

**Universidad CEU-Cardenal Herrera**

Departamento de Producción Animal, Sanidad Animal y Ciencia y  
Tecnología de los Alimentos



**Estafilococia en conejos: relación entre  
genotipos, virulencia y lesiones**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por: D. David Viana Martín

Dirigida por: Dr. D. Juan Manuel Corpa Arenas

Dr. D. José R. Penadés Casanova

**VALENCIA  
2009**



Este trabajo ha sido realizado gracias a las ayudas de:

Ministerio de Ciencia e Innovación: Proyectos BIO2008-05284-C02-02,  
BIO2005-08399-C02 y AGL2008-00273/GAN.

Universidad Cardenal Herrera-CEU (PRUCH04/11, PRUCH05/9,  
PRUCH-B06/18, PRCEU-UCH01/08, PRCEU-UCH 23/08 y  
COPERNICUS CEU-UCH / SANTANDER).

Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Generalitat Valenciana (GV05/202).



## Índice

I. Introducción.....	1
1.1. Género <i>Staphylococcus</i> .....	3
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
1.3. <i>S. aureus</i> en conejos .....	4
1.4. Tipado molecular de <i>S. aureus</i> .....	6
1.5. Factores de virulencia y patogenia de <i>S. aureus</i> .....	11
1.6. Elementos genéticos móviles de <i>S. aureus</i> .....	17
II. Objetivos .....	19
III. Material y métodos .....	23
3.1. Animales estudiados.....	25
3.2. Estudios anatomopatológicos .....	27
3.2.1. Examen macroscópico.....	28
3.2.2. Estudio microscópico .....	28
3.2.3. Estudio inmunocitoquímico .....	28
3.2.4. Infección experimental .....	30
3.2.5. Análisis estadístico .....	31
3.3. Estudio microbiológico.....	32
3.4. Tipado de cepas de <i>S. aureus</i> .....	34
3.4.1. Purificación del ADN genómico.....	34
3.4.2. Caracterización molecular de cepas de <i>S. aureus</i> .....	34
3.4.3. Multilocus Sequence Typing (MLST).....	37
3.4.4. Método de secuenciación clásico de ADN .....	37
3.5. Análisis mediante PCR de factores de virulencia bacterianos.....	38
3.6. Análisis mediante Southern blot de factores de virulencia bacterianos .....	41
3.7. Metodología empleada para el estudio de la cepa IVIA-1 .....	41
3.7.1. Método de secuenciación de ADN mediante pirosecuenciación .....	41
3.7.2. Análisis <i>in silico</i> .....	42
3.7.3. Cepas, plásmidos, cebadores y medios utilizados en este estudio .....	42
3.7.4. Inducción de la respuesta SOS en la cepa IVIA-1.....	42
3.7.5. Introducción de un gen marcador en la cepa IVIA-1.....	43

3.7.6. Transducción .....	44
3.7.7. Plásmidos de fusión transcripcional.....	44
3.7.8. Ensayo enzimático para la cuantificación de actividad $\beta$ -lactamasa en plásmidos de fusión transcripcional.....	44
IV. Resultados .....	49
IV.1. Caracterización genotípica de cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de lesiones de conejo.....	51
4.1.1. Aislado bacteriano.....	53
4.1.2. Caracterización molecular de cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de conejo .....	53
4.1.3. Caracterización molecular de cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de otras especies.....	61
4.1.4. Análisis de la estabilidad del genotipo mediante los genes <i>coa/spa/clfB</i> ...	65
4.1.5. Resultados anatomopatológicos.....	67
4.1.6. Distribución de genes de virulencia entre aislados de <i>S. aureus</i> .....	70
4.1.6.1. Adhesinas.....	74
4.1.6.2. Toxinas.....	78
4.1.6.3. Otros genes de virulencia .....	82
IV.2. Caracterización inmunopatológica de mastitis cunícolas producidas por <i>S. aureus</i> .....	87
4.2.1. Caracterización macroscópica de casos naturales.....	89
4.2.2. Clasificación histomorfológica de casos naturales.....	90
4.2.2.1. Mastitis tipo abscesos .....	91
4.2.2.2. Mastitis tipo rosetas.....	92
4.2.2.3. Mastitis tipo sándwich.....	92
4.2.2.4. Mastitis tipo mixta .....	93
4.2.2.5. Otros hallazgos histopatológicos .....	93
4.2.2.6. Relación entre mastitis crónica y genotipo.....	93
4.2.3. Caracterización inmunocitoquímica de casos naturales .....	95
4.2.3.1. Mastitis tipo abscesos .....	95
4.2.3.2. Mastitis tipo rosetas.....	97
4.2.3.3. Mastitis tipo sándwich.....	97
4.2.3.4. Mastitis tipo mixta .....	98
4.2.4. Mastitis experimental.....	100

---

IV.3. Secuenciación de una cepa clínica de <i>S. aureus</i> aislada de conejo .....	105
4.3.1. Análisis <i>in silico</i> .....	108
4.3.2. Estudio del $\Phi$ IVIA-1 .....	109
4.3.3. Comparativa de la cepa IVIA-1 con otras cepas ST121 .....	115
V. Discusión .....	119
5.1 Caracterización genotípica de cepas de <i>S. aureus</i> .....	121
5.2. Distribución de genes de virulencia entre aislados de <i>S. aureus</i> .....	126
5.3. Caracterización inmunopatológica de mastitis cunícolas .....	134
5.4. Secuenciación de una cepa clínica de <i>S. aureus</i> aislada de conejo .....	141
VI. Conclusiones .....	145
VII. Iconografía .....	149
VIII. Bibliografía .....	165







## Abreviaturas empleadas

$\phi$	fago
aa	aminoácidos
ADN	ácido desoxirribonucleico
<i>att<sub>B</sub></i>	sitio de integración en el cromosoma bacteriano
<i>att<sub>L</sub></i>	sitio de integración izquierdo
<i>att<sub>R</sub></i>	sitio de integración derecho
<i>bla</i>	gen que codifica la $\beta$ -lactamasa
CD	antígeno de superficie de diferenciación leucocitaria (cluster of differentiation)
DLV	variante en dos alelos (doble locus variant)
DO <sub>(nm)</sub>	densidad óptica a una cierta longitud de onda (nm)
<i>egc</i>	grupo de genes que codifican enterotoxinas (enterotoxin gene cluster)
<i>erm</i>	eritromicina
ICQ	inmunocitoquímico-
IS	secuencia de inserción
kb	kilobase
LB	medio luria bertani
min	minuto
ml	mililitro
MLST	tipado mediante secuenciación multilocus (Multilocus Sequence Typing)
mM	milimolar
ng	nanogramo
nM	nanomolar
ORF	pauta abierta de lectura
<i>ori</i>	origen de replicación
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RFLP	análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism)
PBS	tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)

rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SaPI	isla de patogenicidad de <i>S. aureus</i>
SLV	variante en un alelo (single locus variant)
ST	secuencia tipo (sequence type)
<i>tetM</i>	gen que codifica resistencia a tetraciclina
TBST	tampon Tris salino con Tween 20 (Tris buffered saline with Tween 20)
TSA	medio tripticasa soja agar
TSB	caldo tripticasa soja
tsr	origen de replicación termosensible
U	unidad
UFC	unidades formadoras de colonia
UV	ultravioleta
Xgal	5-Bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosido
$\mu$ l	microlitro
$\mu$ g	microgramo
$\mu$ M	micromolar

# **I.- INTRODUCCIÓN**



# I.- INTRODUCCIÓN

## 1.1.- Género *Staphylococcus*

Los estafilococos son bacterias Gram-positivas que pertenecen a la familia Micrococcaceae. Tienen forma redondeada y se asocian formando agrupaciones irregulares o su forma típica de racimos de uva (Biberstein, 1994; Quinn, 1999). Los estafilococos tienen un diámetro de 0,5-1,5  $\mu\text{m}$ . No forman esporas y carecen de flagelo. Son bacterias catalasa positivas, anaerobias facultativas y utilizan los glúcidos tanto por oxidación como por fermentación. Soportan la desecación (sobre todo en los exudados) durante semanas; el calentamiento a temperaturas de incluso 60 °C durante 30 minutos; las fluctuaciones de pH entre los valores de 4 y 9,5; y las concentraciones de sal de 7,5 % (Biberstein, 1994).

La coagulasa, producida por algunas especies de este género, provoca la coagulación del plasma *in vitro* y permite la distinción entre *Staphylococcus* coagulasa positivos y negativos. Entre los *Staphylococcus* coagulasa positivos se encuentran diferentes especies patógenas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* y algunas cepas de *Staphylococcus hyicus* (Biberstein, 1994). Los dos *Staphylococcus* coagulasa negativos más comúnmente aislados, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*, actúan como comensales o se encuentran en el medio ambiente, considerándose hasta hace poco tiempo como no patogénicos. Sin embargo, en la última década el número de infecciones por *S. epidermidis* se ha incrementado alarmantemente debido a que junto con *S. aureus* es de las especies bacterianas más frecuentemente asociada a infecciones en implantes médicos (Costerton *et al.*, 1999). Por su parte, *S. saprophyticus* es un patógeno habitualmente responsable de infecciones urinarias, sobre todo en mujeres jóvenes (Ishihara *et al.*, 2001).

## 1.2.- *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* está considerado una de las especies bacterianas de mayor importancia, desde el punto de vista sanitario, tanto para el hombre como para los animales (Kloos, 1980).

Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y comúnmente está considerado como hospedador habitual de la piel (Kloos, 1980) y mucosas,

principalmente en la cavidad nasal (Peacock *et al.*, 2001; Wertheim *et al.*, 2005); encontrándose también en la mayoría de los productos de origen animal (Kloos, 1980).

La gran mayoría de las infecciones por esta bacteria provocan portadores asintomáticos. Por tanto, *S. aureus* constituye un agente oportunista, ya que requiere de factores predisponentes para originar patologías (Feil *et al.*, 2003).

En el hombre, el principal problema provocado por *S. aureus* tiene lugar en el ámbito hospitalario, siendo la causa más importante de infecciones nosocomiales (Jones, 2003). Más de 100 años después de que Ogston (1882) describiera en el hombre la enfermedad y la patogénesis de la formación de abscesos, la frecuencia de la adquisición de infecciones, tanto de origen hospitalario como de origen comunitario, ha ido en aumento. En los últimos años *S. aureus* ha adquirido una elevada importancia debido a la aparición de cepas con nuevas variantes virulentas y a la adquisición de resistencia a antibióticos, destacando los aislados resistentes a meticilina y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos (MRSA) (Boyce *et al.*, 2005; Sabat *et al.*, 2006) y a la vancomicina (Appelbaum, 2006). En humanos, provoca un amplio espectro de enfermedades, desde infecciones leves de la piel hasta endocarditis, shock tóxico y neumonía necrotizante (Tenover y Gayne, 2000).

*S. aureus* también es uno de los mayores patógenos en medicina veterinaria, afectando a diversas especies animales, infectándose un elevado número de explotaciones animales, implicando graves pérdidas económicas y suponiendo un riesgo de zoonosis. En los animales, *S. aureus* produce principalmente mastitis en rumiantes (Bergonier *et al.*, 2003; Barkema *et al.*, 2006), osteitis en pollos (McNamee *et al.*, 1998) y abscesos, pododermatitis y mastitis en conejos (Hermans *et al.*, 2003; Segura *et al.*, 2007; Corpa *et al.*, 2009), siendo el estudio de éstas últimas patologías uno de los puntos tratados en la presente tesis doctoral.

### **1.3.- *S. aureus* en conejos**

Los sistemas de producción de carne de conejo en Europa occidental han evolucionado hacia una creciente intensificación. En España, como en el resto de Europa, la modernización de la cunicultura comenzó en la década de los 50 con la utilización de jaulas metálicas, pero fue a finales de los 60 cuando tuvo un mayor impulso debido a la implicación de la industria de piensos compuestos en el proceso productivo (Rosell, 1996). Esto ocasionó un incremento en la densidad de

conejos en las granjas, lo que facilita la diseminación de los agentes infecciosos dentro de las mismas (Hermans *et al.*, 2003).

La estafilococia es una enfermedad que afecta comúnmente a conejos domésticos, a liebres y a conejos silvestres (Flatt, 1974; Kötsche y Gottschalk, 1974). Está causada por *S. aureus* y se caracteriza por una inflamación supurativa en prácticamente todos los órganos y localizaciones de los animales, destacando la mastitis y la pododermatitis, y, con frecuencia, por una septicemia fatal (Flatt, 1974).

En un estudio llevado a cabo por Rosell y de la Fuente durante los años 2000 a 2005 en 16 explotaciones, la principal causa de desvieje entre hembras reproductoras fue la baja productividad, seguida de la mastitis, la pobre condición corporal y la pododermatitis (Rosell y de la Fuente, 2009). En otro estudio realizado durante un año en hembras de desvieje procedentes de dos explotaciones, la principal causa de eliminación de animales fueron lesiones purulentas provocadas por *S. aureus*, siendo el patógeno más frecuentemente aislado de mastitis, abscesos y pododermatitis (Segura *et al.*, 2007). Por tanto, ya que la mastitis y la pododermatitis están causadas sobre todo por *S. aureus*, se puede considerar la estafilococia como uno de los principales problemas en explotaciones cunícolas.

La estafilococia afecta a la práctica totalidad de las explotaciones. *S. aureus* produce cuadros patológicos tanto a nivel local como sistémico, afectando a individuos en diversos estadios productivos. En las infecciones por *S. aureus* se pueden diferenciar dos cuadros patológicos característicos que afectan a un elevado porcentaje de conejos en una misma granja. Por una parte, la estafilococia de los gazapos lactantes, donde se suelen observar pequeños abscesos en piel, incluso a veces subcutáneos y en órganos internos, provocando cuadros subagudos y muerte del animal. Por otro lado están los procesos piógenos en maternidad y cebadero, donde la estafilococia se manifiesta en forma de mastitis, pododermatitis, abscesos subcutáneos y en órganos internos, rinitis-conjuntivitis y metritis (Rosell *et al.*, 2000; Peris y Corpa, 2003), siendo la mastitis producida por *S. aureus* una de las principales causas de eliminación en maternidad (Segura *et al.*, 2007; Corpa *et al.*, 2009). Ya que las hembras reproductoras constituyen el eslabón más importante de la cadena productiva, la aparición de patologías en hembras reproductoras puede afectar a la producción de la explotación puesto que

podría ser responsable de la mortalidad de conejos lactantes y de animales en cebo (Marcato y Rosmini, 1986; Quevedo *et al.*, 2003).

#### **1.4.- Tipado molecular de *S. aureus***

Las poblaciones naturales de *S. aureus* son muy heterogéneas (Tenover *et al.*, 1994; Kapur *et al.*, 1995). Además, algunos biotipos se consideran hospedador-específicos mientras que otros pueden colonizar diferentes hospedadores, por lo que se hace necesario investigar la relación entre las cepas de *S. aureus* de origen humano y animal (Hookey *et al.*, 1998). Se han descrito ecovares (biotipos específicos de hospedador) en humana, bovino, ovino y aves (Devriese, 1984). Por tanto, para poder controlar las infecciones de *S. aureus* y conocer los genotipos más prevalentes entre las diferentes especies resulta crucial realizar un tipado rápido y certero (Schumacher-Perdreau *et al.*, 1994; Strommenger *et al.*, 2008), que permita distinguir entre los distintos tipos de cepas.

Los métodos para tipar aislados de *S. aureus* pueden basarse en la caracterización fenotípica o en técnicas moleculares.

#### **Caracterización fenotípica**

Las técnicas basadas en la caracterización fenotípica más empleadas son la determinación de susceptibilidades a un panel antimicrobiano, el análisis del perfil de plásmidos y el fagotipado. Sin embargo, estos métodos tienen un bajo poder discriminatorio, son lentos y de bajo rendimiento (Tang *et al.*, 1997; Zaidi *et al.*, 2003). Debido al gran número de aislados de *S. aureus* que son sensibles a la mayoría de antibióticos testados o libres de plásmidos, el tipado mediante antibiograma y el análisis del perfil de plásmidos son poco adecuados para diferenciar aislados de *S. aureus* (Lange *et al.*, 1999). Por su parte, aunque hay ciertos fagotipos que predominan entre las cepas epidémicas (Marples y Reith, 1992), la asociación entre fagotipo y carácter epidémico de la cepa no es suficientemente rigurosa para utilizarla como valor predictivo. Además, en ocasiones es difícil conseguir los reactivos y determinados tipos de MRSA no son tipables mediante fagos (Blair y Williams, 1961; Bannerman *et al.*, 1995). Otro problema en el empleo de fagos para tipar cepas de *S. aureus* es que dos cepas pueden diferenciarse únicamente en un fago, dando lugar a dos cepas diferentes mediante el fagotipado. Esto es debido a que estos elementos genéticos pueden

transferirse horizontalmente entre cepas diferentes (Lindsay y Holden, 2004), confiriendo resistencia a la infección por fagos del mismo tipo (Weinbauer y Rassoulzadegan, 2004).

### **Técnicas moleculares**

En cuanto a las técnicas moleculares, es común el empleo de la electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE, "pulsed-field gel electrophoresis") como herramienta de discriminación entre cepas, siendo considerada la técnica de referencia. Se basa en perfiles de restricción conocidos, con la ventaja de que se pueden separar largas cadenas de ADN. Este método posee un gran poder de discriminación, pero a pesar de ello, tiene limitaciones: es difícil la comparación entre laboratorios, hay problemas a la hora de interpretar los resultados y posee un rendimiento bajo y un elevado coste (Cookson *et al.*, 1996; van Belkum *et al.*, 1998). PFGE es un método apropiado para la determinación de relaciones clonales pero no para estudios epidemiológicos a largo tiempo (Blanc *et al.*, 2001; Blanc *et al.*, 2002).

El tipado mediante técnicas basadas en la secuenciación de ADN posee ventajas en cuanto a velocidad, interpretación precisa de los resultados, posibilidad de crear con facilidad bases de datos y la estandarización entre diversos laboratorios (MacKenzie *et al.*, 2005). Entre las técnicas basadas en la secuenciación del ADN se encuentra el tipado mediante secuenciación multilocus (MLST Multilocus Sequence Typing). Este método se basa en la detección de variaciones en 7 locus de forma directa por secuenciación del ADN, permitiendo la identificación de genotipos iguales o altamente relacionados (Enright *et al.*, 2000). La principal ventaja de este método radica en que las pocas mutaciones de los 7 genes empleados en el tipado mediante MLST le permiten ser un buen método para estudios epidemiológicos globales y a largo tiempo, facilitando la comparación de los datos entre laboratorios mediante la creación de bases de datos vía Internet (Feil *et al.*, 2003; MacKenzie *et al.*, 2005). Sin embargo, el MLST de *S. aureus* es un método caro y laborioso, ya que requiere la secuenciación de aproximadamente 3.500 nucleótidos por cada cepa analizada (Ruppitsch *et al.*, 2006).

Otra técnica de tipado molecular se basa en la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Durante los últimos años, los avances más remarcables en el tipado molecular se han alcanzado gracias al

descubrimiento de repeticiones en tándem localizadas en el genoma de eucariotas y procariotas, durante proyectos de secuenciación de genomas. El número de unidades de repetición localizadas en un mismo locus (conocido como VNTR, “variable numbers of tandem repeat”) varía normalmente entre cepas y esa variación se puede detectar mediante PCR con cebadores flanqueantes (Jeffreys *et al.*, 1992; Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998; Adair *et al.*, 2000; Keim *et al.*, 2000; Farlow *et al.*, 2001). Un buen ejemplo de esto lo componen los genes que codifican para proteínas de superficie que se unen a moléculas extracelulares matriciales (MSCRAMMs, “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”) y adhesinas de secreción (SERAMs, “secreted expanded repertoire adhesive molecules”). Estos genes son buenos candidatos para proveer un método de tipado de una buena resolución genética, ya que contienen secuencias con regiones variables y las proteínas de superficie que codifican interactúan con el ambiente y son estables a lo largo del tiempo (Koreen *et al.*, 2005).

Entre las secuencias del genoma de *S. aureus* que presentan repeticiones en tándem, se han empleado sobre todo tres marcadores específicos de *S. aureus*: los genes *coa*, *spa* y *clfB*.

La coagulasa (Coa) está producida por todas las cepas de *S. aureus*, principal motivo para que se emplee como criterio para la identificación de *S. aureus*. Es una proteína extracelular (SERAM) capaz de unirse a la protrombina. El complejo formado, llamado staphylotrombina, puede estimular la coagulación al convertir el fibrinógeno en fibrina (Schwarzkopf y Karch, 1994). La proteína contiene tres regiones: el extremo amino-terminal, que contiene el sitio de unión a la protrombina; una región central altamente conservada, y la región carboxi-terminal, compuesta de repeticiones de 27 aminoácidos (aa), codificados por secuencias en tándem de 81pb. El poder discriminatorio del gen *coa* radica en esta región que contiene repeticiones en tándem de 81 pb (Schwarzkopf y Karch, 1994).

La proteína A estafilocócica (Spa) es un importante factor de virulencia de *S. aureus*, (Gao y Stewart, 2004) codificada por el gen *spa*. Spa se une al fragmento Fc de las inmunoglobulinas de diversas especies de mamíferos, poseyendo un importante papel a la hora de eludir la fagocitosis (Gomez *et al.*, 2006). El gen *spa* se compone de aproximadamente 2.150 pb y contiene varias regiones de distinta funcionalidad: una región de unión Fc, la región X y el extremo carboxi-terminal,

necesario para el anclaje a la pared celular (Schneewind *et al.*, 1992). La región X contiene un número variable de repeticiones de 21-27 pb, aunque la mayoría son de 24 pb (Guss *et al.*, 1984; Frenay *et al.*, 1996). Esta región repetitiva es altamente polimórfica, aunque suficientemente estable para permitir discriminar epidemiológicamente aislados no relacionados (Colbert *et al.*, 1984; Frenay *et al.*, 1994). La región polimórfica, además de emplearse en el tipado molecular de *S. aureus* mediante su detección por PCR, también se ha utilizado en el tipado mediante secuenciación. Esta técnica se conoce como *spa* typing (Frenay *et al.*, 1996). Al secuenciarse un solo locus se abarata el coste respecto al MLST. Sin embargo, este método es incapaz de discriminar entre determinados linajes de *S. aureus*, haciéndose necesario el empleo de otras técnicas para completar el tipado (Struelens *et al.*, 2009).

El gen clumping factor B (*clfB*) codifica una proteína MSCRAMM que se une al fibrinógeno y a la queratina (Ni Eidhin *et al.*, 1998) y facilita la colonización nasal de *S. aureus* en humanos (van Belkum *et al.*, 1998). Posee las características de las proteínas de superficie de bacterias Gram-positivas: una larga secuencia señal, una región de 500 aa y la región R, que sirve de unión entre esta secuencia y la región de anclaje a la pared celular. Además, la región R del *clfB* posee una región que codifica repeticiones del dipéptido serina-aspartato (SD). La longitud del dominio R, región de repeticiones SD, varía entre cepas (McDevitt y Foster, 1995), lo que le convierte en un excelente candidato para el tipado molecular (Koreen *et al.*, 2005).

### **Tipado molecular de *S. aureus* en conejos**

En la especie cunícola, los aislados se han clasificado, hasta el momento, en cepas de alta y baja virulencia (Hermans *et al.*, 2000). A nivel clínico, estos dos tipos de cepas se han diferenciado atendiendo al número de animales afectados que se presentan en la explotación y a la tasa de mortalidad. Las cepas de *S. aureus* de baja virulencia (“low virulence”) afectan a un limitado número de animales y poseen baja mortalidad, produciendo por tanto pocas pérdidas económicas. Sin embargo, las cepas clasificadas como de alta virulencia (“high virulence”) se diseminan a través de la explotación afectando a un gran número de conejos, provocando problemas crónicos y graves pérdidas económicas.

Para corroborar molecularmente estas diferencias clínicas entre cepas se buscó, en primer lugar, clasificar las cepas mediante el biotipado. Sin embargo, aunque los brotes altamente virulentos de la enfermedad en conejos son frecuentemente producidos por cepas pertenecientes al biotipo CV-C mixto, éste comprende tanto cepas de alta como de baja virulencia (Devriese *et al.*, 1981; Devriese, 1984; Devriese *et al.*, 1996), haciéndose necesario el uso del fagotipado. Éste se lleva a cabo utilizando fagos de la colección internacional de tipado para cepas de *S. aureus* de origen humano (Parker, 1962). Las cepas “low virulence” pueden pertenecer a una amplia variedad de fagotipos (Devriese *et al.*, 1981; Hermans *et al.*, 1999), mientras que las cepas aisladas de brotes epidémicos de alta virulencia en granjas, normalmente pertenecen al fagotipo 3A/3C/55/71. Por tanto, normalmente las cepas “high virulence” pertenecen al biotipo-fagotipo CV-C mixto 3A/3C/55/71. Este biotipo se describió como el causante de graves problemas por toda Europa a partir de los años 80 (Vancraeynest *et al.*, 2006a).

Además de las propiedades fenotípicas descritas, se han examinado genóticamente cepas de conejo. Hermans *et al.* (2000, 2001) emplearon una técnica conocida como amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, “randomly amplified polymorphic DNA”), basada en la amplificación de secuencias al azar mediante el empleo de oligonucleótidos cortos. Los principales problemas de esta técnica radican en la dificultad para estandarizar la técnica y, por tanto, la reproducibilidad entre laboratorios. Mediante el empleo de RAPD clasificaron en un mismo tipo a las cepas pertenecientes al fagotipo de alta virulencia (RAPD tipo “a”). Además, estudios más recientes han clasificado la mayoría de las cepas de alta virulencia en los mismos tipos mediante tipificación por PFGE, MLST y tipo de *spa*. Por tanto, estos estudios sugirieron un origen clonal de la forma de alta virulencia (Hermans *et al.*, 1999; Vancraeynest *et al.*, 2006b). Sin embargo, esta distinción entre cepas de *S. aureus* de alta y baja virulencia no se ha descrito en otras especies animales ni en el hombre. Por ello, la puesta a punto de un método de tipado molecular de cepas de *S. aureus* sencillo y rápido que permita corroborar estos resultados será otro de los puntos a tratar en esta tesis.

### 1.5. Factores de virulencia y patogenia de *S. aureus*

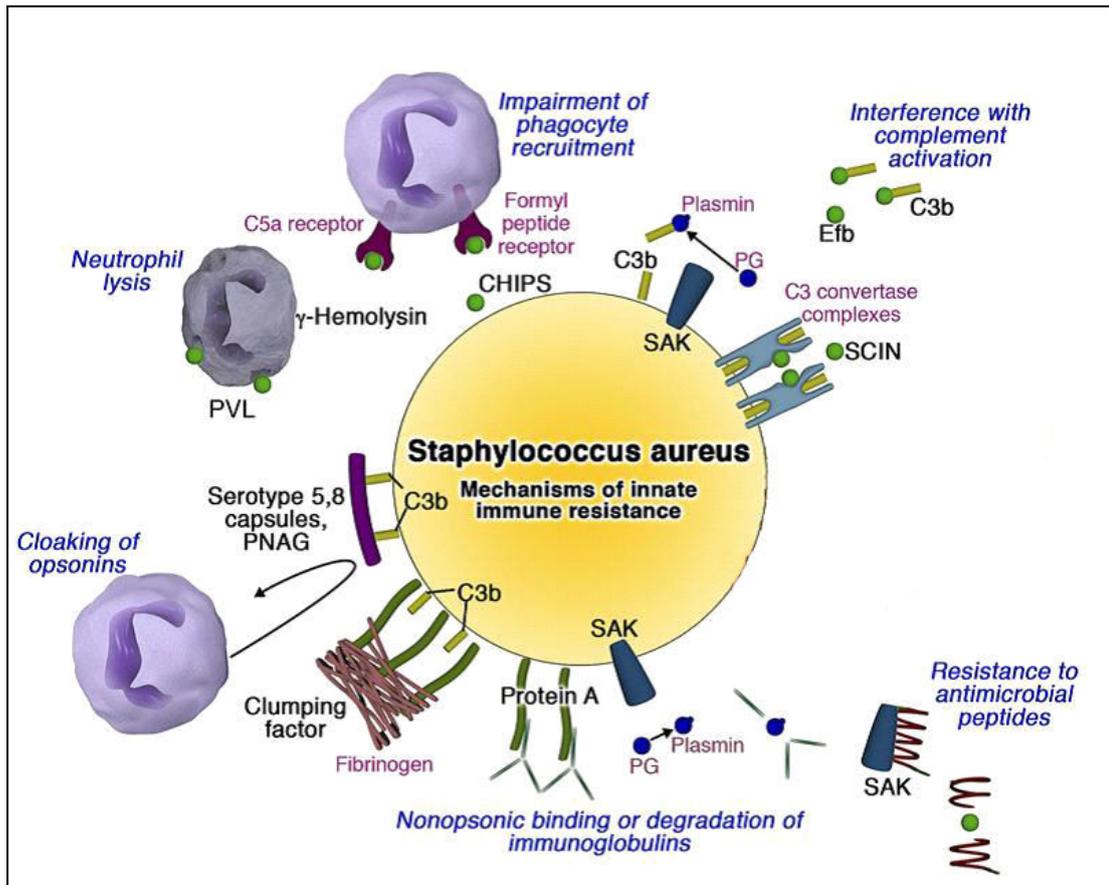
La capacidad de *S. aureus* de producir enfermedades se debe a la combinación de sus factores de virulencia. *S. aureus* puede producir más de 30 factores de virulencia que le permiten sobrevivir en condiciones extremas dentro del hospedador y establecer y mantener la infección (Haveri *et al.*, 2008).

En primer lugar, resulta crítica la capacidad de adherencia a los tejidos del hospedador para colonizar y establecer la infección (Menzies, 2003). En esta primera etapa actúan las adhesinas o moléculas de la superficie microbiana con capacidad de unión a las células del hospedador o a moléculas de la matriz extracelular, tales como el fibrinógeno (ClfA, ClfB, Map/Eap, Fib), la fibronectina (FnBPA, FnBPB), la elastina (EbpS) y el colágeno (Cna) (Patti *et al.*, 1994; Foster y Hook, 1998). Estas proteínas se conocen con el nombre de MSCRAMMs (Foster y Hook, 1998). La colonización proporciona un nicho a la bacteria a partir del cual puede desarrollar enfermedad cuando las defensas del hospedador disminuyen (Gordon y Lowy, 2008), aumentando el riesgo de sufrir infección (Kluytmans *et al.*, 1997; Wertheim *et al.*, 2005).

Una vez la bacteria se ha adherido a los tejidos del hospedador es capaz de crecer y persistir. Durante la infección, *S. aureus* produce numerosos enzimas y exotoxinas, como proteasas, lipasas y elastasas, a través de los cuales obtiene nutrientes e invade y destruye tejidos del hospedador, permitiéndole diseminarse a otros lugares (Gordon y Lowy, 2008). La coagulasa (*coa*) es una proteína extracelular (SERAM) y como se ha comentado con anterioridad, activa la protrombina, y convierte el fibrinógeno en fibrina. Otra proteína con actividad coagulasa es la proteína de unión al von Willebrand (vWBP) (Bjerketorp *et al.*, 2002). Ambas proteínas se encuentran en todos los *S. aureus*, sin embargo su función no está clara. La formación de pequeños coágulos sanguíneos podría facilitar la evasión de la respuesta inmune. La proteína vWBP también posee un dominio de unión al factor de von Willebrand (Bjerketorp *et al.*, 2002), al igual que la proteína A (Hartleib *et al.*, 2000). Aunque la finalidad de esta unión al factor de von Willebrand se desconoce, se relaciona con la adhesión en zonas de daño vascular, facilitando la colonización (Bjerketorp *et al.*, 2002).

Otros factores de patogenicidad permiten a *S. aureus* persistir, evadiendo la respuesta inmune del hospedador y el efecto de los antimicrobianos. Los neutrófilos y el sistema de complemento son los principales elementos del sistema

inmune innato encaminados a contrarrestar la invasión de agentes microbianos (Beutler, 2004). Sin embargo, *S. aureus* posee diversos mecanismos para evadirlos (figura I-1.) La proteína estafilocócica inhibidora de la quimiotaxis (CHIPS, “chemotaxis inhibitory protein of staphylococci”) bloquea la quimiotaxis de neutrófilos (Postma *et al.*, 2004), mientras que el inhibidor estafilocócico del complemento (SCIN, “staphylococcal complement inhibitor”) previene la opsonización y la fagocitosis (Rooijackers *et al.*, 2005). La proteína MSCRAMM Fib también inhibe el sistema de complemento (Hammel *et al.*, 2007). La proteína A, otra proteína MSCRAMM, se une a la porción Fc de las inmunoglobulinas (Deisenhofer, 1981), previniendo la opsonización y, por tanto, evadiendo la respuesta inmune del hospedador. La estafiloquinasa (SAK) interactúa con proteínas del hospedador, inactiva a  $\alpha$ -defensinas (péptidos bactericidas producidos por los neutrófilos) y activa al plasminógeno (se transforma en plasmina facilitando la diseminación por el tejido hospedador) (Bokarewa *et al.*, 2006). Otros mecanismos que permiten a la bacteria persistir en el tejido del hospedador son la capacidad de sobrevivir en el interior de células epiteliales y de macrófagos, evadiendo la respuesta inmune (Gronlund *et al.*, 2005); la formación de cápsulas polisacáridas extracelulares, que les permiten resistir la fagocitosis (O’Riordan y Lee, 2004; Gordon y Lowy, 2008) y la formación de biofilm. Éste último favorece la colonización ya que dificulta la eliminación de las bacterias por el flujo de leche favoreciendo el desarrollo de mastitis (Baselga *et al.*, 1994); protege frente al sistema inmune del hospedador (McKenney *et al.*, 1998; Barrio *et al.*, 2000) y aumenta la resistencia a los antibióticos (Amorena *et al.*, 1999; Cucarella *et al.*, 2004).



**Figura I-1.** Mecanismos de *S. aureus* para evadir la inmunidad innata del hospedador. CHIPS inhibe el reclutamiento de células fagocíticas, mientras que SCIN y Fib bloquean la activación del sistema de complemento. La proteína A se une a los dominios Fc de las inmunoglobulinas, mientras que la unión de Clumping factor al fibrinógeno, la cápsula polisacárida y la poli-N-acetilglucosamina (PNAG) enmascaran la superficie bacteriana para evitar el reconocimiento de los fagocitos. PVL y la gamma-hemolisina producen poros en las membranas de leucocitos, mientras que la estafiloquinasa (SAK) inhibe péptidos bactericidas y activa el plasminógeno. Modificado de “Understanding how leading bacterial pathogens subvert innate immunity to reveal novel therapeutic targets” (Nizet, 2007).

Otro de los mecanismos empleados por *S. aureus* para contrarrestar las defensas del hospedador es la producción de superantígenos (enterotoxinas, toxina del síndrome de shock tóxico y toxinas exfoliativas). Estos superantígenos pueden estimular de manera ineficiente e inespecífica las defensas del hospedador, pudiendo tener severas e incluso fatales consecuencias para el hospedador (Projan y Novick, 1997). Se ha descrito una familia de superantígenos (SAGs) clásicos que incluye TSST-1 (la toxina del síndrome de shock tóxico) y 5 variantes antigénicas de enterotoxinas de *S. aureus* (SEs), denominadas Sea, Seb,

Sec, Sed y See. Las nuevas SEs se han ido nombrando asignándoles la siguiente letra del abecedario en el orden en el que se han ido descubriendo (Lina *et al.*, 2004). Los superantígenos pueden activar inespecíficamente a un gran número de linfocitos T (Balaban y Rasooly, 2000), dificultando la respuesta inmune frente a la infección bacteriana (Ferens *et al.*, 1998; Dinges *et al.*, 2000; Proft y Fraser, 2003). Las enterotoxinas, aunque son superantígenos, se designaron originalmente como enterotoxinas debido a su habilidad para producir emesis tras su ingestión. Recientemente se han descrito nuevas SEs que carecen de propiedades eméticas, por lo que se denominan como superantígenos “staphylococcal enterotoxin-like” (SEI) (Lina *et al.*, 2004). Otro ejemplo de superantígenos son las toxinas exfoliativas, producidas por algunas cepas de *S. aureus*. Hay dos toxinas exfoliativas principales, la toxina exfoliativa A y la toxina exfoliativa B. *S. aureus* puede producir una de las dos toxinas o ambas. Estas toxinas exfoliativas se relacionan con infecciones de la piel en humanos, principalmente son responsables del síndrome de piel escaldada estafilocócica. Ejercen su acción uniéndose a desmosomas y separando el estrato granuloso del estrato espinoso de la epidermis (Amagai *et al.*, 2002). Otra exotoxina destacada es Panton-Valentine Leukocidin (PVL), la cual crea poros en la membrana celular de los leucocitos, destruyéndolos. PVL está asociada con infecciones de la piel y tejidos blandos (Lina *et al.*, 1999; Diep *et al.*, 2004), así como infecciones más graves, como neumonía necrotizante, con un alto índice de mortalidad (Feng *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2009).

A pesar del arsenal de factores de virulencia, *S. aureus* mantiene un gran control sobre la expresión de estos factores y rara vez causa infecciones severas en individuos sanos. Se han identificado genes reguladores que coordinan la expresión de varios grupos de genes estafilocócicos (Peng *et al.*, 1988; Cheung *et al.*, 1992). El más estudiado de ellos, *agr*, induce la expresión de exoproteínas (proteínas extracelulares), mientras que suprime la expresión de proteínas de superficie (Ji *et al.*, 1995; Novick, 2003). Las proteínas de superficie se sintetizan principalmente durante la fase de crecimiento exponencial, y las proteínas secretadas se sintetizan durante la fase estacionaria. Se ha descrito que este hecho debe tener una importancia clínica, ya que en las diferentes fases de infección se requiere un panel de determinantes de virulencia diferente. Durante las fases iniciales de la infección, la expresión de proteínas de superficie que unen moléculas de la matriz extracelular, favorece la colonización exitosa del tejido

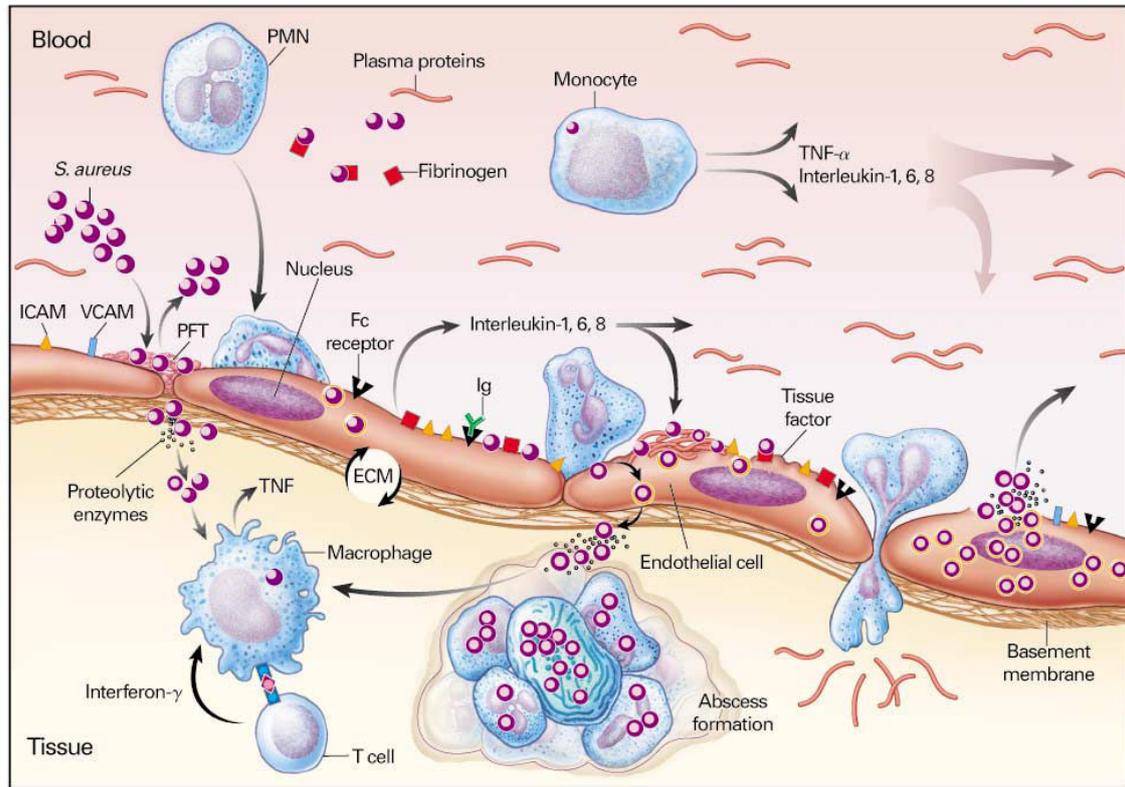
hospedador, mientras que la posterior síntesis de exoproteínas favorece la diseminación a tejidos adyacentes (Cheung *et al.*, 1994).

A pesar de que los factores del hospedador pueden predisponer a sufrir una infección por *S. aureus*, en general, están poco caracterizados (Gordon y Lowy, 2008). En el hombre, *S. aureus* es un habitante normal de la piel y las mucosas. Aproximadamente el 20% de la población es portador nasal persistente de *S. aureus*, mientras que el 60% porta la bacteria de forma intermitente (Kluytmans *et al.*, 1997). Sin embargo, a pesar de esta elevada frecuencia de colonización de la mucosa nasal rara vez causa infecciones invasivas severas, desconociéndose los factores que hacen que se desarrolle enfermedad (Lindsay *et al.*, 2006).

Los macrófagos, junto con las células epiteliales, inician la respuesta inflamatoria necesaria para eliminar a la bacteria (figura I-2). Para ello, liberan sustancias quimiotácticas para recluir neutrófilos al foco de infección (Paape *et al.*, 2002). El inicio de la respuesta inflamatoria provoca la producción y liberación de factor de necrosis tumoral, interferones e interleuquinas (Burvenich *et al.*, 1994). Los fagocitos emplean mediadores químicos para eliminar la infección, sin embargo, algunos de estos mediadores, como las sustancias oxígeno-reativas (ROS) derivadas de los neutrófilos, pueden causar daño en las células hospedadoras (Paape *et al.*, 2002).

En el caso de los animales, la patogénesis de la mastitis crónica provocada por *S. aureus* no es del todo conocida. La persistencia de las infecciones se asocian a alguna discapacidad de la respuesta inmune, debido por un lado, como se ha descrito anteriormente, a factores relacionados con la bacteria (factores de virulencia que le permiten sobrevivir y multiplicarse en la glándula mamaria), y por otro lado a factores relacionados con el hospedador (Gronlund *et al.*, 2005). En concreto, en la glándula mamaria se produce un descenso en la capacidad fagocítica de los neutrófilos debido a diversos factores, como la interferencia de la grasa y caseína de la leche, la presencia de menos glucógeno y unas opsoninas menos eficaces (Paape *et al.*, 1979; Paape *et al.*, 2003; Rainard y Riollet, 2006).

La caracterización de la respuesta del hospedador en las mastitis cunícolas producidas por *S. aureus* será otro de los aspectos estudiados en esta tesis.



**Figura I-2.** Patogenia de las infecciones por *S. aureus*.

Los estafilococos circulantes se unen al endotelio dañado (PFT, trombos con fibrina y plaquetas) a través de MSCRAMM o directamente a través de interacciones receptor-adhesina, o bien se unen a componentes séricos como el fibrinógeno. Los cambios microambientales (como los que se producen en la matriz extracelular, ECM) modifican a las células endoteliales, haciéndoles más susceptibles a la infección. Después de la fagocitosis por las células endoteliales, la producción de enzimas proteolíticos por parte de *S. aureus*, facilita su diseminación por el tejido adyacente o por el torrente sanguíneo. Una vez en el tejido adyacente subepitelial, la bacteria promueve una repuesta inflamatoria que conlleva la formación de abscesos, es decir, un foco de infección metastático.

Después de la fagocitosis, las células endoteliales expresan receptores Fc y moléculas de adhesión (moléculas de adhesión vascular, VCAM, y moléculas de adhesión intercelular, ICAM) y liberan interleucina-1, interleucina-6 e interleucina-8. Como resultado, se produce la extravasación de leucocitos por diapedesis. Se produce un aumento de la permeabilidad vascular debido a un cambio en la conformación de las células endoteliales. Después de la exposición a *S. aureus*, tanto los monocitos como los macrófagos liberan interleucina-1, interleucina-6, interleucina-8 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ). La activación de los macrófagos se produce como consecuencia de la liberación de interferón- $\gamma$  por los linfocitos T. (Lowy, 1998).

## 1.6.- Elementos genéticos móviles de *S. aureus*

Muchos de los factores de virulencia de *S. aureus* se encuentran codificados en elementos genéticos móviles tales como transposones, plásmidos, bacteriófagos o islas de patogenicidad (IPs).

Dentro de estos elementos genéticos móviles los fagos juegan un papel muy importante en la transmisión de factores de virulencia, bien porque están codificados en su genoma, o de forma indirecta como vehículo de información genética no codificada por el fago, como es el caso de las islas de patogenicidad. En *S. aureus* se han identificado y secuenciado un gran número de fagos (Kwan *et al.*, 2005). De hecho, en todas las cepas secuenciadas de *S. aureus* se han encontrado bacteriófagos que suponen hasta un 4 ó 5% del genoma total (Baba *et al.*, 2002; Holden *et al.*, 2004). Estos bacteriófagos se encuentran integrados en el cromosoma de la bacteria y se mantienen en ciclo lisogénico (profagos), donde la replicación de su ADN se produce de forma pasiva, es decir, sólo se replican cuando el cromosoma de la bacteria se replica (transferencia vertical). Ante situaciones de estrés, tales como luz UV, agentes que dañen el ADN y algunos antibióticos, los fagos se inducen y pasan a un ciclo lítico (Lindsay *et al.*, 1998; Úbeda *et al.*, 2005). Durante la inducción, los fagos se escinden del cromosoma bacteriano y comienzan a replicarse, transfiriéndose horizontalmente a otras cepas de *S. aureus*.

Las IPs son elementos genéticos accesorios con un tamaño que varía de 10 a 200 kb, contienen uno o más genes asociados con factores de virulencia, poseen en sus extremos repeticiones directas o secuencias de inserción, contienen genes con actividad semejante a las integrasas y presentan una alta inestabilidad, pudiendo ser deletadas en bloque y sufrir duplicaciones y amplificaciones (Gertz *et al.*, 2000). Basándose en estas características y en el hecho de que algunas IPs poseen un contenido de GC medio muy distinto al del resto del genoma, se ha postulado que las IPs pueden tener un importante papel en la evolución de los microorganismos al permitir la adquisición de grandes fragmentos genómicos por transferencia horizontal (Gertz *et al.*, 2000).

Las islas de patogenicidad de *S. aureus* (SaPIs) fueron las primeras IPs claramente definidas en patógenos Gram-positivos. De los 22 genomas secuenciados de *S. aureus*, 21 contienen al menos una isla de patogenicidad,

asumiéndose en la actualidad que la práctica totalidad de cepas clínicas contiene al menos uno de estos elementos (Úbeda *et al.*, 2007).

Las SaPIs presentan una organización genética muy conservada. Cada SaPI se inserta en un sitio específico de integración (*att<sub>B</sub>*), teniendo un tamaño entre 14 y 17 kb. Están flanqueadas por repeticiones directas y presentan una integrasa al lado del sitio de integración izquierdo (*att<sub>L</sub>*). Contienen un bloque de unas 10 a 12 ORFs con una gran homología entre las distintas IPs implicada en la biología de estos elementos (Úbeda *et al.*, 2008) y suelen poseer varios genes que codifican para factores de virulencia.

Estos elementos genéticos móviles, tanto los fagos como las islas de patogenicidad, poseen una gran influencia en la patogénesis y en la adaptación de *S. aureus*, ya que codifican elementos de virulencia que contribuyen en las interacciones patógeno-hospedador y en las manifestaciones clínicas (Ben Zakour *et al.*, 2008a). En un estudio llevado a cabo por Sung *et al.* (2008) se observó como algunos elementos genéticos móviles eran las principales diferencias entre cepas aisladas de humanos respecto a las aisladas de animales (Sung *et al.*, 2008).

El estudio de estos elementos en cepas animales, sobre todo en el conejo, es otro de los apartados tratado en este trabajo.

## **II.- OBJETIVOS**



## II.- OBJETIVOS

*Staphylococcus aureus* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, afectando tanto a animales como al hombre, por lo que es necesaria la realización de tipados que permitan distinguir entre los diferentes tipos de cepas (Schumacher-Perdreau *et al.*, 1994; Strommenger *et al.*, 2008).

*S. aureus* es uno de los principales patógenos en medicina veterinaria. En cunicultura puede dar lugar a distintos procesos patológicos entre los que destaca la mastitis como una de las principales causas de eliminación de conejas reproductoras. En el estudio de la patogenia provocada por *S. aureus* es importante conocer tanto la importancia del hospedador como de los diferentes determinantes de virulencia bacterianos. Para la valoración del daño producido por patógenos en la glándula mamaria se consideran muy útiles los estudios histopatológicos (Trinidad *et al.*, 1990). Sin embargo, mientras las mastitis provocadas por *S. aureus* en vacas ha sido bien documentada histológicamente (Heald, 1979; Paape *et al.*, 1979; Nickerson y Heald, 1981, , 1982; Gudding *et al.*, 1984; Sordillo *et al.*, 1989; Trinidad *et al.*, 1990; Leitner *et al.*, 2003), no existen apenas estudios histopatológicos y ninguno inmunocitoquímico sobre mastitis estafilocócicas en conejos (Flatt, 1974; Adlam *et al.*, 1976; Rosell *et al.*, 2000; Peris *et al.*, 2006).

Por otra parte, el conocimiento del genoma bacteriano proporciona una excelente fuente de estudio para conocer la evolución y la patogénesis bacteriana. Hasta la fecha se ha publicado el genoma completo de 22 aislados de *S. aureus*. El análisis comparativo entre dos cepas de *Staphylococcus* cualesquiera revela que más del 78% de los genes están conservados (Takeuchi *et al.*, 2005). El análisis de las regiones del genoma de *S. aureus* que son variables entre las cepas puede proporcionar información sobre la adaptación de cada cepa a su nicho ambiental particular, así como su potencial patógeno (Ben Zakour *et al.*, 2008a).

Por todo ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Identificar y valorar marcadores genéticos capaces de caracterizar las diferentes cepas de *S. aureus* cunícolas.

2. Estudiar la distribución de los diferentes genotipos dentro y entre diferentes explotaciones cunícolas.
3. Determinar si las diferentes lesiones producidas por *S. aureus* en conejos son causadas por uno o varios genotipos, así como, si un mismo genotipo es capaz de producir más de un tipo de lesión.
4. Comprobar la prevalencia de los diferentes factores de virulencia entre los distintos genotipos estudiados.
5. Caracterizar la respuesta inmune del hospedador a través del estudio histopatológico e inmunocitoquímico de lesiones provocadas por cepas de *S. aureus* cunícolas en el tejido mamario.
6. Secuenciar el genoma completo de un aislado de *S. aureus* procedente de conejo para conocer los posibles factores que permiten su adaptación al conejo, así como su potencial patógeno.

### **III.- MATERIAL Y MÉTODOS**



## III.- MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1.- Animales estudiados

#### Casos naturales

Se estudiaron 373 conejas (*Oryctolagus cuniculus*) seleccionadas por presentar diferentes tipos lesionales de carácter purulento, que tras su análisis se comprobó que estaban provocadas por *S. aureus*.

La mayoría de animales, 301 conejas, procedían de 33 explotaciones cunícolas situadas en la provincia de Valencia. Estas explotaciones se distribuían en 14 pueblos, localizados en 8 de las 14 comarcas de la provincia de Valencia (figura VII-1 y tabla III-1). Cabe destacar que en estas 7 comarcas se sitúan el 76% de las explotaciones cunícolas, albergando el 81% de las hembras reproductoras de la provincia de Valencia. El resto de animales procedían de 8 granjas de la provincia de Castellón (29 conejas); de una explotación de la provincia de Alicante (28 animales); 9 conejas procedían de una granja de Albacete; 4 conejas de una explotación de la provincia de Navarra; y 2 conejas de una granja de la provincia de Cuenca. La distribución de los animales analizados se muestra en la tabla III-1 y III-2.

Las explotaciones presentaban diferentes historiales de estafilococias, desde casos esporádicos, con menos de un 3% de hembras afectadas, hasta altos niveles, con más de un 10% de hembras afectadas. La situación más frecuente fueron explotaciones con una baja prevalencia de casos de estafilococia, con tan sólo casos esporádicos. Algunos de estos casos podían presentarse como brotes cíclicos, principalmente en primavera y otoño, cuando se producían cambios bruscos de temperatura, o junto con algún otro proceso patológico, como enteropatía o colibacilosis. Tan sólo la granja número 2 presentó graves pérdidas económicas con un elevado índice de mortalidad, mientras que tres granjas (números 12, 17 y 25) se estudiaron durante periodos en los que existía un brote de estafilococia.

**Tabla III-1.** Datos epidemiológicos de las explotaciones estudiadas de la provincia de Valencia.

Granjas	Localidad	<sup>a</sup> Comarca	<sup>b</sup> Densidad	Animales analizados	<sup>c</sup> Historia clínica de estafilococias
1	Albalat	A	(1)	5	Baja prevalencia.
2	Puzol	B	(2)	5	Alto índice de estafilococias (70/80%), principalmente en reproductoras.
3	Valencia	C	(2)	9	Baja prevalencia.
4	Alfarp	D	(3)	2	N.D.
5	Chiva	E	(3)	18	N.D.
6	Buñol	E	(3)	6	Baja prevalencia.
7	Buñol	E	(3)	4	Baja prevalencia.
8	Aras de los Olmos	F	(4)	5	Historial de estafilococias crónicas. Baja prevalencia en el momento del muestreo.
9	Aras de los Olmos	F	(4)	3	Baja prevalencia.
10	Pedralba	F	(4)	6	N.D.
11	Titaguas	F	(4)	1	Baja prevalencia.
12	Fuenterrobles	G	(4)	2	Historial de mastitis estafilocócicas crónicas. Sufría un brote en el momento del muestreo.
13	Fuenterrobles	G	(4)	1	Baja prevalencia.
14	Fuenterrobles	G	(4)	1	Baja prevalencia.
15	Fuenterrobles	G	(4)	3	Baja prevalencia.
16	Fuenterrobles	G	(4)	1	Baja prevalencia.
17	Fuenterrobles	G	(4)	2	Historial de mastitis estafilocócicas crónicas. Sufría un brote en el momento del muestreo.
18	Fuenterrobles	G	(4)	1	Baja prevalencia.
19	Fuenterrobles	G	(4)	1	Baja prevalencia.
20	Fuenterrobles	G	(4)	4	Baja prevalencia.
21	Sinarcas	G	(4)	24	Baja prevalencia.
22	Anna	H	(5)	3	N.D.
23	Anna	H	(5)	10	Baja prevalencia.
24	Navarrés	H	(5)	3	Baja prevalencia.
25	Navarrés	H	(5)	2	Alta prevalencia de mastitis (10-20%) en el momento del muestreo.
26	Navarrés	H	(5)	8	Baja prevalencia.
27	Navarrés	H	(5)	100	Baja prevalencia.
28	Navarrés	H	(5)	5	N.D.
29	Navarrés	H	(5)	9	Baja prevalencia.
30	Navarrés	H	(5)	13	N.D.
31	Navarrés	H	(5)	6	N.D.
32	Navarrés	H	(5)	26	Baja prevalencia.
33	Millares	H	(5)	12	Baja prevalencia.

<sup>a</sup>**Comarcas:** **A:** El Camp de Morvedre; **B:** Valencia; **C:** Ribera Alta; **D:** Foya de Buñol; **E:** Los Serranos; **F:** Plana Utiel-Requena; **G:** Canal de Navarrés. <sup>b</sup>**Densidad cunícola en las diferentes comarcas:** **(1):** menos de 1.000 reproductoras; **(2):** entre 1.000 y 2.000; **(3):** Entre 2.000 y 5.000; **(4):** Entre 5.000 y 10.000 y **(5):** más de 10.000 reproductoras. <sup>c</sup>**Historia clínica de estafilococias:** **N.D.:** no se conocen datos. **Baja prevalencia:** afección de <3% de hembras. **Alta prevalencia:** afección de >10% de hembras. **Estafilococia crónica:** >10-20% de reproductoras afectadas crónicamente, con brotes periódicos. **Brotos:** incidencia de >50% de reproductoras.

**Tabla III-2.** Datos epidemiológicos de las explotaciones estudiadas fuera de la provincia de Valencia.

Granjas	Localidad	<sup>a</sup> Provincia	Animales analizados	<sup>b</sup> Historia clínica de estafilococias
34	Adzaneta	A	8	Baja prevalencia.
35	Altura	A	4	Baja prevalencia.
36	Altura	A	1	Baja prevalencia.
37	Altura	A	1	Baja prevalencia.
38	Altura	A	2	Baja prevalencia.
39	Altura	A	2	Baja prevalencia.
40	Altura	A	2	Baja prevalencia.
41	Soneja	A	9	Baja prevalencia.
42	Gayanes	B	28	Baja prevalencia.
43	Ossa de Montiel	C	9	Baja prevalencia.
44	Mira	D	2	Baja prevalencia.
45	Marchante	E	4	Baja prevalencia.

<sup>a</sup>Provincia: **A:** Castellón; **B:** Alicante; **C:** Albacete; **D:** Cuenca; **E:** Navarra. <sup>b</sup>Historia clínica de estafilococias: **Baja prevalencia:** afección de <3% de hembras

### Casos experimentales

Se realizó una infección experimental en glándula mamaria donde se emplearon 34 conejas multíparas procedentes de la misma explotación. Los animales fueron inseminados previamente en la explotación y llevados al estabulario de la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad CEU-Cardenal Herrera (Moncada, Valencia) una semana antes del parto. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad CEU-Cardenal Herrera, cumpliendo así con el R.D. 1201/2005 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos actualmente vigente.

### 3.2.- Estudios anatomopatológicos

Los animales se transportaron a la sala de necropsias de la Facultad de Veterinaria de la Universidad CEU-Cardenal Herrera (Moncada, Valencia), donde se sacrificaron mediante la inoculación intravenosa (vena marginal de la oreja), de una sobredosis de barbitúrico (Dolethal ®. Vétoquinol SA, Lure, France), tras la cual se inyectó cloruro potásico para confirmar la muerte de los animales.

### **3.2.1.- Examen macroscópico**

Se realizó la necropsia de todos los animales de forma ordenada, sistemática y completa. Inicialmente se llevó a cabo el examen externo de piel y aberturas externas, posteriormente se examinó el tejido subcutáneo y órganos de cavidad abdominal y torácica.

### **3.2.2.- Estudio microscópico**

Las muestras de tejido seleccionadas durante la necropsia se sumergieron en una solución de formol tamponado al 10% (Panreac) para su fijación, manteniéndose un máximo de 36 horas, tras las cuales se procedió a su tallado. Las muestras, una vez talladas, se incluyeron en parafina mediante el procesador automático de tejidos (Histolab ZX-110), en el que las muestras fueron deshidratadas, mediante sucesivos pases por alcoholes en gradación creciente y xilol puro (Panreac), y finalmente incluidas en parafina de punto de fusión 58°C (Panreac). El montaje definitivo de los bloques se realizó en una unidad formadora de bloques (MYR 2500-III). De cada uno de los bloques se obtuvieron secciones de 3  $\mu$ m de espesor mediante microtomo de rotación (Microm HM 310), utilizando cuchillas desechables (Accu-Edge, LPB). Las secciones fueron recogidas en portaobjetos de cristal (Marienfelb, Alemania) y secadas durante al menos 24 horas en una estufa a 37°C. Posteriormente se realizó la técnica convencional de tinción de Hematoxilina-Eosina (Panreac). La observación de las muestras se realizó en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600) y las fotografías se tomaron con cámara digital (Nikon DXM 1200).

### **3.2.3.- Estudio inmunocitoquímico**

Los tejidos de mama fueron sometidos a estudios inmunocitoquímicos (ICQ) para la detección de linfocitos T y B, células plasmáticas y macrófagos. Los bloques de tejido de glándula mamaria fueron procesados como se indica en el apartado anterior. Las secciones fueron recogidas en portaobjetos de cristal tratados con polysine<sup>®</sup> (Menzel-Glaser, Alemania) y secadas durante al menos 24 horas en una estufa a 37°C. A continuación, las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas hasta agua destilada. Después, se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno (Fisher Scientific) al 3% durante 10 minutos, para bloquear la acción de la peroxidasa endógena. Transcurrido este tiempo, se lavaron

nuevamente con agua destilada y se procedió a realizar la técnica de desenmascaramiento antigénico. Para ello, las muestras se sumergieron en buffer citrato 10 mM (pH 6,0) (Biogenex), sometiéndose a calor y presión durante 20 minutos en una cámara (Decloaking Chamber, Biocare). Posteriormente, tras un lavado con agua destilada durante 5 minutos, las muestras se introdujeron en un coverplate® (Thermo Electron Corporation) y se lavaron con Tris buffered saline with Tween 20 (TBST) (Dako). A continuación, se realizó un bloqueo mediante caseína durante 10 minutos a 37 °C y sin lavar se aplicaron 250 µl del anticuerpo primario correspondiente (tabla III-3). Al finalizar el proceso de incubación con el anticuerpo primario se lavó durante 8 minutos con TBST, a temperatura ambiente, para aplicar 250 µl de anticuerpo secundario (tabla III-3) durante 20 minutos a 37°C. De nuevo se lavó con TBST durante 8 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente aplicar 250 µl de la solución Vectastain® Elite ABC (Vector), también durante 20 minutos a 37°C. Tras lavar con TBST durante 8 minutos a temperatura ambiente, se aplicaron 250 µl de Nova Red substrate Chromogen (Vector), durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron las muestras dos veces con agua destilada y se tiñeron durante 2 minutos con Hematoxilina de Mayer's, realizándose el color mediante la aplicación durante un minuto de Bluing reagent (Richard-Allan Scientific). Por último, se deshidrataron y se montaron con Cytoseal 60 (Richard-Allan Scientific). La observación de las muestras se realizó en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600) y las fotografías se tomaron con cámara digital (Nikon DXM 1200). La positividad estuvo dada por algún grado de tinción rojo-marrón en el citoplasma de las células en estudio. El conteo de células positivas se llevó a cabo mediante el programa de análisis de imagen NIS-Elements D 2.30 (Nikon), realizando un conteo de 20 campos alrededor de la zona de necrosis, a 400 aumentos, lo que suponía una superficie de 8,25 mm<sup>2</sup>. En cada prueba inmunocitoquímica se utilizó un control positivo (muestra de nódulo linfático) y un control negativo (una sección del tejido en estudio en el que se sustituyó el anticuerpo primario por suero no inmune).

**Tabla III-3.** Descripción de los diferentes anticuerpos primarios y secundarios empleados en este estudio.

Anticuerpo primario (dilución)	Reactividad	Anticuerpo secundario (Vectastain® Elite ABC)	Tiempo de incubación (Tª)	Casa comercial
CD79acy (HM57) (1:50)	Linfocitos B	anti-mouse IgG	1 h. (37°C)	Dako, M7051
CD3 (1:10)	Linfocitos T	anti-rat IgG (H+L)	Toda noche (4°C)	UC Davis
Macrophage anti-rabbit (RAM11) (1:100)	Macrófagos	anti-mouse IgG	1 h. (37°C)	Lab Vision Corporation, MS-1829-S
Anti-rabbit IgG:HRP (1:100)	Células plasmáticas	Conjugado primario	1 h. (37°C)	Stressgen, SAB-300

### 3.2.4.- Infección experimental

El protocolo de infección experimental se basó en protocolos de infecciones previamente descritas pero con modificaciones (Adlam *et al.*, 1976; Amorena *et al.*, 1991). Para realizar la infección experimental se inocularon 1000 UFC de diferentes cepas de *S. aureus*, disueltas en 0,5 ml. de PBS. Previo a la inoculación, se desinfectaron las cadenas mamarias con clorhexidina 2% y se extrajo una muestra de leche para comprobar la ausencia de bacterias en las glándulas mamarias a inocular. Las conejas se inocularon dos días después del parto, manteniendo a los gazapos con la madre. La inoculación se efectuó con una aguja hipodérmica (25G) en la base del pezón, con un ángulo de 45°, con el objetivo de introducir el inóculo en el seno del pezón (figura III-1). Se inocularon tres mamas alternas (craneal izquierda, media derecha y caudal izquierda). Las parejas de las glándulas mamarias infectadas se utilizaron como mamas control (craneal derecha, media izquierda y caudal derecha), inoculándose 0,5 ml. de PBS.



**Figura III-1.** Corte longitudinal de un pezón y glándula mamaria cunicola. Se señala un seno del pezón, lugar de la inoculación. Tricrómico de Masson.

Tras la infección se valoró la inflamación (hinchazón e induración) de cada mama a las 24 y 48 horas, y se tomó la temperatura rectal de las conejas. Previo al sacrificio, a las 48 horas, se extrajo de nuevo una muestra de leche de cada mama para valorar la presencia de la cepa inoculada. Las conejas se sacrificaron como se describe en el apartado 3.2. Tras el sacrificio se valoró macroscópicamente y microscópicamente el estado de cada mama, clasificando las lesiones en graves, moderadas y leves, atendiendo al grado de inflamación. Asimismo se realizó una estimación de la cantidad de bacterias presentes en las lesiones mediante microscopía.

### **Preparación del inóculo:**

Un cultivo de la cepa a inocular se creció durante toda la noche en TSB. Posteriormente se calculó la concentración del cultivo midiendo la absorbancia de una dilución 1/10 ( $DO_{600nm}$ ), aplicando la fórmula:  $DO_{600nm} \times 4,9 \times 10^9 = \text{UFC/ml}$ .

Después se realizaron lavados con PBS para eliminar todos los productos bacterianos y el cultivo se dejaba a una concentración de 2000 UFC / ml.

El inóculo fue plaqueado en TSA para comprobar su concentración bacteriana.

### **3.2.5.- Análisis estadístico**

Para comprobar si había diferencias entre el grado de afección de la cadena mamaria izquierda y derecha se realizó un análisis mediante el test de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ), considerándose un nivel de significación de  $p < 0,05$ . El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 11.0 para Windows.

Para valorar si había diferencias entre el número de células presentes entre los diferentes tipos de mastitis se elaboró un modelo mixto de repetibilidad, empleándose el programa SPSS 11.0 para Windows:

$Y_{ijk} = m + \text{lesión}_i + \text{individuo}_j + e_{ijk}$ , donde:

$Y_{ijk}$ : dato k (de 1 a 20 medidas por individuo) del individuo j que presenta la lesión i. Las variables a analizar fueron macrófagos (RAM11+), linfocitos T (CD3+), linfocitos B (CD79+) y células plasmáticas (IgM+).

**m**: media global.

**lesión:** efecto fijo de la lesión *i*. Se consideraron 8 grados, atendiendo a los subtipos de mastitis descritos: abscesos (encapsulados maduros, inmaduros y no encapsulados), rosetas, sándwich (completo, incompleto e infiltrado) y mixta.

**individuo:** efecto aleatorio del individuo *j* sobre todos sus registros de datos.

**e:** error residual.

### 3.3.- Estudio microbiológico

Tras el examen externo del animal, se tomaron muestras de lesiones de carácter purulento para su posterior estudio microbiológico. Mediante una torunda estéril (Deltalab, Rubí, España) se procedió a la toma de muestras y posterior siembra en placas de agar-sangre (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y agar MacConkey (Scharlau, Barcelona, España) que fueron incubadas a 37°C durante 18-24 horas. Posteriormente las colonias que crecieron fueron identificadas mediante métodos microbiológicos clásicos (tinción Gram, prueba catalasa, prueba oxidasa y PCR coagulasa).

Habitualmente se obtuvo un aislado de cada lesión, excepto de 10 conejas, en las cuales se tomaron varias muestras de la misma lesión para verificar si las cepas podían ser diferentes: en dos de los animales con pododermatitis en las extremidades anteriores y posteriores, se tomaron dos muestras. De igual forma, en 7 de las conejas con mastitis, con un aspecto heterogéneo de las distintas mamas afectadas, se tomaron tres aislados en dos de las conejas y dos aislados en el resto. Por último, de un animal que presentaba 3 lesiones diferentes (mastitis, neumonía y conjuntivitis bilateral) se tomaron 4 aislados (mastitis, neumonía y una muestra de cada ojo).

Adicionalmente, se analizó el genotipo de aislados cunícolas descritos previamente en la bibliografía y aislados procedentes de hospedadores diferentes al conejo. Se incluyeron en el estudio 16 cepas de conejos procedentes de diferentes países europeos caracterizadas como “high” y “low virulent” según Hermans *et al.* (2000) (tabla III-4), 14 cepas bovinas, 10 aislados de caprino, de ovino y de porcino; 5 aislados procedentes de ave, 3 aislados de macaco, 2 procedentes de caballo, 2 aislados de ciervo y 7 cepas humanas representativas y de secuencia conocida (tabla III-5).

**Tabla III-4.** Cepas cunícolas tipadas previamente por el grupo de la Dra. Hermans.

Cepa	Hospedador	<sup>a</sup> Biotipo	<sup>b</sup> Fagotipo	<sup>c</sup> RAPD tipo
KH103	Conejo	C	3A/3C/55/71	a
KH276	Conejo	C	3A/3C/55/71	a
VL468	Conejo	C	3A/3C/55/71	a
KH454	Conejo	C	3A/3C/55/71	a
KH152	Conejo	C	3A/3C/55/71	a
KH374X	Conejo	C	3A/3C/55/71	a
VL10	Conejo	C	3A/3C/55/71	a
266/3572	Conejo	C	3A/3C/55/71	a
KH547	Conejo	C	3A/3C/55/71	a
JS606	Conejo	C	3A/3C/55/71	a
JS432	Conejo	C	3A/3C/55/71	a
KH383	Conejo	A	3A/3C/55/71	a
KH232	Conejo	C	3C/55/71	a
KH119	Conejo	C	29/3A/3C/55/71/6/42E/47/54/75/84/94	a
KH522	Conejo	C	29/52/52A/80/3A/3C/55/71/6/42E/47/53/54/75/84	a
KH273	Conejo	H	N.T.	h

<sup>a</sup>Biotipado, <sup>b</sup>Fagotipado y <sup>c</sup>RAPD tipo de Hermans *et al.*, (2000). (NT: no tipable).

**Tabla III-5.** Aislados de diferentes especies caracterizados genotípicamente.

Cepas	Hospedador	Referencia
Mu50	Humano	Hiramatsu <i>et al.</i> , 1997
N315	Humano	Kuroda <i>et al.</i> , 2001
EMRSA-16 (MRSA252)	Humano	Holden <i>et al.</i> , 2004
COL	Humano	Gill <i>et al.</i> , 2005
Newman	Humano	Duthie y Lorenz, 1952
NCTC8325	Humano	Novick, 1967
MSSA476	Humano	Holden <i>et al.</i> , 2004
JP5447-JP5450, JP5453, JP5460	Ave	Proporcionados por Exopol S.L.
JP5451, JP5457, JP5458	Macaco	Proporcionados por Exopol S.L.
JP5454, JP5455	Caballo	Proporcionados por Exopol S.L.
JP5456, JP5459	Ciervo	Proporcionados por Exopol S.L.
JP3304-JP3313	Porcino	Proporcionados por Exopol S.L.
JP3314-JP3323	Bovino	Proporcionados por Exopol S.L.
RF122	Bovino	Fitzgerald <i>et al.</i> , 2000
V299	Bovino	Cucarella <i>et al.</i> , 2004
V315	Bovino	Cucarella <i>et al.</i> , 2004
V329	Bovino	Cucarella <i>et al.</i> , 2001
JP3324-JP3333	Ovino	Proporcionados por Exopol S.L.
JP3334-JP3343	Caprino	Proporcionados por Exopol S.L.

### **3.4.-Tipado de cepas de *S. 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 basado en el análisis de las regiones polimórficas de los genes *coa* (Hookey *et al.*, 1998), *spa* (Frenay *et al.*, 1994; Shopsin *et al.*, 1999) y *clfB* (Koreen *et al.*, 2005).

#### **3.4.1.- Purificación del ADN genómico**

Para la obtención del ADN genómico se inoculó un tubo estéril con medio TSB (caldo de triptona y soja, Scharlau) a partir de una única colonia del aislado y se dejó crecer a 37°C toda una noche. El ADN cromosomal de *S. aureus* se extrajo mediante el kit Genelute Bacteril Genomic DNA (Sigma), siguiendo el protocolo del fabricante, excepto por el lisado de la pared celular mediante 12,5 µg/ml de lisostafina durante una hora a 37°C antes de la purificación del ADN.

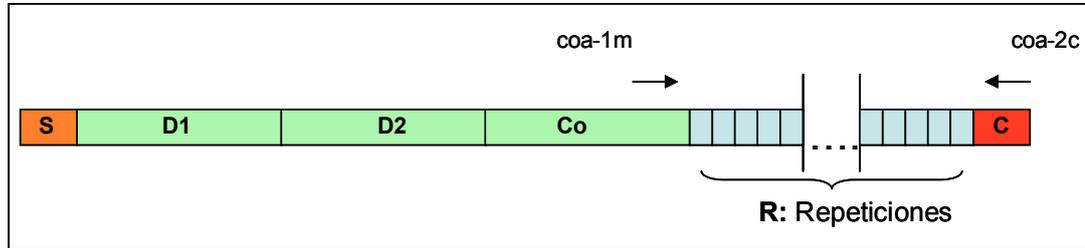
#### **3.4.2.- Caracterización molecular de cepas de *S. aureus* procedentes de conejo**

Para realizar el tipado molecular, se amplificaron las regiones polimórficas de los genes *coa/spa/clfB* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente se digirió el producto obtenido de *coa* y *spa* para analizar su polimorfismo en los fragmentos de restricción (RFLP).

Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó un termociclador modelo Techne Progene. La mezcla de reacción contenía 2 mM de ión Mg<sup>2+</sup>, 200 µM de cada uno de los nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP. Amersham Pharmacia), 200 nM de cada uno de los cebadores, 0,5 unidades de ADN polimerasa (Netzyme), 40 a 80 ng de ADN purificado y agua hasta un volumen final de 25 µl.

La amplificación mediante PCR del gen de la coagulasa se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Hookey *et al.* (1998). Para ello se emplearon los oligonucleótidos *coa-1m* y *coa-2c* (figura III-2, tabla III-6) a una concentración 5 veces superior a la habitual. Las condiciones de PCR consistieron en una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C

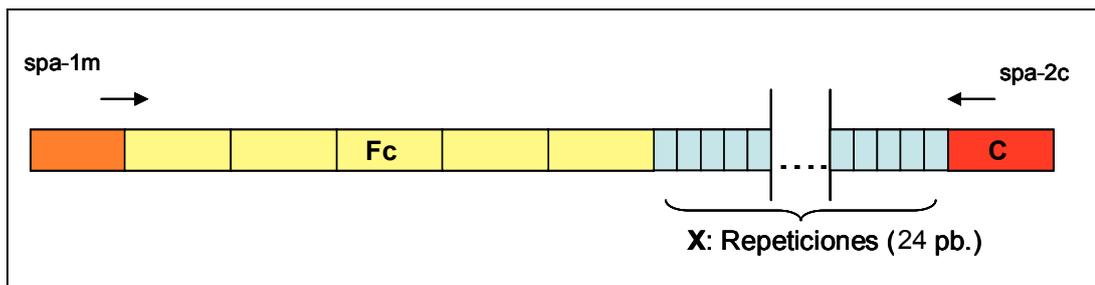
durante 20 s, 57°C durante 15 s y 72°C durante 50 s, con una etapa final a 72 °C durante 5 minutos.



**Figura III-2.** Esquema de la secuencia del gen de la coagulasa.

**S:** secuencia señal, **D1:** región D1, **D2:** región D2, **Co:** región altamente conservada entre cepas, **R:** zona con repeticiones variables, **C:** región C-terminal.

La amplificación mediante PCR del gen de la proteína A se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Frenay *et al.* (1994), pero con modificaciones. Para ello se emplearon los oligonucleótidos spa-1m y spa-2c (figura III-3, tabla III-6). Las condiciones de PCR consistieron en una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida de 40 ciclos a 94°C durante 20 s, 50°C durante 20 s y 72°C durante 90 s, con una etapa final a 72 °C durante 5 minutos.

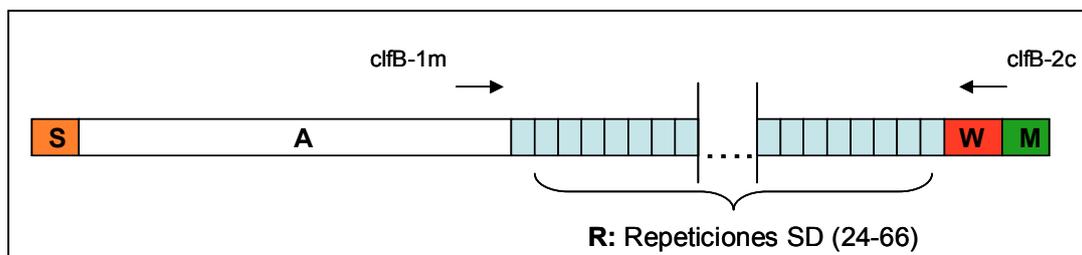


**Figura III-3.** Esquema de la secuencia de la proteína A.

**Fc:** secuencia de unión a la región Fc, **X:** región X, región polimórfica con repeticiones de 21-27 pb, **C:** anclaje a la pared celular.

Por último, para amplificar la región variable del gen *clfB* nos basamos en el procedimiento descrito por Koreen *et al.* (2005), empleándose los oligonucleótidos clfB-1m y clfB-2c (figura III-4, tabla III-6). Las condiciones de PCR consistieron en

una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C durante 20 s, 56°C durante 20 s y 72°C durante 60 s, con una etapa final a 72 °C durante 5 minutos.



**Figura III-4.** Esquema de la secuencia de cumpling factor B.

**S:** secuencia señal, **A:** secuencia de 500 aa, **R:** unión de región A y W, zona de repeticiones serina-aspartato, **W:** anclaje a la pared celular, **M:** región transmembrana.

**Tabla III-6.** Oligonucleótidos empleados en la caracterización molecular.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Programa PCR
coa-1m	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G	94°C 4'; 30 (94°C 20'', 57°C 15'', 72°C 50''); 72°C 5'
coa-2c	GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	
spa-1m	GAT TTT AGT ATT GCA ATA CAT AAT TCG	94°C 4'; 40 (94°C 20'', 50°C 20'', 72°C 90''); 72°C 5'
spa-2c	CCA CCA AAT ACA GTT GTA CCG	
clfB-1m	CAG CAG TAA ATC CGA AAG ACC C	94°C 4'; 35 (94°C 20'', 56°C 20'', 72°C 60''); 72°C 5'
clfB-2c	CAC CTT TAG GAT TTG ATG GTG C	

Una alícuota de 5 µl del producto de PCR de cada gen era analizada por electroforesis en un gel de agarosa (Molecular Netline, Need) al 2% (para el producto de *coa*) y al 1% (para el producto de *spa* y *clfB*) en presencia de bromuro de etidio (Mercury, EEUU) y eran fotografiados bajo luz UV.

Posteriormente, después de analizar los productos de PCR de los genes de la coagulasa y proteína A, se realizó un análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción de dichos genes (Hookey *et al.*, 1998). Para ello, aproximadamente 500 ng del producto de PCR precipitado con etanol/acetato se digirieron con 5 U del enzima de restricción *CfoI* (Roche) a 37°C durante 2 horas. El resultado de la digestión se analizó por electroforesis en un gel de agarosa (Molecular Netline, Need) al 3% en presencia de bromuro de etidio (Mercury, EEUU) y eran fotografiados bajo luz UV.

La combinación de tamaños obtenidos antes y después de la digestión de cada uno de los genes sirvió para definir los distintos patrones o tipos.

Los genotipos determinados por los genes *coa/spa/cfb* se identificaron mediante un código alfabético (latino y griego) y uno numérico (arábigo y romano). La identificación de cada genotipo se compuso de dos pares de signos: una letra latina y un número arábigo para el producto de PCR del gen *coa* y el resultado de su digestión respectivamente, un número romano y un número arábigo para el producto de PCR del gen *spa* y el resultado de su digestión respectivamente, y finalmente, una letra del alfabeto griego para el producto de PCR del gen *cfb*.

### 3.4.3.- Multilocus Sequence Typing (MLST).

Adicionalmente, como complemento, se realizó una comparación entre la caracterización genotípica basada en los genes *coa*, *spa* y *cfb* y otro método de tipado denominado Multilocus Sequence Typing (MLST) (Enright *et al.*, 2000). Este método permite discernir entre diferentes líneas clonales mediante la detección de variaciones en siete locus o genes polimórficos. Se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de siete genes que codifican para enzimas metabólicos (“housekeeping genes”): *arc* (Carbamate kinase), *aro* (Shikimate dehydrogenase), *glp* (Glycerol kinase), *gmk* (Guanylate kinase), *pta* (Phosphate acetyltransferase), *tpi* (Triosephosphate isomerase), *yqi* (Acetyle coenzyme A acetyltransferase). Los productos de PCR se purificaron y se secuenciaron mediante secuenciación clásica. Como resultado se obtuvieron cada una de las secuencias de los *loci*, pudiéndolas comparar con las ya existentes en la base de datos centralizada “saureus.mlst.net”, obteniendo un perfil alélico o *sequence type* (ST). Las condiciones de PCR así como la secuencia de cebadores se encuentran disponibles en la página web saureus.mlst.net.

### 3.4.4.- Método de secuenciación clásico de ADN

Por otra parte, los productos de PCR de los genes *coa* y *spa* se purificaron mediante el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen), según recomendaciones del fabricante. Tras el purificado, los productos de PCR se secuenciaron directamente por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia (IBMCP-UPV), mediante el método de la terminación de cadena por incorporación de dideoxinucleótidos

marcados con fluorocromos y utilizando un secuenciador automático modelo ABI 377 (PE Biosystems; Foster City, California). Los cebadores empleados fueron los mismos que los utilizados para la amplificación mediante PCR.

Mediante este método de secuenciación se determinó si había correlación entre el ADN secuenciado procedente del producto de PCR de los genes *coa* y *spa* y los patrones electroforéticos procedentes del polimorfismo de los fragmentos de restricción procedentes de la digestión con *CfoI* mediante el análisis con los programas BLAST 2.0 del servidor NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov); (Altschul *et al.*, 1997)) y el programa Vector NTI (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California).

### **3.5.- Análisis mediante PCR de factores de virulencia bacterianos**

Treinta y nueve factores de virulencia fueron examinados mediante PCR para determinar su presencia o ausencia de una selección de aislados representativa de cada lesión y genotipo. Los determinantes bacterianos examinados se describen en la literatura como posibles factores de virulencia.

La secuencia de cebadores, las condiciones del termociclador, los controles positivos y las referencias se resumen en la tabla III-7. Para el diseño de los cebadores empleados en este estudio se emplearon secuencias disponibles en el GenBank y se obtuvieron de Invitrogen.

En cada amplificación se usaron 100 ng de ADN, 100 pmol de cada cebador, 200  $\mu$ M (de cada) de deoxinucleosido trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, y dTTP), 1X buffer (Netzyme), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, y 1 U de ADN polimerasa termoestable (Netzyme). Se añadió agua hasta un volumen final de 25  $\mu$ l. Para determinar el tamaño del producto de PCR se analizaron 5  $\mu$ l por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Como controles positivos de los diferentes determinantes bacterianos se emplearon las siguientes cepas: Newman (Duthie y Lorenz, 1952), NCTC 8325 (Novick, 1967), MSSA476 (Holden *et al.*, 2004), RF122 (Fitzgerald *et al.*, 2000), N315 (Kuroda *et al.*, 2001), V329 (Cucarella *et al.*, 2001), COL (Gill *et al.*, 2005), FRI1151m (Jaulhac *et al.*, 1991), FRI326 (Jaulhac *et al.*, 1991), RN6390 (Peng *et al.*, 1988), RN6734 (Vojtov *et al.*, 2002), RN6607 (Ji *et al.*, 1997), RN8465 (Ji *et al.*, 1997), RN4850 (Jarraud *et al.*, 2000) y la cepa 2020, un aislado humano proporcionado por el laboratorio de J.R. Fitzgerald.

**Tabla III-7.** Determinantes bacterianos examinados en este estudio. Cebadores y programas de PCR para la amplificación de los genes.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Control +	PCR <sup>a</sup>	Referencia
<i>clfA</i>				
<i>clfA</i> -1m	GTA GGT ACG TTA ATC GGT T	Newman	1	Peacock <i>et al.</i> , 2002
<i>clfA</i> -2c	CTC ATC AGG TTG TTC AGG			
<i>fnbA</i>				
<i>fnbA</i> -1m	CAC AAC CAG CAA ATA TAG	8325	2	Peacock <i>et al.</i> , 2002
<i>fnbA</i> -2c	CTG TGT GGT AAT CAA TGT C			
<i>fnbB</i>				
<i>fnbB</i> -1m	GTA ACA GCT AAT GGT CGA ATT GAT ACT	8325	4	Tristan <i>et al.</i> , 2003
<i>fnbB</i> -2c	CAA GTT CG ATA GGA GTA CTA TGT TC			
<i>cna</i>				
<i>cna</i> -1m	AGT GGT TAC TAA TAC TG	MSSA-476	2	Peacock <i>et al.</i> , 2002
<i>cna</i> -2c	CAG GAT AGA TTG GTT TA			
<i>sdrC</i>				
<i>sdrC</i> -1m	ACG ACT ATT AAA CCA AGA AC	Newman	3	Peacock <i>et al.</i> , 2002
<i>sdrC</i> -2c	GTA CTT GAA ATA AGC GGT TG			
<i>sdrD</i>				
<i>sdrD</i> -1m	GGA AAT AAA GTT GAA GTT TC	Newman	3	Peacock <i>et al.</i> , 2002
<i>sdrD</i> -2c	ACT TTG TCA TCA ACT GTA AT			
<i>sdrE</i>				
<i>sdrE</i> -1m	ATC AAG TAC TCA AAA ACA GC	Newman	3	Este trabajo
<i>sdrE</i> -2c	TGG CTT GTT TCT TTA CCT GC			
<i>bbp</i>				
<i>bbp</i> -1m	AACTACATCTAGTACTCAACAACAG	RF122	2	Tristan <i>et al.</i> , 2003
<i>bbp</i> -2c	ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT			
<i>ebpS</i>				
<i>ebpS</i> -1m	CATCCAGAACCAATCGAAGAC	Newman	2	Tristan <i>et al.</i> , 2003
<i>ebpS</i> -2c	CTTAACAGTTACATCATCATGTTTATCTTTG			
<i>map/eap</i>				
<i>map/eap</i> -1m	GCG AAA TAT ACA GTT AAT TT	Newman	1	Peacock <i>et al.</i> , 2002
<i>map/eap</i> -2c	ACT TTT TTA ATG TCA GTT GC			
<i>ica A</i>				
<i>icaA</i> -1m	CCA GAA AAT TCC TCA CCC GTA TTAG	N315	4	Este trabajo
<i>icaA</i> -2c	GTG TCT GAC TTC GCT TTA ATA CAG CC			
<i>fib</i>				
<i>fib</i> -1m	GCG AAG GAT ACG GTC CAA GAG A	Newman	4	Boden W. <i>et al.</i> , 1995
<i>fib</i> -2c	CAA TTC GCT CTT GTA AGA CCA TT			
<i>bap</i>				
<i>sasp</i> -1m	CCC TAT ATC GAA GGT GTA GAA TTG CAC	V239	3	Trotonda <i>et al.</i> , 2005
<i>sasp</i> -2c	GCT GTT GAA GTT AAT ACT GTA CCT GC			
<i>tst</i>				
<i>tsst</i> -1m	CTA ATC AAA TAA TCA AAA CTG C	N315	3	Este trabajo
<i>tsst</i> -2c	TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT			
<i>sea</i>				
<i>sea</i> -1m	AAA GTC CCG ATC AAT TTA TGG CTA	MSSA-476	4	Akineden <i>et al.</i> , 2001
<i>sea</i> -2c	GTA ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA			
<i>seb</i>				
<i>seb</i> -1m	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	COL	4	Akineden <i>et al.</i> , 2001
<i>seb</i> -2c	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC			
<i>sec</i>				
<i>sec</i> -1m	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	N315	4	Akineden <i>et al.</i> , 2001
<i>sec</i> -2c	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC			
<i>sed</i>				
<i>sed</i> -1m	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT	FRI1151m	4	Akineden <i>et al.</i> , 2001
<i>sed</i> -2c	TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG			
<i>see</i>				
<i>see</i> -1m	TAG ATA AGG TTA AAA CAA GC	FRI326	4	Akineden <i>et al.</i> , 2001
<i>see</i> -2c	TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC			
<i>seg</i>				
<i>seg</i> -1m	AAT TAT GTG AAT GCT CAA CCC GAT C	N315	4	Akineden <i>et al.</i> , 2001
<i>seg</i> -2c	AAA CTT ATA TGG AAC AAA AGG TAC TAG TTC			
<i>seh</i>				
<i>seh</i> -1m	CAA TCA CAT CAT ATG CGA AAG CAG	MSSA-476	4	Akineden <i>et al.</i> , 2001
<i>seh</i> -2c	CAT CTA CCC AAA CAT TAG CAC C			
<i>sei</i>				
<i>sei</i> -1m	CTC AAG GTG ATA TTG GTG TAG G	N315	4	Akineden <i>et al.</i> , 2001
<i>sei</i> -2c	AAA AAA CTT ACA GGC AGT CCA TCT C			

Estafilococia en conejos: relación entre genotipos, virulencia y lesiones

Cebador	Secuencia (5'-3')	Control +	PCR <sup>a</sup>	Referencia
<i>selj</i>				
<i>selj</i> -1m	CAT CAG AAC TGT TGT TCC GCT AG	FRI1151m	4	Akineden <i>et al.</i> , 2001
<i>selj</i> -2c	CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGT AC			
<i>selk</i>				
<i>selk</i> -1m	ATG GCG GAG TCA CAG CTA CT	COL	4	Holtfreter <i>et al.</i> , 2004
<i>selk</i> -2c	TGC CGT TAT GTC CAT AAA TGT T			
<i>sell</i>				
<i>sell</i> -1m	CAC CAG AAT CAC ACC GCT TA	N315	4	Holtfreter <i>et al.</i> , 2004
<i>sell</i> -2c	TCC CCT TAT CAA AAC CGC TAT			
<i>selm</i>				
<i>selm</i> -1m	CTA TTA ATC TTT GGG TTA ATG GAG AAC	N315	4	Jarraud <i>et al.</i> , 2001
<i>selm</i> -2c	TTC AGT TTC GAC AGT TTT GTT GTC AT			
<i>seln</i>				
<i>seln</i> -1m	ACG TGG CAA TTA GAC GAG TC	N315	4	Jarraud <i>et al.</i> , 2001
<i>seln</i> -2c	GAT TGA TCT TGA TGA TTA TGA G			
<i>selo</i>				
<i>selo</i> -1m	GAG AGT TTG TGT AAG AAG TCA AGT G	N315	4	Smyth <i>et al.</i> , 2005
<i>selo</i> -2c	GAT TCT TTA TGC TCC GAA TGA GAA			
<i>selp</i>				
<i>selp</i> -1m	CTG AAT TGC AGG GAA CTG CT	N315	4	Holtfreter <i>et al.</i> , 2004
<i>selp</i> -2c	ATT GGC GGT GTC TTT TGA AC			
<i>selq</i>				
<i>selq</i> -1m	GAA CCT GAA AAG CTT CAA GGA	N315	4	Holtfreter <i>et al.</i> , 2004
<i>selq</i> -2c	ATT CGC CAA CGT AAT TCC AC			
<i>selu</i>				
<i>selu</i> -1m	TAA AAT AAA TGG CTC TAA AAT TGA TGG	N315	4	Letertre <i>et al.</i> , 2003
<i>selu</i> -2c	ATC CGC TGA AAA ATA GCA TTG AT			
<i>eta</i>				
<i>eta</i> -1m	CTA GTG CAT TTG TTA TTC AA	2020	4	Akineden <i>et al.</i> , 2001
<i>eta</i> -2c	TGC ATT GAC ACC ATA GTA CT			
<i>etb</i>				
<i>etb</i> -1m	ACG CGT ATA TAC ATT CAA TT	2020	4	Akineden <i>et al.</i> , 2001
<i>etb</i> -2c	TCC ATC GAT AAT ATA CCT AA			
<i>lukS,F-PV</i>				
<i>pvl</i> -1m	ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A	RN6390	4	Lina <i>et al.</i> , 1999
<i>pvl</i> -2c	GCA TCA AGT GTA TTG GAT AGC AAA AGC			
<i>hlg</i>				
<i>hlg</i> -1m	GCC AAT CCG TTA TTA GAA AAT GC	Newman	4	Lina <i>et al.</i> , 1999
<i>hlg</i> -2c	CCA TAG ACG TAG CAA CGG AT			
<i>sspA</i>				
<i>ssp</i> -1m	CAA GTG CTG CAG GTC AAG TTG	COL	4	Este trabajo
<i>ssp</i> -2c	CCG TGC GTA GCA TCT ACG ACG TG			
<i>cap5</i>				
<i>cap5</i> -1m	CAT AAT TCG AGG GTT TGG TC	Newman	4	Este trabajo
<i>cap5</i> -2c	CTA ATT GCC GCT GGA ACT GCC			
<i>cap8</i>				
<i>cap8</i> -1m	GTT TGG TCT TGT TAT TTG TGG	RF122	4	Este trabajo
<i>cap8</i> -2c	CTT CTA ACG AAT GAC TCT TCC G			
<i>agrI</i>				
<i>agrI</i> -1m	CAC TTA TCA TCA AAG AGC C	RN6734	3	Strommenger <i>et al.</i> , 2004
<i>agrI</i> -2c	CCA CTA ATT ATA GCT GG			
<i>agrII</i>				
<i>agrII</i> -1m	GTA GAG CCG TAT TGA TTC	RN6607	3	Strommenger <i>et al.</i> , 2004
<i>agrII</i> -2c	GTA TTT CAT CTC TTT AAG G			
<i>agrIII</i>				
<i>agrIII</i> -1m	TAT ATA AAT TGT GAT TTT TTA TTG	RN8465	3	Peacock <i>et al.</i> , 2002
<i>agrIII</i> -2c	TTC TTT AAG AGT AAA TTG AGA A			
<i>agrIV</i>				
<i>agrIV</i> -1m	GTT GCT TCT TAT AGT ACA ATG TT	RN4850	3	Peacock <i>et al.</i> , 2002
<i>agrIV</i> -2c	CTT AAA AAT ATA GTG ATT CCA ATA			

Programa PCR<sup>a</sup>: **1:** 94°C durante 3 min; 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 45°C durante 30 s, y 72°C durante 120 s; 72°C durante 5 min. **2:** 94°C durante 3 min; 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 50°C durante 30 s, y 72°C durante 120 s; 72°C durante 5 min. **3:** 94°C durante 3 min; 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 50°C durante 30 s, y 72°C durante 60 s; 72°C durante 5 min. **4:** 94°C durante 3 min; 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 55°C durante 30 s, y 72°C durante 60 s; 72°C durante 5 min.

### **3.6.- Análisis mediante Southern blot de factores de virulencia bacterianos**

Los resultados obtenidos mediante PCR fueron corroborados mediante el análisis Southern blot. Para la hibridación Southern blot se digirió el ADN mediante 5 U del enzima de restricción *HindIII* (Roche) a 37°C durante toda la noche. Tras someter el ADN digerido a electroforesis en gel de agarosa, se realizó un proceso de depurinización en medio ácido (HCl 0,25 M) y se transfirió a membranas de nylon cargadas positivamente (Hybond-N; 0.45 mm pore-size filters; Amersham Life Science) utilizando el método de capilaridad inversa en medio alcalino (NaOH 0,4 M) (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1990). La hibridación de la sonda y el ADN se puso de manifiesto según el protocolo proporcionado por el kit PCR-digoxigenin DNA-labeling and chemiluminescence detection (Roche).

Todas las sondas utilizadas en este estudio fueron marcadas con digoxigenina al mismo tiempo que se sintetizaban por PCR. Para ello se sustituyó parte del dTTP por dUTP-digoxigenina (Roche Molecular Biochemicals), de forma que la concentración final fue 200 µM de dATP, dCTP y dGTP, 190 µM de dTTP y 10 µM de dUTP-digoxigenina. Las sondas se desnaturalizaron por calor antes de cada uso. La detección se realizó con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina que se reveló por quimioluminiscencia, utilizando como sustrato CSPD-ready-to-use<sup>®</sup> (Roche Molecular Biochemicals).

### **3.7.- Metodología empleada para el estudio de la cepa IVIA-1**

#### **3.7.1.- Método de secuenciación de ADN mediante pirosecuenciación**

Para la secuenciación completa del genoma de *S. aureus* se extrajo una muestra de ADN conforme al protocolo descrito con anterioridad. En un gel de agarosa al 2% se corrió una alícuota de la muestra para comprobar que no existía degradación. Una muestra de 10 µg de ADN se envió a la empresa 454 Life Science Corporation (Bradford, Connecticut, EEUU) para secuenciarla mediante pirosecuenciación. El resto de la muestra se empleó para completar las secuencias inciertas de ADN (“gaps”) mediante secuenciación clásica. Las secuencias ensambladas (“contigs”) obtenidos mediante pirosecuenciación se alinearon con secuencias de *S. aureus* conocidas para predecir los fragmentos que faltaban para

completar la secuencia. Se diseñaron cebadores para realizar PCRs con el mismo ADN molde. Posteriormente, se secuenció mediante secuenciación clásica (punto 3.4.4).

### **3.7.2.- Análisis *in silico***

Para completar la secuenciación completa del genoma de *S. aureus*, así como para buscar homologías con otras secuencias conocidas se empleó el programa ARTEMIS (Rutherford *et al.*, 2000).

Otros recursos utilizados fueron los programas Chromas (McCarthy, Griffith University, Australia) y BLAST del servidor NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov); (Altschul *et al.*, 1997)).

Las secuencias fueron comparadas con la base de datos del GenBank, que incluye el genoma completo de 22 cepas de *S. aureus*.

### **3.7.3.- Cepas, plásmidos, cebadores y medios utilizados en este estudio**

Las cepas, los plásmidos y los cebadores utilizados se recogen en las tablas III-7, III-8 y III-9. Las cepas de *S. aureus* se crecieron rutinariamente a 32°C, 37°C o 43°C en TSA o en TSB (Scharlau) y se guardaron como glicerizados a -75°C. Cuando fue conveniente, se incorporaron los antibióticos eritromicina (20 µgr ml<sup>-1</sup> o 2,5 µgr ml<sup>-1</sup>), tetraciclina (3 µgr ml<sup>-1</sup>), cloranfenicol (20 µgr ml<sup>-1</sup>) o el producto Xgal (20 mg ml<sup>-1</sup>) (Roche).

Se utilizó caldo Luria-Bertani (LB) o placas de agar Luria-Bertani (Pronadisa) para cultivar cepas de *E. coli*. Para mantener las construcciones en *E. coli* se utilizó el antibiótico ampicilina (100 µgr ml<sup>-1</sup>).

### **3.7.4.- Inducción de la respuesta SOS en la cepa IVIA-1**

El ciclo lítico de los fagos que se encuentran en estado latente en la bacteria puede inducirse mediante la aplicación de sustancias que activen la respuesta SOS. Para obtener un lisado de una cepa lisogénica, se realizó una dilución 1/50 en TSB de un cultivo estacionario y se creció hasta alcanzar una OD<sub>540</sub> = 0,4. Seguidamente se añadió mitomicina C (Sigma, 2 µgr ml<sup>-1</sup>) y posteriormente los

cultivos se crecieron en agitación lenta (73 rpm) a 32°C. La lisis normalmente solía ocurrir sobre las 3 horas. Los lisados obtenidos se filtraron en filtros de 0,2 µm para eliminar aquellas bacterias que no hubieran sido lisadas. Finalmente, estos lisados se guardaron a 4°C hasta su uso.

Con los fagos obtenidos se procedió a realizar infecciones en placa. Se diluyó un cultivo estacionario de la cepa a infectar 1/50 en TSB y se creció hasta alcanzar una  $OD_{540} = 0,4$ . Se infectaron 50 µl de este cultivo con 100 µl de diluciones seriadas en “phage buffer” (1M NaCl, 0,05M Tris 2,5M pH=7,8, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 4mM CaCl<sub>2</sub>), del lisado a temperatura ambiente durante 5 minutos. Tras los cuales, a la mezcla de fagos y bacterias se les añadió 3 ml de “phage top agar” (25 gr de Nutrient Broth N°2, Oxoid; 3,5 gr de agar) y se plaqueó en placas de “phage base” (25 gr de Nutrient Broth N°2, Oxoid; 7gr de agar) suplementadas con CaCl<sub>2</sub> a una concentración final de 10mM. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se recogió el “phage top agar”, se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm y los lisados obtenidos se filtraron en filtros de 0,2 µm y se guardaron a 4°C hasta su uso.

### 3.7.5.- Introducción de un gen marcador en la cepa IVIA-1

Para introducir un gen marcador que confiera resistencia a tetracina (*tetM*) a la bacteria se utilizó el plásmido pRN6680 que contiene el gen *tetM* clonado (Sloane *et al.*, 1991). En este plásmido, a ambos lados del gen *tetM*, se clonaron dos fragmentos flanqueantes a la región donde se deseaba introducir el gen de resistencia, utilizando los pares de cebadores DL190-133mXBg/DL190-134cB y DL190-135cP/DL190-136mE. Mediante corte *Bgl*II / *Eco*RI se liberó del plásmido todo el fragmento que contenía el gen *tetM* y los fragmentos flanqueantes. Posteriormente este fragmento fue clonado en el plásmido pMAD, obteniéndose la construcción pJP615. Después, se transformó esta construcción en la cepa RN4220, y se transdujo a la cepa IVIA-1 utilizando el fago 80α. Se crecieron las bacterias obtenidas a 30°C en TSB y se plaquearon diluciones del cultivo en fase estacionaria en TSA conteniendo eritromicina y Xgal a 43°C (temperatura restrictiva). Debido a que el plásmido no puede replicarse a 43°C, aquellas colonias que crecieron en eritromicina correspondían a las bacterias donde se había producido integración del plásmido en el cromosoma bacteriano por recombinación homóloga de alguno de los dos fragmentos flanqueantes. Se muestrearon de 1 a 5

de estas colonias en TSB sin antibiótico, se plaquearon diluciones del cultivo estacionario en TSA conteniendo Xgal y se seleccionaron aquellas colonias que eran blancas, ya que habían perdido el plásmido en la segunda recombinación. Finalmente se comprobó qué colonias eran resistentes a tetraciclina para diferenciarlas del fenotipo original, obteniéndose la cepa JP 5633.

### **3.7.6.- Transducción**

Se realizaron diluciones seriadas del lisado a transducir en phage buffer. Cien microlitros de estas diluciones se añadieron a 1 ml de bacteriasceptoras crecidas hasta  $OD_{540} = 1,4$  a las que se añadió  $CaCl_2$  a una concentración final de 4,4 mM. La mezcla del lisado con las bacterias se incubó a 37°C durante 20 minutos para dar tiempo suficiente al fago a penetrar en la bacteria. Posteriormente, se plaqueó la mezcla en placas de TSA con tetraciclina como marcador. Estas placas contenían citrato sódico (17 mM) para impedir que el fago lisara las bacterias.

### **3.7.7.- Plásmidos de fusión transcripcional**

Los plásmidos de fusión transcripcional pJP680, pJP681, pJP682 y pJP683 fueron construidos por diferentes amplificadores de PCR que contenían regiones promotoras de los genes a analizar dentro del plásmido pCN41 (Charpentier *et al.*, 2004), utilizando como enzimas de restricción *EcoRI* y *SaII*. Para la construcción del plásmido pJP680 se emplearon los cebadores phiDL190-5mE / phiDL190-8cS, para la construcción del plásmido pJP681 se emplearon los cebadores phiDL190-5mE / phiDL190-4cS, para generar el plásmido pJP682 se empleó el par de cebadores phiDL190-3mS / phiDL190-6cE, mientras que para la construcción del plásmido pJP683 se emplearon los cebadores phiDL190-7mS / phiDL190-6cE.

### **3.7.8.- Ensayo enzimático para la cuantificación de actividad $\beta$ -lactamasa en plásmidos de fusión transcripcional**

Para la realización de esta técnica se empleó el protocolo descrito por Ji *et al.* (1995). Se utilizó un cultivo de las cepas de interés crecido a 37° C en agitación, diluyendo este cultivo en TSB + Azida Sódica (5mM). Se transfirió un volumen final de 50  $\mu$ l a placas de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos de las distintas

diluciones, a las cuales se añadió 50 µl de la solución de nitrocefín (132 µg/ml en una solución de fosfato sódico 0,1M a pH 5,8).

Las placas se incubaron a 37°C en agitación, procediendo a su lectura en una THERMOmax (Molecular devices). La lectura se realizó a una longitud de onda de DO<sub>650</sub> y DO<sub>490</sub>, durante 20 minutos a intervalos de 20 segundos. Para el cálculo de las unidades de actividad β-lactamasa, se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Unidad de actividad } \beta\text{-lactamasa} = V_{\max} \text{ factor de dilución} / \text{DO}_{650\text{nm}}$$

$$V_{\max} = \Delta \epsilon \times 10^3 / \text{min}$$

Un incremento de absorbancia de 0,001 DO<sub>490</sub> se definió como 1 unidad de actividad β-lactamasa.

**Tabla III-8.** Cepas utilizadas en el estudio de la cepa IVIA-1.

<b>Cepa</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
IVIA-1	Aislado clínico procedente de mastitis cunícola.	Este estudio.
CO37	Aislado clínico procedente de un absceso cunícola.	Este estudio.
CO40	Aislado clínico procedente de mastitis cunícola.	Este estudio.
CO196	Aislado clínico procedente de mastitis cunícola.	Este estudio.
CO324	Aislado clínico procedente de mastitis cunícola.	Este estudio.
CO3	Aislado clínico procedente de mastitis cunícola.	Este estudio.
CO9	Aislado clínico procedente de mastitis cunícola.	Este estudio.
CO14	Aislado clínico procedente de otitis cunícola.	Este estudio.
98/2064	Aislado clínico cunícola procedente de Bélgica.	Dra. K. Hermans
KH454	Aislado clínico cunícola procedente de Bélgica.	Dra. K. Hermans
DV3	Aislado clínico cunícola procedente de Francia.	Dra. K. Hermans
DV18	Aislado clínico cunícola procedente de Francia.	Dra. K. Hermans
KH119	Aislado clínico cunícola procedente de Bélgica.	Dra. K. Hermans
HT0733	Aislado clínico humano.	Dr. R. Fitzgerald
E269	Aislado clínico humano.	Dr. R. Fitzgerald
2020	Aislado clínico humano.	Dr. R. Fitzgerald
CV15	Aislado clínico humano.	Dr. R. Fitzgerald
HT1215	Aislado clínico humano.	Dr. R. Fitzgerald
RN4220	Derivado defectivo en restricción de RN450.	(Kreiswirth <i>et al.</i> , 1983)
RN450	NCTC8325 curada de los fagos $\phi$ 11, $\phi$ 12 y $\phi$ 13.	(Novick, 1967)
RN4220 <i>lexA</i> Ind <sup>-</sup>	RN4220 <i>lexA</i> <sub>G94E</sub>	(Maiques <i>et al.</i> , 2006)
JP3964	RN4220 (pJP615)	Este estudio.
JP5633	Derivada IVIA-1, con marcador tetM en fago a estudio	Este estudio.
JP4237	RN4220 (pJP680)	Este estudio.
JP4238	RN4220 (pJP681)	Este estudio.
JP4239	RN4220 (pJP682)	Este estudio.
JP4240	RN4220 (pJP683)	Este estudio.
JP4502	RN4220 <i>lexA</i> <sub>A91D</sub> (pJP680)	Este estudio.

**Tabla III-9.** Plásmidos empleados en el estudio de la cepa IVIA-1.

Plásmido	Descripción	Referencia
pRN6680	Derivado del pBlueScript. Contiene el gen <i>tetM</i> .	(Sloane <i>et al.</i> , 1991)
pMAD	Vector lanzadera con origen termosensible para <i>S. aureus</i> , gen de resistencia a <i>erm</i> y el gen <i>lacZ</i> .	(Arnaud <i>et al.</i> , 2004)
pCN41	Utilizado en la fusión transcripcional de <i>Staphylococcus</i> , portador de $\beta$ -lactamasa <i>blaZ</i> , contiene resistencia a <i>erm</i> .	(Charpentier <i>et al.</i> , 2004)
pJP615	Plásmido derivado de pMAD para introducir el gen <i>tetM</i> .	Este estudio.
pJP680	Análisis transcripcional de <i>cl</i> en presencia de Cro, derivado de pCN41.	Este estudio.
pJP681	Análisis transcripcional de <i>cl</i> en ausencia de Cro, derivado de pCN41.	Este estudio.
pJP682	Análisis transcripcional de <i>cro</i> en ausencia de Cl, derivado de pCN41.	Este estudio.
pJP683	Análisis transcripcional de <i>cro</i> en presencia de Cl, derivado de pCN41.	Este estudio.

**Tabla III-10.** Cebadores utilizados en el estudio de la cepa IVIA-1.

Cebador	Secuencia (5'→3')	Utilidad
phiDL190-208m	TAG AAG CTG GAC TAG ATG G	PCR de escisión del fago en estudio.
phiDL190-209c	TTA CGT CAA ACG CAT CAG C	
phiDL190-1m	GCA TCA TTT GAA AAA AGA GG	PCR integrasa, análisis de la replicación del fago en estudio.
phiDL190-2c	CCA ATT GAG TGC GTT TGC	
DL190-133mXBg	<u>GCTCTAGAGAAGATCTGA</u> TGC AAT TGG TGT AAT GG	Cebadores empleados para introducir el marcador <i>tetM</i> en la cepa IVIA-1.
DL190-134cB	<u>CGGGATCCA</u> CCT TAT TTT CAA ATT CTT AC	
DL190-135cP	<u>AAACTGCAG</u> TTA ATA CTT ATT TAA TAA ATC TG	
DL190-136mE	<u>CGGAATTC</u> TAG TAA TAG TTA TAA ATG AGG	
phiDL190-3mS	<u>ACGCGTCGAC</u> TCA ATC TAG AAC TAA ATG ATT C	Cebadores para la construcción de los plásmidos de fusión transcripcional.
phiDL190-4cS	<u>ACGCGTCGAC</u> CAA AGC TAT ATC TGC TAC C	
phiDL190-5mE	<u>CCGGAATTC</u> CTT TCT TTA TTT ATC GCT ATT TG	
phiDL190-6cE	<u>CCGGAATTC</u> CAA TTC TAT TGA ACT TCT GTG	
phiDL190-7mS	<u>ACGCGTCGAC</u> CTT TCT TTA TTT ATC GCT ATT TG	
phiDL190-8cS	<u>ACGCGTCGAC</u> CAA TTC TAT TGA ACT TCT GTG	



## **IV.- RESULTADOS**



**IV.1.- Caracterización genotípica  
de cepas de *S. aureus* aisladas  
de lesiones de conejo.**



## **IV.1.- Caracterización genotípica de cepas de *S. aureus* aisladas de lesiones de conejo**

Las poblaciones naturales de *S. aureus* son muy heterogéneas (Tenover *et al.*, 1994; Kapur *et al.*, 1995), por lo que se hace necesario investigar la forma de diseminación de las cepas de *S. aureus* (Hookey *et al.*, 1998). En este apartado se quiso estudiar la distribución de *S. aureus* en las explotaciones cunícolas, así como comprobar si las cepas de *S. aureus* procedentes de conejo son iguales a las de otras especies. Este estudio se llevó a cabo mediante un tipado molecular basado en la amplificación del ADN y posterior análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP).

### **4.1.1.- Aislado bacteriano**

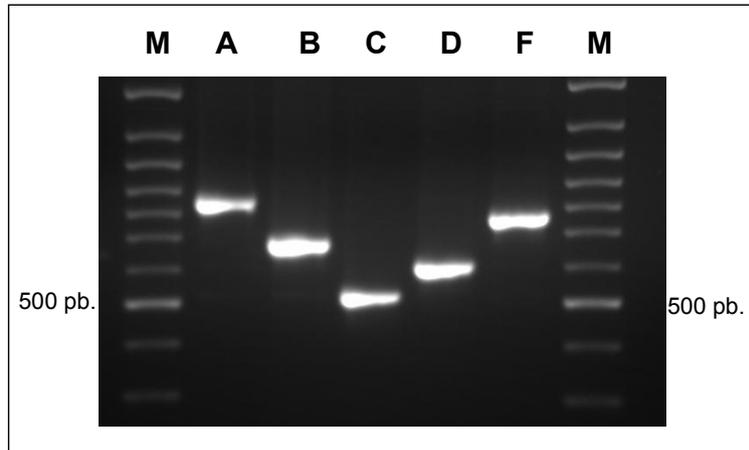
Tras el cultivo de las muestras y su posterior identificación mediante métodos clásicos se identificaron como cepas de *S. aureus* un total de 451 aislados, procedentes de 373 animales. Los aislados se caracterizaron por crecer en colonias opacas blancas o amarillas en placas de agar sangre, ser Gram-positivos y resultar positivos a la prueba de la catalasa y negativos a la de la oxidasa. Todos los aislados identificados como *S. aureus* resultaron positivos a la amplificación de los genes de la coagulasa, proteína A y clumping factor B, genes específicos de *S. aureus*.

### **4.1.2.- Caracterización molecular de cepas de *S. aureus* aisladas de conejo**

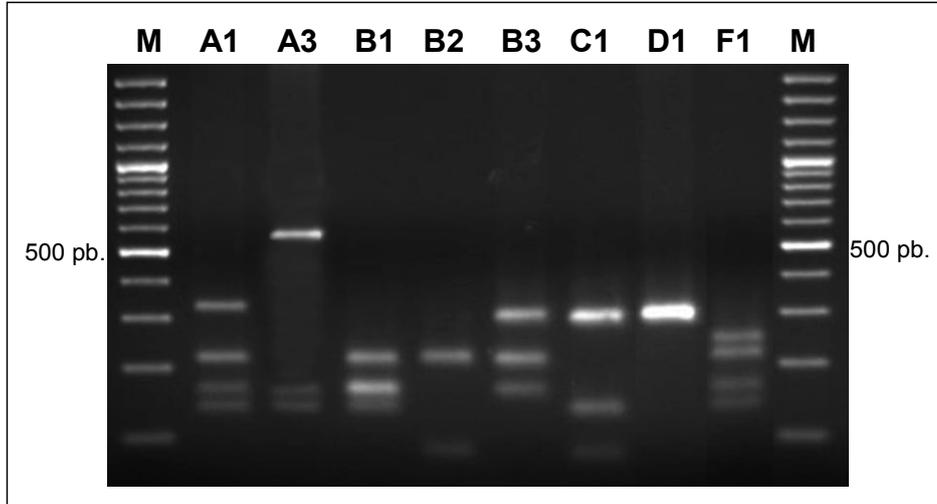
Una vez obtenidos los aislados, para determinar si las diferentes cepas de *S. aureus* procedentes de conejos infectados estaban relacionadas clonalmente, se realizó un tipado molecular de los 451 aislados. Este tipado se basó en el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción de los genes *coa* y *spa* (PCR-RFLP) y en el análisis mediante PCR del gen *clfB* (Frenay *et al.*, 1994; Hookey *et al.*, 1998; Koreen *et al.*, 2005).

Tras el estudio mediante PCR del gen *coa* se obtuvieron 5 tipos diferentes atendiendo al tamaño amplificado, denominándose A, B, C, D y F (figura IV-1). Tras la posterior digestión del producto de PCR con *CfoI*, se obtuvieron 8 patrones diferentes: A1, A3, B1, B2, B3, C1, D1 y F1 (figura IV-2), de los cuales dos

patrones procedían del producto A (A1 y A3), tres del B (B1, B2 y B3) y un patrón del resto de productos, lo que indica que la digestión por *CfoI* permite diferenciar clones inicialmente asignados como A y B.

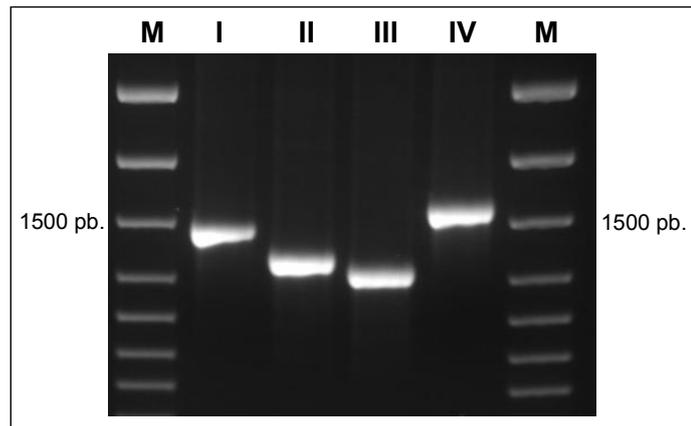


**Figura IV-1.** Análisis del producto de PCR del gen de la coagulasa por electroforesis en gel de agarosa. M: marcador de 100 pb (Fermentas).

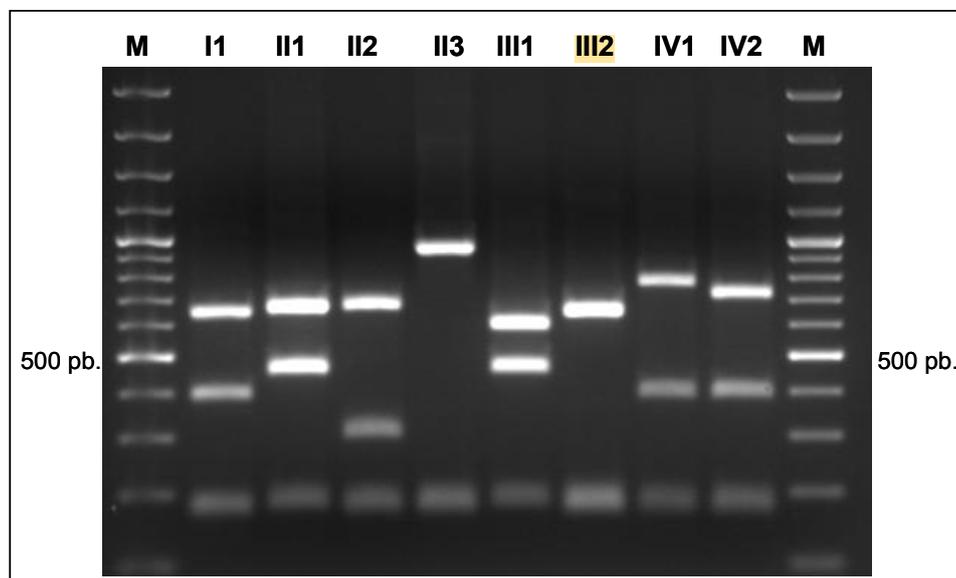


**Figura IV-2.** Patrones electroforéticos resultantes de la digestión del producto de PCR de *coa* con *CfoI*. M: marcador 100 pb (Fermentas).

Por su parte, el análisis por PCR del gen *spa* generó 4 tipos diferentes, denominados I, II, III y IV (figura IV-3). Al digerir el producto de PCR con *CfoI*, estos 4 tipos se ampliaron a 8 patrones diferentes: I1, II1, II2, II3, III1, III2, IV1 y IV2 (figura IV-4), ya que el tipo II y los tipos III y IV originaron 3 y 2 patrones diferentes, respectivamente.

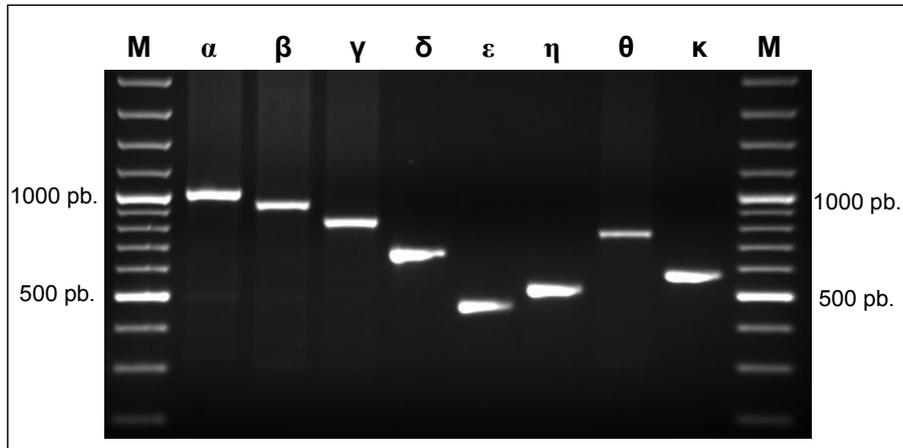


**Figura IV-3.** Análisis del producto de PCR del gen *spa* por electroforesis en gel de agarosa. M: marcador de 100 pb (Fermentas).



**Figura IV-4.** Patrones electroforéticos resultantes de la digestión del producto de PCR de *spa* con *CfoI*. M: marcador de 100 pb (Fermentas).

En último lugar, el estudio de los aislados de conejo mediante PCR del gen *clfB* proporcionó 8 patrones diferentes:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$  y  $\kappa$  (figura IV-5).



**Figura IV-5.** Análisis del producto de PCR del *clfB* por electroforesis en gel de agarosa. M: marcador de 100 pb (Fermentas).

La combinación de tamaños obtenidos antes y después de la digestión, así como la combinación del análisis de los tres genes (*coa/spa/clfB*), dio lugar a 26 genotipos diferentes en los 451 aislados analizados (tabla IV1-1):

**Tabla IV1-1.** Genotipos cunícolas determinados por los genes *coa/spa/clfB*.

<i>coa</i>	<i>spa</i>	<i>clfB</i>	Genotipo	Nº aislados	% aislados
A1	II1	$\delta$	A1/II1/ $\delta$	306	67,8
		$\varepsilon$	A1/II1/ $\varepsilon$	5	1,1
		$\eta$	A1/II1/ $\eta$	13	2,9
		$\kappa$	A1/II1/ $\kappa$	4	0,9
	III1	$\delta$	A1/III1/ $\delta$	40	8,9
A3	III2	$\delta$	A3/III2/ $\delta$	5	1,1
B1	I1	$\alpha$	B1/I1/ $\alpha$	6	1,3
		$\delta$	B1/I1/ $\delta$	2	0,4
	IV1	$\alpha$	B1/IV1/ $\alpha$	17	3,8
		$\beta$	B1/IV1/ $\beta$	1	0,2
		$\delta$	B1/IV1/ $\delta$	1	0,2
		$\theta$	B1/IV1/ $\theta$	1	0,2
	IV2	$\alpha$	B1/IV2/ $\alpha$	1	0,2
		$\beta$	B1/IV2/ $\beta$	4	0,9
$\theta$		B1/IV2/ $\theta$	2	0,4	
B2	IV1	$\delta$	B2/IV1/ $\delta$	3	0,7
B3	IV1	$\gamma$	B3/IV1/ $\gamma$	4	0,9
	IV2	$\gamma$	B3/IV2/ $\gamma$	1	0,2
C1	I1	$\beta$	C1/I1/ $\beta$	22	4,9
		$\gamma$	C1/I1/ $\gamma$	1	0,2
		$\theta$	C1/I1/ $\theta$	1	0,2
		II2	$\gamma$	C1/II2/ $\gamma$	1
D1	II3	$\alpha$	D1/II3/ $\alpha$	1	0,2
	IV1	$\alpha$	D1/IV1/ $\alpha$	3	0,7
	IV2	$\alpha$	D1/IV2/ $\alpha$	5	1,1
F1	II1	$\delta$	F1/II1/ $\delta$	1	0,2

Mediante secuenciación clásica se comprobó que en todos los casos la secuencia obtenida del producto de PCR correspondía a la suma de los fragmentos obtenidos tras la digestión.

En cuanto al número de aislados de cada genotipo, el genotipo más frecuentemente aislado fue con diferencia el A1/II1/δ, identificado en el 67,8% de las cepas. El genotipo A1/III1/δ fue el segundo en número de aislados con 40 (8,9%), pero aislándose 35 de ellos en la explotación 42, localizada en la provincia de Alicante y caracterizada por utilizar autorreposición y no introducir animales externos a la explotación. Los genotipos C1/I1/β y B1/IV1/α fueron tercero y cuarto en número de aislados, con 22 (4,9%) y 17 (3,8%), respectivamente (tablas IV1-2 y IV1-3). En el 46% de las explotaciones en las que se muestreó más de un animal (37 explotaciones, tabla III-1 y III-2) se obtuvo más de un genotipo.

En cuanto a la distribución de los 26 genotipos en las granjas, 17 sólo se aislaron en una explotación, mientras que los más distribuidos geográficamente fueron los genotipos A1/II1/δ, B1/IV1/α y C1/I1/β, aislándose de 33 (73,3%), 5 (11,1%) y 7 (15,6%) explotaciones respectivamente. El genotipo A1/II1/δ estuvo presente en todas las regiones analizadas, tanto de la provincia de Valencia como en otras provincias, mientras que el genotipo B1/IV1/α estuvo presente en 4 comarcas de la provincia de Valencia. Sin embargo, el genotipo C1/I1/β sólo se identificó en la comarca de la Canal de Navarrés, caracterizada por una alta densidad de animales (tablas IV1-2 y IV1-3).

**Tabla IV1-2.** Genotipos de las cepas cunícolas de *S. aureus* en relación a la granja de procedencia, en la provincia de Valencia.

Granjas	Localidad	<sup>a</sup> Comarca	<sup>b</sup> Densidad	Genotipos	<sup>c</sup> Historia clínica de estafilococias
1	Albalat	A	(1)	A1/II1/δ, B1/IV1/θ	Baja prevalencia.
2	Puzol	B	(2)	B1/I1/α	Alto índice de estafilococias (70/80%), principalmente en reproductoras.
3	Valencia	C	(2)	A1/II1/δ, B1/IV1/α, B1/IV1/β, B1/IV2/α	Baja prevalencia.
4	Alfarp	D	(3)	C1/II2/γ, D1/IV2/α	N.D.
5	Chiva	E	(3)	A1/II1/δ	N.D.
6	Buñol	E	(3)	B1/IV1/α, B1/IV2/β	Baja prevalencia.
7	Buñol	E	(3)	B1/IV1/δ, B1/IV2/β, B2/IV1/δ	Baja prevalencia.
8	Aras de los Olmos	F	(4)	A1/II1/η	Historial de estafilococias crónicas. Baja prevalencia en el momento del muestreo.
9	Aras de los Olmos	F	(4)	A1/II1/δ	Baja prevalencia.
10	Pedralba	F	(4)	A1/II1/δ	N.D.
11	Titaguas	F	(4)	D1/IV1/α	Baja prevalencia.
12	Fuenterrobles	G	(4)	A1/II1/δ	Historial de mastitis estafilocócicas crónicas. Sufría un brote en el momento del muestreo.
13	Fuenterrobles	G	(4)	A1/II1/δ	Baja prevalencia.
14	Fuenterrobles	G	(4)	A1/II1/δ	Baja prevalencia.
15	Fuenterrobles	G	(4)	A1/III1/δ	Baja prevalencia.
16	Fuenterrobles	G	(4)	A1/II1/δ	Baja prevalencia.
17	Fuenterrobles	G	(4)	A1/II1/δ	Historial de mastitis estafilocócicas crónicas. Baja prevalencia en el momento del muestreo.
18	Fuenterrobles	G	(4)	B1/IV1/α	Baja prevalencia.
19	Fuenterrobles	G	(4)	B1/IV2/β	Baja prevalencia.
20	Fuenterrobles	G	(4)	A1/II1/η	Baja prevalencia.
21	Sinarcas	G	(4)	A1/II1/δ, B1/IV1/α, B1/IV2/β, B1/IV2/θ	Baja prevalencia.
22	Anna	H	(5)	A1/II1/δ, C1/I1/β	N.D.
23	Anna	H	(5)	A1/II1/δ, C1/I1/β	Baja prevalencia.
24	Navarrés	H	(5)	A1/II1/δ, C1/I1/β	Baja prevalencia.
25	Navarrés	H	(5)	B1/II1/δ, F1/II1/δ	Alta prevalencia de mastitis (10-20%) en el momento del muestreo.
26	Navarrés	H	(5)	A1/II1/δ, D1/II3/α, D1/IV2/α	Baja prevalencia.
27	Navarrés	H	(5)	A1/II1/δ, A1/II1/η, A1/III1/δ, C1/I1/β, C1/I1/θ	Baja prevalencia.
28	Navarrés	H	(5)	A1/II1/δ, A1/IV1/ε, D1/IV2/α	N.D.
29	Navarrés	H	(5)	A1/II1/δ, C1/I1/β, C1/I1/γ	Baja prevalencia.
30	Navarrés	H	(5)	A1/II1/δ, C1/I1/β, D1/IV1/α, D1/IV2/α	N.D.
31	Navarrés	H	(5)	A1/II1/δ, C1/I1/β	N.D.
32	Navarrés	H	(5)	A1/II1/δ, B1/IV1/α	Baja prevalencia.
33	Millares	H	(5)	A1/II1/δ	Baja prevalencia.

<sup>a</sup>**Comarcas:** **A:** El Camp de Morvedre; **B:** L'Horta Nord; **C:** Valencia; **D:** Ribera Alta; **E:** Foya de Buñol; **F:** Los Serranos; **G:** Plana Utiel-Requena; **H:** Canal de Navarrés. <sup>b</sup>**Densidad cunícola en las diferentes comarcas:** **(1):** menos de 1.000 reproductoras; **(2):** entre 1.000 y 2.000; **(3):** Entre 2.000 y 5.000; **(4):** Entre 5.000 y 10.000 y **(5):** más de 10.000 reproductoras. <sup>c</sup>**Historia clínica de estafilococias:** **N.D.:** no se conocen datos. **Baja prevalencia:** afección de <3% de hembras. **Alta prevalencia:** afección de >10% de hembras. **Estafilococia crónica:** >10-20% de reproductoras afectadas crónicamente, con brotes periódicos. **Brotos:** incidencia de >50% de reproductoras.

**Tabla IV1-3.** Genotipos de las cepas cunícolas de *S. aureus* de las explotaciones estudiadas fuera de la provincia de Valencia.

Granjas	Localidad	<sup>a</sup> Provincia	Genotipos	<sup>b</sup> Historia clínica de estafilococias
34	Adzaneta	A	A1/II1/δ, A1/II1/k	Baja prevalencia.
35	Altura	A	A1/II1/δ	Baja prevalencia.
36	Altura	A	A1/II1/η	Baja prevalencia.
37	Altura	A	A1/II1/δ	Baja prevalencia.
38	Altura	A	A1/II1/δ	Baja prevalencia.
39	Altura	A	A1/II1/δ	Baja prevalencia.
40	Altura	A	A1/II1/δ	Baja prevalencia.
41	Soneja	A	A1/II1/δ, B3/IV1/γ, B3/IV2/γ	Baja prevalencia.
42	Gayanes	B	A1/II1/δ, A1/III1/δ	Baja prevalencia.
43	Ossa de Montiel	C	A1/II1/δ, A3/III2/δ	Baja prevalencia.
44	Mira	D	A1/II1/δ	Baja prevalencia.
45	Marchante	E	A1/II1/δ	Baja prevalencia.

<sup>a</sup>**Provincia:** **A:** Castellón; **B:** Alicante; **C:** Albacete; **D:** Cuenca; **E:** Navarra. <sup>b</sup>**Historia clínica de estafilococias:** **Baja prevalencia:** afección de <3% de hembras.

Por otro lado, con el objeto de determinar si los genotipos encontrados en este estudio también son frecuentes en otros lugares geográficos, se realizó el mismo tipado molecular mediante el análisis de los genes *coa/spa/clfB* a 16 aislados estafilocócicos de conejo proporcionados por la Dra. K. Hermans (Hermans *et al.*, 2000). Estos aislados provenían de otros países europeos (Bélgica e Inglaterra). Una vez realizado el genotipado se identificaron 7 genotipos: A1/II1/δ, A1/III1/ζ, B1/I1/α, B1/II1/δ, C1/I1/γ, F1/II1/δ y F2/III2/α (tabla IV1-4). Cinco de estos 7 genotipos fueron identificados entre los 26 genotipos descritos en este estudio: A1/II1/δ, B1/I1/α, B1/II1/δ, C1/I1/γ y F1/II1/δ. Estos 5 genotipos englobaron al 70,07% de los aislados analizados en el presente estudio (tabla IV1-1), lo que sugiere que los genotipos más prevalentes de aislados cunícolas de *S. aureus* se encuentran ampliamente distribuidos a nivel internacional. No obstante, los genotipos de la cepa KH 374X (Bélgica) y JS432 (Inglaterra), A1/III1/ζ y F2/III2/α respectivamente, no fueron identificados en este estudio. Además, los genotipos C1/I1/β y B1/IV1/α, segundo y tercero más representados geográficamente en la provincia de Valencia, no se identificaron en los aislados estudiados de otros países, lo que sugeriría que estas cepas estaban adaptadas a las condiciones particulares de la zona.

**Tabla IV1-4.** Genotipos procedentes de aislados cunícolas de otros países europeos, proporcionados por la Dra. K. Hermans.

Cepa	coa	spa	clfB	<sup>a</sup> Identificado
KH103	A1	II1	δ	sí
KH276	A1	II1	δ	sí
VL468	A1	II1	δ	sí
KH454	A1	II1	δ	sí
KH152	A1	II1	δ	sí
KH374X	A1	III1	ζ	no
VL10	B1	II1	δ	sí
266/3572	C1	I1	γ	sí
KH547	F1	II1	δ	sí
JS606	F1	II1	δ	sí
JS432	F2	III2	α	no
KH383	A1	II1	δ	sí
KH232	A1	II1	δ	sí
KH119	A1	II1	δ	sí
KH522	F1	II1	δ	sí
KH273	B1	I1	α	sí

<sup>a</sup>Identificado: genotipos aislados en este estudio.

Por otra parte, el genotipado utilizando los genes *coa/spa/clfB* fue capaz de diferenciar genotipos clasificados con anterioridad en el mismo patrón empleando el biotipado-fagotipado y tipo RAPD (tabla IV1-5) (Hermans *et al.*, 2000). Esto demostró que este método de tipado es más específico que los métodos utilizados con anterioridad, al discernir entre tipos que antes no eran detectados.

**Tabla IV1-5.** Aislados cunícolas clasificados en el mismo biotipo-fagotipo-RAPD tipo pero discriminados por el tipado mediante los genes *coa/spa/clfB*.

Cepa	Tipado <i>coa/spa/clfB</i>	<sup>a</sup> Biotipo-Fagotipo-RAPD tipo
KH103		
KH276		
VL468	A1/II1/δ	
KH454		
KH152		
KH374X	A1/III1/ζ	C -3A/3C/55/71-a
VL10	B1/II1/δ	
266/3572	C1/I1/γ	
KH547	F1/II1/δ	
JS606	F1/II1/δ	
JS432	F2/III2/α	

<sup>a</sup> Biotipo-Fagotipo-RAPD tipo de Hermans *et al.*, (2000).

#### 4.1.3.- Caracterización molecular de cepas de *S. aureus* aisladas de otras especies

El estudio se completó con el análisis mediante genotipado de aislados de *S. aureus* procedentes de diversas especies animales, con el objetivo de determinar si las cepas cunícolas también eran comunes a aislados estafilocócicos de otras especies, o por el contrario eran específicas de la especie cunícola.

Estos aislados fueron obtenidos principalmente de explotaciones situadas en Valencia y otras provincias españolas, empleándose para ello: 14 aislados procedentes de bovinos, 10 aislados de caprinos, ovinos y porcinos respectivamente; 5 aislados procedentes de aves, 3 aislados de macacos, 2 procedentes de equinos, 2 aislados de ciervos y 7 aislados humanos de *S. aureus* (Mu50, N315, EMRSA-16 (MRSA252), COL, Newman, NCTC8325 y MSSA476).

Después de realizar el genotipado correspondiente se obtuvieron los siguientes genotipos (tabla IV1-6): de los aislados bovinos se obtuvieron 14 genotipos diferentes (A1/I7/ζ, A1/II6/ζ, A1/IV3/β, A2/II4/γ, B1/II4/δ, B4/IV2/α, C3/II4/θ, D3/II5/ι, D5/I7/β, D5/IV1/δ, F3/I4/β, F4/I6/γ, F4/I10/β y F5/II7/ζ); de los 10 aislados procedentes de caprino se obtuvieron 5 genotipos diferentes (A1/I7/ζ, A1/IV5/β, A1/V1/β, B6/I4/β y F3/I4/β); de los 10 de ovino, 6 genotipos diferentes (A1/IV5/β, B6/I4/β, B7/I9/α, F1/IV3/β, F4/II3/γ y F5/IV5/η); 5 genotipos distintos de los 10 aislados porcinos (B5/IV4/γ, D4/I7/γ, F4/I6/γ, F4/I8/γ, y O1/IV2/γ); 5 genotipos diferentes de ave (A3/VI1/δ, D2/VI2/γ, D3/II1/λ, F4/I10/λ y O1/II7/β); 3 de macaco (B1/I1/β, D2/I2/β y F6/IV2/β); 2 procedentes de caballo (A1/I5/β y D2/I1/γ); y 2 de ciervo (B6/I4/β y F2/IV3/μ); mientras que los 7 aislados humanos generaron 6 genotipos distintos (B2/IV2/β, B3/II3/β, C2/IV2/β, D1/IV2/α, D1/IV2/β y D2/IV1/α). Por tanto, hubo una gran variabilidad de genotipos en todas las especies, sobre todo en humanos, bovinos, aves, macacos, caballos y ciervos, con un genotipo diferente para cada aislado.

**Tabla IV1-6.** Genotipos procedentes de aislados de diferentes especies.

Cepa	Hospedador	coa	spa	c/fB	<sup>a</sup> ST	<sup>b</sup> Identificado
Mu50	Humano	B2	IV2	β	5	no
N315	Humano	B3	II3	β	5	no
EMRSA-16 (MRSA252)	Humano	C2	IV2	β	36	no
COL	Humano	D1	IV2	α	250	sí
Newman	Humano	D1	IV2	α	254	sí
NCTC8325	Humano	D1	IV2	γ	8	no
MSSA476	Humano	D2	IV1	α	1	no
JP5447	Ave	D3	I1	λ	692	no
JP5449	Ave	A3	VI1	δ	Nuevo (SLV690)	no
JP5450	Ave	D2	VI2	γ	101	no
JP5451	Macaco	F6	IV2	β	Nuevo (DLV55)	no
JP5453	Ave	F4	I10	λ	398	no
JP5454	Caballo	A1	I5	β	Nuevo (SLV133)	no
JP5455	Caballo	D2	I1	γ	1	no
JP5456	Ciervo	B6	I4	β	522	no
JP5457	Macaco	B1	I1	β	Nuevo	no
JP5458	Macaco	D2	I2	β	Nuevo	no
JP5459	Ciervo	F2	IV3	μ	Nuevo (SLV425)	no
JP5460	Ave	O1	II7	β	Nuevo	no
JP3304	Porcino	F4	I6	γ	398	no
JP3305	Porcino	F4	I6	γ	N.D.	no
JP3306	Porcino	F4	I6	γ	N.D.	no
JP3307	Porcino	D4	I7	γ	Nuevo (SLV1)	no
JP3308	Porcino	F4	I8	γ	398	no
JP3309	Porcino	B5	IV4	γ	433	no
JP3310	Porcino	O1	IV2	γ	9	no
JP3311	Porcino	F4	I6	γ	398	no
JP3312	Porcino	F4	I6	γ	N.D.	no
JP3313	Porcino	F4	I6	γ	N.D.	no
JP3314	Bovino	F4	I6	γ	398	no
JP3315	Bovino	A1	IV3	β	133	no
JP3316	Bovino	A1	I7	ζ	97	no
JP3317	Bovino	D5	I7	β	437	no
JP3318	Bovino	F3	I4	β	522	no
JP3319	Bovino	F4	I10	β	398	no
JP3320	Bovino	B4	IV2	α	97	no
JP3321	Bovino	F5	II7	ζ	352	no
JP3322	Bovino	A1	II6	ζ	97	no
JP3323	Bovino	D5	IV1	δ	26	no
RF122	Bovino	B1	II4	δ	151	no
V299	Bovino	D3	II5	ι	20	no
V315	Bovino	A2	II4	γ	71	no
V329	Bovino	C3	II4	θ	126	no
JP3324	Ovino	F5	IV5	η	133	no
JP3325	Ovino	F1	IV3	β	133	no
JP3326	Ovino	A1	IV5	β	133	no
JP3327	Ovino	B6	I4	β	N.D.	no
JP3328	Ovino	A1	IV5	β	N.D.	no

Cepa	Hospedador	coa	spa	clfB	<sup>a</sup> ST	<sup>b</sup> Identificado
JP3329	Ovino	F4	II3	γ	398	no
JP3330	Ovino	A1	IV5	β	N.D.	no
JP3331	Ovino	A1	IV5	β	N.D.	no
JP3332	Ovino	A1	IV5	β	N.D.	no
JP3333	Ovino	B7	I9	α	130	no
JP3334	Caprino	A1	V1	β	133	no
JP3335	Caprino	A1	IV5	β	133	no
JP3336	Caprino	A1	IV5	β	N.D.	no
JP3337	Caprino	F3	I4	β	522	no
JP3338	Caprino	A1	IV5	β	N.D.	no
JP3339	Caprino	B6	I4	β	522	no
JP3340	Caprino	A1	IV5	β	N.D.	no
JP3341	Caprino	A1	I7	ζ	N.D.	no
JP3342	Caprino	A1	IV5	β	N.D.	no
JP3343	Caprino	A1	I7	ζ	N.D.	no

<sup>a</sup>ST: secuencia tipo, resultado del MLST. Nuevo: secuencia tipo no descrita todavía en la base de datos. Entre paréntesis la secuencia tipo más próxima: SLV: se diferencia en un locus, DLV: se diferencia en dos locos. N.D.: no determinado.

<sup>b</sup>Identificado: genotipos aislados en este estudio.

En total, los 63 aislados de diversas especies dieron lugar a 42 patrones diferentes, difiriendo de los genotipos hallados en las cepas cunícolas excepto uno de los genotipos, D1/IV2/α, identificado en 2 aislados humanos, las cepas COL y Newman. No obstante, este genotipo sólo se identificó en el 1,1% de aislados cunícolas del presente estudio. Por lo tanto, estos datos ponen de manifiesto la especificidad de los genotipos identificados en la especie cunícola. Además, seis genotipos se determinaron en más de un aislado. El genotipo mencionado, D1/IV2/α, aislado de 2 cepas humanas de *S. aureus*; el genotipo A1/I7/ζ, aislado de una cepa bovina y una caprina; el genotipo A1/IV5/β, determinado de 5 aislados ovinos y 5 aislados caprinos; el genotipo B6/I4/β, aislado una vez de ciervo, ovino y caprino; el genotipo F3/I4/β, determinado de un aislado de bovino y un aislado de caprino; y el genotipo F4/I6/γ, determinado en 6 aislados de porcino y un aislado bovino. Por tanto, este método de tipado mostró la capacidad de discriminar entre aislados de diferentes especies, mostrando, sobre todo, una relación entre aislados de rumiantes.

Adicionalmente, y a fin de confirmar esta capacidad de discriminación, se comparó el método de tipado mediante los genes *coa/spa/clfB* con un tipado mediante secuenciación multilocus (Multilocus Sequence Typing, MLST). De estos 63 aislados se seleccionaron en base al hospedador los distintos genotipos para realizar un tipado por MLST, excepto de los aislados humanos y el aislado bovino RF122 que son cepas secuenciadas de ST (sequence type) conocida.

En total, se realizaron 40 secuenciaciones por MLST para comprobar si había correspondencia entre el tipado por MLST y el método de tipado descrito en este estudio (tabla IV1-6). Del análisis por MLST se identificaron 27 perfiles alélicos. Entre éstos, sólo 6 se identificaron en más de un aislado (tabla IV1-7). Sin embargo, el método de genotipado descrito en este trabajo sí era capaz de discriminar entre aislados con una misma ST, excepto un aislado de bovino y 5 aislados de porcino con genotipo F4/I6/γ. El hecho de que este método de genotipado fuese capaz de diferenciar estas cepas podría indicar un origen común de las cepas pertenecientes a la misma ST, pero con cierta especialización hacia el hospedador, detectada en la variación de los genes *coa/spa/clfB*. Por lo tanto, una misma secuencia alélica podía contener distintos genotipos mediante el análisis de los genes *coa/spa/clfB*. Por el contrario, un mismo genotipo siempre originó la misma secuencia alélica salvo en una ocasión, las cepas Col y Newman, con genotipo D1/IV2/ α y ST250 y ST254 respectivamente.

**Tabla IV1-7.** Genotipos determinados de aislados de diversas especies con la misma secuencia alélica (ST). Detalle de la tabla IV-5.

ST	Hospedador	Genotipo	Cepa
1	Caballo	D2/I1/γ	JP5455
1	Humano	D1/IV1/α	MSSA476
5	Humano	B2/IV2/β	Mu50
5	Humano	B3/II3/β	N315
97	Bovino	A1/I7/ζ	JP3316
97	Bovino	B4/IV2/α	JP3320
97	Bovino	A1/II6/ζ	JP3322
133	Bovino	A1/IV3/β	JP3315
133	Caprino	A1/V1/β	JP3334
133	Caprino	A1/IV5/β	JP3335
133	Ovino	F5/IV5/η	JP3324
133	Ovino	F1/IV3/β	JP3325
133	Ovino	A1/IV5/β	JP3326
398	Ave	F4/I10/λ	JP5453
398	Bovino	F4/I6/γ	JP3314
398	Bovino	F4/I10/β	JP3319
398	Ovino	F4/II3/γ	JP3329
398	Porcino	F4/I6/γ	JP3304
398	Porcino	F4/I8/γ	JP3308
398	Porcino	F4/I6/γ	JP3311
522	Bovino	F3/I4/β	JP3318
522	Caprino	F3/I4/β	JP3337
522	Caprino	B6/I4/β	JP3339
522	Ciervo	B6/I4/β	JP5456

Según estos resultados el genotipado mediante los genes *coa/spa/clfB* posee mayor poder de discriminación que el tipado por MLST. Debido a que los genes empleados en este tipado codifican para proteínas que experimentan cambios como consecuencia de su interacción con el medio ambiente, se debía comprobar que este alto poder de discriminación no era debido a una hipervariabilidad que impidiese la reproducibilidad de los resultados. Para ello se llevó a cabo un análisis de la estabilidad del método

#### **4.1.4.- Análisis de la estabilidad del genotipado mediante los genes *coa/spa/clfB*.**

Para comprobar la estabilidad de los genes empleados en el genotipado se analizaron dos tipos de datos:

##### **Caracterización molecular de genotipos aislados de la misma explotación**

Tres de las granjas estudiadas se muestrearon en diferentes periodos de tiempo (tabla IV1-8). Las tres explotaciones se caracterizaban por utilizar autorreposición, evitando la entrada de animales procedentes de núcleos de multiplicación o de otras explotaciones. Por tanto, si los genes empleados en el genotipado fuesen lo suficientemente estables, se esperaría que en estas explotaciones las cepas analizadas a lo largo del tiempo diesen lugar a los mismos genotipos, por el contrario, si hubiese una hipervariabilidad de los genes, se producirían cambios en éstos rápidamente, dando lugar a nuevos genotipos. En las tres explotaciones estudiadas hubo un mantenimiento de los genotipos, de manifiesto sobre todo con genotipos menos distribuidos geográficamente, como el genotipo A1/III1/δ y B1/IV1/α, lo que indicaba que los genes eran suficientemente estables para ser empleados en este genotipado.

**Tabla IV1-8.** Genotipos de *S. aureus* determinados en tres explotaciones en distintos periodos.

Granja	Año	Genotipos (nº aislados)
6	2002	B1/IV1/α (2)
	2003	B1/IV1/α (5)
24	2003	A1/III1/δ (6)
	2005	A1/III1/δ (1)
	2006	A1/III1/δ (4)
42	2001	A1/III1/δ (1)
	2005	A1/III1/δ (2)
	2007	A1/III1/δ (12)
	2008	A1/III1/δ (13)

### Caracterización molecular de genotipos de *S. aureus* aislados del mismo animal

Para analizar la estabilidad de los genes utilizados en el genotipado también se analizaron distintos aislados de un mismo animal, en concreto aislados procedentes de mastitis bovinas, que permitían obtener aislados del mismo animal a lo largo del tiempo. De estos aislados se realizó un genotipado mediante el análisis de los genes *coa/spa/clfB*. En total se analizaron aislados de 4 vacas, las cuales mostraron el mismo genotipo entre los distintos aislados a lo largo del tiempo (tabla IV1-9), indicando la estabilidad de los genes empleados.

**Tabla IV1-9.** Genotipos de *S. aureus* determinados de los aislados obtenidos de cada animal a lo largo del tiempo.

Nº animal	Cepa	Fecha	Genotipo
1	V482	11/02/1998	D3/II5/ι
1	V713	13/04/1999	D3/II5/ι
1	V990	09/09/1999	D3/II5/ι
2	V259	21/07/1998	C3/II4/θ
2	V403	21/09/1998	C3/II4/θ
2	V547	11/02/1998	C3/II4/θ
2	V1005	09/07/1999	C3/II4/θ
2	V1140	18/11/1999	C3/II4/θ
3	V103	28/04/1998	D3/II5/ι
3	V488	11/02/1998	D3/II5/ι
3	V873	06/01/1999	D3/II5/ι
3	V974	09/09/1999	D3/II5/ι
4	V279	21/07/1998	F7/II4/γ
4	V409	21/09/1998	F7/II4/γ
4	V577	11/02/1998	F7/II4/γ
4	V868	06/01/1999	F7/II4/γ

#### 4.1.5.- Resultados anatomopatológicos

Después de la caracterización molecular de las cepas estafilocócicas, se buscó la posible relación entre genotipo y lesión. Asimismo, se quiso conocer si un genotipo específico podía producir más de un tipo de lesión. De esta manera, se analizaron 373 conejas de las que 319 presentaban una única lesión, 48 tenían dos lesiones y 6, tres lesiones distintas. Las patologías que presentaban estos animales llevaron a identificar un total de 10 lesiones diferentes (tabla IV1-10).

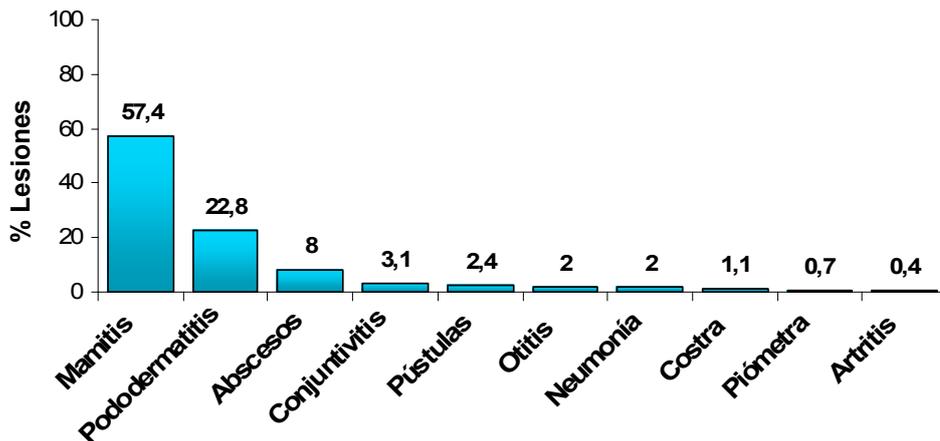
**Tabla IV1-10.** Genotipos de *S. aureus* determinados de las diferentes lesiones.

Genotipo	Mas	Pod	Abs	Conj	Pust	Oti	Neu	Cos	Pio	Art	Total
A1/III1/δ	197	52	27	8	5	2	8	4	2	1	306
A1/III1/ε	1	3	1								5
A1/III1/η	4	1	1		5		1			1	13
A1/III1/κ	1	2			1						4
A1/III1/δ	26	11	3								40
A3/III2/δ	2	1	2								5
B1/II1/α	5			1							6
B1/II1/δ	1	1									2
B1/IV1/α	5	9		1		1			1		17
B1/IV1/β		1									1
B1/IV1/δ		1									1
B1/IV1/θ		1									1
B1/IV2/α	1										1
B1/IV2/β	1	3									4
B1/IV2/θ						2					2
B2/IV1/δ	1	2									3
B3/IV1/γ		4									4
B3/IV2/γ		1									1
C1/II1/β	9	5	2	2		3		1			22
C1/II1/γ	1										1
C1/II1/θ						1					1
C1/II2/γ	1										1
D1/II3/α		1									1
D1/IV1/α	2	1									3
D1/IV2/α		3		2							5
F1/II1/δ	1										1
<b>Total</b>	<b>259</b>	<b>103</b>	<b>36</b>	<b>14</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>451</b>

**Mas:** mastitis; **Pod:** pododermatitis; **Abs:** abscesos; **Conj:** conjuntivitis; **Pust:** pústula; **Oti:** otitis; **Neu:** neumonía; **Cos:** costra; **Pio:** piómetra; **Art:** artritis.

Entre las lesiones de carácter purulento provocadas por *S. aureus* (figuras VII-2 a VII-9), las más frecuentes fueron la mastitis, la pododermatitis y los abscesos con 259 (57,4%), 103 (22,8%) y 36 (8%) casos respectivamente. Otras

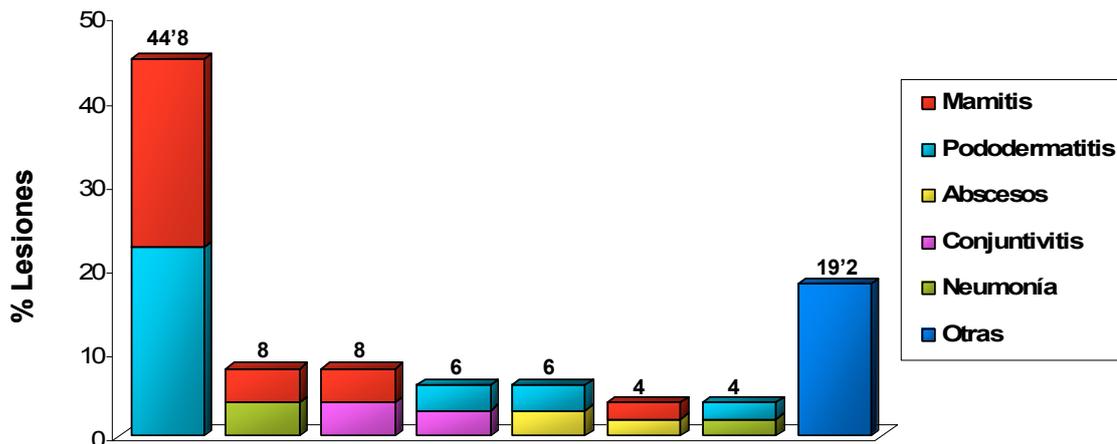
lesiones observadas con menor frecuencia fueron conjuntivitis (3,1%), con 14 conejas afectadas; presencia de pústulas en diferentes localizaciones (2,4%), con 11 conejas afectadas; otitis (2%) y neumonía (2%), con 9 conejas afectadas respectivamente; costras (1,1%), con 5 casos; piómetras (0,7%), que afectó a 3 conejas; y finalmente artritis (0,4%), con dos casos (figura IV-6).



**Figura IV-6.** Porcentaje de aparición de las distintas lesiones identificadas en el estudio.

En total, 54 conejas sufrían dos o más lesiones al mismo tiempo, siendo la combinación de lesiones más común mastitis junto con pododermatitis, en 22 conejas (40,8%) (figura IV-7). En 44 de las 54 conejas con más de una lesión, se determinó el mismo genotipo en las diferentes lesiones, lo que indica que en caso de una segunda lesión, es más probable que ésta esté producida por una cepa presente en el animal.

De las 10 conejas restantes (8 con dos lesiones y 2 conejas con tres lesiones) se aislaron dos genotipos. Estas 10 conejas procedían de 5 explotaciones (números 21, 25, 26, 30 y 31) localizadas en dos regiones de alta densidad cunícola, la Plana de Utiel-Requena y la Canal de Navarrés. Por tanto, podría suponer una mayor diseminación de genotipos al aumentar la densidad de animales, lo que aumentaría la probabilidad de encontrar más de un genotipo en un mismo animal.



**Figura IV-7.** Porcentaje de aparición de las distintas combinaciones de lesiones identificadas en el estudio.

Algunos genotipos parecen tener predisposición por un tipo de localización anatómico. Lo más habitual fue que los diferentes genotipos se aislaran de mastitis, la lesión más frecuente. Sin embargo, el genotipo B3/IV1/γ se determinó sólo en 4 casos de pododermatitis de la misma explotación y durante el mismo periodo de tiempo. Por su parte, algunos de los aislados de genotipos B1/IV1/α, B1/IV2/β y B1/IV2/θ, aislados de la misma granja (21), parecían tener predisposición por producir lesiones diferentes a mastitis: los genotipos B1/IV1/α y B1/IV2/β pododermatitis, y el genotipo B1/IV2/θ otitis. Sin embargo, en esa misma granja también se aisló A1/II1/δ de pododermatitis y otitis. Estos datos indicaron un mayor número de lesiones diferentes a mastitis en estas granjas, lo que podría indicar la importancia del manejo en las explotaciones.

Entre las diferentes lesiones, se observó como el genotipo más distribuido, A1/II1/δ, estaba ampliamente diseminado, aislándose en todos los tipos lesionales en al menos la mitad de los casos estudiados, excepto en la otitis, en la que predominaron genotipos minoritarios.

En resumen, los resultados mostraron que algunas cepas de *S. aureus* son capaces de producir diferentes tipos de lesiones. Adicionalmente, se observó que cada tipo de lesión puede deberse a diferentes genotipos (tabla IV1-10). El genotipo A1/II1/δ fue el que se aisló con mayor frecuencia (en un 67,8% de los aislados). Además, se aisló en los 10 tipos de lesiones analizados en este estudio, lo que revela la capacidad de este genotipo para infectar diferentes regiones anatómicas y provocar lesiones. El resto de genotipos se aisló en un número

variable de lesiones, que oscilaba entre 1 y 6 (tabla IV1-10), y en algún caso parecía que había afinidad por un nicho concreto, por ejemplo en el caso de la otitis, aunque por el bajo número de animales identificados no es posible concluir si es significativo.

#### **4.1.6.- Distribución de genes de virulencia entre aislados de *S. aureus***

La importancia del hospedador en la patogénesis de la enfermedad provocada por *S. aureus* se desconoce, pero sí se tiene constancia de que los determinantes de virulencia bacterianos (toxinas, adhesinas asociadas a la pared celular y exoproteínas) influyen en el proceso (Projan y Novick, 1997). Peacock *et al.* postularon que las cepas de *S. aureus* asociadas a infecciones en humanos poseen una combinación de determinantes patogénicos variable y que la presencia o expresión de una combinación de los mismos varía dependiendo del tipo de infección y la susceptibilidad genética del hospedador (Peacock *et al.*, 2002).

Para comprobar la relevancia de los diferentes factores de virulencia entre los distintos genotipos estudiados, se realizó un análisis de 41 genes descritos en la bibliografía como posibles determinantes de virulencia (tabla IV1-11). Se analizaron 13 proteínas de superficie MSCRAMMs (“microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”) y SERAMs (“secreted expanded repertoire adhesive molecules”), relacionadas con la habilidad del estafilococo para colonizar el tejido del hospedador (Patti *et al.*, 1994): FnbA, FnbB, ClfA, ClfB, Cna, Bbp, EbpS, Sdr’s, Fib, Proteína A, Bap, Coa y Map/Eap. También se analizaron una serie de toxinas: TSST-1,  $\gamma$ -toxina, PVL, Eta y Etb, y 17 enterotoxinas, las 5 SEs clásicas, Sea, Seb, Sec, Sed y See, y otras enterotoxinas descritas más recientemente: Seg, Seh, Sei, Selj, Selk, Sell, Selm, Seln, Selo, Selp, Selq, Selu. Estas toxinas pueden provocar una respuesta errónea de los linfocitos B y T, dificultando la respuesta inmune frente a la infección bacteriana (Ferens *et al.*, 1998; Dinges *et al.*, 2000; Proft y Fraser, 2003). Se incluyó también el estudio de una proteasa sérica, V8, encargada de inactivar anticuerpos y otras moléculas antibacterianas (Prasad *et al.*, 2004), de factores relacionados con la formación o interacción del biofilm, IcaA, perteneciente al operón *icaADBC* (Cramton *et al.*, 1999), y los polisacáridos capsulares más comunes, Cap5 y Cap8 (O’Riordan y Lee, 2004). Por último, se analizó un regulador global, Agr (Novick, 2000), implicado en la regulación de diferentes factores de virulencia.

Tabla IV1-11. Determinantes de virulencia bacterianos analizados.

Gen de virulencia	Proteína	<sup>a</sup> Función
<b>Adhesinas</b>		
<i>fnbA</i> y <i>fnbB</i>	FnBPA y FnBPB	Unión a la fibronectina
<i>clfA</i> y <i>clfB</i>	ClfA y ClfB	Unión al fibrinógeno
<i>cna</i>	Cna	Unión al colágeno
<i>spa</i>	Proteína A	Unión al dominio Fc de las Igs
<i>sdrC</i> , <i>sdrD</i> y <i>sdrE</i>	SdrC, SdrD y SdrE	Adhesinas
<i>bbp</i>	Bbp	Unión a la sialoproteína ósea
<i>ebpS</i>	EbpS	Unión a la elastina
<i>map/eap</i>	Map/Eap	Análogos, unión al fibrinógeno
<i>icaA</i>	IcaA	Síntesis polisacárido bacteriano
<i>fib</i>	Fib	Unión al fibrinógeno
<i>bap</i>	Bap	Formación biofilm
<b>Toxinas</b>		
<i>tst</i>	TSST-1	Exotoxina superantígena
<i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , <i>see</i> , <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>sei</i> , <i>selj</i> , <i>selk</i> , <i>sell</i> , <i>selm</i> , <i>seln</i> , <i>selo</i> , <i>selp</i> , <i>selq</i> , <i>selu</i>	Enterotoxina A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, U	Exotoxinas superantígenas
<i>eta</i> y <i>etb</i>	Toxina exfoliativa A y B	Exotoxinas superantígenas
<i>lukS</i> , F-PV	Leucocidina Panton- Valentine	Leucocidina
<i>hlg</i>	Toxina gamma	Leucocidina
<b>Otras</b>		
<i>coa</i>	Coagulasa	Activación de protombina
<i>sspA</i>	Proteasa V8	Proteasa sérica
<i>agrD</i>	AgrD	Pertenece al locus <i>agr</i> , regulador global de 2 componentes
<i>cap</i>	Cap	Proteína de la cápsula polisacárida

<sup>a</sup>**Función:** función de la proteína codificada por cada gen de virulencia analizado.

El análisis se llevó a cabo mediante amplificación por PCR, ya que se ha descrito una excelente correlación entre los resultados de PCR y la detección de enterotoxinas mediante ensayos de aglutinación pasiva en látex (Becker *et al.*, 1998; McLauchlin *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2000).

El estudio mediante PCR usando las cepas control de los diferentes factores de patogenicidad mostró que los cebadores amplificaban un producto de PCR con los tamaños predichos para los diferentes genes. Los productos de PCR de los genes de virulencia fueron utilizados como sonda en los experimentos de Southern blot con ADN genómico de cepas control. Los resultados de Southern blot confirmaron los resultados de PCR.

El objetivo de este estudio fue determinar la importancia de estos 41 factores de patogenicidad entre las cepas aisladas de diferentes lesiones, así como identificar si existía una combinación óptima de factores para cada tipo de infección. Para ello se seleccionó una cepa perteneciente a los distintos genotipos determinados de cada una de las lesiones, entre los 451 aislados analizados previamente para determinar su genotipo mediante el análisis de los genes *coa/spa/clfB* (tabla IV1-12).

**Tabla IV1-12.** Lesiones y genotipos analizados en el estudio de la distribución de genes de virulencia entre aislados de *S. aureus*.

Lesión	Genotipos analizados
Mastitis	A1/II1/δ, A1/II1/ε, A1/II1/η, A1/III1/δ, A3/III2/δ, B1/II1/α, B1/II1/δ, B1/IV1/α, B1/IV2/α, B1/IV2/β, B2/IV1/δ, C1/II1/β, C1/II1/γ, C1/II2/γ, D1/IV1/α y F1/II1/δ
Pododermatitis	A1/II1/δ, A1/II1/ε, A1/II1/η, A1/III1/δ, A3/III2/δ, B1/II1/δ, B1/IV1/α, B1/IV1/β, B1/IV1/δ, B1/IV1/θ, B1/IV2/α, B1/IV2/β, B2/IV1/δ, B3/IV1/γ, B3/IV2/γ, C1/II1/β, D1/II3/α, D1/IV1/α y D1/IV2/α
Absceso	A1/II1/δ, A1/II1/ε, A1/II1/η, A1/III1/δ, A3/III2/δ y C1/II1/β
Conjuntivitis	A1/II1/δ, B1/II1/α, B1/IV1/α, C1/II1/β y D1/IV2/α
Pústula	A1/II1/η
Otitis	A1/II1/δ, B1/IV2/θ, C1/II1/β y C1/II1/θ
Neumonía	A1/II1/δ y A1/II1/η
Costra	A1/II1/δ y C1/II1/β
Piómetra	A1/II1/δ y B1/IV1/α
Artritis	A1/II1/η

La presencia o ausencia de determinados factores de virulencia puede estar correlacionado con el origen epidemiológico de la cepa, es decir, si proviene de una enfermedad o de un portador asintomático (Peacock *et al.*, 2002). Por tanto, además de las 61 cepas correspondientes a aislados de lesiones cunícolas provocadas por *S. aureus*, se incluyeron en el estudio 10 cepas provenientes de aislados nasales de conejo, con 10 genotipos diferentes (tabla IV1-13). De todos ellos, 4 genotipos se habían aislado previamente en lesiones provocadas por *S. aureus*: A1/II1/δ, A1/III1/δ, B1/IV1/α y B1/IV2/α; los otros 6 genotipos sólo se aislaron en nariz.

El estudio se completó con el análisis de 16 aislados de *S. aureus* de conejo de diferentes países europeos, cepas previamente descritas, empleadas en la caracterización genotípica mediante el análisis de los genes *coa/spa/clfB* y utilizadas como cepas de referencia (tabla IV1-14).

En resumen, se analizaron 87 aislados de *S. aureus*: 61 aislados procedentes de lesiones cunícolas, 10 cepas procedentes de aislados nasales de conejo y 16 aislados cunícolas de diferentes países europeos.

**Tabla IV1-13.** Cepas procedentes de aislados nasales de conejo incluidas en el estudio de la distribución de genes de virulencia entre aislados de *S. aureus*.

Aislados nasales	Genotipo	<sup>a</sup> Identificado
CO 343	B1/IV2/α	sí
CO 344	B1/IV1/α	sí
CO 346	A1/II1/δ	sí
CO 355	A1/III1/δ	sí
CO 366	B1/I3/δ	no
CO 400	B3/I1/γ	no
CO 407	A1/III2/α	no
CO 444	A3/III1/δ	no
CO 448	F3/II6/β	no
CO 475	A1/III4/δ	no

<sup>a</sup>Identificado: genotipos aislados previamente de lesiones producidas por *S. aureus*.

**Tabla IV1-14.** Genotipos procedentes de aislados cunícolas, de diferentes países europeos, procedentes de lesiones de *S. aureus*.

Cepa	Hospedador	Genotipo	<sup>a</sup> Identificado
KH103	Conejo	A1/II1/δ	sí
KH276	Conejo	A1/II1/δ	sí
VL468	Conejo	A1/II1/δ	sí
KH454	Conejo	A1/II1/δ	sí
KH152	Conejo	A1/II1/δ	sí
KH374X	Conejo	A1/III1/ζ	no
VL10	Conejo	B1/II1/δ	sí
266/3572	Conejo	C1/I1/γ	sí
KH547	Conejo	F1/II1/δ	sí
JS606	Conejo	F1/II1/δ	sí
JS432	Conejo	F2/III2/α	no
KH383	Conejo	A1/II1/δ	sí
KH232	Conejo	A1/II1/δ	sí
KH119	Conejo	A1/II1/δ	sí
KH522	Conejo	F1/II1/δ	sí
KH273	Conejo	B1/I1/α	sí

<sup>a</sup>Identificado: genotipos aislados previamente de lesiones producidas por *S. aureus*.

#### 4.1.6.1.- Distribución de genes de virulencia entre aislados de *S. aureus*. Adhesinas

Tres de las adhesinas analizadas se estudiaron previamente en la caracterización genotípica de aislados de *S. aureus* procedentes de lesiones. Así, los genes *coa*, *spa* y *clfB* resultaron positivos en todos los aislados analizados, independientemente de la lesión de procedencia. Además, otras tres adhesinas, *clfA*, *fib* y *map/eap*, también resultaron positivas en todos los aislados. Por el contrario, en ninguno de los aislados analizados se detectó el gen *bap*. Por su parte, se detectaron las adhesinas *ebpS*, *fnbA*, *icaA* y *sdrC* en todos los aislados salvo en uno, el genotipo A3/III1/δ, procedente del aislado nasal cunícola CO 444. Por último, el resto de adhesinas mostró mayor variabilidad. El gen *cna* se aisló en 83 (95%) de los aislados, los genes *sdrD* y *sdrE* en 77 (89%) y 71 (82%) de los aislados respectivamente, el factor de virulencia *bbp* se detectó en 69 (79%) de las cepas analizadas y el gen *fnbB* en 50 (57%) de los aislados (tabla IV1-15). Por tanto, todas las adhesinas estudiadas, excepto *bap*, estuvieron presentes en la mayoría de los aislados. Así, las adhesinas *coa*, *spa*, *clfB*, *clfA*, *fib* y *map/eap* fueron imprescindibles entre las cepas cunícolas estudiadas, mientras que los genes *ebpS*, *fnbA*, *icaA* y *sdrC* sólo estuvieron ausentes en un aislado. Por su parte, la adhesina *fnbB* fue la menos distribuida entre los diferentes aislados cunícolas.

**Tabla IV1-15.** Numero de aislados positivos a cada uno de los determinantes de virulencia.

Gen	Nº aislados	% aislados
<i>coa</i>	87	100
<i>spa</i>	87	100
<i>clfB</i>	87	100
<i>clfA</i>	87	100
<i>fib</i>	87	100
<i>map/eap</i>	87	100
<i>icaA</i>	86	99
<i>ebpS</i>	86	99
<i>fnbA</i>	86	99
<i>sdrC</i>	86	99
<i>cna</i>	83	95
<i>sdrD</i>	77	89
<i>sdrE</i>	71	82
<i>bbp</i>	69	79
<i>fnbB</i>	50	57
<i>bap</i>	0	0

Al analizar cómo se distribuyen las adhesinas en cada uno de los genotipos cabría esperar que cepas pertenecientes al mismo genotipo poseyeran la misma combinación de factores de virulencia. Como se observa en la tabla IV1-16, en la mayoría de los casos hubo relación entre las adhesinas detectadas y los genotipos en los que se determinaron. El genotipo A3/III1/δ fue el que menos adhesinas presentó (*coa*, *spa*, *clfB*, *clfA*, *fib*, *map/eap* y *cna*), siendo capaz de colonizar la mucosa nasal. Por su parte, el número mínimo de adhesinas para producir lesión fue de 12, los genotipos B1/IV2/β (carentes de *sdrD*, *sdrE* y *bbp*) y D1/IV1/α (carentes de *cna*, *sdrE* y *bbp*) fueron capaces de producir mastitis y pododermatitis.

**Tabla IV1-16.** Porcentaje de aislados cunícolas positivos a los genes: *ebpS*, *fnbA*, *icaA*, *cna*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, *bbp* y *fnbB*, en relación al genotipo.

Genotipo	<i>ebpS</i>	<i>fnbA</i>	<i>icaA</i>	<i>cna</i>	<i>sdrC</i>	<i>sdrD</i>	<i>sdrE</i>	<i>bbp</i>	<i>fnbB</i>
A1/II1/δ	100%	100%	100%	100%	100%	91%	95%	100%	41%
A1/II1/ε	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
A1/II1/η	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	50%
A1/III1/δ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
A1/III1/ζ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
A1/III2/α	100%	100%	100%	100%	100%	0%	100%	100%	100%
A1/III4/δ	100%	100%	100%	100%	100%	0%	100%	100%	0%
A3/III1/δ	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%
A3/III2/δ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
B1/I1/α	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
B1/I3/δ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
B1/II1/δ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
B1/IV1/α	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	100%
B1/IV1/β	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	100%
B1/IV1/δ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
B1/IV1/θ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
B1/IV2/α	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	100%
B1/IV2/β	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	0%	100%
B1/IV2/θ	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	100%	100%
B2/IV1/δ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
B3/I1/γ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
B3/IV1/γ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
B3/IV2/γ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
C1/I1/β	100%	100%	100%	100%	100%	83%	83%	100%	0%
C1/I1/γ	100%	100%	100%	100%	100%	50%	100%	50%	0%
C1/I1/θ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
C1/II2/γ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
D1/II3/α	100%	100%	100%	0%	100%	100%	100%	0%	100%
D1/IV1/α	100%	100%	100%	50%	100%	100%	0%	0%	100%
D1/IV2/α	100%	100%	100%	0%	100%	100%	100%	0%	100%
F1/II1/δ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
F2/III2/α	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
F3/II6/β	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

■ : gen ausente en un determinado genotipo. ■ : gen variable en un determinado genotipo.

Entre los genotipos en los que no se detectó *cna* se encontró el genotipo D1/II3/α, aislado de una conjuntivitis, y el D1/IV2/α, determinado en una pododermatitis y una conjuntivitis. Todos los aislados pertenecientes a estos genotipos carecían del gen *cna*. Por su parte, el genotipo D1/IV1/α mostraba variabilidad para este gen. El aislado procedente de mastitis carecía de *cna*, mientras que el mismo genotipo aislado de pododermatitis sí lo poseía. Además todos los genotipos carentes del gen *cna* pertenecían al mismo tipo de *coa* (D1) y *clfB* (α).

El gen *sdrD* resultó positivo en 77 (89%) aislados. Todos los aislados pertenecientes a 5 genotipos fueron negativos para este gen (tabla IV1-16). Por su parte, 3 genotipos presentaron variabilidad en la detección de *sdrD*: los aislados procedentes de mastitis pertenecientes a los genotipos A1/II1/δ y C1/II1/γ y el aislado de pododermatitis de genotipo C1/II1/β fueron negativos para este gen.

Los genes *sdrE* y *bbp* mostraron un 87% de homología en sus secuencias. También mostraron cierta homología en cuanto a su presencia o ausencia entre los aislados. De los 87 aislados cunícolas del estudio, 13 (15%) resultaron negativos tanto al gen *sdrE* como al gen *bbp*. Estos 13 aislados pertenecían a 5 genotipos diferentes (tabla IV1-16) y 5 lesiones diferentes. Además, de los 13 aislados negativos al gen *sdrE* descritos anteriormente, también resultó negativa una cepa con genotipo B1/IV2/θ aislada de otitis. Por su parte, también resultaron negativos al gen *bbp* tres genotipos: B1/IV1/β y D1/II3/α, aislados de pododermatitis, y D1/IV2/α, aislado de mastitis y conjuntivitis. En cuanto a los genotipos en los que no todos los aislados eran iguales en cuanto a la presencia o ausencia de los genes *sdrE* y *bbp* se identificaron 3 genotipos: *sdrE* estuvo ausente de un aislado procedente de mastitis de genotipo A1/II1/δ y de un aislado de pododermatitis de genotipo C1/II1/β. *bbp* estuvo ausente de un aislado de mastitis de genotipo C1/II1/γ.

Finalmente, el gen *fnbB* codifica para la adhesina que menos se detectó entre los diferentes aislados. Entre los 37 aislados negativos para el gen *fnbB* se determinaron 15 genotipos distintos, detallados en la tabla IV1-16. De estos 15 genotipos, sólo en dos, A1/II1/δ y A1/II1/η, se detectaron cepas que sí fueron positivas para este gen. Además, 12 de los aislados de conejo empleados como referencia también carecían del gen *fnbB*. Estos 12 aislados pertenecían a los mismos genotipos carentes del gen *fnbB* que las cepas del estudio, salvo el

genotipo F2/III2/α (no determinado en los aislados cunícolas del estudio). La variabilidad observada en la presencia de estas adhesinas entre los aislados pertenecientes al mismo genotipo podría ser explicada por la inserción de transposones y secuencias de inserción (IS), provocando mutaciones en estos genes.

Al analizar cómo se distribuyen las adhesinas entre las diferentes lesiones y entre los aislados nasales se podía conocer si existía una combinación óptima de adhesinas dependiendo de dónde procediese el aislado. Sin embargo, como se observa en la tabla IV1-17, no se pudo definir ninguna relación entre las adhesinas analizadas y la lesión de la que proceden los aislados. Lo más significativo fue que se obtuvieron aislados carentes del gen *fnbB* en 8 de las 10 lesiones estudiadas, resultando positivos a todas las adhesinas analizadas, salvo *bap*, el aislado de pústula y el aislado de artritis. Cabe destacar que de los 4 aislados procedentes de otitis, no se detectó el gen *fnbB* en 3 de ellos (75%).

**Tabla IV1-17.** Porcentaje de aislados cunícolas positivos a los genes: *ebpS*, *fnbA*, *icaA*, *cna*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*, *bbp* y *fnbB*, en relación a la lesión de la que procedían.

Lesión	<i>ebpS</i>	<i>fnbA</i>	<i>icaA</i>	<i>cna</i>	<i>sdrC</i>	<i>sdrD</i>	<i>sdrE</i>	<i>bbp</i>	<i>fnbB</i>
Mastitis	100%	100%	100%	94%	100%	83%	72%	72%	67%
Pododermatitis	100%	100%	100%	89%	100%	89%	74%	63%	63%
Absceso	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	67%
Conjuntivitis	100%	100%	100%	80%	100%	100%	80%	60%	80%
Pústula	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Otitis	100%	100%	100%	100%	100%	75%	75%	75%	25%
Neumonía	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	50%
Costra	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	50%
Piódmetra	100%	100%	100%	100%	100%	100%	67%	67%	67%
Artritis	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Aislado nasal	90%	90%	90%	100%	90%	70%	70%	70%	50%

■ : gen variable en cepas pertenecientes a una lesión determinada.

Atendiendo a la relación de los genes de virulencia detectados entre los diferentes aislados nasales de *S. aureus*, no hubo ninguna adhesina que predominase más o menos entre los genotipos identificados sólo en aislados nasales y los genotipos capaces de provocar lesiones invasivas (tabla IV1-18). De entre los diferentes aislados nasales destaca la cepa CO 444, que carecía de los genes *fnbA*, *sdrC*, *bap*, *bbp*, *ebpS*, *icaA*, *sdrD*, *sdrE* y *fnbB*.

**Tabla IV1-18.** Relación entre la presencia (+) o ausencia (-) de los diferentes genes de virulencia analizados de aislados nasales procedentes de conejo.

Genotipo	Gen de virulencia													<sup>a</sup> Ident
	<i>clfA</i>	<i>fnbA</i>	<i>sdrC</i>	<i>m/eap</i>	<i>fib</i>	<i>bap</i>	<i>bbp</i>	<i>ebpS</i>	<i>icaA</i>	<i>sdrD</i>	<i>cna</i>	<i>sdrE</i>	<i>fnbB</i>	
A1/II1/δ	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	sí
A1/III1/δ	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	sí
B1/IV1/α	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	sí
B1/IV2/α	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	sí
A1/III2/α	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	no
A1/III4/δ	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	no
A3/III1/δ	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	no
B1/I3/δ	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	no
B3/I1/γ	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	no
F3/II6/β	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	no

<sup>a</sup>Ident: genotipos aislados de lesiones producidas por *S. aureus*.

#### 4.1.6.2.- Distribución de genes de virulencia entre aislados de *S. aureus*. Toxinas

Se analizaron 17 enterotoxinas, las 5 SEs clásicas (*Sea*, *Seb*, *Sec*, *Sed* y *See*) y otras enterotoxinas descritas más recientemente (*Seg*, *Seh*, *Sei*, *Selj*, *Selk*, *Sell*, *Selm*, *Seln*, *Selo*, *Selp*, *Selq*, *Selu*).

Las enterotoxinas más comunes entre los aislados estudiados fueron la enterotoxina *selu*, determinada en 64 aislados (74%); la enterotoxina *sei*, positiva en 60 de los aislados (69%), y la enterotoxina *selm*, detectada en 55 de los aislados (63%). Por su parte, no se detectaron en ninguno de los aislados cunícolas las enterotoxinas *sea*, *see* y *selq*.

Analizando estas enterotoxinas en relación con el genotipo (tabla IV1-19) se observó que en la mayoría de los casos hubo relación entre estos factores de virulencia y los genotipos en los que se determinaron. Sin embargo, en 11 genotipos se detectó variabilidad entre los aislados pertenecientes al mismo genotipo. La enterotoxina *seb* se detectó sólo en los genotipos B3/I1/γ (aislado nasal), B3/IV1/γ (pododermatitis) y B3/IV2/γ (pododermatitis), todos ellos pertenecientes al mismo patrón por el gen *coa* y *clfB*, lo que podría indicar un origen clonal de estos genotipos.

**Tabla IV1-19.** Porcentaje de aislados cunícolas positivos a los genes: *seb*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp* y *selu*, en relación al genotipo.

Genotipo	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>selj</i>	<i>selk</i>	<i>sell</i>	<i>selm</i>	<i>seln</i>	<i>selo</i>	<i>selp</i>	<i>selu</i>
A1/II1/δ	0%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	14%	0%	100%	100%	100%	0%	100%
A1/II1/ε	0%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	0%	100%
A1/II1/η	0%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	83%	0%	100%	100%	100%	0%	100%
A1/III1/δ	0%	0%	50%	100%	25%	100%	50%	75%	0%	100%	100%	100%	0%	100%
A1/III1/ζ	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
A1/III2/α	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
A1/III4/δ	0%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	100%	100%	0%	100%
A3/III1/δ	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
A3/III2/δ	0%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	0%	100%
B1/I1/α	0%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	50%
B1/I3/δ	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	100%
B1/II1/δ	0%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	0%	100%
B1/IV1/α	0%	0%	67%	0%	17%	0%	67%	0%	50%	0%	0%	0%	0%	50%
B1/IV1/β	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	100%
B1/IV1/δ	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	100%	100%	100%	100%	0%	0%
B1/IV1/θ	0%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	0%	100%
B1/IV2/α	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	50%
B1/IV2/β	0%	0%	0%	0%	0%	0%	50%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
B1/IV2/θ	0%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	100%
B2/IV1/δ	0%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	100%	100%	100%	100%	0%	0%
B3/I1/γ	100%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	100%	100%
B3/IV1/γ	100%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	100%	0%
B3/IV2/γ	100%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	100%	100%
C1/I1/β	0%	0%	33%	0%	100%	0%	50%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	33%
C1/I1/γ	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	50%	0%	0%	0%	50%
C1/I1/θ	0%	0%	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
C1/II2/γ	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%
D1/II3/α	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%
D1/IV1/α	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	50%	50%	50%	0%	50%
D1/IV2/α	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	50%	0%	0%	0%	0%	0%
F1/II1/δ	0%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	0%	100%
F2/III2/α	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	100%
F3/II6/β	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%

■ : gen variable en un determinado genotipo. ■ : gen presente en un determinado genotipo.

Estas enterotoxinas suelen aparecer en distintas combinaciones, generalmente asociadas a elementos genéticos móviles (Jarraud *et al.*, 2001; Baba *et al.*, 2002; Holtfreter *et al.*, 2007), lo que podría explicar la variabilidad de enterotoxinas dentro de un mismo genotipo. Así, la combinación que apareció con mayor frecuencia fue la asociada al *egc* (enterotoxin gene cluster) (Jarraud *et al.*, 2001), sobre todo la combinación *seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo*, *selu*, conocida como *egc-2*, frente a *egc-1* (*seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo*, sin *selu*) (Smyth *et al.*, 2005). En

total, 46 de los 87 aislados de conejo estudiados fueron positivos a *egc-2*, 32 (37%) de los cuales sólo poseían estas enterotoxinas. En los 14 aislados restantes *egc-2* aparecía junto a *sed*, *selj*, *seh* y *selk* (1 aislado); *sed*, *selj* y *selk* (1 aislado); *seb* y *selp* (2 aislados), y *selk* (10 aislados) (tabla IV1-20). Estas 46 cepas pertenecían a 11 genotipos diferentes, siendo los genotipos más representados el A1/II1/δ (11 aislados, 100%), el genotipo A1/II1/η (6 aislados, 100%), y el genotipo A1/III1/δ (4 aislados, 100%). Además, en 15 de los aislados cunícolas descritos previamente por Hermans *et al.* (2000), identificados con el genotipo A1/II1/δ (11 aislados), F1/II1/δ (3 aislados) y B1/II1/δ (1 aislado) también se identificó el *egc-2* en todos los casos, guardando relación con los aislados cunícolas del estudio.

La combinación *egc-1* (*seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo*, sin *selu*) fue mucho menos frecuente: se detectó en cuatro aislados, con tres combinaciones diferentes. La combinación *sec*, *sell* y *egc-1* se detectó en un aislado de pododermatitis con el genotipo B1/IV1/δ; la combinación *seb*, *selp* y *egc-1* se detectó en otro aislado de pododermatitis con genotipo B3/IV1/γ; mientras que la combinación *sell* y *egc-1* se detectó en dos aislados con genotipo B2/IV1/δ, una mastitis y una pododermatitis. Por tanto, todos los genotipos con *egc-1* pertenecían al patrón B por el gen *coa* y IV1 por el gen *spa*.

El resto de combinaciones entre las diferentes enterotoxinas fue menos frecuente. Junto con las combinaciones ya descritas de *egc-1* y *egc-2* se diferenciaron 13 combinaciones más, detalladas en la tabla IV1-20. La enterotoxina *sed* siempre apareció asociada a *selj*, pudiéndose combinar también con las enterotoxinas *seh*, *sell* y *selu*. De igual forma, la enterotoxina *selm* siempre apareció combinada con *egc* o con enterotoxinas que pertenecen a *egc*; mientras que *selk* siempre se detectó asociado al menos a *egc-2*. Además, las enterotoxinas *seg*, *selm* y *selo* sólo aparecieron con el *egc* completo, bien de tipo 1 ó de tipo 2, salvo un caso en el que las enterotoxinas *selm* y *selo* aparecieron junto con *seln* y *selu* formando un *egc* incompleto.

Además, en 7 aislados se identificó una única enterotoxina: *sell*, en dos pododermatitis con genotipos D1/II3/α y D1/IV2/α; *selu*, en un aislado de mastitis con genotipo B1/IV2/α y en un aislado de piómetra con genotipo B1/IV1/α; *seh*, en un aislado de otitis con genotipo C1/I1/β; *sei*, en un aislado descrito previamente por Hermans *et al.* (2000) de genotipo C1/I1/γ; y *selj*, en una pododermatitis donde se determinó el genotipo B1/IV2/β.

Por otro lado, en 5 aislados no se identificó ninguna enterotoxina. Estos aislados procedían de nariz, con genotipos B1/IV1/ $\alpha$  y B1/IV2/ $\alpha$ ; de mastitis con genotipos B1/IV2/ $\beta$  y D1/IV1/ $\alpha$ , y de una conjuntivitis D1/IV2/ $\alpha$ .

Los genotipos cunícolas pertenecientes a cualquiera de los patrones tipo A por el gen de la *coa* pertenecieron a las combinaciones donde estaban implicadas las enterotoxinas pertenecientes a *egc-2*, excepto 3 aislados con genotipos A1/III2/ $\alpha$  y A3/III1/ $\delta$ , pertenecientes a aislados nasales, y A1/III1/ $\zeta$ , aislado descrito previamente por Hermans *et al.* (2000).

**Tabla IV1-20** Distribución de los aislados entre las combinaciones de enterotoxinas descritas en este estudio.

Gen de virulencia	Nº de aislados	% de aislados
<i>sec, sell, egc1</i>	1	1,1
<i>seb, selp, egc1</i>	1	1,1
<i>sell, egc1</i>	2	2,3
<i>sed, selj, seh, selk, egc2</i>	1	1,1
<i>sed, selj, selk, egc2</i>	1	1,1
<i>selk, egc2</i>	10	11,5
<i>seb, selp, egc2</i>	2	2,3
<i>egc2</i>	32	36,8
<i>sed, selj, seh, sell, selu</i>	1	1,1
<i>sed, selj, sell, selu</i>	1	1,1
<i>sed, selj, seh</i>	2	2,3
<i>sed, selj, sell</i>	2	2,3
<i>sed, selj, selu</i>	3	3,4
<i>sed, selj</i>	2	2,3
<i>seh, sell</i>	1	1,1
<i>seh, sei</i>	1	1,1
<i>seh, selj</i>	1	1,1
<i>seh, selu</i>	2	2,3
<i>seh</i>	1	1,1
<i>sei, selm, selu</i>	4	4,6
<i>sei, selu</i>	4	4,6
<i>sei</i>	1	1,1
<i>selm, seln, selo, selu</i>	1	1,1
<i>selj</i>	1	1,1
<i>sell</i>	2	2,3
<i>selu</i>	3	3,4
Ninguno	5	5,7

Al analizar cómo se distribuyen las enterotoxinas entre las diferentes lesiones y entre los aislados nasales (tabla IV1-21) no se encontró ninguna relación. Lo más significativo fue que los diez tipos de lesión analizados poseían el *egc-2* y sus combinaciones. Todos los aislados procedentes de artritis, pústulas y neumonías contenían la combinación *selk* y *egc-2*, mientras que 2 de los 3 aislados procedentes de piómetra contenían *egc-2* (tabla IV1-21). Sin embargo, debido al bajo número de aislados procedentes de estas lesiones no se puede concluir una asociación de esta combinación de enterotoxinas por predisponer a las cepas a producir estas lesiones. Sí había relación con los genotipos: A1/II1/η (artritis, neumonía y pústula) y A1/II1/δ (neumonía y piómetra).

**Tabla IV1-21.** Porcentaje de aislados cunícolas positivos a los genes: *seb*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp* y *selu*, en relación a la lesión de la que procedían.

Lesión	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>selj</i>	<i>selk</i>	<i>sell</i>	<i>selm</i>	<i>seln</i>	<i>selo</i>	<i>selp</i>	<i>selu</i>
Mastitis	0%	0%	28%	44%	17%	56%	28%	6%	17%	56%	50%	50%	0%	56%
Pododermatitis	11%	5%	16%	58%	5%	63%	26%	16%	26%	68%	63%	63%	11%	58%
Absceso	0%	0%	17%	83%	17%	83%	17%	33%	0%	83%	83%	83%	0%	83%
Conjuntivitis	0%	0%	40%	20%	40%	20%	40%	0%	20%	20%	20%	20%	0%	80%
Pústula	0%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	100%	100%	0%	100%
Otitis	0%	0%	25%	25%	50%	50%	25%	0%	25%	25%	25%	25%	0%	50%
Neumonía	0%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	100%	100%	0%	100%
Costra	0%	0%	0%	50%	50%	50%	0%	0%	0%	50%	50%	50%	0%	100%
Piómetra	0%	0%	0%	67%	0%	67%	0%	0%	0%	67%	67%	67%	0%	100%
Artritis	0%	0%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	100%	100%	0%	100%
Aislado nasal	10%	0%	0%	40%	0%	80%	0%	20%	0%	50%	40%	40%	10%	80%

■ : gen ausente en cepas aisladas de una determinada lesión.

■ : gen presente en cepas aisladas de una determinada lesión.

En cuanto al resto de toxinas analizadas, sólo la  $\gamma$ -toxina codificada por el gen *hlg* fue detectada, en este caso en todos los aislados analizados salvo en la cepa CO 444, perteneciente a un aislado nasal con genotipo A3/III1/δ. Sin embargo, el gen *tst*, el gen *eta* y el gen *etb* no se detectaron en ninguno de los aislados analizados. Por su parte, los genes *lukS*, *F-PV*, que codifican para la leucocidina Pantón-Valentine, se detectaron en las cepas cunícolas JS 606 y JS 432 (Hermans *et al.*, 2000).

Por último, analizando la distribución de las diferentes enterotoxinas estudiadas entre los aislados nasales se observó una gran variabilidad. Se determinaron genotipos capaces de producir lesiones invasivas que no presentaban enterotoxinas y genotipos con un gran número de éstas (entre ellas las que pertenecen al *egc*), tanto en genotipos procedentes de colonizaciones nasales asintomáticas como de lesiones (tabla IV1-22).

**Tabla IV1-22.** Distribución de enterotoxinas entre aislados nasales procedentes de conejo.

Genotipo	Gen de virulencia	<sup>a</sup> Identificado
A1/III1/δ	<i>seb, selp, egc2</i>	sí
A1/III1/δ	<i>selk, egc 2</i>	sí
B1/IV1/α	Ninguno	sí
B1/IV2/α	Ninguno	sí
A1/III2/α	<i>sei, selu</i>	no
A1/III4/δ	<i>selk, egc 2</i>	no
A3/III1/δ	<i>sei, selu</i>	no
B1/I3/δ	<i>sei, selm, selu</i>	no
B3/I1/γ	<i>seb, selp, egc2</i>	no
F3/II6/β	<i>sei, selu</i>	no

<sup>a</sup>Identificado: genotipos aislados de lesiones producidas por *S. aureus*.

#### 4.1.6.3.- Distribución de genes de virulencia entre aislados de *S. aureus*. Otros genes de virulencia

Se analizó también si los aislados cunícolas poseían cápsula polisacárida. Para ello, se comprobó la presencia de *cap5* o *cap8*, que codifican la cápsula tipo 5 y tipo 8, respectivamente, los tipos capsulares más frecuentes entre los aislados clínicos, tanto de humanos como de animales (O'Riordan y Lee, 2004).

Entre los aislados cunícolas hubo un predominio de la cápsula tipo 8, con 60 aislados (69%). Estos aislados procedían de 8 de las 10 lesiones analizadas y de aislados nasales, identificándose 14 genotipos diferentes. La cápsula tipo 5 se determinó en 13 aislados (15%), determinándose 11 genotipos diferentes. Por su parte, 14 aislados cunícolas fueron negativos tanto a *cap5* como a *cap8*, correspondiendo a 8 genotipos diferentes (tabla IV1-23). En los casos en los que se pudo determinar el tipo capsular, todos los aislados pertenecientes al mismo genotipo presentaban el mismo tipo de cápsula.

**Tabla IV1-23.** Porcentaje de aislados cunícolas positivos a *cap5*, *cap8*, *agrI*, *agrII*, *agrIII* y *agrIV*, en relación al genotipo.

Genotipo	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>agrI</i>	<i>agrII</i>	<i>agrIII</i>	<i>agrIV</i>
A1/II1/δ	0%	100%	0%	0%	0%	100%
A1/II1/ε	0%	100%	0%	0%	0%	100%
A1/II1/η	0%	0%	0%	0%	17%	83%
A1/III1/δ	0%	100%	0%	0%	0%	100%
A1/III1/ζ	100%	0%	100%	0%	0%	0%
A1/III2/α	100%	0%	100%	0%	0%	0%
A1/III4/δ	0%	0%	0%	0%	0%	100%
A3/III1/δ	0%	0%	0%	0%	0%	100%
A3/III2/δ	0%	100%	0%	0%	0%	100%
B1/I1/α	0%	100%	0%	0%	100%	0%
B1/I3/δ	100%	0%	0%	0%	0%	100%
B1/II1/δ	0%	100%	0%	0%	0%	100%
B1/IV1/α	0%	100%	0%	0%	100%	0%
B1/IV1/β	0%	0%	0%	0%	100%	0%
B1/IV1/δ	0%	0%	100%	0%	0%	0%
B1/IV1/θ	0%	0%	0%	0%	100%	0%
B1/IV2/α	0%	100%	0%	0%	100%	0%
B1/IV2/β	0%	100%	0%	0%	100%	0%
B1/IV2/θ	0%	100%	0%	0%	100%	0%
B2/IV1/δ	0%	100%	100%	0%	0%	0%
B3/I1/γ	100%	0%	0%	100%	0%	0%
B3/IV1/γ	100%	0%	0%	100%	0%	0%
B3/IV2/γ	100%	0%	0%	100%	0%	0%
C1/I1/β	0%	100%	0%	0%	100%	0%
C1/I1/γ	0%	0%	0%	0%	50%	50%
C1/I1/θ	0%	0%	0%	0%	100%	0%
C1/II2/γ	0%	100%	0%	0%	100%	0%
D1/III3/α	100%	0%	100%	0%	0%	0%
D1/IV1/α	100%	0%	50%	0%	0%	50%
D1/IV2/α	100%	0%	100%	0%	0%	0%
F1/II1/δ	0%	100%	0%	0%	0%	100%
F2/III2/α	100%	0%	0%	100%	0%	0%
F3/II6/β	100%	0%	100%	0%	0%	0%

■ : variabilidad en el tipo de *agr* dentro de un genotipo.

Respecto a la proteasa sérica V8, todos los aislados analizados fueron positivos al gen *sspA*, lo que mostraba que esta proteasa era imprescindible entre las cepas cunícolas estudiadas

Por último, entre los aislados de procedencia cunícola, el tipo de *agr* más frecuente fue el tipo IV, con 46 aislados cunícolas (53%). Otros 27 aislados cunícolas pertenecieron al tipo de *agr* III (31%). El resto de aislados cunícolas perteneció a *agr* tipo I (10 aislados, 11%) o al *agr* tipo II (4 aislados, 5%).

Atendiendo a la relación entre genotipo y pertenecer a uno u otro tipo de *agr*, se observó que, independientemente de la procedencia del aislado, un mismo genotipo pertenecía al mismo tipo de *agr*, salvo los genotipos C1/II1/γ, A1/II1/η y D1/IV1/α (tabla IV1-23). Así, los genotipos cunícolas pertenecientes a cualquiera de los patrones tipo A por el gen de la *coa* pertenecieron al tipo de *agr* más frecuente, el tipo IV, excepto 3 aislados con genotipos A1/III2/α y A1/II1/η, pertenecientes a un aislado nasal y una pústula respectivamente, y A1/III1/ζ, aislado descrito previamente por Hermans *et al.* (2000). Por tanto, guardaba relación con las combinaciones donde estaban implicadas la enterotoxinas pertenecientes a *egc-2*, también observadas en los patrones tipo A por el gen de la *coa*.

Al analizar cómo se distribuyen estos genes entre las diferentes lesiones se observa un predominio de la cápsula tipo 8 salvo en el caso de los aislados procedentes de la mucosa nasal (tabla IV1-24). En este caso, todos los genotipos aislados únicamente de nariz (A1/III2/α, A1/III4/δ, A3/III1/δ, B1/I3/δ, B3/II1/γ y F3/II6/β) presentaron la cápsula tipo 5 (4 aislados) o indeterminada (2 aislados). En cuanto al tipo de *agr* hubo un predominio de los tipos III y IV. Mientras que en los casos de abscesos, neumonía, piómetra y aislados procedentes de mucosa nasal había un predominio del tipo IV, en los casos de conjuntivitis y otitis hubo un predominio del tipo III (tabla IV1-24).

**Tabla IV1-24.** Porcentaje de aislados cunícolas positivos a *cap5*, *cap8*, *agrI*, *agrII*, *agrIII* y *agrIV*, en relación a la lesión de la que procedían.

Lesión	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>agrI</i>	<i>agrII</i>	<i>agrIII</i>	<i>agrIV</i>
Mastitis	17%	83%	11%	0%	44%	44%
Pododermatitis	47%	53%	21%	10%	32%	37%
Absceso	0%	83%	0%	0%	17%	83%
Conjuntivitis	20%	80%	20%	0%	60%	20%
Pústula	0%	0%	0%	0%	100%	0%
Otitis	0%	75%	0%	0%	75%	25%
Neumonía	0%	50%	0%	0%	0%	100%
Costra	0%	100%	0%	0%	50%	50%
Piómetra	0%	100%	0%	0%	33%	67%
Artritis	0%	0%	0%	0%	0%	100%
Aislado nasal	40%	40%	20%	10%	20%	50%

■ : gen presente en cepas aisladas de una determinada lesión.

En resumen, la diversidad en los genes de virulencia de los distintos genotipos analizados fue elevada. Todas las adhesinas estudiadas se determinaron en la mayoría de los aislados, excepto el gen *bap*. Así, las adhesinas *coa*, *spa*, *clfA*, *clfB*, *fib* y *map/eap*, se determinaron en todos los aislados analizados de *S. aureus*, mientras que las adhesinas *ebpS*, *fnbA* y *sdrC* sólo estuvieron ausentes en un aislado nasal cunícola. La presencia de *cna* fue mayoritaria y estuvo carente sólo en el 4,6% de los aislados cunícolas. Por su parte, los genes *sdrD*, *sdrE* y *bbp* no se determinaron en el 11,5%, 17,2% y 19,5% de los casos, respectivamente, mientras que *fnbB* fue la adhesina menos presente entre los aislados cunícolas, no determinándose en el 44,8%. Entre las enterotoxinas, la mayoría de las cepas de *S. aureus* poseía enterotoxinas. La combinación que apareció con mayor frecuencia fue la asociada al cluster *egc-2*. El resto de combinaciones entre las diferentes enterotoxinas fue menos frecuente, aunque dieron lugar a nuevas combinaciones entre las distintas enterotoxinas. *hlg* fue detectada en todos los aislados analizados, salvo en un aislado cunícola procedente de nariz, mientras que se observó una baja importancia de PVL entre los aislados cunícolas y ausencia del gen *tst* y los genes *eta* y *etb*. Por último, entre los aislados cunícolas hubo un predominio de la cápsula tipo 8 y el tipo IV de *agr*.

## **IV.2.- Caracterización inmunopatológica de mastitis cunícolas producidas por *S. aureus***



## **IV.2.- Caracterización inmunopatológica de mastitis cunícolas producidas por *S. aureus***

Una de las principales causas de eliminación entre conejas reproductoras en granjas industriales es la mastitis producida por *S. aureus* (Segura *et al.*, 2007). Para conocer el papel que ejerce el sistema inmune del hospedador en la patogenia de las mastitis estafilocócicas, en este apartado se llevó a cabo una caracterización macroscópica y microscópica de las mismas, tanto en casos naturales como experimentales.

### **4.2.1.- Caracterización macroscópica de casos naturales**

La mastitis fue la lesión purulenta provocada por *S. aureus* más frecuentemente diagnosticada, con el 57,4% de los casos. De las 246 conejas con mastitis se realizó un estudio histopatológico de 135. Todas las conejas analizadas mostraron una mastitis purulenta crónica en una o varias glándulas mamarias. Las glándulas afectadas mostraron el tejido mamario aumentado de tamaño y consistencia, involucrando, por lo general, al pezón y al tejido adyacente; muchas veces formando abscesos de 1 a 12 cm. Estos abscesos podían abrirse, descargando el material purulento al exterior. En ocasiones, la piel que recubría las mamas afectadas aparecía enrojecida. Las conejas con mastitis se mostraron letárgicas e incapaces de amamantar a los gazapos. Generalmente, si las conejas no morían debido a la infección eran eliminadas de la explotación por el ganadero.

Inicialmente se realizó un estudio sobre el número de glándulas mamarias que poseían 130 conejas afectadas de mastitis crónica, observándose que el número de mamas por animal variaba entre 8 y 10. En total, 49 animales mostraron 8 glándulas mamarias, 43 mostraron 9, y 38 conejas poseían 10 glándulas mamarias. Posteriormente, se valoró el número de mamas afectadas. De las 130 conejas, 55 sólo tenían afectada una de las mamas, mientras que 48, 14 y 13 animales presentaban afección en dos, tres y cuatro o más glándulas mamarias, respectivamente. Finalmente, se estudió la frecuencia de afección entre las diferentes glándulas mamarias. Un total de 253 mamas se vieron afectadas entre las 130 conejas. En 135 ocasiones (53,4%), al menos una de las glándulas derechas se vio afectada, mientras que el lado izquierdo se afectó en 118 ocasiones (46,6 %). Estudiando los pares de glándulas, el par más craneal estaba

afectado en 25 (9,9%) ocasiones (17 veces la glándula mamaria derecha y 8 veces la izquierda); el segundo par craneal se afectó en 53 (21%) ocasiones (25 ocasiones la mama derecha y en 28 ocasiones la izquierda); el tercer par de mamas se afectó en 80 (31,6%) ocasiones, (afectándose 43 veces el lado derecho y 37 el izquierdo); el cuarto par de mamas se afectó un total de 62 (24,5%) ocasiones (28 veces el lado derecho y 34 el izquierdo); por último, el quinto par de mamas, cuando existía, se vio afectado en 33 (13%) ocasiones (22 veces el lado derecho y 11 veces el lado izquierdo) (tabla IV2-1). Por tanto, no hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la afección de las glándulas mamarias de la cadena derecha o izquierda, aunque sí se afectaron en menor medida los pares craneales y caudales respecto a los centrales.

**Tabla IV2-1.** Número de glándulas mamarias afectadas en relación a su localización anatómica.

	<b>Derecha</b>	<b>Izquierda</b>	<b>Total</b>
<b>Primer par (craneal)</b>	17 (6,7%)	8 (3,2%)	25 (9,9%)
<b>Segundo par</b>	25 (9,9%)	28 (11,1%)	53 (21%)
<b>Tercer par</b>	43 (17%)	37 (14,6%)	80 (31,6%)
<b>Cuarto par</b>	28 (11,1%)	34 (13,4%)	62 (24,5%)
<b>Quinto par (caudal)</b>	22 (8,7%)	11 (4,3%)	33 (13%)
<b>Total</b>	135 (53,4%)	118 (46,6%)	253 (100%)

#### **4.2.2.- Clasificación histomorfológica de casos naturales**

Las lesiones de las 135 mamas afectadas por *S. aureus* se clasificaron atendiendo a criterios histomorfológicos. Todas las mastitis presentaron una inflamación crónica de tipo purulento, caracterizada por la presencia de un gran número de heterófilos dentro de los espacios alveolares. Algunos alveolos estaban totalmente colapsados por estas células, mientras que otros estaban normales o contenían una baja cantidad de heterófilos. Además, también fue frecuente observar gran cantidad de material necrótico y restos celulares en los senos galactóforos (figura VII-10). En ocasiones se observaron abundantes formas bacterianas en el intersticio y en los alveolos.

Se definieron cuatro tipos diferentes de mastitis: tipo abscesos, tipo rosetas, tipo sándwich y tipo mixto (tabla IV2-2).

Sólo una de las mastitis, producida por el genotipo C1/II2/γ, no pudo ser clasificada en ninguno de estos cuatro tipos. Estaba caracterizada por un intenso infiltrado de heterófilos de localización intersticial y, en menor medida, en luces alveolares.

#### 4.2.2.1.- Mastitis tipo abscesos

Este tipo de inflamación fue la que se diagnosticó con mayor frecuencia, observándose en 88 de los 135 animales (65,2%). La mastitis tipo abscesos se caracterizó por la presencia de uno (16 casos) o varios (72 casos) abscesos, de tamaño variable. El material purulento consistió principalmente en heterófilos, en distintos grados de degeneración, y otros restos celulares, junto con acúmulos de bacterias Gram-positivas.

En 32 de las conejas, los abscesos estaban bien delimitados por una gruesa cápsula fibrosa, con abundante tejido conjuntivo denso y maduro (figura VII-11). Sin embargo, en 26 de los casos estudiados, los abscesos estaban delimitados por una cápsula de tejido conjuntivo más laxo, infiltrada por linfocitos, células plamáticas, macrófagos, fibroblastos y vasos sanguíneos hiperémicos (figura VII-12). Así, se definió una mastitis tipo **abscesos encapsulados**, que podía ser a su vez **madura** (si mostraba una cápsula fibrosa compacta) o **inmadura** (cuando presentaba una cápsula conjuntiva laxa infiltrada por células inflamatorias).

Por su parte, 30 de los abscesos estudiados no presentaban cápsula, sólo estaban rodeados por una delgadísima banda de tejido conectivo que solía presentar necrosis aguda en su cara interna. Estas mastitis se clasificaron como tipo abscesos **sin cápsula**. En ocasiones, estos abscesos contenían una zona central con abundantes bacterias Gram-positivas, rodeadas de material necrótico y restos celulares, delimitados por abundantes heterófilos fusiformes (figura VII-13).

El tejido adyacente a los abscesos se presentaba atrófico, predominando un intersticio con abundante tejido fibroso y las luces de los alveolos mamarios disminuidas y ocluidas por heterófilos y macrófagos (figura VII-14). En la dermis se observó un infiltrado inflamatorio en los casos en los que la inflamación progresó hacia la periferia. Otras características histopatológicas observadas fueron hiperemia, hemorragias y formación de neovasos.

#### 4.2.2.2.- Mastitis tipo rosetas

En contraste a las mastitis tipo absceso, hubo un tipo de mastitis caracterizadas por la presencia de áreas extensas de inflamación no delimitadas por una cápsula fibrosa, con abundante necrosis y colonias bacterianas. En la periferia de estas áreas de necrosis aparecían otros focos secundarios más pequeños, como si fueran zonas satélites de las anteriores, delimitados por el propio epitelio alveolar, en diferentes fases de necrosis. Este tipo de lesión se denominó tipo **rosetas**, debido a la apariencia que presentaba (figura VII-15). En la luz de los alveolos mamarios se localizaban abundantes heterófilos y macrófagos. Además, en el tejido intersticial se podía observar un infiltrado de heterófilos y en menor medida un infiltrado linfoplasmocitario difuso. La estructura histológica de los lóbulos adyacentes a las zonas afectadas se diferenciaba correctamente. Como en el tipo descrito anteriormente, también pudo observarse infiltrado inflamatorio en la dermis y el tejido subcutáneo cuando la inflamación progresaba hacia la periferia. La mastitis tipo rosetas se detectó en 12 animales (8,9%).

#### 4.2.2.3.- Mastitis tipo sándwich

Este tipo de lesión se observó en 31 de los 135 animales (22,9% de los casos). En este grupo se clasificaron las mastitis que presentaron una banda ancha de inflamación alrededor del tejido mamario, entre el tejido mamario y la piel, y que se extendía al tejido subcutáneo y en ocasiones incluso a los músculos abdominales. La inflamación alrededor de la glándula mamaria podía ser parcial (25 casos) o total (6 casos). En general, aunque el infiltrado celular variaba, estaba compuesto de heterófilos, macrófagos y, en menor medida, células plasmáticas. En este tipo de lesión también era frecuente observar hiperemia, edema intersticial, hemorragias y la presencia de émbolos sépticos.

La mama propiamente dicha podía aparecer afectada ligeramente, sobre todo en la periferia, o bien, con un infiltrado intersticial linfoplasmocitario o heterófilo y la luz de los alveolos con abundantes heterófilos. A este tipo de lesiones se las clasificó como mastitis tipo **sándwich incompleto** y tipo **sándwich infiltrado**, respectivamente.

Cuando la inflamación rodeaba completamente a la glándula, lo que recibió el nombre de **sándwich completo**, el tejido mamario presentaba necrosis por

coagulación, con abundantes bacterias Gram-positivas (figura VII-16). Además, se detectaron infiltrados linfoplasmocitarios y heterofílicos en la dermis de ocho animales, así como soluciones de continuidad (figura VII-17), indicando que la bacteria probablemente habría penetrado a través de una herida en la piel.

#### **4.2.2.4.- Mastitis tipo mixta**

Estas glándulas mamarias presentaban características histopatológicas de dos de los tipos descritos anteriormente. En cuatro animales se detectaron lesiones compatibles con una mastitis tipo abscesos encapsulados y rosetas de forma simultánea. En estas mamas, algunos de los abscesos aparecían bien delimitados por una cápsula de tejido conjuntivo denso y maduro, mientras que en otras zonas del tejido, las lesiones no estaban bien delimitadas y tenían focos satélites característicos de las lesiones tipo rosetas.

#### **4.2.2.5.- Otros hallazgos histopatológicos**

Otros hallazgos observados en las glándulas mamarias analizadas fue la presencia de células gigantes multinucleadas, principalmente relacionadas con material mineralizado (figura VII-18) y *corpora amilacea*. Estas células se observaron en 18 casos: en 12 mastitis tipo abscesos (7 abscesos maduros, 4 inmaduros y una mastitis subtipo absceso sin cápsula), en 2 mastitis tipo rosetas y en 4 mastitis tipo sándwich (dos casos subtipo sándwich incompleto, uno infiltrado y un subtipo completo). También se detectó la presencia de células espumosas (figura VII-19), formando acúmulos en el tejido intersticial próximo a abscesos. Se detectaron en 15 casos de mastitis tipo abscesos y 2 casos de mastitis tipo mixta (abscesos-rosetas).

#### **4.2.2.6.- Relación entre mastitis crónica y genotipo**

El 63,7 % de las mastitis estudiadas estaban provocadas por aislados del genotipo A1/II1/δ. El resto de genotipos estaban mucho menos representados.

El tipo de mastitis más común descrito para el genotipo A1/II1/δ fueron los abscesos, con 55 (63,9%) casos de mastitis. Entre ellos, 37 mastitis fueron encapsuladas (22 con cápsula madura y 15 con cápsula inmadura) y 18 no encapsuladas. En segundo lugar se clasificaron las mastitis tipo sándwich (3

sándwich completos, 11 incompletos y 5 sándwich infiltrados). El tercer tipo de mastitis, con 10 casos, fueron las tipo rosetas, mientras que se clasificaron como mixtas 2 mastitis. En la tabla IV2-2 se detallan los resultados. Además, también se analizó el estado fisiológico de las glándulas, comprobando la presencia o ausencia de leche. De las 135 mamas analizadas, 79 (58,5%) no presentaban leche en los alveolos. Entre los diferentes tipos de mastitis, en las tipo abscesos hubo un predominio de mamas inactivas, sin leche, mientras que en las mastitis clasificadas como tipo rosetas y tipo sándwich hubo un predominio de mamas activas. Aparentemente, no hubo una relación clara entre los diferentes genotipos y los tipos de mastitis descritos, excepto en 2 casos. Curiosamente, 41 de las 48 lesiones clasificadas como mastitis tipo abscesos provocadas por el genotipo A1/II1/δ tenían un patrón multifocal. De la misma manera, 3 de las 5 lesiones para el genotipo C1/I1/β se clasificaron como sándwich incompleto.

**Tabla IV2-2.** Clasificación de las mastitis naturales analizadas según sus características histomorfológicas y el genotipo identificado.

Genotipo	<sup>1</sup> Abscesos		Roseta	Sándwich			Mixta	Total	
	Encapsulado			Sin cápsula	Completo	Incompleto			Infiltrado
	Maduro	Inmaduro							
A1/II1/δ	22 (21M+1U)	15 (M)	18 (12M+6U)	10	3	11	5	2	86
A1/II1/ε		1 (M)							1
A1/II1/η		1 (U)	1 (U)			1			3
A1/II1/κ	1(M)								1
A1/III1/δ	4 (1U+3M)	8(M)	5 (M)	1		4		1	23
A3/III2/δ			1 (M)					1	2
B1/I1/α		1 (M)			1				2
B1/II1/δ			1 (U)						1
B1/IV1/α	1 (M)		1 (U)	1			1		4
B1/IV2/α	1 (U)								1
B1/IV2/β			1 (M)						1
B2/IV1/δ	1 (M)								1
C1/I1/β	1 (U)				1	3			5
C1/I1/γ					1				1
D1/IV1/α	1 (U)		1 (U)						2
F1/II1/δ			1 (M)						1
<sup>2</sup> Total	32 8L/24NL	26 11L/15NL	30 11L/19NL	12 7L/5NL	6 4L/2NL	19 8L/11NL	6 5L/1NL	4 2L/2NL	135 56L/79NL

<sup>1</sup>Abscesos: (M): multifocal, (U): unifocal. <sup>2</sup>Presencia de leche en el alveolo: con leche (L), sin leche (NL).

### 4.2.3.- Caracterización inmunocitoquímica de casos naturales

Con el objeto de determinar mejor el papel del hospedador en el desarrollo de los diferentes tipos de mastitis, se realizó una caracterización inmunopatológica para valorar la respuesta inmune de las conejas. Para ello, se emplearon cuatro anticuerpos que marcaban: macrófagos (RAM11 positivos), linfocitos T (CD3 positivos), linfocitos B (CD79 positivos) y células plasmáticas (IgM positivas). Este estudio se llevó a cabo en todos los tipos de mastitis descritos histomorfológicamente, producidos por cepas de *S. aureus* que pertenecían al genotipo A1/II1/δ, el más ampliamente distribuido, para eliminar el efecto cepa del análisis.

#### 4.2.3.1.- Mastitis tipo abscesos

Entre las mastitis tipo abscesos, como se ha indicado con anterioridad, se distinguían tres subtipos, en función de las características de su cápsula, analizándose 5 mastitis de cada subtipo (cápsula madura, inmadura y sin cápsula).

Este tipo de lesión presentó abundante celularidad (figura IV-8), sobre todo alrededor de los abscesos (figura VII-20).

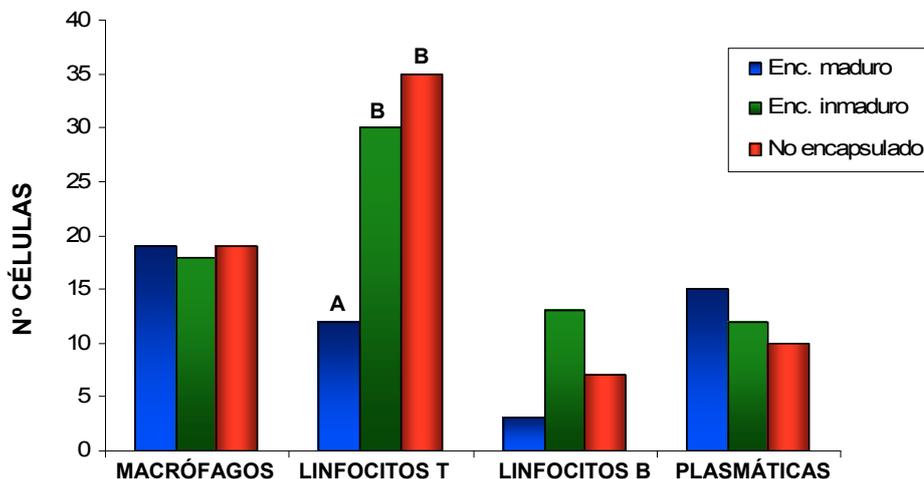
En general, en todas las mastitis tipo abscesos se encontró un gran número de macrófagos que expresaban el marcador RAM11. Estos macrófagos se localizaban sobre todo alrededor de los focos de necrosis, limitando el material purulento, en la parte interna de la cápsula. Además, también fueron abundantes en las luces alveolares en las mastitis con abscesos encapsulados de forma laxa, y, en las no encapsuladas, en forma de infiltrados de localización intersticial. También se marcaron las células espumosas, que se localizaron tan sólo en mastitis con abscesos (mastitis tipo abscesos y mastitis tipo mixta), guardando por tanto relación con este tipo de lesión. Se distribuyeron formando grupos por todo el tejido mamario, delimitados por una cantidad variable de tejido conjuntivo. Las tres mamas con mayor número de células espumosas pertenecieron cada una a un subtipo de mastitis tipo abscesos (madura, inmadura y sin cápsula).

Por su parte, los linfocitos T (CD3+) se localizaron en un número similar, tanto en el subtipo inmaduro como en el subtipo no encapsulado, localizándose próximos a las zonas de pus, en el intersticio y en las luces alveolares. En estos dos subtipos de mastitis fue frecuente encontrar CD3 y CD79 formando manguitos

perivasculares. En menor número se localizaron en las mastitis con abscesos bien encapsulados, encontrándose, en este caso, sobre todo alrededor de las zonas purulentas.

En cuanto a los linfocitos B (CD79+), predominaron sobre todo en las mastitis subtipo inmaduro, donde se localizaron distantes de las zonas de necrosis, formando pequeños acúmulos en el intersticio. En las mastitis subtipo no encapsulado también se observaron en gran cantidad, pero en menor número que en las anteriores, apareciendo en pequeños acúmulos. Mientras, en el subtipo restante, mastitis con cápsula madura, el número de linfocitos CD79 fue bajo.

Finalmente, las células plasmáticas (IgM+) predominaron en todas las mastitis tipo abscesos, infiltrando el tejido conjuntivo próximo a los abscesos así como el intersticio mamario. Sin embargo, las células plasmáticas IgM positivas fueron variables. Predominaron en las mastitis subtipo maduro, donde fueron las células predominantes junto con los macrófagos. En los otros dos subtipos, hubo variabilidad entre las mamas. En los subtipos con cápsula inmadura hubo dos de las 5 mamas donde predominaron las células plasmáticas marcadas, mientras que en las mastitis no encapsuladas hubo tres de 5 mamas con predominio de células plasmáticas marcadas.

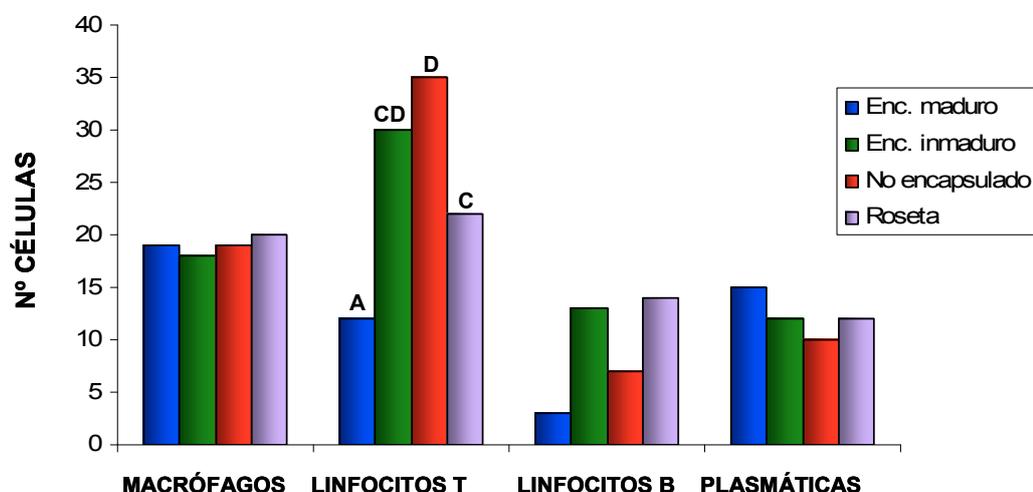


**Figura IV-8.** Medias mínimo cuadráticas de número de células en cada una de las lesiones tipo absceso marcadas mediante ICQ: encapsulado maduro, encapsulado inmaduro y no encapsulado. Dentro de una variable hay diferencias significativas en el caso de no tener letras en común ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3.2.- Mastitis tipo rosetas

Se analizaron 5 mastitis tipo rosetas. En general, fueron mastitis que se caracterizaron por una celularidad similar a las mastitis tipo abscesos. Se localizaban sobre todo en el intersticio, tanto en zonas menos lesionadas como en aquellas que habían perdido su estructura histológica, más que en áreas limítrofes a la necrosis. Los macrófagos (RAM11+) se distribuyeron delimitando las zonas de necrosis, pero en muy bajo número delimitando los focos satélites de lesión (figura VII-21). Los linfocitos T (CD3+), en una proporción similar a los macrófagos, se distribuían de forma aislada en el intersticio y luces alveolares. Los linfocitos B (CD79+) formaron acúmulos localizados en el intersticio. Por último, las células plasmáticas se localizaron en el intersticio y próximas a las zonas de pus.

Comparando este tipo lesional con el anterior cabe destacar la menor cantidad de linfocitos T (CD3+) con respecto al subtipo absceso no encapsulado, con el que histológicamente guarda cierta semejanza (excepto por la presencia de focos inflamatorios satélites) (figura IV-9 y figura IV-11).

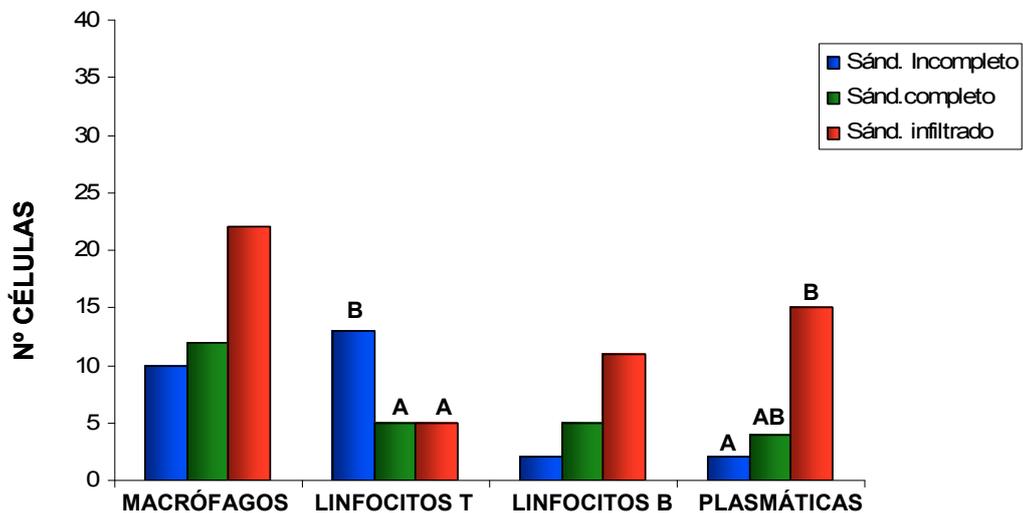


**Figura IV-9.** Medias mínimo cuadráticas de número de células en la lesión tipo absceso y roseta marcadas mediante ICQ. Dentro de una variable hay diferencias significativas en el caso de no tener letras en común ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3.3.- Mastitis tipo sándwich

En términos generales es el tipo de mastitis con menos celularidad (figura VII-22). Se analizaron 5 casos de mastitis tipo sándwich incompleto y sándwich infiltrado, y 3 casos de sándwich completo (figura IV-10). Existe un cierto

predominio de macrófagos (RAM11+), sobre todo en la lesión tipo sándwich infiltrado, localizándose principalmente en el intersticio y luces alveolares, más que próximos a la zona de necrosis. Los otros tres tipos de células aparecen en menor número, localizándose próximos a la zona de necrosis y en el intersticio, pero sin formar acúmulos celulares. No existen diferencias, en el número de células inflamatorias, entre sándwich completo e incompleto, excepto en el número de linfocitos T (CD3+), siendo significativamente más numerosos en el subtipo incompleto. En las dos mastitis tipo sándwich infiltrado había un predominio de linfocitos B (CD79+) y células plasmáticas (IgM+), sobre todo en el intersticio próximo a las zonas de rosetas.

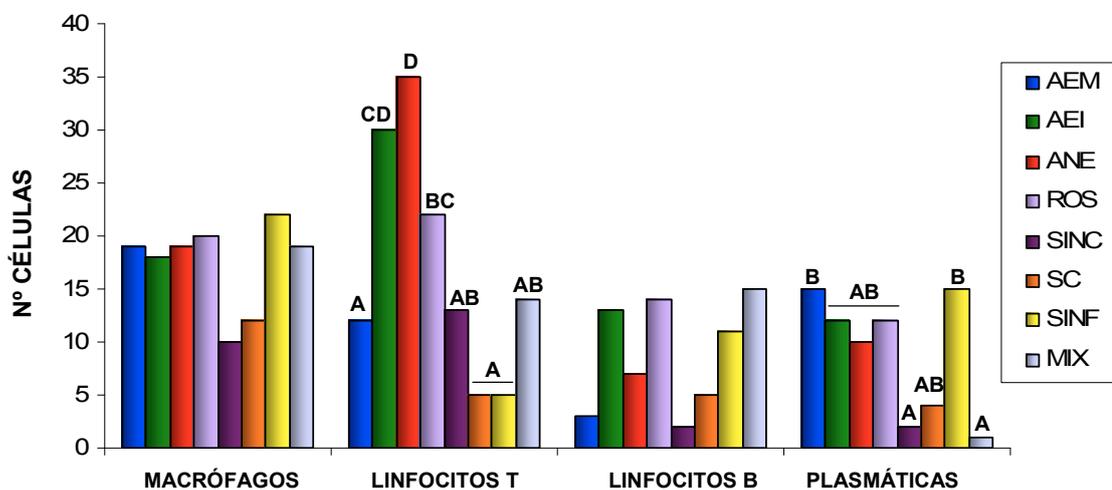


**Figura IV-10.** Medias mínimo cuadráticas de número de células en cada uno de las lesiones tipo sándwich marcadas mediante ICQ: incompleto, completo e infiltrado. Dentro de una variable hay diferencias significativas en el caso de no tener letras en común ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3.4.- Mastitis tipo mixta

Se analizaron las dos mastitis clasificadas como mixtas, con características de abscesos encapsulados y rosetas. Estas mastitis poseían las características descritas anteriormente para cada una de las lesiones. Así, había diferencias de celularidad, sobre todo en cuanto a macrófagos (RAM11+) y linfocitos T (CD3+), con un mayor predominio en los abscesos, limitando las zonas purulentas, que en las rosetas, que presentaban menor cantidad de células y localizadas sobre todo en el intersticio y luces alveolares.

En resumen, comparando todos los tipos de lesiones (figura IV-11), fue en el número de linfocitos T (CD3+) donde más diferencias se observaron. El número de linfocitos T fue significativamente mayor en las mastitis de tipo absceso no encapsulado, seguido de los abscesos encapsulados inmaduros y las mastitis tipo rosetas. En el resto de lesiones hay un menor número de linfocitos T (CD3+), siendo más bajo en las lesiones tipo sándwich completo y sándwich infiltrado. Por su parte, el número de células plasmáticas (IgM+) fue menor significativamente entre las mastitis tipo sándwich incompleto y tipo mixta respecto a las mastitis tipo absceso encapsulado maduro y sándwich infiltrado. Para estas dos variables, linfocitos T (CD3+) y células plasmáticas (IgM+), el efecto global lesión fue significativo para explicar sus diferencias, pero no fue significativo para las variables macrófagos (RAM11+) y linfocitos B (CD79+). El número de macrófagos fue similar, excepto en la lesión de tipo sándwich incompleto, donde el número de macrófagos RAM11+ fue menor que en el caso del tipo sándwich infiltrado. Por último, el número de linfocitos B (CD79+) fue menor en las mastitis de tipo absceso encapsulado maduro y tipo sándwich incompleto respecto a las mastitis tipo absceso encapsulado inmaduro, roseta y mixta.



**Figura IV-11.** Medias mínimo cuadráticas de número de células en cada uno de los tipos de mastitis atendiendo a criterios histomorfológicos, marcadas mediante ICQ. Dentro de una variable hay diferencias significativas en el caso de no tener letras en común ( $p < 0,05$ ).

**AEM:** absceso encapsulado maduro, **AEI:** absceso encapsulado inmaduro, **ANE:** absceso no encapsulado, **ROS:** roseta, **SINC:** sándwich incompleto, **SC:** sándwich completo, **SINF:** sándwich infiltrado, **MIX:** mixta.

#### 4.2.4.- Mastitis experimental

Después de determinar los diferentes tipos histomorfológicos se planteó realizar una infección experimental en mama para caracterizar mejor la respuesta inmune del hospedador durante las fases iniciales de la mastitis, eliminando las variables de tiempo y vía de infección.

Se utilizaron un total de 34 conejas, infectándose al menos tres conejas con cada cepa. Para realizar la infección se emplearon 9 genotipos: A1/II1/δ, A1/III1/δ, B1/I1/α, B1/IV1/α, B1/IV2/α, B2/IV1/δ, C1/I1/β, C1/II2/γ y D1/IV1/α. Todos ellos eran cepas procedentes de aislados de mastitis excepto el genotipo B2/IV1/δ que procedía de una pododermatitis. El tipo de mastitis y el número de conejas inoculadas con cada cepa se detalla en la tabla IV2-3.

**Tabla IV2-3.** Cepas empleadas en la mastitis experimental.

Genotipo	Procedencia	Clasificación histomorfológica	Número conejas inoculadas
A1/II1/δ	Mastitis	Sándwich completo	7
A1/III1/δ	Mastitis	Absceso encaps. maduro	3
B1/I1/α	Mastitis	No determinado	3
B1/IV1/α	Mastitis	Mixta (S/R)	3
B1/IV2/α	Mastitis	Absceso encaps. maduro	3
B2/IV1/δ	Pododermatitis	-	4
C1/I1/β	Mastitis	No determinado	4
C1/II2/γ	Mastitis	<sup>a</sup> Otros	4
D1/IV1/α	Mastitis	Absceso encaps. maduro	3

<sup>a</sup>**Otros:** mastitis no englobada en ninguno de los tipos descritos.

Todas las cepas empleadas en la infección fueron positivas a los siguientes genes de virulencia: *coa*, *spa*, *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *sdrC*, *sdrD*, *map/eap*, *fib*, *ebpS*, *hlg* y *sspA*; mientras que resultaron negativas a los siguientes genes analizados: *bap*, *tst*, *eta*, *etb*, *lukS*, *F-PV*, *sea*, *seb*, *sec*, *see*, *selp* y *selq*. Por su parte los genes que mostraban variabilidad entre las cepas eran (tabla IV2-4 ): *bbp*, *cna*, *sdrE*, *fnbB*, *sed*, *selj*, *seh*, *sell*, *selk*, *egc*, *selu*, *cap* y el tipo de *agr*.

**Tabla IV2-4.** Relación de genes de virulencia que varían entre las muestras empleadas en la infección.

Genotipo	Genes de virulencia											
	<i>bbp</i>	<i>cna</i>	<i>sdrE</i>	<i>fnbB</i>	<i>sed/selj</i>	<i>seh</i>	<i>sell</i>	<i>selk</i>	<i>egc</i>	<i>selu</i>	<i>cap</i>	<i>agr</i>
A1/II1/δ	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	8	IV
A1/III1/δ	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	8	IV
B1/I1/α	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	8	III
B1/IV1/α	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	8	III
B1/IV2/α	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	8	III
B2/IV1/δ	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	8	I
C1/I1/β	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	8	III
C1/II2/γ	+	+	+	-	-	+	+		-	-	8	III
D1/IV1/α	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	5	I

El cultivo de la leche previo a la inoculación demostró la ausencia de infecciones previas.

Tras la infección se valoró macroscópica y microscópicamente el estado de cada mama a las 24 y 48 horas, clasificando las lesiones en graves, moderadas y leves, atendiendo al grado de inflamación. Se observaron diferencias entre conejas infectadas con cepas diferentes y entre conejas infectadas con la misma cepa (tabla IV2-5).

Cuatro de las cepas produjeron lesiones graves al menos en dos conejas: A1/II1/δ, B2/IV1/δ, C1/II2/γ y D1/IV1/α. En general, las conejas infectadas con estas cepas presentaron fiebre y signos de inflamación (figura VII-23). Presentaron rubor, aumento de la temperatura y vasos sanguíneos subcutáneos hiperémicos y muy dilatados. Algunas de las mamas presentaban nódulos, de 2 a 8 centímetros, con la piel oscurecida. En ocasiones, se observó salida de pus y sangre por el pezón. En el examen *post-mortem* estas mamas presentaban una gran hiperemia y necrosis del tejido mamario (figura VII-24). Podría esperarse que el genotipo D1/IV1/α, que era el que menos factores de virulencia presentaba (carecía de enterotoxinas y de las adhesinas *bbp*, *cna*, y *sdrE*), produjese lesiones de menor virulencia. Sin embargo, produjo lesiones consideradas como graves.

Por otra parte, no todas las conejas infectadas con estas cepas mostraban lesiones graves. De las 7 conejas infectadas con la cepa A1/II1/δ, sólo 4 presentaron lesiones graves, dos lesiones moderadas y una lesiones leves, con un ligero aumento de consistencia. De las 4 conejas infectadas con las cepas B2/IV1/δ y C1/II2/γ, la mitad presentaban lesiones graves y otras dos conejas, lesiones entre moderadas y leves; mientras que dos de las conejas infectadas con la cepa

D1/IV1/α presentaron lesiones graves en sus mamas y una tercera coneja lesiones muy leves.

Microscópicamente también se observó variabilidad. Las lesiones guardaron relación con su aspecto macroscópico. En las lesiones más graves se observó un gran número de heterófilos en luces alveolares e intersticio (figura VII-25), focos de necrosis, pérdida de la estructura alveolar, con fenómenos vasculares, sobre todo hiperemia, hemorragia y, en ocasiones trombosis (figura VII-26). Los senos del pezón y el propio pezón se encontraron repletos de material purulento, en algunos casos con necrosis. En todas las mastitis con lesiones graves se detectaron bacterias Gram-positivas. En aquellas mastitis donde las lesiones macroscópicas fueron moderadas se observaron heterófilos en las luces alveolares e hiperemia leve, no detectándose bacterias en ninguna de las mastitis con lesiones leves. En algunas de las mamas control, adyacentes a mamas con lesiones graves se observaron heterófilos en luces alveolares.

Las cepas A1/III1/δ y B1/I1/α produjeron lesiones menos graves que las cuatro anteriores, encontrándose conejas con mastitis moderadas y conejas con mastitis leves. Macroscópicamente, se observaron menos fenómenos vasculares, sobre todo se apreciaba un aumento de la consistencia y el volumen de la mama, sin formarse nódulos propiamente dichos. Ninguna de las conejas presentó fiebre. Estas alteraciones macroscópicas se reflejaron en un aumento del número de heterófilos, sobre todo próximos al pezón, con algún pequeño foco de hiperemia y necrosis al observarse microscópicamente. En ninguna de las mastitis se observaron bacterias. Ambas cepas produjeron este tipo de lesiones en una de tres conejas infectadas, no observándose lesiones en el resto de las conejas.

El resto de las cepas, B1/IV1/α, B1/IV2/α y C1/I1/β, no produjeron ninguna alteración macroscópica, o fueron leves, con un ligero aumento de consistencia comparándola con las mamas control. Al estudiarlas microscópicamente sólo se observaron heterófilos como signos de inflamación y leves fenómenos vasculares, como zonas de hiperemia y hemorragia aisladas. Algunas conejas infectadas con estas cepas no presentaron ninguna alteración microscópica. No se observaron bacterias en ninguno de los casos.

Tabla IV2-5. Valoración de la infección experimental con aislados naturales de *S. aureus*

Genotipo	Coneja	<sup>a</sup> Lesiones		<sup>b</sup> Bacterias	<sup>c</sup> T <sup>a</sup> (°C)
		Macroscópicas	Microscópicas		
A1/II1/δ	1	++++	+++	+++	40,8
	2	0/+	++	+	40,6
	3	++++	+++	+++	40
	4	++++	+++	+++	40,3
	5	++/+++	++	++	40,8
	6	++/+++	++	+	39,8
	7	+++	+++	++	38,5
A1/III1/δ	8	0/+	0/+	-	39
	9	+/>+	+	-	39,1
	10	0	0/+	-	38,9
B1/I1/α	11	0	0/+	-	39,2
	12	0/+	0/+	-	39,1
	13	++	+	-	38,6
B1/IV1/α	14	0/+	+	-	39
	15	0/+	0/+	-	39,2
	16	0	0	-	38,7
B1/IV2/α	17	+	0/+	-	39,5
	18	0	0/+	-	38,8
	19	0	0/+	-	38,6
B2/IV1/δ	20	++	+	-	39,7
	21	++	+	-	39,5
	22	+++	++	+	40,4
	23	++++	+++	++	40,3
C1/I1/β	24	0	0/+	-	39,3
	25	0	+	-	39,8
	26	+	+	-	38,8
	27	0	0/+	-	39,3
C1/II2/γ	28	+	+	-	38,6
	29	+++	++	++	41,1
	30	0/+	0	-	39,2
	31	++++	++	+	40,1
D1/IV1/α	32	0	0/+	-	38,8
	33	+++	+++	++	40,7
	34	++++	++++	+++	40,8

<sup>a</sup>**Lesiones:** 0: sin lesiones, +: leves, ++: moderadas, +++: graves, ++++: muy graves.

<sup>b</sup>**Bacterias:** estimación de la presencia de bacterias en las lesiones: -: sin bacterias, +: escasas, ++: moderadas, +++: abundantes.

<sup>c</sup>**T<sup>a</sup>:** temperatura más alta en la medición a las 24 y 48 horas.



**IV.3.- Secuenciación de una cepa clínica de *S. aureus* aislada de conejo.**



### IV.3.- Secuenciación de una cepa clínica de *S. aureus* aislada de conejo

El genotipo A1/II1/δ se identificó en 306 de los 451 aislados de conejo procedentes de lesiones, es decir, en el 67,8% de los aislados, siendo el más ampliamente distribuido. Además, fue aislado en mayor o en menor medida de todas las lesiones analizadas en el presente estudio, así como de aislados nasales y de aislados cunícolas de otros países europeos, mientras que no fue determinado en ninguno de los aislados pertenecientes a otras especies determinados mediante el genotipado de los genes *coa/spa/clfB*.

Por todo ello, y a fin de profundizar en el estudio de la estafilococia cunícola, se secuenció completamente un aislado perteneciente al genotipo A1/II1/δ, procedente de mastitis, para averiguar qué podía caracterizar a este genotipo para encontrarse tan ampliamente distribuido entre la población cunícola.

Después de la pirosecuenciación se obtuvieron 58 “contigs”, de los cuales 8 eran secuencias de menos de 600 pb. El resto variaban desde 1.895 pb hasta 256.024 pb, con una media de 62.805 pb. Los “contigs” fueron ordenados respecto a los genomas de *S. aureus* secuenciados en las bases de datos, lo que supuso un total de 2.700.602 pb (97,7%) del genoma completo del aislado. El resto del genoma correspondía a los “gaps” entre “contigs”, constituyendo 63.679 pb (2,3%) que se obtuvieron mediante amplificación por PCR de las secuencias flanqueantes y secuenciación clásica. Curiosamente, de los 43 “gaps” secuenciados, 21 correspondían a posibles transposasas. En concreto, 12 secuencias correspondían a una transposasa para el elemento de inserción *IS1181*, descrita en la mayoría de cepas de *S. aureus*, y 9 a una posible transposasa, homóloga en un 99% a la transposasa *IS3/IS911* de la cepa MRSA252. Otros 5 fragmentos tuvieron homología con secuencias altamente repetidas entre los genomas de *S. aureus*, como son las secuencias de RNA ribosomal.

La cepa se denominó IVIA-1 y su genoma fue de 2.764.281 pb.

#### 4.3.1.- Análisis *in silico*

Se realizó un análisis *in silico* del genoma completo de IVIA-1, comparándolo con genomas secuenciados de *S. aureus*. El objetivo era localizar regiones únicas o sin homología a otros *S. aureus*, es decir, regiones específicas.

Se localizaron multitud de genes ortólogos que tenían homología con proteínas de especies diversas. Lo más característico fue un sistema de modificación-restricción y un bacteriófago no descritos previamente en otros *S. aureus*.

El sistema de modificación-restricción tuvo homología con el sistema de restricción-modificación tipo I de *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius*.

Por su parte, se localizaron una serie de ORF con homología a proteínas relacionadas con fagos de diversas especies, sugiriendo la existencia de un fago no descrito con anterioridad en ningún *S. aureus* (tabla IV3-1). Además, en la secuencia de IVIA-1 se localizó otro fago, en la localización 316.872 pb-361.010 pb. En este caso todas sus ORF codificaban para proteínas homólogas a proteínas fágicas de *S. aureus*, compartiendo sitio de integración con el fago phiNM4 de la cepa Newman y el fago L54a de la cepa Col, entre otros (tabla IV3-2).

Ante la posibilidad de que este elemento genético móvil, no descrito previamente en *S. aureus*, pudiera conferir cierta especificidad a la cepa se procedió a su análisis, que se muestra en el siguiente apartado.

**Tabla IV3-1.** Proteínas homólogas relacionadas con fagos de diversas especies.

Posición genoma	ORF	Proteína homóloga	Organismo
1301692-1302816	1	phage integrase	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>
1307995-1308606	14	SWF/SNF family helicase	<i>Bacillus thuringiensis serovar israelensis</i>
1309330-1311153	17	phage NTP-binding protein	<i>Clostridium thermocellum</i>
1312190-1313905	19	DNA polymerase	<i>Bacillus thuringiensis serovar israelensis</i>
1315880-1317055	23	DNA primase	<i>Bacillus thuringiensis serovar israelensis</i>
1320224-1321588	27	phage terminase	<i>Listeria monocytogenes</i>
1321607-1322740	28	phage portal protein, HK97	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>
1323456-1324622	30	major capsid protein	<i>Bacillus thuringiensis serovar israelensis</i>
1326027-1326716	35	major tail protein, phi 13 family	<i>Enterococcus faecalis</i>
1327427-1331606	37	tape measure protein	<i>Lactobacillus casei bacteriophage A2</i>
1332366-1334936	39	prophage LambdaSa2, PblB, putative	<i>Streptococcus agalactiae</i>

**Tabla IV3-2.** Principales proteínas homólogas relacionadas con fagos descritos en *S. aureus*.

Posición genoma	ORF	Proteína homóloga (cepa <i>S. aureus</i> )
317340-318189	1	prophage integrase L54a (Col)
319472-319811	5	ATP-dependent helicase phi12 (N315)
319819-320755	6	cl-like represor phi12 (N315)
320767-321478	7	putative phage transcriptional regulador (USA300)
322473-323223	10	anti represor phiN315 (N315)
336440-337010	37	dUTPase ( <i>S. aureus</i> phage phi12)
337400-337562	39	<i>rinB</i> ( <i>S. aureus</i> phage 11)
338831-339182	42	phage endonuclease ( <i>S. aureus</i> phage phi PVL108)
339312-339780	43	phage terminase small subunit ( <i>S. aureus</i> phage PVL)
339782-341474	44	terminase large subunit ( <i>S. aureus</i> phage phiPV83)
341690-342968	45	portal protein ( <i>S. aureus</i> phage phi13)
342933-343527	46	putative prohead protease (MSSA476)
343617-344850	47	capsid protein (MW2)
345053-345386	48	DNA packaging protein ( <i>S. aureus</i> phage phi PVL108)
346466-347417	52	major tail protein (MW2)
348168-352815	54	tail length tape measure protein (MW2)
354323-358106	56	phage minor structural protein (NCTC8325)
359742-360495	60	amidase ( <i>S. aureus</i> phage phi13)

#### 4.3.2.- Estudio del $\Phi$ IVIA-1

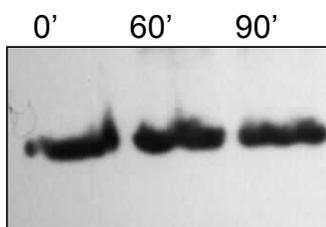
Este fago, llamado  $\Phi$ IVIA-1 se integraba entre el gen *glnA*, una glutamina sintetasa muy conservada en *S. aureus*, y un gen con una homología del 82% a la proteína SERP0879 de *Staphylococcus epidermidis*. Mediante análisis *in silico* se encontraron dos secuencias de 38 pb (acagaactcaagtatctgaatgggaaagagatcagtac) repetidas que se atribuyeron como *att<sub>L</sub>* (repetición izquierda) y *att<sub>R</sub>* (repetición derecha). La secuencia que delimitaban comprendía a 39.338 pb, contabilizándose 47 ORF de más de 50 aa.

Posteriormente se estudió la funcionalidad del fago, analizando la capacidad de escisión, replicación y movilización que poseía.

Al inducir la respuesta SOS en la cepa IVIA-1 mediante mitomicina C y, por tanto, inducir la replicación de los fagos en estado lisogénico, se observó lisis de la bacteria, confirmando la funcionalidad de al menos uno de los dos fagos descritos en el genoma de esta cepa. La infección de la cepa RN4220, derivada de la cepa NCTC8325, curada de los fagos  $\phi$ 11,  $\phi$ 12 y  $\phi$ 13 y defectiva en el sistema de

modificación–restricción (Novick, 1967), con el lisado obtenido de la inducción de la cepa IVIA-1 dio como resultado la producción de calvas de infección, mostrando por tanto la capacidad de infección de al menos uno de los fagos. Asimismo, se valoró la capacidad de escisión mediante amplificación por PCR. Se emplearon los cebadores phiDL190-208m y phiDL190-209c, que amplificaban a 231 pb y 224 pb, del *att<sub>L</sub>* y *att<sub>R</sub>*, respectivamente. No se obtuvo producto de PCR, lo que indicaba que el  $\Phi$ IVIA-1 no era capaz de escindir.

Además, se analizó específicamente la replicación del  $\Phi$ IVIA-1 tras la inducción con mitomicina C. Para ello se diseñó una sonda específica de la integrasa del fago mediante los cebadores phiDL190-1m y phiDL190-2c, que amplificaban una región de 633 pb, y se realizó un Southern blot con muestras tomadas a distintos intervalos de tiempo tras las inducción de la respuesta SOS. Si el fago replicase, aumentaría la cantidad de ADN del fago a lo largo del tiempo, sin embargo como resultado no se obtuvo un incremento de la intensidad de la banda, indicando que el fago no replicaba, al menos tras la inducción de la respuesta SOS (figura IV-12), sugiriendo que el  $\Phi$ IVIA-1 no es móvil.



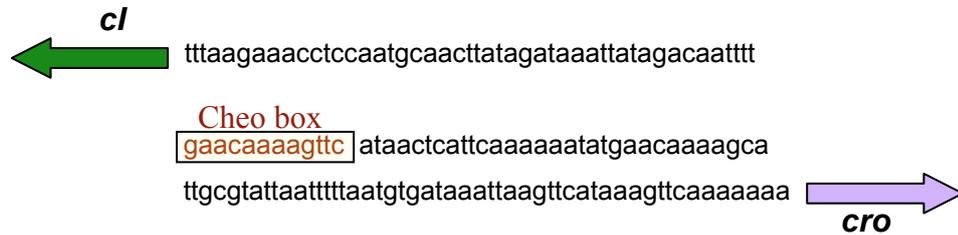
**Figura IV-12.** Southern blot analizando la capacidad de replicación del fago tras la inducción de la respuesta SOS a tiempo cero, 60 y 90 minutos.

Finalmente, se introdujo un gen marcador que confería resistencia a tetraciclina (*tetM*) entre 2 ORF divergentes del fago en estudio, concretamente entre la ORF20, una proteína hipotética con homología a la proteína SH1788 de *Staphylococcus haemolyticus*, y la ORF21, una proteína hipotética con homología a una proteína de *Plasmodium spp.* Mediante este marcador se podían diferenciar entre sí los dos fagos de IVIA-1. Se obtuvo un lisado de una infección en placa de la cepa IVIA-1 con resistencia a tetraciclina (JP 563), y este lisado se empleó para hacer una transducción a la cepa RN4220. Sin embargo, no se obtuvo ningún transductante de la cepa RN4220 con resistencia a tetraciclina, lo que confirmó la falta de movilidad del fago.

La falta de escisión, replicación y movilización indicaban que el  $\Phi$ IVIA-1 era un fago defectivo, es decir, sin capacidad de movilización. Este hecho podría estar relacionado con la capacidad de inducción del fago, por ello se estudió una posible regulación del fago.

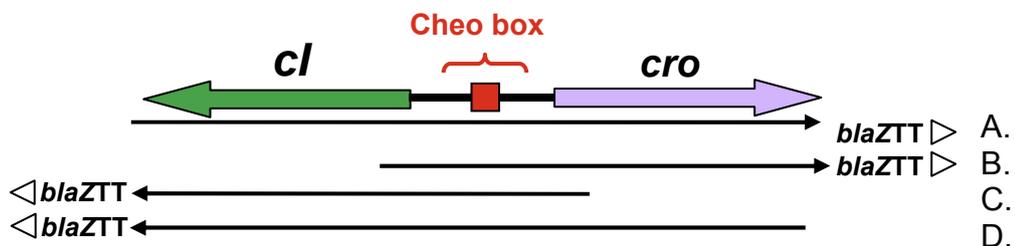
Mediante el análisis *in silico* de las ORFs de la secuencia fágica se comprobó que la ORF4 codificaba para una proteína de tipo represor CI (76% de homología con represor tipo CI de  $\phi$ iMRS252), mientras que la ORF5 lo hacía para una proteína de tipo antirrepresor Cro (81% de homología con represor tipo Cro de  $\phi$ iMRS252), siendo secuencias divergentes (figura IV-13). Estas proteínas han sido muy estudiadas como modelo de regulación del ciclo lítico en el fago  $\lambda$  de *Escherichia coli*. Además de su importancia en el mantenimiento de la viabilidad celular, la respuesta SOS también está implicada en la activación de bacteriófagos presentes en forma lisogénica. En condiciones normales, el fago  $\lambda$  se encuentra en ciclo lisogénico por la acción del represor CI. Cuando se produce un daño en el ADN de la bacteria o se bloquea su replicación, se activa la denominada respuesta SOS que tiene como finalidad reparar el ADN dañado. Una de las consecuencias de la inducción de la respuesta SOS es la activación de la proteína RecA, que adquiere actividad co-proteasa, promoviendo la autodigestión del represor CI del fago  $\lambda$  en un punto muy concreto, entre una alanina y una glicina, liberándose de esta forma la represión ejercida sobre los genes implicados en el ciclo lítico del fago (Little, 2007).

Sin embargo, en el caso del  $\Phi$ IVIA-1, la proteína tipo CI no tenía una secuencia Ala-Gly para ser reconocida por la proteína RecA, mientras que en la secuencia intergénica había una secuencia de tipo Cheo box (GAACnnnnGTTC), por tanto una zona de posible unión del represor LexA (Cheo *et al.*, 1991). La proteína LexA reprime todos los genes del sistema SOS, incluyendo *recA*, en ausencia de inducción (Little, 2007; Butala *et al.*, 2009) mediante la unión a las secuencias Cheo box. Cuando LexA es degradado por RecA, reconociendo una secuencia Ala-Gly (igual que el represor CI), cesa la represión del sistema SOS, comenzando la expresión de genes implicados en la reparación del ADN.



**Figura IV-13.** Representación esquemática de los genes divergentes con homología a *cl* y *cro* y de la Cheo box en la secuencia intergénica.

Por tanto, parecía que en el ΦVIA-1 la proteína LexA podía reprimir la activación del fago junto con el represor Cl. Para estudiar la función de los genes *cl* y *cro* y la posible intervención de LexA en la regulación del fago utilizamos el plásmido de fusión transcripcional pCN41. Este plásmido es capaz de medir la expresión de un gen indirectamente a través de la actividad β-lactamasa, mediante la fusión transcripcional entre el promotor del gen en estudio y el gen *blaZ*. De esta manera se midió la expresión de *cro* en presencia y ausencia de Cl, así como la expresión de *cl* en presencia y ausencia de Cro (figura IV-14).

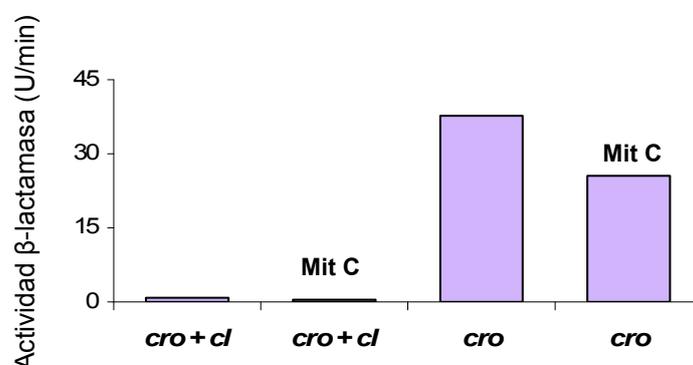


**Figura IV-14.** Representación esquemática de las construcciones realizadas en el plásmido pCN41. A. Medida de la expresión de *cro* en presencia de Cl (pJP683). B. Medida de la expresión de *cro* en ausencia de Cl (pJP682). C. Medida de la expresión de *cl* en ausencia de Cro (pJP681). D. Medida de la expresión de *cl* en presencia de Cro (pJP680).

La primera hipótesis fue si Cl actuaba reprimiendo a Cro. Para ello se clonaron los genes *cl* y *cro* en el pCN41, midiendo la expresión del promotor de *cro* acoplado al gen *blaZ*, generándose el plásmido pJP683. De igual forma, se clonó sólo el gen *cro* junto con su promotor en el plásmido pCN41 para valorar su expresión en ausencia de Cl, su hipotético represor, generándose el plásmido pJP682. Estos plásmidos se transformaron en la cepa RN4220 generándose las

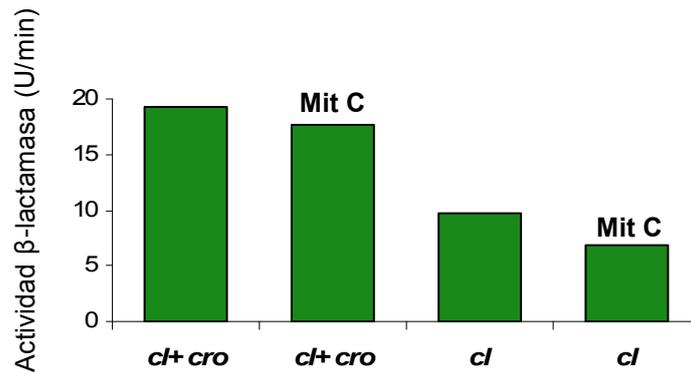
cepas JP4240 y JP4239. Para valorar el papel de LexA se valoró también la expresión de *cro* induciendo la respuesta SOS con mitomicina C. La inducción de la respuesta SOS provocaría la activación de RecA y por tanto la autodegradación de LexA.

Como se observa en la figura IV-15, hubo mayor expresión de *cro* en ausencia de CI, tanto en condiciones normales como durante la respuesta SOS, con LexA degradado. En presencia de CI, los niveles de expresión de *cro* fueron prácticamente cero, por lo que se podía pensar en una represión de CI sobre Cro, siendo esta represión independiente de la respuesta SOS.



**Figura IV-15.** Actividad β-lactamasa relacionada con el nivel de expresión de *cro* en presencia y en ausencia de CI. CI actúa reprimiendo la expresión de *cro*.

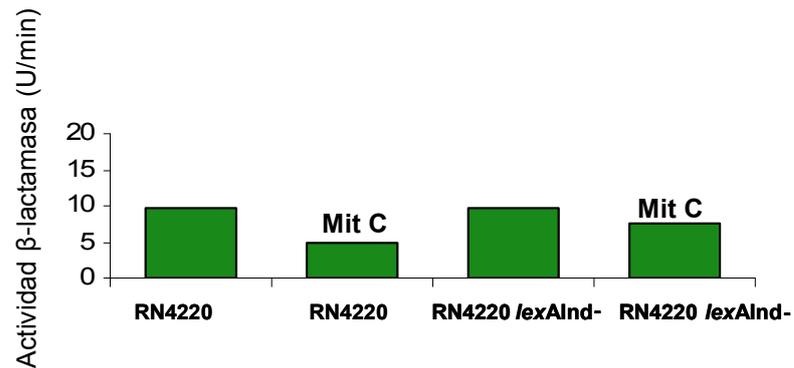
Se analizó también la expresión de *cl* en presencia y ausencia de Cro. Para ello se clonó, en el plásmido pCN41, el gen *cl* y su región promotora, generándose el plásmido pJP681; y el gen *cl* y su región promotora junto con el gen *cro*, generándose el plásmido pJP680. Estos plásmidos se transformaron en la cepa RN4220, generándose las cepas JP4238 y JP4237, respectivamente. Al analizar la actividad β-lactamasa se observó que los niveles de expresión de *cl* eran mayores, aproximadamente el doble, en presencia de la proteína Cro. Esto sugería una expresión de *cl* en función de los niveles de Cro, aunque en ausencia de Cro no había una inhibición de CI (figura IV-16).



**Figura IV-16.** Actividad  $\beta$ -lactamasa relacionada con el nivel de expresión de *cl* en presencia y en ausencia de Cro. Los niveles de *cl* dependen de la cantidad de Cro.

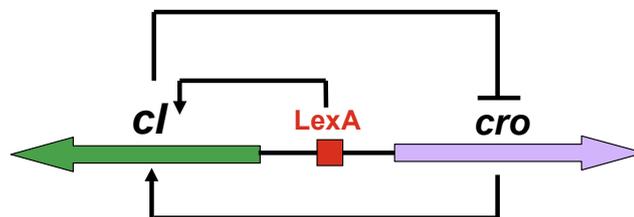
Además, analizando los niveles de expresión de *cro* y *cl* después de la inducción de la respuesta SOS con mitomicina C, en las figuras IV-11 y IV-12, se observó una disminución en la expresión en todos los casos, más acusada en la expresión de *cl* en ausencia de Cro. Para analizar el papel de la proteína LexA en la regulación de estas dos proteínas, se transformó el plásmido pJP680 en la cepa RN4220 *lexA* Ind<sup>-</sup>, generándose la cepa JP4502. La sustitución de un glutamato por una glicina en el sitio de corte reconocido por RecA, Ala-Gly de la proteína LexA, dio como resultado un represor que no puede ser cortado y que es menos sensible a la inducción de SOS ya que se mantiene la represión del sistema con un LexA no degradable (Maiques *et al.*, 2006). De esta manera, si LexA está regulando los niveles de Cl, tras la inducción de la respuesta SOS los niveles de *cl* deberían ser similares a los observados en condiciones normales.

Al inducir la respuesta SOS con mitomicina C y degradar LexA se observó una disminución en la actividad  $\beta$ -lactamasa, por tanto de la expresión de *cl*, mientras que en el mutante en LexA no degradable (RN4220 *lexA* Ind<sup>-</sup>) los niveles de expresión se recuperaron, aunque no a niveles basales (figura IV-17).



**Figura IV-17.** Actividad β-lactamasa relacionada con el nivel de expresión de *cl* en ausencia de Cro. Los niveles de expresión de *cl* se recuperan en una cepa con LexA no degradable tras la inducción de la respuesta SOS.

Por tanto, estos resultados parecían indicar que la represión que ejerce CI sobre Cro es independiente de la respuesta SOS, sin embargo sí parecían indicar que los niveles de CI dependen de la cantidad de Cro y de la unión de LexA, necesiéndose más estudios para conocer el posible papel de LexA (figura IV-18).



**Figura IV-18.** Modelo de regulación del ΦIVIA1. CI actúa como un represor de Cro y, a su vez, sus niveles dependen de la unión de LexA y de los niveles de Cro.

#### 4.3.3.- Comparativa de la cepa IVIA-1 con otras cepas ST121

En trabajos anteriores se ha descrito el predominio de un clon de *S. aureus* aislado de conejos, perteneciente a ST121 y ampliamente distribuido por Europa (Vancraeynest *et al.*, 2006a). Para comprobar si el genotipo A1/II1/δ, ampliamente distribuido en este estudio, podía corresponderse con este clon se realizó MLST de varias cepas pertenecientes a este genotipo. Así, todas las cepas con genotipo A1/II1/δ analizadas correspondían a ST121, mientras que otras cepas de genotipos B1/IV2/α, C1/II1/β y C1/II2/γ dieron lugar a otras ST (tabla IV3-3).

**Tabla IV3-3.** Relación entre genotipo y secuencia tipo (ST) de aislados cunícolas de *S. aureus*.

Cepa	Genotipo <sup>a</sup>	ST <sup>b</sup>	Procedencia
IVIA-1	A1/II1/δ	121	Este estudio
CO196	A1/II1/δ	121	Este estudio
CO324	A1/II1/δ	121	Este estudio
CO3	C1/II2/γ	DLV1	Este estudio
CO9	B1/IV2/α	SLV96	Este estudio
CO14	C1/II1/β	DLV1	Este estudio
98/2064	A1/II1/δ	121	K. Hermans
KH454	A1/II1/δ	121	K. Hermans
DV3	A1/II1/δ	121	K. Hermans
DV18	A1/II1/δ	121	K. Hermans
KH119	A1/II1/δ	121	K. Hermans

<sup>a</sup>Genotipo: tipado basado en los marcadores genéticos *coa/spa/clfB*. <sup>b</sup>ST: secuencia tipo, resultado del MLST. SLV: se diferencia en un locus, DLV: se diferencia en dos locus.

Este clon de cepas pertenecientes a ST121 se ha descrito previamente en aislados humanos, relacionados con cepas sensibles a meticilina y ampliamente distribuidas por Europa (Day *et al.*, 2001; Enright *et al.*, 2002; Aires de Sousa *et al.*, 2005; Layer *et al.*, 2006).

Para comprobar si el ΦIVIA-1, que parecía ser específico de la cepa IVIA-1, se encontraba también en otras cepas ST121 se seleccionaron 10 cepas cunícolas con genotipo A1/II1/δ y 5 cepas humanas ST121. El fago se detectó mediante PCR empleando los oligonucleótidos phiDL190-5mE // DL190-136mE, obteniéndose un producto de 11,291 kb. Posteriormente, se realizó un análisis de RFLP del producto de PCR mediante las enzimas de restricción *HindIII* y con *CfoI*.

Por un lado, todas las cepas cunícolas con genotipo A1/II1/δ poseían el ΦIVIA-1, así como los aislados humanos pertenecientes a ST121. Por tanto, el fago encontrado en la cepa IVIA-1 no era específico de aislados cunícolas, se encontraba también en aislados humanos pertenecientes a ST121, lo que estaba en concordancia con la idea de que el ΦIVIA-1 no es móvil. Por otra parte, al realizar el genotipado basado en los genes *coa/spa/clfB* en las cepas humanas se obtuvieron nuevos genotipos no descritos anteriormente en cepas cunícolas. De una de las cepas se obtuvo el mismo genotipo, mientras que las otras 4 variaban

en el patrón del gen *clfB* y una de ellas además en el patrón del gen *coa* (tabla IV-3-4).

Como se ha comentado anteriormente, algunos elementos genéticos móviles constituyen las principales diferencias entre cepas aisladas de humanos respecto a las aisladas de animales (Sung *et al.*, 2008). Una vez descartado que el  $\Phi$ VIA-1 otorgase especificidad a las cepas aisladas de conejos se buscaron otros elementos genéticos móviles que pudiesen discernir entre las cepas ST121 de humanos y conejos. Debido a que las cepas ST121 humanas se han descrito en infecciones relacionadas con la piel (Scheffold *et al.*, 2007; Wiese-Posselt *et al.*, 2007) se trató de identificar factores de virulencia codificados en elementos genéticos móviles y relacionados con infecciones cutáneas. Un alto porcentaje de bacterias aisladas de lesiones en piel son capaces de producir las toxinas exfoliativas A y/o B (Eta y/o Etb) o la exotoxina Pantón-Valentine leukocidin (PVL) (Mertz *et al.*, 2007). Estas toxinas están codificadas en elementos genéticos móviles: Eta está codificada por el gen *eta* en profagos y SaPIs, el gen *etb* codifica para la proteína Etb, localizándose en un plásmido, y PVL está codificada por dos genes, *lukF-PV* y *lukS-PV*, que se localizan en profagos (Feng *et al.*, 2008). Como se ha comentado en el apartado de distribución de genes de virulencia entre aislados de *S. aureus* (apartado 4.1.6), los aislados cunícolas carecían de los genes *eta* y *etb* y sólo se detectó *lukS,F-PV* en dos aislados que no pertenecían al genotipo A1/II1/δ. Sin embargo, todos los aislados humanos con ST121 eran positivos al menos a uno de los tres genes (tabla IV3-4). Por lo tanto, las cepas cunícolas pertenecientes a ST121 carecían de elementos genéticos móviles que codificasen para *eta*, *etb* y *lukS,F-PV*, respecto a aislados humanos pertenecientes al mismo linaje (misma ST).

**Tabla IV3-4.** Determinación de la presencia del fago  $\Phi$ IVIA-1 y los genes *eta*, *etb* y *lukS,F-PV* en aislados pertenecientes a ST121.

Cepa	Genotipo <sup>a</sup>	ST <sup>b</sup>	Aislado	$\Phi$ IVIA-1	<i>eta</i>	<i>etb</i>	<i>lukS,F-PV</i>	Procedencia
IVIA-1	A1/II1/ $\delta$	121	Conejo	+	-	-	-	Este estudio
CO37	A1/II1/ $\delta$	ND	Conejo	+	-	-	-	Este estudio
CO40	A1/II1/ $\delta$	ND	Conejo	+	-	-	-	Este estudio
CO196	A1/II1/ $\delta$	121	Conejo	+	-	-	-	Este estudio
CO324	A1/II1/ $\delta$	121	Conejo	+	-	-	-	Este estudio
98/2064	A1/II1/ $\delta$	121	Conejo	+	-	-	-	K. Hermans
KH454	A1/II1/ $\delta$	121	Conejo	+	-	-	-	K. Hermans
DV3	A1/II1/ $\delta$	121	Conejo	+	-	-	-	K. Hermans
DV18	A1/II1/ $\delta$	121	Conejo	+	-	-	-	K. Hermans
HT0733	D4/II1/ $\gamma$	121	Humano	+	-	+	-	R. Fitzgerald
E269	A1/II1/ $\delta$	121	Humano	+	+	-	-	R. Fitzgerald
2020	A1/II1/ $\beta$	121	Humano	+	+	+	-	R. Fitzgerald
CV15	A1/II1/ <i>i</i>	121	Humano	+	-	-	+	R. Fitzgerald
HT1215	A1/II1/ $\beta$	121	Humano	+	-	-	+	R. Fitzgerald

<sup>a</sup>**Genotipo:** tipado basado en los marcadores genéticos *coa/spa/clfB*. <sup>b</sup>**ST:** secuencia tipo, resultado del MLST.

## **V.-DISCUSIÓN**



## V.- DISCUSIÓN

### 5.1.- Caracterización genotípica de cepas de *S. aureus*

En el presente estudio se desarrolló un método genotípico capaz de caracterizar diferentes cepas de *S. aureus* procedentes de humanos y diversas especies animales. Las primeras caracterizaciones de *S. aureus* cunícolas se basaban en el fenotipo, por medio del biotipado y fagotipado (Devriese *et al.*, 1981; Okerman *et al.*, 1984). Cualquiera de los métodos destinados a la clasificación de cepas bacterianas debe ser capaz de discriminar entre todos los organismos pertenecientes a una especie. En el caso de *S. aureus*, el mayor inconveniente del fagotipado es la escasa reproducibilidad y el hecho de que no se puedan tipar todos los aislados (Bannerman *et al.*, 1995; Mehndiratta *et al.*, 2009). Así, Hermans *et al.* (1999) describen que algunas cepas de *S. aureus* no reaccionan con ninguno de los bacteriófagos empleados. Otro problema que presenta el fagotipado es que los bacteriófagos pueden transferirse horizontalmente entre cepas, sin que haya relación entre ambas (Lindsay y Holden, 2004). Así, una cepa que adquiere un determinado fago puede hacerse resistente a la infección durante el fagotipado, dando como resultado una cepa diferente.

Por otra parte, varios métodos de tipado basados en el ADN han sido desarrollados en las últimas décadas, utilizándose para ello diferentes marcadores genéticos (Tang *et al.*, 1997; van Belkum *et al.*, 2001). En este estudio, se demostró que el empleo de un genotipado basado en los marcadores genéticos *coa/spa/clfB* es capaz de diferenciar aislados clasificados en el mismo biotipo-fagotipo: CV-C mixto 3A/3C/55/71 y RAPD tipo "a". Otros trabajos más recientes también describen la capacidad de los métodos basados en el ADN para discriminar entre cepas indistinguibles mediante fagotipado (Mehndiratta *et al.*, 2009).

A la hora de buscar relaciones entre cepas se recomienda el empleo de más de un marcador genético (Tenover *et al.*, 1994; Shopsin *et al.*, 2000). Para conseguir un alto nivel de resolución genética se recomienda el empleo de los genes *spa* y *clfB*, ya que contienen secuencias con regiones de repetición variable y, además, codifican para proteínas de superficie que interactúan con el medio ambiente y pueden experimentar cambios como consecuencia de sufrir mayor presión selectiva. Por ello, presentan con mayor facilidad alteraciones en sus

secuencias (Foster y Hook, 1998). De esta manera, el tipado utilizando el gen *spa* se describe como uno de los mejores métodos, después del análisis con microarrays de ADN (Francois *et al.*, 2005). Sin embargo, el tipado mediante la combinación de los genes *spa* y *clfB* consigue un poder de discriminación del 99,5%, el cual es superior al tipado mediante el gen *spa*, con un poder del 97,3%, y al tipado con el gen *clfB*, con un poder de discriminación del 91%, acercándose al análisis mediante microarrays de genoma completo, con un poder del 100% (Koreen *et al.*, 2004; Koreen *et al.*, 2005). Además, el tipado mediante el gen *coa* sirve como complemento al tipado por *spa*, aumentando su valor (Shopsin *et al.*, 2000). La combinación de estos marcadores genéticos puede emplearse eficazmente en brotes estafilocócicos o durante estudios a largo plazo (Shopsin *et al.*, 1999; Koreen *et al.*, 2004), siendo, el poder discriminatorio, virtualmente similar a la detección de mutaciones a lo largo del genoma mediante otras técnicas, como PFGE o el análisis del genoma completo mediante microarrays (Koreen *et al.*, 2005).

En este trabajo se demostró que el uso del tipado por los genes *coa/spa/clfB* sigue los cinco criterios marcados por Maslow *et al.* (1993): es un método capaz de tipar, es decir, no hay muestras con resultados ambiguos o sin resultados; es reproducible, una misma muestra siempre va a dar el mismo resultado; tiene poder de discriminación, ya que diferencia entre genotipos de *S. aureus*, tanto en estudios epidemiológicos como en brotes; y es sencillo de realizar y de interpretar, además de rápido.

La incorporación de *clfB* como marcador genético para el incremento del poder de discriminación se demostró especialmente acertada en cuatro casos. Usando sólo los genes *coa* y *spa* se diferenciaron 4 genotipos, A1/II1, B1/IV1, B1/IV2 y C1/I1; mientras que con la adición del gen *clfB*, los 4 genotipos se ampliaron a 15 tipos, A1/II1/δ, A1/II1/ε, A1/II1/η, A1/II1/κ, B1/IV1/α, B1/IV1/β, B1/IV1/δ, B1/IV1/θ, B1/IV2/α, B1/IV2/β, B1/IV2/δ, B1/IV2/θ, C1/I1/β, C1/I1/γ y C1/I1/θ.

Usando esta metodología se detectaron una gran variedad de genotipos, aunque fueron principalmente tres, A1/II1/δ, B1/IV1/α y C1/I1/β, los más distribuidos geográficamente, aislándose de 33, 5 y 7 explotaciones respectivamente. El genotipo A1/II1/δ fue, con diferencia, el detectado con mayor frecuencia, aislándose en el 73,3% de las granjas. Esta extensa distribución de un

número limitado de genotipos se ha descrito con anterioridad en humanos (Oliveira *et al.*, 2002), rumiantes (Fitzgerald *et al.*, 1997; Su *et al.*, 1999; Katsuda *et al.*, 2005; Mork *et al.*, 2005) y conejos (Hermans *et al.*, 2000). El genotipo más ampliamente distribuido, A1/II1/δ, pertenecía al linaje ST121, descrito previamente como un clon de *S. aureus* aislado de conejos y ampliamente distribuido por Europa (Vancraeynest *et al.*, 2006a).

Como se ha comentado previamente, *coa*, *spa* y *clfB* codifican para proteínas expuestas a la respuesta inmune del hospedador, por tanto, en estos loci es más probable que tengan lugar fenómenos de recombinación en “puntos calientes” para introducir diversidad genética y poder adaptarse a la presión de selección. La hipervariación en los genes de virulencia se debe a la competición con el sistema inmune del hospedador y/o al hecho de que no son críticos para el metabolismo (Morandi *et al.*, 2007). Esta hipervariabilidad de los genes empleados para el genotipado podría dificultar la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Sin embargo, mediante la caracterización de aislados de la misma explotación y del mismo animal a lo largo del tiempo, se comprobó que el genotipado mediante la combinación de los genes *coa/spa/clfB* sí era reproducible.

Por otra parte se observó que, aunque los genotipos están ampliamente distribuidos entre las regiones, las proporciones varían entre ellas; algunos genotipos tan sólo se localizaron en una cierta área geográfica y no en otras. Un ejemplo es el genotipo C1/II1/β que se confinó a 7 de las 10 granjas situadas en dos pueblos localizados en la Canal de Navarrés, una comarca con una alta densidad de animales. Recientemente, Mork *et al.* (2005) propusieron que las cepas más prevalentes son más contagiosas en la naturaleza, mientras que las cepas presentes de forma esporádica o heterogéneas genéticamente causan infecciones de forma más limitada. Los resultados de este estudio guardaron relación con dicha hipótesis.

El hecho de que varios genotipos de *S. aureus* se identificasen en conejos de las distintas comarcas estudiadas en este trabajo, algunas de ellas alejadas físicamente, sugiere que estos genotipos se diseminaron dentro de la población de conejos tiempo atrás, o que existen otros reservorios o vías de infección. Una hipótesis menos probable sería que estos genotipos más prevalentes, con un origen distinto, surgiesen a causa de una evolución independiente y convergente dentro de cada región (Miragaia *et al.*, 2002). En cualquier caso, los resultados

mostrados sugirieron, sobre todo, que un control efectivo de las infecciones de conejo provocadas por *S. aureus* debería incluir el empleo de estrategias destinadas a combatir directamente los clones que con mayor frecuencia producen enfermedad, principalmente el genotipo A1/II1/δ.

Los resultados mostrados en este trabajo están de acuerdo con estudios previos en los que se describe que un mismo conejo puede verse afectado por varios genotipos simultáneamente, y que en una misma granja puede aislarse más de un tipo de *S. aureus* (Hermans *et al.*, 1999; Hermans *et al.*, 2000). La alta densidad de granjas, así como el elevado intercambio de animales entre explotaciones podría explicar, no sólo la diseminación de la estafilococia, sino también la presencia simultánea de varios genotipos en una misma granja. Esta hipótesis se refuerza por el hecho de que en todas las granjas localizadas en zonas de alta densidad de conejos se aislaron diferentes genotipos de *S. aureus*, mientras el número de granjas con diferentes genotipos fue menor en zonas de menor densidad cunícola.

En rumiantes, ciertos tipos de *S. aureus* son más propensos a invadir localizaciones como el pezón o las ubres (Aarestrup *et al.*, 1994; Su *et al.*, 1999; Middleton y Fox, 2002). En este trabajo, por el contrario, no se obtuvieron relaciones entre los genotipos y las lesiones. Un genotipo podía causar diferentes lesiones y una misma lesión era causada por distintos genotipos. La mayoría de genotipos se aislaron de 1 a 6 lesiones, e incluso el genotipo A1/II1/δ se aisló de 10 tipos lesionales diferentes, lo que sugeriría que todos los genotipos son capaces de invadir diferentes zonas anatómicas del conejo o de desarrollar cualquiera de las lesiones detectadas en este estudio. A pesar de ello, hay pocos animales con más de una lesión, 54 conejas de un total de 373. De estas 54 conejas, en 44 se aisló un único genotipo de las lesiones. Este hecho podría ser debido a que las lesiones dependen de la vía de entrada del patógeno, conteniéndose la infección en el sitio primario de entrada, como consecuencia de la respuesta inmunológica, evitando así la colonización en otros órganos. Esta capacidad de diseminación sistémica podría depender más de factores relacionados con la respuesta inmune del hospedador, que con el arsenal genético de la bacteria (Lindsay *et al.*, 2006).

En los animales con más de una lesión, lo más frecuente fue aislar el mismo genotipo de las diferentes lesiones. Este hecho indica la importancia de una colonización previa por *S. aureus* para el desarrollo de estafilococia. Así, la

presencia de animales portadores de *S. aureus* podría predisponer a desarrollar infecciones estafilocócicas, como se ha descrito en humanos (von Eiff *et al.*, 2001; Perl *et al.*, 2002).

Los aislados de *S. aureus* difieren según la especie animal (Devriese, 1984), por ello el estudio se completó con el genotipado de aislados de *S. aureus* procedentes de diversas especies animales, con el objetivo de determinar si los patrones electroforéticos observados en los aislados cunícolas también eran comunes en aislados estafilocócicos de otras especies, o por el contrario, eran específicos de la especie cunícola.

Los 63 aislados de diversas especies dieron lugar a 42 patrones diferentes, comprobándose que no había correspondencia entre los genotipos cunícolas determinados y los generados en otras especies. Se ha descrito que cepas humanas de *S. aureus* permanecen con facilidad en las explotaciones cunícolas (Hermans *et al.*, 1999) y generalmente se acepta la colonización de animales con cepas humanas como consecuencia del contacto entre humanos y animales, en bovinos (Swartz *et al.*, 1985; Zadoks *et al.*, 2002), en porcinos (van Duijkeren *et al.*, 2008), en aves (Rodgers *et al.*, 1999) y en conejos (Devriese, 1984; Hermans *et al.*, 1999). Sin embargo, en este trabajo sólo se identificaron dos aislados humanos con genotipo D1/IV2/α, que se correspondían con genotipos cunícolas de baja prevalencia en este estudio.

En relación con el análisis MLST, una misma secuencia alélica podía ser discriminada en más de un genotipo mediante el análisis de los genes *coa/spa/clfB*, mostrando por tanto menor poder de discriminación. Estudios filogenéticos no relacionan el gen *coa* con los genes “housekeeping” empleados para MLST, indicando que *coa* puede ser transferida lateralmente entre linajes diferentes (Watanabe *et al.*, 2005). Sin embargo, en este estudio, un mismo genotipo siempre originó la misma secuencia alélica en todas las especies salvo en una ocasión, las cepas Col y Newman, con genotipo D1/IV2/α y ST250 y ST254, respectivamente.

Los resultados obtenidos del análisis MLST guardan relación con trabajos anteriores. El clon ST398, determinado en los genotipos F4/I10/λ, F4/I10/β, F4/I13/γ y F4/I6/γ, se ha descrito como un linaje de cepas capaz de aislarse de varias especies, siendo ampliamente identificado entre cerdos y humanos en contacto con ganado porcino (Huijsdens *et al.*, 2006; van Duijkeren *et al.*, 2008; Springer *et al.*, 2009). Varios estudios han descrito que cepas de *S. aureus* de amplios

orígenes geográficos pertenecen al complejo clonal CC133, capaz de infectar a rumiantes (Jorgensen *et al.*, 2005; Aires-de-Sousa *et al.*, 2007) y la mayoría de aislados de mastitis bovina pertenecen a ST151, ST771 y ST97, mientras que los aislados de caballo están relacionados con linajes asociados a humanos, pertenecientes a los clusters CC1, CC8 y CC22 (Sung *et al.*, 2008).

La razón por la que algunas cepas y no otras son capaces de infectar a diferentes hospedadores no está clara (Ben Zakour *et al.*, 2008a). Esta diferencia entre genotipos observada entre las diferentes especies podría indicar una especialización de las cepas de *S. aureus* en infectar cada una de las diferentes especies. Aquellas cepas que son capaces de infectar a más de un hospedador podrían no haberse especializado o podrían haberse adaptado a más de una especie (Haveri *et al.*, 2008). Por tanto, la población de *S. aureus* presenta una alta estructura clonal (Morandi *et al.*, 2007). Los estudios de esta población clonal muestran que estos clones son específicos de determinadas especies animales indicando una adaptación al hospedador por parte de la bacteria (Kapur *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2005). Así, por ejemplo, se ha descrito que una gran proporción de los aislados de *S. aureus* procedentes de mastitis bovina pertenecen al clon ET3 (Kapur *et al.*, 1995; Fitzgerald *et al.*, 1997). Fitzgerald *et al.* (1997) describen cepas pertenecientes al linaje ET3 que difieren en la clínica que desarrollan, sugiriendo que hay una dependencia de la cepa y/o de los factores del hospedador que influyen en el potencial patógeno de la bacteria.

## **5.2.- Distribución de genes de virulencia entre aislados de *S. aureus***

En este estudio, por primera vez, se ha analizado una amplia selección de determinantes de virulencia en aislados de *S. aureus* pertenecientes a diferentes genotipos y procedentes de diversas lesiones, para conocer cómo influye el potencial patógeno de la bacteria en el desarrollo de la enfermedad.

La diversidad en los genes de virulencia fue elevada, como se ha descrito con anterioridad en otros trabajos (Akineden *et al.*, 2001; Peacock *et al.*, 2002; Zecconi *et al.*, 2006).

El conocimiento sobre la variabilidad genética entre diferentes poblaciones de *S. aureus* puede ayudar a la identificación del origen de un aislado (Haveri *et al.*, 2008). Como se ha comentado en este trabajo *S. aureus* presenta especificidad por especie (Herron-Olson *et al.*, 2007; Ben Zakour *et al.*, 2008b) y parte de esta

especialización o adaptación al hospedador puede ser debida a la adquisición o pérdida de elementos genéticos accesorios (Fitzgerald y Musser, 2001).

Todas las adhesinas analizadas se determinaron en la mayoría de los aislados, lo que parece indicar que son indispensables para la producción de enfermedad. Las adhesinas *coa*, *spa*, *clfA*, *clfB*, *fib* y *map/eap*, se determinaron en todos los aislados analizados de *S. aureus*, siendo específicos de esta bacteria, pudiéndose emplear para la identificación de *S. aureus* (Boden Wastfelt y Flock, 1995; Schmitz *et al.*, 1997; Luczak-Kadlubowska *et al.*, 2006; Hussain *et al.*, 2008). Map y Eap se analizaron conjuntamente ya que tienen secuencias N-terminal similares, teniendo una gran homología en la composición en aminoácidos, por lo que Map y Eap se consideran miembros de la misma familia (Palma *et al.*, 1999).

Por su parte, las adhesinas *ebpS*, *fnbA*, *icaA* y *sdrC* sólo estuvieron ausentes en un aislado nasal cunícola. Los datos referentes a otros trabajos muestran una gran variabilidad en la distribución de *ebpS* entre aislados humanos, desde un 58% a un 100% de los aislados podían ser positivos a este factor de virulencia (Smeltzer *et al.*, 1997; Peacock *et al.*, 2002; Tristan *et al.*, 2003). En cuanto a aislados cunícolas, se ha descrito un 71% de prevalencia para este gen (Vancraeynest *et al.*, 2004), inferior al descrito en este trabajo. El gen *sdrC* ya se había descrito como presente en todos los aislados de *S. aureus* (Josefsson *et al.*, 1998). En este trabajo únicamente un aislado cunícola procedente de nariz carecía de ese gen.

Por el contrario, el gen *bap* no se detectó en ninguno de los aislados cunícolas, quedando limitado a aislados bovinos (Cucarella *et al.*, 2001).

El resto de adhesinas mostró más variabilidad. La presencia de *cna* fue mayoritaria, estuvo presente en el 95% de los aislados cunícolas. Esto fue sorprendente, ya que tanto en estudios humanos (Montanaro *et al.*, 1999; Tristan *et al.*, 2003; Nashev *et al.*, 2004) como en estudios animales (van Leeuwen *et al.*, 2005; Zecconi *et al.*, 2006) se citan presencias más bajas, entre el 29-48%. Vancraeynest *et al.* (2004) citan una prevalencia del 56% entre los aislados cunícolas analizados, estando ausente de todas las cepas consideradas de alta virulencia. En el trabajo de van Leeuwen *et al.* (2005) se muestra una distribución variable de *cna* entre los linajes analizados, siendo positivos a esta adhesina todos los aislados animales pertenecientes a un linaje concreto.

Los genes, *sdrD*, *sdrE* y *bbp* se determinaron en el 89%, 82% y 79% de los casos, respectivamente, mientras que *fnbB* fue la adhesina menos presente entre

los aislados cunícolas, determinándose en el 57%. Según Josefsson *et al.* (1998) en todas las cepas de *S. aureus* están presentes al menos dos genes *sdr*, siendo uno de ellos *sdrC* (Peacock *et al.*, 2002). Sin embargo, en este trabajo también se detectaron cepas que sólo fueron positivas a *sdrC*, como también se ha descrito en trabajos más recientes (Sabat *et al.*, 2006).

En los trabajos de Haveri *et al.* (2008) y Salasia *et al.* (2004) *fnbA* fue más común que *fnbB* en aislados de *S. aureus* procedentes de mastitis bovinas. Las proteínas FnBPA y FnBPB permiten a *S. aureus* invadir las células epiteliales del hospedador (Wesson *et al.*, 1998; Brouillette *et al.*, 2003) y están involucradas también en la posibilidad de colonizar superficies como las de instrumental médico (Greene *et al.*, 1995). En las cepas que no expresan FnBPA y FnBPB se ha demostrado previamente que se reduce drásticamente la habilidad para invadir células epiteliales del tejido mamario bovino *in vitro* (Dziewanowska *et al.*, 1999). Como hipotetizaron Haveri *et al.* (2008) cabría esperar que las cepas que poseen tanto FnBPA como FnBPB tengan un mayor potencial de colonización y estén más extendidas en la naturaleza. Sin embargo, entre las cepas analizadas en este estudio se encontró variabilidad entre la presencia y ausencia de *fnbB* en aislados pertenecientes al genotipo más distribuido, A1/II1/δ.

Todos estos datos confirmaron diversos trabajos previos en los que se cita redundancia de MSCRAMMs (Peacock *et al.*, 2002; Tristan *et al.*, 2003), siendo más comunes los MSCRAMMs de unión al fibrinógeno que los de unión a la fibronectina.

En la mayoría de las cepas hubo relación entre genotipo y adhesinas detectadas, mostrando una clonalidad determinada por el tipado con los genes *coa/spa/clfB*. La variabilidad en el contenido de adhesinas mostrada en algunos aislados pertenecientes al mismo genotipo podría deberse a la inserción de transposones y secuencias de inserción (IS). Estas inserciones producen mutaciones en los genes de inserción, promoviendo diversidad genética y adaptación a nuevos ambientes (Kelly *et al.*, 2009).

En este trabajo no se encontraron diferencias entre la distribución de los diversas adhesinas y la procedencia lesional del aislado. Sin embargo, sí se han encontrado en otros estudios. Tristan *et al.* (2003) no observaron diferencias en la distribución de los MSCRAMMS entre aislados nasales y aislados de enfermedades invasivas, pero sí que hubo diferencias entre osteomielitis/artritis y

endocarditis, con un predominio de la aparición de *bbp* en las osteomielitis/artritis y un predominio en la aparición de *fnbB* en las endocarditis. Sin embargo, no todas las cepas aisladas de osteomielitis/artritis y endocarditis portaban *bbp* o *fnbB*, respectivamente (Tristan *et al.*, 2003). Vancraeynest *et al.* (2004) sólo detectaron el gen *bbp* en aislados caracterizados previamente por ellos como de “alta virulencia”, no detectándose en otros aislados.

Entre las enterotoxinas, la combinación que apareció con mayor frecuencia fue la asociada al cluster *egc-2*. Cuarenta y seis de los 87 aislados de conejo estudiados fueron positivos a *egc-2*, 32 de los cuales sólo poseían estas enterotoxinas. En 15 aislados cunícolas, descritos previamente por Hermans *et al.* (2000), también se identificó el *egc-2* en todos los casos, guardando relación con los aislados cunícolas del estudio.

La combinación *egc-1* fue mucho menos frecuente, se detectó en cuatro aislados, con tres combinaciones diferentes (*sec*, *sell* y *egc-1*; *seb*, *selp* y *egc-1*; *sell* y *egc-1*). Esta marcada presencia del *egc* entre aislados de *S. aureus* ya ha sido descrita con anterioridad (Jarraud *et al.*, 1999; Becker *et al.*, 2003; Smyth *et al.*, 2005; Blaiotta *et al.*, 2006).

El resto de combinaciones entre las diferentes enterotoxinas fue menos frecuente. Junto con las combinaciones ya descritas de *egc-1* y *egc-2* se diferenciaron 13 combinaciones más. Las relaciones entre determinados factores de virulencia se mantuvo, salvo excepciones (Zschock *et al.*, 2005). Así, por ejemplo, en este estudio *selj* siempre se identificó junto a *sed*, pero no a la inversa (Zecconi *et al.*, 2006). Estas enterotoxinas suelen aparecer en distintas combinaciones, generalmente asociadas a elementos genéticos móviles (Jarraud *et al.*, 2001; Baba *et al.*, 2002; Holtfreter *et al.*, 2007). La aparición de nuevas combinaciones entre las distintas enterotoxinas podría indicar la aparición de nuevas variantes de MGEs (Fueyo *et al.*, 2005a; Bania *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009). El estudio de estas nuevas variantes podría ser de gran utilidad para conocer la evolución de la bacteria como patógeno. Además, en 6 aislados se identificó una única enterotoxina: *sell* y *selu* en dos aislados cada uno y *seh* y *selj* en un aislado. Por otro lado, en 5 aislados no se identificó ninguna enterotoxina. Por tanto, la mayoría de las cepas de *S. aureus* posee enterotoxinas (Holtfreter *et al.*, 2004; Smyth *et al.*, 2005; Blaiotta *et al.*, 2006; Haveri *et al.*, 2007), lo que indicaría su importancia en la patogenia de la enfermedad.

Las enterotoxinas, además de provocar toxiinfecciones alimentarias y otras infecciones que pueden derivar en shock tanto en humanos como animales (Bergdoll, 1983; Marrack y Kappler, 1990), activan de forma ineficiente e inespecífica a los linfocitos T y células presentadoras de antígeno, provocando la liberación de citoquinas/linfoquinas e interferones, realizando el shock endotóxico y causando inmunosupresión en los linfocitos B y T (Lussow y MacDonald, 1994; Hu *et al.*, 1996; Sundstedt *et al.*, 1998; Dinges *et al.*, 2000). Esta alteración en la respuesta inmune del hospedador podría ser una de las razones de que *S. aureus* produzca frecuentemente infecciones crónicas y reinfecciones (Ferens y Bohach, 2000; Haveri *et al.*, 2007), como se ha descrito en este trabajo.

Aunque hay cierta variabilidad entre los estudios, la mayoría citan una escasa presencia de *sea*, *seb*, *see* y *seh* entre los aislados procedentes de animales (Akineden *et al.*, 2001; Hazariwala *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2002; Smyth *et al.*, 2005). En este estudio no se detectaron ni *sea* ni *see* entre los aislados cunícolas, tres de ellos presentaban *seb*, mientras que en 10 aislados cunícolas se detectó *seh*. Las enterotoxinas clásicas de *S. aureus*, Sea-See, causan intoxicaciones alimentarias (Balaban y Rasooly, 2000; Dinges *et al.*, 2000). Son intoxicaciones transmitidas por los alimentos caracterizadas por un corto periodo de incubación, náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea. Aislados que contengan genes descritos en cepas humanas son indicativos de un origen humano de la infección (Haveri *et al.*, 2007). Sin embargo, ninguno de los aislados pertenecientes al genotipo humano D1/IV2/α poseía estas enterotoxinas.

Las enterotoxinas más comunes entre los aislados estudiados fueron la enterotoxina *selu* (72%), la enterotoxina *sei* (69%), y la enterotoxina *selm* (62%), de acuerdo con estudios previos en aislados cunícolas, donde predominan las enterotoxinas pertenecientes al *egc* (Smyth *et al.*, 2005; Vancraeynest *et al.*, 2006b).

En cuanto al resto de toxinas analizadas, sólo la  $\gamma$ -toxina codificada por el gen *hlg* fue detectada, en este caso en todos los aislados analizados salvo en un aislado cunícola procedente de nariz. Esto sugería que el locus *hlg* puede ser ubicuo entre los aislados cunícolas, como se ha descrito para bovino (Fitzgerald *et al.*, 2000) y humano (Prevost *et al.*, 1995). Esta toxina puede jugar un importante papel en etapas tempranas de la infección, teniendo efectos tóxicos para los neutrófilos.

En este trabajo también se corroboró la baja importancia de *lukS,F-PV* en los aislados cunícolas, ya que se detectó tan sólo en las cepas cunícolas JS 606 y JS 432, procedentes del grupo de la Dra. Hermans. Este grupo también describió dos cepas cunícolas en las que se detectó *lukS,F-PV* (Vancraeynest *et al.*, 2006b). PVL se localiza sobre todo en humanos (Lina *et al.*, 1999; von Eiff *et al.*, 2004) y cepas aisladas de mastitis bovinas (Schuberth *et al.*, 2001; Rainard *et al.*, 2003; Fueyo *et al.*, 2005b), pero no en el resto de aislados animales (van Leeuwen *et al.*, 2005).

Tampoco mostraron relevancia en aislados cunícolas de este estudio el gen *tst*, importante en aislados bovinos (Jones y Wieneke, 1986; Matsunaga *et al.*, 1993; Smyth *et al.*, 2005; Haveri *et al.*, 2007); y los genes *eta* y *etb*, responsables del síndrome de piel escaldada en humanos (Larsen *et al.*, 2000; Haveri *et al.*, 2007).

Los microorganismos que causan enfermedades invasivas normalmente producen cápsulas polisacáridas extracelulares, que les permiten resistir la fagocitosis, siendo las más comunes entre los aislados clínicos de *S. aureus* las de tipo 5 y tipo 8 (O'Riordan y Lee, 2004). Por ello, también se realizó el estudio de los genes *cap5* y *cap8*. Entre los aislados cunícolas hubo un predominio de la cápsula tipo 8, con 60 aislados (69%) frente a 13 aislados (15%) que presentaban la cápsula tipo 5. Los serotipos 5 y 8 se presentan en alrededor del 70% de todos los aislados clínicos humanos y aislados procedentes de mastitis bovinas, sin que exista relación entre el tipo capsular y el origen del aislado, la clínica, la virulencia o la procedencia geográfica (Baselga *et al.*, 1994). Aunque hay cierta variabilidad dependiendo de la región estudiada, hay un predominio de aislados bovinos de *S. aureus* con serotipo 8 frente al serotipo 5, aunque hay una alta prevalencia de cepas que no pertenecen a ninguno de los dos serotipos (Guidry *et al.*, 1997; Tollersrud *et al.*, 2000). Entre los aislados cunícolas del estudio también se observó un claro predominio de la cápsula tipo 8.

Por su parte, 14 aislados cunícolas fueron negativos tanto a *cap5* como a *cap8*. Lattar *et al.* (2009) observaron que las cepas de *S. aureus* carentes de cápsula polisacárida eran más frecuentes en pacientes con osteomielitis crónica, comparado con osteomielitis aguda, sugiriendo que la carencia de cápsula polisacárida puede constituir una ventaja en infecciones crónicas (Lattar *et al.*, 2009). Sin embargo, todos los aislados cunícolas analizados procedían de lesiones crónicas, no observándose predominio de cepas carentes de cápsula.

Por último, entre los aislados de procedencia cunícola, el tipo de *agr* más frecuente fue el tipo IV, con 46 aislados cunícolas (53%). Otros 27 aislados cunícolas pertenecieron al tipo de *agr* III (31%). El resto de aislados cunícolas perteneció a *agr* tipo I (10 aislados, 11%) y *agr* tipo II (4 aislados, 5%). Estos datos guardan relación con los resultados obtenidos en un estudio de 13 aislados cunícolas, todos pertenecientes al tipo *agr* IV (Vancraeynest *et al.*, 2006a). Sin embargo, tanto las cepas bovinas aisladas de mastitis (Buzzola *et al.*, 2007; Vautor *et al.*, 2009) como los aislados humanos (Dufour *et al.*, 2002) pertenecen mayoritariamente al tipo de *agr* I, estando menos extendidos los pertenecientes a los grupos II, III y IV. Entre los aislados pertenecientes al grupo IV descritos, la mayoría fueron aislados humanos de *S. aureus* productores de toxinas exfoliativas (Jarraud *et al.*, 2000). Sin embargo, como también describieron Vancraeynest *et al.* (2006), los aislados cunícolas pertenecientes a *agr* tipo IV carecían de los genes *eta* y *etb*. Otro trabajo realizado con aislados bovinos de mastitis sugiere que los *S. aureus* pertenecientes a *agr* I son más eficientes internalizándose dentro de las células epiteliales y pueden persistir en mayor número en el tejido mamario respecto a bacterias pertenecientes al resto de grupos *agr* (Buzzola *et al.*, 2007). Sin embargo esto no se cumpliría en el caso de aislados cunícolas, ya que en aislados de mastitis predominan los tipos III y IV, aunque quizás en el ganado vacuno, esta persistencia se relaciona más con las mastitis subclínicas de las vacas. También se observó una relación entre los aislados pertenecientes a *agr* tipo IV y la presencia de *egc-2*, descrita recientemente en otros trabajos (Collery *et al.*, 2009).

En cuanto a los aislados nasales, cabría pensar que fuesen menos capaces de producir enfermedades invasivas y que por ello algunos genotipos sólo se aislaran en la nariz de conejos. Sin embargo, analizando la distribución de los diferentes genes de virulencia estudiados entre los aislados nasales, se observó una gran variabilidad, sin una significación entre la presencia o ausencia de determinados genes que los pudiesen caracterizar, salvo uno de los aislados, que carecía de las adhesinas *ebpS*, *fnbA* y *sdrC*, siendo positivas en el resto de aislados cunícolas. Cuatro de los genotipos determinados en las cepas procedentes de aislados nasales son los mismos que los genotipos determinados de lesiones. Esto podría indicar que la colonización nasal actúa de reservorio o que hay contaminación desde las lesiones a la mucosa nasal.

Diversos trabajos han tratado de dilucidar de qué factores bacterianos depende el que *S. aureus* produzca una enfermedad invasiva o simplemente colonice asintómicamente la mucosa nasal, indicando que no hay diferencias entre aislados invasivos y no invasivos. Estos resultados enfatizan la importancia de factores inherentes al hospedador, tales como factores inmunitarios o presencias de otras enfermedades, para el desarrollo de estafilococia (Monecke *et al.*, 2009).

La presencia o combinación de determinados factores de virulencia juega un importante papel en la especificidad al hospedador o en la especificidad por el tejido en infecciones de *S. aureus* (van Leeuwen *et al.*, 2005). A pesar de ello, en este estudio no se obtuvo una relación entre los factores de virulencia analizados y la predisposición por aislarse de una u otra lesión, similar a otros trabajos anteriores (Zecconi *et al.*, 2006; Haveri *et al.*, 2007; Haveri *et al.*, 2008). Sí hubo relación entre los factores analizados y los genotipos de los que procedían los aislados (Haveri *et al.*, 2008). En el trabajo llevado a cabo por van Leeuwen *et al.* (2005), donde relacionan cepas procedentes de humanos con aislados de animales, encuentran una especificidad de los genotipos. Sin embargo, los factores de patogenicidad encontrados no guardan ninguna relación, por lo que parece que tanto las cepas que infectan humanos como las que infectan animales poseen el mismo fondo genético. Tan sólo detectan dos genes que varían su distribución dependiendo de la procedencia: *tst*, que se aísla sobre todo de mastitis bovinas, y *cna*, que predomina más en aislados procedentes de animales que de humanos (van Leeuwen *et al.*, 2005). Determinados factores de patogenicidad pueden verse más representados en determinadas enfermedades, sin embargo, es más una relación de determinados clones o grupos de clones relacionados con determinadas patologías (Jarraud *et al.*, 2002). De acuerdo con todo ello, la unidad básica de la patogenia bacteriana sería el clon o linaje al que pertenece, el cual se expande debido a que posee una adecuada combinación de genes de virulencia y genes reguladores propicios para ello (Jarraud *et al.*, 2002), por lo que el clon más propicio para infectar la población cunícola en este caso fue el genotipo A1/II1/δ.

A pesar de que en este estudio no se encontraron diferencias entre los factores de patogenicidad que pudieran indicar diferencia en la virulencia de los aislados, hay que tener en cuenta que se han descrito diferencias entre la virulencia de cepas estrechamente relacionadas, provocadas por polimorfismo en un reducido

número de nucleótidos, lo que provoca dramáticos cambios en la expresión proteica y la virulencia (Kennedy *et al.*, 2008).

Estudios previos, han clasificado las cepas cunícolas de *S. aureus* como alta (“high”) y baja (“low”) virulencia (Hermans *et al.*, 2000). Las cepas denominadas de “alta virulencia” se relacionaron inicialmente con determinados casos de estafilococia cutánea, capaces de provocar alta mortalidad en gazapos y elevados niveles de lesiones estafilocócicas en hembras y machos, pero sin demasiadas repercusiones en los parámetros reproductivos (Devriese *et al.*, 1981; Okerman *et al.*, 1984).

En este estudio, se analizaron 45 granjas de conejos con distintos niveles de estafilococia, aunque la mayoría de ellas poseían una prevalencia baja (menor de un 3% de estafilococia en maternidad) en el momento del muestreo. En la mayor parte de dichas granjas se identificaron los mismos genotipos que los determinados en cepas clasificadas como altamente virulentas por Hermans *et al.* (2000).

Tan sólo en una granja, la número 2, la infección se dispersó en la explotación, obligando a cerrarla debido a las graves pérdidas económicas. En esta granja, el genotipo determinado fue B1/I1/ $\alpha$ , precisamente el mismo genotipo que el único aislado clasificado como de “baja virulencia”, cepa KH273.

En este trabajo, se observó que genotipos clasificados previamente como “altamente virulentos” se aislaban de granjas con casos esporádicos de estafilococosis y, por otro lado, el genotipo clasificado como de “baja virulencia” fue el único que se diseminó rápidamente por la explotación, afectando a la mayor parte de animales y obligando a cerrar la granja. Por lo tanto, nuestros resultados discrepan con la clasificación “high/low virulence” de Hermans *et al.* (2000).

### **5.3.- Caracterización inmunopatológica de mastitis cunícolas**

En las últimas décadas, la selección de animales más prolíficos a través de la genética ha causado un incremento en el número de glándulas mamarias por coneja, debido a la alta heredabilidad de este carácter (Lebas, 2000). En los animales analizados en este estudio, el número de glándulas mamarias osciló entre 8, 9 y 10 (37,7%, 33% y 29%, respectivamente). El número de mamas no predispuso a sufrir mastitis y lo más frecuente fue la inflamación de sólo una

glándula. Ambas cadenas mamarias se afectaron con la misma frecuencia, aunque los pares craneales y caudales se afectaron en menor medida, en comparación con el resto de pares. Esto pudo ser debido al hecho de que estas mamas estén más protegidas contra traumatismos y no sean tan fácilmente accesibles por los gazapos, debido a las patas delanteras y traseras.

Las mastitis en el ganado vacuno se relacionan sobre todo con el periodo de lactación más que con la mama inactiva (Jones *et al.*, 1997). De igual manera, Adlam *et al.* (1976) describieron que, en mastitis naturales de conejo, la infección ocurría en cualquier momento durante la lactación, pero no en animales no lactantes. Sin embargo, en este estudio, en 79 de las 135 (58,5%) glándulas mamarias no se detectó leche en los alveolos mamarios. Por tanto, se observaron mastitis tanto en conejas no lactantes como en lactación. No obstante, no puede descartarse que la infección comience durante el periodo de lactación y persista hasta el periodo seco. Esta hipótesis estaría de acuerdo con los resultados obtenidos después de una inoculación experimental en la glándula mamaria, la cual se volvía altamente susceptible a la infección sólo durante la lactación (Adlam *et al.*, 1976).

Los estudios histológicos se consideran valiosos para la valoración del daño producido por patógenos en la glándula mamaria (Trinidad *et al.*, 1990). Sin embargo, mientras la histopatogénesis de las mastitis provocadas por *S. aureus* en vacas ha sido bien documentada (Heald, 1979; Paape *et al.*, 1979; Nickerson y Heald, 1981, , 1982; Gudding *et al.*, 1984; Sordillo *et al.*, 1989; Trinidad *et al.*, 1990; Leitner *et al.*, 2003), hay muy pocos trabajos relativos a la mastitis estafilocócica en conejos (Flatt, 1974; Adlam *et al.*, 1976; Rosell *et al.*, 2000; Peris *et al.*, 2006). A pesar de que existen numerosos trabajos sobre los fenómenos inflamatorios que tienen lugar en la glándula mamaria, principalmente en ganado vacuno, el conocimiento que se tiene sobre el sistema inmune innato de la glándula mamaria y su respuesta durante la mastitis es rudimentario (Rainard y Riollet, 2006).

La glándula mamaria de las conejas es susceptible a la infección natural por *S. aureus*, pudiendo desarrollarse dos tipos de cuadros patológicos. El primero de ellos no suele ser fatal y consiste en la formación de abscesos en una o varias glándulas mamarias (Adlam *et al.*, 1976). El segundo proceso, llamado en ocasiones “mama azul” (“blue-breast”), tiene un carácter agudo, caracterizado por

la presencia de un tejido mamario edematoso y hemorrágico, que normalmente causa, de forma rápida, la muerte de los animales (Adlam *et al.*, 1976).

Las mastitis analizadas en este estudio fueron todas de carácter crónico, siendo clasificadas atendiendo a aspectos histomorfológicos en mastitis tipo abscesos, mastitis tipo rosetas, mastitis tipo sándwich y mastitis tipo mixta.

Las mastitis tipo abscesos se clasificaron en tres subtipos atendiendo a la cantidad de tejido conjuntivo que delimitaba los abscesos, a la disposición de las fibras conectivas y la cantidad de infiltrado inflamatorio. Estos abscesos podían rodearse de una gruesa cápsula formada por abundante tejido conectivo compacto, sin apenas células inflamatorias; tejido conectivo con fibras conectivas laxas e infiltradas por numerosas células inflamatorias; o, por último, sin cápsula o formada por escasas fibras de tejido conectivo mezcladas con abundantes fibroblastos y células inflamatorias. A priori, estas lesiones parecen ser tres estadios diferentes de un mismo proceso, donde los abscesos con cápsulas compactas serían las lesiones más crónicas, con la infección bien delimitada y controlada, las mastitis con abscesos delimitados por una cápsula de tejido conectivo laxo serían una fase intermedia, y los abscesos no encapsulados serían una fase incipiente de la formación del absceso, con mayor actividad celular (Ackermann, 2006). La formación de estos abscesos otorga protección a la bacteria frente a drogas terapéuticas (Trinidad *et al.*, 1990).

Respecto a las mastitis clasificadas como rosetas, podrían ser una fase todavía más temprana, donde los focos purulentos todavía no se han delimitado. No obstante, otra posibilidad que podría explicar este tipo lesional, sería la imposibilidad del sistema inmune del hospedador para llevar a cabo una respuesta que pueda delimitar el proceso inflamatorio; la bacteria podría evadirlo con mayor facilidad e ir invadiendo nuevas ubicaciones de la glándula mamaria.

Por su parte, las mastitis tipo sándwich parecían estar relacionadas con la vía de entrada del patógeno. Aunque el canal del pezón es la ruta más común para la infección de la glándula mamaria, también se describe como posible la vía percutánea (Foster, 2006; Schlafer, 2007). Los traumatismos en la glándula mamaria pueden causar una solución de continuidad en la piel y provocar una mayor susceptibilidad a la infección (Jones *et al.*, 1997), así como cualquier otra perturbación del resto de los mecanismos de defensa (inmuno-mediados o no inmuno-mediados) del hospedador (Jones *et al.*, 1997; Foster, 2006). En este

estudio, el desarrollo de la mastitis tipo sándwich pudo ser debida a laceraciones en la piel ejercidas por los propios gazapos durante la lactación o por traumatismos provocados por elementos de las jaulas o el material de los nidales, como mostraron las lesiones descritas en la dermis de la mama en ocho de las conejas. En las mastitis tipo sándwich, el tejido mamario no afectado aparecía atrófico. Esto podía explicarse por la obstrucción del flujo de la leche ejercido por el tejido de granulación y la fibrosis circundante, conllevando la consiguiente involución de los lóbulos no invadidos por la bacteria (Foster, 2006). Cuando la inflamación rodeó completamente a la glándula (sándwich completo) se observó necrosis por coagulación de la misma, probablemente como consecuencia de un proceso de isquemia. En estos casos hubo un elevado número de bacterias Gram-positivas invadiendo el tejido necrótico. Este fenómeno no se observó en las glándulas mamarias clasificadas como tipo sándwich incompleto.

En el subtipo sándwich infiltrado, posiblemente hubo una extensión de la inflamación a los tejidos adyacentes: bien porque la inflamación periglandular característica de las lesiones tipo sándwich invadió la glándula mamaria o, de forma menos probable, lesiones previas en la glándula mamaria se extendieron alrededor de la mama, bajo la piel y cerca de la musculatura abdominal.

Finalmente, en las mastitis clasificadas como tipo mixto se distinguieron características comunes a los abscesos encapsulados y a las rosetas. Este tipo de lesión pudo ser debido a una reactivación del proceso purulento a partir de los abscesos o a una reinfección. Se ha descrito que las conejas normalmente pueden reinfectarse en la siguiente lactación (Adlam *et al.*, 1976).

En ganado vacuno también se han realizado trabajos donde se describían las características del tejido mamario tras la infección por *S. aureus*, pero sin realizar una clasificación histomorfológica. Las lesiones se caracterizaban sobre todo por una involución del epitelio alveolar con disminución del área luminal, aumento del estroma y reducción de la actividad secretora (Heald, 1979; Nickerson y Heald, 1981; Sordillo *et al.*, 1989).

Con el objetivo de caracterizar mejor el efecto del hospedador en el desarrollo de los diferentes tipos de mastitis, se realizó una caracterización de las principales células inflamatorias a nivel mamario, ya que se ha descrito que el número y distribución de los diferentes leucocitos es importante para conocer la respuesta inmune de la glándula mamaria (Leitner *et al.*, 2003).

Para descartar el efecto de la cepa en la producción de mastitis y caracterizar mejor la respuesta inmune del hospedador, se llevó a cabo un estudio en todos los tipos de mastitis descritos según su histomorfología, producidos por cepas de *S. aureus* que pertenecían al genotipo A1/II1/δ, el más ampliamente distribuido. En este estudio se identificaron macrófagos (RAM11+), linfocitos T (CD3+), linfocitos B (CD79+) y células plasmáticas (IgM+).

Atendiendo al tipo celular predominante, las mastitis tipo abscesos fueron las que presentaron una mayor celularidad. Como se ha comentado anteriormente, los tres subtipos de mastitis tipo abscesos podrían considerarse distintas evoluciones de un mismo proceso, determinado por el número de linfocitos T. Esta evolución estaría relacionada con una elevada cantidad de linfocitos T al inicio del proceso (abscesos no encapsulados), probablemente encargados de coordinar la respuesta inmune inicial, y una disminución progresiva de las poblaciones hasta que el proceso esté aparentemente controlado (abscesos compactos).

Las mastitis tipo abscesos se caracterizaron también por la presencia de células espumosas. Este tipo de células se han descrito formando parte de la glándula mamaria en humanos (Gaffney *et al.*, 1976) y ganado vacuno (Lee *et al.*, 1969; Lee *et al.*, 1980). Las células espumosas de la glándula mamaria pueden derivar de las células epiteliales o de los macrófagos (Damiani *et al.*, 1998). En este estudio, ya que las células espumosas fueron positivas a RAM11, podríamos indicar que derivaron de macrófagos. Estos macrófagos están encargados de fagocitar la grasa de la leche durante la involución del tejido mamario (Azzara y Dimick, 1985). También se han descrito en casos de necrosis con presencia de material lipídico (necrosis grasa (Agale *et al.*, 2009), nefritis hereditaria (Robbins *et al.*, 1995a) y arteriosclerosis (Robbins *et al.*, 1995b)).

En cuanto a las mastitis tipo rosetas, estas lesiones se asemejan histomorfológicamente a la lesión tipo absceso no encapsulado, pero con numerosos focos satélites. La escasez de células delimitando los focos satélites de necrosis podría justificar la incapacidad del sistema inmunitario para delimitar el proceso inflamatorio. En el tejido mamario sano, así como en la mastitis, hay un predominio de macrófagos y de linfocitos T. Estos linfocitos T aumentan su número en el estroma del tejido mamario en los casos de mastitis (Sordillo *et al.*, 1989), siendo clave, al menos en ganado vacuno, la respuesta inmune celular en la infección por *S. aureus* (Nickerson y Heald, 1982). Por tanto, tras el estudio

inmunocitoquímico, este tipo de lesión podría explicarse por el descenso en el número de linfocitos T (CD3+) respecto a las mastitis tipo absceso no encapsulado. En este estudio no se han podido analizar las subpoblaciones de linfocitos T para conocer el ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. En ganado vacuno es menor a uno, tanto en condiciones normales como, sobre todo, tras la infección por *S. aureus* (Park *et al.*, 2004).

En este estudio no se encontró una relación entre el número de bacterias y la cantidad de leucocitos, como en otros trabajos en ganado vacuno, donde el número de bacterias es inversamente proporcional a la cantidad de leucocitos (Prasad y Newbould, 1968). Sin embargo, también hay que tener en cuenta que puede haber zonas lesionadas estériles, sin proliferación de la bacteria, donde las lesiones se producen debido a daños indirectos producidos por las toxinas producidas por *S. aureus* y por los enzimas hidrolíticos liberados sobre todo por los neutrófilos (Adlam *et al.*, 1976; Nickerson y Heald, 1982; Sordillo *et al.*, 1989).

Este amplio abanico lesional observado en la glándula mamaria cunícola tras la infección por *S. aureus* podría deberse al tiempo transcurrido desde la infección, a variaciones en el sistema inmune del hospedador o a la vía de entrada del patógeno. Aunque también podría estar relacionado con la presencia de un arsenal patógeno heterogéneo en el germen, que a algunas cepas le conferiría una mayor eficacia en la penetración e invasión del tejido mamario.

La cepa más frecuentemente aislada de las mastitis fue el genotipo A1/II1/δ, en el 65,7% de las mamas, describiéndose 15 genotipos más. Los resultados no parecían mostrar una relación entre las lesiones y las cepas aisladas. Tan sólo es remarcable que 41 de las 48 mastitis debidas al genotipo A1/II1/δ y clasificadas como mastitis tipo abscesos tenían una distribución multifocal. Esto pudo ser debido a que este genotipo tenía alguna característica por la cual adquiría una mayor virulencia o, también pudo deberse a una mayor posibilidad de reinfección, al ser la cepa más extendida. También es remarcable que 3 de las 5 lesiones provocadas por el genotipo C1/I1/β se clasificaron como tipo sándwich. Aunque el número de muestras es bajo, podría indicar que esta cepa tendría cierta predisposición por colonizar la piel y producir afección de la glándula mamaria después de una lesión. No obstante, esta hipótesis está por confirmar.

Al analizar los resultados de una infección experimental con 9 genotipos diferentes de *S. aureus* se observó que las infecciones derivaron en mastitis de tipo

agudo, caracterizadas por la presencia de fenómenos vasculares e infiltrados de heterófilos, como se ha descrito previamente en otros trabajos (Nickerson y Heald, 1982; Foster, 2006). Los neutrófilos son la primera célula efectora contra la infección bacteriana de la glándula mamaria, aunque pierden parte de su capacidad fagocítica en la leche (Paape *et al.*, 1979).

Hubo cepas que produjeron lesiones graves, mientras otras prácticamente no produjeron ninguna alteración. Por tanto, existía una variabilidad en las lesiones producidas entre conejas infectadas con cepas diferentes, así como entre conejas infectadas con la misma cepa. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia tanto de las características de la cepa como probablemente de la respuesta inmune del hospedador.

Una de las cepas empleadas en la infección experimental fue aislada de una coneja con pododermatitis ulcerativa, produciendo posteriormente lesiones graves en dos conejas, lo que corroboró la posibilidad de que una cepa fuese capaz de provocar diferentes lesiones, descrita con anterioridad.

Las enfermedades producidas por cepas estafilocócicas menos patógenas, como las cepas de estafilococos coagulasa negativos, son menos graves, muchas veces sin formación de abscesos. Sin embargo, analizando las lesiones crónicas se observa también tejido de granulación y fibrosis, causando obstrucción y presión, terminando en la atrofia de lóbulos (Trinidad *et al.*, 1990). Así, en este trabajo, aunque hubo cepas menos patógenas, sin provocar lesiones a las 48 horas de la infección, sí fueron capaces de colonizar la glándula mamaria y provocar mastitis purulenta crónica en condiciones naturales.

Se ha descrito previamente infecciones experimentales con *S. aureus* (Adlam *et al.*, 1976; Amorena *et al.*, 1991), sin embargo estaban encaminadas al estudio de la infección estafilocócica en rumiantes, utilizándose el conejo como modelo experimental. La puesta en marcha de un protocolo de infección experimental en mama facilita estudios sobre la patogénesis, eficacia de tratamientos, retención de medicamentos en glándula mamaria, inmunización y otras investigaciones (Postle *et al.*, 1978).

#### 5.4.- Secuenciación de una cepa clínica de *S. aureus* aislada de conejo

En los genomas secuenciados hasta la fecha se ha observado como la mayoría del genoma está conservado, sugiriendo que los eventos de recombinación a gran escala tienen una baja relevancia para la evolución de *Staphylococcus* comparado con otros patógenos como *Listeria* spp y *Bacillus* spp (Ben Zakour *et al.*, 2008a). El análisis comparativo entre dos cepas de *Staphylococcus* cualesquiera revela más del 78% de los genes conservados (Takeuchi *et al.*, 2005).

Por ello, se han descrito tres categorías genómicas definidas como “core genome”, “core variable” y “accessory genome” (Lindsay *et al.*, 2006). El “core genome” corresponde a los genes conservados en todas las cepas, el “core variable” son aquellos genes conservados sobre todo en cepas relacionadas evolutivamente, mientras que el “accessory genome” corresponde a elementos genéticos móviles.

El análisis de las regiones del genoma de *S. aureus* que son variables entre las cepas puede proveer información sobre la adaptación de cada cepa a su nicho ambiental particular, así como sobre su potencial patógeno (Ben Zakour *et al.*, 2008a). Además, el estudio de los componentes específicos de una cepa puede revelar los eventos genéticos que han contribuido a la aparición de nuevas cepas virulentas (Ben Zakour *et al.*, 2008a). Así, por ejemplo, los profagos poseen una gran influencia en la patogénesis y en la adaptación de *S. aureus*, ya que codifican elementos de virulencia que contribuyen en las interacciones patógeno-hospedador y en las manifestaciones clínicas (Ben Zakour *et al.*, 2008a). De hecho, algunas familias de fagos, como la familia de fagos que se integra en el gen *hly* (codifica para  $\beta$ -hemolisina), son abundantes en cepas humanas mientras que están menos extendidos en cepas procedentes de animales, lo que podría sugerir una importancia en la adaptación específica a humanos (Goerke *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2008).

El posible bacteriófago encontrado en la cepa IVIA-1 no contiene ninguno de los genes de virulencia descritos hasta la fecha pero podría participar en la especificidad de esta cepa por la especie cunícola. Sin embargo, este fago no es exclusivo de aislados cunícolas, puesto que también se detectó en 5 aislados humanos pertenecientes al clon ST121. Además, según los datos obtenidos en el

análisis de la capacidad de movilización del  $\Phi$ IVIA-1, todo hace indicar que se trata de un fago defectivo.

Muchos de los profagos que aparecen en los genomas bacterianos son defectivos. A pesar de esto, muchos de ellos pueden proporcionar ventajas biológicas a la bacteria hospedadora ya que son capaces de codificar muchos genes funcionales (Casjens, 2003). No se descarta que la presencia de estos profagos defectivos sea consecuencia de un proceso de selección, al proporcionar importantes ventajas a la bacteria hospedadora (Casjens, 2003) y no simples remanentes genéticos generados durante la evolución de los genomas (Asadulghani *et al.*, 2009). Así, el estudio del profago detectado en la cepa IVIA-1 podría aportar un mayor conocimiento de la adaptación de esta cepa.

Una de las consecuencias de la inducción de la respuesta SOS es la activación de la proteína RecA que adquiere actividad co-proteasa promoviendo la autodigestión del represor CI del fago lambda en un punto muy concreto, entre una alanina y una glicina, liberándose de esta forma la represión ejercida sobre los genes implicados en el ciclo lítico del fago (Little, 1984).

Se han descrito algunos métodos de regulación diferentes al modelo del fago lambda. Por ejemplo, en *V. cholerae*, el profago CTX controla su ciclo lisogénico mediante tres proteínas: un represor producido por el propio fago (RstR), otro represor producido por la bacteria (LexA) que, al activarse la respuesta SOS, se autodigiere liberando la represión ejercida sobre los genes implicados en el ciclo lítico del fago, y la proteína RstC codificada por el fago satélite RS1, que induce la agregación de RstR (el represor de CTX), liberando la represión de los genes del ciclo lítico del fago (Waldor *et al.*, 1997; Demo *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2002).

El profago de la cepa IVIA-1 estudiado podría mostrar un sistema de regulación novedoso: el represor *cl* carece de Ala-Gly para ser degradado por RecA y en la secuencia intergénica se encontró una secuencia de tipo Cheo box (GAACnnnnGTTC), por tanto una zona de posible unión del represor LexA. Bisognano *et al.* (2004) describieron la presencia de "Cheo-boxes" en las regiones promotoras de genes inducibles por el daño del ADN en *S. aureus*, así como en diferentes factores de virulencia (Bisognano *et al.*, 2004). Los resultados parecían indicar que la represión que ejerce CI sobre Cro es independiente de la respuesta SOS. Sin embargo sí parecían indicar que los niveles de CI dependen de la

cantidad de Cro y de la unión de LexA, necesitándose más estudios para conocer el posible papel de LexA.

Una vez descartado que el  $\Phi$ IVIA-1 fuese exclusivo de cepas cunícolas se buscaron otros elementos genéticos móviles que pudiesen discernir entre las cepas ST121 de humanos y conejos. La transferencia horizontal de genes es el mayor indicador de la evolución de bacterias patógenas (Kelly *et al.*, 2009). Los elementos genéticos móviles permiten el intercambio de genes entre linajes bacterianos, comprobándose que dichos factores, como por ejemplo la leucocidina Pantón-Valentine (PVL), ejercen un gran papel en la virulencia (Gillet *et al.*, 2002; Vandenesch *et al.*, 2003). La comparación entre patógenos relacionados con hospedadores diferentes puede revelar los mecanismos potenciales por los que el patógeno puede interactuar con el hospedador (Crossman *et al.*, 2004). Estos mecanismos de adaptación han podido ser comprobados mediante la comparación entre patógenos con más de un hospedador y patógenos estrictos de un hospedador, por ejemplo las bacterias del género *Bartonella*. *B. quintana* es un patógeno específico del hombre mientras que *B. henselae* es un patógeno del hombre e infecta de forma asintomática a los gatos. *B. quintana*, el patógeno estricto, ha perdido genes respecto a *B. henselae*. Se conoce que el ancestro de ambos organismos adquirió genes relacionados con la interacción con el hospedador mediante transferencia horizontal, pero muchos de estos genes se han perdido en *B. quintana*. Este hecho refuerza la hipótesis de que los hospedadores que se adaptan a un hospedador evolucionan respecto a los antecesores mediante la pérdida de genes (Crossman *et al.*, 2004). En este caso, se observó como los aislados cunícolas carecían de elementos genéticos móviles que codificasen para los genes *eta*, *etb* y *lukS,F-PV*, respecto a aislados humanos pertenecientes al mismo linaje (misma ST). Esto podría indicar que las cepas cunícolas se han adaptado al hospedador mediante la pérdida de estos elementos genéticos móviles, explicando el hecho de que el genotipo A1/II1/δ esté tan extendido en explotaciones de conejos y no afectando a otros hospedadores. Hasta el momento no se conoce con exactitud los genes relacionados con las interacciones específicas patógeno-hospedador. El conocimiento de estos genes podrían ser dianas terapéuticas ideales para evitar infecciones y portadores, tanto en animales como humanos, reduciendo la morbilidad, la mortalidad y las pérdidas económicas (Sung *et al.*, 2008).



## **VI. CONCLUSIONES**



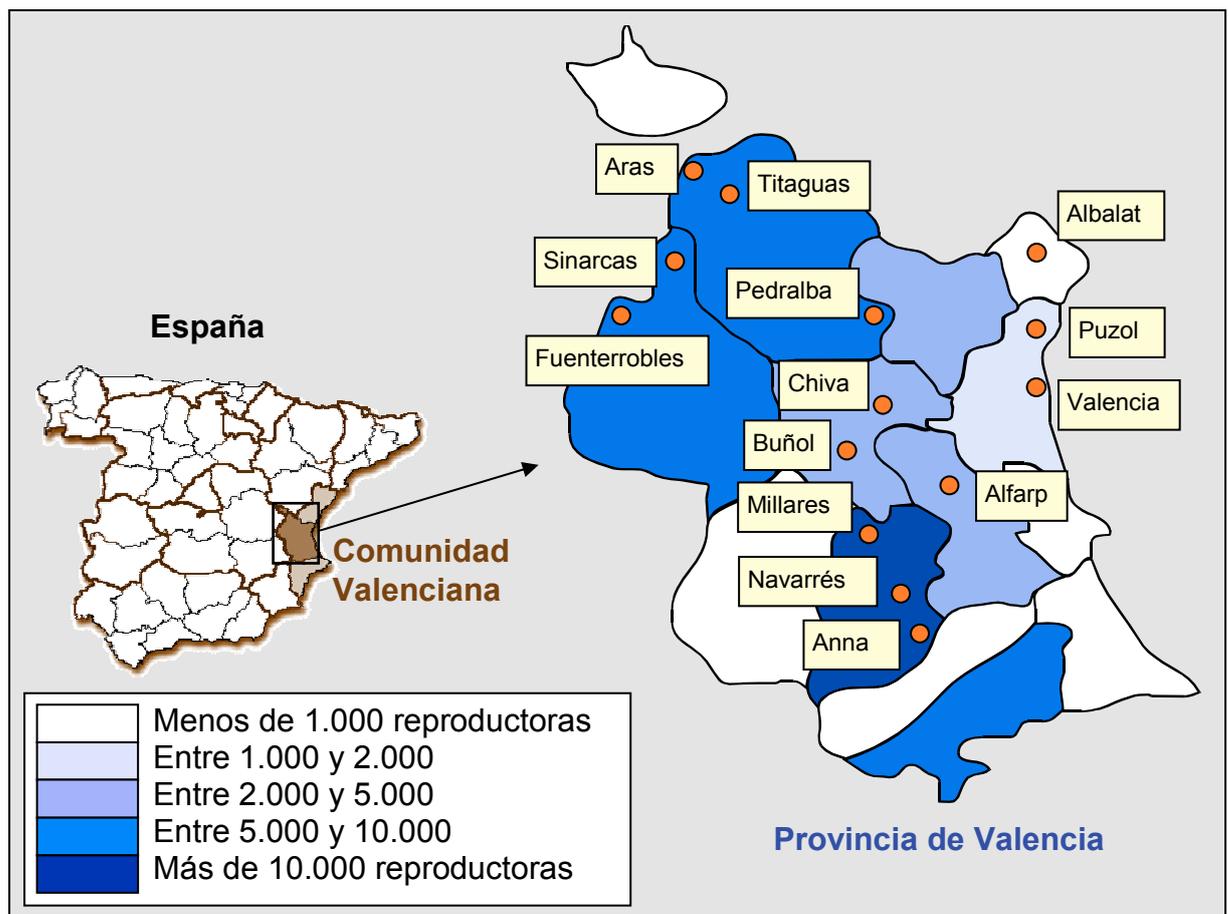
En respuesta a los objetivos planteados en el inicio de este trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. El tipado molecular mediante los genes *coa/spa/clfB* fue un método capaz de discriminar entre genotipos de *S. aureus*, siendo sencillo de realizar y de interpretar, además de rápido.
2. En las explotaciones cunícolas existe una extensa distribución de un número limitado de genotipos, predominando sobre todo el genotipo A1/II1/δ.
3. Un animal puede afectarse por varios genotipos al mismo tiempo y a su vez, en una misma granja puede aislarse más de un tipo de *S. aureus*.
4. Un genotipo puede provocar diferentes lesiones y una misma lesión puede ser causada por distintos genotipos.
5. Se observó divergencia genética entre los aislados de *S. aureus* procedentes de especies diferentes. La variación detectada en los genes *coa/spa/clfB* podría indicar la especialización hacia el hospedador de cepas con un origen común.
6. No existió relación entre los factores de virulencia analizados y la predisposición por aislarse de una u otra lesión. Sí hubo relación entre los factores analizados y los genotipos de los que procedían los aislados.
7. Las mastitis producidas por *S. aureus* en conejas pudieron clasificarse atendiendo a características histomorfológicas, que a su vez, estuvieron condicionadas por las características de la bacteria y la respuesta inmune del hospedador.
8. Los aislados cunícolas pertenecientes al linaje ST121 han perdido los genes *eta*, *etb* y *lukS,F-PV*, codificados por elementos genéticos móviles, respecto a aislados humanos del mismo linaje.



## **VII. ICONOGRAFÍA**

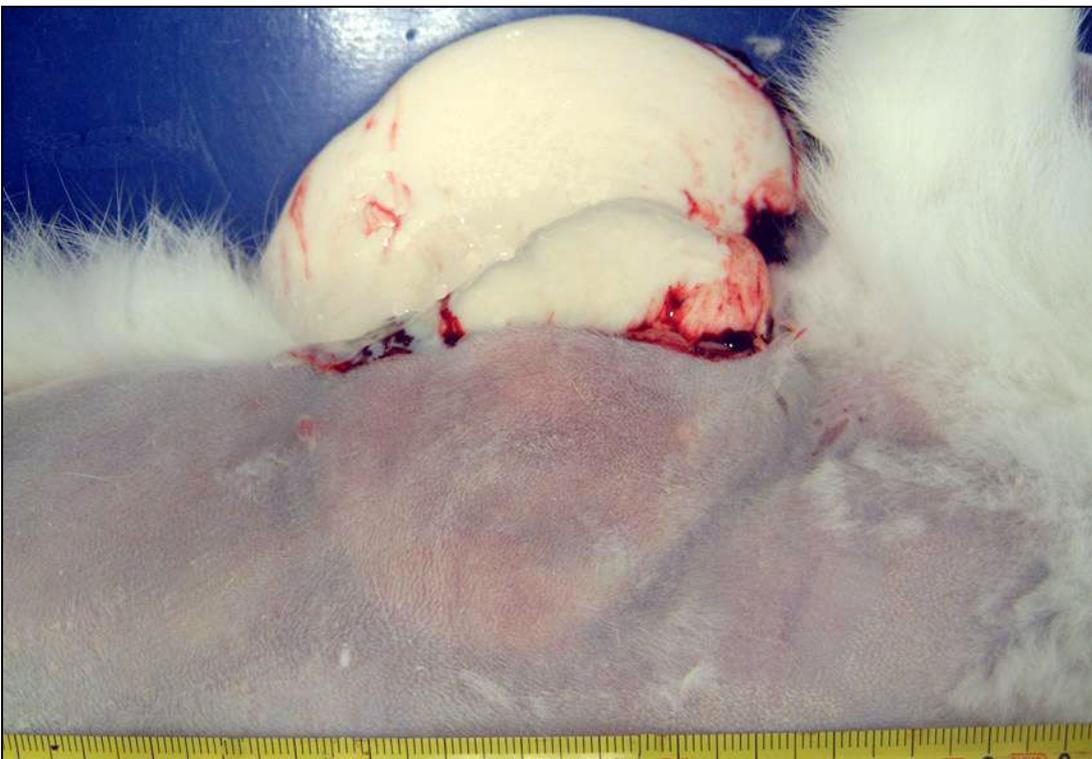




**Figura VII-1.** Mapa de densidad cunícola de la provincia de Valencia. Se muestran las 14 poblaciones donde se localizan las 33 granjas analizadas.



**Figura VII-2.** Mastitis crónica. Zona ventral rasurada. Se observa nódulo de 9 cm de diámetro en la glándula torácica derecha.



**Figura VII-3.** Mastitis crónica. Glándula mamaria repleta de material purulento de color blanco-amarillento que se vierte al corte.



**Figura VII-4.** Pododermatitis ulcerativa. Se observa pérdida de pelo y tejido cicatricial en la superficie plantar de las extremidades posteriores.



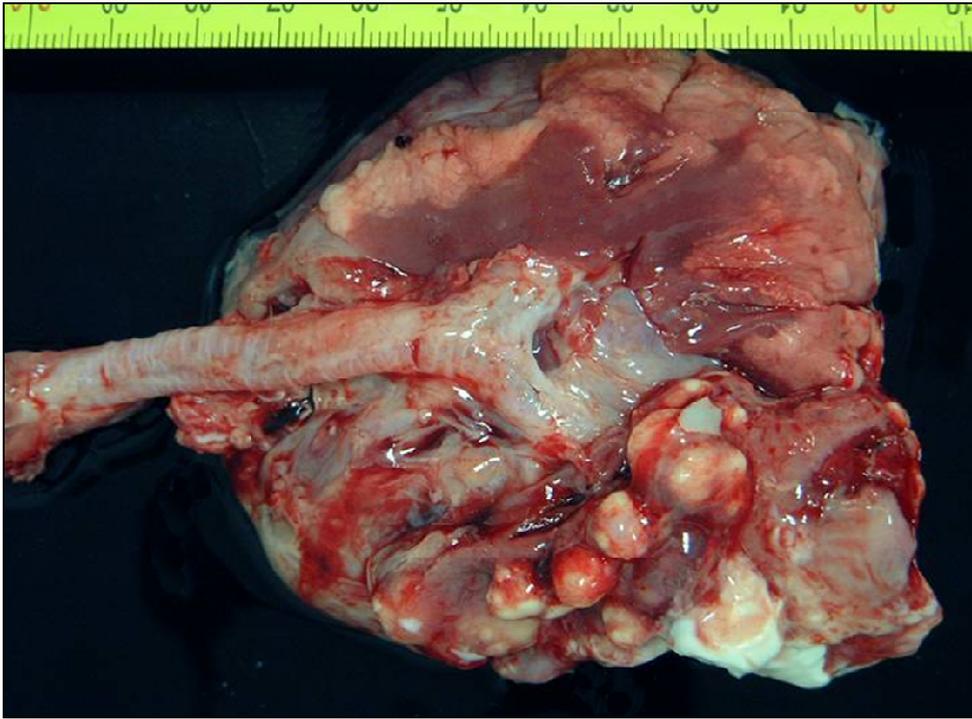
**Figura VII-5.** Abscesos en diversas localizaciones (A: escápula, B: mandíbula, C: extremidad posterior derecha, D: cavidad ocular).



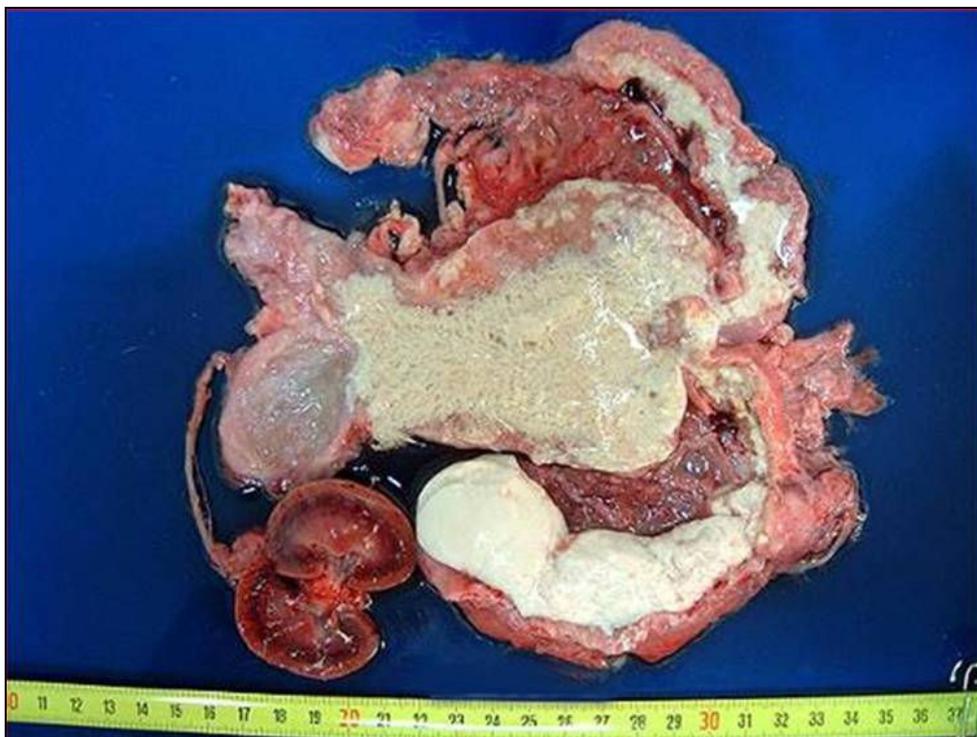
**Figura VII-6.** Conjuntivitis purulenta. Presencia de exudado purulento en el ojo.



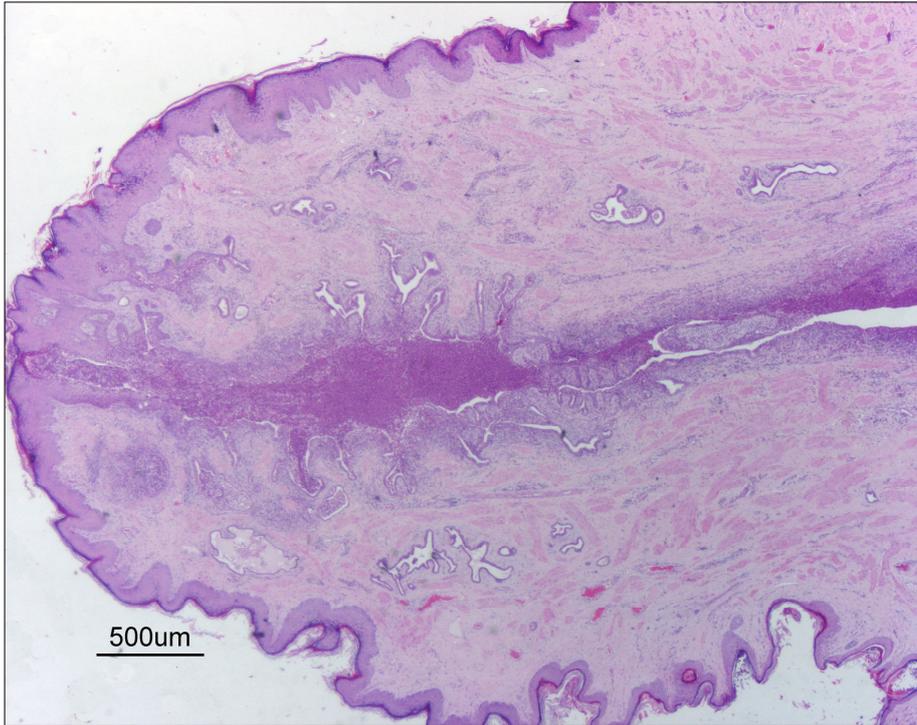
**Figura VII-7.** Otitis. Se aprecia postura característica debido a la afección del oído medio.



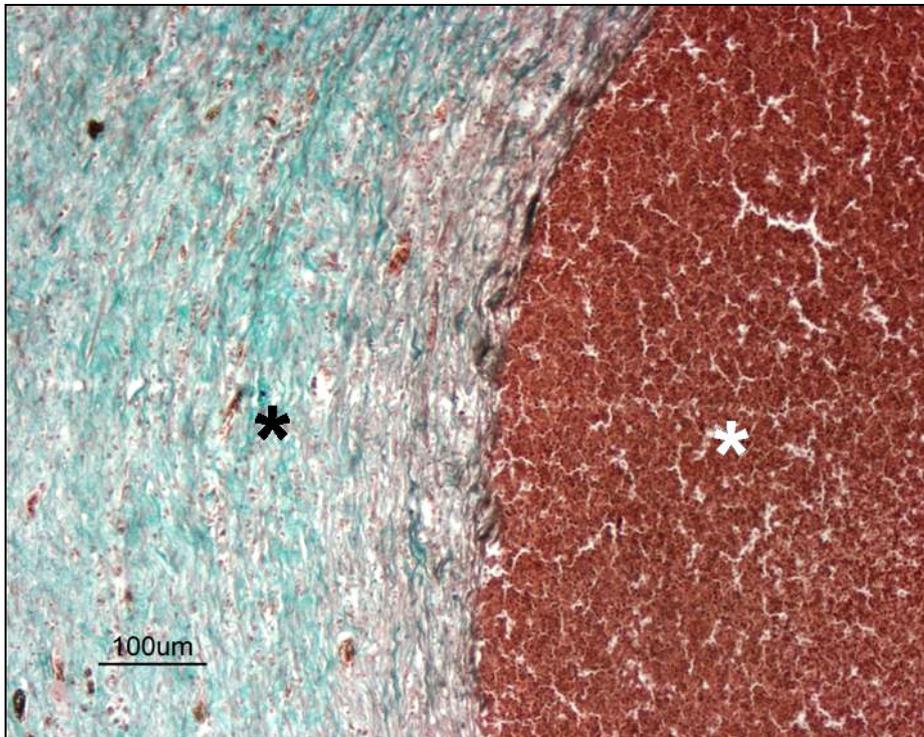
**Figura VII-8.** Neumonía purulenta. Se observan múltiples abscesos de tamaño variable (0,3-1,2 cm de diámetro), repletos de material purulento junto con una pleuritis fibrosa.



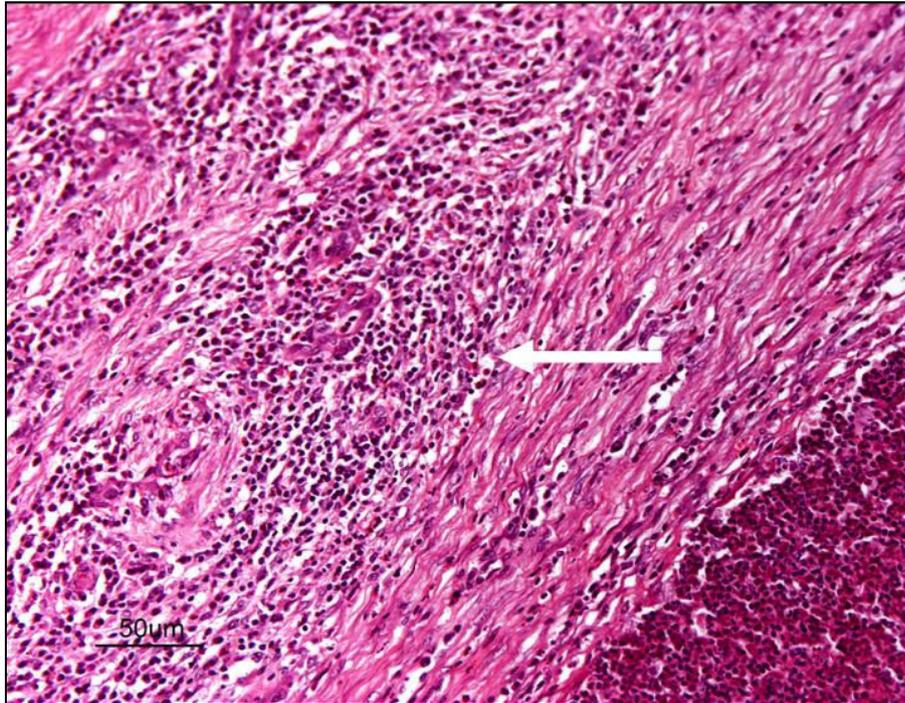
**Figura VII-9.** Piómetra. Acúmulo de material purulento en ambos cuernos uterinos e incluso en vagina.



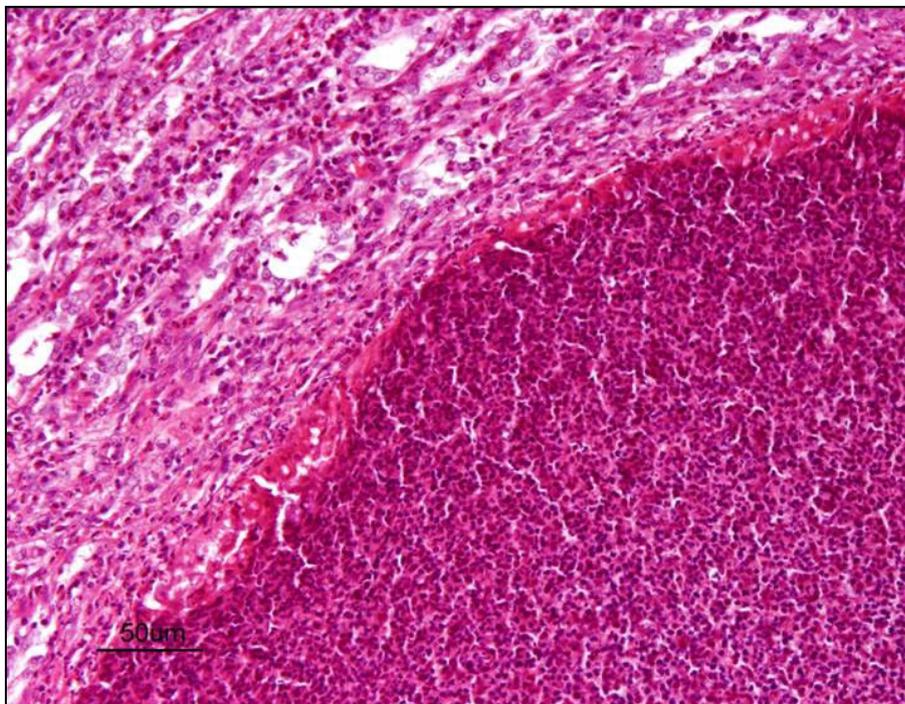
**Figura VII-10.** Mastitis crónica. Pezón. Presencia de abundante material purulento (heterófilos y restos celulares) en los conductos galactóforos. H-E.



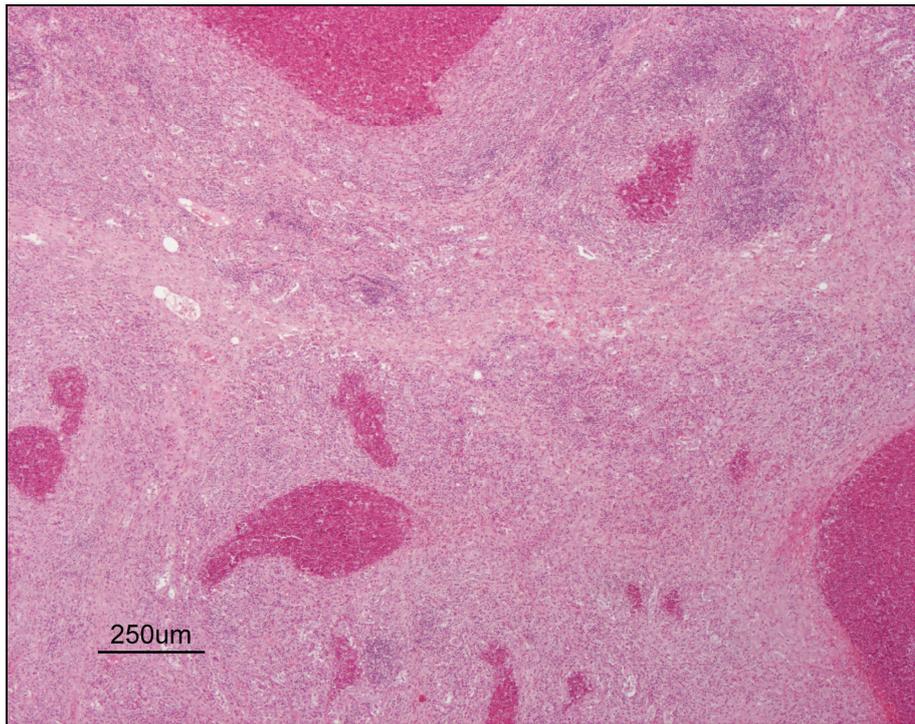
**Figura VII-11.** Mastitis tipo absceso encapsulado maduro. La imagen muestra una gruesa cápsula de tejido conjuntivo compacta (asterisco negro) que delimita abundante material purulento (asterisco blanco). Tricrómico de Masson.



**Figura VII-12.** Mastitis tipo absceso encapsulado inmaduro. En este caso se observa una cápsula laxa de tejido conjuntivo infiltrada por abundantes macrófagos y células plasmáticas (flecha). H-E.



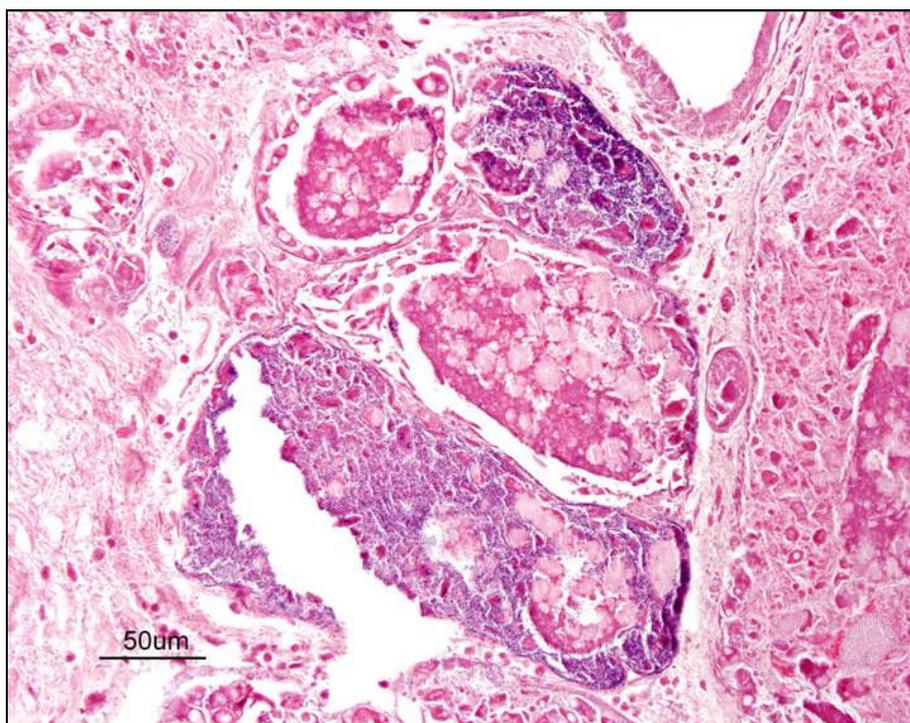
**Figura VII-13.** Mastitis tipo absceso no encapsulado. El material purulento únicamente está rodeado por una fina banda de tejido conectivo y necrosis, con presencia de abundantes heterófilos y macrófagos. H-E.



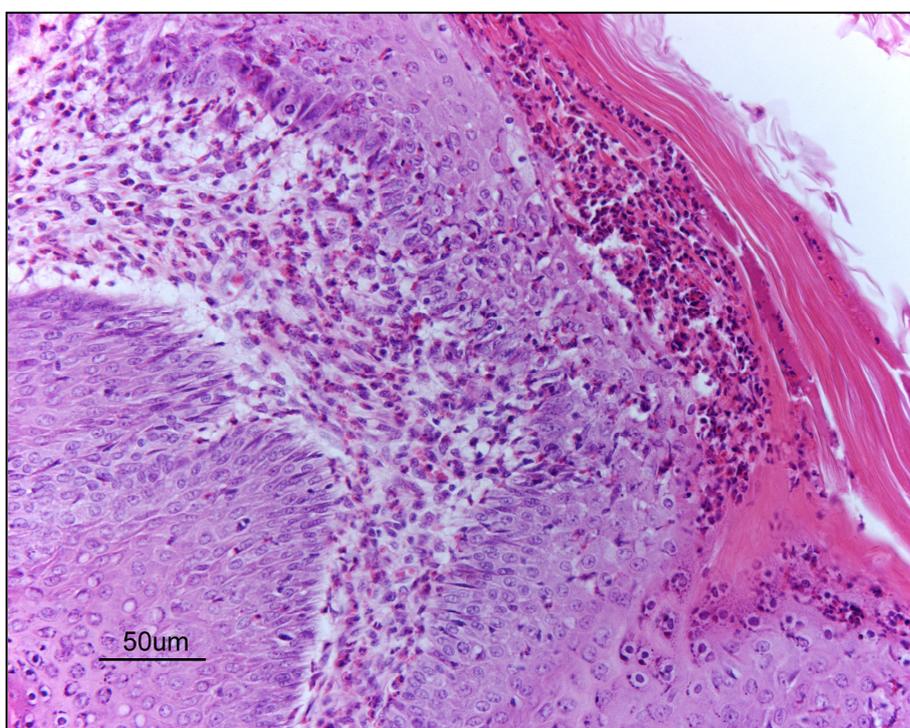
**Figura VII-14.** El tejido adyacente a los abscesos se presentaba atrófico, predominando un intersticio con abundante tejido fibroso. H-E.



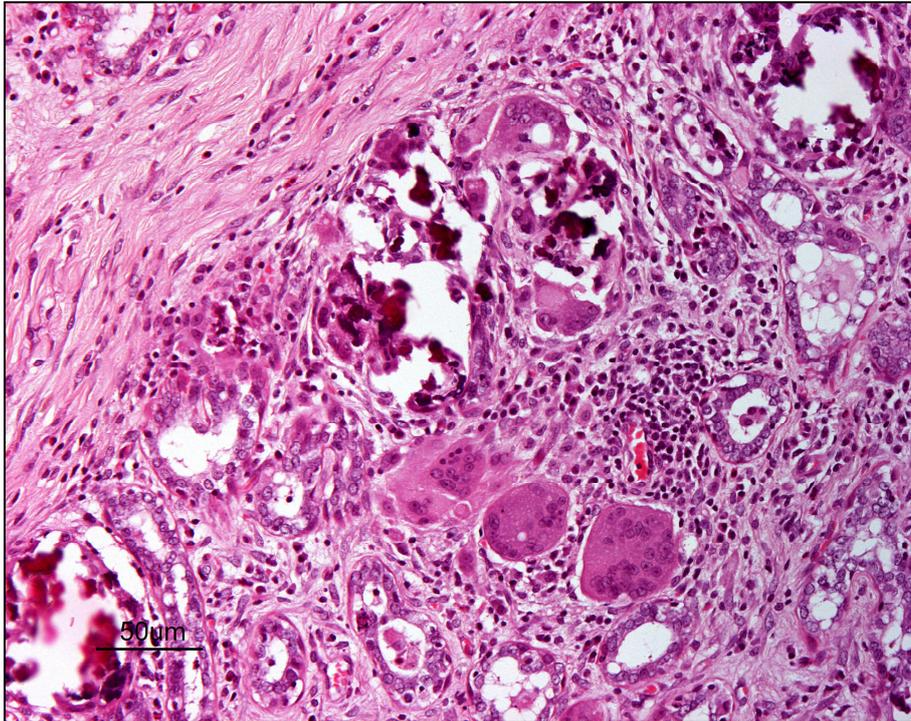
**Figura VII-15.** Mastitis tipo rosetas. Se observan zonas de necrosis no encapsuladas (asteriscos blancos) rodeadas por focos secundarios donde se aprecia necrosis del epitelio alveolar (asteriscos negros). H-E.



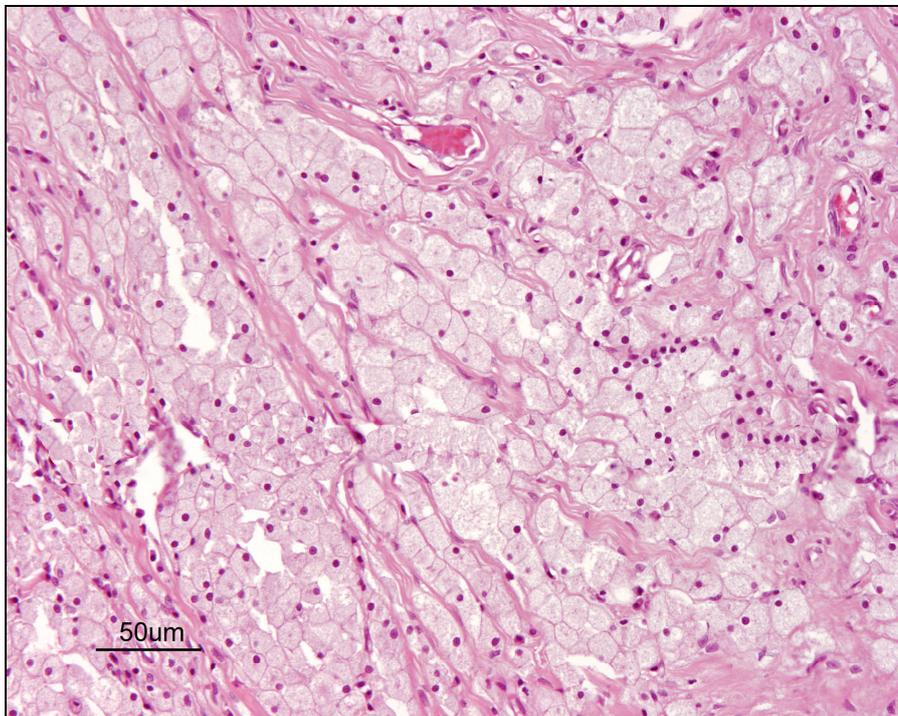
**Figura VII-16.** Mastitis tipo sándwich completo. Se observa una necrosis por coagulación del tejido mamario con presencia de numerosas bacterias. H-E.



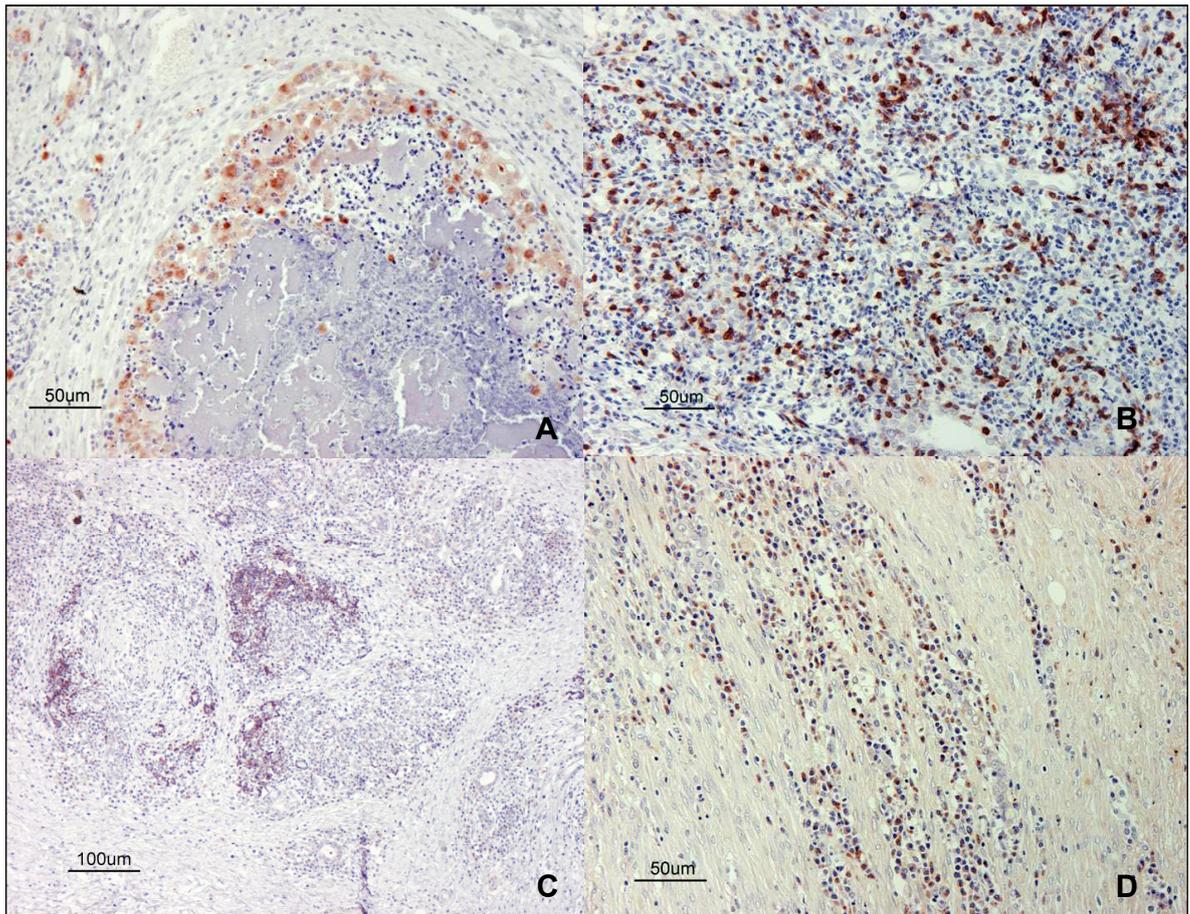
**Figura VII-17.** Dermatitis purulenta en una mastitis tipo sándwich. H-E.



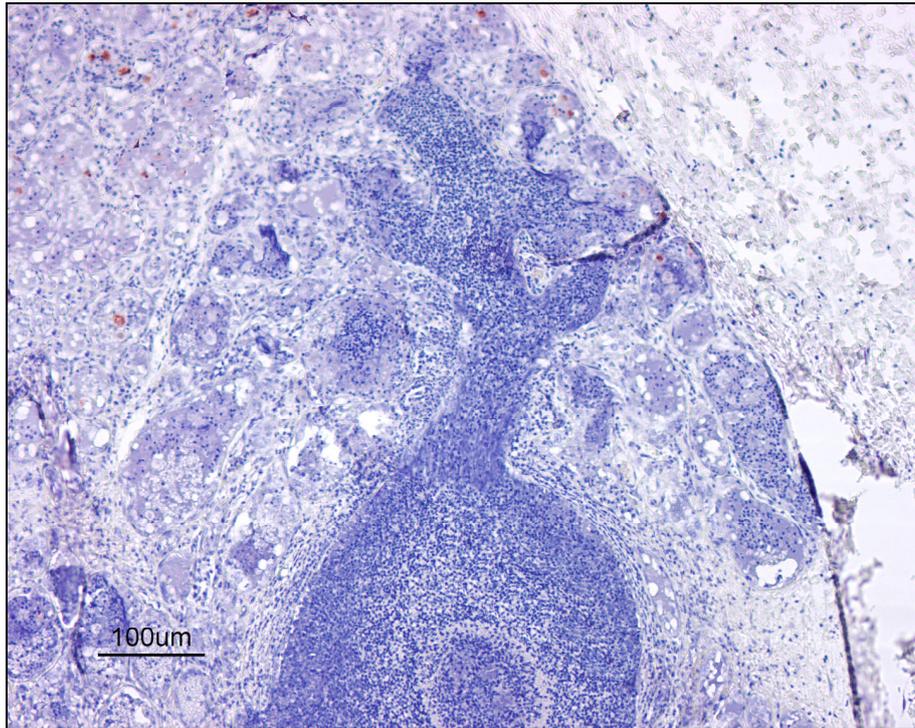
**Figura VII-18.** Presencia de células multinucleadas asociadas a material mineralizado. H-E.



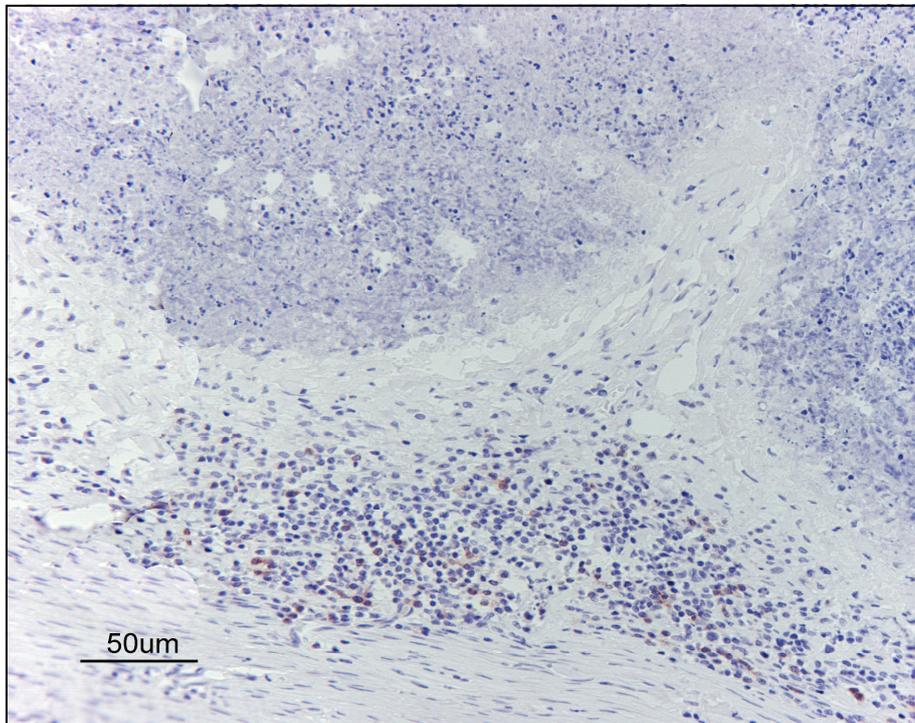
**Figura VII-19.** Presencia de numerosas células espumosas en el tejido intersticial próximo a un absceso. H-E.



**Figura VII-20.** Mastitis tipo absceso encapsulado inmaduro. A. Numerosos macrófagos en la cara interna de la cápsula rodeando al material purulento. B. Abundantes linfocitos T a nivel intersticial. C. Presencia de linfocitos B en el intersticio del tejido mamario involucionado. D. Células plasmáticas en el tejido conjuntivo próximo a un absceso. ABC.



**Figura VII-21.** Mastitis tipo roseta. Se pone de manifiesto el reducido número de macrófagos delimitando los focos satélites de lesión. ABC.



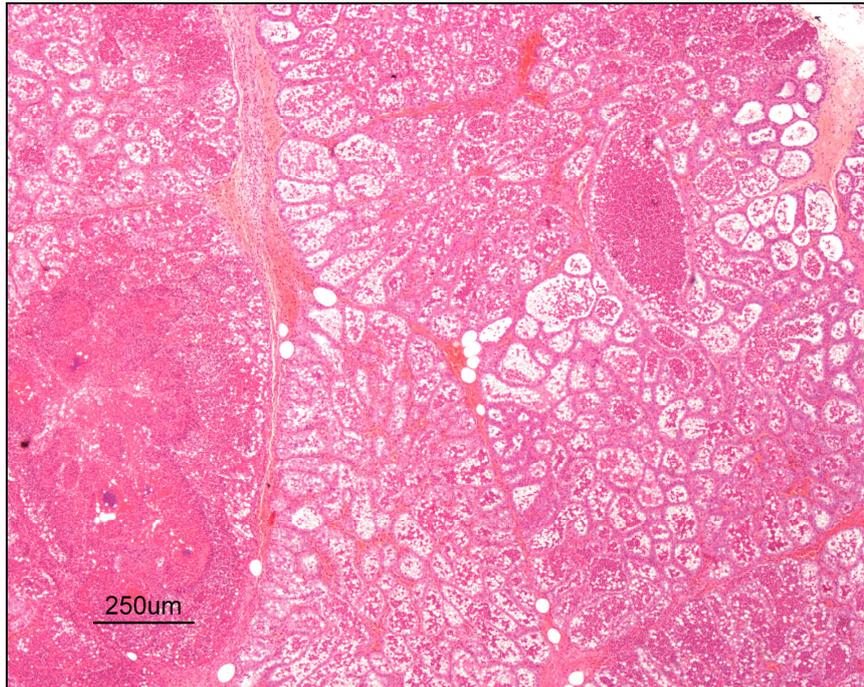
**Figura VII-22.** Mastitis tipo sándwich completo. Escaso número de linfocitos T delimitando la zona de necrosis periglandular. ABC.



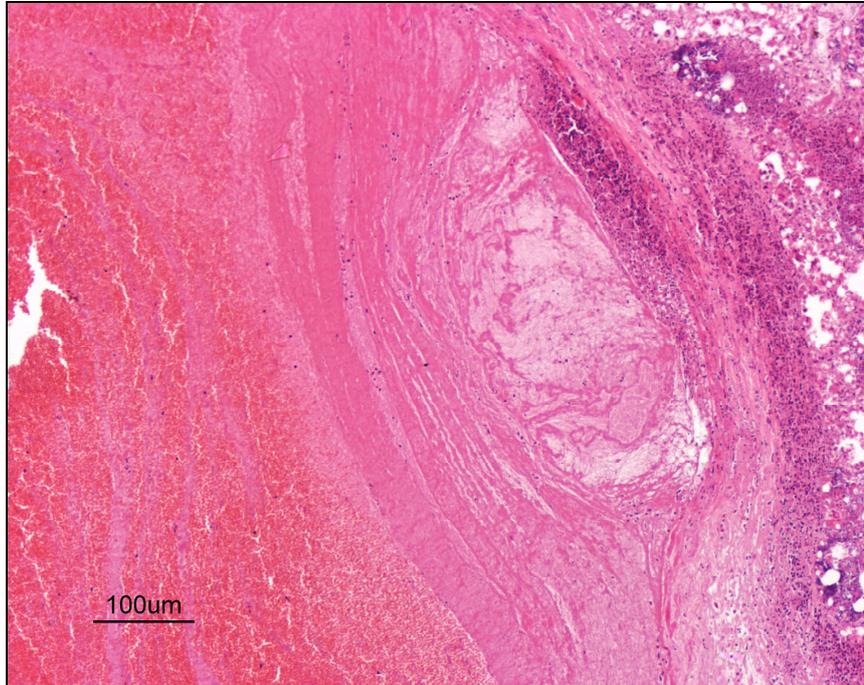
**Figura VII-23.** Infección experimental. La glándula mamaria de la derecha fue inoculada con una cepa A1/II1/δ de *S. aureus*, presentando a las 48 horas claros signos de inflamación en comparación con la mama control de la izquierda.



**Figura VII-24.** Infección experimental. Hiperemia y necrosis del tejido mamario tras 48 horas de la inoculación experimental de una cepa D1/IV1/α de *S. aureus*.



**Figura VII-25.** Infección experimental. Lesiones graves a las 48 horas tras la infección con una cepa A1/II1/δ de *S. aureus*. Se observan amplias zonas de necrosis y gran cantidad de heterófilos en las luces alveolares. H-E.



**Figura VII-26.** Infección experimental. Formación de un trombo después de 48 horas de una infección experimental con una cepa D1/IV1/α de *S. aureus*. Se observa necrosis de la pared del vaso sanguíneo y presencia de una masa de plaquetas y fibrina próximas a la zona lesionada. H-E.

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**



- Aarestrup, F.M., Scott, N.L. y Sordillo, L.M. (1994) Ability of *Staphylococcus aureus* coagulase genotypes to resist neutrophil bactericidal activity and phagocytosis. *Infect Immun* 62: 5679-5682.
- Ackermann, M.R. (2006) Chronic inflammation and wound healing. En *Pathologic basis of veterinary disease*. Vol. 156-157. McGavin, M. and Zachary, J. (eds). St. Louise: Mosby Press.
- Adair, D.M., Worsham, P.L., Hill, K.K., Klevytska, A.M., Jackson, P.J., Friedlander, A.M. y Keim, P. (2000) Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol* 38: 1516-1519.
- Adlam, C., Thorley, C.M., Ward, P.D., Collins, M., Lucken, R.N. y Knight, P.A. (1976) Natural and experimental staphylococcal mastitis in rabbits. *J Comp Pathol* 86: 581-593.
- Agale, S.V., Momin, Y.A. y Khan, W.A. (2009) Cytology of idiopathic granulomatous mastitis: a report of a case masquerading as carcinoma. *Bombay Hospital Journal* 51: 104-106.
- Aires-de-Sousa, M., Parente, C.E., Vieira-da-Motta, O., Bonna, I.C., Silva, D.A. y de Lencastre, H. (2007) Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. *Appl Environ Microbiol* 73: 3845-3849.
- Aires de Sousa, M., Conceicao, T., Simas, C. y de Lencastre, H. (2005) Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and the community. *J Clin Microbiol* 43: 5150-5157.
- Akineden, O., Annemuller, C., Hassan, A.A., Lammler, C., Wolter, W. y Zschock, M. (2001) Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 959-964.

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Amagai, M., Yamaguchi, T., Hanakawa, Y., Nishifuji, K., Sugai, M. y Stanley, J.R. (2002) Staphylococcal exfoliative toxin B specifically cleaves desmoglein 1. *J Invest Dermatol* 118: 845-850.
- Amorena, B., Garcia de Jalon, J.A., Baselga, R., Duchá, J., Latre, M.V., Ferrer, L.M., Sancho, F., Mansson, I., Krovacek, K. y Faris, A. (1991) Infection of rabbit mammary glands with ovine mastitis bacterial strains. *J Comp Pathol* 104: 289-302.
- Amorena, B., Gracia, E., Monzon, M., Leiva, J., Oteiza, C., Perez, M., Alabart, J.L. y Hernandez-Yago, J. (1999) Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *J Antimicrob Chemother* 44: 43-55.
- Appelbaum, P.C. (2006) The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 12 Suppl 1: 16-23.
- Arnaud, M., Chastanet, A. y Debarbouille, M. (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 70: 6887-6891.
- Asadulghani, M., Ogura, Y., Ooka, T., Itoh, T., Sawaguchi, A., Iguchi, A., Nakayama, K. y Hayashi, T. (2009) The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. *PLoS Pathog* 5: e1000408.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (1990) *Current protocols in molecular biology*: John Wiley & Sons, New York, N.Y.

- Azzara, C.D. y Dimick, P.S. (1985) Lipolytic enzyme activity of macrophages in bovine mammary gland secretions. *Journal Dairy Science* 68: 1804-1812.
- Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K. y Hiramatsu, K. (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* 359: 1819-1827.
- Balaban, N. y Rasooly, A. (2000) Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 61: 1-10.
- Bania, J., Dabrowska, A., Korzekwa, K., Zarczynska, A., Bystron, J., Chrzanowska, J. y Molenda, J. (2006) The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. *Lett Appl Microbiol* 42: 315-320.
- Bannerman, T.L., Hancock, G.A., Tenover, F.C. y Miller, J.M. (1995) Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 33: 551-555.
- Barkema, H.W., Schukken, Y.H. y Zadoks, R.N. (2006) The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci* 89: 1877-1895.
- Barrio, B., Vangroenweghe, F., Dosogne, H. y Burvenich, C. (2000) Decreased neutrophil bactericidal activity during phagocytosis of a slime-producing *Staphylococcus aureus* strain. *Vet Res* 31: 603-609.
- Baselga, R., Albizu, I. y Amorena, B. (1994) *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Vet Microbiol* 39: 195-204.
- Becker, K., Roth, R. y Peters, G. (1998) Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J Clin Microbiol* 36: 2548-2553.

- Becker, K., Friedrich, A.W., Lubritz, G., Weilert, M., Peters, G. y Von Eiff, C. (2003) Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J Clin Microbiol* 41: 1434-1439.
- Ben Zakour, N.L., Guinane, C.M. y Fitzgerald, J.R. (2008a) Pathogenomics of the staphylococci: insights into niche adaptation and the emergence of new virulent strains. *FEMS Microbiol Lett* 289: 1-12.
- Ben Zakour, N.L., Sturdevant, D.E., Even, S., Guinane, C.M., Barbey, C., Alves, P.D., Cochet, M.F., Gautier, M., Otto, M., Fitzgerald, J.R. y Le Loir, Y. (2008b) Genome-wide analysis of ruminant *Staphylococcus aureus* reveals diversification of the core genome. *J Bacteriol* 190: 6302-6317.
- Bergdoll, M.S. (1983) Enterotoxins. En *Staphylococci and staphylococcal infections*. Easmon, C.S.F. y Adlam., C. (eds). New York, N.Y.: Academic Press, Inc., pp. 559-598.
- Bergonier, D., de Cremoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G. y Berthelot, X. (2003) Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res* 34: 689-716.
- Beutler, B. (2004) Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40: 845-859.
- Biberstein, E. (1994) Estafilococos. En *Tratado de microbiología veterinaria*. Biberstein, E.L. y Lee, Y.C. (eds). Zaragoza: Acribia, pp. 167-173.
- Bisognano, C., Kelley, W.L., Estoppey, T., Francois, P., Schrenzel, J., Li, D., Lew, D.P., Hooper, D.C., Cheung, A.L. y Vaudaux, P. (2004) A recA-LexA-dependent pathway mediates ciprofloxacin-induced fibronectin binding in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 279: 9064-9071.
- Bjerketorp, J., Nilsson, M., Ljungh, A., Flock, J.I., Jacobsson, K., and Frykberg, L. (2002) A novel von Willebrand factor binding protein expressed by *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 148: 2037-2044.

- Blaiotta, G., Fusco, V., von Eiff, C., Villani, F. y Becker, K. (2006) Biotyping of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by enterotoxin gene cluster (*egc*) polymorphism and *spa* typing analyses. *Appl Environ Microbiol* 72: 6117-6123.
- Blair, J.E. y Williams, R.E.O. (1961) Phage typing of staphylococci. *Bull. W.H.O.* 24: 771-784.
- Blanc, D.S., Struelens, M.J., Deplano, A., De Ryck, R., Hauser, P.M., Petignat, C. y Francioli, P. (2001) Epidemiological validation of pulsed-field gel electrophoresis patterns for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 39: 3442-3445.
- Blanc, D.S., Francioli, P. y Hauser, P.M. (2002) Poor value of pulsed-field gel electrophoresis to investigate long-term scale epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2: 145-148.
- Boden Wastfelt, M.K. y Flock, J.I. (1995) Incidence of the highly conserved *fib* gene and expression of the fibrinogen-binding (Fib) protein among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 33: 2347-2352.
- Bokarewa, M.I., Jin, T. y Tarkowski, A. (2006) *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 504-509.
- Boyce, J.M., Cookson, B., Christiansen, K., Hori, S., Vuopio-Varkila, J., Kocagoz, S., Oztop, A.Y., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Harbarth, S. y Pittet, D. (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 5: 653-663.
- Brouillette, E., Talbot, B.G. y Malouin, F. (2003) The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis. *Infect Immun* 71: 2292-2295.
- Burvenich, C., Paape, M.J., Hill, A.W., Guidry, A.J., Miller, R.H., Heyneman, R., Kremer, W.D. y Brand, A. (1994) Role of the neutrophil leucocyte in the local

and systemic reactions during experimentally induced *E. coli* mastitis in cows immediately after calving. *Vet Q* 16: 45-50.

Butala, M., Zgur-Bertok, D. y Busby, S.J. (2009) The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cell Mol Life Sci* 66: 82-93.

Buzzola, F.R., Alvarez, L.P., Tuchscher, L.P., Barbagelata, M.S., Lattar, S.M., Calvino, L. y Sordelli, D.O. (2007) Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse *agr* groups to invade mammary epithelial cells. *Infect Immun* 75: 886-891.

Casjens, S. (2003) Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol Microbiol* 49: 277-300.

Colbert, D., Anilionis, A., Gelep, P., Farley, J. y Breyer, R. (1984) Molecular organization of the protein A gene and its expression in recombinant host organisms. *J Biol Response Mod* 3: 255-259.

Collery, M.M., Smyth, D.S., Tumilty, J.J., Twohig, J.M. y Smyth, C.J. (2009) Associations between enterotoxin gene cluster types *egc1*, *egc2* and *egc3*, *agr* types, enterotoxin and enterotoxin-like gene profiles, and molecular typing characteristics of human nasal carriage and animal isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 58: 13-25.

Cookson, B.D., Aparicio, P., Deplano, A., Struelens, M., Goering, R. y Marples, R. (1996) Inter-centre comparison of pulsed-field gel electrophoresis for the typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 44: 179-184.

Corpa, J.M., Hermans, K. y Haesebrouck, F. (2009) Main Pathologies associated with *Staphylococcus aureus* infections in rabbits: a review. *World Rabbit Science* 17: 1-11.

Costerton, J.W., Stewart, P.S. y Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.

- Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W. y Gotz, F. (1999) The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 67: 5427-5433.
- Crossman, L., Holden, M., Pain, A. y Parkhill, J. (2004) Genomes beyond compare. *Nat Rev Microbiol* 2: 616-617.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. y Penadés, J.R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 183: 2888-2896.
- Cucarella, C., Tormo, M.A., Úbeda, C., Trotonda, M.P., Monzón, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I. y Penadés, J.R. (2004) Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 72: 2177-2185.
- Cuny, C., Claus, H. y Witte, W. (1996) Discrimination of *S. aureus* strains by PCR for r-RNA gene spacer size polymorphism and comparison to Smal macrorestriction patterns. *Zentralbl Bakteriol* 283: 466-476.
- Charpentier, E., Anton, A.I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y. y Novick, R.P. (2004) Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 70: 6076-6085.
- Cheo, D.L., Bayles, K.W. y Yasbin, R.E. (1991) Cloning and characterization of DNA damage-inducible promoter regions from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 173: 1696-1703.
- Cheung, A.L., Koomey, J.M., Butler, C.A., Projan, S.J. y Fischetti, V.A. (1992) Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6462-6466.
- Cheung, A.L., Eberhardt, K.J., Chung, E., Yeaman, M.R., Sullam, P.M., Ramos, M. y Bayer, A.S. (1994) Diminished virulence of a *sar-lagr*- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *J Clin Invest* 94: 1815-1822.

- Damiani, S., Cattani, M.G., Buonamici, L. y Eusebi, V. (1998) Mammary foam cells. Characterization by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Virchows Arch* 432: 433-440.
- Davis, B.M., Kimsey, H.H., Kane, A.V. y Waldor, M.K. (2002) A satellite phage-encoded antirepressor induces repressor aggregation and cholera toxin gene transfer. *Embo J* 21: 4240-4249.
- Day, N.P., Moore, C.E., Enright, M.C., Berendt, A.R., Smith, J.M., Murphy, M.F., Peacock, S.J., Spratt, B.G. y Feil, E.J. (2001) A link between virulence and ecological abundance in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Science* 292: 114-116.
- Deisenhofer, J. (1981) Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry* 20: 2361-2370.
- Demo, M., Quinones, J. y Martin, V. (1999) Dichotomous keys for identifying *Staphylococcus* isolated from bovine milk. *Rev Latinoam Microbiol* 41: 53-57.
- Devriese, L.A., Godard, C., Okerman, L. y Renault, L. (1981) Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. *Ann Rech Vet* 12: 327-332.
- Devriese, L.A. (1984) A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *J Appl Bacteriol* 56: 215-220.
- Devriese, L.A., Hendrickx, W., Godard, C., Okerman, L. y Haesebrouck, F. (1996) A new pathogenic *Staphylococcus aureus* type in commercial rabbits. *Zentralbl Veterinarmed B* 43: 313-315.
- Diep, B.A., Sensabaugh, G.F., Somboona, N.S., Carleton, H.A. y Perdreau-Remington, F. (2004) Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leucocidin. *J Clin Microbiol* 42: 2080-2084.

- Dinges, M.M., Orwin, P.M. y Schlievert, P.M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13: 16-34, table of contents.
- Dossett, J.H., Kronvall, G., Williams, R.C., Jr. y Quie, P.G. (1969) Antiphagocytic effects of staphylococcal protein A. *J Immunol* 103: 1405-1410.
- Dufour, P., Jarraud, S., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R.P., Bes, M., Etienne, J. y Lina, G. (2002) High genetic variability of the agr locus in *Staphylococcus* species. *J Bacteriol* 184: 1180-1186.
- Duthie, E.S. y Lorenz, L.L. (1952) Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity. *J Gen Microbiol* 6: 95-107.
- Dziewanowska, K., Patti, J.M., Deobald, C.F., Bayles, K.W., Trumble, W.R. y Bohach, G.A. (1999) Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun* 67: 4673-4678.
- Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J. y Spratt, B.G. (2000) Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 38: 1008-1015.
- Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H. y Spratt, B.G. (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7687-7692.
- Fan, J., Shu, M., Zhang, G., Zhou, W., Jiang, Y., Zhu, Y., Chen, G., Peacock, S.J., Wan, C., Pan, W. y Feil, E.J. (2009) Biogeography and virulence of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 4: e6216.
- Farlow, J., Smith, K.L., Wong, J., Abrams, M., Lytle, M. y Keim, P. (2001) *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol* 39: 3186-3192.

- Feil, E.J., Cooper, J.E., Grundmann, H., Robinson, D.A., Enright, M.C., Berendt, T., Peacock, S.J., Smith, J.M., Murphy, M., Spratt, B.G., Moore, C.E. y Day, N.P. (2003) How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol* 185: 3307-3316.
- Feng, Y., Chen, C.J., Su, L.H., Hu, S., Yu, J. y Chiu, C.H. (2008) Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* 32: 23-37.
- Ferens, W.A., Davis, W.C., Hamilton, M.J., Park, Y.H., Deobald, C.F., Fox, L. y Bohach, G. (1998) Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. *Infect Immun* 66: 573-580.
- Ferens, W.A. y Bohach, G.A. (2000) Persistence of *Staphylococcus aureus* on mucosal membranes: superantigens and internalization by host cells. *J Lab Clin Med* 135: 225-230.
- Fitzgerald, J.R., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Smyth, C.J. y Kapur, V. (1997) Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol Infect* 119: 261-269.
- Fitzgerald, J.R., Hartigan, P.J., Meaney, W.J. y Smyth, C.J. (2000) Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. *J Appl Microbiol* 88: 1028-1037.
- Fitzgerald, J.R. y Musser, J.M. (2001) Evolutionary genomics of pathogenic bacteria. *Trends Microbiol* 9: 547-553.
- Flatt, R. (1974) Bacterial diseases. En *The biology of the laboratory rabbit*. Weisbroth, S.H., Flatt, R.E. y Krauss, A.K. (eds). Nueva York, NY, EE UU: Academic Press, pp. 193-236.
- Foster, R.A. (2006) Female Reproductive system. En *Pathologic basis of veterinary disease*. McGavin, M. y Zachary, J. (eds). St. Louise: Mosby Press, pp. 1263-1315.

- Foster, T.J. y Hook, M. (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 6: 484-488.
- Francois, P., Huyghe, A., Charbonnier, Y., Bento, M., Herzig, S., Topolski, I., Fleury, B., Lew, D., Vaudaux, P., Harbarth, S., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Blanc, D.S., Pittet, D. y Schrenzel, J. (2005) Use of an automated multiple-locus, variable-number tandem repeat-based method for rapid and high-throughput genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 43: 3346-3355.
- Frenay, H.M., Theelen, J.P., Schouls, L.M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Verhoef, J., van Leeuwen, W.J. y Mooi, F.R. (1994) Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol* 32: 846-847.
- Frenay, H.M., Bunschoten, A.E., Schouls, L.M., van Leeuwen, W.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Verhoef, J. y Mooi, F.R. (1996) Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 60-64.
- Frothingham, R., and Meeker-O'Connell, W.A. (1998) Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144 ( Pt 5): 1189-1196.
- Fueyo, J.M., Mendoza, M.C., Alvarez, M.A. y Martin, M.C. (2005a) Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. *FEMS Microbiol Lett* 243: 447-454.
- Fueyo, J.M., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., Muniz, J., Alvarez, M.A. y Martin, M.C. (2005b) Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *J Clin Microbiol* 43: 1278-1284.

- Gaffney, E.V., Polanowski, F.P., Blackburn, S.E. y Lambiase, J.P. (1976) Origin, concentration and structural features of human mammary gland cells cultured from breast secretions. *Cell Tissue Res* 172: 269-279.
- Gao, J. y Stewart, G.C. (2004) Regulatory elements of the *Staphylococcus aureus* protein A (Spa) promoter. *J Bacteriol* 186: 3738-3748.
- Gertz, S., Engelmann, S., Schmid, R., Ziebandt, A.K., Tischer, K., Scharf, C., Hacker, J. y Hecker, M. (2000) Characterization of the sigma(B) regulon in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 182: 6983-6991.
- Gill, S.R., Fouts, D.E., Archer, G.L., Mongodin, E.F., Deboy, R.T., Ravel, J., Paulsen, I.T., Kolonay, J.F., Brinkac, L., Beanan, M., Dodson, R.J., Daugherty, S.C., Madupu, R., Angiuoli, S.V., Durkin, A.S., Haft, D.H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., Lee, C., Dimitrov, G., Jiang, L., Qin, H., Weidman, J., Tran, K., Kang, K., Hance, I.R., Nelson, K.E. y Fraser, C.M. (2005) Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* 187: 2426-2438.
- Gillet, Y., Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J.C., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Piemont, Y., Brousse, N., Floret, D. y Etienne, J. (2002) Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359: 753-759.
- Goerke, C., Koller, J. y Wolz, C. (2006) Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 171-177.
- Gomez, M.I., O'Seaghda, M., Magargee, M., Foster, T.J. y Prince, A.S. (2006) *Staphylococcus aureus* protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. *J Biol Chem* 281: 20190-20196.

- Gordon, R.J. y Lowy, F.D. (2008) Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 46 Suppl 5: S350-359.
- Greene, C., McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P.E., Lew, D.P. y Foster, T.J. (1995) Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. *Mol Microbiol* 17: 1143-1152.
- Gronlund, U., Johannisson, A. y Persson Waller, K. (2005) Changes in blood and milk lymphocyte sub-populations during acute and chronic phases of *Staphylococcus aureus* induced bovine mastitis. *Res Vet Sci*.
- Gudding, R., McDonald, J.S. y Cheville, N.F. (1984) Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* mastitis: bacteriologic, histologic, and ultrastructural pathologic findings. *Am J Vet Res* 45: 2525-2531.
- Guidry, A., Fattom, A., Patel, A. y O'Brien, C. (1997) Prevalence of capsular serotypes among *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the United States. *Vet Microbiol* 59: 53-58.
- Gurtler, V. y Barrie, H.D. (1995) Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable-length 16S-23S rDNA spacer regions: characterization of spacer sequences. *Microbiology* 141 ( Pt 5): 1255-1265.
- Guss, B., Uhlen, M., Nilsson, B., Lindberg, M., Sjoquist, J. y Sjudahl, J. (1984) Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *Eur J Biochem* 138: 413-420.
- Hammel, M., Sfyroera, G., Ricklin, D., Magotti, P., Lambris, J.D. y Geisbrecht, B.V. (2007) A structural basis for complement inhibition by *Staphylococcus aureus*. *Nat Immunol* 8: 430-437.
- Hartleib, J., Kohler, N., Dickinson, R.B., Chhatwal, G.S., Sixma, J.J., Hartford, O.M., Foster, T.J., Peters, G., Kehrel, B.E. y Herrmann, M. (2000) Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* 96: 2149-2156.

- Haveri, M., Roslof, A., Rantala, L. y Pyorala, S. (2007) Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J Appl Microbiol* 103: 993-1000.
- Haveri, M., Hovinen, M., Roslof, A. y Pyorala, S. (2008) Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *J Clin Microbiol* 46: 3728-3735.
- Hazariwala, A., Sanders, Q., Hudson, C.R., Hofacre, C., Thayer, S.G. y Maurer, J.J. (2002) Distribution of staphylococcal enterotoxin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from poultry and humans with invasive staphylococcal disease. *Avian Dis* 46: 132-136.
- Heald, C.W. (1979) Morphometric study of experimentally induced *Staphylococcus bovis* mastitis in the cow. *Am J Vet Res* 40: 1294-1298.
- Hermans, K., De Herdt, P., Devriese, L.A., Hendrickx, W., Godard, C. y Haesebrouck, F. (1999) Colonization of rabbits with *Staphylococcus aureus* in flocks with and without chronic staphylococcosis. *Vet Microbiol* 67: 37-46.
- Hermans, K., Haesebrouck, F., Vanechoutte, M., Devriese, L.A., Godard, C. y De Herdt, P. (2000) Differentiation between high and low virulence *Staphylococcus aureus* strains from rabbits by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet Microbiol* 72: 311-319.
- Hermans, K., De Herdt, P., Baele, M., Devriese, L.A. y Haesebrouck, F. (2001) Sequence analysis of a RAPD band differentiating high and low virulence *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. *Vet Microbiol* 82: 61-67.
- Hermans, K., Devriese, L.A. y Haesebrouck, F. (2003) Rabbit staphylococcosis: difficult solutions for serious problems. *Vet Microbiol* 91: 57-64.

- Herron-Olson, L., Fitzgerald, J.R., Musser, J.M. y Kapur, V. (2007) Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 2: e1120.
- Holden, M.T., Feil, E.J., Lindsay, J.A., Peacock, S.J., Day, N.P., Enright, M.C., Foster, T.J., Moore, C.E., Hurst, L., Atkin, R., Barron, A., Bason, N., Bentley, S.D., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clark, L., Corton, C., Cronin, A., Doggett, J., Dowd, L., Feltwell, T., Hance, Z., Harris, B., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., James, K.D., Lennard, N., Line, A., Mayes, R., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., Spratt, B.G. y Parkhill, J. (2004) Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9786-9791.
- Holtfreter, S., Bauer, K., Thomas, D., Feig, C., Lorenz, V., Roschack, K., Friebe, E., Selleng, K., Lovenich, S., Greve, T., Greinacher, A., Panzig, B., Engelmann, S., Lina, G. y Broker, B.M. (2004) egc-Encoded superantigens from *Staphylococcus aureus* are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. *Infect Immun* 72: 4061-4071.
- Holtfreter, S., Grumann, D., Schmutde, M., Nguyen, H.T., Eichler, P., Strommenger, B., Kopron, K., Kolata, J., Giedrys-Kalemba, S., Steinmetz, I., Witte, W. y Broker, B.M. (2007) Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol* 45: 2669-2680.
- Hookey, J.V., Richardson, J.F. y 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.
- Hu, H.L., Cornwell, W.D., Rogers, T.J. y Lin, Y.S. (1996) In vivo analysis of a superantigen-induced T cell suppressor factor. *Cell Immunol* 167: 285-292.

- Huijsdens, X.W., van Dijke, B.J., Spalburg, E., van Santen-Verheuevel, M.G., Heck, M.E., Pluister, G.N., Voss, A., Wannet, W.J. y de Neeling, A.J. (2006) Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5: 26.
- Hussain, M., von Eiff, C., Sinha, B., Joost, I., Herrmann, M., Peters, G. y Becker, K. (2008) *eap* Gene as novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 46: 470-476.
- Ishihara, S., Yokoi, S., Ito, M., Kobayashi, S. y Deguchi, T. (2001) Pathologic significance of *Staphylococcus saprophyticus* in complicated urinary tract infections. *Urology* 57: 17-20.
- Jarraud, S., Cozon, G., Vandenesch, F., Bes, M., Etienne, J. y Lina, G. (1999) Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *J Clin Microbiol* 37: 2446-2449.
- Jarraud, S., Lyon, G.J., Figueiredo, A.M., Gerard, L., Vandenesch, F., Etienne, J., Muir, T.W. y Novick, R.P. (2000) Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 182: 6517-6522.
- Jarraud, S., Peyrat, M.A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougel, C., Etienne, J., Vandenesch, F., Bonneville, M. y Lina, G. (2001) *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 166: 669-677.
- Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J. y Vandenesch, F. (2002) Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 70: 631-641.
- Jaulhac, B., Prevost, G. y Piemont, Y. (1991) Specific detection of the toxic shock syndrome toxin-1 gene using the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 5: 281-284.

- Jeffreys, A.J., Wilson, V. y Thein, S.L. (1992) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. 1985. *Biotechnology* 24: 467-472.
- Ji, G., Beavis, R.C. y Novick, R.P. (1995) Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 12055-12059.
- Ji, G., Beavis, R. y Novick, R.P. (1997) Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 276: 2027-2030.
- Jones, R.N. (2003) Global epidemiology of antimicrobial resistance among community-acquired and nosocomial pathogens: a five-year summary from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Semin Respir Crit Care Med* 24: 121-134.
- Jones, T.C., Hunt, R.D. y King, N.W. (1997) The genital system. En *Veterinary Pathology*. Williams y Wilkins (eds). Maryland, pp. 1149-1221.
- Jones, T.O. y Wieneke, A.A. (1986) Staphylococcal toxic shock syndrome. *Vet Rec* 119: 435-436.
- Jorgensen, H.J., Mork, T., Caugant, D.A., Kearns, A. y Rorvik, L.M. (2005) Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. *Appl Environ Microbiol* 71: 8352-8361.
- Josefsson, E., McCrea, K.W., Ni Eidhin, D., O'Connell, D., Cox, J., Hook, M. y Foster, T.J. (1998) Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 144 ( Pt 12): 3387-3395.
- Kapur, V., Sisco, W.M., Greer, R.S., Whittam, T.S. y Musser, J.M. (1995) Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J Clin Microbiol* 33: 376-380.
- Katsuda, K., Hata, E., Kobayashi, H., Kohmoto, M., Kawashima, K., Tsunemitsu, H. y Eguchi, M. (2005) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated

from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. *Vet Microbiol* 105: 301-305.

Keim, P., Price, L.B., Klevytska, A.M., Smith, K.L., Schupp, J.M., Okinaka, R., Jackson, P.J. y Hugh-Jones, M.E. (2000) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 182: 2928-2936.

Kelly, B.G., Vespermann, A. y Bolton, D.J. (2009) The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food Chem Toxicol* 47: 951-968.

Kennedy, A.D., Otto, M., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Chen, L., Mathema, B., Mediavilla, J.R., Byrne, K.A., Parkins, L.D., Tenover, F.C., Kreiswirth, B.N., Musser, J.M. y DeLeo, F.R. (2008) Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: recent clonal expansion and diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1327-1332.

Kloos, W.E. (1980) Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu Rev Microbiol* 34: 559-592.

Kluytmans, J., van Belkum, A. y Verbrugh, H. (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10: 505-520.

Koreen, L., Ramaswamy, S.V., Graviss, E.A., Naidich, S., Musser, J.M. y Kreiswirth, B.N. (2004) spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol* 42: 792-799.

Koreen, L., Ramaswamy, S.V., Naidich, S., Koreen, I.V., Graff, G.R., Graviss, E.A. y Kreiswirth, B.N. (2005) Comparative sequencing of the serine-aspartate repeat-encoding region of the clumping factor B gene (*clfB*) for resolution within clonal groups of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 43: 3985-3994.

- Kötsche, W. y Gottschalk, C. (1974) *Enfermedades del conejo y de la liebre*. Acribia. Zaragoza.
- Kreiswirth, B.N., Lofdahl, S., Betley, M.J., O'Reilly, M., Schlievert, P.M., Bergdoll, M.S. y Novick, R.P. (1983) The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* 305: 709-712.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H. y Hiramatsu, K. (2001) Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357: 1225-1240.
- Kwan, T., Liu, J., DuBow, M., Gros, P. y Pelletier, J. (2005) The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5174-5179.
- Lange, C., Cardoso, M., Senczek, D. y Schwarz, S. (1999) Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet Microbiol* 67: 127-141.
- Larsen, H.D., Huda, A., Eriksen, N.H. y Jensen, N.E. (2000) Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. *Vet Microbiol* 76: 153-162.
- Larsen, H.D., Aarestrup, F.M. y Jensen, N.E. (2002) Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Vet Microbiol* 85: 61-67.
- Lattar, S.M., Tuchscher, L.P., Caccuri, R.L., Centron, D., Becker, K., Alonso, C.A., Barberis, C., Miranda, G., Buzzola, F.R., von Eiff, C. y Sordelli, D.O. (2009) Capsule Expression and Genotypic Differences Among *Staphylococcus*

*aureus* Isolates from Patients with Chronic or Acute Osteomyelitis. *Infect Immun.*

Layer, F., Ghebremedhin, B., Konig, W. y Konig, B. (2006) Heterogeneity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains at a German University Hospital implicates the circulating-strain pool as a potential source of emerging methicillin-resistant *S. aureus* clones. *J Clin Microbiol* 44: 2179-2185.

Lebas, F. (2000) Biología En *Enfermedades del conejo*. Vol. I. Generalidades. Rosell, J.M. (ed). Madrid: Mundi Prensa, pp. 66-99.

Lee, C.S., McDowell, G.H. y Lascelles, A.K. (1969) The importance of macrophages in the removal of fat from the involuting mammary gland. *Res Vet Sci* 10: 34-38.

Lee, C.S., Wooding, F.B. y Kemp, P. (1980) Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. *J Dairy Res* 47: 39-50.

Leitner, G., Eligulashvily, R., Krifucks, O., Perl, S. y Saran, A. (2003) Immune cell differentiation in mammary gland tissues and milk of cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50: 45-52.

Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F. y Fach, P. (2003) Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* 95: 38-43.

Lina, G., Piemont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.O., Gauduchon, V., Vandenesch, F. y Etienne, J. (1999) Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 29: 1128-1132.

- Lina, G., Bohach, G.A., Nair, S.P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E. y Mariuzza, R. (2004) Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J Infect Dis* 189: 2334-2336.
- Lindsay, J.A., Ruzin, A., Ross, H.F., Kurepina, N. y Novick, R.P. (1998) The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 29: 527-543.
- Lindsay, J.A. y Holden, M.T. (2004) *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol* 12: 378-385.
- Lindsay, J.A., Moore, C.E., Day, N.P., Peacock, S.J., Witney, A.A., Stabler, R.A., Husain, S.E., Butcher, P.D. y Hinds, J. (2006) Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. *J Bacteriol* 188: 669-676.
- Little, J.W. (1984) Autodigestion of *lexA* and phage lambda repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 1375-1379.
- Little, J.W. (2007) Prophage Induction of Phage Lambda. En *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*. McGrath, S. y Sinderen, D.V. (eds): Horizon Scientific Press, pp. 251-272.
- Lowy, F.D. (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339: 520-532.
- Luczak-Kadlubowska, A., Krzyszton-Russjan, J. y Hryniewicz, W. (2006) Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated in Poland in 1996 to 2004 that were deficient in species-specific proteins. *J Clin Microbiol* 44: 4018-4024.
- Lussow, A.R. y MacDonald, H.R. (1994) Differential effects of superantigen-induced "anergy" on priming and effector stages of a T cell-dependent antibody response. *Eur J Immunol* 24: 445-449.

- MacKenzie, F.M., Struelens, M.J., Towner, K.J. y Gould, I.M. (2005) Report of the Consensus Conference on Antibiotic Resistance; Prevention and Control (ARPAC). *Clin Microbiol Infect* 11: 938-954.
- Maiques, E., Úbeda, C., Campoy, S., Salvador, N., Lasa, I., Novick, R.P., Barbe, J., y Penadés, J.R. (2006) beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 188: 2726-2729.
- Marcato, P.S. y Rosmini, R. (1986) Mammary glands. En *Pathology of the rabbit and hare*. Marcato, P.S. y Rosmini, R. (eds). Bologna: Società Editrice Esculapio, pp. 179-186.
- Marples, R.R. y Reith, S. (1992) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in England y Wales. *Commun Dis Rep CDR Rev* 2: R25-29.
- Marrack, P. y Kappler, J. (1990) The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248: 705-711.
- Maslow, J.N., Mulligan, M.E. y Arbeit, R.D. (1993) Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 17: 153-162; quiz 163-154.
- Matsunaga, T., Kamata, S., Kakiichi, N. y Uchida, K. (1993) Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J Vet Med Sci* 55: 297-300.
- McDevitt, D. y Foster, T.J. (1995) Variation in the size of the repeat region of the fibrinogen receptor (clumping factor) of *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiology* 141 (Pt 4): 937-943.
- McKenney, D., Hubner, J., Muller, E., Wang, Y., Goldmann, D.A. y Pier, G.B. (1998) The ica locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect Immun* 66: 4711-4720.

- McLauchlin, J., Narayanan, G.L., Mithani, V. y O'Neill, G. (2000) The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J Food Prot* 63: 479-488.
- McNamee, P.T., McCullagh, J.J., Thorp, B.H., Ball, H.J., Graham, D., McCullough, S.J., McConaghy, D. y Smyth, J.A. (1998) Study of leg weakness in two commercial broiler flocks. *Vet Rec* 143: 131-135.
- Mehndiratta, P.L., Bhalla, P., Ahmed, A. y Sharma, Y.D. (2009) Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by PCR-RFLP of Spa gene: a reference laboratory perspective. *Indian J Med Microbiol* 27: 116-122.
- Menzies, B.E. (2003) The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Curr Opin Infect Dis* 16: 225-229.
- Mertz, P.M., Cardenas, T.C., Snyder, R.V., Kinney, M.A., Davis, S.C. y Plano, L.R. (2007) *Staphylococcus aureus* virulence factors associated with infected skin lesions: influence on the local immune response. *Arch Dermatol* 143: 1259-1263.
- Middleton, J.R. y Fox, L.K. (2002) Influence of *Staphylococcus aureus* strain on mammary quarter milk production. *Vet Rec* 150: 411-413.
- Miragaia, M., Couto, I., Pereira, S.F., Kristinsson, K.G., Westh, H., Jarlov, J.O., Carrico, J., Almeida, J., Santos-Sanches, I. y de Lencastre, H. (2002) Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence of geographic dissemination. *J Clin Microbiol* 40: 430-438.
- Monecke, S., Luedicke, C., Slickers, P. y Ehricht, R. (2009) Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in asymptomatic carriers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
- Montanaro, L., Arciola, C.R., Baldassarri, L. y Borsetti, E. (1999) Presence and expression of collagen adhesin gene (*cna*) and slime production in

- Staphylococcus aureus* strains from orthopaedic prosthesis infections. *Biomaterials* 20: 1945-1949.
- Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P. y Castiglioni, B. (2007) Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Vet Microbiol* 124: 66-72.
- Mork, T., Tollersrud, T., Kvitle, B., Jorgensen, H.J. y Waage, S. (2005) Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from ovine intramammary infections in Norway. *Vet Microbiol* 106: 265-273.
- Nashev, D., Toshkova, K., Salasia, S.I., Hassan, A.A., Lammler, C. y Zschock, M. (2004) Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiol Lett* 233: 45-52.
- Ni Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Hook, M. y Foster, T.J. (1998) Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 30: 245-257.
- Nickerson, S.C. y Heald, C.W. (1981) Histopathologic response of the bovine mammary gland to experimentally induced *Staphylococcus aureus* infection. *Am J Vet Res* 42: 1351-1355.
- Nickerson, S.C. y Heald, C.W. (1982) Cells in local reaction to experimental *Staphylococcus aureus* infection in bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 65: 105-116.
- Nizet, V. (2007) Understanding how leading bacterial pathogens subvert innate immunity to reveal novel therapeutic targets. *J Allergy Clin Immunol* 120: 13-22.
- Novick, R. (1967) Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology* 33: 155-166.

- Novick, R.P. (2000) Pathogenicity factors and their regulation. En *Gram-positive pathogens*. Fischetti, V., Novick, R.P., Ferretti, J. y Rood, J.L.P.D. (eds). Washington DC: American Society for Microbiology., pp. 392–407.
- Novick, R.P. (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 48: 1429-1449.
- O'Riordan, K. y Lee, J.C. (2004) *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* 17: 218-234.
- Ogston, A. (1882) Micrococcus poisoning. *J Anat.* 17: 24-58.
- Okerman, L., Devriese, L.A., Maertens, L., Okerman, F. y Godard, C. (1984) Cutaneous staphylococcosis in rabbits. *Vet Rec* 114: 313-315.
- Oliveira, D.C., Tomasz, A. y de Lencastre, H. (2002) Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2: 180-189.
- Paape, M., Mehrzad, J., Zhao, X., Detilleux, J. y Burvenich, C. (2002) Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7: 109-121.
- Paape, M.J., Wergin, W.P., Guidry, A.J. y Pearson, R.E. (1979) Leukocytes-second line of defense against invading mastitis pathogens. *J Dairy Sci* 62: 135-153.
- Paape, M.J., Bannerman, D.D., Zhao, X. y Lee, J.W. (2003) The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res* 34: 597-627.
- Palma, M., Haggar, A. y Flock, J.I. (1999) Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol* 181: 2840-2845.
- Park, Y.H., Joo, Y.S., Park, J.Y., Moon, J.S., Kim, S.H., Kwon, N.H., Ahn, J.S., Davis, W.C. y Davies, C.J. (2004) Characterization of lymphocyte

- subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. *J Vet Sci* 5: 29-39.
- Parker, M. (1962) Phage typing and the epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection. *J Appl Bacteriol* 25: 389-402.
- Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J. y Hook, M. (1994) MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 48: 585-617.
- Peacock, S.J., de Silva, I. y Lowy, F.D. (2001) What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol* 9: 605-610.
- Peacock, S.J., Moore, C.E., Justice, A., Kantzanou, M., Story, L., Mackie, K., O'Neill, G. y Day, N.P. (2002) Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 70: 4987-4996.
- Peng, H.L., Novick, R.P., Kreiswirth, B., Kornblum, J. y Schlievert, P. (1988) Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 170: 4365-4372.
- Peris, B. y Corpa, J.M. (2003) Las estafilococias en el conejo. *Cunicultura*. 164 (27): 271-281.
- Peris, B., Segura, P., Viana, D., Selva, L., Penadés, J.R. y Corpa, J.M. (2006) La mamitis estafilócica cunícola. *Lagomorpha* 143 (30): 6-13.
- Perl, T.M., Cullen, J.J., Wenzel, R.P., Zimmerman, M.B., Pfaller, M.A., Sheppard, D., Twombly, J., French, P.P. y Herwaldt, L.A. (2002) Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 346: 1871-1877.
- Postle, D.S., Roguinsky, M. y Poutrel, B. (1978) Induced staphylococcal infections in the bovine mammary gland. *Am J Vet Res* 39: 29-35.

- Postma, B., Poppelier, M.J., van Galen, J.C., Prossnitz, E.R., van Strijp, J.A., de Haas, C.J. y van Kessel, K.P. (2004) Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J Immunol* 172: 6994-7001.
- Prasad, L., Leduc, Y., Hayakawa, K. y Delbaere, L.T. (2004) The structure of a universally employed enzyme: V8 protease from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60: 256-259.
- Prasad, L.B. y Newbould, F.H. (1968) Initial response of the bovine mammary gland to invasion by *Staphylococcus aureus*. *Can Vet J* 9: 170-177.
- Prevost, G., Couppie, P., Prevost, P., Gayet, S., Petiau, P., Cribier, B., Monteil, H. y Piemont, Y. (1995) Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol* 42: 237-245.
- Proft, T. y Fraser, J.D. (2003) Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol* 133: 299-306.
- Projan, S.J. y Novick, R.P. (1997) The molecular basis of pathogenesis. En *The staphylococci in human disease*. Crossley, K.B. y Archer, G.L. (eds). New York: Churchill Livingstone.
- Quevedo, F., Pascual, J.J., Blas, E., y Cervera, C. (2003) Influencia de la madre sobre el crecimiento y la mortalidad de los gazapos en cebo. En *XXVIII Symposium de Cunicultura* Alcañiz, pp. 115-122
- Quinn, P. (1999) *Staphylococcus* species. En *Clinical veterinary microbiology*. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. y Carter, G.R. (eds). London: Mosby, pp. 118-126.
- Rainard, P., Corrales, J.C., Barrio, M.B., Cochard, T. y Poutrel, B. (2003) Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF'-PV leukotoxin. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 272-277.

- Rainard, P. y Riollot, C. (2006) Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res* 37: 369-400.
- Robbins, S.L., Kumar, V. y Cotran, R.S. (1995a) El riñón. En *Patología estructural y funcional*. Schoen, F.J. (ed), pp. 1025-1094.
- Robbins, S.L., Kumar, V. y Cotran, R.S. (1995b) Vasos sanguíneos. En *Patología estructural y funcional*. Schoen, F.J. (ed), pp. 519-572.
- Rodgers, J.D., McCullagh, J.J., McNamee, P.T., Smyth, J.A. y Ball, H.J. (1999) Comparison of *Staphylococcus aureus* recovered from personnel in a poultry hatchery and in broiler parent farms with those isolated from skeletal disease in broilers. *Vet Microbiol* 69: 189-198.
- Rooijackers, S.H., Ruyken, M., Roos, A., Daha, M.R., Presanis, J.S., Sim, R.B., van Wamel, W.J., van Kessel, K.P. y van Strijp, J.A. (2005) Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat Immunol* 6: 920-927.
- Rosell, J.M. (1996) Situación actual y perspectivas de la cunicultura. En *Zootecnia. Bases de Producción Animal. Producciones Cunícola y Avícolas Alternativas*. Buxadé, C. (ed). Madrid: Mundi-Prensa, pp. 17-29.
- Rosell, J.M., De la Fuente, L.F., García, F., Gracia, E. y Baselga, R. (2000) Enfermedades de la reproducción: conejas. En *Enfermedades del conejo*. Vol. II. Rosell, J.M. (ed). Madrid: Mundiprensa, pp. 71-122.
- Rosell, J.M. y de la Fuente, L.F. (2009) Culling and mortality in breeding rabbits. *Prev Vet Med* 88: 120-127.
- Ruppitsch, W., Indra, A., Stoger, A., Mayer, B., Stadlbauer, S., Wewalka, G. y Allerberger, F. (2006) Classifying *spa* types in complexes improves interpretation of typing results for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 44: 2442-2448.

- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A. y Barrell, B. (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16: 944-945.
- Sabat, A., Melles, D.C., Martirosian, G., Grundmann, H., van Belkum, A. y Hryniewicz, W. (2006) Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding sdr genes among nasal-carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 44: 1135-1138.
- Salasia, S.I., Khusnan, Z., Lammler, C. y Zschock, M. (2004) Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *J Vet Sci* 5: 103-109.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor
- Schefold, J.C., Esposito, F., Storm, C., Heuck, D., Kruger, A., Jorres, A., Witte, W. y Hasper, D. (2007) Therapy-refractory Panton Valentine Leukocidin-positive community-acquired methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* sepsis with progressive metastatic soft tissue infection: a case report. *J Med Case Reports* 1: 165.
- Schlafer, D.H. (2007) Female genital system. En *Pathology of Domestic Animals*. Vol. 3. Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. y Palmer, N. (eds). Orlando: Academic Press, Inc. pp. 429-564.
- Schmitz, F.J., Mackenzie, C.R., Hofmann, B., Verhoef, J., Finken-Eigen, M., Heinz, H.P. y Kohrer, K. (1997) Specific information concerning taxonomy, pathogenicity and methicillin resistance of staphylococci obtained by a multiplex PCR. *J Med Microbiol* 46: 773-778.
- Schneewind, O., Model, P. y Fischetti, V.A. (1992) Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. *Cell* 70: 267-281.

- Schuberth, H.J., Krueger, C., Zerbe, H., Bleckmann, E. y Leibold, W. (2001) Characterization of leukocytotoxic and superantigen-like factors produced by *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Vet Microbiol* 82: 187-199.
- Schumacher-Perdreau, F., Jansen, B., Seifert, H., Peters, G. y Pulverer, G. (1994) Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a teaching hospital-epidemiological and microbiological surveillance. *Zentralbl Bakteriol* 280: 550-559.
- Schwarzkopf, A. y Karch, H. (1994) Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: potential and limits for use as epidemiological marker. *J Clin Microbiol* 32: 2407-2412.
- Segura, P., Martinez, J., Peris, B., Selva, L., Viana, D., Penadés, J.R. y Corpa, J.M. (2007) Staphylococcal infections in rabbit does on two industrial farms. *Vet Rec* 160: 869-872.
- Sharma, N.K., Rees, C.E. y Dodd, C.E. (2000) Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Appl Environ Microbiol* 66: 1347-1353.
- Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S.O., Smith, D.H., Waddington, M., Dodge, D.E., Bost, D.A., Riehman, M., Naidich, S. y Kreiswirth, B.N. (1999) Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 37: 3556-3563.
- Shopsin, B., Gomez, M., Waddington, M., Riehman, M. y Kreiswirth, B.N. (2000) Use of coagulase gene (*coa*) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 38: 3453-3456.
- Sloane, R., de Azavedo, J.C., Arbuthnott, J.P., Hartigan, P.J., Kreiswirth, B., Novick, R. y Foster, T.J. (1991) A toxic shock syndrome toxin mutant of *Staphylococcus aureus* isolated by allelic replacement lacks virulence in a rabbit uterine model. *FEMS Microbiol Lett* 62: 239-244.

- Smeltzer, M.S., Gillaspay, A.F., Pratt, F.L., Jr., Thames, M.D. y Iandolo, J.J. (1997) Prevalence and chromosomal map location of *Staphylococcus aureus* adhesin genes. *Gene* 196: 249-259.
- Smith, E.M., Green, L.E., Medley, G.F., Bird, H.E. y Dowson, C.G. (2005) Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolated from high-somatic-cell-count cows and the environment of an organic dairy farm in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 43: 4731-4736.
- Smyth, D.S., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Fitzgerald, J.R., Deobald, C.F., Bohach, G.A. y Smyth, C.J. (2005) Superantigen genes encoded by the egc cluster and SaPI<sub>bov</sub> are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. *J Med Microbiol* 54: 401-411.
- Sordillo, L.M., Doymaz, M.Z. y Oliver, S.P. (1989) Morphological study of chronic *Staphylococcus aureus* mastitis in the lactating bovine mammary gland. *Res Vet Sci* 47: 247-252.
- Springer, B., Orendi, U., Much, P., Hoger, G., Ruppitsch, W., Krziwanek, K., Metz-Gercek, S. y Mittermayer, H. (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new zoonotic agent? *Wien Klin Wochenschr* 121: 86-90.
- Strommenger, B., Cuny, C., Werner, G. y Witte, W. (2004) Obvious lack of association between dynamics of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in central Europe and agr specificity groups. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 15-19.
- Strommenger, B., Bräulke, C., Heuck, D., Schmidt, C., Pasemann, B., Nubel, U. y Witte, W. (2008) *spa* Typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *J Clin Microbiol* 46: 574-581.
- Struelens, M.J., Hawkey, P.M., French, G.L., Witte, W. y Tacconelli, E. (2009) Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs. *Clin Microbiol Infect* 15: 112-119.

- Su, C., Herbelin, C., Frieze, N., Skardova, O. y Sordillo, L.M. (1999) Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cattle in different geographical areas. *Epidemiol Infect* 122: 329-336.
- Sundstedt, A., Grundstrom, S. y Dohlsten, M. (1998) T cell- and perforin-dependent depletion of B cells in vivo by staphylococcal enterotoxin A. *Immunology* 95: 76-82.
- Sung, J.M., Lloyd, D.H. y Lindsay, J.A. (2008) *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology* 154: 1949-1959.
- Swartz, R., Jooste, P.J. y Novello, J.C. (1985) Bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Bloemfontein dairy herds. *J S Afr Vet Assoc* 56: 69-73.
- Takeuchi, F., Watanabe, S., Baba, T., Yuzawa, H., Ito, T., Morimoto, Y., Kuroda, M., Cui, L., Takahashi, M., Ankai, A., Baba, S., Fukui, S., Lee, J.C. y Hiramatsu, K. (2005) Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol* 187: 7292-7308.
- Tang, Y.W., Procop, G.W. y Persing, D.H. (1997) Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin Chem* 43: 2021-2038.
- Tenover, F., and Gayne, R.P. (2000) The epidemiology of Staphylococcus infections. En: *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, V.A., Novick R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A. y Rood J.I. (eds.) Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Tenover, F.C., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Hebert, G.A., Hill, B., Hollis, R., y *et al.* (1994) Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 32: 407-415.

- Tollersrud, T., Kenny, K., Reitz, A.J., Jr. y Lee, J.C. (2000) Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *J Clin Microbiol* 38: 2998-3003.
- Trinidad, P., Nickerson, S.C. y Adkinson, R.W. (1990) Histopathology of staphylococcal mastitis in unbred dairy heifers. *J Dairy Sci* 73: 639-647.
- Tristan, A., Ying, L., Bes, M., Etienne, J., Vandenesch, F. y Lina, G. (2003) Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *J Clin Microbiol* 41: 4465-4467.
- Trotonda, M.P., Manna, A.C., Cheung, A.L., Lasa, I., and Penadés, J.R. (2005) SarA positively controls *bap*-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 187: 5790-5798.
- Úbeda, C., Maiques, E., Knecht, E., Lasa, I., Novick, R.P. y Penadés, J.R. (2005) Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Mol Microbiol* 56: 836-844.
- Úbeda, C., Maiques, E., Tormo, M.A., Campoy, S., Lasa, I., Barbe, J., Novick, R.P., y Penadés, J.R. (2007) SaPI operon I is required for SaPI packaging and is controlled by LexA. *Mol Microbiol* 65: 41-50.
- Úbeda, C., Maiques, E., Barry, P., Matthews, A., Tormo, M.A., Lasa, I., Novick, R.P. y Penadés, J.R. (2008) SaPI mutations affecting replication and transfer and enabling autonomous replication in the absence of helper phage. *Mol Microbiol* 67: 493-503.
- van Belkum, A., van Leeuwen, W., Kaufmann, M.E., Cookson, B., Forey, F., Etienne, J., Goering, R., Tenover, F., Steward, C., O'Brien, F., Grubb, W., Tassios, P., Legakis, N., Morvan, A., El Solh, N., de Ryck, R., Struelens, M., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., Kooistra, M., Talens, A., Witte, W. y Verbrugh, H. (1998) Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel

- electrophoresis of Smal macrorestriction fragments: a multicenter study. *J Clin Microbiol* 36: 1653-1659.
- van Belkum, A., Struelens, M., de Visser, A., Verbrugh, H. y Tibayrenc, M. (2001) Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 14: 547-560.
- van Duijkeren, E., Houwers, D.J., Schoormans, A., Broekhuizen-Stins, M.J., Ikawaty, R., Fluit, A.C. y Wagenaar, J.A. (2008) Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* between humans and animals. *Vet Microbiol* 128: 213-215.
- van Leeuwen, W.B., Melles, D.C., Alaidan, A., Al-Ahdal, M., Boelens, H.A., Snijders, S.V., Wertheim, H., van Duijkeren, E., Peeters, J.K., van der Spek, P.J., Gorkink, R., Simons, G., Verbrugh, H.A. y van Belkum, A. (2005) Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 187: 4584-4591.
- Vancraeynest, D., Hermans, K. y Haesebrouck, F. (2004) Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Vet Microbiol* 103: 241-247.
- Vancraeynest, D., Haesebrouck, F., Deplano, A., Denis, O., Godard, C., Wildemauwe, C. y Hermans, K. (2006a) International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53: 418-422.
- Vancraeynest, D., Hermans, K. y Haesebrouck, F. (2006b) Prevalence of genes encoding exfoliative toxins, leucotoxins and superantigens among high and low virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains. *Vet Microbiol* 117: 211-218.
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M.C., Lina, G., Nimmo, G.R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenland, T., Reverdy, M.E. y Etienne, J. (2003) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying

Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 9: 978-984.

Vautor, E., Magnone, V., Rios, G., Le Brigand, K., Bergonier, D., Lina, G., Meugnier, H., Barbry, P., Thiery, R. y Pepin, M. (2009) Genetic differences among *Staphylococcus aureus* isolates from dairy ruminant species: a single-dye DNA microarray approach. *Vet Microbiol* 133: 105-114.

Vojtov, N., Ross, H.F. y Novick, R.P. (2002) Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10102-10107.

von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H. y Peters, G. (2001) Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* 344: 11-16.

von Eiff, C., Friedrich, A.W., Peters, G. y Becker, K. (2004) Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 49: 157-162.

Waldor, M.K., Rubin, E.J., Pearson, G.D., Kimsey, H. y Mekalanos, J.J. (1997) Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTXphi are encoded by region RS2. *Mol Microbiol* 24: 917-926.

Wang, S.C., Wu, C.M., Xia, S.C., Qi, Y.H., Xia, L.N. y Shen, J.Z. (2009) Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China. *Vet Microbiol*.

Watanabe, S., Ito, T., Takeuchi, F., Endo, M., Okuno, E. y Hiramatsu, K. (2005) Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 187: 3698-3707.

Weinbauer, M.G. y Rassoulzadegan, F. (2004) Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environ Microbiol* 6: 1-11.

- Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A. y Nouwen, J.L. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5: 751-762.
- Wesson, C.A., Liou, L.E., Todd, K.M., Bohach, G.A., Trumble, W.R. y Bayles, K.W. (1998) *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect Immun* 66: 5238-5243.
- Wiese-Posselt, M., Heuck, D., Draeger, A., Mielke, M., Witte, W., Ammon, A. y Hamouda, O. (2007) Successful termination of a furunculosis outbreak due to lukS-lukF-positive, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a German village by stringent decolonization, 2002-2005. *Clin Infect Dis* 44: e88-95.
- Zadoks, R.N., van Leeuwen, W.B., Kreft, D., Fox, L.K., Barkema, H.W., Schukken, Y.H. y van Belkum, A. (2002) Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *J Clin Microbiol* 40: 3894-3902.
- Zaidi, N., Konstantinou, K. y Zervos, M. (2003) The role of molecular biology and nucleic Acid technology in the study of human infection and epidemiology. *Arch Pathol Lab Med* 127: 1098-1105.
- Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Dapra, V. y Piccinini, R. (2006) Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb Pathog* 40: 177-183.
- Zschock, M., Kloppert, B., Wolter, W., Hamann, H.P. y Lammler, C. (2005) Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet Microbiol* 108: 243-249.

## Agradecimientos

Cuando uno está finalizando la tesis doctoral y echa la vista atrás recuerda todo el sufrimiento que conlleva realizarla, pero rápidamente le vienen a la mente numerosas personas a las que ha de estar agradecido, bien porque han contribuido directamente en la elaboración de esta tesis o bien porque han compartido muchas horas de duro trabajo.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis, Juan Manuel Corpa y José Penadés, por iniciarme en el mundo de la investigación y motivarme para poder finalizar este trabajo.

He de agradecer también la ayuda inestimable de todos los cunicultores, así como de José María Pacheco, Veterinario de Nanta, sin su colaboración no hubiese sido posible realizar esta tesis doctoral. También a José Luis Cano por iniciarme en el mundo de la citometría de flujo y a Ernesto Gómez por su valiosísima ayuda con la estadística.

Tampoco puedo olvidarme de Joaquín Ortega, que me ha transmitido su pasión por la Anatomía Patológica, y de las personas del laboratorio de CAHFS, en San Bernardino, sobre todo Santiago Diab, Francisco Uzal y E.J. Hurley.

Por su puesto no puedo olvidarme de todas las personas con las que he compartido tantas horas de trabajo en el laboratorio, tanto en el CEU como en Segorbe, en todas mis etapas de tesis. A todos ellos gracias por todo el apoyo y los buenos momentos vividos. Especialmente tengo que agradecer a Laura Selva todo su trabajo y su apoyo durante las numerosas horas que hemos compartido juntos.

Por último quiero agradecer a mis amigos, a mi familia y a Inma, todo su apoyo, cariño y comprensión, gracias por estar siempre ahí.