

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

Juan Antonio Sáez Nieto y Sylvia Valdezate

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



Laboratorio de Taxonomía (Izda-Dcha): Gema Carrasco, M^o José Medina, Sylvia Valdezate, Juan Antonio Sáez Nieto, Noelia Garrido y Pilar Villalón.

El laboratorio de taxonomía del Servicio se enmarca en las actividades de diagnóstico, referencia e investigación del Servicio de Bacteriología del CNM. Así, se reciben cepas bacterianas y muestras para diagnósticos especiales de 250 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 patologías humanas 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 se integra el laboratorio de Referencia Nacional de estreptococos β -hemolíticos, en el cual se desarrollan las siguientes actividades: vigilancia microbiológica de las cepas de *Streptococcus pyogenes* (St A) y otros estreptococos β -hemolíticos (grupos C y G), productoras de cuadros invasivos graves y otros síndromes; determinación de serotipos, susceptibilidad a los antibióti-

cos 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*, genes *housekeeping* integrados en los diferentes esquemas de MLST «*multilocus sequence variants*», genes de neurotoxinas de *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens*, entre otros.
- Caracterización molecular (brotes y estudios de poblaciones): identificación de genotipos mediante electroforesis en camEpo pulsado (PFGE); «*Multilocus sequence-typing*» (MLST); «*Multilocus variable number tandem analysis*» (MLVA).

- Estudio fenotípico y genotípico de la resistencia a antibióticos: antibiograma (ϵ -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

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

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

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

Caracterización de nuevas especies implicadas en infección humana

Desde 1996 en el que se creó el grupo hasta la actualidad se han identificado 11.964 cepas aisladas de infección y de muestras ambientales relacionadas con brotes. Las cepas pertenecieron a 144 géneros y 399 especies de Gram-negativas y 108 géneros y 517 especies de Gram-positivas. De estas, 308 cepas Gram-negativas pertenecientes a 50 géneros y 465 cepas Gram-positivas de 60 géneros, no se adscribieron a las especies existentes. Por lo que englobarían un número significativo de posibles nuevas especies implicadas en infección humana. Actualmente el grupo esta investigando las cepas identificadas de *Bacillus sp.*, *Paenibacillus sp.* y géneros afines a *Nocardia* (*Actinomadura*, *Streptomyces* y *Actinomyces*). En gram-negativos se investigan nuevas especies de *Acinetobacter*, *Ralstonia* y *Chryseobacterium*.

Filogenia de los géneros *Nocardia* y *Brucella*

Actualmente se realizan 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*. Estos dos últimos genes están mostrando un buen comportamiento como herramientas en la caracterización intraespecífica de estas poblaciones.

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 HOOF-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 y el gran predominio del genotipo 42*.

BIBLIOGRAFÍA (ÚLTIMOS 5 AÑOS)

- Bou G, Saleta JL, Sáez Nieto JA, Tomas M, Valdezate S, Sousa MD, Lueiro F, Villanueva R, Pereira MJ, Linares P.** (2008) Outbreak caused by *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* Emerg Infect Dis 14: 968-71.
- Romero MP, Quiles MI, Peña P, Gutierrez A, García de Miguel MA, Jimenez C, Valdezate S, Sáez Nieto JA.** (2008) Outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteriemia caused by contaminated chlorhexidine in a haemodialysis unit. Infect Ctrl Hosp Epidemiol 29:377-8.
- Valdezate S, Labayru C, Navarro A, Mantecon A, Ortega M, Coque MT, García M, Sáez Nieto JA** (2008) Large clonal outbreak of multidrug resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital. J Antimicrob Chemother 63:17-20.
- Fernandez Natal I, Sáez Nieto JA, Valdezate S, Rodríguez Pollan R-HG, Lapeña S, Cachon F, Soriano F.** (2009) Isolation of *Corynebacterium ureiceleivorans* from normally sterile sites in humans. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 28: 677-681.
- Valdezate S, Navarro A, Rubio V, Garin-Bastuji B, Albert D, Hernandez P, Alonso PM, Sáez Nieto JA.** (2009) Emergence of a clonal lineage of *Brucella abortus* biovar 3 in clinical cases in Spain. J Clin Microbiol 47: 2687-8.
- Monterrubio J, Gonzalez V, Valdezate S, Cordoba A, Villalon P, Sáez Nieto JA.** (2009) Outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a polyvalent intensive care unit: clinical, epidemiological analysis and PFGE-printing evolution. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 9: 1281-4.
- Valdezate S, Navarro A, Medina MJ, Carrasco G, Sáez Nieto JA.** (2010) Molecular screening for rifampicina and fluoroquinolone resistance in a clinical population of *Brucella melitensis*. J Antimicrob Chemother 65: 51-53.
- Escudero R, Elia M, Sáez Nieto JA, Menendez V, Toledo A, Royo G, Rodríguez-Vargas M, Whipp MJ, Gil H, Anda P.** (2010) A possible novel *Francisella* genomic species isolated from blood and urine of a patient with severe illness. Clin Microbiol Infect- 2010; 16: 1026-30.
- Valdezate S, Navarro A, Villalon P, Carrasco G, Sáez Nieto JA.** (2010) Epidemiological and phylogenetic análisis of Spanish human *Brucella melitensis* Straits by MLVA-16 typing, Hoof-printing and *rpoB*. J Clin. Microbiol 48: 2734-40.
- Villalon P, Valdezate S, Medina MJ, Rubio V, Vindel A, Sáez Nieto JA** (2011) Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* in Spain. J Clin Microbiol 49: 875-882.
- Fernandez A, Pereira MJ, Suarez JM, Villalon P, Treviño M, Poza M, Sáez Nieto JA, Regueiro BJ, Villanueva R, Bou G.** (2011) Emergence in Spain of a multidrug resistant *Enterobacter cloacae* clinical isolate producing SFO-1 extended-spectrum beta-lactamase. J. Clin. Microbiol 49: 822-828.
- Valdezate S, Miranda C, Navarro A, Freitas AR, Carrasco G, Coque T, Jimenez E, Sáez Nieto JA.** (2012) Clonal outbreak of multirug

* Véase nuestro artículo el la página 38.

resistant ST17 *Enterococcus faecium* harbouring an INC18:Tn1546 plasmid in a haemo-oncology Ward of a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother* 67: 832-836.

Medina-Pascual MJ, Valdezate S, Villalon P, Garrido N, Rubio V, Sáez-Nieto JA. (2012) Identification, molecular characterization and antimicrobial susceptibility of genovars of the *Burkholderia cepacia* complex in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 3385-3396.

Sáez Nieto JA, Valdezate, Medina MJ, Carrasco G, Garrido N, Villalon P, Ortega M, Navarro A, Rubio V. (2012) Taxonomía polifásica de bacterias patógenas y ambientales relacionadas con casos de infección. *MONOGRAFÍAS DE BACTERIOLOGÍA Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.* 1: 1-117.

Rubio V, Valdezate S, Alvarez D, Villalon P, Medina MJ, Salcedo C, Sáez Nieto JA. (2012) Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of *Streptococcus pyogenes* isolates resistant to erythromycin and tetracycline in Spain (1994-2006). *BMC Microbiology* 12: 215.

Villalon P, Valdezate S, Medina MJ, Carrasco Vindel A, Sáez Nieto JA. (2013) Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, caerbpem hydrolysing oxacillinase and metallo-beta-lactamase genes, and of common insertion sequences in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. *J Antimicrob Chemother* 68: 550-553.

Salvadó M, Plasencia V, Segura C, Gómez J, Medina M^aJ, Sáez Nieto JA, Castellanos S, Horcajada JP. (2013) Infection due to *Actinobaculum spp.*: Report of 12 patients in Spain. *J Infect* 66: 107-113.

Transducción de señal y respuesta inmunitaria en hongos patógenos humanos

Elvira Román, Rosalía Díez-Orejas, Rebeca Alonso-Monge y Jesús Pla

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España



De izquierda a derecha, V. Urrialde, AD. Prieto, B. Huertas, E. van de Plassche, I. Correia, E. Román, R. Díez Orejas, R. Alonso-Monge, J. Pla y C. Gómez-Pavón.

Nuestro grupo de trabajo lleva muchos años dedicándose al estudio de una levadura patógena del ser humano, *Candida albicans*. Este microorganismo forma parte de

nuestra microbiota, comportándose como un comensal, y tan solo en condiciones en las que se produce una alteración de las defensas del huésped, principalmente de tipo