

UNIVERSIDAD DE BURGOS

ESCUELA DE DOCTORADO

TESIS DOCTORALES

TÍTULO: UNDERSTANDING THE SURVIVAL MECHANISMS OF CAMPYLOBACTER JEJUNI IN HUMAN HOSTS AND IN THE ENVIRONMENT.

AUTORA: ORTEGA SANZ, IRENE

PROGRAMA DE DOCTORADO: AVANCES EN CIENCIA Y BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIAS.

ACTO Y FECHA DE LECTURA: EL ACTO PÚBLICO DE DEFENSA DE TESIS SE DESARROLLARÁ EL DÍA 12 DE FEBRERO DE 2024, A LAS 11:30 HORAS, PRESENCIALMENTE, EN EL SALÓN DE ACTOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS (UNIVERSIDAD DE BURGOS).

DIRECTORES: D. JORDI ROVIRA CARBALLIDO
DÑA. BEATRIZ MELERO GIL

TRIBUNAL: D. PABLO SALVADOR FERNÁNDEZ ESCÁMEZ
D. AVELINO ÁLVAREZ ORDÓÑEZ
DÑA. FRANCESCA DE FILIPPIS
DÑA. GREGORIA MEGÍAS LOBÓN
DÑA. MARÍA DE TORO HERNANDO

RESUMEN: Campylobacter es un patógeno bacteriano que se transmite principalmente a través de alimentos contaminados causando la llamada campilobacteriosis, la enfermedad gastrointestinal más frecuentemente notificada en la Unión Europea desde 2005, con más de 127.000 casos en humanos en 2021. En la mayoría de casos notificados, Campylobacter jejuni es la especie predominante, lo que representa una seria amenaza para la salud humana, provocando además un impacto negativo en la economía de los sistemas de salud públicos. Con la finalidad de mejorar la seguridad alimentaria, en esta Tesis Doctoral se profundiza en los mecanismos moleculares de patogenicidad y virulencia de C. jejuni para resistir a las duras condiciones ambientales existentes a lo largo de la cadena de suministro alimentaria y sobrevivir a los mecanismos de defensa del huésped humano.

El estudio de las bases moleculares de patogenicidad de C. jejuni requiere la secuenciación del genoma completo (WGS; del inglés, Whole-Genome Sequencing) de los aislados, así como el análisis genómico posterior de los datos secuenciados. Surge de este modo la necesidad de desarrollar un flujo de trabajo —CamPype— que permita analizar de manera automática datos WGS especialmente de esta bacteria. CamPype permite al usuario personalizar el análisis WGS a realizar, incluyendo el control de calidad y filtrado de las lecturas, la extensión y el ensamblaje de las lecturas, la tipificación bacteriana, la anotación del genoma, la búsqueda de genes de resistencia a antibióticos, genes de virulencia y plásmidos, construcción de pangenoma e identificación de variantes nucleotídicas.

Para validar CamPype, se analizaron 145 genomas de Campylobacter spp, incluyendo las especies C. jejuni, Campylobacter coli y Campylobacter lari, correspondientes a aislados procedentes de distintas etapas de la cadena de suministro avícola de España, así como cepas clínicas de Burgos. El estudio reveló una amplia diversidad genética entre los aislados, con un predominio del Complejo Clonal 21, el cual se identificó en todos los puntos de muestreo. Asimismo, se identificaron varios perfiles de virulencia y resistencia a antibióticos, con una mayor frecuencia de genes de virulencia en la especie C. jejuni que podría explicar su mayor abundancia en el ambiente. También se observaron altas tasas de genes de resistencia a antibióticos, especialmente frente a β -lactámicos, fluoroquinolonas y tetraciclinas, sobre todo en C. jejuni y C. coli, que justifican la amenaza para la salud mundial del aumento de la resistencia a los antibióticos.

En el camino hacia comprender el comportamiento de Campylobacter en el ambiente, dos aislados de C. jejuni que habían infectado a dos hermanos de la misma familia a la vez se compararon genómicamente para encontrar las causas moleculares que llevaron al niño a padecer perimicarditis

después de sufrir campilobacteriosis. Los aislados resultaron ser clones de la misma bacteria y solo se diferenciaron en 16 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs; del inglés, Single Nucleotide Polymorphism), que afectaban principalmente al estado encendido/apagado de genes hipervariables. Estas diferencias sugieren que, cuando se produce la infección del huésped humano, la bacteria es capaz de modular la expresión de ciertos genes para adaptar su comportamiento al entorno, lo que puede provocar el desarrollo de complicaciones posteriores en el huésped según su estado.

Las dos cepas anteriores se caracterizaron fenotípicamente, junto con otros tres aislados representantes de distintos eslabones de la cadena de suministro avícola, y sus genomas también se analizaron en busca de posibles marcadores genéticos responsables de los fenotipos observados. En concreto, se evaluó el comportamiento de los aislados frente a situaciones de estrés típicas de la cadena de suministro avícola, como su capacidad de tolerar el oxígeno y el estrés oxidativo, así como su habilidad para formar biofilm como estrategia adaptativa en la industria alimentaria, la cual depende de la movilidad bacteriana. Los aislados combinaron diferentes comportamientos fenotípicos, con especial relevancia la diferente capacidad de nado de los dos aislados relacionados con el caso de la perimicarditis. Además, el análisis comparativo de los genomas reveló distintos perfiles de genes asociados a las estrategias de supervivencia evaluadas, aunque el mecanismo molecular subyacente de cada fenotipo fue principalmente el cambio de fase de genes hipervariables, que fue crucial para modular los diversos mecanismos de supervivencia adoptados por la bacteria.

La diferente capacidad de nado de los dos aislados relacionados con el caso de perimicarditis condujo hacia un estudio en profundidad del fenotipo de motilidad en *C. jejuni*. Este estudio reveló, de nuevo, una gran diversidad en la capacidad de nado de la bacteria, así como de patrones de genes asociados a este fenotipo y de fasotipos —combinaciones del estado encendido/apagado de genes hipervariables—. Esto indica que la motilidad es un fenotipo complejo que combina distintos mecanismos genéticos pero complementarios, aunque el acortamiento de proteínas como consecuencia de mutaciones puntuales o el estado de fase de aquellos genes hipervariables, donde destacan los implicados en la glicosilación del flagelo, resultan decisivos para explicar la variabilidad de este fenotipo.

El análisis anterior se complementó con un estudio de asociación genoma-fenotipo por sus siglas en inglés GWAS (Genome-Wide Association Study) que reveló nuevos hallazgos implicados en el fenotipo de la motilidad desde un punto de vista estadístico. Concretamente, hasta cuatro regiones del genoma parecieron estar implicadas en la menor o mayor capacidad de nado de la bacteria, regiones que codifican para proteínas de membrana, transmembrana, periplásmicas y de la cápsula, que sugieren un papel fundamental de la estructura y composición de la membrana y la cápsula en el desempeño de la bacteria en ambientes viscosos. Además de la necesidad del correcto ensamblaje del flagelo en un proceso especialmente coordinado, transportadores ABC de fosfatos y de unión de ATP asociados a la membrana podrían ser claves en la transferencia de nutrientes para la generación de la fuerza protón-motriz a través de la membrana necesaria para la rotación del flagelo a mayor o menor velocidad permitiendo distancias de nado de la bacteria más largas o cortas. De esta forma, estos dos últimos estudios ponen de manifiesto la importancia que tiene para entender el fenotipo de la motilidad en *C. jejuni* el estudio tanto de los genes directamente implicados en la construcción del flagelo, como de aquellos genes responsables de poner en marcha el funcionamiento de esta estructura filamentosa.

En definitiva, esta Tesis Doctoral demuestra el potencial de CamPype para caracterizar genómicamente aislados de distintas especies y orígenes generando nuevos datos útiles para posteriores análisis más específicos que permiten profundizar más aún en el estudio de las bases moleculares de patogenicidad de *C. jejuni*. La bacteria se caracteriza por su habilidad para combinar eficientemente diversos y complejos mecanismos genéticos, entre los que se encuentran factores de virulencia implicados en múltiples procesos, varios de los cuales están afectados por el cambio de fase y que determinan distintos fenotipos. Aunque de todos estos, el cambio de fase es el mecanismo que otorga a la bacteria la ventaja adaptativa esencial para hacer frente a situaciones de estrés y adaptarse al huésped, lo que hace que el comportamiento de la bacteria pueda llegar a ser impredecible y potencia su prevalencia en el ambiente.

Palabras clave: análisis genómico, perimicarditis, fenotipo, variación de fase, motilidad.

Keywords: genomic analysis, perimyocarditis, phenotype, phase variation, motility.