

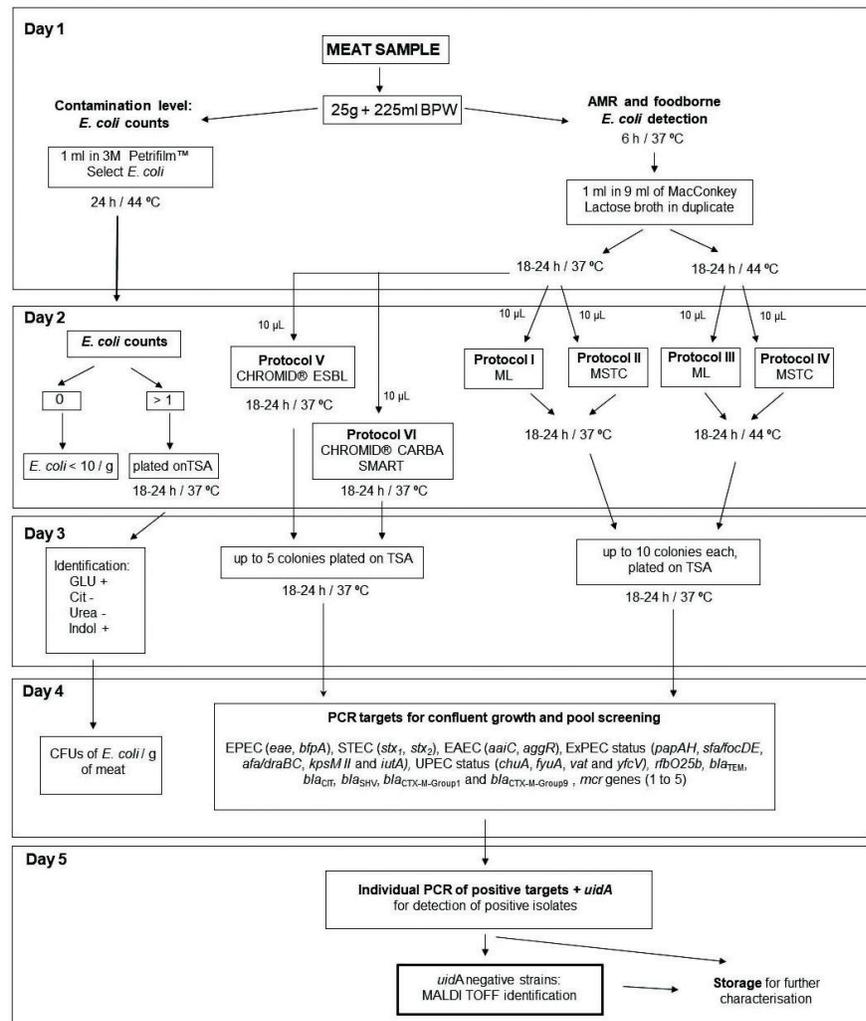
EVALUACIÓN DEL RIESGO MICROBIOLÓGICO DE LA CARNE DE PAVO Y POLLO PARA EL CONSUMIDOR

Dafne Díaz-Jiménez, Isidro García-Meniño, Alexandra Herrera, Luz Lestón, Azucena Mora*



Los alimentos, particularmente los productos avícolas, han sido reconocidos recientemente como reservorios potenciales de *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) para los seres humanos. Por otro lado, los animales de producción serían la principal causa del aumento de resistencias frente a los antibióticos, incluida la resistencia a colistina.

Para valorar el riesgo microbiológico de un alimento, hemos diseñado un protocolo de trabajo de laboratorio (Figura) basado en el análisis de seis marcadores de virulencia / resistencia, e incluyendo el uso de una PCR dúplex para la detección de ExPEC. Este protocolo se validó con 100 productos cárnicos de ave destinados al consumidor. La caracterización de 323 aislamientos reveló que la carne de ave es una fuente filogenéticamente diversa de *E. coli* (filogrupos A a G) y *Escherichia* clado I. El 71% de las muestras de carne portaban cepas de *E. coli* no sensibles a monobactamas, cefalosporinas de tercera y/o fluoroquinolonas. Además, el 47% portaban ≥ 2 cepas diferentes de *E. coli* positivas para genes BLEE, pAmpC o *mcr*. Los aislamientos del 78% de las muestras exhibían el estatus ExPEC y el 53% eran portadores de aislamientos positivos para el estatus de uropatogenicidad (UPEC). Las secuencias tipo (ST) identificadas en el 86% de las muestras pertenecían a linajes ExPEC de alto riesgo, siendo el 73% portadoras de grupos clonales de *E. coli* identificados en infecciones humanas de la misma Área de Salud que las muestras de carne analizadas. Es de destacar que recuperamos más de un clon asociado con patología humana en misma muestra de carne: p.e. ST131-B2 (CH40-22), ST648-F (CH4-58), ST93-A (CH11-neg); ST95-B2 (CH38-27), ST354-F (CH88-58), ST155-B1 (CH4-neg), respectivamente. Aplicando el análisis de riesgo propuesto, el 84% de las muestras de carne presentaban ≥ 3 riesgos, incluidos genes de resistencia, clones exitosos de *E. coli* y factores de virulencia. La carne de pavo mostró tasas significativamente más altas de cepas multirresistentes, o portadoras del gen *mcr* de resistencia a colistina; mientras que el estatus ExPEC, o la presencia de patotipos híbridos como el aEPEC/ExPEC O153:H10-A-ST10 (CH11-54), se asociaron significativamente con la carne de pollo ($P < 0,05$). En la estrategia “de la granja a la mesa”, los ExPEC deben quedar claramente incluidos en la vigilancia alimentaria.



Flujo de trabajo diseñado para investigar el nivel de contaminación, y la prevalencia de resistencia a antimicrobianos (AMR) y de *E. coli* patógena transmitida por los alimentos.

Este estudio forma parte de la tesis doctoral de Dafne Díaz, dirigida por la Dra. Azucena Mora, Profa. Titular (USC), y desarrollada en el marco de los proyectos nacionales AGL2016-79343-R y PID2019-104439RB-C21/AEI/10.13039/501100011033.

Díaz-Jiménez D, García-Meniño I, Herrera A, Lestón L, Mora A. 2020. Microbiological risk assessment of turkey and chicken meat for consumer: Significant differences regarding multidrug resistance, *mcr* or presence of hybrid aEPEC/ExPEC pathotypes of *E. coli*. Food control. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107713>

COMPRIENDIENDO LA APARICIÓN DE FENÓMENOS DE COLA EN LAS GRÁFICAS DE SUPERVIVENCIA DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM TRATADA POR PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE

Delso, C., Martínez, J. M., Cebrián, G., Álvarez, I., Raso, J.

Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, Spain

La tecnología de los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF) se ha demostrado eficaz en la inactivación de formas vegetativas de microorganismos debido al incremento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática de la célula como consecuencia de la formación de poros de tamaño nanométrico (electroporación). Sin embargo, la cinética de muerte no es exponencial, observándose fenómenos de cola en las gráficas de supervivencia lo que indica que a partir de un determinado momento la velocidad de inactivación disminuye con el tiempo de tratamiento. Este hecho limita la aplicación industrial de esta tecnología como sistema de pasteurización de alimentos, siendo necesarios tratamientos muy intensos para poder alcanzar los niveles de inactivación microbiana adecuados para garantizar la seguridad sanitaria del alimento.

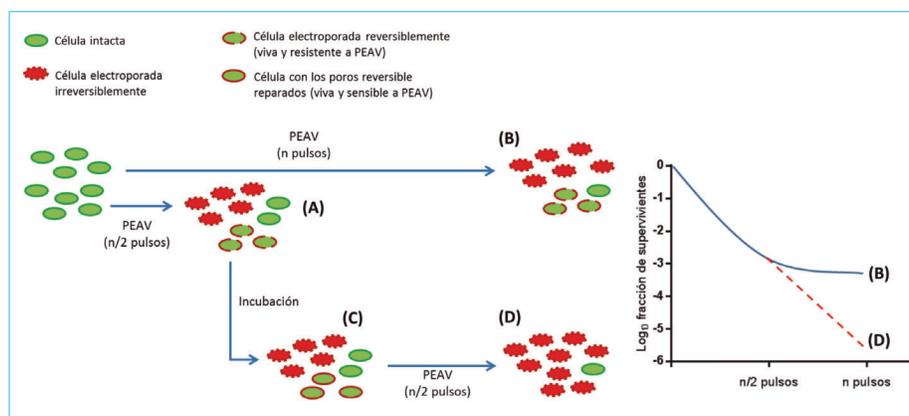


Diagrama adaptado de Delso et al. (2020)*

Hasta la fecha, la presencia de colas se ha atribuido a diversas causas como una distribución de resistencias a los PEF en la población microbiana, la falta de homogeneidad del campo eléctrico en las cámaras de tratamiento, fenómenos de adaptación celular durante los tratamientos, etc. En este estudio, se investigó por primera vez, otra causa que explicaría la cinética no lineal observada en las gráficas de supervivencia de *Salmonella* Typhimurium (CECT 878). Para ello, y como se muestra en el diagrama adjunto, se comparó la inactivación obtenida mediante la aplicación de un número de pulsos en una sola etapa ("n pulsos") con la obtenida aplicando el mismo número de pulsos divididos en dos etapas ("n/2 pulsos") separadas por un periodo de tiempo variable. Los resultados mostraron mayores niveles de inactivación cuando los tratamientos PEF se aplicaron en dos etapas espaciadas por un determinado tiempo de incubación (A, C y D) que cuando se aplicaban en una sola etapa (B), desapareciendo el fenómeno de cola en las gráficas de supervivencia (D). La monitorización de la electroporación celular mediante el uso de fluorocromos, que solo son capaces de entrar en el interior del citoplasma cuando la membrana citoplasmática no está íntegra, permitió determinar el porcentaje de células permeabilizadas tras los tratamientos PEF. Los resultados obtenidos evidenciaron que, cuando los pulsos se aplicaban en dos etapas, un porcentaje de células electroporadas y que seguían viables tras el tratamiento (A) podían cerrar los poros si antes de la aplicación de la segunda etapa de pulsos se dejaban incubar un tiempo suficiente (C). Se planteó la hipótesis de que estas células que se mantenían viables una vez electroporadas se volverían insensibles al efecto del campo eléctrico lo que provocaría la aparición de las colas en las gráficas de supervivencia. Esta pérdida de sensibilidad se atribuyó a que en una célula electroporada el campo eléctrico aplicado no provocaría el incremento del potencial transmembrana por encima del valor crítico que se requiere para que se manifieste la electroporación. Durante el intervalo de tiempo entre la aplicación de una etapa de pulsos y la siguiente, las células viables electroporadas reversiblemente cerrarían los poros formados, la membrana citoplasmática recuperaría su integridad (C) y como consecuencia las células volverían a ser sensibles a los tratamientos (D) desapareciendo las colas en las gráficas de supervivencia. El periodo de tiempo necesario para que las células cerraran los poros (de minutos a horas) dependió del pH del medio de incubación entre etapas de pulsos. En consecuencia, la aplicación de tratamientos de PEF en dos etapas permitiría que las células "resistentes" en la primera dosis de pulsos recuperaran su sensibilidad al campo eléctrico al cerrar sus poros tras un periodo de tiempo, consiguiendo así su inactivación en la segunda dosis de pulsos, desapareciendo las colas en las gráficas de supervivencia. Este fenómeno ha sido validado tanto en leche entera como en zumo de naranja. Estos resultados facilitan la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias de aplicación de los tratamientos PEF a escala industrial para conseguir los niveles de inactivación microbiana necesarios para garantizar la seguridad sanitaria de los alimentos tratados.

* Delso, C., Martínez, J. M., Cebrián, G., Álvarez, I., & Raso, J. (2020). Understanding the occurrence of tailing in survival curves of *Salmonella* Typhimurium treated by pulsed electric fields. *Bioelectrochemistry*, 135, 107580. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107580>

DETERMINANTES DE RANGO DE HUÉSPED DE LOS PATOVARES DE *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* DE LEÑOSAS REVELADOS MEDIANTE GENÓMICA COMPARATIVA Y PRUEBAS DE PATOGENICIDAD CRUZADA

Alba Moreno-Pérez, Adrián Pintado, Eloy Caballo-Ponce, Jesús Murillo y Cayo Ramos

El estudio de los determinantes del rango de huésped dentro del complejo de *Pseudomonas syringae* está ganando una visión renovada, debido a la amplia distribución del patógeno en ambientes no agrícolas, así como a las evidencias de la gran variabilidad en el rango de huésped que existe entre cepas pertenecientes al mismo patovar. Se requiere, por tanto, establecer patosistemas modelos apropiados que faciliten la integración de datos fenotípicos, genómicos y evolutivos. La generación de la secuencia de nucleótidos completa del cromosoma y de los tres plásmidos nativos de la cepa de *Pseudomonas savastanoi* pv. savastanoi NCPPB 3335, patógena del olivo, y del borrador de los genomas de tres cepas de *P. savastanoi* aisladas de adelfa (pv. nerii), fresno (pv. fraxini) y retama (pv. retacarpa), nos ha facilitado realizar un

análisis genómico comparativo con otros 16 genomas de *P. savastanoi* disponibles pertenecientes a los cuatro patovares. A pesar de la superposición de los rangos de huésped de las diversas cepas, las pruebas de patogenicidad cruzada que hemos llevado a cabo nos permitieron separar claramente los patovares y reclasificar algunas cepas en un patovar diferente al que originalmente se habían asignado. Estos ensayos funcionales resultaron fundamentales para reconciliar la filogenia con el rango de huésped, así como para definir bioinformáticamente los repertorios de genes específicos de cada patovar. Hemos calculado que el pangenoma de estas 20 cepas se compone de 7953 familias de genes ortólogos, entre los que se encuentran 45 genes de efectores del sistema de secreción de tipo III, 24 de los cuales son comunes a todas las cepas y cuatro son exclusivos del pv. retacarpa. Los cuatro patovares se corresponden con linajes genéticos bien definidos, que correlacionan con la agrupación jerárquica de las cepas que se obtiene en base a sus genes efectores, lo que apoya el papel de éstos en el rango de huésped diferencial de cada patovar. A diferencia del pv. fraxini, cuyas cepas inducen chancro en fresno, los otros tres patovares, causantes de tumores en plantas, codifican genes implicados en la biosíntesis de las fitohormonas ácido indolacético y citoquininas, así como genes responsables de la síntesis de rizobitoxina y de un bacteriofitocromo. Otros genes exclusivos de patovar codifican proteínas de los sistemas de secreción de tipo I, tipo II, tipo IV y tipo VI, la fitotoxina fevamina A, un sideróforo, proteínas relacionadas con di-GMPc, MCP (*Methyl-accepting chemotaxis proteins*) y una amplia colección de reguladores transcripcionales y transportadores de ocho superfamilias diferentes. Nuestra combinación de análisis de patogenicidad con el uso de herramientas genómicas nos ha permitido asignar correctamente cepas a patovares y proponer un repertorio de genes novedosos relacionados con el rango de huésped en el complejo bacteriano *P. syringae*.

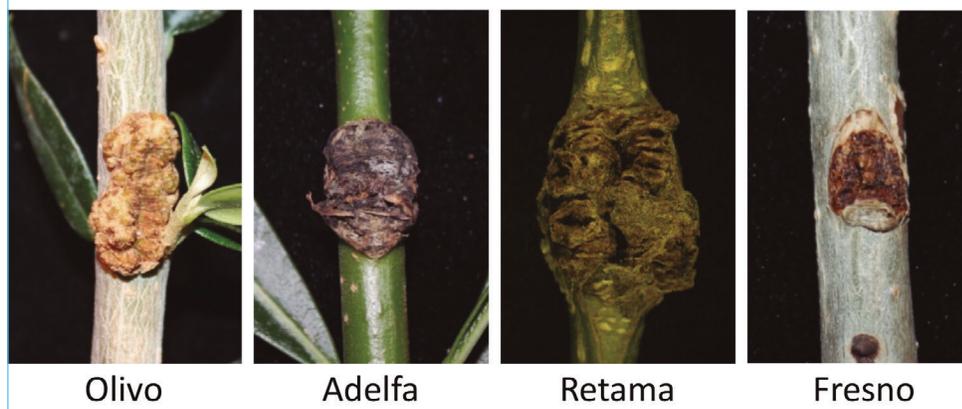
El artículo, se ha publicado en la revista *Frontiers in Plant Science* por investigadores de la Universidad de Málaga y el IHSM-UMA-CSIC (Alba Moreno, Adrián Pintado, Eloy Caballo, Cayo Ramos) en colaboración con Jesús Murillo (Universidad Pública de Navarra) y otras investigadoras de las Universidades Italianas de Perugia y Florencia.

Host Range Determinants of *Pseudomonas savastanoi* Pathovars of Woody Hosts Revealed by Comparative Genomics and Cross-Pathogenicity Tests. *Front. Plant Sci.* (2020) 11:973.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00973>

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00973/full>

Síntomas generados por *P. savastanoi*



En la imagen se muestran los síntomas generados por cepas de la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pertenecientes a sus cuatro patovares de plantas leñosas: de izquierda a derecha, pv. savastanoi (tuberculosis del olivo), pv. nerii (tuberculosis de la adelfa), pv. retacarpa (tuberculosis de la retama) y pv. fraxini (chancro del fresno).

BUSCANDO NUEVOS ANTIBACTERIANOS. LOS MÓDULOS DE UNIÓN A COLINA COMO AUMENTADORES DE LA FAGOCITOSIS

Emma Roig-Molina¹, Manuel Sánchez², Jesús M. Sanz^{1,3,4} y Beatriz Maestro^{1,3}

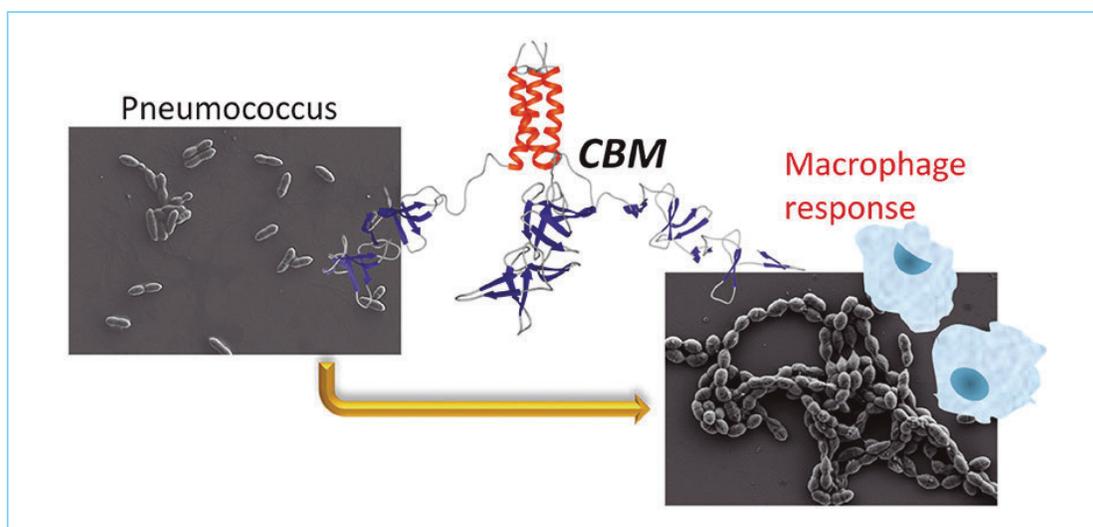
¹Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche. Universidad Miguel Hernández

²Departamento de Producción Vegetal y Microbiología. Universidad Miguel Hernández

³Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (CSIC)

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES)

Las proteínas de unión a colina (Choline-Binding Proteins, CBPs) son una familia de polipéptidos modulares que están involucrados en diversas funciones esenciales del patógeno *Streptococcus pneumoniae* (neumococo). Las CBPs reconocen los residuos de colina presentes en los ácidos teicoicos de la pared celular usando para ello los llamados módulos de unión a colina (CBMs). Las CBPs pueden ser el objetivo en la búsqueda de nuevos fármacos para combatir a neumococo, sobre todo en el caso de cepas resistentes a los antibióticos.



En este trabajo se estudió el potencial de usar CBMs aislados que puedan actuar como inhibidores de las CBPs mediante la competición por los sitios de unión en la superficie de la pared celular. El primer paso fue la caracterización físico-química de la unión a la pared celular de los tres CBMs provenientes de las proteínas C-LytA, C-Cpl1 y C-CbpD. Para dicha caracterización se utilizaron nanopartículas magnéticas recubiertas de DEAE que imitaban la pared celular del neumococo. La interacción fue estudiada combinando diferentes técnicas de modelado molecular, centrifugación analítica, resonancia de plasmón de superficie, espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular. Al añadir de manera exógena estos CBMs a cultivos en fase exponencial de *S. pneumoniae*, lo que se observaba al poco tiempo era la formación de largas cadenas producidas por la inhibición de las CBPs implicadas en separación celular, y que se agregaban formando flóculos y sedimentando en el fondo. Se observó que dichos agregados eran fácilmente reconocidos y fagocitados por macrófagos. Estos resultados indican que los CBMs pueden ser unos buenos candidatos para diseñar nuevas sustancias antimicrobianas basadas en la inducción del sistema inmunitario del hospedador.

Emma Roig-Molina, Manuel Sánchez-Angulo, Jana Seele, Francisco García-Asencio, Roland Nau, Jesús M. Sanz and Beatriz Maestro. (2020). *Searching for Antipneumococcal Targets: Choline-Binding Modules as Phagocytosis Enhancers*. ACS Infect. Dis. 2020, 6, 954–974. DOI: 10.1021/acscinfecdis.9b00344

LA PERCEPCIÓN DE LA LUZ AZUL POR *PSEUDOMONAS SYRINGAE* DURANTE LA FASE EPIFITA ACTIVA LA EXPRESIÓN DE QUIMIORRECEPTORES, PERMITIENDO UNA INFECCIÓN EFICIENTE

Saray Santamaría-Hernando, Jean Paul Cerna-Vargas, Pedro Manuel Martínez-García, Sofía de Francisco-de Polanco, Sandra Nebreda, Pablo Rodríguez-Palenzuela, José Juan Rodríguez-Herva, Emilia López-Solanilla.



Las bacterias fitopatógenas colonizan la superficie de las plantas y pueden multiplicarse como epifitas y saprofitas antes de entrar en el interior de la planta. Durante esta etapa en la filosfera deben adaptarse al ambiente en la superficie de la hoja. Cuando las condiciones son favorables, las bacterias entran a través de heridas o aberturas naturales y se multiplican en el apoplasto de la planta. Una vez dentro, activan mecanismos de virulencia e inducen los síntomas asociados a la enfermedad. El estudio de las adaptaciones bacterianas en las etapas iniciales de la interacción es fundamental para dilucidar el cambio a un estilo de vida patogénico y el desarrollo de la enfermedad.

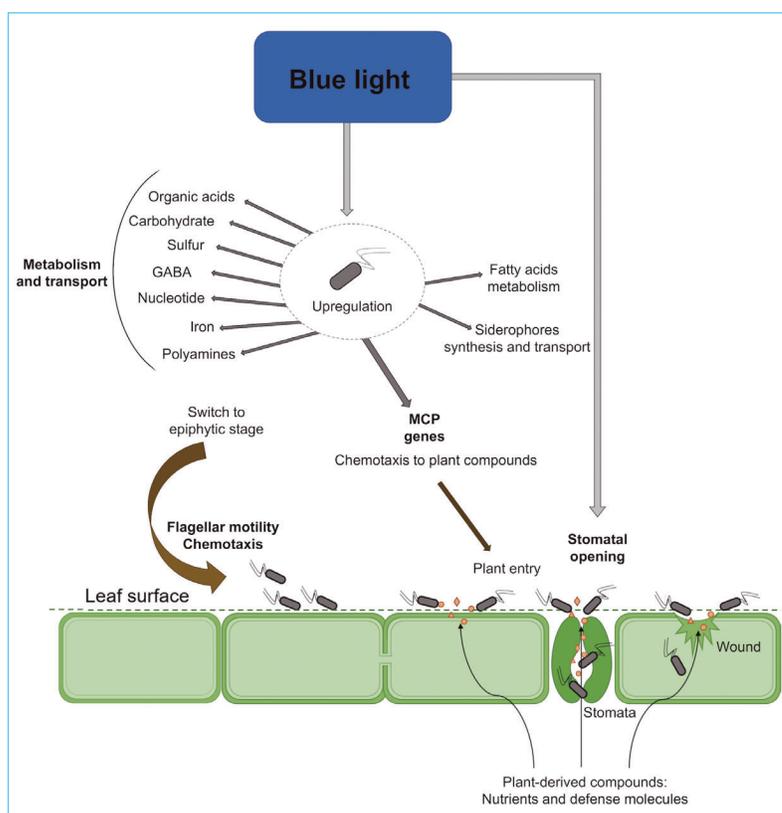
En este trabajo, hemos evaluado el efecto de la percepción de la luz sobre la expresión génica en poblaciones epifitas del patógeno modelo *Pseudomonas syringae* pv. tomate DC3000 (PsPto) durante el contacto inicial con la superficie de hojas de tomate. Hemos observado que el contacto con la superficie de la hoja desencadena una profunda reprogramación génica en PsPto. La respuesta inicial se caracteriza por una significativa activación de los genes de quimiotaxis y motilidad bacteriana, independientemente de las condiciones de luz. Sin embargo, también hemos determinado que, una vez en la superficie de la hoja, la percepción de la luz azul por parte de PsPto es necesaria para lograr una colonización óptima. La percepción de la luz azul, a través de la función de los fotorreceptores de PsPto, desencadena la activación de la actividad metabólica y aumenta la expresión de cinco quimiorreceptores.

Los quimiorreceptores median la quimiotaxis hacia los compuestos liberados desde interior de la hoja y desde los estomas, facilitando la entrada al interior de la planta y el inicio del proceso de virulencia. Hemos demostrado que la inactivación de dos de los quimiorreceptores activados por la luz azul provoca una reducción de la virulencia. Además, en trabajos anteriores se ha demostrado que la luz azul es una señal para la apertura de los estomas, lo que facilita la entrada de bacterias al interior de la planta. Nuestros resultados ponen de manifiesto que durante la interacción de PsPto con plantas de tomate, la percepción de la luz, la quimiotaxis y la virulencia son procesos altamente conectados.

Estos resultados se han publicado en la revista *Molecular Plant Pathology* por investigadores del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP) de la Universidad Politécnica de Madrid.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

"Blue-light perception by epiphytic *Pseudomonas syringae* drives chemoreceptor expression, enabling efficient plant infection". *Molecular Plant Pathology*. 2020 <https://doi.org/10.1111/mpp.13001>.



Modelo que ilustra el efecto de la percepción de la luz azul en *Pseudomonas syringae* durante la fase epifita: aumento en la expresión de genes relacionados con la quimiotaxis y con la actividad metabólica que permiten una respuesta óptima a las señales de la planta, y que sumado a la apertura de los estomas mediada por la luz azul, facilita la entrada de las bacterias al interior de la planta.