

# Patología

## DIVERSIDAD GENÉTICA Y FACTORES DE PATOGENICIDAD PRESENTES EN DIFERENTES CEPAS DE *Staphylococcus Aureus* PROCEDENTES DE LESIONES DE CONEJO Y SU RELACIÓN CON LA VIRULENCIA.

### Relationship between genetic diversity and virulence of different stocks of *Staphylococcus Aureus* in rabbits.

Viana, D.<sup>1</sup>; Selva, L.<sup>1</sup>; Segura, P.<sup>1</sup>; Peris, B.<sup>1</sup>; Penadés, J.R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Atención Sanitaria, Salud Pública y Sanidad Animal (Histología y Anatomía Patológica), Universidad Cardenal Herrera-CEU, 46113 Moncada, Valencia; <sup>2</sup>Centro de Investigación y Tecnología Animal. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Apdo 187. Polígono La Esperanza, 100. 12400 Segorbe. Castellón. Spain. Moncada, Valencia.

**Correspondencia:** Juan Manuel Corpa Arenas. jmcorpa@uch.ceu.es

#### RESUMEN

*Staphylococcus aureus* es un patógeno muy versátil capaz de producir un amplio espectro de enfermedades en un gran número de hospedadores. En la especie cunícola produce una inflamación supurativa en prácticamente todos los órganos y localizaciones y, con frecuencia, una septicemia fatal. Se estudiaron 329 aislados de *S. aureus* procedentes de casos clínicos de 39 granjas cunícolas de la Comunidad Valenciana. Se realizó su tipado molecular, utilizando como criterio de selección el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del producto de PCR del gen de la coagulasa, de la proteína A y del clumping factor B, obteniéndose 16 tipos diferentes de *S. aureus*. De estos aislados se seleccionaron 38 cepas representativas de cada tipo molecular y lesión de procedencia. Se analizaron por PCR diferentes genes implicados en la patogenia de *S. aureus*, comprobándose que cepas del mismo tipo molecular mostraban semejanza en los factores de patogenicidad, independientemente del tipo de lesión de procedencia, implicando una gran variabilidad. Esta falta de relación entre las lesiones producidas por las diferentes cepas y su arsenal genético podría indicarnos o bien que los factores de patogenicidad no tienen implicación directa en las lesiones o, lo más probable, que la inmunidad del hospedador juega un importante papel en la patogenia del proceso.

#### ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is a common pathogen that colonizes and produces disease in a variety of host. In rabbits this bacteria cause suppurative inflammatory reaction in practically all organs and locations and, frequently, fatal septicaemia. Three hundred twenty-nine *S. aureus* isolates coming different purulent lesions were studied. The animals came from 39 industrial rabbitries located in

several villages of the Valenciana Autonomous Region on the Spanish Mediterranean coast. Molecular typing was performed using the polymorphism in the length of fragments after the PCR product restriction of coagulase, A protein and clumping factor B gene as selected criteria. Sixteen different *S. aureus* strains were obtained. Thirty-eight isolates representative of each molecular and origin lesion type were selected and different genes implied in pathogenesis from *S. aureus* were analyzed by PCR, verifying itself that stocks of the same molecular type showed similarity in the virulence factors, independently of the type of origin lesion, implying a great variability. This lack of relation between the lesions produced by the different stocks and their genetic arsenal could indicate to us or that the virulence factors do not have direct implication in the lesion or, most provable, than the immunity of the host plays an important role in disease pathogenesis.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, rabbit, typing, pathogenic genes, virulence factors.

## ■ INTRODUCCIÓN

*Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva, patógena oportunista, que se encuentra en el aire, polvo, aguas residuales, leche, superficies ambientales, así como piel y mucosas de humanos y animales, siendo éstos los principales reservorios. Su habilidad para persistir y multiplicarse en diferentes ambientes junto con su capacidad para producir una gran variedad de exoproteínas le convierten en un patógeno muy versátil capaz de producir un amplio espectro de enfermedades en un gran número de hospedadores. Esta habilidad se debe a la expresión de una batería de factores de virulencia que promueven la adhesión, adquisición de nutrientes y evasión de la respuesta inmune del hospedador (Monday et al., 1999). *S. aureus* suele infectar piel y tejidos blandos, desde los cuales puede invadir la sangre y producir cuadros graves de sepsis, neumonía, endocarditis o llegar hasta las articulaciones o el hueso y producir artritis u osteomielitis. En la especie cunicola infecta lesiones dérmicas e invade tejidos subcutáneos causando diferentes lesiones: pododermatitis, abscesos (subcutáneos o afectando a órganos internos) y mamitis (Vancraeynest et al., 2004; Segura et al., 2006, en prensa). Se ha comprobado que las lesiones purulentas producidas por *S. aureus* son la principal causa patológica de desvieje de conejas en las granjas industriales (Segura et al., 2006, en prensa). Los componentes bacterianos y productos secretados que influyen en la patogénesis de las infecciones por *S. aureus* son muchos: adhesinas asociadas a superficie, una cápsula polisacárida, exoenzimas y exotoxinas. Esta constelación de productos bacterianos le permite adherirse a membranas eucariotas, resistir a la opsonofagocitosis, lisar células eucariotas y desencadenar cascadas de moléculas inmunomoduladoras por parte del hospedador. Hasta el momento, se desconoce el papel que juegan todos estos factores de patogenicidad bacterianos y el hospedador en el desarrollo de la patogenia de la enfermedad.

El objetivo del presente trabajo fue comparar aislados de *S. aureus* de conejo procedentes de diferentes lesiones, buscar una relación entre los aislados y las lesiones que éstos producen y estudiar la relación entre los diferentes factores de patogenicidad presentes en *S. aureus* y la virulencia.

## ■ MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio partimos de 329 aislados de *S. aureus* procedentes de casos clínicos de 39 granjas de la Comunidad Valenciana. Las muestras procedieron de diferentes lesiones purulentas y se cultivaron en agar sangre en aerobiosis durante 24-48 horas. Posteriormente se procedió a extraer el DNA genómico de *S. aureus* empleando los métodos recogidos en la bibliografía (Sambrook et al, 2001).

Posteriormente se realizó el tipado molecular de los 329 aislados, utilizando como criterio de selección el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del producto de PCR del gen de la coagulasa (*coa*), de la proteína A (*spa*) y del clumping factor B (*clfB*) (Shopsin et al., 2000, Koreen et al., 2005). El producto de PCR (5  $\mu$ ) se analizó en un gel de agarosa al 2%. El resto de PCR del gen de la *coa* y *spa* se digirió con el enzima de restricción *CfoI*, durante 3 horas a 37°C, analizándose en un gel de agarosa al 2%. La digestión del producto de PCR permitió discernir mejor entre las distintas cepas.

De estos aislados se seleccionaron 38 cepas representativas de cada tipo molecular y lesión de procedencia, analizándose por PCR diferentes genes implicados en la patogenia de *S. aureus* (Tabla 1). El resultado de la PCR se analizó en un gel de agarosa al 1%. Aquellos resultados dudosos obtenidos por PCR se volvieron a analizar mediante Southern: el DNA genómico de las diferentes cepas se digirió con el enzima de restricción *HindIII* y posteriormente se cargó en un gel de agarosa al 0.8% para transferirlo a una membrana de nylon y poder marcarlo con una sonda específica de cada gen analizado.

## ■ RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis del producto de PCR del gen de la *coa* y su posterior digestión con *CfoI*, establece 5 tipos diferentes de *S. aureus*: A-A, B-B, C-C, D-D y B-E (Figuras 1 y 2). Dichos análisis para la proteína A, establecen los siguientes tipos: 1-1, 2-2, 2-6, 2-7, 3-3, 4-4 y 4-5 (Figuras 3 y 4). El análisis resultante para el *clfB* establece 5 tipos: I, II, III, IV y V (Figura 5). En total se obtienen 16 tipos diferentes de *S. aureus*: AA22IV, AA22V, AA33IV, BB11I, BB11IV, BB44I, BB45I, BB45II, BB45III, BE44IV, CC11II, CC11III, CC26III, DD27I, DD44I, DD45I, siendo el tipo AA22IV el más frecuentemente aislado (Tabla 2).

Tras el análisis por PCR de los diferentes determinantes patogénicos se obtuvieron los siguientes resultados (Gráfica 1): nueve de los veinticuatro factores de patogenicidad estudiados (37.5%) resultaron ser más prevalentes que el resto, al aparecer en todas las cepas aisladas, independientemente del tipo molecular y del tipo de lesión. Estos nueve factores son: *clfA* y *clfB*, que codifican dos proteínas que se unen al fibrinógeno; *fnbA*, que codifica para una proteína que se une a la proteína A; *sdrC*, una adhesina putativa; *V8*, serina proteasa que contribuye a la supervivencia y crecimiento de *S. aureus*; *icaA*, utilizado como marcador del operón *ica*, implicado en la producción de biofilm; *map/eap*, que codifica para una proteína análoga a un complejo mayor de histocompatibilidad de clase II; *hlg*, que codifica para una gamma-toxina; *efb*, que codifica para una proteína que se une al fibrinógeno. Tres de los veinticuatro factores (12.5%) no aparecen en ninguno de los aislados cunicolas analizados. Estos determinantes son: *sea* y *seb*, dos enterotoxinas, y *tst*, una exoproteína productora del síndrome de shock tóxico. El resto de factores de patogenicidad (50%) fueron identificados en mayor o en menor medida, guardando relación con el tipo molecular de la cepa analizada e independientemente a la lesión de procedencia. Así, *cna*, *sdrD* y *sdrE* aparecían en prácticamente todos los aislados. *Cna* (91,4%), es una proteína que se une al colágeno, *sdrD* (85,7%) y *sdrE* (74,3%) pertenecen a la misma familia y son adhesinas putativas. En menor medida se detectó *fnbB* (40%), que codifica para una proteína de unión a la proteína B y tres enterotoxinas: *seg* (37%), *sei* (31.4) y *seh* (28.6%), con la peculiaridad de que *seg* y *sei* se identificaron, en la mayor parte de los aislados analizados, de forma conjunta; mientras que *seh* se identificó únicamente cuando no aparecían éstos. Finalmente, la enterotoxina *sec* (2,9%) sólo apareció en una de las cepas analizadas. En cuanto a los tipos capsulares se analizaron los dos serotipos más habituales: el serotipo

8 resultó presentarse más habitualmente (80%) que el serotipo 5 (14'3%). Además se analizaron dos subgrupos del locus *agr*, resultando el subgrupo *agr* III (42'9%) ligeramente más representado que el locus *agr* IV (37'1%).

Tras el análisis de los diferentes factores se comprobó que cepas del mismo tipo molecular mostraban semejanza en los factores de patogenicidad, independientemente del tipo de lesión de procedencia, implicando una gran variabilidad en los genes de virulencia entre las poblaciones naturales de *S. aureus*. Esta falta de relación entre las lesiones producidas por las diferentes cepas y su arsenal genético podría indicarnos o bien que los factores de patogenicidad habitualmente estudiados tanto en la especie cunicola como en otras especies incluida la humana, no tienen implicación directa en las lesiones o, lo más probable, que la inmunidad del hospedador juega un importante papel en la patogénica del proceso.

## ■ AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por sendos proyectos de investigación (GV05/202) de la Generalitat Valenciana (Consellería de Empresa, Universidad y Ciencia) y PRUCH05/09 de la Universidad Cardenal Herrera-CEU.

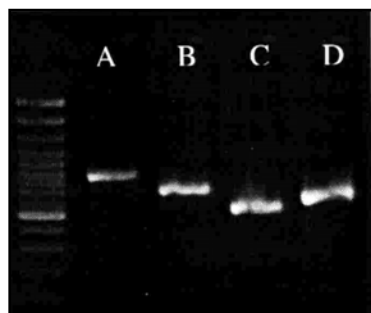
## ■ REFERENCIAS

- KOREEN, RAMASWAMY S.V., NAIDICH S., KOREEN I.V., GRAFF G.R., GRAVISS E.A., KREISWIRTH B.N. 2005. *Journal Clinical Microbiology*, 3985-3994
- MONDAY S.R., BOHACH G.A. 1999. Properties of *Staphylococcus aureus* enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1. In J.E. Alouf and J.H. Freer (ed.), 589-610.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor.
- SHOPSIN B., GOMEZ M., WADDINGTON M., RIEHMAN M., KREISWIRTH B.N. 2000. *Journal Clinical Microbiology*, 3453-3456
- VANCRAEYNEST D., HERMANS K., MARTEL A., VANECHOUTTE M., DEVRIESE L.A., HAESBROUCK F. 2004. *Veterinary Microbiology* 101: 245-51

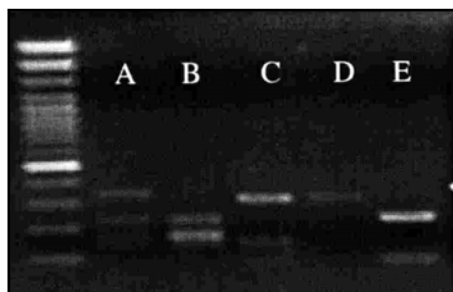
**Tabla 1.** Factores de patogenicidad empleados en el estudio.

Gen	Función	Gen	Función
<i>clfA</i>	Adhesin for fibrinogen	<i>ica A</i>	Polysaccharide intercellular adhsin
<i>clfB</i>	Adhesin for fibrinogen	<i>V8</i>	Serine proteasa
<i>fnbA</i>	Adhesin for fibronectin	<i>tst</i>	Ext toxin wit superantigen activity
<i>fnbB</i>	Adhesin for fibronectin	<i>sea</i>	Ext toxin wit superantigen activity
<i>cap 5</i>	Capsular polysaccharire type 5	<i>seb</i>	Ext toxin wit superantigen activity
<i>cap 8</i>	Capsular polysaccharire type	<i>sec</i>	Ext toxin wit superantigen activity
<i>map/eap</i>	Mejora histocompatibility complex class II analogue protein	<i>seg</i>	Ext toxin wit superantigen activity
<i>hlg</i>	Bicomponent leukocidin	<i>seh</i>	Ext toxin wit superantigen activity
<i>efb (fib)</i>	Binds to fibrinogen	<i>sei</i>	Ext toxin wit superantigen activity
<i>sdrC</i>	Putative shhesin	<i>cna</i>	Adhesin for collagen
<i>sdrD</i>	Putative shhesin	<i>agr III</i>	Global regulador
<i>sdrE</i>	Putative shhesin	<i>agr IV</i>	Global regulador

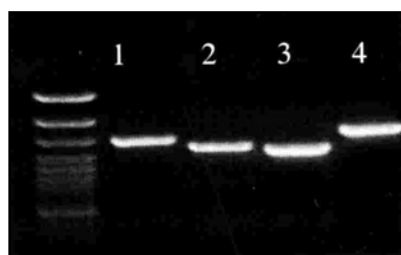
**Figura 1.** PCR del gen *coa*.



**Figura 2.** Digestión producto de PCR del gen *coa*



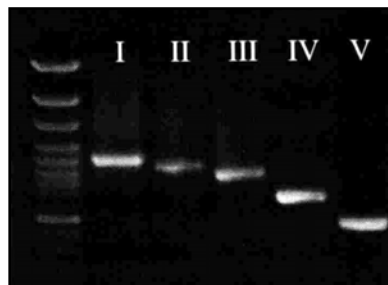
**Figura 3.** PCR del gen *spa*.



**Figura 4.** Digestión producto de PCR del gen *spa*.



**Figura 5.** PCR del gen *clfB*.



**Tabla 2.** Cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes lesiones en granjas cunícolas, tipadas por el gen *coa* y *spa*.

	MG	Pod	Abs	Oti	Pne	Pyo	Conj	Artritis	Costra	Pústula
<b>AA22</b>	159	39	23	2	9	1	8	1	4	4
<b>AA33</b>	6	3	3							
<b>BB11</b>	5						1			
<b>BB44</b>	4	12				1	1			
<b>BB45</b>	2	2		2						
<b>BE44</b>	1	2								
<b>CC11</b>	10	5	2	4			2		1	
<b>CC26</b>	1									
<b>DD27</b>		1								
<b>DD44</b>	2	1								
<b>DD45</b>		3					2			

**MG:** Mamitis; **Pod:** Pododermatitis; **Abs:** Absceso; **Oti:** Otitis; **Pne:** Neumonía; **Pyo:** Piómetra; **Conj:** Conjuntivitis.

**Gráfica 1.** Porcentaje de aparición de los diferentes factores.

