

germinal ni produjeron clamidoconidios. En el estudio microscópico se observaron estructuras esféricas, ovoides y de forma irregular; la utilización del sistema API 20CAUX permitió identificar los 3 cultivos como *Prototheca wickerhamii*. Los 3 aislados fueron a sensibles a Anfotericina B, solo 2 fueron sensibles a 5-Fluocitosina y resistentes a Itraconazol, el efecto del Fluconazol fue variable.

### Conclusión

Se observó prototecosis en uñas de pacientes diabéticos, solo en un caso se presentaron además dermatofitos. En este trabajo *Prototheca wickerhamii* tuvo una frecuencia de 1.5%.

### Bibliografía

Galan, F., P. Garcia-Martos, M. Palomo, M. Beltran, J. Gil, and Mira. Onychoprotothecosis due to *Prototheca wickerhamii*. Mycopathologia. 137:75-77.

Las-Flörl C. and Mayr A. Human Protothecosis. Clinical Microbiology Reviews 20(2)230-242.

## INDICE DE AUTORES

<b>Andaluz, E.</b> Universidad de Extremadura.	<b>P23</b>	<b>Cantón, E.</b> Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Valencia.	<b>P3, P20</b>
<b>Argüelles, J.C.</b> Área de Microbiología. Universidad de Murcia. Murcia. arguelle@um.es.	<b>PI, PI8</b>	<b>Carrasco, G.</b> Laboratorio de Taxonomía, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España.	<b>P21</b>
<b>Arnabat-Domínguez, J.</b> Departamento de Odontoestomatología. Facultad Odontología. IDIBELL. Universidad de Barcelona. josepamabat@ub.edu.	<b>SI-PI</b>	<b>Casanova, M.</b> Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Farmacia, Universitat de València/Estudi General (UVEG), Valencia.	<b>P3, P4</b>
<b>Baquero, F.</b> Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.	<b>Conferencia Inaugural</b>	<b>Castillo Agudo, L.</b> Unidad de Investigación GMCA, Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Farmacia Universidad de Valencia, Valencia.	
<b>Barcena, I.</b> Wirchow Institute. University of Würzburg.	<b>PI I</b>	<b>Chauhan, N.</b> ICPH, UMDNJ- New Jersey, Medical School	<b>P23</b>
<b>Blanco Roca, M.T.</b> Departamento de Ciencias Biomédicas. Microbiología. Universidad de Extremadura. Badajoz. CIBERbbn, Badajoz.	<b>SIV-PI</b>	<b>Cívicos, C.</b> Departamento de Microbiología y Genética. IMB, CIETUS. Universidad de Salamanca. Salamanca, carloscivicos@usal.es.	<b>P6, P8</b>
<b>Benz, R.</b> Jacobs University, Bremen.	<b>PI I</b>	<b>Corcuera, M<sup>a</sup> T.</b> Unidad de Anatomía Patológica. Hospital Carlos III. Madrid. mcorcuera.hcii@salud.madrid.org	<b>SIV-P3</b>
<b>Blanc, V.</b> Dentaid, S.L. Cerdanyola del Vallès, España. blanc@dentaid.es	<b>P2</b>	<b>Delgado Rastrollo, M.</b> Departamento de Ciencias Biomédicas. Microbiología. Universidad de Extremadura. Badajoz. CIBERbbn, Badajoz.	<b>SIV-PI</b>
<b>Blanes, R.</b> Departamento de Microbiología y Ecología. Facultad de Farmacia, Universitat de València/Estudi General (UVEG), Valencia. m.rosario.blanes@uv.es	<b>P3, P4, PI2</b>	<b>Domenech, M.</b> Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Madrid. mirid@cib.csic.es.	<b>P7</b>
<b>Blázquez, M.A.</b> Universidad de Valencia, Valencia.	<b>PI0</b>	<b>Domínguez, A.</b> Departamento de Microbiología y Genética. IMB, CIETUS. Universidad de Salamanca. Salamanca. ado@usal.es.	<b>P4, P6, P8, PI3, SIII-P3</b>
<b>Calvo, E.</b> Unidad de Proteómica. Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid.	<b>P5</b>	<b>Durán, L.</b> Departamento de Microbiología y Genética. IMB, CIETUS. Universidad de Salamanca. Salamanca. laudupri@usal.es.	<b>P6, P8</b>
<b>Caminero, A.</b> Unidad de Investigación GMCA, Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia, Valencia.	<b>P5</b>		
<b>Campa, A.G. de la</b> Centro Nacional de Microbiología y CIBERes, ISCIII, Madrid.	<b>PI0</b>		

- Espinosa, A.P.** P24  
Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla de México. paula.espinosa@icbuap.buap.mx
- Eraso, E.** P19  
Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea, Bilbao.
- Fabrizi, S.** P2  
Facultad de Odontología Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Fernández Calderón, C.** SIV-PI  
Departamento de Ciencias Biomédicas. Microbiología. Universidad de Extremadura. Badajoz. CIBERbbn, Badajoz.
- Ferrándiz, M.J.** P10  
Centro Nacional de Microbiología y CIBERes, ISCIII, Madrid.
- Figuero Ruiz, E.** SI- P4  
Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial Facultad de Odontología. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Fuentes-Edfuf, C.** P15, P16, P17  
Departamento de Microbiología y Parasitología, Edif. CIBUS-Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
- Fuste, E.** P9, P22  
Laboratory of Molecular Microbiology and Antimicrobials. Dept. Pathology and Experimental therapeutics. Faculty of Medicine. IDIBELL. University of Barcelona. esterfuste@gmail.es
- García, E.** P7, P14  
Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, España. e.garcia.cib.csic.es
- García, J.M.** P20  
Unidad de Investigación GMCA, Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia, Valencia.
- García, M.T.** P10  
Centro Nacional de Microbiología y CIBERes, ISCIII, Madrid. mtgares@isciii.es.
- García, P.** P1, P14  
Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid.
- García-González, P.** P15, P16  
Departamento de Microbiología y Parasitología, Edif. CIBUS-Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
- García-Lamas, N.** P15, P16  
Departamento de Microbiología y Parasitología, Edif. CIBUS-Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
- García-Peñarrubia, P.** P18  
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular (B) e Inmunología, Facultad de Medicina. Universidad de Murcia.
- García-Prieto, F.** P23  
Universidad de Extremadura. fatgp@unex.es
- García Rodríguez, J.A.** Conferencia de Clausura  
Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y M.M. Universidad de Salamanca.
- Garrido, N.** P21  
Laboratorio de Taxonomía, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.
- Gelis, S.** P5  
Unidad de Investigación GMCA, Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Farmacia Universidad de Valencia, Valencia.
- Gómez, M.** P4, P20  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universitat de València/Estudi General (JVEG), Valencia.
- Gómez Aguado, F.** SIV-P3  
Unidad de Anatomía Patológica. Hospital Carlos III. Madrid.
- Gómez García, A.C.** SIV-PI  
Departamento de Ciencias Biomédicas. Microbiología. Universidad de Extremadura. Badajoz. CIBERbbn, Badajoz.
- Gómez Gómez, J.V.** P24  
Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. México.
- González-Párraga, P.** P1  
Área de Microbiología. Universidad de Murcia. Murcia.
- Hermoso, J.A.** P10  
Instituto Rocasolano, CSIC, Madrid,
- Iglesias-Losada, J.** P19  
Servicio de Medicina de Familia, Centro de Salud de Gorliz-Plentzia, Plentzia.
- Imbert Palafox** P24  
Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. México
- Jiménez-Galisteo, L.** P9, P11, P22  
Laboratory of Molecular Microbiology and Antimicrobials. Dept. Pathology and Experimental therapeutics. Faculty of Medicine. IDIBELL. University of Barcelona.
- Larriba, G.** SII-PI, P23  
Departamento de Ciencias Biomédicas. Área de Microbiología. Facultad de Ciencias. Badajoz. glarriba@unex.es.
- León, R.** SI-P3  
Departamento de I+D+I. DentaId. Barcelona.
- López, J.** SI-P5  
Dept. Odontología. Facultad de Odontología. IDIBELL. Universitat de Barcelona. Barcelona
- López, J.A.** P5  
Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid.

min at 30000 rpm and 21°C. Pellets were resuspended in 2 ml of SLS 1% in HEPES 10 mM pH 7.4, and suspensions incubated at RT for 20 min. Sedimentation of outer membranes was done at 30000 rpm for 60 min and pellets resuspended in sample buffer.

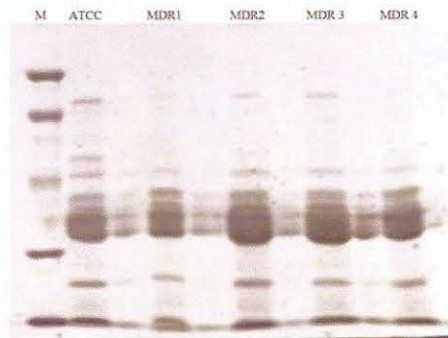
Proteins were resolved in SDS-PAGE electrophoresis using a modification of the Laemmli method. OMPs were compared with a size standard marker purchased by Biorad (USA).

**Bioassay for the measurement of meropenem accumulation.** Long rods cells of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 formed in the presence of 4 x meropenem MIC and short rods from cultures without antibiotic were washed with PBS ph 7.4 and resuspended in 30 ml of the same buffer. The total protein of both samples was equalled by BCA™ Protein Assay Kit and meropenem was added in a final concentration of 1 µg/ml while cells were centrifuged at 13000 rpm for 1 min. The supernatant was used for the measurement of the meropenem unable to penetrate inside the cells.

Measures were done using a meropenem susceptible strain of *Escherichia coli*. The standard curve ranged from 25 to 0 ng/ml of meropenem. After incubation of samples at 37°C for approximately 2 hours, the optical density at 550 nm was measured. Optical densities of unknown samples were extrapolated to the standard curve to obtain the quantity of meropenem inside and outside of long or short *P. aeruginosa* cells.

**Results.**

The analysis of OMP from *P.aeruginosa* MDR strains in comparison to OMP from *P. aeruginosa* ATCC 27853, revealed the existence of slight differences which cannot explain in principle the marked differences in susceptibility



Accumulation of meropenem, in contrast, revealed marked differences between regular bacilli and “filamentous” bacteria.

	Meropenem accumulation (µg/ml)
Long rods	90
Short rods	77

This morphological changes can contribute to explain lack of success of antibiotic treatment, since long rods can survive to treatment and be the origin of recidivisms when “normal” morphology is restored.

**NUEVOS ANTIBIÓTICOS FRENTE A LA DNA TOPOISOMERASA I DE *Streptococcus pneumoniae***

**M.T. García<sup>1</sup>, M.A. Blázquez<sup>2</sup>, M. J. Ferrándiz<sup>1</sup>, M. J. Sanz<sup>2</sup>, N. S. Martín<sup>3</sup>, J.A. Hermoso<sup>3</sup>, and A. G. de la Campa<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Centro Nacional de Microbiología y CIBERes, ISCIII, Ctra Mahadahonda-Pozuelo km 2, Madrid, España; <sup>2</sup> Universidad de Valencia, Avda. Blasco Ibañez 13, Valencia, España; <sup>3</sup> Instituto. Rocasolano, CSIC, C/ Serrano 117, Madrid, España.  
e-mail: mtgares@isciii.es

La resistencia a antimicrobianos es un serio problema clínico y de salud pública a nivel mundial desde hace años. Este problema afecta a *Streptococcus pneumoniae*, uno de los principales patógenos humanos y el principal agente etiológico de las neumonías comunitarias. La resistencia de *S. pneumoniae* a antibióticos β-lactámicos y macrólidos se ha extendido en todo el mundo en las dos últimas décadas. Actualmente, fluoroquinolonas como levofloxacin y moxifloxacin son alternativas terapéuticas para el tratamiento de estas infecciones. A pesar de que la resistencia a fluoroquinolonas en *S. pneumoniae* es actualmente inferior al 3%, es esperable un incremento de las mismas. La búsqueda de nuevos antimicrobianos, preferentemente para dianas diferentes, se hace imprescindible para prevenir el problema.

Las DNA topoisomerasas son enzimas esenciales que controlan el mantenimiento de la topología del DNA, vital en los procesos de replicación, transcripción y recombinación. En *S. pneumoniae* existen dos de tipo II (gyrasa y topoisomerasa IV) y una de tipo I (topoisomerasa I, TopA). Las topoisomerasas de tipo II son diana de fluoroquinolonas. Sin embargo, hasta la fecha, no se habían descrito antibióticos eficaces frente a topoisomerasas de tipo I. La actividad enzimática de TopA se basa en la ruptura de una de las hebras del DNA para formar un intermedio covalente mediante un enlace fosfodiéster entre una tirosina del dominio catalítico de la enzima y un extremo 3'-OH del DNA roto. Una vez modificada la topología del DNA, la enzima cambia de conformación, permitiendo la liberación del DNA del

complejo y la posterior religación de sus extremos. El resultado final de esta actividad enzimática es la relajación de DNA debido a la eliminación de vueltas de superenrollamiento negativo. El presente estudio caracteriza por primera vez la topoisomerasa I de una bacteria patógena Gram positiva e identifica dos alcaloides sintéticos fenantrénicos como inhibidores de la DNA topoisomerasa I de *S. pneumoniae* a dosis inhibitorias del crecimiento bacteriano.

Para ello se sobreexpresó y purificó la TopA tras clonar el gen *topA* en *E. coli*, e inducir su expresión como una proteína de fusión con una cola de 6 Histidinas en su extremo N-terminal. Después se comprobó la actividad de la enzima relajando DNA plasmídico con superenrollamiento negativo y se caracterizó mediante su modelado molecular en base a la estructura cristalográfica ya conocida de su homóloga de *E. coli*.

Tras sintetizar 18 alcaloides aporfirínicos y fenantrénicos, se determinó su actividad antibacteriana (Concentración Mínima Inhibitoria) y se estudió su efecto sobre la actividad de TopA. Dos de estos compuestos, seconeolitsina y N-metilseconeolitsina, fueron capaces de inhibir *in vitro* tanto la actividad de la enzima como el crecimiento bacteriano a dosis de 17  $\mu$ M.

Para comprobar el papel de la TopA como diana de los dos compuestos mencionados, el gen *topA* se clonó en *S. pneumoniae* bajo el control de un promotor regulable por maltosa, y se observó cómo la inhibición ejercida por la seconeolitsina en el crecimiento bacteriano disminuía bajo condiciones de inducción. Por otra parte, se analizó el nivel de superenrollamiento de un plásmido interno después de tratamientos con seconeolitsina mediante electroforesis de geles bidimensionales de agarosa con cloroquina. La protección que confiere la sobreexpresión de TopA a la inhibición del crecimiento y el superenrollamiento negativo de plásmidos tras tratamientos con el inhibidor, confirman el papel *in vivo* de la TopA como diana de los compuestos analizado.

Los estudios de Docking de la enzima con los inhibidores mencionados permiten sugerir que el mecanismo de inhibición se basa en fuertes interacciones entre los alcaloides y el sitio de unión de DNA de TopA cuando ésta se encuentra en conformación cerrada. Esto supone el bloqueo del mecanismo de apertura de la enzima que se requiere para la actividad enzimática.

P11

## PORIN-LIKE PROTEINS FROM *Gordonia jacobaea*

**Jimenez Galisteo L<sup>1</sup>, Ruiz-Martinez L<sup>1</sup>, Barcena I<sup>2</sup>, Benz R<sup>3</sup>, Viñas M<sup>1</sup>.**

*1. Laboratory of Molecular Microbiology and Antimicrobials, Dept. Pathology and Experimental therapeutics, Faculty of Medicine, IDIBELL University of Barcelona. 2. Wirchow Institute, University of Wurzburg. 3. Jacobs University, Bremen.*

*Gordonia* is a genus of gram positive bacteria, belonging phylogenetically to the CNM group of actinomycetes (*Corynebacterium*, *Nocardia* and *Mycobacterium*), which synthesise large amounts of mycolic acids (MAs). *Gordonia jacobaea* is a non-spore forming and catalase positive bacillus that has the capacity to accumulate canthaxanthin, as well as other pigments. *G. jacobaea* was isolated and identified for the first time by the group of TG.Villa at the Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy at the University of Santiago de Compostela.

The genus *Gordonia* includes around 20 species. The interest of isolation of such species was due to their abilities to produce carotenoids and other substances, their ability to degrade xenobiotics, and environmental pollutants, or otherwise slowly biodegradable natural polymers as well as to transform or synthesize eventual useful compounds. Other species were isolated also as a possible opportunistic pathogens for humans, either in immunocompromised and immunocompetent patients. *Gordonia terrae* has been considered to be a cause of primary cutaneous infection, and *Gordonia aichiensis*, *Gordonia bronchialis* and *Gordonia rubropertincta* have been isolated from sputum specimens of patients with pulmonary disease. *Gordonia sputi* was also isolated from the sputa of patients with chronic pulmonary diseases.

The cell envelope of these Gram-positive bacteria is extremely hydrophobic and forms a strong permeability barrier resulting in a high resistance to most common antibiotics and chemotherapeutic agents. Small hydrophilic solutes diffuse through pore-forming proteins that resemble the function of gram-negative bacterial porins with much lower efficiency compared to *E. coli*. This is presumably because the cell wall channels of these organisms are deeply buried within an outer lipid layer based on MAs (and other lipids), which means that these proteins have highly hydrophobic properties.

The bigger SDS-PAGE band (Gjp100) was eluted from the gel and incubated at 37 ° for 30 minutes and analyzed one more time by SDS-PAGE, it showed a band of approximately 100 kDa, whereas the same eluted treated at 100° for 5 and 10 minutes showed one band of approximately 30 to 35 kDa, suggesting that the band of 100 kDa could consist of a single protein formed by 3 monomers about 30 to 35 kDa.

Most prominent electrophysiological properties were determined by using artificial black Planar Lipid Bilayers following the method described by Benz and co-workers. Pores formed by Gjp100 of wild-type and MV26 strains were analysed. Gjp100 forms channels in the lipid bilayer when it is in the oligomeric form. Figure shows single-channel recordings of Gjp100 derived from the MV26 strain at 1M KCl.

We have measured conductance values of 1 nS in KCl 1M, and we observed there peaks with maximal proportion of conductance at 1, 2 and 3 ns, these results could again indicate that the extract of Gjp100 could contain a trimeric pore-forming protein.

There was no dependence on voltage on the extract obtained from band of Gjp100.

The selectivity of Gjp100 was also studied by zero current membrane potential measurements in the presence of KCl gradients. Five-fold KCl gradients (100 mM versus 500 mM) were established across lipid bilayer membranes in which ca. 100–1000 channels were reconstituted. The gradients resulted in an asymmetry potential of ca. 80 mV at the more dilute side for Gjp100 from the two sources (mean of three measurements each). This result indicated little preferential movement of potassium ions over chloride ions through the channel at neutral pH. The zero current membrane potentials were analysed using the Goldman-Hodgkin-Katz equation. The ratio of the potassium permeability, PK, divided by the chloride.