

Epidemiología molecular de microorganismos patógenos: entre la evolución y la clínica

Fernando González-Candelas, M^a Alma Bracho, Julia Hillung, Alvaro Chiner, Paula Ruiz-Hueso, Carlos Francés-Cuesta, M^a Lorena Mejía, Beatriz Beamud, Marta Pla-Díaz y Neris García-González



Unidad Mixta de Investigación "Infección y Salud Pública" FISABIO-Universitat de València. Instituto de Biología Integrativa de Sistemas, I2SysBio, CSIC-Universitat de València. CIBER en Epidemiología y Salud Pública.



Foto del grupo "Epidemiología Molecular" de la Universidad de Valencia-FISABIO.

Nuestro grupo de investigación surge hace 20 años para resolver un problema complicado. Muchos lectores recordarán el brote masivo de hepatitis C que se detectó en esas fechas en la ciudad de Valencia. En ese momento, algunos de los integrantes del grupo nos ocupábamos de problemas básicos en biología evolutiva, utilizando virus como el de la fiebre aftosa y el de la estomatitis vesicular como organismos modelo para estudios de evolución experimental, a la vez que trabajábamos en la aplicación de la teoría evolutiva en la conservación de especies vegetales en riesgo de extinción. Nuestra aproximación fundamental en ambos casos era la Genética de poblaciones y la teoría de la evolución y aplicábamos sus principios para analizar la variabilidad genética de las muestras y poblaciones estudiadas, bien mediante la secuenciación de fragmentos de genes o con la

aplicación de otros marcadores moleculares, muchos de los cuales han caído en desuso hoy en día. Con estos antecedentes, y tras conocer que se estaban secuenciando virus de la hepatitis C derivados de la posible fuente y afectados por el brote, planteamos ante las autoridades sanitarias, primero, y las judiciales, a continuación, que la conjunción de los análisis moleculares del virus y los métodos filogenéticos podrían resolver las principales cuestiones planteadas: ¿había realmente un brote con una única fuente y, en ese caso, cual era ésta?, ¿quiénes de los posibles afectados habían sido infectados realmente por una fuente común?, y, finalmente, ¿cuándo se había producido cada infección? El análisis de más de 4000 secuencias de un fragmento de apenas 400 nucleótidos del VHC nos permitió dar respuestas a esas preguntas no sólo desde un punto de vista científico (González-Can-

delas *et al.* 2013), sino en sede judicial, en la que contribuimos a identificar al anestesista Juan Maeso como culpable de la infección con VHC de más de 275 de sus pacientes a lo largo de 10 años de actividad profesional.

Con este estudio iniciamos lo que ha resultado ser una fructífera y estrecha colaboración con la Dirección General de Salud Pública de la Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana, plasmada en numerosos trabajos científicos y de asesoramiento, que detallaremos más adelante, y en la creación de una unidad mixta de investigación entre la Universitat de València y la fundación FISABIO, gestora de la investigación de la DGSP y otros centros sanitarios en la Comunitat Valenciana. Nuestro planteamiento es sencillo: al igual que en el caso del brote de hepatitis C, vamos a aplicar el análisis molecular, evolutivo y genético poblacional a microorganismos

mos infecciosos, tanto virus como bacterias, con dos objetivos básicos, ampliar nuestro conocimiento de cómo evolucionan estos patógenos y aplicarlo en la vigilancia epidemiológica y la resolución de brotes y casos de transmisión.

Los virus de RNA y muchas bacterias tienen tasas de mutación y evolución muy elevadas, lo que permite que se acumulen suficientes diferencias genéticas en sus genomas en tiempos muy cortos. El análisis de genes que evolucionan rápidamente o el de genomas completos permite la reconstrucción de las relaciones genealógicas entre los aislados obtenidos tanto de muestras clínicas como de fuentes ambientales o de otros orígenes. Con estos análisis hemos identificado el origen de varios brotes de distintos virus (VIH, VHA, VHB, Enterovirus, etc., ver, p.e., Patiño-Galindo *et al.* 2017) y bacterias, en especial de *Legionella pneumophila* (Coscollá *et al.* 2010; Sánchez Busó *et al.* 2016), si bien en la actualidad estamos estudiando brotes nosocomiales de otras bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* o *Serratia marcescens*.

Los estudios de brotes suelen tener gran repercusión tanto en los medios como para las autoridades sanitarias, pero las posibilidades que ofrece la epidemiología molecular van mucho más allá de esta aplicación concreta. Así, el estudio de los brotes de *L. pneumophila* en Alcoy (Sánchez-Busó *et al.* 2013) mediante la secuenciación de 69 genomas completos nos ofreció una visión muy novedosa de la dinámica evolutiva y epidemiológica de esta bacteria. Determinamos, por ejemplo, que casi el 98% de la variabilidad genética introducida en los últimos 20 años en las principales cepas responsables de esos brotes se debe a eventos de recombinación con otros linajes de *L. pneumophila* y no a eventos de mutación puntual. Además, esos eventos de recombinación no se producen al azar en el genoma de la bacteria, sino que se localizan en “zonas calientes” que han sido descritas con más precisión posteriormente. El estilo de vida intracelular de esta bacteria parece ser, en gran medida, el responsable de esta alta promiscuidad en el intercambio genético, que se extiende tanto a genes de origen eucariota así como a los procedentes de otras bacterias (Coscollá *et al.* 2011). En ese mismo estudio pusimos de manifiesto que las definiciones de brote pueden diferir según la perspectiva con que se estudien. En concreto, un brote en epidemiología se define por la acumulación extraordinaria de

casos en el espacio y el tiempo mientras que desde un punto de vista biológico definiríamos un brote por el origen común del organismo infeccioso que afecta a varias personas, por ejemplo. En el caso de Alcoy, probamos que *L. pneumophila* aisladas en un mismo brote podían tener distintos orígenes biológicos y que aislados de brotes diferentes podían ser más parecidos. Si esta situación se repite en otras localidades, y nada hace sospechar que no pueda suceder así, la investigación y determinación de la fuente o fuentes de los brotes de *Legionella* puede resultar mucho más compleja de lo que ya es.

Al comparar las secuencias genéticas de microorganismos de evolución rápida podemos estudiar otros aspectos más allá de su mayor o menor parecido o proximidad filogenética. Podemos, por ejemplo, estudiar qué factores y procesos evolutivos han actuado sobre sus poblaciones, separando el efecto de la selección del de la recombinación o determinando cuáles han sido las dianas sobre las que ha actuado la selección y en qué forma lo ha hecho (Patiño-Galindo y González-Candelas, 2017). También podemos analizar la dimensión temporal de los acontecimientos evolutivos. Cambiando de organismo, esto es lo que hemos hecho recientemente con la bacteria *Treponema pallidum*, causante de la sífilis (Arora *et al.* 2017). En un estudio pionero por haber analizado el genoma completo de un buen número de cepas no cultivadas de esta bacteria, al comparar los cambios genómicos de la subespecie *T. pallidum pallidum* con los de *T.p. pertenuis* y *T.p. endemicum*, causantes de las treponemosis conocidas como pian y bejel, respectivamente, hemos revelado una división reciente en dos linajes (Nichols y SS14) producida a mitad del siglo XVIII. El segundo de estos linajes es el principal responsable de la expansión epidémica de esta bacteria en la actualidad, habiendo desarrollado resistencia al tratamiento con azitromicina a pesar de que no es el antibiótico de primera opción para esta infección. Desafortunadamente, los datos disponibles no nos permiten establecer una fecha y menos un lugar de origen para *T.p. pallidum*, por lo que uno de los grandes interrogantes de la historia de las enfermedades infecciosas aún está pendiente de resolver.

En la actualidad, nuestro grupo está ampliando las líneas de investigación ya apuntadas, siempre manteniendo nuestro interés en la dualidad de los resultados obtenidos. Por ejemplo, en el último proyecto para el que hemos

recibido financiación del MINECO (BFU2017-89594R) abordamos la epidemiología y evolución de la resistencia a antibióticos desde una perspectiva genómica. Nos centramos en *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEEs con el objetivo de secuenciar un número elevado (>2000) de aislados en hospitales de la CV en los próximos años. El proyecto se complementará con un análisis más detallado de los plásmidos presentes en estas bacterias y con estudios de evolución experimental, con los que nos proponemos indagar en las relaciones epistáticas entre las mutaciones responsables de la resistencia a distintos antibióticos así como en coexistencia con fagos (proyecto PROMETEO2016-122 de la Generalitat Valenciana). Seguimos, además, caracterizando la epidemiología molecular de infecciones de transmisión sexual (*Neisseria gonorrhoeae*, *T. pallidum* y *Chlamydia trachomatis*) a la vez que estamos iniciando una línea de trabajo en infecciones alimentarias (*Salmonella enterica* y *Campylobacter jejuni*). Por lo que respecta a la epidemiología y evolución de virus, nos centramos en la vigilancia epidemiológica de virus de la parotiditis y de hepatitis C y E, mientras mantenemos varias colaboraciones en estudios con VIH, VHC y citomegalovirus, entre otros. Podéis encontrar más información sobre nuestros proyectos, publicaciones y otras actividades en la web del grupo <https://www.uv.es/epimolecular/>

REFERENCIAS

- Arora, N. *et al.* 2017. Origin of modern syphilis and emergence of a pandemic *Treponema pallidum* cluster. *Nature Microbiology* 2:16245.
- Coscollá, M. *et al.* 2010. Legionellosis outbreak associated with asphalt paving machine, Spain, 2009. *Emerging Infectious Diseases* 16(9): 1381-1387.
- Coscollá, M. *et al.* 2011. Quantifying Nonvertical Inheritance in the Evolution of *Legionella pneumophila*. *Molecular Biology and Evolution* 28(2): 985-1001.
- González-Candelas, F. *et al.* 2013. Molecular evolution in court: Analysis of a large hepatitis C virus outbreak from an evolving source. *BMC Biology* 11: 76.
- Patiño-Galindo, J.A.; González-Candelas, F. 2017. Comparative analysis of variation and selection in the HCV genome. *Infection, Genetics and Evolution* 49: 104-110.
- Patiño-Galindo, J.A. *et al.* 2017. The molecular epidemiology of HIV-1 in the Comunidad Valenciana (Spain): analysis of transmission clusters. *Scientific Reports* 7:11584.
- Sánchez-Busó, L. *et al.* 2014. Recombination drives genome evolution in outbreak-related *Legionella pneumophila* isolates. *Nature Genetics* 46(11): 1205-1211.
- Sánchez-Busó, L. *et al.* 2016. Genomic investigation of a legionellosis outbreak in a persistently colonized hotel. *Frontiers in Microbiology* 6: 1556.