

Taxonomía de bacterias patógenas inusuales, emergentes, atípicas y de difícil identificación

Juan Antonio Sáez Nieto y Sylvia Valdezate

Laboratorio de Taxonomía. Centro Nacional de Microbiología.
Instituto de Salud Carlos III. 28220 Majadahonda, Madrid



Laboratorio de Taxonomía (Izda-Dcha):
Pilar Villalón, M^a Jose Medina,
Miguel Angel Fernandez Torres,
Juan Antonio Sáez Nieto, Sylvia Valdezate,
Gema Carrasco, Noelia Garrido

El Laboratorio de Taxonomía (desde 1996, fecha de su creación) se enmarca en las actividades de diagnóstico, referencia e investigación del Área de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología. Así, se reciben cepas bacterianas y muestras para diagnósticos especiales de 270 laboratorios de microbiología de hospitales, delegaciones territoriales de salud, departamentos universitarios y de otros centros de investigación. Las actividades desarrolladas son: identificación fenotípica y genotípica de especies bacterianas productoras de patología humana emergentes, inusuales y de difícil identificación; caracterización de brotes comunitarios y nosocomiales producidos por bacterias inusuales; descripción de nuevas especies; determinación de marcadores fenotípicos y moleculares de variabilidad, virulencia y resistencia a antimicrobianos en bacterias emergentes e inusuales; diagnóstico de botulismo. Nuestro grupo también integra el laboratorio de Referencia Nacional de estreptococos β -hemolíticos, en el cual se desarrollan las siguientes actividades: vigilancia microbio-

lógica de las cepas de *Streptococcus pyogenes* (SGA) y otros estreptococos β -hemolíticos (grupos, C y G), productoras de cuadros invasivos graves y otros síndromes; determinación de serotipos, susceptibilidad a los antibióticos utilizados para el tratamiento y control de la infección; detección de los principales factores de virulencia (toxinas y superantígenos) de las cepas circulantes.

METODOLOGÍA APLICADA A ESTAS ACTIVIDADES

En Taxonomía:

- Pruebas bioquímicas/fisiológicas convencionales: paneles de identificación bioquímica y metabólica.
- Secuenciación de genes con fines taxonómicos y de factores de virulencia: 16S RNA, 23S RNA, *rpoB*, *recA*, *gyrB*, *hps65*, *secA1*, *tuf*, *rpoD*, y otros genes metabólicos

housekeeping" integrados en los diferentes esquemas de MLST "multilocus sequence typing, genes codificantes de neurotoxinas de *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens* y otros genes de virulencia.

- Caracterización molecular (brotes y estudios de poblaciones): identificación de genotipos mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE); "Multilocus sequence typing" (MLST); Multilocus variable number tandem analysis" (MLVA).
- Estudio fenotípico y genotípico de la resistencia a antibióticos: antibiograma (E-test, difusión en disco, dilución en placa y microdilución); genes de resistencia a β -lactámicos, macrólidos, aminoglicósidos, quinolonas, tetraciclinas, glicopéptidos, principalmente.
- Diagnóstico y detección de los serotipos de *Clostridium botulinum*: tipado y subtipado de neurotoxinas

- Análisis y secuenciación de genomas completos en cepas de *Nocardia*, *Burkholderia*, *Xanthobacter*, *Paenibacillus* y *Saezia*.

En *S. pyogenes* y otros beta-hemolíticos:

- Pruebas bioquímicas convencionales, paneles de identificación fenotípica y molecular del género *Streptococcus* (94 especies).
- Aglutinación del latex con serogrupo-específicos para la determinación del grupo de Lancefield (β -hemolíticos)
- Secuenciación del gen *emm* (tipos de la proteína M) y detección de genes de toxinas y superantígenos de SGA (*speA*, *speB*, *speC*, *speF*, *speG*, *speJ*, *speH*, *smeZ* y *ssa*).
- Estudio de brotes por PFGE y MLST.
- Sensibilidad a antimicrobianos (E-test) y fenotipos de resistencia a macrólidos (DDS).
- Detección de genes de resistencia a macrólidos, tetraciclina (*erm*, *msr*, *mef*, *tetM*, *tetO*).

Además de la actividad de referencia mencionada, se desarrollan varias líneas de investigación:

- a. Caracterización de nuevas especies implicadas en infección humana

Desde 1996 en el que se creó el grupo hasta la actualidad se han estudiado 15.000 cepas aisladas de infección y de muestras ambientales relacionadas con brotes. Las cepas pertenecieron a 168 géneros y 501 especies de gram-negativas y 127 géneros y 656 especies de gram-positivas. De estas, 155 cepas pertenecientes a los phyla: *Proteobacteria*, (α , β , γ) *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* y *Synergistetes*) no se adscribieron a los géneros y/o especies existentes. Por lo que englobarían a posibles nuevas especies implicadas en infección humana. Actualmente el grupo esta investigación las cepas candidatas a nuevas especies de *Bacillus sp.*, *Paeniba-*

cillus sp. y géneros afines a *Nocardia* (*Actinomadura*, *Streptomyces* y *Actinomyces*). En gram-negativos se investigan nuevas especies de *Acinetobacter*, *Ralstonia* y *Chryseobacterium*,. Así como en géneros poco habituales en infección humana como: *Paracoccus*, *Brevundimonas*, *Xanthobacter* y otros (α -*Proteobacteria*), *Massilia*, *Ottowia* (β -*Proteobacteria*), *Pseudoxanthomonas*, *Idiomarina* (γ -*Proteobacteria*). Recientemente el grupo ha descrito un nuevo Género perteneciente a β -*proteobacteria*, aislado de un hemocultivo, en el Hospital Clínico de San Carlos de Madrid: "*Saezia sanguinis*" así como 11 nuevas especies del género *Paenibacillus*, aisladas de muestras clínicas en diversos hospitales. Actualmente se analiza el genoma completo de diversas candidatas a nuevas especies de *Paenibacillus*, *Xanthobacter* y *Saezia* (género descrito en nuestro laboratorio recientemente).

- b. Filogenia de los géneros *Nocardia* y *Brucella*

Actualmente se realiza estudios comparativos de identificación, tipado y filogenias de las especies de *Nocardia* más frecuentes en España: *N. abscessus*, *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica* y *N. nova*, mediante análisis del 16S, *rpoB*, y *gyrB*, así como de otras especies. Otro aspecto importante que se ha desarrollado es el estudio de caracterización molecular de cepas de *Nocardia* con elevada resistencia a antimicrobianos.

En el caso de *Brucella melitensis*, responsable del 97% de los casos humanos de brucelosis, se han aplicado diferentes marcadores moleculares para el estudio de poblaciones circulantes: MLST, MLVA-16 y HOOB-Print (Hypervariable Octameric Oligonucleotide Finger-Print). Las dos últimas técnicas nos han permitido: establecer la estructura de la población de las cepas circulantes en España, agrupándose en tres clusters principales: grupo Americano, Mediterráneo Este y Mediterráneo Oeste; su correlación con los tipos *rpoB1*, *rpoB2* y *rpoB3*, respectivamente; predominando el genotipo 42, del grupo Mediterráneo Este.

BIBLIOGRAFIA RECIENTE DEL GRUPO

- M.I. de Garnica, J.A. Sáez-Nieto, R. Gonzalez, J.A. Santos, C. Gonzalo.** Diversity of gram-positive catalase-negative cocci in sheep bulk tan by comparative 176s rDNA sequence analysis. INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL 2014; 34: 142-145. doi:10.1016/j.igairyj.2013.08.002
- M.J. Medina-Pascual, S. Valdezate, G. Carrasco, P. Villalon, N. Garrido, J.A. Sáez Nieto.** Increase of isolation of *Burkholderia contaminans* from Spanish patients with cystic fibrosis. CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION 2015; 21:150-156. doi: 10.1016/j.cmi.2014-07-014
- G. Carrasco, S. Valdezate, N. Garrido, M.J. Medina-Pascual, P. Villalon, J.A. Sáez Nieto.** *gyrB* as a tool for identifying *Nocardia species* and exploring their phylogeny. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 2015; 53: 997-1001. doi:11.1128/JCM.03072-14
- P. Villalon, S. Valdezate, T. Cabezas, Ana Vindel, M.J. Medina Pascual, N. Garrido, M. Ortega, J. A. Sáez Nieto.** Endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii*: a twelve-year study in a tertiary care hospital. BMC MICROBIOLOGY 2015; 15:47. doi:10.1186/S12866-015-0383-Y
- S. Valdezate, N. Garrido, G. Carrasco, P. Villalon, M.J. Medina, J.A. Saez Nieto.** Resistance gene pool to co-trimoxazole in non-susceptible *Nocardia* strains. FRONTIERS IN MICROBIOLOGY 2015; 6:376. doi:10.3389/fmicb.2015.00376
- J.A. Sáez Nieto, S. Valdezate, M.J. Medina, G. Carrasco, N. Garrido, P. Villalon.** Taxonomía polifásica de bacterias patógenas y ambientales relacionadas con casos de infección(2012-2014). MONOGRAFÍAS DE BACTERIOLOGIA. CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA, ISCIII. 2015 Vol. 3 Pag. 1-75.
- G. Carrasco, J.D. Caballero, N. Garrido, S. Valdezate, R. Canton, J.A. Saez-Nieto.** Shortcomings of the comercial MALDI-TOF database and use of MLSA as an arbiter in the identification of *Nocardia species*. FRONTIERS IN MICROBIOLOGY http://idex.doi.org/10.3389/fmicb/2016.00542.
- F. Traverso, A. Blanco, P. Villalon, N. Beratz, J.A. Saez Nieto, Horacio Lopeardo,** National Collaborative group for the study of streptococci and related bacteria. Molecular characterization of invasive *Streptococcus dysgalaciae subsp. equisimilis*. Multicenter study: Argentina 2011-2012.REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGIA 2016; 48:279-289. 10.1016/j.ram.2016.07.001.
- S. Valdezate, N. Garrido, G. Carrasco, M^o Jose Medina-Pascual, P. Villalon, A. M. Navarro, J.A. Sáez Nieto.** Epidemiology and susceptibility to antimicrobial agents of the main *Nocardia species* in Spain. JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY. 2017; 72:754-761. doi: 10.1093/jac/dkw.489.
- J.A. Sáez Nieto, M.J. Medina-Pascual, G. Carrasco, N. Garrido, M.A. Fernandez-Torres, P. Villalón, S. Valdezate.** *Paenibacillus spp.* isolated from human and environmental samples in Spain. Detection of eleven new species. NEW MICROBES AND NEW INFECTIONS 2017; 19:19-27. doi: 10.1016/j.nmni.2017.05.006
- J.A. Sáez Nieto, S. Valdezate, M.J. Medina, G. Carrasco, N. Garrido, P. Villalon.** Taxonomía

polifásica de bacterias patógenas y ambientales relacionadas con casos de infección(2015-2017). MONOGRAFÍAS DE BACTERIOLOGÍA. CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA, ISCIII. 2018; Vol. 4 Pag. 1-80.

A.I. Vela, P. Villalon, J.A. Saez Nieto, G. Chacon, L. Dominguez, J.F. Fernandez-Garaizabal. Detection

and characterization of *Streptococcus Pyogenes* from animal clinical specimens. EMERG INFECT DIS 2017; 23: 2011-2016.

S. Valdezate, S. Monzon, N. Garrido, A. Zaballos, M.J. Medina Pascual, UJM Azcona-Gitierrez, B. Villar. First insight into the genome sequences of two linezolid-resistant *Nocardia farcinica* strains isolated

from patients with cystic fibrosis. GENOME ANNOUNCEMENT 2017; 16:5 (46).

G. Carrasco, S. Monzon, P. Jimenez, I. Cuesta, J. Bartolome-Alvarez, S. Valdezate. First draft genome sequence of a clinical strain of *Nocardia cerradoensis*. GENOME ANNOUNCEMENT 2017; 28; 5 (39).

Ecología microbiana molecular: explorando la diversidad procariótica y vírica de ambientes hipersalinos y marinos

Borja Aldeguer-Riquelme, Pepa Antón*, Inmaculada García-Heredia, María Gomariz, Cristina López, Mónica Lluesma, Lucía Maestre, Ana B. Martín-Cuadrado, Manuel Martínez-García, Fran Martínez-Hernández, Fernando Santos, Esther Rubio-Portillo, Loles Ramos-Barbero, Judith Villamor



Grupo de Ecología Microbiana Molecular, Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Carretera de San Vicente s/n, 03690 Sant Vicent del Raspeig, Alicante



Miembros del grupo de Ecología Microbiana Molecular desde sus inicios hasta la actualidad, ordenados cronológicamente. De izquierda a derecha empezando por la fila superior: Pepa Antón, Fernando Santos, Arantxa Peña, Lenin Maturrano, Manuel Martínez-García, Mehmet Burçin Mutlu, Cristina López, Débora Nercessian, María Gomariz, Ines Boujelben, Inmaculada Meseguer, Esther Rubio-Portillo, Judith Villamor, Ece Albayrak, Pedro González-Torres, Loles Ramos-Barbero, Nuria Sarrias, Borja Aldeguer-Riquelme, Mónica LLuesma, Fran Martínez-Hernández, Ana B. Martín-Cuadrado, Inmaculada García-Heredia y Lucía Maestre.

PRESENTACIÓN DEL GRUPO

El grupo de Ecología Microbiana Molecular de la Universidad de Alicante empezó a funcionar en 1999, cuando estaba constituido por un par de estudiantes de doctorado recién licenciados, Fernando Santos y Arantxa Peña, y su fundadora, Pepa Antón que acababa de obtener su plaza de profesora titular de Microbiología. Poco después el grupo consiguió sus primeros proyectos financiados (uno de ellos coordinado con Ramon Rosselló-Móra, del IMEDEA, con el que desde entonces mante-

nemos una fructífera y estable colaboración) y se incorporaron al mismo dos nuevos estudiantes, Lenin Maturrano y Manuel Martínez García, que empezaron también a desarrollar sus tesis doctorales. Estas cuatro primeras tesis (de Fernando, Lenin, Arantxa, y Manuel) fueron la semilla de lo que luego serían nuestras principales líneas de investigación durante gran parte de nuestra trayectoria: virus en ambientes hipersalinos, diversidad procariótica de ambientes hipersalinos, *Salinibacter ruber* y microbiota de invertebrados marinos, respectivamente.

Durante estos casi 20 años de trayectoria, son muchos los investigadores que han pasado por nuestro grupo para realizar estancias cortas o hacer sus tesis doctorales (la figura 1 muestra a gran parte de ellos), además de numerosos estudiantes que han llevado a cabo con nosotros sus DEAs, TFGs y TFGs. Algunos de los miembros iniciales siguen en el grupo y ya han empezado a formar sus grupos independientes pero todavía englobados en el de Ecología Microbiana Molecular, ya que una parte esencial de nuestra labor científica se basa en la cooperación y la optimización de