

Tipado de diferentes cepas de estafilococos implicados en lesiones purulentas en la especie cunícola

_____ B. Peris, P. Segura, J. Martínez, J. Ortega, J. Penadés y J.M. Corpa

PERIS, B.*; SEGURA, P.*; MARTÍNEZ, J.*; ORTEGA, J.*;
PENADÉS, J.** y CORPA, J.M.*

**Histología y Anatomía Patológica, Dpt. Atención Sanitaria, Salud Pública y Sanidad Animal.
**Dpt. Química, Bioquímica y Biología Celular. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud,
Universidad Cardenal Herrera - CEU, Edificio del Seminario, s/n. Moncada 46113. Valencia. Spain
Tel. 961369000 (ext 1374). Fax. 961395272*

Resumen

Se ha realizado un estudio sobre diferentes procesos patológicos de carácter purulento presentes en 14 granjas cunícolas de la provincia de Valencia. El germen que con mayor frecuencia se ha aislado de dichas lesiones ha sido *Staphylococcus aureus*. Tras el cultivo e identificación, se realizó el tipado molecular del mismo, utilizando como criterio de selección el polimorfismo en la longitud del gen de la coagulasa. Se han identificado cuatro cepas diferentes involucradas en la patología estudiada (A, B, C y D). Se ha observado que una misma cepa puede provocar distintos tipos lesionales. La cepa A fue la más frecuente en todas las explotaciones y en prácticamente todas las lesiones de tipo piógeno.

Abstract

A study has been carried out on the different pathological processes of purulent character present in fourteen rabbit farms in the area of Valencia. The germ that was most frequently isolated in these lesions was the *Staphylococcus aureus*. Following the cultivation and identification a typing of the gene was carried out, utilising as selection criteria the polymorphism in the length of the coagulasa gene. Four different strains have been identified as being involucrated in the pathology studied (A,B,C,D). It has been observed that the same strain is able to provoke different lesional types. The strain identified as A was the most frequently observed in all investigations and in practically all of the pyogenic lesions.

Introducción

El sector cunícola representa un 7% de la producción final agraria en la Comunidad Valenciana. El número total de granjas se halla alrededor de las 274 con un censo aproximado de 120.000 hembras. Las explotaciones se encuentran distribuidas mayoritariamente entre las provincias de Castellón y Valencia con un 45 y un 38 %, respectivamente, destacando determinadas comarcas, como son la Canal de Navarrés, y Hoya de Bunyol, en la provincia de Valencia, y el Maestrat y Alt Maestrat en Castellón, donde la cunicultura ocupa un puesto relevante sobre la ganadería de la zona. En el ámbito nacional, la comunidad Valenciana ocupa el tercer lugar, tras Cataluña y Galicia, en cuanto a número de animales y explotaciones censadas.

En los últimos años el sector cunícola ha sufrido un profundo cambio que ha repercutido tanto en la modernización de las granjas como en la adquisición de un elevado nivel de profesionalización del personal al cargo de las mismas. Esto ha permitido que las explotaciones hayan aumentado la densidad de reproductoras y de animales de cebo, con grandes tasas de reposición y con modelos de producción que conllevan una desmesurada utilización de jaulas, materiales, instalaciones e incluso de los propios animales, con el fin de lograr una mayor rentabilidad en la explotación y disfrutar, por parte del ganadero, de una mayor calidad de vida.

Todos estos factores (cambios de manejo, incremento de productividad, cambios ecológicos, empleo de inmunodepresores y anabolizantes nutricionales, estrés ambiental, uso injustificado de antibióticos, etc) están condicionando el curso de diversos procesos patológicos y contribuyen a crear nuevas situaciones morbosas.

Actualmente las estafilococias suponen, en la cunicultura industrial, un proceso patológico de enorme interés ya que se encuentra instaurado, en mayor o menor medida, en la práctica totalidad de las granjas y origina una medicación, en ocasiones, excesiva, provocando multitud de resistencias en los animales.

El objetivo de este estudio es identificar y caracterizar los diferentes tipos de cepas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) implicadas en lesiones de carácter purulento y su asociación con diversos cuadros patológicos presentes en explotaciones cunícolas de la provincia de Valencia.

Material y métodos

Animales

Se han estudiado 295 conejas que presentaban lesiones de carácter purulento en diferentes localizaciones, procedentes de 14 explotaciones cunícolas localizadas en la provincia de Valencia.

Toma de muestras

Los animales fueron sacrificados mediante inyección intracardiaca de barbitúrico (Dolethal ®). Tras ejecutar la necropsia ordenada, sistemática y completa, se realizó el examen macroscópico de todos los tejidos con especial atención a aquellos que mostraban evidencias de sufrir un proceso de naturaleza piógena. Se tomaron muestras de los mismos mediante torundas estériles y se fijaron en formol aquellos órganos afectados, para su posterior estudio microscópico.

Microbiología

Las muestras obtenidas fueron sembradas en medios con agar-sangre y agar-McConkey e incubadas a 37°C durante 16-18 horas. Los aislados fueron identificados como *S. aureus* (figura 1) por métodos microbiológicos clásicos (tinción Gram, prueba de catalasa y test de coagulasa mediante PCR).

Caracterización de las cepas de *Staphylococcus aureus*

La purificación del ADN genómico se llevó a cabo siguiendo los métodos utilizados habitualmente en la bibliografía para la extracción de ADN genómico de microorganismos Gram-positivos (Sambrook et al., 1989). Posteriormente se realizó el 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 (PCR-RFLP-coa) descrito por Hookey et al., 1998.

Antibiograma

Una vez aislada la bacteria de la muestra se evaluó su sensibilidad frente a diferentes antibióticos (Penicilina, Tetraciclina, Cefalexina, Gentamicina, Neomicina, Eritromicina y Espiramicina). Para ello se inoculó un tubo con TSB a partir de una colonia de aislado y se dejó crecer durante toda una noche. Se halló la concentración de bacterias en suspensión por ml mediante espectrofotometría (OD a 600 nm) y se ajustó con suero salino fisiológico estéril (Braun) hasta una concentración de 10⁶ bacterias/ml. Con esa suspensión se inoculó en superficie de forma uniforme y con torundas estériles una placa con el medio Mueller-Hinton (Oxoid). Posteriormente se añadieron discos comerciales (Biomérieux) impregnados con antibiótico (Penicilina G 10 UI, Cefalexina 30 mg, Gentamicina 10 mg, Neomicina 30 UI, Tetraciclina UI, Eritromicina 15 UI y Espiramicina 100 mg) y se incubó a 37 °C durante 20 horas. Tras este periodo de crecimiento se midió el halo de inhibición (figura 2).



Fig. 1. *S. aureus* en medio de un cultivo.



Fig. 2. Antibiograma. Halos de inhibición de diferentes antibióticos.

Resultados y discusión

Para la realización de este trabajo se han estudiado 295 conejas que mostraban lesiones de carácter purulento, procedentes de 14 explotaciones cunícolas. En varias ocasiones, un mismo animal mostraba diferentes procesos piógenos simultáneamente, por lo que finalmente se han examinado un total de 319 muestras (tabla 1). Tras el estudio microbiológico se ha aislado *S. aureus* de un 64,26 % de las muestras analizadas, siendo por lo tanto, el germen predominante en las lesiones de tipo purulento.

Tabla-1

Gérmes aislados de diferentes procesos patológicos de carácter purulento						
Lesión	Staphylococcus	Pasteurella	Staphylococcus + Pasteurella	Otros	No crecimiento	TOTAL
Mimitis	139	24	12	10	16	201
Pododermatitis	43	0	0	6	1	50
Abscesos	16**	31***	0	2	1	50
Plómetras	2	6	0	2	2	12
Neumonías purulentas	2	0	0	1	0	3
Heridas purulentas	2	0	0	0	0	2
Otitis purulentas	1	0	0	0	0	1
TOTAL	205	61	12	21	20	319

* Crecimientos no identificados, crecimiento de varios gérmes o contaminaciones.

** Localización de los abscesos: 8 subcutáneos, 4 internos, 2 mandibulares y 2 en piel.

*** Localización de los abscesos: 27 subcutáneos, 3 internos y 1 mandibular.

Una vez identificado *S. aureus* y demostrada la importancia de este microorganismo en la patología cunícola, se ha realizado un estudio pormenorizado basado únicamente en 93 animales infectados por *S. aureus*, de los cuales se obtuvieron un total de 115 muestras de diferentes lesiones de tipo purulento (tabla 2). De todas ellas, las mamitis (53% de las muestras estudiadas; figura 3), seguidas de las pododermatitis o "mal de patas" de carácter purulento (27% de las muestras estudiadas; figura 4) fueron las más frecuentes.

Tabla-2

Frecuencia y distribución de las muestras obtenidas de distintos procesos patológicos de carácter purulento producidos por <i>S. aureus</i>		
Lesión	Número	%
Mamitis	61	53
Pododermatitis	31	27
Conjuntivitis	8	7
Abscesos	6	5
Neumonías	3	3
Herida purulenta	2	2
Fetos momificados	1	1
Otitis purulenta	1	1
Cerumen	2	1
TOTAL	115	100

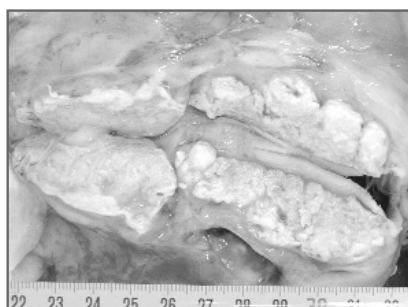


Fig. 3. Mamitis purulenta.



Fig. 4. Pododermatitis purulenta

Tras la identificación del microorganismo causante de la patología como *S. aureus*, se ha realizado el tipado molecular del mismo, utilizando como criterio de selección el polimorfismo en la longitud del gen de la coagulasa, a fin de identificar los distintos tipos de *S. aureus* causantes de patología cunícola en la Comunidad Valenciana. Como se observa en la tabla 3, se han identificado cuatro tipos de cepas diferentes (A, B, C y D) (figura 5). Trabajos previos realizados en la especie cunícola han descrito que esta especie puede ser infectada por distintas cepas de *S. aureus* (Hermans et al., 2003), aunque no siempre se encuentran involucradas todas ellas, como se pone de manifiesto en el presente trabajo, en el que únicamente se han identificado cuatro. El hecho de que únicamente se hayan estudiado 14 explotaciones situadas, todas ellas, en la provincia de Valencia también es un factor a tener en cuenta ya que podría existir una distribución geográfica del microorganismo, o incluso, una distribución condicionada por los flujos de movimiento de reproductoras de unas explotaciones a otras. Por lo tanto, sería conveniente ampliar este estudio a otras provincias más alejadas geográficamente.

Tabla-3

Presencia de las diferentes cepas de S. aureus aisladas de distintas lesiones de carácter purulento en las explotaciones estudiadas				
Explotación	Tipo A	Tipo B	Tipo C	Tipo D
I	Mamitis: 3 Otitis extrema: 1			
II		Mamitis: 4 Pododermatitis: 3		
III	Mamitis: 3 Pododermatitis: 1			
IV	Conjuntiva: 1		Mamitis: 1 Pododermatitis: 1 Conjuntiva: 1 Herida purulenta: 1	
V	Mamitis: 8 Pododermatitis: 2 Conjuntiva: 4 Absceso: 1 Neumonías: 2	Pododermatitis: 1 Cerumen: 2		
VI	Mamitis: 1		Mamitis: 2 Pododermatitis: 2	
VII	Mamitis: 4 Pododermatitis: 1			
VIII	Mamitis: 6 Pododermatitis: 2			Pododermatitis: 2
IX	Mamitis: 1 Pododermatitis: 3			
X	Mamitis: 27 Pododermatitis: 3 Abscesos: 3			
XI	Mamitis: 1 Pododermatitis: 2 Absceso: 1			Pododermatitis: 2
XII	Mamitis: 2 Pododermatitis: 2 Neumonía: 1			Mamitis: 1 Conjuntiva: 1
XIII		Mamitis: 2 Pododermatitis: 4 Conjuntiva: 1 Feto momificado: 1		
XIV	Mamitis: 4 Pododermatitis: 1		Mamitis: 1	

En cuanto a la distribución de los distintos tipos de cepas en las diferentes lesiones se ha observado que un mismo tipo de cepa produce diferentes lesiones (tabla 3), lo que supone una adaptación de la cepa a distintas condiciones de crecimiento en distintos órganos o tejidos. Esta característica no se ha descrito con anterioridad. De hecho, hasta la fecha se pensaba que las distintas cepas de *S. aureus* eran hospedador-específicas (Herron et al., 2002), e incluso órgano-específicas (Cucarella et al., 2001).

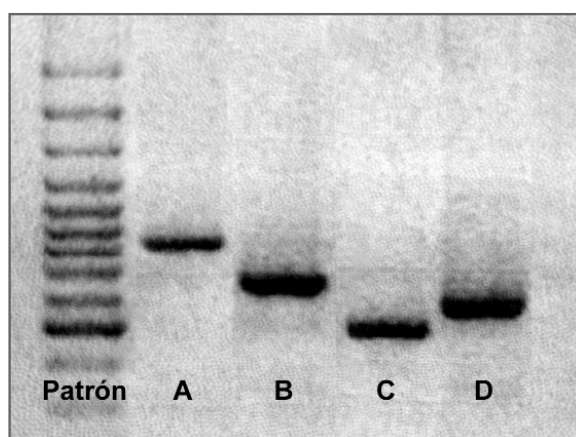


Fig. 5. Cepas de *S. aureus*.

En cuanto a la prevalencia, la cepa tipo A es la que se ha aislado con mayor frecuencia de las lesiones observadas (tabla 4). Esto podría indicar una mayor distribución de esta cepa en las explotaciones cunícolas estudiadas.

Tabla-4

Distribución de las cepas de <i>S. aureus</i> entre los distintos tipos lesionales					
Lesión	Número	Cepas			
		A	B	C	D
Mamitis	61	50	6	4	1
Pododermatitis	31	16	8	3	4
Conjuntivitis	8	5	1	1	1
Abscesos	6	6	0	0	0
Neumonías	3	3	0	0	0
Herida contaminada	2	1	0	1	0
Fetos momificados	1	0	1	0	0
Otitis purulenta	1	0	0	1	0
Cerumen	2	0	2	0	0
TOTAL	115	81	18	10	6

Respecto a la sensibilidad a los antibióticos, se ha observado un comportamiento irregular de la cepa A aislada de diferentes muestras, frente a la tetraciclina y penicilina. Este hecho puede ser provocado por un incremento de resistencia a estos fármacos ocasionada por un posible empleo crónico de los mismos; aunque también podría deberse a que haya modificaciones genotípicas dentro de una misma cepa, en este caso la A, que ocasionen estas diferencias.

Agradecimientos

Este estudio está financiado conjuntamente por la Universidad Cardenal Herrera -CEU (PRUCH02/25) y la Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalitat Valenciana.

Agradecemos la colaboración de todos aquellos cunicultores que, desinteresadamente, nos han cedido sus animales para la realización del presente estudio.

Bibliografía

CUCARELLA, C., SOLANO, C., VALLE, J., AMORENA, B., LASA, I., And PENADES, J.R. (2001) Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation. J Bacteriol 183: 2888-2896.

HERMANS, K., DEVRIESE, L.A., AND HAESEBROUCK, F. (2003) Rabbit staphylococcosis: difficult solutions for serious problems. Vet Microbiol 91: 57-64.

HERRON, L.L., CHAKRAVARTY, R., DWAN, C., FITZGERALD, J.R., MUSSER, J.M., RETZEL, E., AND KAPUR, V. (2002) Genome Sequence Survey Identifies Unique Sequences and Key Virulence Genes with Unusual Rates of Amino Acid Substitution in Bovine Staphylococcus aureus. Infect Immun 70: 3978-3981.

HOOKEY, J.V., RICHARDSON, J.F., AND COOKSON, B.D. (1998) Molecular Typing of Staphylococcus aureus Based on PCR Restriction Fragment Length Polymorphism and DNA sequence Analysis of the Coagulase Gene. J Clin Microbiol 36: 1083-1089.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., And MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. N.Y.: Cold Spring Harbor.