

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN
MICROBIOLOGÍA**

JORNADA CIENTÍFICA 2023/24
29 de mayo de 2024

JORNADA CIENTÍFICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN MICROBIOLOGÍA

29 DE MAYO DE 2024

10. Rafael Rivilla. Apertura de la Jornada

Sesión I. Microbiología Ambiental, Fisiología y Biotecnología Microbiana. Moderadora Francisca Fernández Piñas.

10.15 Adrián Martínez Bonilla. Oxidación de hierro en el subsuelo de la Faja Pirítica Ibérica.

10.30 Jesús Laborda Mansilla. Reconstrucción de Secuencias Ancestrales y Evolución Dirigida, estrategias complementarias en la mejora de PET hidrolasas.

10.45 Juan Rivas-Santisteban. The concept of the *guild* as a quantitative lens for understanding microbial functional ecology.

11. 00. Sofía de Francisco Polanco. Biotechnological approaches to establish a sustainable cycle in plastic management.

Sesión II. Microbiología Clínica y Patógenos. Moderadora Catalina Ribas.

11.15 Marta Martín García. Estudio de la adherencia bacteriana y la formación de *biofilm* de especies bacterianas clínicamente relevantes sobre la superficie de una aleación de CoCrMo anodizada.

11.30 Patricia Mingo-Casas. Within host bioenergetics: potential therapeutic targets during West Nile virus infection.

11.45. Descanso

12.00 Guillermo Santamaría Corral. Terapia con bacteriófagos frente a cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*.

12.15 Ana Valadés Alcaraz. Diseño y caracterización de aptámeros para el diagnóstico precoz del VIH empleando nuevas tecnologías.

12.30. Antonio Broncano Lavado. Tratamiento in vitro de biofilms de *Mycobacterium abscessus* con combinaciones de antibióticos y bacteriófagos.

12.45 Juan Antonio del Castillo Polo. Caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos de Enterobacteriales resistentes a cefiderocol y/o ceftazidima-avibactam.

13.00 Luis Jiménez-Cabello. IFNAR(-/-) Mice Constitutes a Suitable Animal Model for Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Study and Vaccine Evaluation.

13.15. Clausura.

Oxidación de hierro en el subsuelo de la Faja Pirítica Ibérica

Adrián Martínez Bonilla

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM, CSIC – UAM)

amartinez@cbm.csic.es

Río Tinto (Huelva, España) es un ambiente extremo caracterizado por su bajo pH (2.3) y su elevada concentración de metales en solución. Nace en Peña de Hierro, en el corazón de la Faja Pirítica Ibérica (FPI), el mayor depósito de sulfuros metálicos del planeta, siendo la pirita el mayoritario (FeS_2). Actualmente, se hipotetiza que su origen es debido a la actividad de los microorganismos que habitan el subsuelo de la FPI. Éstos podrían estar llevando a cabo la oxidación del Fe^{2+} dependiente de nitrato (NDFO por sus siglas en inglés), lo que produciría Fe^{3+} , el principal oxidante de la pirita. Como consecuencia, se liberarían Fe^{2+} y ácido sulfúrico, dando lugar a las características del río.

Para demostrar esta hipótesis, en primer lugar, se aislaron microorganismos que potencialmente pudieran hacer la NDFO a partir de muestras procedentes del subsuelo de la FPI en condiciones anaerobias estrictas. A continuación, se hizo un screening de todos los microorganismos aislados previamente en el laboratorio y en este trabajo para identificar cuáles son capaces de realizar este metabolismo.

Una vez realizada esta identificación, se procedió a estudiar el efecto de minerales sobre dicho proceso. Para ello, se llevaron a cabo los experimentos en presencia de minerales que contuvieran Fe^{2+} (pirita), Fe^{3+} (hematita) o sin hierro (cuarzo), todos ellos presentes en el subsuelo de la FPI, así como muestras naturales procedentes de los testigos geológicos. Estos experimentos han demostrado que los minerales pueden afectar de forma positiva o negativa a este proceso y que las muestras naturales parecen favorecerlo al tamponar la acidificación que lleva asociada este metabolismo.

Reconstrucción de Secuencias Ancestrales y Evolución Dirigida, estrategias complementarias en la mejora de PET hidrolasas.

Jesús Laborda Mansilla¹, Ivan Mateljak², Valeria A Risso³, José Luis González¹, Mikel Dolz¹, Jose M Sanchez-Ruiz³, Miguel Alcalde¹, Eva Garcia-Ruiz¹

1. Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Madrid, España
2. EvoEnzyme S.L. Parque Científico de Madrid, Madrid, España
3. Departamento de Química Física, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada

El tereftalato de polietileno (PET) es un poliéster versátil y de bajo coste que se ha convertido en un elemento clave en la sociedad moderna, ampliamente utilizado en diversas aplicaciones, como botellas, embalajes y fibras textiles. Sin embargo, las limitaciones en el sistema de reciclaje actual conducen a su acumulación en vertederos y océanos, tanto del PET, como de otros plásticos, representando una amenaza para los ecosistemas y la salud pública.

Este estudio se enfoca en la optimización de un biocatalizador para la degradación eficiente del PET en sus monómeros (Ácido Tereftálico (TPA) y Etilenglicol (EG)), ofreciendo así una alternativa más respetuosa con el medio ambiente que los sistemas de reciclaje convencionales.

Nuestro planteamiento combina dos estrategias. En primer lugar, se empleó la Reconstrucción de Secuencias Ancestrales (ARS) para el diseño de nuevas enzimas, tomando como referencia la secuencia de la PET hidrolasa moderna de *Ideonella sakaiensis* para inferir hipotéticas secuencias de hidrolasas ancestrales. Esto nos permite crear enzimas con estructuras similares a la PET hidrolasa, pero con cambios significativos en la secuencia de aminoácidos, lo que podría resultar en mejoras en la actividad o de algunas de sus propiedades fisicoquímicas.

Tras la producción de una hipotética enzima ancestral funcional se implementó una estrategia de evolución dirigida para la mejora de la actividad, con dicho propósito se desarrolló un protocolo de cribado masivo, *High through put screening* (HTPS) para identificar mutantes con una mayor capacidad de degradación del PET. Finalmente, caracterizamos parcialmente los mutantes obtenidos durante el proceso de evolución dirigida.

Esta combinación de ARS y evolución dirigida nos permite por un lado identificar regiones conservadas en la estructura de enzimas similares a la PET hidrolasa, así como detectar mutaciones no descritas que podrían mejorar la actividad hidrolasa frente al PET.

The concept of the *guild* as a quantitative lens for understanding microbial functional ecology

Juan Rivas-Santisteban, Pablo Yubero, Semidán Robaina-Estévez, José M. González, Javier Tamames, Carlos Pedrós-Alió

Microbiome Analysis Laboratory, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC

Microbes represent an immense functional reservoir. The study of microbial functional ecology is crucial to further understanding of evolution and biogeochemical processes. However, there are two fundamental challenges in this regard: i) protein sequence similarity does not faithfully capture function and ii) taxonomy may not be synonymous with function. The guild concept has been used in various manners when attempting to explain microbial ecology, albeit unsuccessfully because of its qualitative semantics developed for fauna and flora. Here we propose a conceptual revision of the ecological guild, in order to make it quantitatively applicable to any organism¹. Furthermore, we develop a method to apply the quantification of microbial guilds to omics data, so that we can purge the space of truly functional sequences by phylogenetic placements, as well as determine the degree of diversification. We test the utility of the new quantitative guild framework in both oceanic and high deuterium microbiomes.

References:

¹ Rivas-Santisteban, J., Yubero, P., Robaina-Estévez, S., González, J. M., Tamames, J., & Pedrós-Alió, C. (2024). [Quantifying microbial guilds](#). *ISME Communications*, 4(1), ycae042.

Biotechnological approaches to establish a sustainable cycle in plastic management.

Sofia de Francisco

Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, Madrid

Environmental Microbiology Group

Plastics play a crucial role in our daily lives, but they continue to pose significant environmental and health concerns. To address these issues, strategies towards enhancing recyclability and embracing alternative bioplastics derived from renewable sources are urgently needed. The production of aromatic dicarboxylic acids commonly used in plastic production, e.g. terephthalic acid, still depends on fossil resources. Sustainable plastic production using bio-based monomers, e.g. pyridinedicarboxylic acids (PDCAs), has the potential of replacing petrochemical phthalates for polyester synthesis, improving biodegradability and end-of-life options.

3-amino-4-hydroxybenzoic acid (AHBA) is a metabolic intermediate in grixazone biosynthesis within certain *Streptomyces* strains. The GriI enzyme catalyzes an aldol condensation reaction between L-aspartate-4-semialdehyde (ASA) and dihydroxyacetone phosphate (DHAP), while GriH converts the resulting C7 metabolite in AHBA through a cyclization reaction. Therefore, an aromatic amine is biosynthesized in just two enzymatic steps in a shikimate pathway independent fashion, thus not competing with other products of this route such as aromatic amino acids, folates or quinones. In this thesis, we have successfully achieved and optimized the bioproduction of AHBA from renewable feedstocks in the model platform bacterium *Pseudomonas putida* KT2440 by using systems metabolic engineering approaches.

The main goal of the project is to design and build an efficient biocatalyst for PDCAs production from AHBA. For this purpose, new-to-nature enzymatic activities are being developed using protein engineering and evolutionary approaches. Two strategies are being pursued. First, we aim to engineer dioxygenases that could act upon AHBA, thereby cleaving the aromatic ring and allowing the spontaneous cyclization into 2,4-PDCA. Alternatively, we are engineering deaminases to replace the amine group of AHBA with a hydroxyl group, therefore yielding protocatechuic acid, which can subsequently be transformed into 2,4-PDCA using the well-established LigAB dioxygenase.

Estudio de la adherencia bacteriana y la formación de *biofilm* de especies bacterianas clínicamente relevantes sobre la superficie de una aleación de CoCrMo anodizada

Marta Martín García

Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz.

Introducción: Las infecciones de prótesis articular (IPA) representan una complicación poco frecuente, pero con una alta morbilidad y altos costes asociados, tanto económicos como sociales. Aunque *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* son los patógenos más frecuentemente asociados a las IPA, en la actualidad, las bacterias gramnegativas están ganando relevancia. Una de las aleaciones más utilizadas en la fabricación de prótesis articulares es la aleación de cobalto-cromo-molibdeno (CoCrMo). Existen diversas estrategias en la fabricación de materiales para disminuir el riesgo de IPA, entre ellas la modificación de la superficie mediante anodizado, sin embargo, esto aún no se ha aplicado sobre la aleación de CoCrMo. El objetivo de este estudio fue comparar la adherencia de *S. aureus* ATCC29213, *S. epidermidis* ATCC35984, *E. coli* ATCC25922 y *P. aeruginosa* ATCC27853 entre dos acabados superficiales diferentes: un acabado pulido a espejo y uno anodizado. En una segunda fase se evaluó la formación de *biofilm* de *S. aureus* AH176 y *S. epidermidis* ATCC35984 sobre ambas superficies.

Material y métodos: Todas las muestras fueron pulidas mecánicamente hasta acabado espejo. Posteriormente algunas de ellas fueron anodizadas durante 60 minutos a voltaje constante en un baño acuoso con NH_4F (pH=6.2) a temperatura ambiente. El ensayo de biofilm fue precedido por una adherencia inicial siguiendo la metodología descrita previamente por Aguilera-Correa *et al.* (Appl Environ Microbiol. 2019 Jan 9; 85 (2): e02271-18) con una incubación de 90 minutos.

Resultados: La adherencia bacteriana fue significativamente menor en un 25.6%, 27.9%, 37.8% y 59.3% en las muestras anodizadas respecto a la superficie de control para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, respectivamente. Se encontró también una disminución significativa ($p < 0.0001$) de la formación de *biofilm* en el anodizado de las cepas estudiadas, observándose una reducción del 26 % y 23,4% para *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Within host bioenergetics: potential therapeutic targets during West Nile virus infection

Patricia Mingo-Casas^{(1)*}, Ana-Belén Blázquez*, Marta Gómez de Cedrón, Ana San-Félix, Susana Molina, Estela Escribano-Romero, Eva Calvo-Pinilla, Nereida Jiménez de Oya, Ana Ramírez de Molina, Juan-Carlos Saiz, María-Jesús Pérez-Pérez, Miguel A Martín-Acebes

*Equally contributed to this work.

(1) *Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC), Madrid, Spain*

Background. West Nile virus (WNV) is a medically relevant neurotropic flavivirus transmitted by the bites of infected *Culex sp* mosquitoes and it is widely distributed across Europe. Severe forms of West Nile disease (WND) can cause meningitis, encephalitis or even death. In 2020, WNV caused an outbreak in southwest Spain that ended up with 70 human infections and 8 deaths. There are no vaccines or specific drugs to prevent and treat the symptoms of WND in humans, so the search for novel targets for therapeutic interventions is mandatory. Viral rewiring of host bioenergetics may represent a therapeutical target against flaviviral infections. **Methods.** To identify potential changes on host bioenergetics during WNV infection, we performed both a literature search and meta-analysis review for glucose rate in human patients infected with WNV. Real-time measurement of oxygen consumption and extracellular acidification rate in WNV infected cell cultures were monitored using the Seahorse XFe extracellular flux analyzer. *In vitro* viral infection was performed to evaluate the effect of the hexokinase inhibitors sodium oxamate and 2-deoxy-D-glucose (2-DG) or the pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitor sodium dichloroacetate (DCA). Experimental infection in mice with WNV and transcriptomic analyses were performed to identify the key metabolic processes upregulated in brain during WNV infection. The effect of treatment with 2-DG or DCA up to day 6 post-infection was also evaluated *in vivo*. **Results.** Our results from the meta-analysis showed a dysregulation of glucose homeostasis in the central nervous system of WNV-infected patients. Real-time bioenergetic analyses confirmed the upregulation of aerobic glycolysis and a reduction of mitochondrial oxidative phosphorylation during viral replication *in vitro*. Transcriptomics analyses in brain from experimentally infected mice also showed a glycolytic reprogramming combining the upregulation of hexokinases 2 and 3 and pyruvate dehydrogenase kinase 4. Finally, treatment of WNV-infected mice with the Hk inhibitor 2-DG and the Pdk4 inhibitor DCA, showed a reduction in WNV-induced neuroinflammation.

Conclusions. Our results highlight the relevance of host bioenergetic metabolism and specifically glycolysis during WNV infection *in vivo*, providing new opportunities for the development of therapeutic approaches based on glycolytic pathway druggability.

Terapia con bacteriófagos frente a cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*

Guillermo Santamaría Corral

Instituto de Investigación Sanitaria – Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD)

Pseudomonas aeruginosa is one of the major opportunistic pathogens causing a wide range of acute infections, including wound and burn infections among others. *P. aeruginosa* is one of the most important and frequent wound- and burn-colonizing pathogens that, due to various virulence factors and alteration of the host immune system, causes extensive tissue damage and non-scarring wounds. Moreover, apart from its high innate resistance, *P. aeruginosa* can develop resistance to almost all available antimicrobials. Another of its main characteristics is the ability to form biofilms. Due to the lack of adequate and effective treatments, new therapeutic strategies against *P. aeruginosa* multidrug-resistant (MDR) strains are being sought, with bacteriophage or phage therapy being one of the most promising therapeutic alternatives nowadays. The combination of bacteriophages with antibiotics (including β -lactams) is associated with a greater antibacterial effect, greater penetration into the biofilm and less selection of resistance to antibiotics and bacteriophages. The current PhD thesis aims to: isolate and characterize in vitro a new bacteriophage capable of infecting *P. aeruginosa* MDR clinical strains; determine the anti-biofilm effect against *P. aeruginosa* MDR clinical strains of the bacteriophage alone and in combination with β -lactam antibiotics; and to determine the preventive and inhibitory effect of the bacteriophage alone and the combined treatment with a β -lactam antibiotic on *P. aeruginosa* MDR strains in an in vitro wound model.

DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE APTÁMEROS PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DEL VIH EMPLEANDO NUEVAS TECNOLOGÍAS

Ana Valadés Alcaraz.

Laboratorio de Epidemiología Molecular del VIH-1, IRYCIS-Hospital Universitario
Ramón y Cajal, Madrid, España

Existen 39 millones de infectados por VIH, con 1,3 millones de nuevas infecciones al año, siendo 130.000 niños. El diagnóstico temprano es crucial para instaurar la terapia antirretroviral lo antes posible. Sin embargo, las técnicas actuales no detectan el VIH en las primeras dos semanas de infección, requiriéndose nuevas técnicas diagnósticas moleculares económicas, sensibles y rápidas. Los aptámeros son una alternativa a los anticuerpos para detectar proteínas del VIH. Identificando péptidos conservados, seleccionando los mejores aptámeros frente a estos péptidos, e incorporándolos a nanotecnologías ultrasensibles podríamos reconocer cualquier variante del VIH desde los primeros días. El objetivo de mi Tesis es identificar péptidos conservados de varias proteínas del VIH, seleccionar y evaluar aptámeros específicos frente a ellos para su incorporación a nuevas nanotecnologías ultrasensibles basadas en biosensores para la detección molecular temprana del VIH. Se desarrollarán prototipos basados en biosensores funcionalizados con aptámeros e incorporados en microarrays, placas de silicio, sistemas electroquímicos y dispositivos de flujo lateral. Tras su optimización en ensayos ELONA (*Enzyme-Linked Oligonucleotide Assay*), y antes de incorporarse a los biosensores, los mejores prototipos se están evaluando con proteínas recombinantes del VIH, con sobrenadantes de virus, muestras clínicas infectadas con distintas variantes virales, y paneles de seroconversión. Ya hemos identificado bioinformáticamente ocho péptidos conservados entre variantes de cuatro proteínas del VIH (PR/IN/RT/P24) y seleccionado 27 aptámeros específicos. Estamos evaluando distintas combinaciones de aptámeros frente a cada proteína viral, estudiando la especificidad y capacidad de detección del VIH de las mejores combinaciones en ELONA, incorporándolas a varios biosensores para desarrollar dispositivos *point-of-care* ultrasensibles y confirmar su capacidad diagnóstica ultrasensible, siendo los resultados transferibles al ámbito clínico y diagnóstico. La detección temprana revolucionaría el diagnóstico del VIH en neonatos, niños y adultos a nivel global, y ayudaría a alcanzar los objetivos de ONUSIDA para reducir la epidemia.

Tratamiento in vitro de biofilms de *Mycobacterium abscessus* con combinaciones de antibióticos y bacteriófagos

Antonio Broncano Lavado

Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz e Instituto de investigación en infectología de Montpellier

Introducción y objetivos: *Mycobacterium abscessus* es una micobacteria no tuberculosa de crecimiento rápido que se ha convertido, en los últimos años, en un patógeno oportunista de gran importancia entre los pacientes con patologías pulmonares, especialmente entre los pacientes con fibrosis quística y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Esta bacteria posee la capacidad de colonización el tejido pulmonar mediante la formación de biofilms y también de producir infecciones invasivas. *M. abscessus* presenta una alta resistencia a muchos antimicrobianos y su tratamiento es difícil. La terapia con bacteriófagos es una alternativa prometedora para el tratamiento de estas infecciones. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antibiofilm de tres bacteriófagos aislados en España frente a tres cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus*.

Material y métodos: Se estudiaron tres bacteriófagos aislados de las aguas residuales del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz y del río Manzanares (Madrid) frente a un biofilm incipiente de 48 horas de tres cepas de *M. abscessus* subsp. *abscessus*: dos cepas clínicas de fenotipo rugoso y la cepa de referencia DSM 44196 también rugosa. El procedimiento se realizó con en placas de 96 pocillos no tratadas de fondo plano sobre las que se promovió la adherencia de las micobacterias y posteriormente se trató con los bacteriófagos tanto de forma individual como en cóctel. Se realizaron curvas de crecimiento de estas cepas en presencia y en ausencia de bacteriófagos midiendo la absorbancia a 595 nm cada 24 horas durante 8 días. También se estudió el efecto entre bacteriófagos y antibióticos (amikacina e imipenem) mediante el método checkerboard. Posteriormente se estudió la combinación entre bacteriófagos e imipenem frente al biofilm de las tres cepas de *M. abscessus* y se realizaron curvas de crecimiento en presencia y ausencia de bacteriófagos combinados con imipenem.

Resultados: Se observó inhibición en el crecimiento del biofilm de las cepas de *M. abscessus* tras el tratamiento de 24 horas con los bacteriófagos tanto de forma individual como en cóctel. Además, las curvas de crecimiento mostraron que los bacteriófagos eran capaces de inhibir el crecimiento de *M. abscessus* subsp. *abscessus* tanto de forma individual como en cóctel tras 8 días de estudio. La amikacina y el imipenem mostraron un efecto indiferente y sinérgico respectivamente en combinación con los fagos frente a bacterias planctónicas. La combinación entre bacteriófagos e imipenem también demostró ser eficaz frente al biofilm de *M. abscessus* subsp. *abscessus*.

Conclusiones:

Los bacteriófagos empleados son capaces de infectar a *M. abscessus* subsp. *abscessus* y de inhibir el crecimiento planctónico. La combinación entre bacteriófagos e imipenem tuvo un efecto sinérgico y fue también capaz de inhibir el crecimiento del biofilm de *M. abscessus*.

Caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos de Enterobacteriales resistentes a cefiderocol y/o ceftazidima-avibactam

Juan Antonio del Castillo Polo

Hospital Universitario Ramón y Cajal

Experimento 1: evaluación metodológica de la determinación de sensibilidad a cefiderocol. Se comparan frente a la microdilución en caldo manual como método de referencia y según la ISO- 20776-2:2021, con los siguientes resultados:

Microdilución comercial: EUMDROXF® (ThermoFisher), con *essential agreement (EA)* 81.73 y *bias* 2.61% y ComASP® (Liofilchem), con *EA* 88.46% y *bias* 27.88%.

Tira de gradiente (Liofilchem): *EA* 47.12% y *bias* 2.88%.

Discos de antibiótico de Liofilchem (S 100%, y E 51.65%) y ThermoFisher (S 100% y E 69.23%). Conclusión: ninguna microdilución comercial se considera válida según la ISO;

bias en rango, pero *EA* por debajo de 90%. Las tiras de gradiente tienen muy bajo *EA* y los discos tienen baja especificidad, sobre todo en el área de incertidumbre técnica (ATU) definida por EUCAST.

Experimento 2: impacto del tratamiento con CZA en el desarrollo de resistencia y detección con métodos genotípicos y fenotípicos. Se determina la capacidad de varios métodos para la detección de KPC mutadas en aislamientos de pacientes expuestos a CZA:

Fenotípicos: Kit CP y ESBL/AmpC (Rosco Diagnostica), test b-CARBA (Bio-Rad) y agar cromogénico ESBL/CarbaSmart (bioMérieux): solo 50% detección. Inmunocromatografía O.K.N.V.I. RESIST-5 (CORIS BioConcept) y NG-Test CARBA 5 (Hardy Diagnostics): 100%.

Genotípicos (todos 100% detección): secuenciación de genoma completo (WGS, Illumina), Xpert Carba-R (Cepheid) y Eazyplex Superbug CRE (Amplex-Biosystems).

Conclusión: algunos de los métodos fenotípicos utilizados, incluyendo medios cromogénicos, no detectan Enterobacteriales resistentes a CZA con mutaciones en KPC.

Experimento 3: caracterización de un brote en la UCI en 2020-21 de *Kp* resistente a FDC y CZA y búsqueda retrospectiva de casos.

Se determinó la sensibilidad antibiótica con EUMDROXF® (ThermoFisher) y ComASP (Liofilchem), se realizó WGS (Illumina) y se revisaron las historias clínicas para la epidemiología. Conclusión: se describe un brote de 11 *K. pneumoniae* productoras de KPC-62 (mutante de KPC-3), resistentes a FDC y CZA, en 4 pacientes de la UCI sin tratamiento previo con ninguno de los antibióticos. Asimismo, se encuentra una paciente con una *Kp* productora de KPC-31 en 2019 también resistente a ambos.

Experimento 4: descripción del desarrollo de resistencia a CZA y FDC en *Escherichia coli (Ec)* y aplicación de la técnica FTIR. Se describen 6 aislamientos de *Ec* resistentes a FDC y/o CZA con KPC-3, 49 y 31 pertenecientes a una misma paciente tratada en varios ingresos con pautas largas de CZA, y se utiliza la técnica FTIR de IR-Biotyper (Bruker) para agrupar estos aislamientos según su composición bioquímica. Se determinó la sensibilidad antibiótica con EUMDROXF® (ThermoFisher) y ComASP (Liofilchem) y se realizó WGS con Illumina.

Conclusión: la resistencia a cefiderocol en las *Kp* del estudio no se debe exclusivamente a las KPC. Las mutaciones en genes como el sistema Tol-Pal (involucrado en la transducción de energía para la integridad de la membrana externa) podrían contribuir. Nuevas tecnologías como el FTIR podrían ser una herramienta futura para distinguir mecanismos de resistencia que involucren cambios bioquímicos en la membrana.

IFNAR(-/-) Mice Constitutes a Suitable Animal Model for Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Study and Vaccine Evaluation

Luis Jiménez-Cabello

Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA), Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Valdeolmos, 28130 Madrid, Spain.

Epizootic hemorrhagic disease (EHD), caused by Epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV), is an emerging and severe livestock disease. Recent incursion and distribution of EHDV in Europe have outlined the emerging character of EHD. Despite its worldwide impact, numerous knowledge gaps exist. A range of inconveniences restricts utilization of natural hosts of EHDV. Here, we show that adult mice deficient in type I IFN receptor (IFNAR(-/-)) are highly susceptible to EHDV-6 and EHDV-8 infection when the virus is administered subcutaneously. Disease was characterized by ruffled hair, reluctance to move, dehydration and conjunctivitis, with viraemia detected from day 5 post-infection. A deeper characterization of EHDV-8 infection showed viral replication in the lung, liver, spleen, kidney, testis and ovaries. Importantly, increased expression levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and CXCL2 were observed in spleen after EHDV-8 infection. Furthermore, IFNAR(-/-) adult mice immunized with a EHDV-8 inactivated vaccine elicited neutralizing antibodies specific of EHDV-8 and full protection against challenge with a lethal dose of this virus. This study also explores the possibilities of this animal model for study of BTV and EHDV coinfection. In summary, the IFNAR(-/-) mouse model faithfully recapitulates EHD and can be applied for vaccine testing, which can facilitate progress in addressing the animal health challenge posed by this virus.

Keywords: Epizootic Hemorrhagic disease virus; IFNAR(-/-) mouse; vaccine; Bluetongue virus; viral coinfection.

