológica de *Streptococcus pneumoniae*, analizando los serotipos, genotipos y la resistencia antibiótica de los aislados clínicos de neumococo que se reciben en el laboratorio, procedentes de hospitales de las distintas comunidades autónomas. Desde entonces, se han identificado y caracterizado cerca de 85.000 aislados clínicos invasivos de neumococo que están disponibles en nuestra colección de cepas. Todos los años notificamos los casos de enfermedad neumocócica invasiva a Europa a través del ECDC siendo el tercer país europeo que más casos notifica. El LRN está coordinado por el Dr. José Yuste y se subdivide en dos unidades; por un lado, la parte diagnóstica y epidemiológica formada por tres ayudantes de investigación (María Dolores Vicioso, Idoia

del Río y Beatriz López) y la parte de investigación, formada por el Dr. Fernando González Camacho, la Dra. Mirian Domenech y Julio Sempere que está realizando su Tesis Doctoral. A continuación, se exponen las principales líneas de investigación del laboratorio.

## INVESTIGACIÓN EN EPIDEMIOLOGÍA Y SALUD PÚBLICA

*S. pneumoniae* es el principal agente etiológico de las neumonías adquiridas en la comunidad y uno de los principales responsables de sepsis y meningitis bacteriana no epidémica afectando principalmente a la población pediátrica y a los adultos mayores de 65 años. Nuestro laboratorio participa en la caracterización de las cepas circulantes (serotipo, genotipo y sensibilidad antibiótica)

aportando información muy valiosa al sistema nacional de salud sobre la epidemiología de neumococo que es esencial para la detección precoz de clones y serotipos emergentes que puede ser de gran utilidad para evaluar el impacto de las actuales y futuras vacunas disponibles. Entre las técnicas utilizadas destaca la caracterización de neumococos mediante *dot blot* con antisueros, MLST y PCR-secuenciación de genes capsulares.

## MECANISMOS MOLECULARES DE PATOGENICIDAD

Desde hace varios años, nuestro laboratorio está enfocado en el estudio de los mecanismos moleculares relacionados con las diferentes etapas del proceso infeccioso entre las que destacan la colonización del

tracto respiratorio superior, el establecimiento de la neumonía y su diseminación, produciendo enfermedad invasiva. Para lograr estos objetivos, nuestro laboratorio utiliza mutantes en diversos factores de virulencia, líneas celulares epiteliales, células fagocitarias (macrófagos y neutrófilos) así como ratones deficientes en receptores importantes del sistema inmune del huésped. Para poder abordar estos estudios se utiliza la citometría de flujo y la microscopía confocal como principales técnicas metodológicas

### BÚSQUEDA DE ANTÍGENOS VACUNALES BASADOS EN PROTEÍNAS CONSERVADAS

Las actuales vacunas disponibles están basadas en polisacáridos capsulares que pueden estar conjugados o no a una proteína transportadora. Debido a la elevada variabilidad de neumococo (99 serotipos), la limitación en el número de serotipos que pueden ser incluidos en una vacuna polisacáridica y el fenómeno de reemplazo de serotipos, se estudian vacunas alternativas a las actuales. En nuestro grupo estamos caracterizando el papel protector de algunas proteínas de superficie que están muy conservadas. En el año 2016 demostramos que la vacunación con la proteína LytB es capaz de proteger frente a la sepsis y la neumonía incluyendo al serotipo 3 que tiene una elevada cápsula y de hecho, fue seleccionado en los *highlights* de la revista.

### IMPORTANCIA DE LOS BIOFILMS DE NEUMOCOCO EN LA PATOGENESIS Y LETALIDAD

Una de las líneas en la que nuestro laboratorio está interesado se basa en el estudio de los biofilms neumocócicos desde la perspectiva de salud pública analizando su impacto en la virulencia de los serotipos emergentes. Con la incorporación de la Dra. Domenech, experta en biofilms bacterianos, estamos analizando la relación entre la letalidad por serotipos y su capacidad de formación de biofilms ya que la formación de biofilm permite a la bacteria evadir el sistema inmune así como

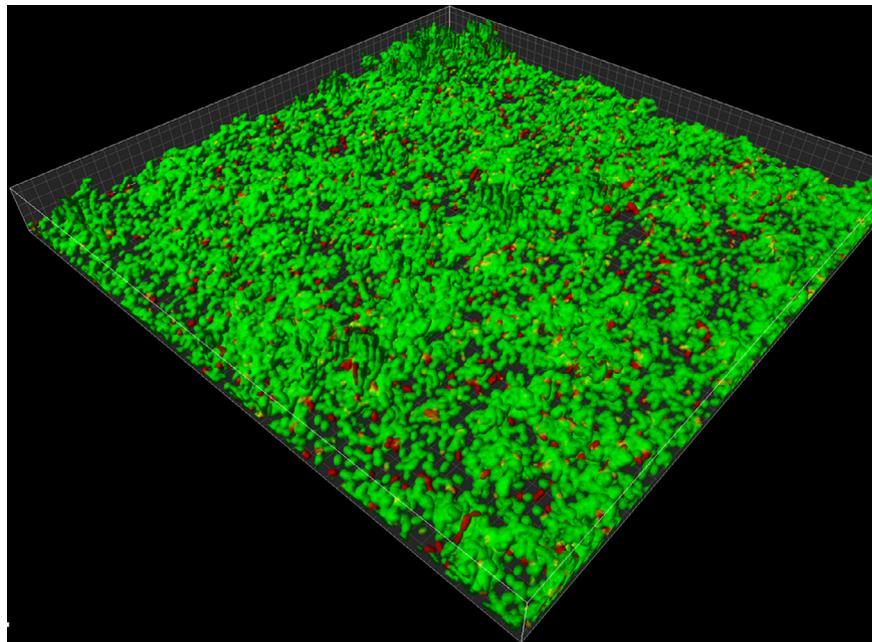


Fig. 1. Visualización de un biofilm neumocócico por microscopía confocal. Tinción con Syto9 de bacterias vivas (verde) y con yoduro de propidio de bacterias muertas (rojo).

desarrollar elevados niveles de resistencia antibiótica.

### BIBLIOGRAFÍA RELEVANTE DE LAS DIFERENTES LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

- Domenech M, Sempere J, de Miguel S, Yuste J.** Combination of antibodies and antibiotics as a promising strategy against multidrug-resistant pathogens of the respiratory tract. *Front Immunol.* 2018; 9:2700.
- Letrado P, Corsini B, Díez-Martínez R, Bustamante N, Yuste JE, García P.** Bactericidal synergism between antibiotics and phage endolysin Cpl-711 to kill multidrug-resistant pneumococcus. *Future Microbiol.* 2018; 13:1215-1223.
- Corsini B, Díez-Martínez R, Aguinagalde L, González-Camacho F, García-Fernández E, Letrado P, García P, Yuste J.** Chemotherapy with Phage Lysins Reduces Pneumococcal Colonization of the Respiratory Tract. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 25;62 (6).
- Corsini B, Aguinagalde L, Ruiz S, Domenech M, Antequera ML, Fenoll A, García P, García E, Yuste J.** Immunization with LytB protein of *Streptococcus pneumoniae* activates complement-mediated phagocytosis and induces protection against pneumonia and sepsis. *Vaccine.* 2016; 34 (50):6148-6157.
- Ramos-Sevillano E, Urzainqui A, de Andrés B, González-Tajuelo R, Domenech M, González-Camacho F, Sánchez-Madrid F, Brown JS, García E, Yuste J.** PSGL-1 on leukocytes is a critical compo-

nent of the host immune response against invasive pneumococcal disease. *PLoS Pathog.* 2016;12 (3): e1005500.

- Aguinagalde L, Corsini B, Domenech A, Domenech M, Cámara J, Ardanuy C, García E, Liñares J, Fenoll A, Yuste J.** Emergence of amoxicillin-resistant variants of Spain<sup>9V</sup>-ST156 pneumococci expressing serotype 11A correlates with their ability to evade the host immune response. *PLoS One.* 2015;10 (9): e0137565.
- Aguinagalde L, Díez-Martínez R, Yuste J, Royo I, Gil C, Lasa I, Martín-Fontecha M, Marín-Ramos NI, Ardanuy C, Liñares J, García P, García E, Sánchez-Puelles JM.** Auranoicin efficacy against MDR *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* infections. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70(9): 2608-17
- Ramos-Sevillano E, Urzainqui A, Campuzano S, Moscoso M, González-Camacho F, Domenech M, Rodríguez de Córdoba S, Sánchez-Madrid F, Brown JS, García E, Yuste J.** Pleiotropic effects of cell wall amidase LytA on *Streptococcus pneumoniae* sensitivity to the host immune response. *Infect Immun.* 2015; 83 (2): 591-603.
- Domenech M, Damian D, Ardanuy C, Liñares J, Fenoll A, García E.** Emerging non-PCV13 serotypes 11A and 35B of *Streptococcus pneumoniae* show high potential for biofilm formation *in vitro*. *PLoS One.* 2015; 10(4): e0125636.
- Domenech M, Ramos-Sevillano E, García E, Moscoso M, Yuste J.** Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2013; 81:2606-15.

# Parecidos razonables entre patógenos bacterianos oportunistas: el curioso caso de *Haemophilus influenzae* y *Helicobacter pylori*

Ariadna Fernández-Calvet<sup>1</sup>, Nahikari López-López<sup>1</sup>, Junkal Garmendia<sup>1,2</sup>

ariadna.fernandez@unavarra.es  
nahikari.lopez@unavarra.es  
junkal.garmendia@csic.es

<sup>1</sup>Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-Gobierno Navarra, Mutilva, Navarra

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Respiratorias, Madrid

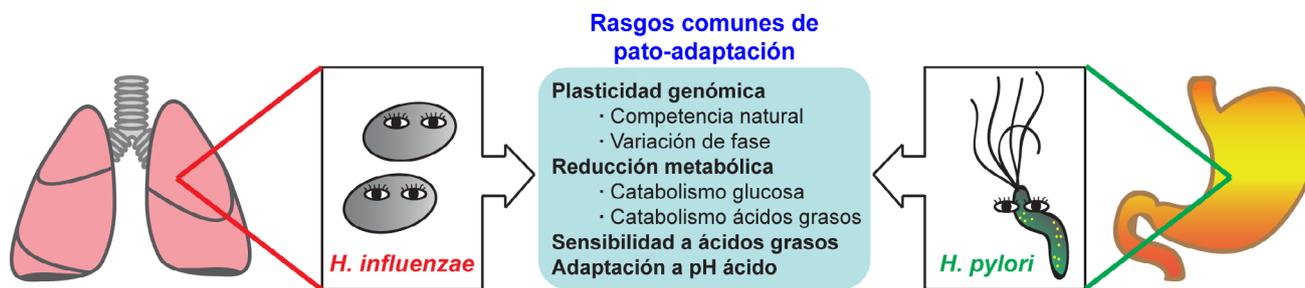


De izquierda a derecha: Ariadna Fernández-Calvet, Nahikari López-López, Junkal Garmendia, Begoña Euba y Celia Gil-Campillo, investigadoras en el Instituto de Agrobiotecnología (IDAB) CSIC-Gobierno de Navarra.

Los patógenos oportunistas colonizadores están excelentemente adaptados al huésped que colonizan, a menudo con rango de hospedador restringido a una sola especie y formando parte de su microbioma. Sin embargo, en determinadas circunstancias, a menudo relacionadas con estados de inmunosupresión del huésped, la colonización asintomática se convierte en infección sintomática (Price *et al.*, 2017). La secuenciación de genomas completos ha revelado rasgos genómicos de patoadaptación que, en algunos casos, son comunes a patógenos oportunistas que colonizan nichos distintos en el mismo hospedador, lo que genera *parecidos razonables* muy interesantes biológica y evolutivamente.

En nuestro grupo de investigación, trabajamos para descifrar los mecanismos de pato-adaptación de la bacteria Gram negativa *Haemophilus influenzae*, un patógeno oportunista colonizador asintomático de la nasofaringe humana, y causante de infección sintomática en las vías respiratorias bajas de individuos que sufren patologías respiratorias crónicas como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Su *et al.*, 2018). El análisis genómico comparado nos ha revelado la enorme variabilidad existente entre aislados descapsulados de esta bacteria, traducido en una heterogeneidad fenotípica significativa. La plasticidad genómica de *H. influenzae* está mediada, entre otros, por la competencia natural, consistente en la captación de ADN

lineal de doble cadena exógeno, que atraviesa las membranas externa e interna, accede al citosol bacteriano como ADN monocadena y, según el grado de homología, puede integrarse en el cromosoma bacteriano mediante doble recombinación homóloga (Mell *et al.*, 2014). Además, *H. influenzae* experimenta variación de fase, un fenómeno estocástico, reversible y de alta frecuencia, determinado por la existencia de repeticiones de secuencia simple (del inglés, *single sequence repeats* – SSR), cuyo número puede variar entre generaciones debido a errores de la ADN polimerasa durante la replicación de ADN. La presencia de SSRs en genes que codifican estructuras de superficie contribuye a la variabilidad antigénica y al mimetismo molecular del patógeno. *H. influen-*



*zae* también presenta sistemas de regulación epigenética regulados por variación de fase. Así, la variación de fase en genes que codifican ADN metiltransferasas genera cambios en el patrón global de metilación, que a su vez regulan el perfil global de expresión génica del patógeno (Phillips *et al.*, 2019).

La evidencia disponible relaciona la plasticidad genómica de *H. influenzae* con rasgos de reducción cromosómica. Este patógeno carece de ruta de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, y la captación de ácidos grasos exógenos no metabolizables tiene efecto detergente, en parte paliable por la inactivación del gen que codifica el transportador de ácidos grasos FadL. Éste es un rasgo de evolución paralela observado en cepas persistentes aisladas del pulmón de pacientes EPOC, un nicho con altos niveles de mediadores inflamatorios de naturaleza lipídica (Moleres *et al.*, 2018). Por otra parte, *H. influenzae* presenta un ciclo de Krebs incompleto con ausencia de las enzimas de la rama oxidativa, y cataboliza glucosa mediante una fermentación asistida por respiración cuyo principal producto excretado es el ácido acético, que a su vez es un inmunometabolito proinflamatorio. Éste es un rasgo de adaptación metabólica en el pulmón EPOC, donde la disponibilidad de glucosa es alta debido a la inflamación basal característica de la enfermedad (López-López, datos no publicados). Un último ejemplo es la variación de fase en el promotor del gen que codifica la adhesina/invasina HMW1/2A. El aumento progresivo de SSRs asociado a la persistencia de *H. influenzae* en el pulmón EPOC regula la disminución progresiva de los niveles de esta proteína, un posible rasgo de selección natural en respuesta al alto título de anticuerpos anti-HMW1/2A en el nicho colonizado (Cholon *et al.*, 2008).

En este artículo, destacamos que *H. influenzae* comparte un buen número de

rasgos de pato-adaptación con observaciones realizadas en *Helicobacter pylori*, un patógeno oportunista colonizador del estómago humano, que induce inflamación crónica de la mucosa gástrica, asintomática en la mayoría de individuos, si bien puede causar complicaciones serias incluyendo úlcera gástrica y duodenal, y cáncer de estómago (Yang *et al.*, 2013). Con genomas de tamaños similares (~1,6 Mb), la plasticidad genómica de *H. pylori* viene también determinada por competencia natural y variación de fase –incluyendo regulación epigenética de la expresión génica. Además, tanto la ruta de  $\beta$ -oxidación como el ciclo de Krebs están incompletos, *H. pylori* es sensible al efecto bactericida de los ácidos grasos, y metaboliza glucosa generando ácido acético como producto principal durante su crecimiento aerobio (Suerbaum *et al.*, 2007; Marais *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2016). La actividad ureasa de *H. pylori* es un requisito importante para la colonización y, de forma análoga, la prevalencia del operón *ure* es mayor en aislados sintomáticos de *H. influenzae* que en cepas aisladas de portadores sanos (Yang *et al.*, 2013; Murphy *et al.*, 2011). Por último, la expresión de las proteínas de superficie SabA y BabA, implicadas en la adhesión de *H. pylori* al epitelio gástrico, está regulada por variación de fase, y se observa una disminución de la misma durante la colonización (Suerbaum *et al.*, 2007; Harvey *et al.*, 2014).

Estas observaciones ponen de manifiesto rasgos adaptativos comunes entre patógenos oportunistas humanos que están alejados filogenéticamente y no comparten nicho. La identificación de fuentes comunes de presión selectiva en vías respiratorias y estómago puede ser una estrategia complementaria para seguir descifrando mecanismos de pato-adaptación, encaminados a la propuesta y desarrollo de terapias antiadaptación.

## REFERENCIAS

- Price LB, Hungate BA, Koch BJ, Davis GS y Liu CM. (2017). Colonizing opportunistic pathogens (COPs): the beasts in all of us. *PLoS Pathog.* 13(8):e1006369.
- Su YC, Jalalvand F, Thegerström J y Riesbeck K. (2018). The interplay between immune response and bacterial infection in COPD: focus upon nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Front Immunol.* 9:2530.
- Mell JC y Redfield RJ. (2014). Natural competence and the evolution of DNA uptake specificity. *J Bacteriol.* 196(8):1471-83.
- Phillips ZN, Tram G, Seib KL y Attack JM. (2019). Phase-variable bacterial loci: how bacteria gamble to maximise fitness in changing environments. *Biochem Soc Trans.* 47(4):1131-1141.
- Moleres J, Fernández-Calvet A, Ehrlich RL, Martí S, Pérez-Regidor L, Euba B, Rodríguez-Arce I, Balashov S, Cuevas E, Liñares J, Ardanuy C, Martín-Santamaría S, Ehrlich GD, Mell JC y Garmendia J. (2018). Antagonistic pleiotropy in the bifunctional surface protein FadL (OmpP1) during adaptation of *Haemophilus influenzae* to chronic lung infection associated with chronic obstructive pulmonary disease. *MBio.* 9(5). pii: e01176-18.
- Cholon DM, Cutter D, Richardson SK, Sethi S, Murphy TF, Look DC y St Geme JW 3rd. (2008). Serial isolates of persistent *Haemophilus influenzae* in patients with chronic obstructive pulmonary disease express diminishing quantities of the HMW1 and HMW2 adhesins. *Infect Immun* 76(10):4463-8.
- Yang I, Nell S y Suerbaum S. (2013). Survival in hostile territory: the microbiota of the stomach. *FEMS Microbiol Rev.* 37(5):736-61.
- Suerbaum S y Josenhans C. (2007). *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol.* 5(6):441-52.
- Marais A, Mendz GL, Hazell SL y Mégraud F. (1999). Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genomic era. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63(3):642-74.
- Jung SW y Lee SW. (2016). The antibacterial effect of fatty acids on *Helicobacter pylori* infection. *Korean J Intern Med.* 31(1):30-5.
- Murphy TF y Brauer AL. (2011). Expression of urease by *Haemophilus influenzae* during human respiratory tract infection and role in survival in an acid environment. *BMC Microbiol.* 11:183.
- Harvey VC, Acio CR, Bredehoff AK, Zhu L, Hallinger DR, Quinlivan-Repassi V, Harvey SE y Forsyth MH. (2014). Repetitive sequence variations in the promoter region of the adhesin-encoding gene *sabA* of *Helicobacter pylori* affect transcription. *J Bacteriol.* 196(19):3421-9.

# Estructura, Dinámica y Función de Genomas de Rizobacterias – Sistemas CRISPR asociados a Reverso Transcriptasas

Nicolás Toro y Francisco Martínez-Abarca

Department of Soil Microbiology and Symbiotic Systems, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, Spain.



Foto de Grupo: Miembros del grupo "Estructura, Dinámica y Función de Genomas de Rizobacterias" en la actualidad.

Nuestro grupo de "Estructura, Dinámica y Función de Genomas de Rizobacterias" tiene como objetivo obtener conocimientos básicos y aplicados sobre las interacciones beneficiosas entre plantas y microorganismos de interés en sistemas agrícolas y forestales (<https://www.eez.csic.es/estructura-dinamica-y-funcion-de-genomas-de-rizobacterias>). El grupo se constituye a finales de los años 90 como una deriva de las líneas dentro del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos en nuestro centro —La Estación Experimental del Zaidín— basadas en el estudio de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. El grupo está constituido por cuatro investigadores en plantilla: Nicolás Toro, Francisco Martínez-Abarca, Manuel Fernández López y Jose I. Jiménez Zurdo. Cuenta en la actualidad con un total de 14 miembros entre personal técnico, estudiantes de Más-

ter y Predoctorales así como personal Postdoctoral. Focaliza sus líneas de investigación en la ecología de microorganismos rizosféricos y la utilización de éstos en la recuperación de suelos degradados, en el análisis genómico de comunidades microbianas del suelo, la caracterización de nuevos ARNs reguladores en microorganismos simbióticos y por último en la contribución al desarrollo de genómica funcional de microorganismos y plantas mediante el uso de herramientas de mutagénesis de alto rendimiento. Esta última línea de Investigación (@ToroLaboratory) se desarrolló partiendo de unos descubrimientos llevados a cabo en los inicios sobre un aislado particular, GR4, de la bacteria *Sinorhizobium meliloti*.

Durante la década de los años 80, el estudio de los determinantes genéticos causan-

tes de una mayor eficiencia en la nodulación de plantas nos llevó a una zona concreta de 40 kb contenida en uno de los dos plásmidos crípticos presentes en este aislado (pRme-GR4b). Este punto es el comienzo de la primera deriva clave en la investigación dentro del grupo que nos llevó a interesarnos en un elemento móvil presente en esta región que ha dado lugar al desarrollo de toda una tecnología de mutagénesis a la carta derivada de lo que apenas se conocía en aquel momento (finales de los 90) como los intrones del grupo II. En esta región se encontró un locus de 1894 nt conteniendo el primer retroelemento activo en rizobacterias: Rmlnt1 (Rm de *Rhizobium meliloti*, lnt1, el primer Intron). Los intrones del grupo II son grandes ribozimas que se comportan como elementos móviles que sufren "splicing" mediante un mecanismo que recuerda a los intrones eucarióticos. Su

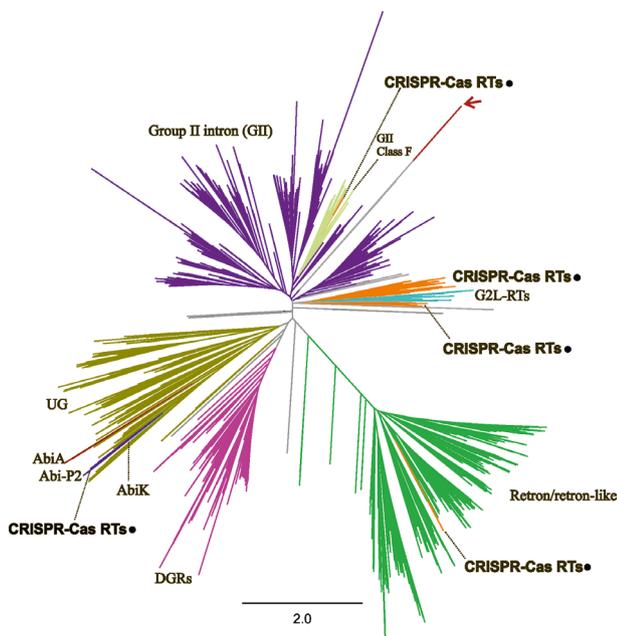


Fig. 1. Árbol filogenético que representa la diversidad procarionta de las Reverso Transcriptasas (RTs) identificadas hasta la fecha. Se destacan mediante puntos aquellas que se encuentran estrechamente relacionadas a sistemas CRISPR-Cas. (Modificado de Toro *et al.* 2019, RNA Biol.).

movilidad está mediada por la formación de un complejo ribonucleoproteína constituido por la proteína codificada por el propio intrón y el RNA escindido. El DNA diana hacia donde se dirige es reconocido principalmente por el RNA que puede programarse de manera eficiente hacia cualquier DNA diana a la carta.

El trabajo de sucesivos años con este elemento sentó las bases de nuevas variedades de intrones con los que desarrollar la tecnología del targetrón dando lugar a varios proyectos de investigación, así como a distintas colaboraciones internacionales. Una actividad relevante presente en este retroelemento y necesaria para su actividad como herramienta mutagénica es la actividad Reverso Transcriptasa (RT). La presencia y el éxito de este retroelemento en *S. meliloti*, nos ha hecho preguntarnos si su presencia en un momento determinado podría haber supuesto ventajas evolutivas a los microorganismos que lo contienen. Así, nuevos elementos relacionados, fragmentos de elementos antiguos insertados en zonas críticas conservadas en los genomas de rizobios relacionados han aparecido en nuevos genomas secuenciados. A ello se ha unido además el esfuerzo y conocimiento del genoma completo de GR4, la bacteria de partida y que gracias a nuestro conocimiento sobre este elemento repetido nos permitió

cerrarlo de manera precisa, así como abordar la secuenciación de nuevas variantes que nos ha permitido conocer los tiempos de evolución de esta bacteria y su asociación muy probable al cultivo del que dependen (en este caso la alfalfa).

La nueva Microbiología, nos ha cambiado la manera de hacernos preguntas sobre el papel de intrones y otros elementos evolutivamente relacionados con ellos en los hospedadores que lo contienen. Así yendo un paso más, nos ha interesado especialmente entender el origen de la RT

presente en este tipo de retroelementos, para lo que desde 2014, llevamos interesados en conocer las relaciones filogenéticas de los distintos tipos de reversos transcriptasas presentes en el mundo procarionta. Ya desde ese año, observamos un subgrupo particular estrechamente relacionado con las que se encontraban presentes en los Intrones del grupo II que parecían haber cambiado completamente de sistema funcional. Estas reverso-transcriptasas se encontraban formando parte de locus CRISPR, en concreto asociados fundamentalmente a genes del complejo adaptativo, y en algunos casos formando una proteína de fusión (RT-Cas1). Los sistemas CRISPR-Cas constituyen un sistema de defensa "inmune" de las bacterias frente a virus y DNA exógeno. En la última fase del proceso, interviene una ribonucleoproteína (la conocida como *cas9*) capaz de reconocer "in vivo" una secuencia diana mediante un RNA guía y digerirlo de manera rápida, eficiente y precisa. Esta propiedad ha dado lugar a la denominada 'Tecnología CRISPR' para la edición genómica a la carta. Una nueva pregunta surge en nuestro grupo de investigación: ¿Cual es el papel de las reversotranscriptasas en los sistemas CRISPR-Cas? ¿A qué sistemas están asociadas?, ¿Qué tipo de co-evolución parecen haber tenido con respecto al sistema CRISPR-Cas

al que se asocian? Nosotros y otros grupos hemos encontrado nuevas variedades de RTs estrechamente relacionadas con algunos sistemas CRISPR-Cas. En un trabajo reciente hemos estudiado un nuevo sistema RT-CRISPR-Cas funcional. En nuestro trabajo hemos demostrado el papel esencial de la actividad retrotranscriptasa en el proceso de adquisición de espaciadores. Proceso que a su vez carece de sesgos en la secuencia descritos previamente en otros sistemas. El estudio proporciona nuevas herramientas con potencial diferencial para el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas.

## PUBLICACIONES RECIENTES MÁS RELEVANTES

- González-Delgado A, Mestre MR, Martínez-Abarca F, Toro N.** (2019) Spacer acquisition from RNA mediated by a natural reverse transcriptase-Cas1 fusion protein associated with a type III-D CRISPR-Cas system in *Vibrio vulnificus*. *Nucleic Acids Res.* 47:10202-10211.
- Toro N, Martínez-Abarca F, Mestre MR, González-Delgado A.** (2019) Multiple origins of reverse transcriptases linked to CRISPR-Cas systems. *RNA Biol.* 16:1486-1493.
- García-Rodríguez FM, Neira JL, Marcia M, Molina-Sánchez MD, Toro N.** (2019) A group II intron-encoded protein interacts with the cellular replicative machinery through the  $\beta$ -sliding clamp. *Nucleic Acids Res.* 47:7605-7617.
- Toro N, Martínez-Abarca F, Molina-Sánchez MD, García-Rodríguez FM, Nisa-Martínez R.** (2018) Contribution of Mobile Group II Introns to *Sinorhizobium meliloti* Genome Evolution. *Front Microbiol.* 9:627.
- Toro N, Martínez-Abarca F, González-Delgado A.** (2017) The Reverse Transcriptases Associated with CRISPR-Cas Systems. *Sci Rep.* 7(1):7089.
- Toro N, Martínez-Abarca F, Fernández-López M.** (2016) The early events underlying genome evolution in a localized *Sinorhizobium meliloti* population. *BMC Genomics.* 17:556.
- Toro N, Nisa-Martínez R.** (2014) Comprehensive phylogenetic analysis of bacterial reverse transcriptases. *PLoS One.* 9(11):e114083.
- Toro N, Martínez-Rodríguez L, Martínez-Abarca F.** (2014) Insights into the history of a bacterial group II intron remnant from the genomes of the nitrogen-fixing symbionts *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae*. *Heredity (Edinb).* 113(4):306-15.
- García-Rodríguez FM, Hernández-Gutiérrez T, Díaz-Prado V, Toro N.** (2014) Use of the computer-retargeted group II intron Rmlnt1 of *Sinorhizobium meliloti* for gene targeting. *RNA Biol.* 11(4):391-401.
- Martínez-Abarca F, Martínez-Rodríguez L, López-Contreras JA, Jiménez-Zurdo JI, Toro N.** (2013) Complete Genome Sequence of the Alfalfa Symbiont *Sinorhizobium/Ensifer meliloti* Strain GR4. *Genome Announc.* 1(1), pii: e00174-12.

# Sistemas de Secreción Tipo IV bacterianos

## Biología y aplicaciones

Dolores Lucía Guzmán-Herrador, Sara Samperio, Carlos Andrés Parra, Matxalen Llosa



Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTec), Universidad de Cantabria, Santander.  
Web: <https://web.unican.es/ibbttec/Paginas/Groups/T4SS.aspx>



Foto de grupo: de izquierda a derecha, Pablo Guridi, Sara Samperio, Matxalen Llosa, y Dolores Guzmán.

El equipo dirigido por la Dra. Matxalen Llosa, Catedrática de Genética de la Universidad de Cantabria, es uno de los 10 grupos que fundaron en 2007 el Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTec), un Centro Mixto entre la Universidad de Cantabria, el CSIC, y el Gobierno Regional.

Nuestros intereses científicos se centran en la comunicación bacteriana mediada por los Sistemas de Secreción Tipo IV (T4SS). Estos complejos macromoleculares, al igual que otras familias de sistemas de secreción, son capaces de translocar sustratos específicos a través de las membranas de bacterias gram-negativas. Lo que les diferencia del resto de sistemas y les dota de mayor interés es su plasticidad, siendo capaces de secretar tanto proteínas como ADN y complejos nucleoproteicos, tanto al medio extracelular

como a otra célula receptora, ya sea procariota o eucariota. Esto se traduce en una enorme versatilidad biológica: los T4SS forman parte de las maquinarias conjugativas para mediar transferencia genética horizontal entre bacterias, están involucrados en la secreción de factores de virulencia a células animales, juegan también un papel en relaciones simbióticas entre bacterias y células de plantas, inyectan toxinas a bacterias competidoras, y son capaces de secretar-importar ADN del medio extracelular. Estas características les convierten en un interesante objeto de estudio tanto desde el punto de vista biológico como biotecnológico y biomédico. Basándonos en el conocimiento molecular que tenemos de estos procesos, nuestro grupo pretende también utilizar estos sistemas para desarrollar herramientas de introducción e integración sitio-específica de ADN en células humanas.

Una parte de nuestro trabajo se centra en el estudio comparativo de T4SS pertenecientes a sistemas conjugativos y a bacterias patógenas. Nuestros modelos de estudio son el T4SS del plásmido conjugativo R388, y el T4SS VirB/D4 de *Bartonella henselae*, que contribuye a la virulencia del patógeno en células humanas. Nuestro principal objetivo es descifrar la base molecular del reclutamiento de sustratos específicos por distintos T4SS, con especial énfasis en la transferencia de ADN.

Un resultado muy significativo del grupo ha sido demostrar que se pueden intercambiar los sustratos entre T4SS involucrados en conjugación y virulencia. Así, hemos mostrado que los complejos nucleoproteicos que se transfieren a través de los T4SS durante la conjugación bacteriana, consistentes en la

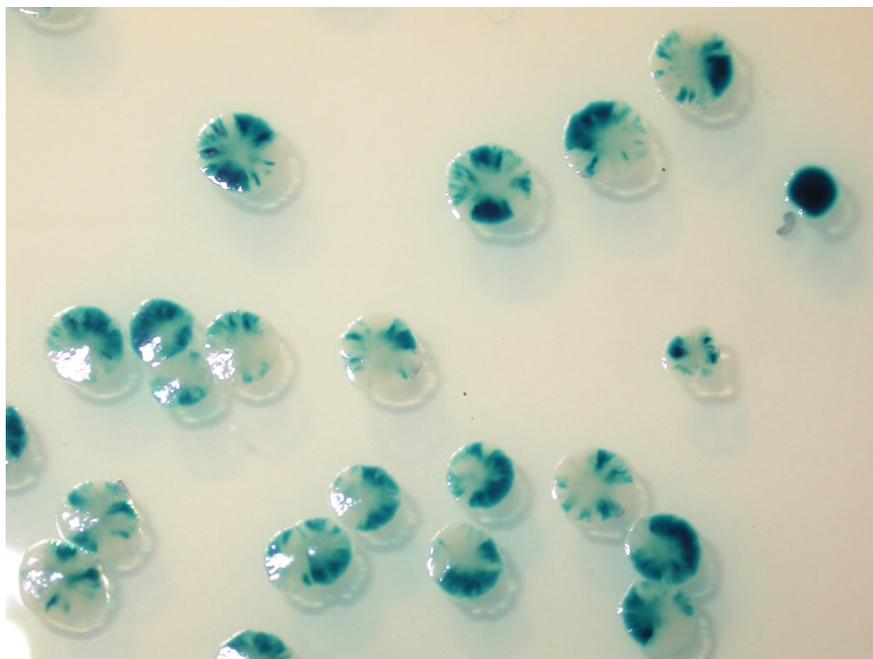


Figura: colonias bacterianas reflejando eventos de recombinación sitio-específica.

relaxasa conjugativa covalentemente unida a la hebra de ADN transferido, pueden ser reconocidos y translocados por los T4SS implicados en la virulencia de los patógenos humanos *B. henselae*, *Legionella pneumophila* o *Coxiella burnetii*. Es decir, que los T4SS de estos patógenos pueden secretar, en lugar de sus sustratos naturales, moléculas de ADN como si fuesen sistemas conjugativos.

Este resultado se pudo observar con una manipulación mínima o nula de los sistemas naturales, lo que argumenta que posiblemente refleje un fenómeno natural, y pueda ocurrir transferencia horizontal de ADN entre patógenos y sus células huésped, mediada por T4SS. Nuestro objetivo actual es demostrar si esta transferencia genética en efecto ocurre en la naturaleza, y descubrir el papel biológico que pueda cumplir, bien sea contribuyendo a la virulencia del patógeno que codifica el T4SS, o contribuyendo a posibles relaciones simbióticas del microbioma con su huésped.

La vertiente aplicada de esta línea consiste en manipular los T4SS de distintas bacterias patógenas para que secreten moléculas de ADN de interés in vivo directamente a las células humanas de elección, que serían distintas dependiendo del tropismo del patógeno de elección.

Otra línea de trabajo se centra en la caracterización de relaxasas conjugativas, las proteínas que procesan y pilotan el ADN a la célula receptora durante la conjugación. Nuestro modelo es la relaxasa del sistema conjugativo de R388, TrwC. Esta proteína, además de su papel en la conjugación, tiene actividad de recombinasa e integrasa sitio-específica en la bacteria receptora, actividad que hemos caracterizado en bacterias y estamos ensayando en células humanas. Uno de nuestros retos es dilucidar cuál sería el rol biológico de esta inesperada actividad, que curiosamente comparten algunas, pero no todas las relaxasas conjugativas analizadas. Nuestros datos indican que, si bien la proteína inicia las reacciones de recombinación/integración con alta especificidad de secuencia por su diana específica, la diana en la célula receptora es más laxa. Esto nos lleva a pensar que tal sistema podría proporcionar al plásmido conjugativo un sistema de colonización de huéspedes no permisivos (i.e. bacterias a las que el plásmido puede conjugar, pero donde no podría replicar), promoviendo su integración en el genoma receptor.

Al tener puesto a punto el ensayo de transferencia de ADN a través de T4SS de patógenos humanos, también hemos estudiado la actividad de TrwC y otras relaxasas tras ser transferidas a células humanas, para

descubrir que la relaxasa potencia en dos órdenes de magnitud la integración en el genoma humano del ADN transferido desde la bacteria. Esta integración no es sitio-específica, aunque estamos elaborando distintas estrategias para que así lo sea. Aunque aún estamos en el estadio de prueba de concepto, las aplicaciones potenciales son enormes.

## SELECCIÓN DE 10 PUBLICACIONES DE LOS ÚLTIMOS 10 AÑOS

Exchange of functional domains between a bacterial conjugative relaxase and the integrase of the human adeno-associated virus. Agúndez L, Zárate-Pérez F, Meier AF, Bardelli M, **Liosa M\***, Escalante CR, Linden RM, Henckaerts E. PLoS ONE 2018 13 (7): e0200841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200841>.

Coupling proteins in Type IV Secretion. **Liosa M\***, Alkorta I. In: S Backert & E Grohmann (Eds). "Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria". Curr Topics Microbiol Immunol 2017 413:143-168. Doi: 10.1007/978-3-319-75241-9\_6.

DNA delivery and genomic integration into mammalian target cells through Type IV A and B secretion systems of human pathogens. Guzmán-Herrador DL, Steiner S, Alperí A, González-Prieto C, Roy CR, **Liosa M\***. Front Microbiol. 2017 Aug 22; 8:1503. doi: 10.3389/fmicb.2017.01503

The Conjugative Relaxase TrwC Promotes Integration of Foreign DNA in the Human Genome. González-Prieto C, Gabriel R, Dehio C, Schmidt M, **Liosa M\***. Appl Environ Microbiol. 2017 83:e00207-17. doi: 10.1128/AEM.00207-17.

A Functional oriT in the Ptw Plasmid of Burkholderia cenocepacia Can Be Recognized by the R388 Relaxase TrwC. Fernández-González E, Bakioi S, Gomes MC, O'Callaghan D, Vergunst AC, Sangari FJ, **Liosa M\***. Front Mol Biosci. 2016 May 3;3:16. doi: 10.3389/fmolb.2016.00016.

Chloramphenicol Selection of IS10 Transposition in the cat Promoter Region of Widely Used Cloning Vectors. González-Prieto C, Agúndez L, **Liosa M\***. PLoS ONE. 2015 Sep 16;10(9):e0138615. doi: 10.1371/journal.pone.0138615.

A translocation motif in relaxase TrwC specifically affects recruitment by its conjugative type IV secretion system. Alperí A, Larrea D, Fernández-González E, Dehio C, Zechner EL, **Liosa M\***. J Bacteriol. 2013 Nov;195(22):4999-5006. doi: 10.1128/JB.00367-13.

HUH site-specific recombinases for targeted modification of the human genome. González-Prieto C, Agúndez L, Linden RM, **Liosa M\***. Trends Biotechnol. 2013 May;31(5):305-12. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.02.002.

New perspectives into bacterial DNA transfer to human cells. **Liosa M**, Schröder G, Dehio C. Trends Microbiol. 2012 Aug;20(8):355-9. doi: 10.1016/j.tim.2012.05.008.

Bacterial Type IV secretion systems in human disease. **Liosa M**, Roy C, Dehio C (2009). Mol. Microbiol. 73(2):141-151. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06751.x.

## Microbioma animal y humano

Andrés Moya, Amparo Latorre, Francisco J. Silva, Rosario Gil, Carlos García-Ferris, Francisco Santonja, Giuseppe D'Auria, Vicente Pérez-Brocal, Rebeca Domínguez-Santos, Susana Ruiz-Ruiz, Mariana Reyes, María Muñoz-Benavent, Jesús Marín-Miret, Benjamín Pérez-Rocher, Irene Creus, Emilio Garrote-Sánchez, Mitchell Distin, Gabriela Debesa, Nicole Pesantes, XueQian Yin, Alejandro Artacho, Nuria Jiménez, Pascual Asensi y Lucía Bori



Unidad Mixta de Investigación en Genómica y Salud del Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I2SysBio) de la Universitat de València-CSIC y la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO).



Algunos miembros del grupo.

Nuestro grupo investiga la simbiosis mutualista procariota-eucariota, ampliamente distribuida en la naturaleza y con impacto significativo en la evolución animal (Moya *et al.*, 2008). En la endosimbiosis, las bacterias viven dentro de células especializadas (bacteriocitos) del hospedador, se transmiten verticalmente y han evolucionado genómica y funcionalmente para complementar las necesidades del hospedador sin ser percibidas como agentes infecciosos. Además, existen ectosimbiosis, asociaciones en que gran cantidad de especies bacterianas están alojadas en diferentes órganos del hospedador, constituyendo su microbiota. La secuenciación masiva ha revelado una compleja microbiota intestinal en animales, que desempeña funciones esenciales, contribuyendo a la correcta

nutrición, fisiología e inmunidad del hospedador (Moya y Ferrer, 2016).

Durante los últimos 15 años, nuestra caracterización del genoma de múltiples endosimbiontes de insectos que se alimentan de floema (ver anterior reseña en SEM@foro n° 58, 2014), ha contribuido significativamente a comprender su papel aportando nutrientes deficitarios en la dieta del hospedador (Latorre y Manzano-Marín, 2017; López-Madrigal y Gil, 2017). Pero también hemos caracterizado varias cepas de *Blattabacterium*, endosimbionte de cucarachas, a pesar de ser éstas omnívoras (López-Sánchez *et al.*, 2009). Actualmente, nuestro sistema simbiote modelo es *Blattella germanica*.

### ¿POR QUÉ *BLATTELLA*?

Las cucarachas son paradigmáticas para estudiar la simbiosis, pues en cada individuo coexisten *Blattabacterium* (en bacteriocitos del cuerpo graso) y una compleja comunidad ectosimbionte (en el intestino posterior; Pérez-Cobas *et al.*, 2015). Ello permite estudiar, a lo largo del desarrollo del insecto, el diálogo entre dos sistemas simbióticos separados espacialmente. Analizamos los cambios que ocurren cuando la microbiota es sometida a perturbaciones (cambios en la dieta, uso de antibióticos con diferente espectro de actividad...).

*Blattabacterium* se transmite de las madres a los ovocitos, siendo la única bacteria pre-

sente en la ooteca, mientras que la microbiota intestinal se adquiere horizontalmente del ambiente, principalmente a través de las heces (Carrasco *et al.*, 2014; Rosas *et al.*, 2018). Estudios meta-ómicos nos han permitido modelizar la colaboración *Blattabacterium*-insecto para sintetizar glutamina a partir de ácido úrico almacenado en uricocitos (otras células especializadas del cuerpo graso; Patiño-Navarrete *et al.*, 2014). Seguimos tratando de averiguar el papel de la microbiota intestinal en la fisiología del insecto y si existe un diálogo entre ambos sistemas simbiotes.

Comprender el conjunto implica evaluar también cómo el hospedador controla ambos sistemas simbiotes. Actualmente estamos estudiando la inmunidad innata de *B. germanica*, buscando péptidos antimicrobianos (AMP) en bacteriocitos e intestino posterior. Estos AMP podrían también aumentar la permeabilidad de membranas, afectando al flujo metabólico en la interfaz hospedador-simbionte, permitiendo la integración metabólica con el hospedador.

## Y AHORA, BARTONELLA

Uno de los enfoques más explorados en la nueva biología sintética es la simplificación de células naturales, eliminando genes no esenciales o con efectos negativos, para generar un chasis adecuado al que agregar módulos genéticos para desempeñar una función de interés (Moya *et al.*, 2009). El estudio genómico de endosimbiontes contribuyó a la definición de genomas mínimos (Gil, 2014), pero estas bacterias no son cultivables y no pueden manipularse experimentalmente. Por ello, en nuestro actual proyecto, aprovechamos la posibilidad de cultivar *Bartonella*, endosimbionte facultativa de células de mamíferos, como modelo para desarrollar, a largo plazo,

un chasis endosimbionte que podría usarse con fines terapéuticos (por ejemplo, dirigida contra patógenos hematófagos o para introducir transitoriamente un gen de interés). Como *Bartonella* es un organismo fastidioso (se necesita hasta una semana para ver colonias en placa), hemos empezado por su modelización metabólica para diseñar un medio de cultivo mejorado. El siguiente paso será su modificación experimental para entender mejor el modelo de cara a futuras intervenciones.

**El microbioma humano** constituye nuestro otro gran programa de investigación. Suele afirmarse que es todo él benéfico, pero está lejos de ser demostrado. Tenemos evidencias de que la microbiota se va acoplado al hospedador, probablemente hasta ser óptima en la fase reproductiva, desacoplándose en edades avanzadas. Hemos demostrado, por ejemplo, que la producción por parte la microbiota intestinal de triptófano e indol, esenciales en nuestro metabolismo, es adecuada durante la infancia, pero declina progresivamente hasta ser casi nula en ancianos (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2019). Pero tenemos fundadas sospechas de que en la microbiota intestinal hay un núcleo de microorganismos que ha co-evolucionado con el hospedador humano, auténticos simbiotes mutualistas. Nuestro objetivo es determinar quiénes son y cómo contribuyen a la normal fisiología del hospedador a lo largo de la vida.

La definición de microbiota normal es clave desde el punto de vista clínico. Analizando los cambios de la microbiota intestinal en series temporales, hemos formulado un criterio matemático, basado en dos coeficientes de la ley de potencia de Taylor (variabilidad de taxones con el tiempo y coeficiente de la ley de potencia), que delimitan cuando una microbiota es sana o disbiótica (Martí *et al.*, 2017).

## ALGUNAS PUBLICACIONES RELEVANTES DEL GRUPO CITADAS EN EL TEXTO

- Carrasco P, Pérez-Cobas AE, van de Pol C, et al.** (2014). Succession of the gut microbiota in the cockroach *Blattella germanica*. *Int Microbiol* 17: 99-109.
- Gil R.** (2014). The minimal gene-set machinery. In *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine: Synthetic Biology*, 2nd edition. Meyers RA (ed.). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. pp. 1-36.
- Latorre A y Manzano-Marín A.** (2017). Dissecting genome reduction and trait loss in insect endosymbionts. *Ann NY Acad Sci* 1389: 52-75.
- López-Madrigrá S y Gil R.** (2017). Et tu, Brute? Not even intracellular mutualistic symbionts escape horizontal gene transfer. *Genes* 8: 247.
- López-Sánchez MJ, Neef A, Peretó J, et al.** (2009). Evolutionary convergence and nitrogen metabolism in *Blattabacterium* strain Bge, primary endosymbiont of the cockroach *Blattella germanica*. *PLoS Genet* 5: e1000721.
- Martí JM, Martínez-Martínez D, Rubio T, et al.** (2017). Health and disease imprinted in the time variability of the human microbiome. *mSystems* 2: e00144-16.
- Moya A, Peretó J, Gil R, Latorre A.** (2008). Learning how to live together: Genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nat Rev Genet* 9: 218-29.
- Moya A, Gil R, Latorre A, et al.** (2019). Towards minimal bacterial cells: evolution vs. design. *FEMS Microbiol Rev* 33: 225-35.
- Moya A y Ferrer M.** (2016). Functional redundancy-induced stability of gut microbiota subjected to disturbance. *Trends Microbiol* 24: 402-13.
- Patiño-Navarrete R, Piulachs MD, Belles X, et al.** (2014). The cockroach *Blattella germanica* obtains nitrogen from uric acid through a metabolic pathway shared with its bacterial endosymbiont. *Biol Lett* 10: 20140407.
- Pérez-Cobas A, Maiques E, Angelova A, et al.** (2015). Diet shapes the gut microbiota of the omnivorous cockroach *Blattella germanica*. *FEMS Microbiol Ecol* 91 pii: fiv022.
- Rosas T, García-Ferris C, Domínguez-Santos R, et al.** (2018). Rifampicin treatment of *Blattella germanica* evidences a fecal transmission route of their gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol* 94: fiv002.
- Ruiz-Ruiz S, Sanchez-Carrillo S, Ciordia S, et al.** (2019). Functional microbiome deficits associated with ageing: chronological age-threshold. *Aging Cell*, aceptado.

## Efectores de los sistemas de secreción tipo III de *Salmonella enterica*

Joaquín Bernal Bayard y Francisco Ramos Morales

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.  
Avda Reina Mercedes, 6. 41012 Sevilla.



De izquierda a derecha: Sara Martos Martínez de Morentin, Joaquín Bernal Bayard, Juan Luis Araujo Garrido, Manuel Benito López González, Francisco Ramos Morales, Julia Aguilera Herce, Andrea Rodríguez Hirtle

Muchas bacterias patógenas Gram negativas poseen sistemas de secreción tipo III (T3SS) relacionados con la virulencia. Se trata de aparatos relacionados evolutivamente con el flagelo semejantes a jeringuillas de tamaño minúsculo capaces de inyectar proteínas de las bacterias en las células del organismo eucariótico al que infectan. Estas proteínas, denominadas efectores, suelen interferir con vías de transducción de señales de la célula hospedadora para posibilitar la entrada o la supervivencia del patógeno. En muchos casos se desconoce la función concreta que realiza cada efector. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium es una bacteria capaz de infectar numerosas especies ani-

males. Mientras que en ratones produce una enfermedad sistémica potencialmente mortal semejante a la fiebre tifoidea, en humanos da lugar a gastroenteritis. Su virulencia depende en gran medida de dos T3SS (T3SS1 y T3SS2) que están codificados en dos islas de patogenicidad denominadas SPI1 y SPI2, respectivamente. Entre los dos secretan más de 40 efectores (Ramos-Morales, 2012). *Salmonella* es un patógeno intracelular que utiliza diversas vías para entrar en las células hospedadoras. Los efectores del T3SS1 son fundamentales para la invasión de células no fagocíticas como las epiteliales del intestino. Una vez dentro de la célula eucariótica, *Salmonella* se instala en una vacuola. El esta-

blecimiento de este nicho de supervivencia y replicación depende de efectores del T3SS2, aunque también participan efectores del sistema codificado en la SPI1.

Nuestro grupo se inició en el año 2004 con el objetivo de estudiar efectores de los T3SS de *Salmonella* para tratar de entender la contribución específica de algunos de ellos a la virulencia de esta bacteria. Hemos trabajado principalmente con cuatro efectores: SirP, SteA, SrfJ y SseK1.

SirP posee un dominio con varios motivos de repeticiones ricas en leucina (LRR) que suelen estar implicados en interacciones pro-

teína-proteína. En la región carboxilo terminal tiene otro dominio denominado NEL que está presente en otros efectores que forman parte de una nueva familia de proteínas con actividad ligasa de ubiquitina. Nuestro grupo demostró que SlrP posee esta actividad y que es capaz de interactuar con la tioredoxina humana (Trx), ubicuilarla y provocar una caída de su actividad (Bernal-Bayard & Ramos-Morales, 2009). La estructura tridimensional del complejo formado por SlrP y Trx la resolvimos en colaboración con el grupo de la doctora S. Nessler (Orsay, Francia). Las dos proteínas forman un heterotetrámero en el que las dos moléculas de SlrP interactúan con las dos de Trx, con una por medio del dominio LRR antes mencionado, con la otra a través de una región conectora existente entre el dominio LRR y el dominio NEL (Zouhir *et al.*, 2014). SlrP interactúa también con la proteína ERdj3, una chaperona del retículo endoplásmico que se une a proteínas mal plegadas y contribuye a su correcto plegamiento (Bernal-Bayard *et al.*, 2010). El efecto de ambas interacciones podría explicar el aumento en la tasa de muerte celular que hemos observado en los cultivos de células HeLa que expresan SlrP. Por otro lado, estudiamos también las condiciones de expresión y secreción de SlrP (Cordero-Alba & Ramos-Morales, 2014).

En el caso de SteA analizamos las condiciones que afectan a la síntesis de este efector, su secreción al medio de cultivo y su translocación a las células hospedadoras. El estado redox celular contribuye a la regulación transcripcional de *steA* a través de una vía reguladora que incluye al oxidante periplásmico DsbA, el péptido de membrana interna MgrB y el sistema de dos componentes PhoQ/PhoP (Cardenal-Muñoz & Ramos-Morales, 2013). Además se llevó a cabo un análisis transcriptómico en células HeLa transfectadas establemente con el gen del efector SteA. La expresión de SteA en estas células epiteliales, a través de la modificación de diferentes vías de transducción de señales, dio lugar a una alteración de la morfología celular y una disminución de la tasa de muerte celular espontánea, las uniones intercelulares y la velocidad de migración celular (Cardenal-Muñoz *et al.*, 2014).

SrfJ, una proteína de *Salmonella* que presenta similitud con la glucosilceramidasa humana, es un efector del T3SS2. El gen *srfJ* está regulado positivamente por PhoP a través del sistema de dos componentes SsrA/SsrB y negativamente por IoIR, el represor de los genes implicados en la utilización de mioinositol como fuente de carbono (Cordero-Alba *et al.*, 2012). Esto nos llevó a analizar posibles hospedadores donde la respuesta al mioinositol pudiera ser relevante. Encontramos que *srfJ* se expresa a partir de dos promotores, uno que responde a las señales intravacuolares y es activo cuando *Salmonella* infecta células de mamífero, y otro que responde a mioinositol y que se expresa cuando *Salmonella* coloniza plantas (Aguilera-Herce *et al.*, 2017). Nos interesa ahora incidir en la posible actividad glucosilceramidasa de este efector.

SseK1 forma parte de una familia de efectores que catalizan la transferencia de N-acetilglucosamina a residuos de arginina de ciertas proteínas hospedadoras. Nuestro grupo ha demostrado que SseK1 tiene un papel en la virulencia de *Salmonella* y puede translocarse a las células hospedadoras tanto a través del T3SS1 como a través del T3SS2, aunque con diferentes patrones y cinéticas dependiendo del tipo celular específico. Además, el sistema de dos componentes PhoQ/PhoP regula directamente y de manera positiva la expresión del gen *sseK1* (Baisón-Olmo *et al.*, 2015).

Recientemente, hemos desarrollado un aspecto aplicado del estudio de los T3SS consistente en el diseño de una vacuna viva contra *Pseudomonas aeruginosa*. Para ello empleamos una estirpe atenuada de *S. enterica* serovar Typhimurium en la que hemos expresado el antígeno PcrV de *P. aeruginosa* en fusión con el efector SseJ de *Salmonella*. Los ratones inmunizados con esta vacuna que después fueron infectados con *P. aeruginosa* presentaron una reducción en la carga bacteriana en bazo y pulmones y en los niveles de citoquinas proinflamatorias en suero y además mejoraron significativamente su supervivencia (Aguilera-Herce *et al.*, 2019).

Actualmente nos estamos centrando en la identificación y análisis de posibles nuevos sustratos de las actividades enzimáticas de los efectores SlrP, SseK1 y SrfJ y en la implementación del pez cebra como modelo de hospedador para estos estudios.

## REFERENCIAS

- Aguilera-Herce, J., Zarkani, A. A., Schikora, A. & Ramos-Morales, F. (2017).** Dual Expression of the *Salmonella* Effector SrfJ in Mammalian Cells and Plants. *Front Microbiol* **8**, 2410. *Frontiers*.
- Aguilera-Herce, J., García-Quintanilla, M., Romero-Flores, R., McConnell, M. J. & Ramos-Morales, F. (2019).** A Live *Salmonella* Vaccine Delivering PcrV through the Type III Secretion System Protects against *Pseudomonas aeruginosa*. *mSphere* **4**, e00116-19 (M. F. Pasetti, Ed.). American Society for Microbiology Journals.
- Baisón-Olmo, F., Galindo-Moreno, M. & Ramos-Morales, F. (2015).** Host cell type-dependent translocation and PhoP-mediated positive regulation of the effector SseK1 of *Salmonella enterica*. *Front Microbiol* **6**, 396.
- Bernal-Bayard, J. & Ramos-Morales, F. (2009).** *Salmonella* type III secretion effector SlrP is an E3 ubiquitin ligase for mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* **284**, 27587–95.
- Bernal-Bayard, J., Cardenal-Muñoz, E. & Ramos-Morales, F. (2010).** The *Salmonella* type III secretion effector, *Salmonella* leucine-rich repeat protein (SlrP), targets the human chaperone ERdj3. *J Biol Chem* **285**, 16360–8.
- Cardenal-Muñoz, E. & Ramos-Morales, F. (2013).** DsbA and MgrB regulate *steA* expression through the two-component system PhoQ/PhoP in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **195**, 2368–78.
- Cardenal-Muñoz, E., Gutiérrez, G. & Ramos-Morales, F. (2014).** Global impact of *Salmonella* type III secretion effector SteA on host cells. *Biochem Biophys Res Commun* **449**, 419–424.
- Cordero-Alba, M. & Ramos-Morales, F. (2014).** Patterns of expression and translocation of the ubiquitin ligase SlrP in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **196**, 3912–22.
- Cordero-Alba, M., Bernal-Bayard, J. & Ramos-Morales, F. (2012).** SrfJ, a *Salmonella* type III secretion system effector regulated by PhoP, RcsB, and IoIR. *J Bacteriol* **194**, 4226–36.
- Ramos-Morales, F. (2012).** Impact of *Salmonella enterica* type III secretion system effectors on the eukaryotic host cell. *ISRN Cell Biol* **2012**, 1–36.
- Zouhir, S., Bernal-Bayard, J., Cordero-Alba, M., Cardenal-Muñoz, E., Guimaraes, B., Lazar, N., Ramos-Morales, F. & Nessler, S. (2014).** The structure of the SlrP-Trx1 complex sheds light on the autoinhibition mechanism of the type III secretion system effectors of the NEL family. *Biochem J* **464**, 135–44.

# Mecanismos de adaptación de las bacterias al ambiente rizosférico. Caracterización de consorcios bacterianos para tecnologías agrícolas y de medio ambiente (RIZOSFERA-UAM)

Rafael Rivilla y Marta Martín



Dpto Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid



Miembros del grupo Rizosfera UAM de izquierda a derecha Paula Sansegundo Lobato, Álvaro Gómez Luengo, Esther Blanco Romero, Miguel Redondo-Nieto, David Durán, Ignacio Fernández Puente, Marta Martín, Daniel Garrido Sanz y Rafael Rivilla

El grupo Rizosfera UAM está interesado en el conocimiento de los mecanismos moleculares que promueven la competencia y persistencia de las bacterias en un nicho ecológico cambiante y complejo como es la rizosfera de las plantas. Utilizamos como bacteria modelo *Pseudomonas fluorescens* F113, que además de promover el crecimiento vegetal produce un antifúngico de amplio espectro eficaz contra hongos fitopatógenos. Esta rizobacteria también la hemos utilizado con anterioridad en tecnologías de biorremediación de PCBs. Hemos trabajado en la regulación de la variación de fase y la movilidad como principales caracteres implicados en la colonización competitiva

de la rizosfera. Observamos que durante el proceso de colonización de la raíz se seleccionan variantes de fase hipermóviles que expresan dos aparatos flagelares; uno típico de *Pseudomonas* y otro críptico que no aparece en cultivos de laboratorio y que es más similar al flagelo de *Azotobacter*. Estas variantes de fase hipermóviles desplazan a la estirpe silvestre en experimentos de colonización competitiva de la rizosfera (Martínez-Granero *et al.*, 2006; Barahona *et al.*, 2016). Mediante la disección de los mecanismos de transducción de señal que regulan el movimiento en *P. fluorescens* F113, hemos construido mutantes múltiples hipermóviles más competitivos que la estirpe

silvestre. La realización de ensayos de control biológico con estos mutantes demostró que la competitividad y persistencia mejora las cualidades antifúngicas de la cepa en ensayos realizados con hongos patógenos de fresa y tomate (Navazo *et al.*, 2009; Barahona *et al.*, 2011). Nuestra investigación más reciente se centra en la regulación de las respuestas de adaptación a los cambios ambientales llevados a cabo por los reguladores transcripcionales AmrZ y FleQ. Los análisis transcriptómicos realizados con los mutantes en *amrZ* y *fleQ* en condiciones tanto de cultivo de laboratorio como, durante el proceso de colonización de la rizosfera y los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina

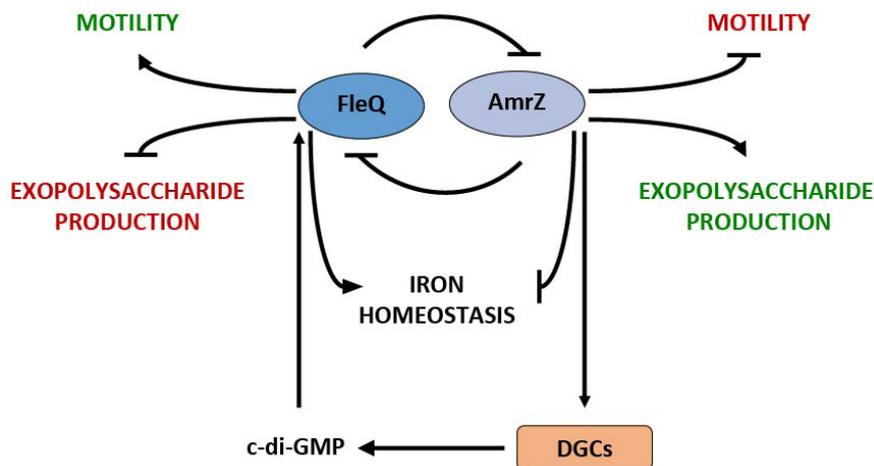


Fig. 1. FleQ y AmrZ forman un nodo central en la regulación de las respuestas de *P. fluorescens* F113 a los cambios ambientales. Blanco Romero *et al*, Scientific Reports 2018 8:13145. © The Authors 2018 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

que permiten analizar los regulones de AmrZ y FleQ, han demostrado que estas proteínas son factores transcripcionales globales y que forman un nodo de regulación central en las respuestas de señalización que se producen cuando hay cambios ambientales (Figura 1). Ambas proteínas se reprimen mutuamente y regulan de manera antagónica la formación de exopolisacáridos, la capacidad de movimiento, la formación de biopelículas, la regulación de los sistemas de secreción tipo VI y la homeostasis del hierro y del di-GMPc (Martínez-Granero *et al.*, 2014; Muriel *et al.*, 2017; Blanco-Romero *et al.*, 2018; Muriel *et al.*, 2019).

Así mismo, hemos analizado filogenéticamente el Complejo de especies de *P. fluorescens*, al que pertenece la cepa modelo F113. Este complejo presenta una alta diversidad genómica y genética. El análisis *in silico* de los genomas completos depositados en las bases de datos nos ha permitido agrupar todas las cepas de este Complejo en 8 grupos filogenéticos que presentan características específicas. En lo que respecta a sus posibles aplicaciones en agrobiotecnología los grupos filogenéticos que acumulan un mayor número de características que promueven el crecimiento vegetal son: *P. corrugata* (que incluye a F113) *P. protegens* y *P. chlororaphis*. Por otro lado, y respecto a sus aplicaciones

en tecnologías del medio ambiente, el grupo de mayor interés para la degradación de contaminantes es *P. jessenii* (Garrido-Sanz *et al.*, 2016).

Respecto a la transferencia de conocimientos y aplicaciones de las bacterias del suelo en tecnologías de medioambiente, el análisis del Complejo *fluorescens* nos ha permitido determinar secuencias específicas de grupo y hemos diseñado una estrategia de PCR, que nos permite asignar cualquier aislado a alguno de los 8 subgrupos (Garrido-Sanz *et al.*, 2017). También, hemos aislado 2 consorcios bacterianos para la descontaminación de PCBs y Diesel, en sistemas de rizorremediación. El análisis metagenómico nos ha permitido caracterizar estos consorcios y dilucidar el papel que juega cada miembro en la degradación del contaminante (Garrido-Sanz *et al.*, 2018; Garrido-Sanz *et al.*, 2019). Basados en este tipo de análisis también estamos colaborando con empresas del sector agrobiotecnológico, caracterizando consorcios para ser utilizados como inoculantes agrícolas para la promoción del crecimiento vegetal.

## BIBLIOGRAFÍA

Barahona E, Navazo A, Garrido-Sanz D, Muriel C, Martínez-Granero F, Redondo-Nieto N, Martín M y

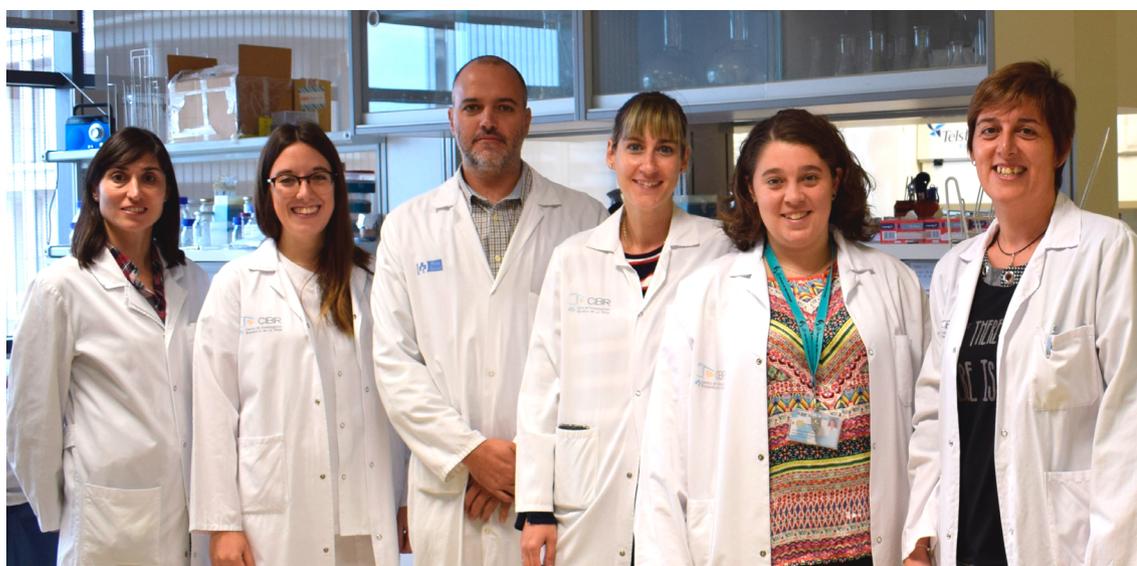
- Rivilla R. (2016) *Pseudomonas fluorescens* F113 can produce a second flagellar apparatus, which is important for plant root colonization. *Front Microbiol* 7:1471.
- Barahona E, Navazo A, Martínez-Granero F, Zea-Bonilla T, Pérez-Jiménez RM, Martín M y Rivilla R. (2011) *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability and improved biocontrol activity against fungal root pathogens. *Appl Environ Microbiol*. 77:5412-9
- Blanco-Romero E, Redondo-Nieto M, Martínez-Granero F, Garrido-Sanz D, Ramos-González MI, Martín M y Rivilla R. (2018) Genome-wide analysis of the FleQ direct regulon in *Pseudomonas fluorescens* F113 and *Pseudomonas putida* KT2440. *Sci Rep*. 8(1):13145.
- Garrido-Sanz D, Arrebola E, Martínez-Granero F, García-Méndez S, Muriel C, Blanco-Romero E, Martín M, Rivilla R, Redondo-Nieto M. (2017) Classification of isolates from the *Pseudomonas fluorescens* Complex into phylogenomic groups based in group-specific markers. *Front Microbiol*. 8:413
- Garrido-Sanz D, Manzano J, Martín M, Redondo-Nieto M, Rivilla R. (2018) Metagenomic analysis of a biphenyl-degrading soil bacterial consortium reveals the metabolic roles of specific populations. *Front Microbiol*. 9:232.
- Garrido-Sanz D, Meier-Kolthoff JP, Göker M, Martín M, Rivilla R, Redondo-Nieto M. (2016) Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *PLoS One*. 11(2):e0150183.
- Garrido-Sanz D, Redondo-Nieto M, Guirado M, Pindado Jiménez O, Millán R, Martín M, Rivilla R. (2019) Metagenomic insights into the bacterial functions of a Diesel-degrading consortium for the rhizoremediation of Diesel-polluted soil. *Genes (Basel)*. 10(6):456.
- Martínez-Granero F, Redondo-Nieto R, Vesga P, Martín M y Rivilla R. (2014) AmrZ is a global transcriptional regulator implicated in iron uptake and environmental adaptation in *Pseudomonas fluorescens* F113. *BMC Genomics*. 26;15:237
- Martínez-Granero F, Rivilla R y Martín M. (2006) Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Appl Environ Microbiol*. 72(5):3429-34.
- Muriel C, Arrebola E, Redondo-Nieto M, Martínez-Granero F, Jalvo B, Pfeilmeier S, Blanco-Romero E, Baena I, Malone JG, Rivilla R y Martín M. (2017) AmrZ is a major determinant of c-di-GMP levels in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Sci Rep*. 8(1):1979.
- Muriel C, Blanco-Romero E, Trampari E, Arrebola E, Durán D, Redondo-Nieto M, Malone JG, Martín M y Rivilla R. (2019) The diguanylate cyclase *AdrA* regulates flagellar biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* F113 through *SadB*. *Sci Rep*. 9(1):8096.
- Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, Martínez-Granero F, Rivilla R y Martín M. (2009) Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microbial Biotech*. Vol 2 Issue 4: 489-498.

# Grupo de Microbiología Molecular: Resistencia a los antibióticos

Beatriz Rojo-Bezares y Yolanda Sáenz Domínguez



Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño (La Rioja)



Grupo de Microbiología Molecular.  
De izquierda a derecha: Beatriz Rojo-Bezares, Paula Toledano, José Manuel Azcona-Gutiérrez, María López, Gabriela Chichón y Yolanda Sáenz.

Las infecciones bacterianas siguen siendo un gran problema en salud humana y animal; así como las contaminaciones bacterianas en alimentos o en medioambiente. Este problema se ve acentuado por el alarmante incremento y diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos, y por la escasez de alternativas terapéuticas disponibles para combatirlos. Desde el Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), el grupo de Microbiología Molecular se suma al esfuerzo mundial para luchar contra el problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos.

Nuestro grupo, dirigido por la Dra. Yolanda Sáenz y formado por químicos, biólogos, bioquímicos, farmacéuticos y médicos, se inició en 2008 con el propósito principal de caracterizar los mecanismos que las bacterias desarrollan para resistir la acción de los antibióticos, para incrementar su virulencia o para protegerse de presiones medioambientales o del sistema inmune del hospedador. Asimismo, estas investigaciones nos ayudan

a identificar nuevas dianas terapéuticas y a descubrir nuevos compuestos antimicrobianos que combatan estos patógenos.

Con un enfoque interdisciplinar usando técnicas de microbiología, biología molecular y celular, bioquímica, secuenciación masiva o transcriptómica, pretendemos responder a preguntas como:

¿por qué los antibióticos disponibles no tienen actividad frente a bacterias patógenas? ¿existe el mismo comportamiento patogénico entre una especie bacteriana de origen clínico que de origen animal, alimentario o medioambiental? ¿por qué se impone una especie bacteriana en infecciones de ciertos pacientes, como *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística? ¿podemos relacionar el conocimiento del genoma de una bacteria con su capacidad de infección o persistencia? ¿existen nuevas dianas o tecnologías terapéuticas que faciliten el control y erradicación de distintas bacterias patógenas?

Colaboramos con distintos hospitales, centros de investigación y tecnológicos tanto en formación de personal como en trabajos de investigación. En nuestro laboratorio, cada año contamos con 3-5 estudiantes en prácticas o estancias nacionales e internacionales. Además, impartimos cursos y seminarios a investigadores, especialistas y estudiantes y damos apoyo y servicio a empresas.

## LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

### *Pseudomonas aeruginosa*: origen, resistencia, virulencia y patogenia

La línea de investigación principal se centra en la especie *P. aeruginosa*, uno de los mayores responsables de infecciones hospitalarias y causante de complicaciones graves en enfermedades respiratorias crónicas (fibrosis quística, EPOC). Este patógeno supone un importante problema de salud, dado sus altos niveles de resistencia a antibióticos y virulencia; así como su gran ubicuidad y dificultad

de erradicación. Por ello, este problema no se limita al ámbito hospitalario, sino que requiere un análisis en diferentes nichos ecológicos.

A lo largo de los últimos 10 años, nuestro grupo ha conseguido una amplia colección de *P. aeruginosa* provenientes de muestras clínicas y no clínicas (individuos y animales sanos, alimentos y medioambiente) en las que se investiga: i) los niveles de resistencia a diversos antibióticos y los mecanismos moleculares implicados, ii) la presencia de elementos genéticos movilizables, iii) los factores biológicos implicados en la patogenia (sistemas de secreción, pigmentos, elastasas, motilidad, biofilm, etc.), iv) la toxicidad y virulencia bacteriana empleando modelos celulares o animales, v) genoma completo por secuenciación masiva, iv) nuevas dianas terapéuticas.

Entre los logros obtenidos en nuestro grupo, destacar la primera publicación sobre *P. aeruginosa* en muestras fecales de individuos sanos, la primera descripción de cepas portadoras de la citotoxina ExIA provenientes de muestras animales y medioambientales, la detección de nuevos integrones portadores de genes codificantes de carbapenemasas y la caracterización de clones de alto riesgo en cepas clínicas y no-clínicas. Así mismo con la colaboración del grupo de la Dra. A. Prince de la Universidad de Columbia (Nueva York, EEUU) descubrimos que la acumulación de succinato favorece el crecimiento y adaptación de esta bacteria a los pulmones de pacientes con fibrosis quística.

### Patógenos zoonóticos emergentes del género *Streptococcus*

Esta línea de investigación se fundamenta en el estudio tanto de *Streptococcus agalactiae* como de *Streptococcus* del grupo *bovis* y *S. dysgalactiae*, entre otros. En ausencia de medidas de prevención, *S. agalactiae* es la causa más frecuente de infección perinatal (meningitis y sepsis) mediante la transmisión vertical de la madre al recién nacido durante el parto, debido a la colonización del tracto genital en mujeres gestantes. En el ganado bovino la transmisión se produce principalmente en el ordeño, la infección cursa con cuadros de mastitis subclínica o incluso manifestaciones clínicas, conllevando fuertes pérdidas económicas para el sector lechero. En los últimos años, están emergiendo microorganismos zoonóticos, tales como

*S. bovis*, *S. suis*, *S. dysgalactiae*, *S. equi* y *S. canis*, como patógenos humanos que pueden suponer un problema clínico en el futuro.

Los objetivos planteados en nuestra investigación incluyen analizar los mecanismos de resistencia a antimicrobianos y metales pesados, mecanismos de virulencia y tipificación molecular de los aislados, estudiar los elementos genéticos móviles implicados en la diseminación y transferencia de resistencia y patogenia.

El primer trabajo de caracterización molecular de resistencia a antibióticos y metales pesados, de virulencia y de tipificación molecular realizado en cepas de *S. agalactiae* aisladas de embarazadas en La Rioja; así como las primeras descripciones del gen *Inu(C)* en cepas de *Streptococcus* del grupo *bovis* y del gen *Inu(B)* en una cepa clínica de *S. agalactiae* en Europa, son logros de nuestro grupo.

### Genómica bacteriana

En los dos últimos años, hemos incluido en nuestra investigación herramientas genómicas, basadas en la secuenciación masiva, no sólo para el estudio de *P. aeruginosa* y *Streptococcus*, sino también para caracterizar enterobacterias portadoras de carbapenemasas. Con dichas herramientas, determinamos resistoma, viruloma, elementos genéticos movilizables, islas de patogenidad, etc. que nos permitan averiguar las estructuras implicadas en la diseminación de la resistencia a carbapenémicos; así como la relación clonal y evolutiva en dichos géneros bacterianos.

### Nuevas terapias con actividad antimicrobiana o antibiofilm frente a bacterias patógenas

Los antibióticos disponibles son cada vez menos eficaces por lo que existe una necesidad urgente de aplicar nuevos antimicrobianos para prevenir el crecimiento y diseminación de bacterias patógenas de importancia clínica, animal, alimentaria y medioambiental. El plasma atmosférico frío es una técnica capaz de inhibir el crecimiento microbiano, y como no implica condiciones extremas, se ha sugerido su uso para descontaminar superficies sin afectar su estructura.

Desde el grupo de Microbiología Molecular nos proponemos buscar nuevas alternativas

antimicrobianas, que incluyen nuevos compuestos químicos, nanopartículas, péptidos o bacteriocinas, productos naturales obtenidos de bacterias, hongos, plantas, animales y algas; así como el uso del plasma atmosférico frío como técnica antimicrobiana y antibiofilm.

### PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

- Riquelme SA, Lozano C, Moustafa AM, Limmatta K, Tomlinson KL, Britto C, Khanal S, Gill SK, Narechania A, Azcona-Gutiérrez JM, DiMango E, Saénz Y, Planet P, Prince A. (2019). CFTR-PTEN-dependent mitochondrial metabolic dysfunction promotes *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. *Sci Transl Med* 11(499). eaav4634.
- Lozano C, Azcona-Gutiérrez JM, Van Bambeke F, Saénz Y. (2018). Great phenotypic and genetic variation among successive chronic *Pseudomonas aeruginosa* from a cystic fibrosis patient. *PLoS One* 13(9):e0204167.
- Ruiz-Roldán L, Bellés A, Bueno J, Azcona-Gutiérrez JM, Rojo-Bezares B, Torres C, Castillo FJ, Saénz Y, Seral C. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish children: occurrence in faecal samples, antimicrobial resistance, virulence, and molecular typing. *Biomed Res Int* 2018:8060178.
- Rojo-Bezares B, Estepa V, Cebollada R, de Toro M, Somalo S, Seral C, Castillo FJ, Torres C, Saénz Y. (2014). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons. *Int J Med Microbiol* 304(3-4): 405-14.
- Estepa V, Rojo-Bezares B, Torres C, Saénz Y. (2014). Faecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in healthy humans: antimicrobial susceptibility and global genetic lineages. *FEMS Microbiol Ecol* 89(1): 15-9.
- Estepa V, Rojo-Bezares B, Torres C, Saénz Y. (2015). Genetic lineages and antimicrobial resistance in *Pseudomonas* spp. isolates recovered from food samples. *Foodborne Pathog Dis* 12(6): 486-91.
- Rojo-Bezares B, Estepa V, de Toro M, Undabeitia E, Olarte I, Torres C, Saénz Y. (2011). A novel class 1 integron array carrying *bla<sub>VIM-2</sub>* genes and a new insertion sequence in a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a Spanish hospital. *J Med Microbiol* 60(Pt 7): 1053-4.
- Rojo-Bezares B, Azcona-Gutiérrez JM, Martín C, Jareño MS, Torres C, Saénz Y. (2016). *Streptococcus agalactiae* from pregnant women: antibiotic and heavy-metal resistance mechanisms and molecular typing. *Epidemiol Infect* 144(15): 3205-14.
- Porres-Osante N, Azcona-Gutiérrez JM, Rojo-Bezares B, Undabeitia E, Torres C, Saénz Y. (2014). Emergence of a multiresistant KPC-3 and VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* strain in Spain. *J Antimicrob Chemother* 69(7): 1792-5.
- Múgica-Vidal R, Sainz-García E, Álvarez-Ordoñez A, Prieto M, González-Raurich M, López M, López M, Rojo-Bezares B, Saénz Y, Alba-Elías F. (2019). Production of Antibacterial Coatings Through Atmospheric Pressure Plasma: a Promising Alternative for Combatting Biofilms in the Food Industry. *Food Bioproc Tech* 18(8): 1251-63.

# Microbiota nasal y enfermedades respiratorias porcinas

Virginia Aragón, Florencia Correa-Fiz, Marina Sibila



Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA)-Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA),  
Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain



Foto grupo. Miembros actuales del grupo. De izquierda a derecha, Yasser Mahmmoud, Miguel Blanco, Pau Obregón, Virginia Aragón, Berenice Plasencia, Flor Correa, Carlos Neila, Sergi López, Marina Sibila, Nuria Galofré, Eva Huerta y Mar Costa

Existe una gran presión para la reducción en el uso de antimicrobianos, por el constante aumento de las resistencias y el inminente problema para la salud de los animales y las personas. En España, se está trabajando a través de un plan nacional, el PRAN, y, aunque el uso de antimicrobianos todavía es alto, cabe resaltar la drástica reducción del 97% en uso de colistina en cerdos entre 2015 y 2018. En la producción porcina, las enfermedades respiratorias representan uno de los mayores problemas sanitarios y en consecuencia son una de las principales causas de uso de antimicrobianos en este sector.

Unos de los patógenos respiratorios de importancia en el sector porcino es *Haemophilus parasuis*, que causa la enfermedad de Glässer (poliserositis fibrinosa, incluidas meningitis y artritis). Durante años nuestro grupo se ha centrado en el estudio de la patogenidad de esta bacteria con el objetivo final de desarrollar una vacuna eficaz. A tra-

vés de estudios de tipado genético, ensayos de virulencia e infecciones experimentales en lechones, definimos distintos grados de virulencia en las cepas de campo y se detectó un grupo de moléculas asociadas a dicha virulencia, los autotransportadores triméricos VtaA. Los VtaAs son proteínas antigénicas localizadas en la membrana externa, que se expresan durante la infección del cerdo. Los VtaAs son factores de virulencia, involucrados en mecanismos como adhesión a proteínas de la matriz extracelular o resistencia a la fagocitosis. El análisis de su estructura nos permitió definir un epítipo expuesto en la superficie bacteriana, común a todas los VtaA de las cepas virulentas. Los anticuerpos frente a este epítipo son opsonizantes y permitirían dirigir la respuesta específicamente a las cepas virulentas. Además, al estar presente el epítipo en todas los VtaA asociadas con virulencia, se evitaría el intercambio antigénico (“antigenic switching”) entre diferentes VtaAs.

En los últimos años nuestro interés se ha ampliado a otros patógenos porcinos, como *Mycoplasma hyorhinis* y *Streptococcus suis*, y al papel de la microbiota nasal. La cavidad nasal es la vía natural de entrada de los patógenos respiratorios, y allí encuentran la primera barrera frente a la infección, la microbiota nasal. La comparación de esta microbiota en lechones de granjas con enfermedad de Glässer frente a la de lechones sanos nos permitió determinar que la microbiota nasal puede predisponer a los lechones a sufrir enfermedades. Observamos que varios taxones bacterianos, como *Bacteroidales*, *Lactobacillales* y *Clostridiales*, estaban reducidos en la microbiota nasal en lechones destetados que luego desarrollaron la enfermedad de Glässer. La enfermedad de Glässer está producida por las cepas virulentas de *H. parasuis*, pero esta bacteria también tiene cepas no virulentas, que pueden proteger frente a la enfermedad. La microbiota asociada con estos dos tipos de cepas de

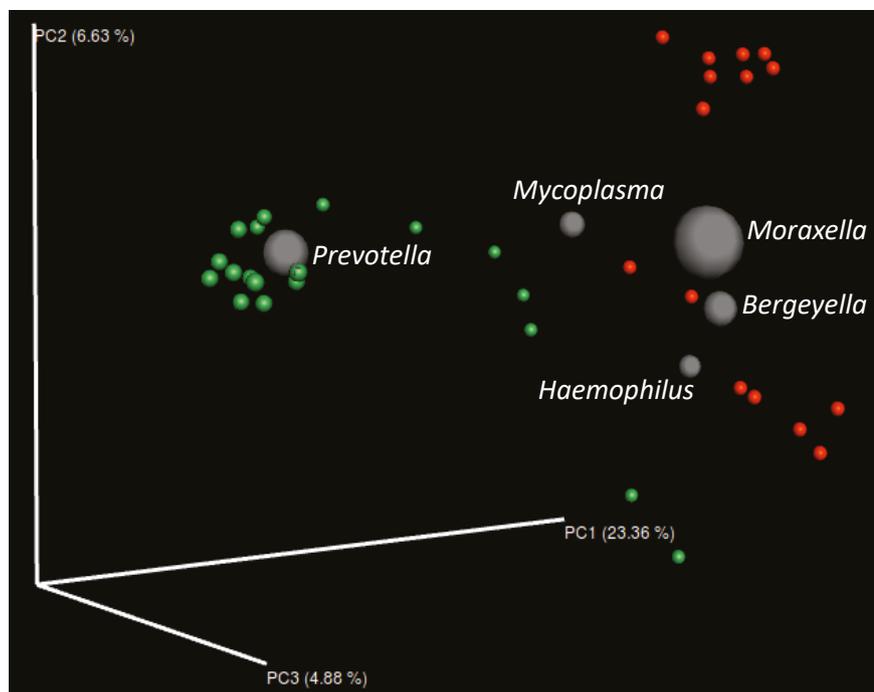


Figura 1. Análisis de coordenadas principales (PC) mostrando la diversidad beta de la microbiota nasal de lechones al destete (3-4 semanas de vida) antes (puntos rojos) y después (puntos verdes) de la eliminación de los tratamientos antimicrobianos perinatales. Las esferas grises indican los 5 géneros más abundantes y son proporcionales a su abundancia relativa.

*H. parasuis* resultó ser diferente, detectándose algunas familias bacterianas que podrían facilitar la colonización de cepas virulentas de *H. parasuis* (y por lo tanto aumentar el riesgo de enfermedad), y otras distintas que podrían facilitar la colonización de cepas no virulentas (y por lo tanto promover la protección frente a la enfermedad de Glässer). Estos hallazgos apoyan la idea de que se pueden diseñar intervenciones específicas para conseguir una composición de la microbiota adecuada para garantizar la protección de los lechones. Pero el papel de la microbiota nasal no es específico de la enfermedad de Glässer, y lechones que luego desarrollaron poliserositis por *M. hyorhinis* tenían una composición muy diferente a la de los lechones de granjas sanas, con distintos géneros bacterianos asociados a salud y enfermedad.

Además, los antimicrobianos puede tener efectos colaterales en la microbiota beneficiosa. Recientemente hemos demostrado que la eliminación de tratamientos antimicrobianos perinatales produce un aumento de la diversidad bacteriana en la microbiota nasal. Este

aumento de diversidad tiene efectos beneficiosos a largo plazo, con una reducción en la mortalidad y en el coste de medicación, y un aumento productivo. Los cambios más significativos en la composición de la microbiota al eliminar los antimicrobianos fueron un aumento en *Prevotella* y *Lactobacillus*, y una reducción de *Moraxella* y *Bergeyella* (Figura 1).

Nuestro grupo tiene también experiencia en otros patógenos respiratorios de gran importancia económica a nivel mundial como son *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, agentes causales de neumonía y pleuroneumonía en cerdos. Cabe destacar la puesta a punto de los modelos de enfermedad en cerdo, que son de gran utilidad para estudios de nuevos productos terapéuticos, vacunas o para la validación de herramientas diagnósticas. Además, se ha determinado que el diagnóstico de *M. hyopneumoniae* mejora usando hisopos laríngeos en animales vivos y muestras del tracto respiratorio inferior (lavado brocoalveolar o hisopo pulmonar) en anima-

les muertos, y se han establecidos métodos de cuantificación de lesiones pulmonares para ambos patógenos.

Nuestro objetivo de futuro continuará siendo el control de las enfermedades respiratorias porcinas en ausencia de antibióticos, con especial énfasis en estrategias alternativas, como el desarrollo de probióticos.

## PUBLICACIONES REPRESENTATIVAS

- Betlach AM, Maes D, Garza-Moreno L, Tamiozzo P, Sibila M, Haesebrouck F, Segalés J, Pieters M.** (2019). *Mycoplasma hyopneumoniae* variability: Current trends and proposed terminology for genomic classification. *Transbound Emerg Dis* 66:1840-54.
- Costa-Hurtado M, García-Rodríguez L, Lopez-Serrano S y Aragon V.** (2019). *Haemophilus parasuis* VtaA2 is involved in adhesion to extracellular proteins. *Vet Res* 50:69.
- Correa-Fiz F, Gonçalves Dos Santos JM, Illas F y Aragon V.** (2019). Antimicrobial removal on piglets promotes health and higher bacterial diversity in the nasal microbiota. *Sci Rep* 9:6545.
- Garza-Moreno L, Segalés J, Aragón V, Correa-Fiz F, Pieters M, Carmona M, Krejci R y Sibila M.** (2019). Characterization of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains in vaccinated and non-vaccinated pigs from Spanish slaughterhouses. *Vet Microbiol* 231:18-23.
- García-Morante B, Dors A, León-Kempis R, Pérez de Rozas A, Segalés J, Sibila M.** (2018) Assessment of the in vitro growing dynamics and kinetics of the non-pathogenic J and pathogenic 11 and 232 *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vet Res* 49:45.
- Fernández-Aguilar X, Gottschalk M, Aragon V, Cámara J, Ardanuy C, Velarde R, Galofré-Milà N, Castillo-Contreras R, López-Olvera JR, Mentaberre G, Colom-Cadena A, Lavin S y Cabezón O.** (2018). Urban Wild Boars and Risk for Zoonotic *Streptococcus suis*, Spain. *Emerg Infect Dis* 24(6):1083-6.
- Mathieu-Denoncourt A, Letendre C, Auger JP, Segura M, Aragon V, Lacouture S y Gottschalk M.** (2018). Limited interactions between *Streptococcus suis* and *Haemophilus parasuis* in vitro co-infection studies. *Pathogens* 7(1). pii: E7.
- Howell KJ, Weinert LA, Peters SE, Wang J, Hernandez-García J, Chaudhuri RR, Luan SL, Angen Ø, Aragon V, Williamson SM, Langford PR, Rycroft AN, Wren BW, Maskell DJ y Tucker AW.** (2017). "Pathotyping" Multiplex PCR Assay for *Haemophilus parasuis*: a Tool for Prediction of Virulence. *J Clin Microbiol* 55:2617-28.
- Correa-Fiz F, Galofre-Mila N, Costa-Hurtado M y Aragon V.** (2017). Identification of a surface epitope specific of virulent strains of *Haemophilus parasuis*. *Vet Microbiol* 198:116-20.
- Correa-Fiz F, Fraile L y Aragon V.** (2016). Piglet nasal microbiota at weaning may influence the development of Glässer's disease during the rearing period. *BMC Genomics* 17:404.

# Filogenómica y genómica comparativa de arqueas y bacterias halófilas

Antonio Ventosa, Cristina Sánchez-Porro, Rafael Ruiz de la Haba, Blanca Vera Gargallo, Ana Durán Viseras, Cristina Galisteo y Maribel Reina



Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla



Componentes del grupo. De izquierda a derecha: Antonio Ventosa, Maribel Reina, Blanca Vera, Cristina Sánchez-Porro, Ana Durán, Rafael R. de la Haba, Cristina Galisteo.

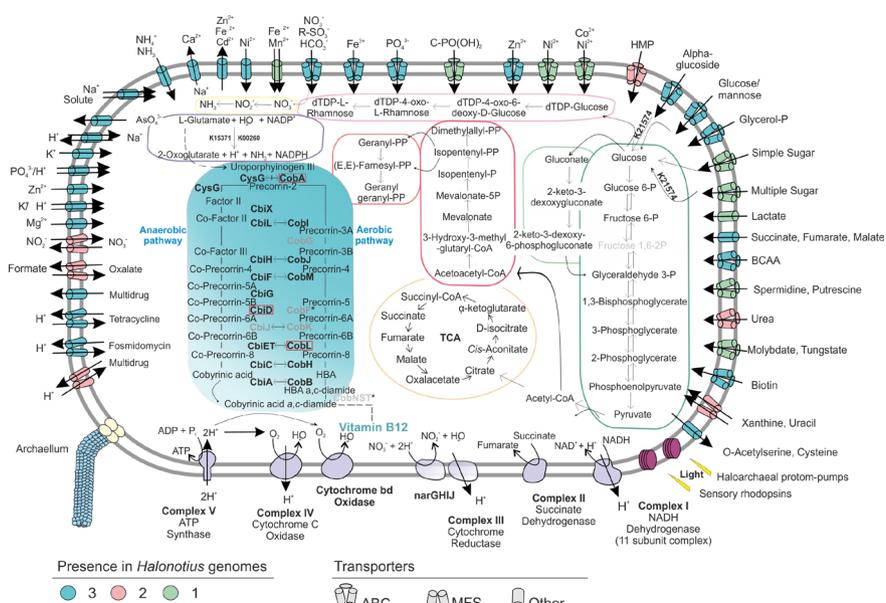
Nuestro grupo de investigación ha venido realizando estudios metagenómicos en ambientes hipersalinos, especialmente en salinas costeras de nuestro país, que constituyen excelentes modelos de estudio de hábitats extremos, presentando un gradiente de salinidad desde la del agua de mar hasta la saturación de sales. Estos estudios han permitido determinar la estructura y actividad de los grupos de arqueas y bacterias que constituyen la diversidad microbiana de estos sistemas hipersalinos, de los cuales un porcentaje elevado de microorganismos abundantes en estos ambientes aún no han sido aislados en cultivo puro. Con tal motivo, un objetivo de nuestro grupo consiste en realizar estudios exhaustivos enfocados al aislamiento y caracterización de dichos grupos de arqueas y bacterias halófilas a partir de salinas marinas.

Entre los nuevos grupos que hemos aislado y caracterizado en detalle recientemente se encuentran especies de los géneros *Natronomonas*, *Halorientalis*, *Natrinema* y

*Halorubrum*, y muy especialmente debemos referirnos al aislamiento de tres nuevas cepas pertenecientes al género *Halonotius* y cuatro nuevas cepas que constituyen un nuevo género, para el que proponemos la designación de *Halosegnis*, con dos nuevas especies: *Halosegnis longus* y *Halosegnis rubeus*. Estudios de reclutamiento genómico y de comparación de secuencias ribosómicas indican que estos nuevos taxones constituyen grupos abundantes en ambientes hipersalinos, con una amplia distribución geográfica. Las reconstrucciones metabólicas basadas en el análisis de los genomas de las especies del género *Halonotius* (Figura 2) demostró que poseen los genes de biosíntesis de cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>), un resultado relevante que permitiría justificar su amplia distribución geográfica y abundancia en ambientes hipersalinos, en los cuales podrían desempeñar un importante papel como fuente de dicha vitamina. Estos estudios forman parte de la Tesis Doctoral de Ana Durán Viseras, que será presentada próximamente.

## DIVERSIDAD FILOGENÓMICA Y FUNCIONAL DE PROCARIOTAS EN SUELOS HIPERSALINOS

Un proyecto de investigación que actualmente estamos desarrollando tiene como objetivos la determinación de la estructura y actividad de la comunidad procariota de suelos hipersalinos, así como la comparación de dichos ambientes terrestres con los ambientes hipersalinos acuáticos que hemos estudiado previamente y de los que existe mucha mayor información. Este estudio ha sido objeto de una Tesis Doctoral, realizada por Blanca Vera Gargallo (2018), en suelos hipersalinos localizados en las Marismas del Odiel, Huelva, mediante el empleo de técnicas metagenómicas, metagenéticas y de marcaje con isótopos estables (SIP). Los suelos hipersalinos estudiados mostraron una mayor diversidad tanto taxonómica como funcional con respecto a los ambientes acuáticos estudiados con anterioridad, siendo mayoritarios grupos pertenecientes a *Euryarchaeota*, *Bacteroidetes*, *Balneolaeota* y *Rhodothermaeota*,



Reconstrucción metabólica de haloarqueas del género *Halorubrum* (tomada de Durán-Viseras *et al.*, Front. Microbiol. 10: 1928, 2019).

si bien una elevada proporción de secuencias metagenómicas se afiliaban a taxones no cultivados hasta la fecha, especialmente pertenecientes al dominio *Bacteria*. Los estudios de SIP sugieren que la comunidad de arqueas de los suelos salinos estudiados se encuentra mejor adaptada que la comunidad bacteriana presente en dichos ambientes extremos (Vera-Gargallo & Ventosa, 2018; Vera-Gargallo *et al.*, 2019).

## GÉNERO *SALINIVIBRIO*: MLSA Y GENÓMICA COMPARATIVA

El género *Salinivibrio* incluye bacterias halófilas moderadas, que se encuentran normalmente en ambientes hipersalinos (salinas, lagos salinos), así como en salmueras y alimentos en salazón. Este género incluye un número muy reducido de especies y nuestro grupo de investigación ha venido realizando estudios acerca de la situación taxonómica de las mismas, así como el aislamiento de nuevas cepas de *Salinivibrio* que pudieran constituir nuevas especies de dicho género. Con dicha finalidad, y como parte del estudio de Tesis Doctoral de Clara López Hermoso (2017), aislamos 70 nuevas cepas de ambientes salinos de diferentes localizaciones. Debido a la dificultad para diferenciar dichas cepas a nivel de especie mediante la comparación de

secuencias del ARNr 16S, establecimos una metodología alternativa, basada en un análisis por secuenciación multilocus (MultiLocus Sequence Analysis, MLSA), mediante la comparación de los genes "housekeeping" *gyrB*, *recA*, *rpoA* y *rpoB*. Este estudio fue validado mediante la realización de estudios alternativos basados en las técnicas convencionales de hibridación ADN-ADN, usadas tradicionalmente en la delimitación de especies en procariontes (López-Hermoso *et al.*, 2017). Más recientemente, hemos obtenido los genomas de 36 cepas de *Salinivibrio*, incluyendo las cepas tipo de todas las especies y subespecies descritas. Por otro lado, al no disponer de ningún genoma cerrado de representantes de *Salinivibrio*, hemos procedido a la secuenciación del genoma completo de la cepa tipo de *Salinivibrio kushneri*, una especie descrita recientemente por nuestro grupo de investigación. Al igual que otros miembros de la familia *Vibrionaceae*, *S. kushneri* posee dos cromosomas circulares con tamaños de 2,84 Mb y 0,60 Mb, respectivamente; por otro lado, posee un elevado número (9) de operones ribosómicos, típico de bacterias con tasas de crecimiento rápido en medios de laboratorio. El análisis de los genomas de las cepas de *Salinivibrio* puso de manifiesto una alta homogeneidad y grado de sintenia entre los representantes de este género. El estudio filogenómico ha permitido conocer con detalle la

estructura del género, quedando constituido por seis especies (*S. costicola*, *S. siamensis*, *S. sharmensis*, *S. proteolyticus*, *S. kushneri* y *S. socompensis*) y una especie adicional, que debe ser descrita en el futuro (de la Haba *et al.*, 2019).

## PUBLICACIONES SELECCIONADAS (ÚLTIMOS 5 AÑOS)

- Ventosa A, de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Papke RT** (2015). Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Curr. Op. Microbiol.* 25: 80-87.
- Amoozegar MA, Siroosi M, Atashgahi S, Smidt H, Ventosa A** (2017). Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. *Microbiology* 163: 623-645.
- López-Hermoso C, de la Haba RR, Sánchez-Porro C, Papke RT, Ventosa A** (2017). Assessment of Multilocus Sequence Analysis as a valuable tool for the classification of the genus *Salinivibrio*. *Front. Microbiol.* 8: 1107.
- Oren A, Ventosa A, Kamekura M** (2017). *Class Haloarchaea*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. W. B. Whitman (ed.), pp. 1-5. Wiley & Sons, New Jersey.
- León MJ, Hoffmann T, Sánchez-Porro C, Heider J, Ventosa A, Bremer E** (2018). Compatible solute synthesis and import by the moderate halophile *Spiribacter salinus*: physiology and genomics. *Front. Microbiol.* 9: 108.
- Vera-Gargallo B, Ventosa A** (2018). Metagenomic insights into the phylogenetic and metabolic diversity of the prokaryotic community dwelling in hypersaline soils from the Odiel saltmarshes (SW Spain). *Genes* 9: 152.
- de la Haba RR, Corral P, Sánchez-Porro C, Infante-Domínguez C, Makkay A, Amoozegar MA, Ventosa A, Papke RT** (2018). Genotypic and lipid analyses of strains from the archaeal genus *Halorubrum* reveal insights into their taxonomy, divergence and population structure. *Front. Microbiol.* 9: 512.
- Vera-Gargallo B, Chowdhury TR, Brown J, Fansler SJ, Durán-Viseras A, Sánchez-Porro C, Bailey VL, Jansson JK, Ventosa A** (2019). Spatial distribution of prokaryotic communities in hypersaline soils. *Sci. Rep.* 9: 1769.
- Ventosa A, de la Haba RR, Sánchez-Porro C** (2019). Genus *Halorubrum*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. W. B. Whitman (ed.), pp. 1-12. Wiley & Sons, New Jersey.
- Amoozegar MA, Safarpour A, Noghabi KA, Bakhtiari T, Ventosa A** (2019). Halophiles and their vast potential in biofuel production. *Front. Microbiol.* 10: 1895.
- Durán-Viseras A, Andrei A-S, Ghai R, Sánchez-Porro C, Ventosa A** (2019). New *Halorubrum* species provide genomics-based insights into cobalamin synthesis in haloarchaea. *Front. Microbiol.* 10: 1928.
- de la Haba RR, López-Hermoso C, Sánchez Porro C, Konstantinidis K, Ventosa A** (2019). Comparative genomics and phylogenomic analysis of the genus *Salinivibrio*. *Front. Microbiol.* 10: 2104.

## Grupo MICROMOL: Identificación de dianas terapéuticas y desarrollo de estrategias alternativas para el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas

Jordi Barbé<sup>a</sup>, Montserrat Llagostera<sup>a</sup>, Susana Campoy<sup>a</sup>, María Pilar Cortés<sup>a</sup>, Jesús Aranda<sup>a</sup> y Ivan Erill<sup>b</sup>

Jordi.Barbe@uab.cat  
Susana.Campoy@uab.cat

<sup>a</sup>Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Campus Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona  
y <sup>b</sup>Department of Biological Sciences, University of Maryland, Baltimore County, Baltimore, MD, United States  
<http://grupsderecerca.uab.cat/micromol/en>



Foto del grupo: De izquierda a derecha, arriba: Marc Gaona, Jordi Corral, M. Pilar Cortés, Ruth Ricart, Miquel Sánchez-Osuna, Ivan Erill, Joan Ruiz, Jesús Aranda, Montserrat Llagostera y Jordi Barbé. Abajo: Susana Escribano, Elisabeth Frutos, Susana Campoy, Julia López y Jennifer Otero.

La selección y dispersión de bacterias multirresistentes fruto de un uso abusivo de los antibióticos en sus diferentes ámbitos de aplicación, ha provocado la disminución de la efectividad de los compuestos antimicrobianos disponibles. Esto supone uno de los mayores retos de nuestra sociedad y de la salud pública a nivel mundial, ya que no sólo conlleva un coste sanitario elevado, sino que, año tras año, aumenta sin cesar el número de muertes debidas a estos patógenos recalcrantes.

La comprensión de los mecanismos moleculares que gobiernan el comportamiento de

los patógenos bacterianos es esencial para el desarrollo de terapias que actúen de manera diferencial a como lo hacen los sistemas antimicrobianos conocidos y permitan la prevención y el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

En este escenario, las líneas de investigación de nuestro grupo tratan de ahondar en la identificación de nuevas dianas terapéuticas y en el desarrollo de estrategias alternativas que permitan incrementar la eficiencia y la variedad de herramientas enfocadas al tratamiento y prevención de infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos.

Desde el inicio de nuestra andadura, en 1985, los mecanismos asociados a la reparación del DNA, y concretamente a los que se refieren al sistema SOS, una respuesta génica que se activa en presencia de lesiones en el DNA, han sido una de las bases en nuestra investigación. Nuestros estudios han permitido definir la red génica de este sistema y caracterizar su regulación en multitud de microorganismos, trazando la posible evolución de dicha respuesta a lo largo del Dominio Bacteria (Erill *et al.*, 2007). Además, hemos vinculado la implicación del sistema SOS con la capacidad de diseminación de resistencias a antibióticos y de islas de patogenicidad y

otros factores de virulencia (Guerin *et al.*, 2009). Más recientemente, nuestros trabajos han demostrado que el regulador positivo de la respuesta SOS, RecA, está directamente asociado con la quimiotaxis y algunos movimientos sobre superficie, como *swarming* o *twitching* en *Salmonella enterica* o en *Acinetobacter baumannii*, respectivamente (Irazoki *et al.*, 2016). Los estudios en la motilidad de *A. baumannii* (Pérez-Varela *et al.*, 2017), han derivado en un nuevo proyecto de investigación en el que hemos podido evidenciar como transportadores pertenecientes a prácticamente todas las familias de bombas de flujo descritas, además de su papel en la resistencia, están implicadas en la motilidad y en la virulencia de este microorganismo (Pérez-Varela *et al.*, 2019). Estos resultados nos permiten continuar con esta línea dirigida a la búsqueda de nuevos tratamientos centrados en moléculas como potenciales inhibidores de dichas bombas.

Otra línea de trabajo importante en nuestro grupo ha sido el estudio de los sistemas de captación de cationes divalentes, oligoelementos esenciales para la mayoría de los organismos vivos. Dentro del hospedador la concentración disponible de éstos es extraordinariamente baja, de modo que las bacterias patógenas han desarrollado sistemas de captación de alta afinidad que les permiten sobrevivir en estos ambientes. Estos mecanismos están expuestos en la superficie del patógeno y acostumbran a ser altamente inmunógenos, lo que los convierte en candidatos perfectos para el desarrollo de estrategias de inmunoterapia. Nuestro grupo ha estudiado los sistemas de captación y sus mecanismos de control en *S. enterica*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, identificando proteínas y cepas que permitan el desarrollo de nuevas vacunas (Teixido *et al.*, 2011; Aranda *et al.*, 2012). Actualmente, gracias a la concesión de financiación por un proyecto, estamos estudiando los perfiles de sistemas de captación de hierro en bacterias conocidas como ESKAPE (*Enterococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.) de origen hospitalario, y que conforman un grupo de especies bacterianas para las que la Organización Mundial de la Salud

determinó como prioritaria la búsqueda de nuevas estrategias para su tratamiento dado su elevado grado de multiresistencia. El objetivo principal de este proyecto es el desarrollo de mecanismos de inmunoterapia activa y pasiva de amplio espectro basados en la conservación de estos sistemas de captación de alta afinidad entre distintos aislamientos y especies.

Una tercera alternativa de tratamiento en la que nuestro grupo está dedicado desde hace más de diez años es la aplicación biotecnológica de los bacteriófagos utilizando como modelo *S. enterica*. Fruto de dicha investigación, hemos desarrollado un coctel de distintos bacteriófagos que se ha aplicado con éxito como terapia oral en pollos de engorde infectados experimentalmente con *S. enterica* en condiciones que mimetizan las de una granja comercial (Colom *et al.*, 2015; Colom *et al.*, 2017), y también en el tratamiento de alimentos contaminados experimentalmente (Spricigo *et al.*, 2013). Gracias a la colaboración con el grupo de NanoQuímica y Materiales Supramoleculares dirigido por el Dr. Daniel Maspoch del Institut Català de Nanotecnologia (ICN2), hemos desarrollado diferentes estrategias de encapsulación de bacteriófagos con diferentes materiales biocompatibles, que les confieren estabilidad incrementando su tiempo de residencia y prolongando de forma significativa su efecto terapéutico tras su administración en terapia oral (Colom *et al.*, 2015; Colom *et al.*, 2017). Continuando con esta línea, nuestro interés actual y futuro recae en determinar y caracterizar los mecanismos de resistencia a los bacteriófagos en diferentes ámbitos de aplicación y también en profundizar en el análisis de sus genomas para poder determinar nuevas funciones que ayuden a garantizar la seguridad de los futuros productos basados en fagos. Relacionado con ello, estamos involucrados en un proyecto H2020 Fast Track to Innovation para el desarrollo de un producto comercial biocida y un aditivo alimentario basado en bacteriófagos para el control de *S. enterica*.

En toda nuestra trayectoria, queda patente nuestro interés por trasladar a la sociedad todo nuestro bagaje adquirido en la investigación básica. Por ello, la transferencia de tecnología es también un eje que articula este

grupo reflejada en la obtención de diversas patentes vinculadas a sistemas de captación de cationes divalentes y bacteriófagos, esta última de concesión internacional y licenciada para su explotación.

Además, también intentamos promover la relación con el sector productivo de nuestra sociedad ofreciendo servicios, estableciendo acuerdos y/o contratos con empresas, para, en base a nuestra experiencia, estimular la transferencia de tecnología y conocimiento.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aranda, J., Teixidó, L., Fittipaldi, N., Cortés, P., Llagostera, M., Gottschalk, M., and Barbé, J. (2012) Inactivation of the gene encoding zinc-binding lipoprotein 103 impairs the infectivity of *Streptococcus suis*. *Can J Vet Res* 76: 72–6.
- Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Arriñez-Soriano, J., Cortés, P., Maspoch, D., and Llagostera, M. (2017) Microencapsulation with alginate/CaCO<sub>3</sub>: A strategy for improved phage therapy. *Sci Rep* 7: 41441
- Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Cortés, P., Maspoch, D., and Llagostera, M. (2015) Liposome-Encapsulated Bacteriophages for Enhanced Oral Phage Therapy against *Salmonella* spp. *Appl Environ Microbiol* 81: 4841–9
- Erill, I., Campoy, S., and Barbé, J. (2007) Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev* 31: 637–56
- Guerin, E., Cambay, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Re, S.D., *et al.* (2009) The SOS response controls integron recombination. *Science* (80-) 324.
- Irazoki, O., Mayola, A., Campoy, S., and Barbé, J. (2016) SOS System Induction Inhibits the Assembly of Chemoreceptor Signaling Clusters in *Salmonella enterica*. *PLoS One* 11: e0146685
- Pérez-Varela, M., Corral, J., Vallejo, J.A., Rumbó-Feal, S., Bou, G., Aranda, J., and Barbé, J. (2017) Mutations in the  $\beta$ -Subunit of the RNA Polymerase Impair the Surface-Associated Motility and Virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun* 85: pii: e00327-17
- Pérez-Varela, M., Corral, J., Aranda, J., and Barbé, J. (2019) Roles of Efflux Pumps from Different Superfamilies in the Surface-Associated Motility and Virulence of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *Antimicrob Agents Chemother* 63. pii: e02190-18
- Spricigo, D.A., Bardina, C., Cortés, P., and Llagostera, M. (2013) Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *Int J Food Microbiol* 165: 169–174
- Teixido, L., Carrasco, B., Alonso, J.C., Barbe, J., and Campoy, S. (2011) Fur Activates the Expression of *Salmonella enterica* Pathogenicity Island 1 by Directly Interacting with the *hilD* Operator *in vivo* and *in vitro*. *PLoS One* 6: e19711.

# Grupo de Biología Molecular de la Patogenicidad de *Brucella*

Felix J. Sangari García y Juan M. García Lobo



Instituto de Biomedicina y Biotecnología. Universidad de Cantabria-CSIC

De izquierda a derecha:  
Félix J Sangari, Juan M García, Asunción Seoane,  
Yelina Ortiz, Candela González Riancho

El grupo de Biología Molecular de la Patogenicidad de *Brucella* de la Universidad de Cantabria continúa su actividad en las instalaciones del nuevo Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC) (<http://web.unican.es/ibbttec/>), al que nos trasladamos en Agosto de 2013, tras una larga andadura en los laboratorios del Departamento de Biología Molecular, en la Facultad de Medicina en Santander.

Nuestra línea principal de trabajo es la investigación de los mecanismos de patogenicidad, o lo que viene siendo lo mismo, de

la capacidad de crecimiento intracelular del importante agente zoonótico *Brucella*.

Las bacterias del género *Brucella* son causantes de la brucelosis, una zoonosis de importante repercusión en la salud animal humana y que causa importantes pérdidas económicas con especial repercusión países en desarrollo. En los animales, que constituyen su hospedador natural, como vacas, cabras u ovejas, dan lugar a abortos e infertilidad principalmente, mientras que en los humanos la enfermedad se manifiesta como un síndrome febril que puede progresar a una

fase crónica caracterizada por la aparición de severas complicaciones como endocarditis, artralgia, epididimitis o neurobrucelosis. La brucelosis es endémica en áreas como América Central y Sudamérica, Oriente Próximo, los países mediterráneos, el norte de África y los países del Cáucaso y Asia Central. En Cantabria, área con importante ganadería vacuna en manejo extensivo, todavía se producen de tanto en tanto brotes puntuales que obligan al saneamiento de las cabañas afectadas, aunque el número de casos humanos es muy reducido. Sin embargo, a nivel mundial se maneja la cifra de unos 500.000

casos humanos nuevos cada año, un cifra probablemente infravalorada 4 ó 5 veces.

Nuestro trabajo sobre *Brucella* se inició con el desarrollo de métodos para la manipulación genética de la bacteria y fue descrito en detalle en la anterior aparición del grupo en esta revista (Sangari y García Lobo, 2014).

En estos cinco últimos años, nuestro trabajo ha continuado en la misma línea. Hemos analizado el papel de dos proteínas de notable interés. Por una parte, una anhidrasa carbónica que interviene en la adaptación de *Brucella* entre el estado intracelular, es decir infectando a un huésped con una tensión elevada de CO<sub>2</sub>, y el estado de vida libre en el que la tensión de CO<sub>2</sub> es la atmosférica (García Lobo, JM *et al.*, 2019). Por otra parte, hemos estudiado el papel de una proteína con actividad inhibidora de la lisozima, pero que parece jugar un papel relevante en la supervivencia de *Brucella* en células del sistema inmune.

Otra de nuestras líneas de investigación en este patógeno es el estudio del papel del sistema de secreción tipo IV de *Brucella* en la virulencia. Hemos estudiado la regulación de la expresión del sistema *virB* por dos RNAs pequeños que se localizan en el entorno del operón *virB*, y hemos puesto a punto un novedoso sistema para identificar nuevos efectores secretados por este sistema en *Brucella*. Para ello hemos utilizado métodos de predicción bioinformática junto a diferentes estrategias con metodología de microbiología celular usando efectores subrogados fluorescentes o por métodos de interferencia viral.

Además de nuestro trabajo sobre *Brucella*, la otra línea del grupo pivota sobre el estudio de microbiomas ambientales. Por una parte estamos implicados en el Plan de Conser-

vación Preventiva de la Cueva de Altamira, en cuya redacción ya participamos en el año 2014 (VVAA, 2014), y donde contribuimos en el control del biodeterioro de las pinturas de la cueva. Y por otra parte estamos colaborando con la Universidad Central de Ecuador en el estudio de las comunidades microbianas presentes en diversos volcanes andinos.

Respecto a los estudios en la cueva de Altamira, de los diferentes riesgos biológicos detectados la proliferación de “colonias visibles” es el que se considera de mayor relevancia y al que estamos dedicando nuestro esfuerzo investigador.

Las llamadas entre comillas colonias visibles son biofilms o consorcios de microorganismos, generalmente de unos pocos milímetros, visibles y con diferentes colores (gris, blanco, amarillo) que crecen en las paredes y el techo, sobre todo de las zonas más externas de Altamira. Desde su primera descripción alrededor del año 2000 han sido objeto de numerosos estudios. Tras nuestra incorporación a este trabajo, estamos contribuyendo a una mejor descripción de los componentes de los consorcios a través de estudios de secuenciación masiva. Tras una caracterización por secuenciación de amplicones de 16S RNA hemos progresado a una etapa de análisis metagenómico que está empezando a dar resultados interesantes. Tenemos datos sobre las bacterias que componen los consorcios de forma mayoritaria y sus proporciones en los diferentes tipos de “colonia” y hemos obtenido borradores de buena calidad de los genomas de los componentes mayoritarios derivados de los datos metagenómicos.

Con esta información, que queremos completar con datos de expresión (meta-transcriptomas), esperamos ser capaces de

identificar los aspectos más relevantes de la ecología de los consorcios, identificar las fuentes de energía y las rutas metabólicas implicadas.

El fin último de este trabajo es el diseño de medidas de control seguras, que sirvan para atajar un eventual problema de biodeterioro por sobre proliferación de las “colonias” pero que no causen problemas colaterales de proliferación alternativa, como ha ocurrido anteriormente en circunstancias similares. Este objetivo, que es bastante complicado, solo será posible cuando conozcamos en todo detalle los aspectos eco-fisiológicos de estos consorcios, a lo que estamos dedicando nuestro esfuerzo.

**Agradecimientos:** El trabajo de nuestro grupo se ha financiado entre otros con proyectos de la Universidad de Cantabria-SO-DERCAN que se nutren de fondos FEDER.

## REFERENCIAS

- Félix J Sangari y Juan M García Lobo.** (2014). Biología Molecular de la Patogenicidad de *Brucella*. SEMaforo. 58, 76-77.
- García-Lobo JM, Ortiz Y, González-Riancho C, Seoane A, Arellano-Reynoso B, and Sangari FJ.** (2019) Polymorphisms in *Brucella* Carbonic anhydrase II mediate CO<sub>2</sub> dependence and fitness *in vivo*. *Frontiers in Microbiology* (BioRxiv doi: 10.1101/804740).
- VVAA.** (2014) PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN PARA LA CONSERVACIÓN PREVENTIVA Y RÉGIMEN DE ACCESO DE LA CUEVA DE ALTAMIRA(2012-2014). Informe final <http://www.culturaydeporte.gob.es/mnaltamira/dam/jcr:23aff8fe-2c0c-474a-8db4-c34b644bcde9/conservacionpreventivaaltamira-informefinal-doc-investigacion.pdf>.
- Cuezva S, Fernandez-Cortes A, Porca E, Pašić L, Jurado V, Hernandez-Marine M, Serrano-Ortiz P, Hermosin B, Cañaveras JC, Sanchez-Moral S, Saiz-Jimenez C.** (2009) The biogeochemical role of Actinobacteria in Altamira Cave, Spain. *FEMS Microbiol Ecol.* 2012. 81:281-90. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01391.x.

# Interacciones huésped-parásito en infecciones neumocócicas

Pedro García y Jesús Miguel Sanz



Departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas. Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid

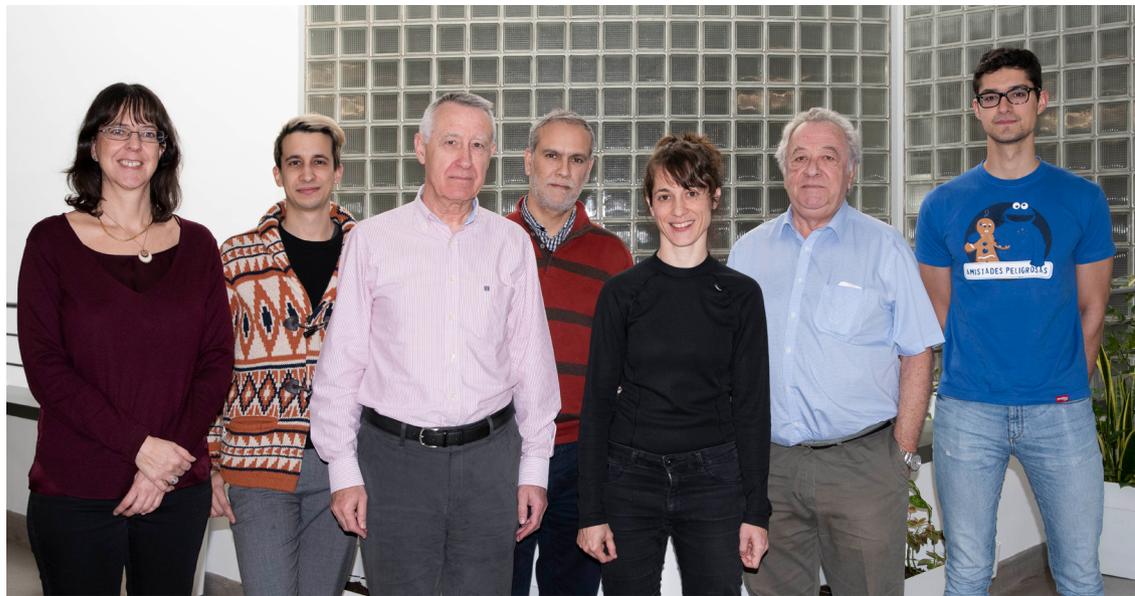


Foto de grupo. De izquierda a derecha: Beatriz Maestro, Roberto Vázquez, Pedro García, Jesús Sanz, Susana Ruiz, Ernesto García, Víctor Fuentes.

Las actividades de nuestro laboratorio han aparecido dos veces en pasadas ediciones de esta publicación, por la doble pertenencia a dos grupos: inicialmente en junio de 2013 en el número de "Biología de los microorganismos patógenos" ([https://www.semicrobiologia.org/storage/secciones/publicaciones/semaforo/55/articulos/21\\_BMP\\_55\\_Garcia.pdf](https://www.semicrobiologia.org/storage/secciones/publicaciones/semaforo/55/articulos/21_BMP_55_Garcia.pdf)) y, posteriormente, en diciembre de 2014 en el especial de "Microbiología Molecular" ([https://www.semicrobiologia.org/storage/secciones/publicaciones/semaforo/58/articulos/43\\_MM22\\_PGarcia.pdf](https://www.semicrobiologia.org/storage/secciones/publicaciones/semaforo/58/articulos/43_MM22_PGarcia.pdf)). Desde entonces, el número de contratados pre- y posdoctorales se ha reducido y, además, se ha producido la jubilación de nuestro jefe Ernesto García, que ha pasado a ser Profesor emérito pero que sigue siendo una pieza clave en nuestro desarrollo científico. Por otro lado, se ha incorporado recientemente el grupo del Dr. Jesús M. Sanz que potencia y complementa nuestras líneas de investigación. El grupo

pertenece al CIBERES (CIBER de Enfermedades Respiratorias), con lo que el foco principal de nuestras investigaciones se centra en el estudio de compuestos antibacterianos contra diferentes patógenos causantes de enfermedades respiratorias. Tradicionalmente, el objetivo de nuestros proyectos ha sido la bacteria *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), habiendo abordado distintos temas: a) análisis estructural y funcional de las CBPs (*choline-binding proteins*), tanto codificadas por la bacteria como por los fagos que la infectan; b) factores de patogenicidad, especialmente los distintos tipos capsulares que son fácilmente intercambiables entre distintas cepas por transformación genética; c) la formación de biofilms y los factores que favorecen este tipo de crecimiento y, d) la utilización de las enzimas líticas fágicas, también denominadas endolisinas o enzibióticos, como agentes bactericidas con gran especificidad.

En la actualidad, las líneas fundamentales del laboratorio convergen en la utilización de técnicas de estructura e ingeniería de proteínas para la búsqueda y caracterización de nuevos compuestos antibacterianos que constituyan tratamientos alternativos contra patógenos resistentes a varios antibióticos. La naturaleza molecular de tales compuestos es amplia, incluyendo desde moléculas orgánicas pequeñas hasta enzimas completas (enzibióticos), y cuyas dianas también son variadas (membrana o pared celulares), aunque siempre localizadas en la superficie bacteriana.

En los últimos años hemos desarrollado pequeños compuestos orgánicos (ésteres de aminas bicíclicas o EBAs) que perturban la membrana celular y poseen efecto lítico tanto en patógenos respiratorios Gram-negativos (*Pseudomonas aeruginosa* y *Haemophilus influenzae*) como Gram-positivos (S.

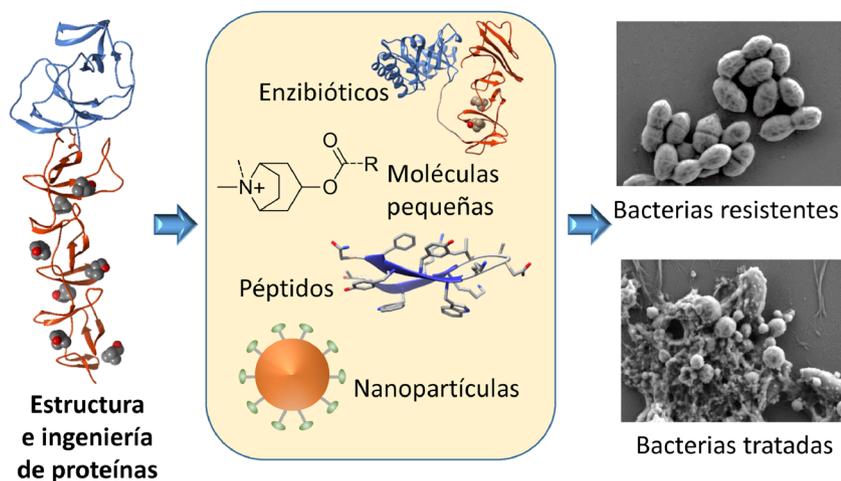


Figura. Resumen esquemático de los objetivos científicos del grupo.

*pneumoniae*), y son activos tanto en cultivo planctónico como en biofilms, habiéndose comprobado su eficacia frente a cepas neumocócicas resistentes en modelos de pez cebra. Asimismo, también investigamos efectos similares producidos por pequeños péptidos ("choline-binding repeats" o CBRs). En ambos casos, el efecto bactericida se ve incrementado exponencialmente por la disposición multivalente de varias copias de estos compuestos en nanopartículas dendríméricas. Por otro lado, las endolisinas son enzimas codificadas por fagos cuya función es hidrolizar el peptidoglicano de la bacteria hospedadora y terminar el ciclo lítico diseminando nuevos viriones. En los últimos años se ha descrito el uso de una gran variedad de endolisinas contra muchos patógenos bacterianos, lo que constituye una gran esperanza en su futura aplicación clínica ya que presentan varias ventajas frente a los antibióticos. Entre ellas se pueden citar: a) son muy específicas; b) no se han descrito bacterias resistentes frente a estas enzimas, probablemente porque su diana (el peptidoglicano) es una estructura muy conservada entre las bacterias; c) por la misma razón, son igualmente efectivas contra cepas multirresistentes; d) tienen también actividad bactericida frente a bacterias que forman biofilms que son, generalmente, refractarias a los antibióticos y, e) son eficaces en todo tipo de estado metabólico bacteriano. Teniendo en cuenta además los numerosos artículos que se están publicando en los últimos años, es

evidente que estos antibacterianos constituyen una prometedora alternativa para luchar contra la gran amenaza de los patógenos multirresistentes.

Además, hemos construido las enzimas quiméricas más potentes contra neumococo (Cpl-711 y PL3), estrictamente específicas contra esta bacteria, pero también hemos caracterizado otras endolisinas con un rango de huésped más amplio, como Cpl-7S y Csl2. Asimismo, hemos comprobado su acción sinérgica con determinados antibióticos, o también entre dos enzibióticos que rompen diferentes enlaces. Todas estas enzimas han demostrado ser muy eficaces contra bacterias susceptibles que forman biofilms y se han validado en modelos animales, como ratones o peces cebra. Además, estamos estudiando nuevas endolisinas contra patógenos Gram-negativos, como *P. aeruginosa* y *H. influenzae*.

En la actualidad también investigamos de manera alternativa compuestos que provoquen un efecto no lítico sobre las bacterias, de forma que se evite la liberación de toxinas y factores inflamatorios al medio al mismo tiempo que se induce la respuesta del sistema de defensa del huésped. En el caso de neumococo, la adición de dendrímeros de colina o de módulos de unión a colina (denominados CBMs) causa encadenamiento y agregación celulares, provocando un incremento de la fagocitosis bacteriana.

Finalmente, estamos introduciendo procedimientos de nanotecnología en el laboratorio destinados a la inmovilización multivalente de los compuestos reseñados sobre nanopartículas de diferente naturaleza química, con el fin último de incrementar sustancialmente su actividad, disminuyendo así las dosis necesarias.

## PUBLICACIONES MÁS RELEVANTES

- Vázquez R, García P.** (2019). Synergy between two chimeric lysins to kill *Streptococcus pneumoniae*. *Front Microbiol* 10:1251. doi.org/10.3389/fmicb.2019.01251.
- Roig-Molina E, Domenech M, Retamosa M de G, Nácher-Vázquez M, Rivas L, Maestro B, García P, García E, Sanz JM.** (2019). Widening the antimicrobial spectrum of esters of bicyclic amines: *in vitro* effect on Gram-positive *Streptococcus pneumoniae* and Gram-negative non-typeable *Haemophilus influenzae* biofilms. *Biochim Biophys Acta* 1863: 96–104.
- Ercibengoa M, Alonso M, Vicente D, Morales M, García E., Marimón, JM.** (2019). Utility of MALDI-TOF MS as a new tool for *Streptococcus pneumoniae* serotyping. *PLoS One* 14: e0212022.
- Bello-Gil D, Maestro B, Fonseca J, Dinjaski N, Prieto MA, Sanz JM.** (2018). Poly-3-hydroxybutyrate functionalization with BioF-tagged recombinant proteins. *Appl Environ Microbiol* 84: e02595-17.
- Vázquez R, García E, García P.** (2018). Phage lysins for fighting bacterial respiratory infections: a new generation of antimicrobials. *Front Immunol* 9: 2252.
- Ferrándiz MJ, Cercenado MI, Domenech M, Tirado-Vélez JM, Escolano-Martínez MS, Yuste J, García E, de la Campa AG, Martín-Galiano AJ.** (2018). An uncharacterized member of the Gls24 protein superfamily is a putative sensor of essential amino acid availability in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Ecol* 77: 471–487.
- Domenech M, García E.** (2018). Autolysis-independent DNA release in *Streptococcus pneumoniae in vitro* biofilms. *Clin Infect Dis Open Access* 2, 114. <https://www.omicsonline.org/open-access/autolysin-independent-dna-release-in-streptococcus-pneumoniae-in-vitro-biofilms.pdf>.
- Zamora-Carreras H, Maestro B, Strandberg E, Ulrich A, Sanz JM, Jiménez MA.** (2018). Roles of amphipathicity and hydrophobicity in the micelle-driven structural switch of a 14-mer peptide core from a choline-binding repeat. *Chem Eur J* 24: 5825–5839.
- Corsini B, Díez-Martínez R, Aguinagalde L, González-Camacho F, García-Fernández E, Letrado P, García P, Yuste J.** (2018). Chemotherapy with phage lysins reduces pneumococcal colonization of the respiratory tract. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e02212-17.
- Letrado P, Corsini B, Díez-Martínez R, Bustamante N, Yuste JE, García P.** (2018). Bactericidal synergism between antibiotics and phage endolysin Cpl-711 to kill multidrug-resistant pneumococcus. *Future Microbiol* 13:1215-1223.

## *Photobacterium damsela*: investigación básica y aplicada de patógenos de la acuicultura marina

Carlos R. Osorio, Ana Vences, Xosé M. Matanza, Saqr Abushattal, Alba V. Barca, Laura López-Suárez



Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidade de Santiago de Compostela



Componentes del grupo. De izquierda a derecha: Alba Vázquez Barca (doctoranda), Carlos Rodríguez Osorio (P), Saqr Abushattal (doctorando), Xosé Manuel Matanza Fente (doctorando), Ana Vences Lorenzo (postdoctoral), Laura López Suárez (doctoranda).

El grupo de trabajo sobre *Photobacterium damsela* tiene más de 20 años de experiencia en el estudio de este importante patógeno de la acuicultura de peces marinos a escala mundial. Esta especie comprende dos subespecies, *damsela* y *piscicida*, que causan patologías muy diferentes debido a un interesante proceso de especiación a través del cual cada subespecie ha adquirido elementos genéticos móviles portando factores de virulencia únicos.

*P. damsela* subsp. *damsela* puede considerarse un patógeno generalista, que afecta a una gran diversidad de peces, así como a crustáceos y moluscos, y es un patógeno

oportunista para el ser humano, pudiendo causar septicemias mortales. Las cepas altamente virulentas contienen un plásmido, pPHDD1, que codifica dos potentes citotoxinas, la damselsina y la fobalisina P, mientras que una tercera hemolisina, fobalisina C, está codificada en el cromosoma. La damselsina actúa en sinergia con las dos fobalisinas para causar importantes daños celulares, y nuestros recientes estudios de transcriptómica y proteómica demuestran que los genes de estas toxinas están entre los más altamente expresados por esta bacteria, las toxinas se producen en grandes cantidades, y son secretadas por el sistema de secreción de tipo II. Las cepas que carecen del plásmido

pPHDD1 son menos virulentas en ensayos de laboratorio, pero curiosamente se aíslan con gran frecuencia a partir de brotes en piscifactorías, y en nuestro grupo hemos identificado una nueva fosfolipasa cromosómica que contribuye a la virulencia y a la citotoxicidad en estas cepas.

Este patógeno muestra una elevada diversidad genética, y nuestros estudios recientes demuestran que en un mismo brote coexisten genotipos de *P. damsela* subsp. *damsela* muy diversos. Así, de un mismo lote de peces enfermos se aíslan cepas con y sin plásmido, y es de especial relevancia la gran diversidad que existe en los genes

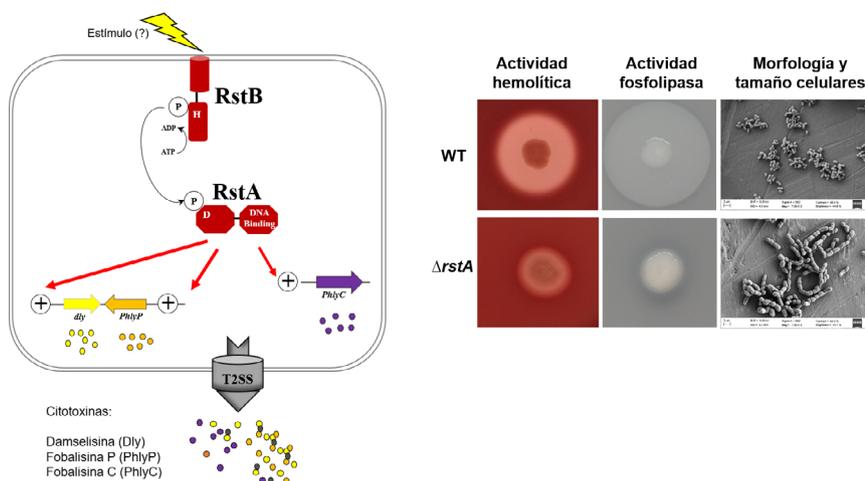


Fig. 1. El sistema regulador de dos componentes RstAB regula las tres principales citotoxinas del patógeno *P. damsela* subsp. *damsela*, que son secretadas por el sistema de secreción de tipo 2 (T2SS) y causan graves daños en las células del hospedador. En el panel de la derecha se puede apreciar que la mutación de este sistema prácticamente anula la producción de las citotoxinas (con actividades hemolítica y fosfolipasa), y altera enormemente el tamaño celular, así como la separación de las células hijas tras la división.

que codifican los polisacáridos de la envuelta celular. Esta elevada diversidad genética nos condujo a buscar algún punto débil que fuese ubicuo en las poblaciones de este patógeno. Así, recientemente hemos descubierto un sistema regulador de dos componentes al que hemos denominado RstAB, cuya mutación prácticamente anula la virulencia, causa una drástica disminución en la expresión de los genes de las citotoxinas, y tiene consecuencias negativas en la transcripción de otros factores de virulencia adicionales, así como en la morfología celular. Este sistema está presente en todos los aislados de esta subespecie y es un prometedor punto de partida para diseñar estrategias de control de este patógeno, además de un interesante modelo de estudio de la regulación de la virulencia. Por el momento desconocemos los estímulos que desencadenan la activación del sistema RstAB, si bien sí hemos determinado que una caída en la salinidad del medio estimula la producción de las citotoxinas y de otros factores de virulencia.

Por otra parte, *P. damsela* subsp. *piscicida* es un patógeno exclusivo de peces, en los que causa la fotobacteriosis o pseudotuberculosis, una enfermedad de especial transcendencia en el área mediterránea por las grandes pérdidas económicas que causa en los cultivos de dorada y de lubina. En los genomas de las cepas de esta subespecie se ha produci-

do un complejo proceso de acumulación de elementos de inserción. Como consecuencia, en los genomas de la subsp. *piscicida* ha tenido lugar una reducción masiva de funciones génicas, unido ello a una evolución hacia un modo de vida muy asociado al pez hospedador. El factor de virulencia mejor estudiado en esta subespecie es la toxina AIP56, que induce apoptosis en macrófagos y neutrófilos de los peces, y se secreta en altos niveles a través del sistema de secreción de tipo II. Esta toxina está codificada en un pequeño plásmido (pPHDP10) de tan sólo 9 kilobases. Además, muchas cepas de esta subespecie contienen un plásmido, pPHDP70, que incluye en su estructura una isla de patogenicidad con los genes de síntesis y utilización del sideróforo piscibactina. Muy recientemente, en nuestro grupo de trabajo hemos contribuido a la primera evidencia de la existencia de un sistema de secreción de tipo III en esta subespecie. Lejos de tratarse de un sistema anecdótico en este patógeno, nuestros datos recientes revelan una presencia muy amplia de este sistema de secreción en la subsp. *piscicida*, lo cual nos ha abierto nuevos horizontes en el estudio de la patobiología de esta subespecie.

Nuestros estudios actuales están encaminados a aplicar los conocimientos adquiridos en los más de 20 años de estudio de estos dos patógenos, para ofrecer nuevas estra-

tegias de diagnóstico, de prevención y de control de las enfermedades causadas tanto por la subsp. *damsela* como por la subsp. *piscicida*.

## PUBLICACIONES RECIENTES DEL GRUPO:

- Terceti MS, Vences A, Matanza XM, Barca AV, Noia M, Lisboa J, Dos Santos NMS, Do Vale A y Osorio CR.** (2019). The RstAB system impacts virulence, motility, cell morphology, penicillin tolerance and production of Type II secretion system-dependent factors in the fish and human pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Front Microbiol*, 10:897.
- Abushattal S, Vences A, Dos Santos NMS, Do Vale A y Osorio CR.** (2019). Draft genome sequences of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* SNW-8.1 and PP3, two fish-isolated strains containing a Type III secretion system. *Microbiology Resource Announcements*. e00426-19
- Osorio CR.** (2019). *Photobacterium damsela*: How horizontal gene transfer shaped two different pathogenic lifestyles in a marine bacterium. *Er: Horizontal gene transfer: breaking borders between living kingdoms*. pp. 175-199. (T.G. Villa & M. Viñas, eds.). Ed. Springer, Suiza. ISBN: 978-3-030-21861-4.
- Matanza XM y Osorio CR.** (2018). Transcriptome changes in response to temperature in the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*: clues to understand the emergence of disease outbreaks at increased seawater temperatures. *PLoS One*. 13(12): e0210118.
- Terceti MS, Vences A, Matanza XM, Dalsgaard I, Pedersen K y Osorio CR.** (2018). Molecular epidemiology of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* outbreaks in marine rainbow trout farms reveals extensive horizontal gene transfer and high genetic diversity. *Front Microbiol*. 9:2155.
- Osorio CR, Vences A, Matanza XM y Terceti MS.** (2018). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a generalist pathogen with unique virulence factors and high genetic diversity. *J Bacteriol*. JB.00002-18.
- Vences A, Rivas AJ, Lemos ML, Husmann M y Osorio CR.** (2017). Chromosome-encoded hemolysin, phospholipase, and collagenase in plasmidless strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* contribute to virulence for fish. *Appl Environ Microbiol*, 83: e00401-17.
- Terceti MS, Rivas AJ, Alvarez L, Noia M, Cava F y Osorio CR.** (2017). *rstB* regulates expression of the *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* major virulence factors Damselysin, Phobalysin P and Phobalysin C. *Front Microbiol*, 8:582.
- Terceti MS, Ogut H y Osorio CR.** (2016). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging fish pathogen in the Black Sea: evidences of a multiclinal origin. *Appl Environ Microbiol*. 82:3736-3745.
- Rivas AJ, Vences A, Husmann M, Lemos ML y Osorio CR.** (2015). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* major virulence factors Dly, Hly<sub>pl</sub> and Hly<sub>ch</sub> are secreted via the type II secretion system. *Infect Immun*. 83: 1246-1256.

## Antimicrobial Resistance Unit (ARU) Unidad de Resistencia a Antibióticos

Natalia Montero Serra, Cristina Bernabé Balas, Jose Francisco Delgado Blas, Manuel Ares Arroyo, Bosco Rodríguez Matamoros, Emilia Wedel, Carlos Serna Bernaldo, Irene Sánchez Méndez, Ana Sempere-Ruiz, María Eugenia Revilla, Niloofer Razmgah, Mónica Suárez Rodríguez y Bruno González-Zorn

 [bgzorn@ucm.es](mailto:bgzorn@ucm.es)  
[www.ucm.es/aru](http://www.ucm.es/aru)  
[@AruUcm](https://twitter.com/AruUcm)

Universidad Complutense de Madrid.



Foto de grupo. Arriba: Carlos Serna, Emilia Wedel, Jose F. Delgado, Bruno González-Zorn, Bosco Rodríguez, Cristina Bernabé. Abajo: María Eugenia Revilla, Niloofer Razmgah, Mónica Suárez, Natalia Montero, Irene Sánchez. Cuadrantes: Gabriel Moyano, Manuel Ares, Ana Sempere, Cristina Calvo.

La resistencia a antibióticos (AMR) representa una de las mayores amenazas del siglo XXI. Su avance conlleva un elevado coste, cobrándose más de 33.000 vidas humanas anuales en la Unión Europea, cifra que se estima en 10 M para el año 2050. Nuestro grupo considera la AMR como un fenómeno ecológico cuyo fundamento abordamos desde una perspectiva de Una Salud o *One Health* (Gonzalez-Zorn *et al.*, 2013). Nuestro objetivo es intentar comprender, a nivel fundamental, cuál es el flujo de mecanismos de resistencia a antibióticos en nuestro ecosistema Tierra, utilizando distintas aproximaciones reduccionistas.

ARU nació en 2004 y durante este tiempo hemos defendido doce tesis doctorales. Nuestros primeros doctorados, Álvaro San Millán y José Antonio Escudero, tienen hoy su propio grupo de investigación con sendos

ERC *Starting Grants*, mientras que otros se han incorporado al programa de formación de excelencia del ECDC o están realizando su postdoc en EEUU o el Reino Unido. Hemos participado y participamos en proyectos de la UE relevantes en resistencia a antibióticos, como EvoTAR (*Evolution and Transfer of Antimicrobial Resistance*), EFFORT (*Ecology from Farm to Fork of Resistance Transmission*), EJP-OH (*European Joint Program on One Health*) o AVANT (*Alternatives to Antimicrobials*), además de en dos ITN Marie Skłodowska-Curie TRAIN-ASAP y CARTNET.

Desde nuestros inicios colaboramos con la *University for Development Studies* en Ghana. Construimos allí un laboratorio de Seguridad Alimentaria y formamos durante cuatro años a Courage K.S. Saba, ahora a cargo del mismo (Saba *et al.*, 2012). Con la ayuda de

la OMS, de la *International Foundation for Science* y de la UCM, hemos instaurado un sistema de hemocultivo y realizado cursos prácticos de microbiología y biotecnología en el *Tamale Teaching Hospital*. Cada año enviamos estudiantes con programas de la UCM y de la CAM para investigar, formarse y realizar voluntariado. Formamos parte de la Red NEAR-JPIAMR con otros países de la UE y África para ayudar en su investigación en AMR.

En nuestros comienzos identificamos un mecanismo de resistencia desconocido hasta ese momento en *Escherichia coli* denominado *armA* (*aminoglycoside resistance methyltransferase*), una **metiltransferasa del ARN 16S** que anula el efecto de los aminogluósidos (González-Zorn *et al.*, 2005). Caracterizamos cómo este mecanismo de

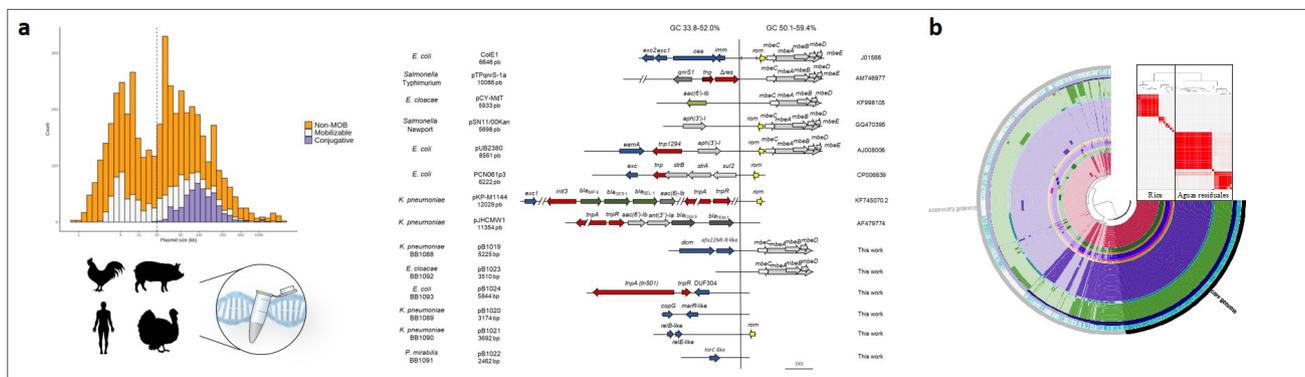


Figura 1. a. Descubrimiento de la relevancia de los plásmidos multicopia (MCP). Utilizando técnicas clásicas, unidas a genómicas y bioinformáticas en humanos, animales y medio ambiente, hemos desvelado la enorme relevancia de los plásmidos de pequeño tamaño en microbiología. Prácticamente la mitad de los plásmidos en las bases de datos son de pequeño tamaño. (Ares-Arroyo, 2018). b. El análisis comparativo del pangenoma de aislados de *E. coli* portadores de genes de metiltransferasas del ARN 16S procedentes de efluentes naturales y aguas residuales nos permite establecer vínculos entre bacterias, mobilomas ambiente, el efecto antropogénico y su evolución en el tiempo.

resistencia actúa a nivel de ribosoma exclusivamente en el residuo m<sup>7</sup>G1405, interfiriendo con el metiloma del propio ribosoma y con la traducción global en la propia bacteria (Gutiérrez *et al.*, 2013). Estos genes confieren altos niveles de resistencia a la plazomicina, un antibiótico de último recurso aprobado en EEUU en 2018, en fase de aprobación para su uso clínico en Europa. Por lo tanto, es esencial que continuemos trabajando en las metiltransferasas del ARN 16S si queremos que un nuevo antibiótico sea eficaz durante el mayor tiempo posible.

Durante estos años, también hemos identificado que los **plásmidos pequeños multicopia (MCP)** tienen mucha más relevancia que la que se les ha dado en las últimas décadas. En el grupo hemos descubierto que los MCP están presentes en un gran número de bacterias patógenas y no patógenas (Ares-Arroyo 2018). Estos MCP capturan mecanismos de resistencia y los diseminan con un *fitness cost* bajo, que se llega a compensar por completo a través de mutaciones cromosómicas (San Millán 2015). Nos fascina cómo estos MCP permiten la innovación genética dando lugar a un nuevo plásmido de la familia con su propio número de copias. El descubrimiento de la relevancia de los MCP ha creado múltiples líneas de investigación que abren nuevas puertas en el estudio de los plásmidos y su relevancia en la AMR.

Estos estudios previos nos llevaron a interesarnos por la **captación genética y su transmisión**. En colaboración con otros grupos, descubrimos la implicación del meca-

nismo SOS en la captación de *cassettes* de resistencia en los integrones bacterianos (Guerin 2009) y seguimos investigando este mecanismo como elemento de regulación de la AMR y los mecanismos plasmídicos implicados en su diseminación (Hadziabdic S 2018). Dentro de esta línea de investigación, descubrimos que la población sana de grandes ciudades representa un importante reservorio de mecanismos de resistencia emergentes, como la resistencia a colistina mediada por *mcr-1* (Martínez-Ovejero C 2017). Este descubrimiento nos valió el *Premio Nacional de Investigación PRAN* en 2018, mérito de todos los miembros de ARU y en especial de Jose F. Delgado-Blas. Además, en la actualidad estamos utilizando modelos murinos para comprender la transmisión de plásmidos y mecanismos de resistencia a antibióticos entre individuos utilizando sistemas de seguimiento por *videotracking*.

Si tenemos que destacar algo durante la existencia de ARU es sin duda el nivel humano de todos los miembros del grupo. El apoyo entre ellos da lugar a una cohesión y compañerismo que estimamos únicos y esenciales. También hemos sentido el apoyo de todos nuestros colegas del Grupo de Microbiología Molecular, de toda la SEM y de la comunidad microbiológica española, gracias al cual nos asentamos como grupo en España. A todos, muchísimas gracias.

**BIBLIOGRAFÍA REPRESENTATIVA**

Gonzalez-Zorn B, Catalan A, Escudero JA, Domínguez L, Teshager T, Porrero C, Moreno MA. Gene-

tic basis for dissemination of armA. J Antimicrob Chemother. 2005 Sep;56(3):583-5. Epub 2005 Jul 18.

E. Guerin, G. Cambray, N. Sanchez-Alberola, S. Campoy, I. Erill, S. Da Re, B. Gonzalez-Zorn, J. Barbe, M. C. Ploy, D. Mazel. Recombination of integron cassettes is under control of the SOS response. Science 324(5930):1034. 2009.

Saba C.K.S. and B. Gonzalez-Zorn. Food Safety in Ghana: A Metha-Analysis. J Infect Dev Ctries 6(12):828-35. 2012.

González-Zorn B, Escudero JA. Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment. Int Microbiol. 15(3):101-9. Review. 2013.

Gutiérrez B, Douthwaite S, Gonzalez-Zorn B. Indigenous and acquired modifications in the aminoglycoside binding sites of Pseudomonas aeruginosa rRNAs. RNA Biol. 10(8):1324-32. 2013.

San Millan A, Santos-Lopez A, Ortega-Huedo R, Bernabe-Balas C, Kennedy SP, Gonzalez-Zorn B. Small plasmid-mediated antibiotic resistance in Haemophilus influenzae is enhanced by increases in plasmid copy number and bacterial fitness. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 59(6):3335-41. 2015.

Ovejero CM, Delgado-Blas JF, Calero-Caceres W, Muniesa M, Gonzalez-Zorn B. Spread of mcr-1 -carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. J Antimicrob Chemother. 2017 Jan 10. pii: dkw533. doi: 10.1093/jac/dkw533.

Hadziabdic S, Fischer J, Malorny B, Borowiak M, Guerra B, Kaesbohrer A, Gonzalez-Zorn B, Szabo I. In vivo Transfer and Microevolution of Avian Native IncA/C<sub>2</sub>bla<sub>NDM-1</sub>-Carrying Plasmid pRH-1238 during a Broiler Chicken Infection Study. Antimicrob Agents Chemother. 2018 Mar 27;62(4). Pii: e02128-17. Doi: 10.1128/AAC.02128-17.

Ares-Arroyo M, Bernabe-Balas C, Santos-Lopez A, Baquero MR, Prasad KN, Cid D, Martin-Espada C, San Millan A, Gonzalez-Zorn B. PCR-Based Analysis of ColE1 Plasmids in Clinical Isolates and Metagenomic Samples Reveals Their Importance as Gene Capture Platforms. Front Microbiol. 2018 9:469.

Munk P *et al.* Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. Nat Microbiol. 2018 Oct. 3 (10):1186. Doi: 10.1038/s41564-018-0241-4.

## Ernesto García. Consejos para jóvenes microbiólogos

Entrevista: Samuel García Huete e Ignacio Belda  
Grabación, sonido y postproducción: Álvaro Sanz Llopis.



**You Tube**

La entrevista a Ernesto García puede verse en este enlace:



<https://www.youtube.com/watch?v=die2LNAAjyE>

*Reseña resumen de la entrevista realizada al Doctor Ernesto García, Profesor de Investigación emérito en el Centro de investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Dentro de esta serie temática que JISEM desarrolla, microbiólogos de referencia en España nos dan su opinión y consejos sobre la situación de la Ciencia española para los jóvenes. Tienen la palabra el Dr. García. La entrevista completa en vídeo está disponible escaneando el código QR o copiando el enlace al pie de esta reseña.*

13 años. Yo tenía afición por coger bichos en el campo —que había muchos en aquella época— y la playa, y teníamos un profesor de ciencias naturales que tenía un microscopio binocular, cosa que en aquella época era absolutamente increíble. Entonces empezamos a ver los primeros infusorios, paramecios, las *Vorticellas*, y este tipo de cosas; y aquello me enganchó. Me enganchó sobre todo por la Microbiología, porque es un mundo sobre el que puedes leer mucho, pero si no lo ves resulta un poco complicado de imaginar.

### ¿CÓMO SURGIÓ SU VOCACIÓN CIENTÍFICA?

**Ernesto:** Lo recuerdo perfectamente. Estaba en lo que entonces era 3º de bachiller, unos

### ¿CREE QUE ES IMPORTANTE TENER BUENOS MENTORES EN CIENCIA?

**Ernesto:** Es lo fundamental. Hay incluso una frase de André Lwoff, el premio Nobel,

que decía que el arte del científico es buscar un buen maestro. Tanto desde el punto de vista de un jefe, como desde el punto de vista de un profesor que te enseñe... es lo fundamental.

### ¿QUÉ CONSERVA DE SU TIEMPO EN LA TESIS?

**Ernesto:** Tuve la suerte, porque obviamente fue suerte, de caer en un laboratorio en el que me sentía como en mi casa. Mi director de tesis era Antonio Portolés, que ya falleció, y era como un segundo padre. De hecho, yo perdí a mi padre poco tiempo después y él cuidó de mí como si fuera hijo suyo; a parte de enseñarme todo. Y yo me sentía en aquel laboratorio como en mi casa. Tenía un grupo de compañeros, de amigos y de maestros, porque eran todos maestros, que, la verdad, consiguieron que fueran unos años estupendos. Y encima nos lo pasábamos bien. Yo creo que trabajábamos bien y encima nos lo pasábamos bien, cosa que es un lujo, vamos.

### ¿QUÉ APRENDISTE DE TU ETAPA POSTDOCTORAL EN BÉLGICA?

**Ernesto:** Es una cosa curiosa. Mi postdoctoral era para hacer una cosa muy diferente de lo que había estado haciendo. Yo había estado trabajando, fundamentalmente en microbiología, en los mecanismos de transformación con *Bacillus subtilis*. Y me fui a trabajar en una cosa, que en aquella época comenzaba a explotar, pero que tenía muy poco que ver, y era el destino del DNA pero no en procariotas sino en eucariotas, concretamente, DNA bacteriano en ratas. Entonces, aquello no tenía que ver con lo que yo hice previamente, pero aprendí una cantidad de tecnología de purificación de DNA —que en aquella época todavía era muy preliminar—, análisis físico-químico de DNA por diferentes técnicas, ultracentrifugación analítica... que realmente me fueron de lo más útiles en el futuro.

### ¿Y A NIVEL CIENTÍFICO?

**Ernesto:** Sobre todo, lo que más me llamó la atención la diferencia económica. Puede parecer una anécdota tonta pero...

no lo es. En aquella época en España, trabajar con radiactividad, aunque fuera con emisores beta como el tritio, era casi un logro. Pocos laboratorios tenían la capacidad, primero económica porque a fin de cuentas los isótopos radiactivos eran caros, pero tampoco las instalaciones necesarias para poder trabajar. Una cosa que no deja de ser curiosa, es que aunque en nuestro laboratorio concretamente no llegamos a tener que reciclar los viales de centelleo, de radiactividad, porque podíamos permitirnos utilizar viales nuevos, pero casi casi llegábamos a eso. Sin embargo, el nivel económico que yo descubrí en Bélgica era... alucinante. Si dijera que los presupuestos eran cien veces superiores a los de España, creo que no me equivocaría.

### ¿QUÉ HA CAMBIADO DE LA CIENCIA DE ENTONCES A LA DE HOY?

**Ernesto:** Para bien, yo creo que la introducción de las técnicas de biología molecular. Secuenciación, clonación, etc., todo eso ha supuesto un avance y una velocidad de cruceo insospechada hace 40 años. Pero por el contrario, yo creo que se ha perdido bastante de conocimiento básico sobre lo que es la Microbiología. Hoy en día, y yo conozco algunos casos, hay personas que han hecho su tesis doctoral sobre un microbio, pero no han cultivado ese microbio en su vida. Todo era a base de genes que otros, a lo mejor, habían clonado antes, o a base de purificar proteínas, pero raramente durante toda una tesis doctoral habían cultivado un determinado microorganismo. Entonces, el conocimiento de la microbiología básica yo creo que se ha perdido bastante precisamente por eso, yo creo que se ha vuelto todo muy molecular.

### USTED OBTUVO UNA PLAZA EN EL CSIC APENAS 5 AÑOS DESPUÉS DE LA TESIS, ¿CUÁL ES EL SECRETO?

**Ernesto:** El secreto es haber nacido en aquella época. Ser viejo. Es así eh... Ahora hay muchas facilidades, bueno, muchos medios, para que haya gente que haga unas magníficas investigaciones. Porque en medios, cualitativamente no creo que tengamos muchas diferencias con otros países, sí tenemos muchas diferencias cuantitativas

evidentemente, a nivel de repetición de aparatos, de gente sobre todo, y por supuesto en el fondo, de presupuestos. Creo... bueno no, estoy convencido, que las posibilidades de que una persona con menos de 40 años consiga una plaza fija son casi asintóticamente iguales a cero.

### ENTONCES... ¿PODRÍA DARNOS UN CONSEJO?

**Ernesto:** Pues me gustaría poder dar un consejo, pero no me gustaría dar el consejo que se me está ocurriendo... le diría que haga su tesis y que no se quede en España, porque veo muy difícil que se pueda estabilizar. No hay posibilidades. Los presupuestos ahora mismo son absolutamente, ya no bajos, es que son ridículos. Nunca han sido boyantes. En España, el porcentaje del PIB que se ha destinado a investigación no ha pasado del 1,5% nunca, cuando la media europea ya era del 2 y pico por ciento. Estamos hablando del año 2005, 2006, 2007, quizás. En aquellos momentos nos parecía que había mucho dinero, y éramos la cola de Europa, por detrás de muchos países que si los dijera nos íbamos a sorprender. Pero parecía que había una cierta tendencia. Pero llegó la crisis y hemos vuelto a los niveles de 1995, aproximadamente. Hemos perdido veintitantos años en este país. No solo en cuanto a dinero, sino lo que más hemos perdido son ilusiones de la gente. Es decir, ahora mucha gente joven, por lo menos la gente que puede, después de hacer sus tesis, lamentablemente, se tienen que ir al extranjero porque aquí no les ofrecemos una estabilidad de ningún tipo. (...) Con lo cual, a la gente joven, se le ofrecen muy pocas posibilidades. En eso estoy convencido que hay una frase muy buena del Padre Brown, el protagonista de las novelas de Chesterton, que decía "no es que no sepan cual es la solución —me estoy refiriendo obviamente a los políticos—, es que no consiguen ver el problema".

### ¿TENEMOS ALGO QUE APRENDER COMO SOCIEDAD DEL MUNDO MICROBIANO?

**Ernesto:** Todo. Las bacterias llevan por lo menos 3.000 millones de años en la Tierra.

La especie humana... el Homo antecesor hace 800.000 años, dicen, digamos que 1 millón de años lleva la especie humana sobre la Tierra. Es decir, las bacterias nos llevan toda la ventaja. No vamos a acabar con ellas; no queremos acabar con ellas, nos son muy beneficiosas, pero también nos son muy perjudiciales. Para muchísimas cosas los microbios estaban mucho antes que nosotros, seguirán estando mucho después que nosotros y los necesitamos para todo. Desde para hacer pan y cerveza, hasta para arreglar lo que la especie humana está haciendo en el medio ambiente, los microbios nos pueden ayudar mucho, hasta por supuesto, luchar contra las enfermedades.

### ¿CREE QUE ES IMPORTANTE LA ESPECIALIZACIÓN TEMPRANA?

**Ernesto:** Me parece muy importante que la gente se especialice, y se especialice cuanto antes, porque hoy en Ciencia es difícil tener un nivel de conocimiento como el que había en el Renacimiento, donde un científico podía saber de todo. Hoy nos gustaría poder saber de todo pero no, nos tenemos que especializar mucho. Pero no sé si, a veces, nos especializamos demasiado. Tenemos demasiada prisa por llegar al microbio y al gen, y al átomo casi, en vez de tener una visión un poco más general. Yo por ejemplo, y se que algunos me van a decir 'ya está aquí el abuelo cebolleta', pero conozco muchos jóvenes biólogos, que difícilmente distinguen una margarita de una cebolla... y eso me da mucha pena. Que un biólogo sepa mucho de bioquímica, o de biología molecular y microbiología, me parece muy bien, pero no exclusivamente. Yo sería

partidario de dejar la especialización para los últimos años de carrera.

### ¿QUÉ OPINA DEL FAMOSO PUBLISH OR PERISH?

**Ernesto:** Me parece una cosa horrible, y que lleva a lo que se dice en una serie de trabajos que recoge el artículo titulado "El coste mental de la carrera investigadora". Es un artículo publicado hace escasamente 10 días, donde se pone en evidencia, por si alguien no lo sabía, que la carrera investigadora, particularmente en los primeros años, produce muchas taraduras mentales, por decirlo de una manera coloquial. Es decir, la gente está súper estresada, está muy nerviosa, con muchos problemas mentales, porque a todo lo que supone el estudio y la investigación se suma la inseguridad laboral y económica, que van juntas obviamente. Eso produce una cantidad de desequilibrios mentales, por lo visto mucho más altos entre la población investigadora —sobre todo la investigadora joven— que en la población general. Lo cual indica que algo estamos haciendo mal. Y, para mí, una de las razones es la teoría esa del *publish or perish*.

### DOS CONSEJOS PARA JÓVENES MICROBIÓLOGOS

**Ernesto:** Buena pregunta. Desde luego que le guste la microbiología, realmente. Para mí la microbiología es apasionante, sin duda ninguna, ha sido nuestro pasado y es nuestro futuro. Le diría que se dedicase a cualquier parte de

la microbiología, yo creo que todas son interesantes si se hacen bien científicamente, y si se hacen bien en un ambiente agradable. Es decir, hacer un trabajo muy bueno en un ambiente desagradable tiene uno de los pies que cojea. Y estar en un ambiente agradable y no trabajar seriamente, pues también cojea, obviamente. Lo ideal, como decía André Lwoff y lo repito, el principal arte de un científico es buscarse un buen jefe. (...). Yo creo que hay que dedicarle mucho esfuerzo, mucho tiempo, pero creo que es casi más importante que la ciencia que se haga, el sitio dónde se haga esa ciencia. Si se hace en un sitio donde uno se encuentra a gusto, el esfuerzo es menos esfuerzo.

### UNAS PREGUNTAS RÁPIDAS:

#### Su microorganismo favorito:

**Ernesto:** El neumococo.

#### Un país para investigar:

**Ernesto:** España si tuviera más dinero. Pero lamentablemente no lo tenemos. Si tengo que elegir otro, Estados Unidos.

#### Un sitio para visitar:

**Ernesto:** El Mediterráneo.

#### Un libro para leer:

**Ernesto:** "La invención de la naturaleza: El Nuevo Mundo de Alexander von Humboldt". Me parece realmente apasionante.

#### Un científico referente:

**Ernesto:** Rubén López, mi jefe y amigo durante muchos años.



**COLIBACILOSIS PORCINA EN ESPAÑA: POTENCIAL PATÓGENO DE CEPAS DE *E. COLI*/ST10 PORTADORAS DEL GEN DE RESISTENCIA A LA COLISTINA *MCR-1* Y DE CEPAS PERTENECIENTES AL GRUPO CLONAL PANDÉMICO ST131**

Isidro García-Meniño, Vanesa García, Azucena Mora\*, Dafne Díaz-Jiménez, Saskia C. Flament-Simon, María Pilar Alonso, Jesús E. Blanco, Miguel Blanco, Jorge Blanco.

 [isidro.garcia@usc.es](mailto:isidro.garcia@usc.es)  
[azucena.mora@usc.es](mailto:azucena.mora@usc.es)

Los resultados de esta publicación forman parte de la tesis doctoral de Isidro García Meniño, defendida el pasado 27 de junio. Los directores del trabajo fueron la Dra. Azucena Mora (\**corresponding author* de la publicación) y el Dr. Jorge Blanco.

La colistina es uno de los antimicrobianos de “última línea” usados actualmente en medicina humana frente a infecciones provocadas por bacterias gram negativas multirresistentes. Los animales de producción, y especialmente el ganado porcino, se evidencian como principal reservorio y diseminador del gen plasmídico *mcr-1*.

El objetivo principal del estudio era conocer la situación del sector porcino en relación al nivel de resistencias a antibióticos. Para ello se llevó a cabo la caracterización de los clones de *E. coli* implicados en colibacilosis porcina. Además, consideramos de gran interés analizar la presencia y potencial zoonótico del grupo clonal pandémico ST131.

Se analizaron 499 aislamientos de *E. coli* recuperados en granjas de producción porcina en España durante el período 2006-2016. Demostramos que casi la mitad de las cepas implicadas en colibacilosis pertenecen a los grupos clonales O157:H39-A-ST10 (CH11-24) y O108:H39-A-ST10 (CH11-24), dato de gran relevancia para el diseño de nuevas vacunas.

También encontramos una alta prevalencia de resistencia a la colistina relacionada con la presencia del gen *mcr-1* (25,6%). La caracterización de 65 aislamientos de *mcr-1* representativos mostró que la mayoría eran multirresistentes. Siete cepas *mcr-1* eran, además, portadoras de genes BLEE. Otros siete aislados *mcr-1* eran co-portadores de *mcr-4* (tres cepas) y *mcr-5* (cuatro cepas). En este estudio, también recuperamos 18 aislamientos ST131 (siete *mcr-1*). Según nuestros datos, este sería el primer informe sobre el aislamiento de ST131 *mcr-1* en cerdos, que además presentaron una alta similitud con aislados clínicos humanos del virotipo D5 en la comparación de los perfiles de macrorestricción obtenidos mediante PFGE (Figura 1).

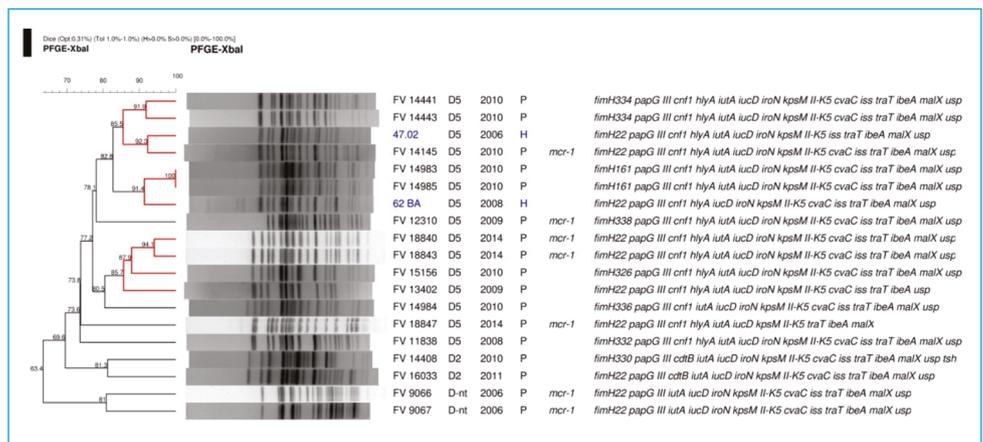


Figura 1. Dendrograma que muestra la alta similitud  $\geq 85\%$  entre cepas ST131 de origen humano (47.02 y 62BA; en azul) y cepas porcinas (FV14145, FV14983 y FV14985).

Publicación Científica: “Swine Enteric Colibacillosis in Spain: Pathogenic Potential of *mcr-1* ST10 and ST131 *E. coli* Isolates”. Revista: *Frontiers in Microbiology*. 2018 Nov 5;9:2659. doi: 10.3389/fmicb.2018.02659.

**Publicación de reseñas de artículos para la sección “Nuestra Ciencia”**

La sección «Nuestra Ciencia» publica reseñas de artículos científicos producidos por nuestros socios. La extensión máxima del texto es de 400 palabras y puede incluirse una imagen. Deben incluir la siguiente información: Título de la reseña, Autor, referencia bibliográfica completa del artículo que se reseña. Si el autor lo desea puede proporcionar su email de contacto.

Envía tus reseñas a la secretaría de la SEM ([secretaria.sem@semicrobiologia.org](mailto:secretaria.sem@semicrobiologia.org)) o al director editorial ([Manuel Sánchez, correo: m.sanchez@umh.es](mailto:Manuel Sánchez, correo: m.sanchez@umh.es))

## EPIDEMIOLOGY AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION OF SPECIES OF THE GENUS AEROMONAS

**Autora:** Ana Fernández Bravo  
(ana.fernandez@urv.cat)

**Directora:** María José Figueras Salvat

**Centro:** Unidad de Microbiología, Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili, Universidad Rovira i Virgili, 43201 Reus, España.

El género *Aeromonas* incluye más de 32 especies, algunas de las cuales están distribuidas en el medio ambiente y se consideran autóctonas de los sistemas acuáticos. El objetivo principal de esta tesis fue contribuir al mejor conocimiento de la epidemiología y la

patogenicidad de este género. En este trabajo se ha investigado la presencia de *Aeromonas* en diferentes fuentes de agua demostrando que el método de floculación de leche desnatada utilizado para detección de virus parece ser un buen método para la detección de estas. Además, el análisis de *A. salmonicida*, una especie asociada clásicamente con enfermedades en peces utilizando un modelo de ratón, confirmó que esta especie puede infectar mamíferos con diferentes niveles de patogenicidad. Teniendo en cuenta el aumento de las infecciones por *Aeromonas* en los últimos años, se han llevado a cabo colaboraciones con hospitales. También se demostró que el uso de MALDI-TOF para la identificación de *Aeromonas* aisladas de peces era poco precisa debido a las carencias en la base de datos. El uso de genomas, su comparación y

el desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas, demostró ser útil para entender la función de las especies. En esta tesis doctoral se llevó a cabo la caracterización de la metalochaperona HypA previamente descrita en otros patógenos, demostrando el rol en la tolerancia al ácido del estómago y en la defensa de *Aeromonas* contra macrófagos. Además, se ha demostrado el rol de la toxina ExoA y el sistema de secreción tipo VI (SST6) en las infecciones mixtas que progresan en una fascitis necrotizante, mediante el estudio de cepas aisladas de un paciente de Estados Unidos. Finalmente, un estudio de la defensa de monocitos humanos contra *Aeromonas* se llevó a cabo. Los resultados demostraron una respuesta inmune especie-específica, siendo más fuerte en las especies más prevalentes en clínica.

### Publicación de resúmenes de Tesis Doctorales

SEM@foro publica resúmenes de Tesis Doctorales realizadas por miembros de la SEM. Deben seguir el siguiente formato: Título, Autor, Director(es), Centro de realización, Centro de presentación (si es distinto) y Resumen (máximo, 250 palabras).

Envía tus reseñas a la secretaría de la SEM ([secretaria.sem@semicrobiologia.org](mailto:secretaria.sem@semicrobiologia.org)) o al director editorial ([Manuel Sánchez, correo: m.sanchez@umh.es](mailto:Manuel Sánchez, correo: m.sanchez@umh.es))

SEM@foro se reserva el derecho a no publicar la información si el resumen es excesivamente largo o el tema del trabajo no guarda suficiente relación con la Microbiología.

Los resúmenes de tesis dirigidas por miembros de la SEM no serán publicados en esta sección. Se recomienda enviar a la sección "Nuestra Ciencia" un resumen de alguno de los artículos producidos por la tesis.



# CMIBM

## VALENCIA 2020

### VIII Congreso Nacional de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana

3-5 de Junio 2020



**ORGANIZA:**  
Grupo Especializado de Microbiología Industrial y  
Biotecnología Microbiana,  
Sociedad Española de Microbiología



[https://congresos.adeituv.es/CMIBM\\_2020](https://congresos.adeituv.es/CMIBM_2020)



#### “Bacterias: la historia más pequeña jamás contada”

Una nueva colaboración con la SEM.

A lo largo de la historia las bacterias han sido consideradas como una entidad con connotaciones negativas a causa de su asociación con muchas enfermedades. Creyendo necesario derribar este prejuicio, unos jóvenes investigadores uruguayos, y los ilustradores de bandas educativas, nos pusimos manos a la obra en crear un cómic basándonos en que la educación era la manera de lograrlo. Es así que surgió la idea de crear el cómic “Bacterias: la historia más pequeña jamás contada”, que tiene como objetivo fomentar la popularización de la microbiología acercando la temática a la población en general y a los niños en particular. El libro se descarga de forma gratuita en formato PDF en el siguiente link: <http://www.comicbacterias.com/>

En esta ocasión, Gastón Azziz y Valentina Carrasco han generado el contenido científico del cómic publicado en este número.

Además, también hemos creado los juegos Guerra de Bacterias y Bacterias: el juego, para poder jugar aprendiendo de la manera más divertida e interesante posible. Os animamos a que descubráis todos los personajes:

<https://www.comicbacterias.com/micromatch/> • <https://www.comicbacterias.com/juego-mesa/>

Por último, como no podía ser de otra manera, nos podéis seguir en Facebook, Twitter e Instagram y enteraros de todas las novedades:

<https://www.facebook.com/comicbacterias/> • <https://twitter.com/comicbacterias> • <https://www.instagram.com/comicbacterias/>



## **MAR DE LACRE**

Cultivo de microorganismos, procedentes de sedimentos de alpechín, en un medio selectivo con RBBR (Remazol Brilliant Blue R) para la búsqueda de aquellos capaces de degradar compuestos estructuralmente complejos, como lignina y derivados. Proyecto LIFE+REGROW (LIFE16 ENV/ES/000331)

Primer Premio del concurso de fotografía Federico Uruburu.

XXVII Congreso Nacional de Microbiología SEM-2019 celebrado en Málaga.

Autora: María Rosa Martínez Gallardo.

# BACTERIAS

PRESENTA A COCO Y FRAN EN LA ANTÁRTIDA



MUCHAS GRACIAS POR ACOMPAÑARME EN ESTE VIAJE, MUCHACHOS.

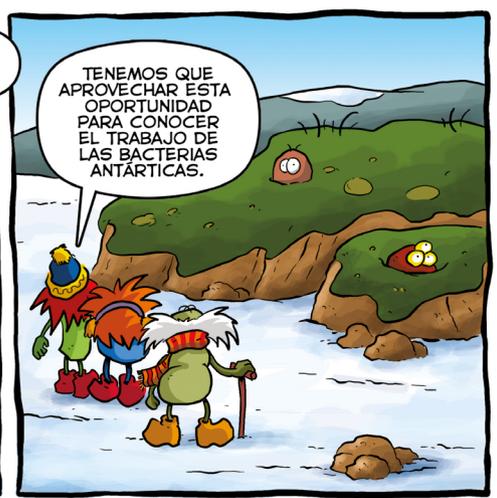
A MI EDAD NO ES CONVENIENTE HACER ESTE TIPO DE TRAVESÍAS SOLO.

¿CÓMO NO LO VAMOS A ACOMPAÑAR A LA ANTÁRTIDA? ES MI OPORTUNIDAD DE FOTOGRAFIAR A LA LEGENDARIA "ABOMINABLE BACTERIA DE LAS NIEVES"

POR FAVOR, DEJA DE DECIR PAVADAS.



TENEMOS QUE APROVECHAR ESTA OPORTUNIDAD PARA CONOCER EL TRABAJO DE LAS BACTERIAS ANTÁRTICAS.



COCO, FRAN, LES PRESENTO A MI PRIMO, FROUZIANCOCOBACTERIA.

¡BIENVENIDOS AL TAPETE MICROBIANO!



¡ABRÍGUESE, DON, QUE SE VA A AGARRAR FLOR DE GRIPE!

JA JA JA, NO TE PREOCUPES.



NOSOTROS UTILIZAMOS ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS PARA MANTENER UNA CAPA FLEXIBLE QUE NOS PROTEGE DEL FRÍO.



GRACIAS A LOS PRODUCTORES PRIMARIOS COMO YO, TODA LA COMUNIDAD PUEDE VIVIR EN EL FRÍO, YA QUE LAS CIANOBACTERIAS SINTETIZAMOS COMPUESTOS ORGÁNICOS A PARTIR DE LA LUZ SOLAR.



Y PARA PROTEGERNOS DE LOS RAYOS UV, PRODUCIMOS PIGMENTOS QUE ATRAEN LOS RAYOS UV Y ASÍ EVITAMOS SER EXPUESTOS A ELLOS.



ESTOS PIGMENTOS ATRAEN LA LUZ, POR ESO SE USAN PARA FABRICAR PANELES FOTOVOLTAICOS.



TODO MUY LINDO, PERO ¿CUÁNDO VAMOS A LAS CUEVAS, QUE TENGO ALGO QUE FOTOGRAFIAR?

AQUÍ ESTAMOS. EN ESTAS CUEVAS PODREMOS VER FÓSILES DE BACTERIAS MUY ANTIGUAS, LLAMADAS LITOBIONTES.

¿QUÉ FÓSILES NI FÓSILES?



¡YO ME VOY A CONSEGUIR LA FOTO DEL AÑO!

ABOMINABLE, ESPERO QUE TE GUSTEN LAS FOTOS CON FLASH.

VEN. NO SEAS TÍMID... AAAAAHHH



ME FALTÓ ACLARAR QUE LOS LITOBIONTES SIGUEN VIVIENDO DENTRO DE LAS ROCAS...

...Y SON EXPERTOS EN ENCONTRAR VALIENTES CAZADORES DE ABOMINABLES BACTERIAS DE LAS NIEVES QUE HUYEN DE MIEDO.

