

Complejos proteicos de membrana externa de *Neisseria meningitidis*: análisis estructural y capacidad antigénica

Juan Marzoa Fandiño

Directores: **Carlos M^a Ferreirós Domínguez y Sandra Sánchez Poza.**

Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela.

La infección meningocócica es un importante problema de salud mundial. De los principales serogrupos patogénicos (A, B, C, Y y W135), el serogrupo B es el único que no dispone de una vacuna eficaz y de amplia cobertura.

Los objetivos planteados en esta tesis fueron realizar un estudio del complexoma de membrana externa de *N. meningitidis*, caracterizar los complejos proteicos más relevantes y analizar sus características antigénicas sin alterar su estructura nativa y, de este modo, la de los epitopos conformacionales que a menudo no son contemplados por la metodología clásica. Finalmente se evaluó el interés de los complejos proteicos estudiados como antígenos vacunales.

Para el análisis del complexoma de la membrana externa del meningococo hemos utilizado una técnica electroforética de reciente publicación, especialmente desarrollada para el estudio de complejos proteicos, denominada *high resolution Clear Native Electrophoresis* (hrCNE). Mediante espectrometría de masas y técnicas electroforéticas bidimensionales derivadas de la hrCNE, caracterizamos la composición de los principales complejos proteicos. Con el fin de analizar la funcionalidad de los anticuerpos generados contra los complejos proteicos purificados y contra vesículas de membrana externa, se realizaron los ensayos de actividad bactericida del suero, unión de anticuerpos a la superficie bacteriana, deposición del componente del complemento C3b, deposición del componente del complejo de ataque a membrana, y actividad opsonofagocítica del suero.

El análisis proteómico reveló la presencia de 12 complejos proteicos mayoritarios. Tres de estos complejos son asociaciones homoméricas de las proteínas chaperonina de 60 kDa, glutamina sintetasa y cetol-ácido reductoisomerasa, y nueve son complejos de porinas, correspondientes a homómeros de la porina PorB y tres tipos de asociaciones heteroméricas de las porinas PorA y PorB, y las proteína RmpM: PorA/PorB, PorB/RmpM y PorA/PorB/RmpM. En menor proporción también se detectaron homómeros de PorA y complejos de alto peso molecular formados por PorA/PorB/RmpM/MIP. La utilización de cepas mutantes nos permitió también confirmar el papel crucial de la PorB en el mantenimiento de la integridad de los complejos de porinas.

Del total de complejos detectados se obtuvieron cinco sueros de ratón anti-complejos: el suero anti-CxChap, obtenido tras la inmunización con el complejo de la chaperonina de 60 kDa, y los sueros anti-CxABR, anti-CxBR y anti-CxAB, anti-CxB, obtenidos tras la inmunización con los

complejos formados por PorA/PorB/RmpM, PorB/RmpM y PorA/PorB y PorB respectivamente. Del mismo modo se obtuvieron sueros inmunes contra OMVs salvajes y defectivas en las proteínas PorA, PorB, RmpM o FetA.

Todos los complejos purificados resultaron accesibles en superficie e indujeron respuestas que promueven la deposición del componente del complemento C3b, la formación del complejo de ataque a membrana y la actividad bactericida. La escasa reactividad cruzada de los sueros anti-complejos de porinas reduce su interés vacunal a la protección frente a la cepa homóloga. Sin embargo, la alta reactividad cruzada del suero anti-CxChap mostrada en los ensayos de unión de anticuerpos a superficie, deposición de C3b, deposición de MAC y actividad opsonofagocítica sugiere que las proteínas chaperonina de 60 kDa y la proteína MIP (co-purificada con el complejo CxChap) pueden ser antígenos con gran interés como componentes vacunales.

Aplicación de las técnicas FISH, PCR específica y 16S-ARDRA al estudio de la población bacteriana asociada al proceso de vinificación

Lucía Blasco Escrivá

Directores: **Isabel Pardo Cubillos y Sergi Ferrer Soler.**

Centro de realización: Dpt. de Microbiología i Ecologia, Fac. Ciències Biològiques, Universitat de València. Centro de presentación: Universitat de València.

El vino es el producto de la fermentación del mosto de uva y en esta transformación intervienen gran cantidad de microorganismos. Estos microorganismos pueden ser beneficiosos, como *S. cerevisiae* y *O. oeni*, o perjudiciales como la gran mayoría de las bacterias lácticas (BL) y todas las bacterias acéticas (BA). La adopción de medidas de control tempranas que eviten las alteraciones microbianas durante el proceso de vinificación o crianza es necesaria para obtener un vino de calidad. Por ello, el objetivo principal de este trabajo ha sido el desarrollo de una metodología rápida que permita detectar, identificar y cuantificar las BL y acéticas en el vino.

Para ello se desarrollaron de sondas fluorescentes que fueron útiles para la detección, identificación y cuantificación de especie de BL y BA del vino mediante microscopía de fluorescencia. Además se desarrollaron cebadores específicos para detección mediante PCR específica de BA. Estas técnicas se compararon con otras descritas previamente como el 16S-ARDRA y tras evaluar estas técnicas moleculares en muestras de mosto y vino se procedió a aplicación de dichas técnicas en vinificaciones a nivel de laboratorio, planta piloto y nivel industrial llegando a la conclusión de la importancia de su utilidad para poder prevenir los posibles deterioros causados por el crecimiento de microorganismos como las BL o BA.

Molecular characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates. Epidemiological distribution in Spain

Elena Castellanos Rizaldos

Directores: **Alicia Aranaz Martín, Lucas Domínguez Rodríguez y Lucía de Juan Ferré.**

Centro de realización: Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) y Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Centro de presentación: Facultad de Veterinaria de Madrid, Universidad Complutense de Madrid, España.

The etiological agent of paratuberculosis or Johne's disease is *M. a. paratuberculosis*. This agent has been divided into three groups by traditional molecular techniques; type I (or "ovine"), type II ("bovine") and type III ("intermediate"). Nonetheless, there are some isolates (especially the most slow-growing phenotypes) that are not typable by these techniques due to DNA quality and quantity requirements. Therefore, we began designing different PCR-based techniques to amplify certain genes and target regions, which were then sequenced to detect possible type-specific differences at the nucleotide level. From these genes, *gyrA*, *gyrB*, *inh-A* and IS900, presented SNPs that were type-specific (I, II and III). At the same time, SNPs present in the *gyrB* and *inh-A* genes in type III strains revealed recognition sites for the restriction enzymes *Hpy188III* and *SinI*. The enzymatic digestion of type III strains products (at that moment only distinguishable from type I strains by PFGE and RFLP-IS900) resulted in different patterns from those of type I and II.

Moreover, we performed a genomic hybridization comparison using microarray on a selection of *M. a. paratuberculosis* isolates obtained from Spain and representing the three types. In this study it was found that *M. a. paratuberculosis* types I and III showed 62 ORFs homologous to *M. a. hominissuis* 104 genome but divergent from the *M. a. paratuberculosis* K-10 genome. In addition, the comparison of types I and III strains with the *M. a. paratuberculosis* K-10 genome revealed deletions of two ORFs in the type I strains analyzed and seven ORFs in the type III strains. This previous data served to optimize PCR-based techniques directed to types I and III specific genomic regions, and constituted another technique to differentiate between these two types. Furthermore, we accomplished a novel molecular approach derived from real time PCR principles and the analysis of differences in melting curves. This technique was able to type *M. a. paratuberculosis* isolates in 1 hour and 30 minutes. Complimentary to this study we also applied these principles to discriminate between MAC members with envi-

ronmental and clinical relevance, especially in the case of immunocompromised patients.

In addition to this, the different outbreaks of paratuberculosis that occur worldwide and the need to establish links between them have created a demand for a rapid molecular technique able to subtype within the *M. a. paratuberculosis* types. For this reason, we analyzed different MIRU-VNTR loci in a panel of *M. a. paratuberculosis* isolates of Spanish origin. Consequently, we described a novel locus (VNTR-259) and proposed the standardization of the interpretation of the results in terms of numbers of copies from agarose gels. The combination of loci used in the study (MIRU-2, MIRU-3, VNTR-25, VNTR-32 and VNTR-259) yielded an index of discrimination HGDI of 0.84. Moreover, this technique was applied for the first time in Spain in other members of MAC different from *M. a. paratuberculosis*, such as *M. a. avium* recovered from birds of prey.

To conclude, the development of these new approaches resulted in the identification, characterization and description of novel type II strains of *M. a. paratuberculosis* from Spanish origin, sampled from Guadarrama goats. These strains revealed a novel deletion of 16 Kb. Included within this deletion, virulence-related operons were identified, such as the mammalian cell entry genes or *mce* among others. The overall result of this study ended in the description of the first natural *mce* mutant strain of *M. a. paratuberculosis* ever reported. The importance of this deletion, that contains different virulence genes was determined by in vitro infections in four cell lines (MOCL-4, BOMAC, THP-1 and CACO-2) and quantitative amplification of pre-rRNA 16S gene. Afterwards, the differential regulation of the genes within the 16 Kb region was evaluated by the analysis of the transcriptome of *M. a. paratuberculosis* K-10 (reference strain) after in vitro infections in THP-1 and MOCL-4 cell lines.

Prevalencia y diversidad de integrones en cepas clínicas y comensales de *Escherichia coli*
Prevalence and diversity of integrons in clinical and commensal *Escherichia coli* strains

Laura Vinué Santolalla

Directora: **Carmen Torres Manrique**
Área de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de La Rioja.

Un integrón es un sistema de recombinación sitio-específico capaz de integrar y expresar genes *cassettes*. Existen cinco clases de integrones que contienen genes *cassettes* de resistencia a antibióticos, siendo los de clase 1 los más frecuentes. Estos se caracterizan por presentar una secuencia conservada en el extremo 5' (5'-CS) y otra en el extremo 3' (3'-CS) formada por un gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternarios (*qacEΔ1*) y un gen de resistencia a sulfamidas (*sul1*).

En esta tesis se estudió en primer lugar la prevalencia y diversidad de integrones en cepas clínicas (hemocultivos) y comensales (heces de personas sanas) de *E. coli*. Se detectaron integrones en el 40% y 29% de las cepas clínicas y comensales, respectivamente. En las cepas clínicas/comensales se detectaron integrones de clase 1 (38.5%/26%), de clase 2 (0.7%/1%) y de clase 1 y 2 (0.7%/2%). Se obtuvo una mayor diversidad de combinaciones de genes *cassettes* en la región variable de integrones de clase 1 en las cepas clínicas (n=11) que en las cepas comensales (n=4). El 32% de los integrones de clase 1 de las cepas de hemocultivos y el 14.3% de los de las cepas comensales carecían de la región 3'-CS, detectándose ocho combinaciones diferentes de genes *cassettes* y cuatro estructuras asociadas con *sul3*, una de ellas nueva incluida en el GenBank (FJ587511). Todos los integrones de clase 2 presentaron la composición de genes *dfrA1* + *sat* + *aadA1*.

Posteriormente se estudió el entorno genético de los genes de resistencia a sulfamidas (*sul*) en las cepas de hemocultivos resistentes a sulfamidas (SUL^R). Así, 63 de las 71 cepas SUL^R contenían genes *sul* y se encontró *sul1* asociado a integrones de clase 1 en el 85.7% de las cepas con este gen, *sul3* a integrones no clásicos carentes de la región 3'-CS en el 71.4% de las cepas y *sul2* en el 91.4% de las cepas fue asociado con *strA-strB*, detectándose once estructuras diferentes y una de ellas nueva con el gen *strB* truncado por IS150 (GenBank FJ705354).

A continuación, se realizó la detección y caracterización de betalactamasas de espectro expandido (BLEEs) en cepas de *E. coli* clínicas y comensales de personas sanas y se determinó su entorno genético y su posible relación con integrones. Se estudiaron 56 cepas clínicas portadoras de BLEEs, detectándose los siguientes genes (numero de cepas): *bla*_{CTX-M-14a} (29), *bla*_{CTX-M-9} (9), *bla*_{CTX-M-15} (1), *bla*_{CTX-M-32} (2), *bla*_{SHV-12} (12), *bla*_{SHV-2} (1), *bla*_{TEM-52} (1) y el gen que codifica una nueva β-lactamasa SHV-102, incluido en GenBank (EU024485). Asimismo se detectaron cepas portadoras de BLEEs en 7 de las 105 muestras fecales de personas sanas estudiadas (6.6%), identificándose los genes (numero de cepas): *bla*_{CTX-M-14a} (1), *bla*_{CTX-M-14b} (1), *bla*_{CTX-M-1} (2), *bla*_{CTX-M-32} (1), *bla*_{CTX-M-8} (1) y *bla*_{TEM-52} (1). Los genes *bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{CTX-M-14b} fueron identificados en la estructura del integrón In60. Se detectaron integrones de clase 1 en el 60.7% de las cepas clínicas BLEE-positivas y en dos de las siete cepas comensales, obteniendo un total de siete combinaciones de genes *cassettes* diferentes. Cinco cepas clínicas y comensales con integrones de clase 1, presentaron la estructura no clásica, carente de la región 3'-CS y en una cepa se detectó un integrón de clase 1 relacionado con *sul3* con una estructura no descrita previamente que incluía una secuencia de inserción IS1294 truncando el gen *cmlA1* (GenBank EU704128).

Se comprobó en 7 cepas que los determinantes genéticos de integrones carentes de 3'-CS y relacionados con *sul3* se encontraban localizados en plásmidos (rango <48 a 150 Kb), transferibles por transformación en algunas cepas y se identificó el plásmido InCh1 en una de ellas. Asimismo se realizó la caracterización de los plásmidos portadores de genes *bla*_{CTX-M-1} y *bla*_{CTX-M-32}, encontrándose dichos genes mayoritariamente en plásmidos de tipo IncN.

Se realizó la caracterización de la variante del promotor de los genes *cassettes* de los integrones de clase 1 en 42 integrones (de 41 cepas clínicas y comensales). Se detectaron cuatro variantes de promotores (PcW, Pch1, PcW_{TGN-10} y PcS). El promotor PcW se encontró unido a otro promotor P2 en algunos casos. La frecuencia de detección de dichas variantes estuvo en relación inversa con la fuerza de dichos promotores, de modo que los porcentajes detectados fueron (de débil a fuerte): PcW (40.5%), Pch1 (33.3%), PcW + P2 (14.3%), PcW_{TGN-10} (9.5%), y PcS (2.4%).

Por último, se analizó la estabilidad del integrón de clase 1 carente de la región 3'-CS en ausencia de presión antibiótica selectiva en 3 de las cepas, observándose comportamientos diferentes. En uno de los casos se produjo la pérdida del integrón y del plásmido que lo portaba (con las resistencias asociadas) al cabo de 75 pases en medio sin antibiótico.

Taxonomía molecular del clado central del género *Vibrio* y otras *Vibrionaceae*

Francisco Javier Pascual Martínez

Directores: **M^a Jesús Pujalte Domarco, M^a Carmen Macián Rovira y David Ruiz Arahal.**

Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Departamento de Microbiología, y Ecología y Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia.

Se ha evaluado la utilidad de diferentes técnicas de tipificación molecular así como el Multilocus Sequence Analysis (MLSA), para la clasificación de las especies del clado central del género *Vibrio*.

Se han estudiado 85 aislados, identificados fenotípicamente como *Vibrio harveyi*, junto con las cepas tipo y de referencia de las 6 especies del clado central. Entre las técnicas de tipificación molecular se han analizado Rep PCR (GTG)₅, RAPD M13, RAPD T7, ISR 16S-23S, así como la combinación de las tres primeras técnicas ("gel combinado"). Posteriormente, se ha corroborado la identidad de cepas representativas de los diferentes grupos formados con la técnica "gel combinado" mediante el MLSA utilizando los genes 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *gyrB*, *rpoD*, *rctB* y *toxR*, tanto de manera individual como concatenando sus secuencias. Finalmente, para confirmar la identidad correcta de los aislados se ha aplicado la hibridación DNA-DNA en una serie de cepas representativas de los diferentes clados obtenidos en el estudio de MLSA, evaluando su correlación respecto a los resultados del MLSA y el "gel combinado".

El análisis de los 7 genes concatenados ha mostrado ser una herramienta óptima para la clasificación y análisis filogenético de los vibrios del clado central. Las secuencias génicas individuales de *rpoD*, *rctB* y *toxR* han mostrado un resultado

satisfactorio, a diferencia de los genes 16S rRNA, *recA*, *pyrH* y *gyrB*. La concatenación de los tres genes más resolutivos (*rpoD*, *rctB* y *toxR*) ha permitido una perfecta definición de las seis especies, lo que permite minimizar el número de genes a secuenciar con fines identificativos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la técnica hibridación DNA-DNA y MLSA, se ha concluido que ninguna técnica de tipificación molecular por separado ha permitido la correcta clasificación y diferenciación de las seis especies, mientras que la combinación de técnicas, si bien mejora los resultados individuales, no diferencia entre *V. campbellii* y *V. rotiferianus*. Además los resultados han mostrado que parte de las cepas identificadas fenotípicamente como *V. harveyi* han resultado ser *V. rotiferianus*.

Empleando la técnica de MLSA, integrada en un estudio polifásico, se ha esclarecido la posición taxonómica de un conjunto de once *Enterovibrio* sp., así como de *Vibrio calviensis* DSM 14347^T. Los resultados han mostrado que (i) tres de las cepas en estudio constituyen una nueva especie del género *Enterovibrio*, para la que se propone el nombre de *E. nigricans* sp. nov. (CECT 7320^T); (ii) las restantes cepas son *E. corallii* (primer aislamiento de esta especie a partir de peces); (iii) *V. calviensis* DSM 14347^T debe ser reclasificada como

una especie del género *Enterovibrio*, *E. calviensis* comb. nov.; y (iv) es necesario enmendar la descripción del género *Enterovibrio*.

Estudio comparativo de sistemas de secreción Tipo IV implicados en transferencia conjugativa de DNA y virulencia bacteriana

Héctor David de Paz Fernández

Directora: **Matxalen Llosa Blas.**
Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria.

Los sistemas de secreción Tipo IV (T4SS) se encuentran ampliamente distribuidos entre las bacterias, donde presentan roles biológicos muy diferentes a pesar de la gran homología que comparten entre sí, estando involucrados en procesos como conjugación bacteriana o virulencia.

En este trabajo, el estudio de dos T4SS implicados en transferencia de DNA y virulencia, nos ha permitido manipular sus componentes, consiguiendo movilizar DNA desde *Bartonella* hacia células humanas. Esto podría sentar las bases para una herramienta de transferencia al genoma humano de DNA de cualquier origen y longitud, de gran valor en el campo de la terapia génica.

Primero realizamos un estudio comparativo de los T4SS Trw de R388 y *Bartonella*, estableciendo los componentes que pueden ser intercambiados, estructural y funcionalmente. Además, hemos llevado a cabo un análisis mutacional de la proteína acopladora de R388 (TrwB) y analizado el efecto de estas mutaciones en la funcionalidad de TrwB en un sistema donde la cantidad de TrwB es limitante para la frecuencia de conjugación. Esto nos ha permitido delimitar los dominios funcionales de la proteína. También hemos obtenido mutantes que interaccionan más fuertemente con el T4SS de *Bartonella*. Por último, hemos conseguido movilizar DNA desde *Bartonella* a células humanas, y hemos determinado que la transferencia depende tanto de la maquinaria conjugativa de R388 como de los T4SS de *Bartonella*.

Publicación de resúmenes de Tesis Doctorales

Actualidad SEM publica resúmenes de Tesis Doctorales realizadas o dirigidas por miembros de la SEM. Deben enviarse a la Secretaría de la SEM o al Director por correo electrónico, siguiendo el formato: *Título, Autor, Director(es), Centro de realización, Centro de presentación* (si es distinto) y *Resumen* (máximo, unas 500 palabras). El resumen que se envía a la base de datos *Teseo* es apropiado también.

Actualidad SEM se reserva el derecho a no publicar la información si el resumen es excesivamente largo o el tema del trabajo no guarda suficiente relación con la microbiología.