

La transición hacia una Taxonomía bacteriana basada en el genoma

SYLVIA VALDEZATE Y PILAR VILLALÓN

Laboratorio de Referencia e Investigación en Taxonomía. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Carretera Pozuelo-Majadahonda Km 2.2. Madrid 28220, España (SPAIN).

✉ svaldezate@isciii.es | pvillalón@isciii.es

🌐 <https://orcid.org/0000-0002-3931-2162> | <https://orcid.org/0000-0003-3026-2178>



Figura 1. Composición actual del Laboratorio de Referencia e Investigación en Taxonomía en el Centro Nacional de Microbiología (campus de Majadahonda del Instituto de Salud Carlos III). De izquierda a derecha figuran Mónica Valiente (Técnico de laboratorio, Garantía Juvenil CAM), Noelia Garrido (Técnico de Laboratorio, Plan Nacional), Dra. Sylvia Valdezate (Investigador Científico de OPIs), María José Medina-Pascual (Técnico Superior Especializado de OPIs) y Dra. Pilar Villalón (Científico Titular de OPIs).

Desde su creación en 1996 por el Dr. Juan A. Sáez-Nieto, el Laboratorio de Taxonomía desarrolla actividades de diagnóstico, referencia e investigación en Taxonomía bacteriana. Se halla adscrito al Área de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología (CNM), ubicado en campus de Majadahonda del Organismo Público de Investigación (OPI) Instituto

de Salud Carlos III (<https://www.isciii.es/Paginas/Inicio.aspx>). Los laboratorios de microbiología clínica de hospitales públicos y privados, delegaciones territoriales de salud, departamentos universitarios y de otros centros de investigación envían cepas bacterianas y solicitan estudios de asignación taxonómica incluidos en la cartera de servicios del

CNM (https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2023-24829), o estudio de brotes, o de vigilancia microbiológica de estreptococos beta-hemolíticos (<https://cnm-laboratorios.isciii.es>).

Brevemente, las actividades realizadas son: i) la identificación feno- y genotípica de especies bacterianas productoras de

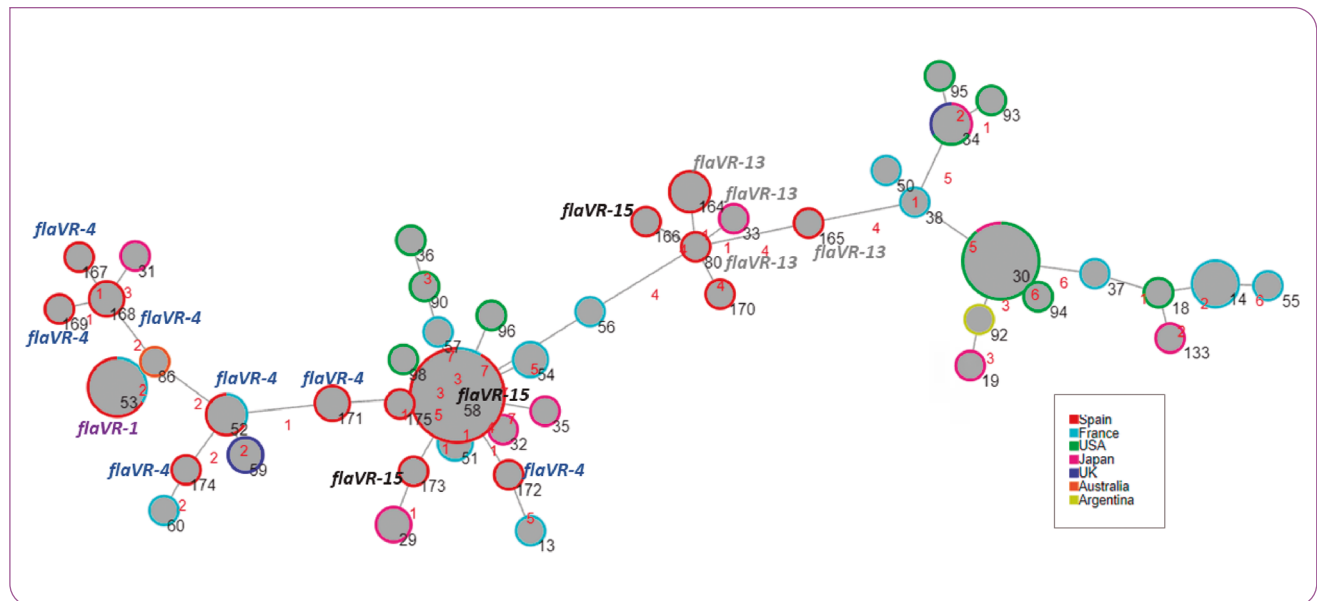


Figura 2. Relación genética mediante goe-BURST de los secuencio-tipos (STs) de *Clostridium botulinum* productores de neurotoxina BoNT/B en España, respecto a los STs BoNT/B detectados en otros países. La numeración en negro indica los STs, y en roja indica la distancia genética. Se incluye con su correlación con los tipos de flagelina (flaVR). Cortesía de Microbiology Spectrum. Valdezate S. et al (2023) Exploring the genetic background of the botulism neurotoxin BoNT/B2 in Spain. doi: 10.1128/spectrum.02380-23. Esta imagen se halla bajo la licencia del Creative Commons (CC-BY, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

patología humana emergentes, inusuales y de difícil identificación; ii) caracterización de brotes comunitarios y nosocomiales producidos por bacterias inusuales; iii) descripción de nuevas especies; iv) determinación de marcadores fenotípicos y moleculares de variabilidad, virulencia y resistencia a antimicrobianos en bacterias emergentes e inusuales; y v) el diagnóstico de botulismo en humanos. Nuestro grupo también integra el laboratorio de Referencia Nacional de estreptococos beta-hemolíticos, en el cual se desarrollan las siguientes actividades: vigilancia microbiológica de las cepas de *Streptococcus pyogenes* (SGA) y otros estreptococos beta-hemolíticos (grupos B, C y G), productores de cuadros invasivos; determinación de serotipos; susceptibilidad a los antibióticos utilizados para el tratamiento y control de la infección; detección de los principales factores de virulencia (exotoxinas superantigénicas) de las cepas circulantes.

Durante la última década, la identificación de bacterias de difícil asignación taxonómica se ha realizado en nuestro laboratorio mediante la aplicación de la Taxonomía Polifásica, con la utilización de pruebas bioquímicas y metabólicas junto a la detección y/o secuenciación de

genes con utilidad taxonómica (16S rDNA, *recA*, *gyrB*, *rpoB*, *secA*, entre otros), y con la detección de genes de virulencia (neurotoxinas de *Clostridium botulinum*, toxinas de *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*, entre otros). En estudio de poblaciones y en situaciones de brote, la identificación de genotipos se ha realizado mediante técnicas de PFGE "pulse-field gel electrophoresis", MLST "Multilocus Sequence Typing" y MLVA "Multilocus variable number tandem analysis". El estudio fenotípico y genotípico de la resistencia a antimicrobianos también ha constituido una actividad relevante, enfocándose a cocos y bacilos gram-positivos (*Enterococcus* spp. y actinomicetes) y a bacilos gram-negativos no fermentadores (*Acinetobacter* spp., *Burkholderia* spp., *Bruceella* spp., entre otros).

Hasta este momento, el 16S rADN ha sido el gen más utilizado para inferir relaciones evolutivas bacterianas y constituye la base principal para la taxonomía microbiana. Con alto grado de conservación de secuencia, proporciona una visión general de la diversidad microbiana y permite realizar estudios utilizando sitios de cebado en la reacción en la cadena de la polimerasa (PCR) casi universales. Al ser el gen marcador más exhaustivamente secuenciado, el depósito público

de secuencias del gen 16S rADN es el de mayor dimensión. Un problema subestimado es la formación de quimeras, que incrementan artificialmente las estimaciones de diversidad e introducen ruido en los árboles filogenéticos, comprometiendo en última instancia las clasificaciones taxonómicas. Las filogenias derivadas de genomas aislados y de la concatenación de genes codificantes de proteínas proporcionan filogenias menos susceptibles a artefactos quiméricos y proporcionan controles de integridad y de contaminación. Para proporcionar una continuidad taxonómica y corregir los numerosos errores los grupos polifiléticos (grupos formados por los descendientes de más de un ancestro se denominan polifiléticos) que existen actualmente en la taxonomía microbiana, se están dirigiendo esfuerzos en trasladar las clasificaciones basadas en 16S rADN a una taxonomía basada en el genoma completo. La "revolución genómica" ha transformado la taxonomía bacteriana, y este nuevo enfoque se está incorporando en la actividad de nuestro laboratorio.

La taxonomía basada en el genoma presenta grandes desafíos, como son disponer de bases de datos taxonómicas completas, genomas de referencia de

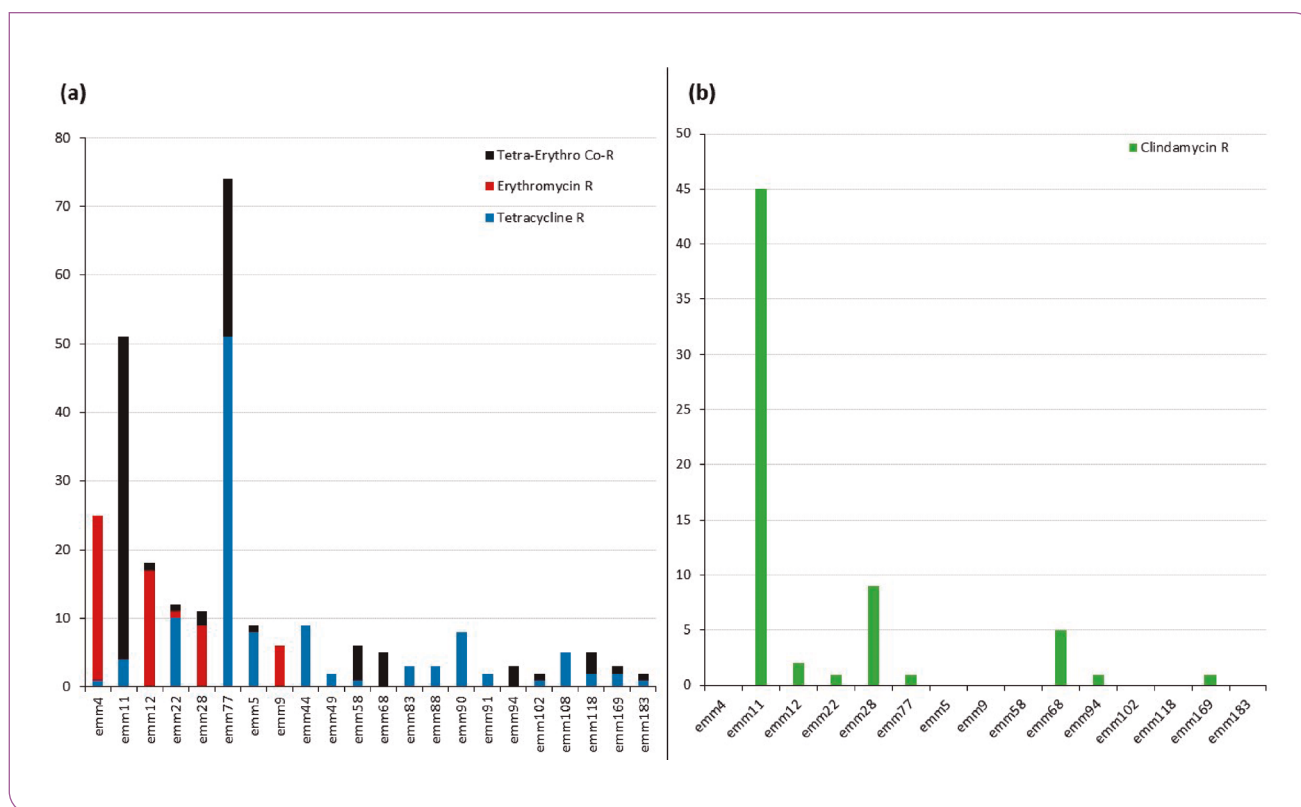


Figura 3. emm tipos de *Streptococcus pyogenes* resistentes a antibióticos, España 2007-2020. (a) emm-tipos resistentes a tetraciclina y eritromicina. (b) Resistencia a clindamicina en emm-tipos resistentes a eritromicina. Eje vertical = número de aislados. R, resistencia. Cortesía de Antibiotics. Villalón P. et al (2023). National surveillance of tetracycline, erythromycin, and clindamycin resistance in invasive *Streptococcus pyogenes*: a retrospective study of the situation in Spain, 2007-2020. doi: 10.3390/antibiotics12010099. Esta imagen se halla bajo la licencia del Creative Commons (CC-BY, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

calidad, y herramientas computacionales eficientes y de fácil uso para “explotar” datos genómicos y maximizar la resolución de asignaciones taxonómicas. Así también, el ensamblado de metagenomas y la amplificación simple de genomas recuperados de organismos no cultivados o sin asignación taxonómica con descripción de fillos candidatos. La aplicación simultánea de índices obtenidos por comparación de genomas entre la cepa de estudio y la cepa tipo y/o genoma referencia considerado como son: la identidad promedio de nucleótidos (ANI, <https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>); la hibridación DNA-DNA digital (dDDH) determinado mediante el método “Genome BLAST Distance Phylogeny” (GBDP); y la diferencia en el contenido de guanina y citosina (G+C) en porcentaje, permiten la delineación taxonómica (<https://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#>). Así si dos genomas bacterianos presentan valores de un ANI <95%, un

DDH <70% y una diferencia G+C >1%, pertenecen a especies distintas. Si los valores de estos marcadores taxonómicos son los complementarios, ambos genomas son identificados como pertenecientes a una misma especie. Aunque, el límite óptimo de ANI para definir las especies procarióticas sigue siendo una cuestión debatible ya que valores del 93% y el 96% definen una zona intermedia que podría reflejar relaciones tanto intraespecies como interespecies (ejemplo el punto de corte de ANI ≥95 % no resuelve especies estrechamente relacionadas como las del género *Enterobacter*). Así pues, esta perspectiva genómica permite el abordaje simultáneo de las tres disciplinas de la taxonomía – clasificación, nomenclatura e identificación – del dominio a la especie. Con un conocimiento más extensivo de los genomas bacterianos, un abaratamiento de los costes asociados y una simplificación del análisis, su implantación será factible.

La actividad e investigación desarrolladas en el laboratorio de Taxonomía se estructura en las siguientes líneas temáticas:

1. Caracterización taxonómica de nuevas especies implicadas en infección humana

Estudio de patógenos no adscritos a los géneros y/o especies existentes o no descritos hasta el momento como agentes etiológicos de infecciones en humanos, como son los pertenecientes a los fila, (α, β, γ) *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* y *Synergistetes*. Se realiza la descripción del nuevo género y especie *Saezia sanguinis* y de once nuevas especies del género *Paenibacillus*, así como el estudio de la participación de las diferentes especies del complejo *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii*

en episodios esporádicos de infecciones nosocomiales. De especial interés resulta el estudio genoma-taxonómico, del viruloma y del resistoma de especies del complejo *Burkholderia cepacia* en pacientes con fibrosis quística y de bacterias anaerobias de interés clínico, como *Bacteroides* del grupo *fragilis* con resistencia a betalactámicos, carbapenémicos y metronidazol y clostridios, entre otros.

2. Filogenia y susceptibilidad a antimicrobianos en *Nocardia* y géneros afines

La identificación de las especies prevalentes de actinomicetos, su caracterización intraespecífica mediante aproximaciones genéticas, genómicas y proteómicas junto al análisis feno/genotípico de la sensibilidad a antimicrobianos en estas poblaciones, ha proporcionado conocimientos novedosos sobre la infección humana por estos patógenos en nuestro país. Destacando la implicación de las especies *Nocardia cyriacigeorgica*, *Nocardia nova*, *Nocardia abscessus* y *Nocardia farcinica*, junto a *Gordonia sputi* y *Gordonia bronchialis* como principales agentes etiológicos y estableciéndose distintos linajes.

3. Diagnóstico clínico del botulismo humano y vigilancia microbiológica de la brucelosis humana

El botulismo es una enfermedad potencialmente mortal que se caracteriza por una parálisis flácida descendente simétrica que, si no se trata, puede provocar insuficiencia respiratoria y la muerte. La neurotoxina botulínica (BoNT) producida por ciertas especies de *Clostridium*, es la toxina biológica más potente conocida y la causa directa del botulismo. Se diferencian varias formas clínicas, siendo las principales: el botulismo transmitido por alimentos; el botulismo intestinal, que afecta normalmente a los lactantes; y el botulismo por heridas. En nuestro país, el laboratorio de Taxonomía bacteriana actúa como laboratorio de referencia en el diagnóstico del botulismo en humanos, que se produce principalmente por *Clostridium botulinum* BoNT/B.

La brucelosis es una zoonosis causada por diferentes especies de bacterias del género *Brucella*, que afectan a la gran mayoría de los mamíferos produciéndose casos graves. Las infecciones subclínicas

y no diagnosticadas son frecuentes. La principal especie implicada en humanos en nuestro país es *Brucella melitensis*, aunque su incidencia ha disminuido drásticamente gracias a los Programas Nacionales de Erradicación de la Brucelosis implantados en rumiantes desde 1996. En el laboratorio de Taxonomía se realizan la vigilancia microbiológica mediante caracterización genética/genómica de los clones.

4. Vigilancia microbiológica nacional del *Streptococcus pyogenes* (SGA) invasivo

El SGA causa un espectro amplio de infecciones invasivas graves, como la fascitis necrotizante y el síndrome del shock tóxico estreptocócico que se asocian a una mortalidad elevada. Ante la ausencia de una vacuna eficaz, la vigilancia constituye la mejor medida de prevención y control de la enfermedad. El laboratorio de Taxonomía desarrolla el Programa de Vigilancia microbiológica de las cepas que circulan en España. La caracterización de los aislados del SGA incluye la determinación del serotipo (gen *emm*), la detección de genes de exotoxinas y el análisis de resistencia a antimicrobianos. El estudio de brotes se realiza mediante secuenciación del genoma completo (WGS). La búsqueda de nuevo conocimiento sobre los serotipos más prevalentes del SGA constituye una de las líneas de investigación de nuestro equipo. Mediante el estudio -ómico (genómica y transcriptómica) y de la capacidad de evasión del sistema inmune queremos conocer las causas que condicionan la hipervirulencia y el desarrollo de los síndromes clínicos más graves, para ofrecer a la sociedad nuevos abordajes en la prevención y tratamiento de la enfermedad invasiva causada por esta bacteria.

Publicaciones seleccionadas (relacionadas con las líneas de investigación 1-4 descritas)

1.1 Medina-Pascual MJ, Valdezate S, Carrasco G, Villalón P, Garrido N, Sáez-Nieto JA (2015) Increase in isolation of *Burkholderia contaminans* from Spanish patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol Infect. ;21(2):150-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.07.014>

1.2 Sáez-Nieto JA, Medina-Pascual MJ, Carrasco G, Garrido N, Fernandez-Torres MA, Villalón P, Valdezate S (2017). *Paenibacillus* spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species. New Microbes New Infect. 24;19:19-27. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.05.006>

1.3 Villalón P, Ortega M, Sáez-Nieto JA, Carrasco G, Medina-Pascual MJ, Garrido N, Valdezate S (2019). Dynamics of a Sporadic Nosocomial *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex Population. Front Microbiol. 22;10:593. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00593>

1.4 Medina-Pascual MJ, Monzón S, Villalón P, Cuesta I, González-Romo F, Valdezate S (2020). *Saezia sanguinis* gen. nov., sp. nov., a *Betaproteobacteria* member of order *Burkholderiales*, isolated from human blood. Int J Syst Evol Microbiol.70:2016-25. doi: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004010>

1.5 Cobo F, Medina MJ, Navarro-Marí JM, Valdezate S (2021). First isolation in Spain of *Paracoccus sanguinis* in blood cultures. Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed). 39(7):359-360. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2020.09.002>. PMID: 34353517.

1.6 Valdezate S, Cobo F, Monzón S, Medina-Pascual MJ, Zaballos Á, Cuesta I, Pino-Rosa S, Villalón P (2021). Genomic Background and Phylogeny of *cfiA*-Positive *Bacteroides fragilis* Strains Resistant to Meropenem-EDTA. Antibiotics (Basel). 16;10(3):304. doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030304>

1.7 Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Villalón P, Garrido N, Monzón S, Cuesta I, Cobo F (2024). Co-occurrence of the cephalosporinase *cepA* and carbapenemase *cfiA* genes in a *Bacteroides fragilis* division II strain, an unexpected finding. J Antimicrob Chemother. 6. doi: 10.1093/jac/dkae166. Epub ahead of print. PMID: 38814812.

2.1 Valdezate S, Garrido N, Carrasco G, Villalón P, Medina-Pascual MJ, Sáez-Nieto JA (2015). Resistance gene pool to co-trimoxazole in non-susceptible *Nocardia* strains. Front Microbiol. 2015 Apr 28;6:376. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00376>. PMID: 25972856; PMCID: PMC4412068.

➤ **2.2 Carrasco G, de Dios Caballero J, Garrido N, Valdezate S, Cantón R, Sáez-Nieto JA** (2016). Shortcomings of the Commercial MALDI-TOF MS Database and Use of MLSA as an Arbiter in the Identification of *Nocardia* Species. *Front Microbiol.* 21;7:542. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00542>

➤ **2.3 Valdezate S, Garrido N, Carrasco G, Medina-Pascual MJ, Villalón P, Navarro AM, Saéz-Nieto JA** (2017). Epidemiology and susceptibility to antimicrobial agents of the main *Nocardia* species in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 1;72(3):754-761. doi: <https://doi.org/10.1093/jac/dkw489>

➤ **2.4 Carrasco G, Monzón S, San Segundo M, García E, Garrido N, Medina-Pascual MJ, Villalón P, Ramírez A, Jiménez P, Cuesta I, Valdezate S** (2020). Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibilities of *Nocardia* Species Isolated from the Soil; A Comparison with Species Isolated from Humans. *Microorganisms.* 15;8(6):900. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060900>

➤ **2.5 Sáez-Nieto JA, Carrasco G, Pino SD, Medina-Pascual MJ, Garrido N, Villalón P, Valdezate S** (2021). Identification and antimicrobial susceptibility of *Streptomyces* and other unusual Actinobacteria clinical isolates in Spain. *New Microbes New Infect.* 13;44:100946. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2021.100946>

➤ **2.6 Pino-Rosa S, Medina-Pascual MJ, Carrasco G, Garrido N, Villalón P, Valiente M, Valdezate S** (2023). Focusing on *Gordonia* Infections: Distribution, Antimicrobial Susceptibilities and Phylogeny. *Antibiotics* (Basel).

26;12(11):1568. doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111568>

➤ **3.1 Pelerito A, Nunes A, Grilo T, Isidro J, Silva C, Ferreira AC, Valdezate S, Nuncio MS, Georgi E, Gomes JP** (2021). Genetic Characterization of *Brucella* spp.: Whole Genome Sequencing-Based Approach for the Determination of Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Profiles. *Front Microbiol.* 12;12:740068. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.740068>

➤ **3.2 Peñuelas M, Guerrero-Vadillo M, Valdezate S, Zamora MJ, Leon-Gomez I, Flores-Cuellar Á, Carrasco G, Díaz-García O, Varela C** (2022). Botulism in Spain: Epidemiology and Outcomes of Antitoxin Treatment, 1997-2019. *Toxins* (Basel). 20;15(1):2. doi: <https://doi.org/10.3390/toxins15010002>

➤ **3.3 Valdezate S, Carrasco G, Medina MJ, Garrido N, Del Pino S, Valiente M, Pallarés MP, Villalón P** (2023). Exploring the genetic background of the botulism neurotoxin BoNT/B2 in Spain. *Microbiol Spectr.* Sep 26;11(5):e0238023. doi: <https://doi.org/10.1128/spectrum.02380-23>

➤ **4.1 Villalón P, Sáez-Nieto JA, Rubio-López V, Medina-Pascual MJ, Garrido N, Carrasco G, Pino-Rosa S, Valdezate S** (2021). Invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Spain: a microbiological and epidemiological study covering the period 2007-2019. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021 Nov;40(11):2295-2303. doi: <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04279-2>

➤ **4.2 Villalón P, Bárcena M, Medina-Pascual MJ, Garrido N, Pino-Rosa S, Carrasco G, Valdezate S** (2023).

National Surveillance of Tetracycline, Erythromycin, and Clindamycin Resistance in Invasive *Streptococcus pyogenes*: A Retrospective Study of the Situation in Spain, 2007-2020. *Antibiotics* (Basel). 6;12(1):99. doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010099>

➤ **4.3 Bellés-Bellés A, Prim N, Saray Mormeneo, Villalón-Panzano P, Valiente-Novillo M, Jover-Sáenz A, Aixalà N, Bernet A, López-González E, Prats I, García-González M** (2023). Changes in group A *Streptococcus emm* types associated with invasive infections in adults, Spain, 2023. *Emerg Infect Dis* 29: 2390-2392. doi: <https://doi.org/10.3201/eid2911.230857>

➤ **4.4 Ramírez de Arellano E, Saavedra-Lozano J, Villalón P, Jové-Blanco A, Grandioso D, Sotelo J, Gamell A, González-López JJ, Cervantes E, González MJ, Rello-Saltor V, Esteva C, Sanz-Santaeufemia F, Yagüe G, Manzanares Á, Brañas P, Ruiz de Gopegui E, Carrasco-Colom J, García F, Cercenado E, Mellado I, Del Castillo E, Pérez-Vazquez M, Oteo-Iglesias J, Calvo C; Spanish PedGAS-Net/CIBERINFEC GAS Study Group** (2024). Clinical, microbiological, and molecular characterization of pediatric invasive infections by *Streptococcus pyogenes* in Spain in a context of global outbreak. *mSphere.* 5:e0072923. doi: <https://doi.org/10.1128/msphere.00729-23>

.....