



MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



FONDO EUROPEO DE  
DESARROLLO REGIONAL  
*Una manera de hacer Europa*  
FONDO SOCIAL EUROPEO  
*El FSE invierte en tu futuro*

Unión Europea

30  
ANIVERSARIO  
(1986-2016)



Instituto  
de Salud  
Carlos III

## PROYECTO COFINANCIADO CON FONDOS FEDER

**Investigador principal:** Dra. Carmen del Águila de la Puente

**Referencia:** PI17/01670

**Título:** Neumonía en el ámbito comunitario y nosocomial: *Acanthamoeba* como refugio y campo de entrenamiento de *Legionella*. Desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas para su traslación.

**Entidad Financiadora:** Ministerio de Economía, Industria y Competitividad; Instituto de Salud Carlos III

**Cantidad concedida:** 87.120 €

**Fecha inicio:** 01/01/2018

**Fecha fin:** 01/01/2018

**Resumen:**

### OBJETIVO GENERAL:

Caracterización del papel vectorial de *Acanthamoeba* como reservorio de *Legionella spp* y su repercusión en: a) **la adquisición de patologías** infecciosas en el ámbito de la comunidad y en un entorno nosocomial, b) en **la modulación** de factores de virulencia e interacción con el hospedador; contribuyendo a la mejora del diagnóstico mediante el desarrollo de nuevas herramientas para su traslación al ámbito sanitario.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Aislar y caracterizar cepas de Amebas de Vida Libre (AVL) y *Legionella* en muestras clínicas y de agua hospitalarias, estudiando la epidemiología molecular de éstos patógenos como agentes causantes de neumonía.
2. Estudiar la interacción patógeno/hospedador, en los microorganismos estudiados: Factores asociados invasión /colonización, factores de virulencia, Mecanismos de Evasión del Sistema Inmune. Modelo “*in vitro*”.



MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



FONDO EUROPEO DE  
DESARROLLO REGIONAL  
*Una manera de hacer Europa*  
FONDO SOCIAL EUROPEO  
*El FSE invierte en tu futuro*

Unión Europea

30  
ANIVERSARIO  
(1986-2016)



Instituto  
de Salud  
Carlos III

3. Desarrollar nuevas alternativas al diagnóstico de neumonía causada por *Legionella* spp, de utilidad hospitalaria para la detección simultánea de las distintas especies de *Legionella*, incluyendo *L. no-pneumophila*.

#### **METODOLOGÍA:**

Se realizará la recuperación de los organismos mediante filtración en los diferentes tipos de aguas y se identificarán los patógenos por cultivo y PCR. Las muestras clínicas se analizarán por cultivo, métodos moleculares e inmunocromatografía. Respecto el resto de actividades y tareas, se desarrollarán las siguientes metodologías: tecnología basada en aptámeros, electroforesis, caracterización molecular. Modelos animales y estudios anatomopatológicos.

#### **DISEÑO Y TAREAS DEL PROYECTO:**

##### ***Diseño del Proyecto***

Fases del estudio:

- 1.- Obtención de muestras de diferente origen.
- 2.- Identificación, amplificación y caracterización de los microorganismos en los diferentes tipos de muestras.
- 3.- Estudio de la interacción patógeno/hospedador.
- 4.- Mejora del diagnóstico de neumonía.
- 5.- Tratamiento de datos análisis y resultados.

##### ***Tareas a Realizar***

- **TAREA 1.- IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS RECUPERADOS DE LAS MUESTRAS DE AGUAS Y CLÍNICAS.**

# Actividad 1.1.- Obtención de material biológico de referencia de las distintas cepas de los protozoos y bacterias en estudio.

# Actividad 1.2.- Diseño del plan de recogida de muestras.

# Actividad 1.3.- Identificación y caracterización de los microorganismos recuperados de las muestras de aguas.



MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



FONDO EUROPEO DE  
DESARROLLO REGIONAL  
*Una manera de hacer Europa*  
FONDO SOCIAL EUROPEO  
*El FSE invierte en tu futuro*

Unión Europea

30  
ANIVERSARIO  
(1986-2016)



Instituto  
de Salud  
Carlos III

#Actividad 1.4: Identificación y caracterización de AVL y *Legionella* asociados en muestras clínicas.

- **TAREA 2: ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PATÓGENO-HOSPEDADOR Y CARACTERIZACIÓN DE LOS FACTORES ASOCIADOS A LA INVASIÓN/COLONIZACIÓN DE *Acanthamoeba* POR *Legionella*.**

#Actividad 2.1: Mecanismos de Evasión del Sistema Inmune y Factores de Virulencia de *Legionella*. Modelo “*in vitro*”.

- **TAREA 3: OBTENCIÓN DE HERRAMIENTAS ÚTILES PARA EL DESARROLLO DE UN MÉTODO DIAGNÓSTICO DE LA LEGIONELLOSIS ESPECÍFICO Y DE BAJO COSTE.**

# Actividad 3.1: Obtención de aptámeros específicos para las distintas especies de *Legionella* spp.

# Actividad 3.2: Estudio de la especificidad y funcionalidad de los aptámeros.

- **TAREA 4: INTERCAMBIO DE INVESTIGADORES Y TÉCNICAS.**
- **TAREA 5: ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS Y PUBLICACIÓN DE LOS MISMOS.**

#### **DISTRIBUCIÓN DEL PROYECTO:**

En una **primera etapa** se procederá a la obtención de material biológico de referencia, a la optimización de los métodos de identificación molecular y al diseño del plan de recogida de muestras.

En una **segunda etapa**, en su primera fase, se realizarán los muestreos en los lugares y momentos seleccionados, realizándose la identificación de los patógenos en estudio tanto en las muestras de aguas como en las muestras clínicas y comienzo de la caracterización. A la vez se cultivarán las cepas de AVL correspondientes y se comenzarán los ensayos de caracterización del papel vectorial de *Acanthamoeba*. Así mismo, se empezarán a diseñar los métodos diagnósticos alternativos. En la segunda fase de esta segunda fase se realizará fundamentalmente la caracterización molecular de los aislados de aguas y de muestras clínicas, y la caracterización proteómica de los receptores y estudios de interacción patógeno hospedador y modelo animal.



MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



FONDO EUROPEO DE  
DESARROLLO REGIONAL  
*Una manera de hacer Europa*  
FONDO SOCIAL EUROPEO  
*El FSE invierte en tu futuro*

Unión Europea

30  
ANIVERSARIO  
(1986-2016)



Instituto  
de Salud  
Carlos III

Un punto clave en este proyecto es disponer de la colaboración de hospitales del SNS como el Hospital Puerta de Hierro y Hospital la Paz, que nos proporcionarán muestras clínicas tanto pediátricas como adultos, y del Hospital Gregorio Marañón del que dispondremos de su tecnología (Citometría de Flujo) y de su Plataforma de Biobancos. Por otro lado, todo el muestro de aguas de diferentes unidades hospitalarias se podrá llevar a cabo gracias a la colaboración con el Hospital Arnau de Vilanova de Valencia y los Hospitales Virgen del Rocío, Hospital Esperanza Macarena y Hospital Nuestra Señora de Valme.

**Por motivos de la convocatoria** no constan en la distribución de tareas los miembros procedentes de los centros colaboradores, pero si se recoge su participación como “lugar de realización”. Para facilitar su identificación se han marcado con \*. Aunque no formen parte del grupo de investigación es indispensable su colaboración para la realización del proyecto: la Dra. Coral Barbas Arriba directora del Centro de Excelencia de Metabolómica y Bioanálisis de la Universidad San Pablo-CEU (colaboración en el desarrollo del aptámero por selección con Electroforesis Capilar y ofreciéndonos todo su servicio de Espectrofotometría de Masas) y el Dr. J. Carlos Andreu del Hospital Arnau de Vilanova (envío muestra de agua de ámbito hospitalario), la Dra. M<sup>a</sup> José Mellado jefa del servicio de pediatría del Hospital de la Paz (coordinación y asesoría pediátrica) y la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Muñoz Fernández jefa de Biobanco del Hospital Gregorio Marañón (asesoría).

**Personal:** CA: Carmen del Aguila (USP-CEU); SF: Soledad Fenoy (USP-CEU); CH: Carolina Hurtado (USP-CEU); DO: Dolores Ollero (USPCEU); AM: Angela Magnet (USP-CEU); CS: Contrato solicitado (USP-CEU); LA: Luis Arvelo (HPH); IS: Isabel Sánchez (HPH); SP: Sara Pérez (HLP); MP: Manuela de Pablos (HLP); LL: Luis Lopez (HVR y HEM); CG: Coral Gómez (HGM).

**Centros:** USPCEU: Universidad San Pablo-CEU; HPH: Hospital Puerta de Hierro; HLP: Hospital La Paz; HVR: Hospital Virgen del Rocío; HEM: Hospital Esperanza Macarena; HGM: Hospital de Gregorio Marañón.

**Centros y Personal colaboradores:** CEMBIO\*: Centro de Excelencia de Metabolómica y Bioanálisis; HAV\*: Hospital Arnau de Vilanova.



TAREAS	Personal que lo Realiza	Lugar Realización	Cronograma
Dirección Proyecto	CA, CH	USPCEU	1S -6S
Tarea 1. (Actividad 1.1)	DO, CS	USPCEU	1S
Tarea 1. (Actividad 1.2)	CA, CH, MF, LA, IS, SP, MP, CG, LL	USPCEU, HPH, HLP, HGM, HAV*, HVR HEM, HNSV*	1S
Tarea 1. (Actividad 1.3)	DO, AM, LL, CS	USPCEU, HAV*, HVR, HEM, HNSV*	1S-5S
Tarea 1. (Actividad 1.4)	DO, AM, LA, IS, SP, MP, CG CS	USPCEU, HPH, HLP, HGM	1S-5S
Tarea 2. (Actividad 2.1)	MF, DO, AM, CH	USPCEU, UCM*	1S-5S
Tarea 2. (Actividad 2.2)	AM, CS	USPCEU, UFRJ*, CEMBIO*	2S-5S
Tarea 3. (Actividad 3.1)	CA, CH, CS	USPCEU, CEMBIO*	1S-5S
Tarea 3. (Actividad 3.2)	CA, CH, CS	USPCEU, CEMBIO*	3S-5S
Tarea 4.	Equipo Investigador	USPCEU, HPH, HLP, HVA*; HVR, HEM, HGM, CEMBIO*, UCM*, UFRJ* HNSV*	3S-4S
Tarea 5.	CA, CH, MF, FI, AM	USPCEU	6S