

Mezclando churras con merinas: patógenos humanos con patógenos de peces

Sara Remuzgo-Martínez¹, María Lázaro-Díez¹, Ana Franco González-de-Canales¹,
Felix Acosta², Daniel Padilla² y José Ramos-Vivas^{1*}

¹Laboratorio de Microbiología Celular, Instituto IDIVAL, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, ²Instituto Universitario de Sanidad Animal, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Arucas, Gran Canaria. *jvivas@idival.org

En este artículo os contamos cómo gracias al trabajo con un patógeno humano *Acinetobacter baumannii*¹ hemos conseguido descubrir varios aspectos novedosos de la biología del patógeno de peces Gram negativo *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Pdsp*), antiguamente conocido como *Pasteurella piscicida*². Queremos hacer énfasis en varios conceptos: la mezcla de ideas provenientes de campos de investigación distintos, la importancia de leer artículos no exclusivamente del propio tema de trabajo, y la colaboración entre grupos que en algunos casos no tienen conexión aparente debido a sus respectivas áreas de trabajo.

Mi grupo trabaja en un hospital y por lo tanto se centra en el estudio de patógenos bacterianos humanos. Como antiguamente —durante mi Tesis Doctoral— había trabajado en vacunas de peces y con patógenos de acuicultura, tengo en ese campo muchos conocidos. Entre los «ictiopatólogos» que conozco, algunos trabajan en las Islas Canarias. Son amigos y colaboradores que recientemente hicieron una visita a nuestro laboratorio. Algunos patógenos de importancia veterinaria causan también zoonosis importantes, por lo que nuestra colaboración se extiende a varios patógenos humanos y animales, y dura ya muchos años. En esa ocasión en concreto, trabajamos juntos con unas cepas de *Photobacterium* para infectar células de pez *in vitro* y hacer fotos en nuestros microscopios. *Pdsp* suele tener un aspecto redondeado, cocobacilar, muy fácilmente reconocible al microscopio. Pero algunas fotos de inmunofluorescencia fueron descartadas debido a lo que tenía pinta de ser una contaminación con otra bacteria. Tenían unas cosas «muy raras». Afortunadamente no eliminamos definitivamente aquellas fotos, sino que las guardamos en una carpeta del ordenador con el nombre «que XXXX es esto», que cayó en el olvido (Figura 1).

Meses más tarde, estábamos trabajando con el patógeno humano *Acinetobacter baumannii*, que trae de cabeza a muchos hospitales, ya que está entre los 6 microorganismos multirresistentes más peligrosos^{3,4}.

Nos encontrábamos estudiando los distintos apéndices superficiales que posee *Acinetobacter baumannii* en una



Figura 1. Carpeta inicial donde guardamos las fotos de inmunofluorescencia que nos hicieron pensar que lo que estábamos viendo era una contaminación con una cepa que tenía grandes fimbrias. Aquello nos cabreó mucho y dejamos de hacer fotos, pues las bacterias con apéndices superficiales no se parecían en nada a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

colección de cepas humanas aisladas en nuestro hospital. En concreto, una de las pruebas que se suele realizar para detectar estructuras superficiales en bacterias Gram negativas es determinar si éstas tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos humanos. Por ejemplo, cuando una bacteria expresa fimbrias de tipo I o similares, normalmente posee la capacidad de aglutinar eritrocitos humanos, y este fenómeno se puede observar simplemente mezclando una cantidad de bacterias con una cantidad de eritrocitos frescos⁵. En este sentido, algunas de nuestras cepas de *Acinetobacter* producían una aglutinación positiva de los eritrocitos humanos (Figura 2a). *Acinetobacter* se clasifica taxonómicamente como «no móvil» ya que no posee flagelos y por lo tanto no posee un movimiento bacteriano rápido clásico. De hecho, su nombre viene del latín *akinetos* «sin movimiento» y *bactrum* «varilla». Sin embargo «se desliza» sobre superficies sólidas gracias a que expresa y utiliza unos apéndices superficiales denominados pili o fimbrias, produciendo además algunas formas muy vistosas (Figura 3a)⁶. Algunas de las fimbrias que producen son de gran tamaño (Figura 4a). Además, esta «mala bestia» tiene una gran facilidad para formar biocapas (biopelículas o biofilms) en superficies sólidas (Figura 5a)⁷. En esos días que trabajábamos con *Acinetobacter*, mis amigos de Canarias me volvieron a llamar para que hiciera más fotos de *Pdsp*, con lo que disponíamos de cultivos frescos en placa. Según la escasa literatura existente sobre los ensayos para determinar la presencia de fimbrias en *Pdsp*, este patógeno no

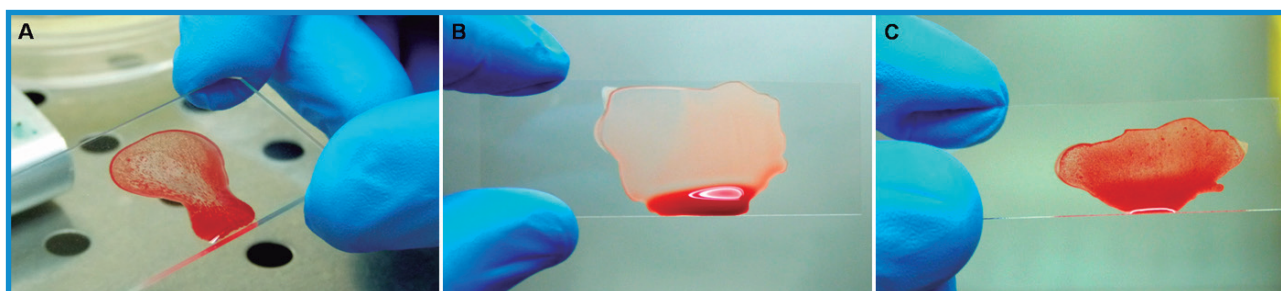


Figura 2. Aglutinación de eritrocitos humanos. A, *Acinetobacter*; B, cepa de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* que no producía aglutinación; C, cepa positiva de *Pdsp*, la n.º 5, que sí producía una aglutinación clara de eritrocitos humanos.

aglutina eritrocitos de varias especies de peces, que son sus hospedadores y víctimas habituales. Tampoco parece aglutinar eritrocitos de rata o de ratón, ni de conejos, caballos o pollos. Pero, ¿y de humanos? Al estar realizando aglutinaciones con cepas de *Acinetobacter*, disponíamos de sangre humana del grupo A⁺, por lo que decidimos utilizar las 5 cepas de *Pdsp* que teníamos en placa para «probar suerte». Con las cuatro primeras cepas no sucedió nada, el mismo resultado que en un control negativo (Figura 2b). Pero la quinta cepa produjo una aglutinación perfecta (Figura 2c). Y ahí saltó la alarma. Muy posiblemente esa cepa poseía fimbrias o pili similares a las fimbrias de tipo I de bacterias Gram negativas.

Al tiempo que estábamos probando la sangre con *A. baumannii*, realizábamos fotografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Decidimos entonces realizar una tinción negativa con ácido fosfotúngstico de las cepas de *Pdsp*, incluso de las que no aglutinaban eritrocitos, ya que un resultado negativo en la aglutinación de eritrocitos solo implica que posiblemente no se expresen fimbrias similares a las de tipo I, pero esta prueba no descarta la presencia de otro tipo de fimbrias bacterianas (y hay muchas...). Y ahí saltó la alarma otra vez, utilizando TEM, vimos que todas las cepas de *Pdsp* poseían fimbrias, incluso algunas de gran tamaño, como ocurría en *A. baumannii* (Figura 4b).

La siguiente pregunta que nos hicimos fue ¿para qué puede *Pdsp* utilizar estas fimbrias? Evidentemente podría utilizarlas como factores de patogenicidad, pero volvimos a pensar en *A. baumannii*. *A. baumannii* es una bacteria no móvil, como *Pdsp* (ya que no poseen flagelos), pero el patógeno humano posee un movimiento característico de las bacterias que se desplazan sobre superficies sólidas utilizando un pilus de tipo IV. Por lo tanto, decidimos realizar pruebas de movilidad sobre superficies sólidas con las cepas de *Pdsp*. ¡Y saltó la alarma otra vez! *Pdsp* es una bacteria no móvil que se «desplaza» sobre superficies sólidas (Figura 3b). La secuencia lógica era seguir buscando similitudes entre el patógeno humano y el de peces, a pesar de que no debería haber mucha correlación entre ambos, debido a su diferente ecobiología. *A. baumannii* es capaz de formar biopelículas. En *Pdsp* estas estructuras no habían sido descritas, por lo que nos pusimos a ello. Descubrimos que *Pdsp* es capaz no solo de desplazarse sobre superficies sólidas sino también de formar biopelículas (Figura 5b). Estas biopelículas las forman comunidades bacterianas complejas adheridas a una superfi-

cie, ampliamente distribuidas en la naturaleza, y tienen gran importancia desde muchos puntos de vista^{8,9}.

Así, de mezclar lo que sabíamos del patógeno humano, con lo que había en la literatura sobre el patógeno de peces, pudimos descubrir y caracterizar parcialmente diferentes aspectos de este último. Creemos que estos pequeños descubrimientos pueden abrir el camino a investigaciones con este patógeno de peces sobre la caracterización de esas fimbrias, sobre los factores ambientales que pueden influir en su desplazamiento sobre superficies sólidas y sobre su ecobiología, o cómo podría ser capaz de sobrevivir en ambientes marinos formando biocapas. Además, hemos extraído varias conclusiones que pueden ser útiles a nuestros doctorandos. Una de ellas es que debimos fiarnos más de resultados preliminares, como nuestras inmunofluorescencias iniciales —antes de desecharlas rápidamente por parecer en algunos casos contaminaciones— pues posteriormente comprobamos que eran en realidad un fiel reflejo de la pureza de los cultivos, ya que nuestro anticuerpo reconocía muy específicamente todas las cepas de *Pdsp*. Es difícil que hubieran sido contaminaciones, aunque nunca se hubieran observado fimbrias en esta especie. El que otros no hayan descubierto algo no implica que sea un dogma, sobre todo conociendo la diversidad genotípica y fenotípica de las bacterias Gram negativas. Muchas observaciones científicas se engendran como aparentemente inútiles durante el primer momento de su contemplación y

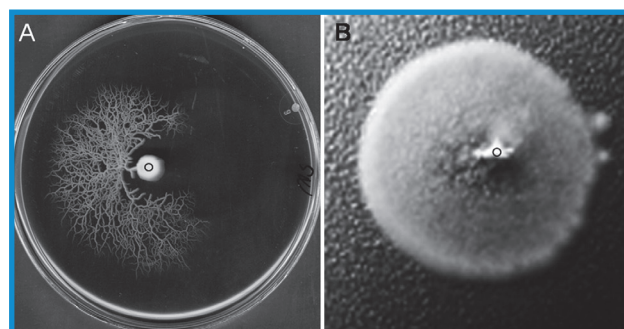


Figura 3. Movilidad entre la parte inferior del agar y el plástico de una placa de Petri de una cepa de *Acinetobacter* (A) y una de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (B). El punto de inoculación vertical se señala con un círculo (en el centro de la placa).

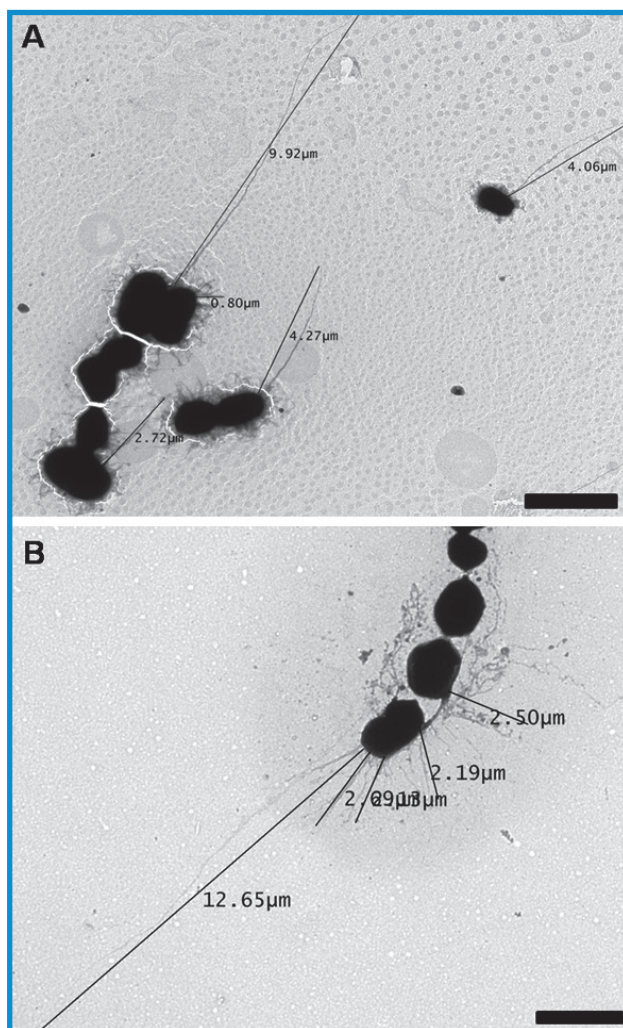


Figura 4. Tinción negativa para microscopía electrónica de transmisión de cepas de *Acinetobacter* (A) y de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (B) donde se pueden apreciar fimbrias de diferentes tamaños. Magnificación original: $\times 5000$. Las barras de escala indican $2.5\mu\text{m}$.

necesitan de otras aportaciones propias o ajenas para que su significado sea desvelado. En otros casos, las ideas surgen de la mezcla de componentes de dos áreas científicas muy diferentes. Aunque de primera mano *Acinetobacter* y *Photobacterium* no tengan mucho que ver, hemos detectado que comparten muchas similitudes fenotípicas.

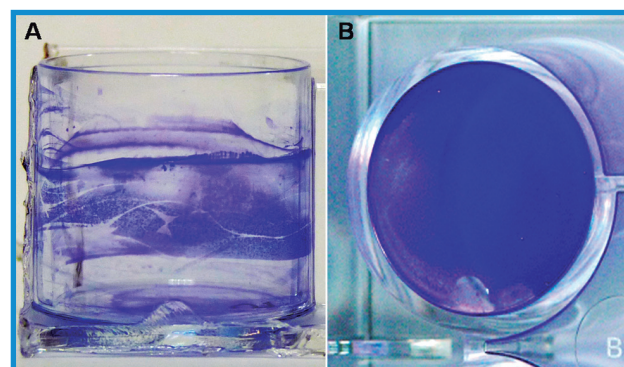


Figura 5. Tinción con cristal violeta de biocapas formadas *in vitro* por *Acinetobacter* (A) y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (B). *Acinetobacter* forma biocapa principalmente en la pared de los pocillos y *Pdsp* en la base.

Ahora nos toca —o a otros— buscar las implicaciones en la ecología y patogénesis que tienen estos nuevos aspectos biológicos de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

REFERENCIAS

1. Antunes LC, Visca P, Towner KJ. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis.* 71:292-301.
2. Romalde JL. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *Int Microbiol.* 5:3-9.
3. Vila J, Pachón J. (2012). Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections: an update. (2012). *Expert Opin Pharmacother.* 13:2319-36.
4. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. (2012). *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence.* 3:243-50.
5. Evans DG, Evans DJ Jr, Tjoa W. (1977). Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect Immun.* 18:330-7.
6. Eijkelkamp BA, Stroeher UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT, Brown MH. (2011). Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 323:44-51.
7. Longo F, Vuotto C, Donelli G. (2014). Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol.* 37:119-27.
8. Kolter R. (2010). Biofilms in lab and nature: a molecular geneticist's voyage to microbial ecology. *Int Microbiol.* 13:1-7.
9. Nadell CD, Xavier JB, Foster KR. (2009). The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev.* 33:206-24.