

Universidad Cardenal Herrera-CEU

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



**MECANISMOS DE PERSISTENCIA Y
VIRULENCIA DE *Staphylococcus aureus*,
Y MODO DE ELIMINACIÓN EN EL
HOSPEDADOR.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Laura Selva Martínez

Dirigida por: Dr. Juan Manuel Corpa Arenas

Dr. 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 (CTIDIA/2002/62, GV05/202 y ARVIV/2007/007).

A mis padres

La verdad es que no se muy bien por donde empezar. He vivido este momento muchas veces, la tesis de Carles, más tarde M^a Pilar, después Geles y por último Eli. Llegaba ese día en el cual, después de mucho esfuerzo, aparecían en el laboratorio con su tesis encuadernada y todo el mundo íbamos a leer los agradecimientos. Lo había pensado muchas veces y por fin ha llegado mi momento.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de Tesis la oportunidad que me han dado. Gracias a Juanma por iniciarme en el mundo de la investigación y a José por permitirme trabajar en su laboratorio, que aunque en ocasiones sea duro, el trabajo se ve recompensado.

En segundo lugar, quiero dar las gracias a mis compañeros. Hace ya cinco años que empecé mi beca en el CEU, entonces compartíamos bancada con BQC (Mocholí, Pilar, Carmen, Enric,...), recuerdo que la Trot estaba de estancia en los USA y David y yo ocupábamos su sitio. Al principio fue Carles quien guió nuestros pasos, gracias. Por allí ya estaban Geles, Eli y Miguel. Recuerdo mi primera cena, la Trot regresaba a lo "Typical Spanish", gracias por tu alegría y amistad; De Eli, que voy a decir, creo que es la persona con la que he compartido más confidencias en el labo. Gracias por ser como eres y por tu ayuda en todo momento, incluso ahora que estás en Boston; Geli todavía sigue en el labo, siempre estás ahí cuando tenemos dudas, por ello gracias.

Al poco tiempo de empezar la beca, llegó Jose y más tarde Mariam. Gracias a ellos he pasado momentos muy divertidos en el laboratorio. Para mi sois dos grandes compañeros y mejor que eso, amigos, que más se puede decir. Con Miguel se puede hablar de todo, bueno algunos temas se repiten más que otros, je je!, gracias por eso y por tu apoyo en momentos de bajón. Bueno y Miguelín me lleva a Nachete, gracias por nuestros momentos de risas. En Segorbe llegó Silvia, gracias por hacernos más fácil el trabajo, y también llegaron nuevos aires: Nuria, gracias por tu paciencia conmigo; Roser, por tener siempre una sonrisa en la boca; Victoria, por transmitirme tu serenidad; Belén, por tu frescura; Luis, por tu integridad y bueno las Marías, que ya tendré ocasión de conocerlas; y en Moncada, llegaron Irene y Selena, no he compartido mucho tiempo con vosotras, pero espero conoceros mejor.

Por último, agradecer al que sí ha sido en todo momento mi compañero, David. Llevamos juntos desde el principio. Hemos preparado clases, congresos, experimentos... la verdad es que ha sido una suerte trabajar contigo, porque siempre estas dispuesto a echar una mano, gracias. Y no quiero dejarme a Inma, gracias por tu forma de ser.

He dejado para el final, lo que yo considero más importante en mi vida, mi familia. Esta tesis va dedicada a mis padres, porque sin su esfuerzo diario no hubiera sido posible lograr todo esto. Y gracias a Rober, por quererme, por su paciencia, porque en ocasiones este trabajo es difícil de entender, y por nuestros sueños de futuro.

A todos, muchas gracias.

Índice



ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La estafilococia	1
Distribución de <i>S. aureus</i>	2
Portadores nasales de <i>S. aureus</i>	3
Estrés oxidativo frente a <i>S. aureus</i>	6
Factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	7
La respuesta SOS	14
Papel de la respuesta SOS en la movilización de elementos genéticos móviles	15

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

Objetivos	21
-----------------	----

CAPÍTULO III: RESULTADOS

I. Portador nasal de <i>S. aureus</i>, un factor de riesgo para el desarrollo de estafilococias en conejos de granja	25
Prevalencia de <i>S. aureus</i> en la mucosa nasal	27
Descripción de las lesiones provocadas por <i>S. aureus</i>	29
Caracterización molecular de las cepas de <i>S. aureus</i> aisladas	32
Análisis del genotipado de cepas de <i>S. aureus</i>	35
II. El H₂O₂ induce la respuesta SOS en <i>S. aureus</i> y promueve la transferencia horizontal de genes implicados en virulencia	39
El H ₂ O ₂ induce la expresión de <i>recA</i> y <i>lexA</i>	41
El H ₂ O ₂ induce profagos en <i>S. aureus</i>	42
El H ₂ O ₂ favorece la replicación y transferencia horizontal de SaPIs mediada por fagos	44
Papel de la catalasa en la inducción de la respuesta SOS por H ₂ O ₂	46
III. Eliminación de competidores por inducción de fagos residentes: el ejemplo de la lucha entre <i>S. pneumoniae</i> y <i>S. aureus</i>	49

Supervivencia de <i>S. aureus</i> tras la inducción de fagos residentes por H ₂ O ₂	51
Efectos del cocultivo de <i>S. aureus</i> con <i>S. pneumoniae</i> productor de H ₂ O ₂	54
El cocultivo de <i>S. pneumoniae</i> y <i>S. aureus</i> induce la transferencia de SaPIbov1	55
El H ₂ O ₂ no induce SOS en <i>S. pneumoniae</i>	56
Las cepas de <i>S. aureus</i> que portan fagos temperados son más sensibles a los antibióticos inductores de la respuesta SOS	57
IV. La producción de toxinas codificadas en fagos e IPs de <i>S. aureus</i> disminuye tras la inducción de la respuesta SOS	59
La producción de la toxina TSST-1 disminuye tras la inducción de la respuesta SOS.....	61
Estudio de la producción de las toxinas codificadas por SaPIbov1	65
Estudio de la producción de factores de virulencia codificados por el fago phiSa3ms	67
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	
Portador nasal de <i>S. aureus</i>: un factor de riesgo para el desarrollo de estafilococias en conejos de granja	73
Consecuencias de la activación de la respuesta SOS mediante el uso de H₂O₂	75
Papel de la catalasa en la inducción de SOS por H₂O₂	77
Eliminación de competidores por inducción de fagos residentes: el ejemplo de la lucha entre <i>S. pneumoniae</i> y <i>S. aureus</i>	78
La producción de toxinas codificadas en fagos e IPs de <i>S. aureus</i> disminuye tras la inducción de la respuesta SOS	82
CAPÍTULO V: MATERIAL Y MÉTODOS	
Bacterias, plásmidos y medios utilizados en estos estudios	87
Estudio de portadores nasales	87
Antibiograma	89
Cocultivo de <i>S. aureus</i> con <i>S. pneumoniae</i>	89
Métodos generales de biología molecular	90
Manipulación del DNA	90

Tipado molecular de cepas de <i>S. aureus</i>	91
Metodología utilizada en los estudios de inducción de SaPIs y fagos	92
Inducción de profagos	92
Titulación de fagos.....	93
Transducción	94
Extracción del DNA para el estudio de replicación de SaPIs.....	94
Metodología utilizada para la obtención de mutantes	95
Obtención de mutantes por delección.....	95
Mutagénesis por inserción.....	98
Metodología para la construcción de plásmidos	99
Métodos bioquímicos	99
Ensayo enzimático para la cuantificación de actividad β -lactamasa en los plásmidos de fusión transcripcional.....	99
SDS-PAGE, Western blot y tinción de Coomassie.....	100
Tabla de cepas utilizadas en estos estudios	102
Tabla de plásmidos utilizados en estos estudios	104
Tabla de cebadores utilizados en estos estudios	105
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	
Conclusiones	109
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA	
Bibliografía	113

Abreviaturas



ABREVIATURAS UTILIZADAS

ϕ	Fago
Δ	Delección
amp	Ampicilina
<i>att</i>	Sitio de integración
<i>att_B</i>	Sitio de integración en el cromosoma bacteriano
<i>att_L</i>	Sitio de integración izquierdo
<i>bla</i>	Gen que codifica la β -lactamasa
bp	Pares de bases
bulk	DNA mayoritario (DNA genómico + fágico)
$^{\circ}\text{C}$	Grados celsius
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
$\text{DO}_{(\text{nm})}$	Densidad óptica a una cierta longitud de onda (nm)
EDTA	Ácido etileldiaminotetraacético
<i>erm</i>	Gen que codifica resistencia a eritromicina
Erm	Eritromicina
h	hora
ICE	Elemento integrativo conjugativo
IP	Isla de patogenicidad
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kv	Kilovoltio
LB	Medio luria bertani
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MC	Mitomicina C
mM	Milimolar
MW	Marcador de tamaño del DNA
nM	Nanomolar
nt	Nucleótido
ORF	Pauta abierta de lectura
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

RD	Repetición directa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SaPI	Isla de patogenicidad de <i>S. aureus</i>
SAGs	Superantígenos
SCN	<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos
<i>tetM</i>	Gen que codifica resistencia a tetraciclina
THY	Todd-Hewitt Yeast extract
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TSA	Medio tripticasa soja agar
TSB	Caldo tripticasa soja
U	Unidad
UFC	Unidades formadoras de colonia
uv	Ultravioleta
WT	Cepa salvaje (wild type)
Xgal	5-Bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido
μ g	Microgramo
μ l	Microlitro
μ m	Micrometro
μ M	Micromolar

Capítulo I



Introducción

La estafilococia.

Introducción.

La estafilococia es una enfermedad infectocontagiosa producida por un microorganismo ubicuo perteneciente al género *Staphylococcus*. Entre los estafilococos de interés veterinario, *Staphylococcus aureus* es responsable de numerosos procesos de carácter endémico o esporádico en bovinos, porcinos, conejos, etc. Esto es gracias a la batería de factores de patogenicidad que permiten a *S. aureus* colonizar y sobrevivir en un amplia variedad de tejidos (Dinges *et al.*, 2000).

Antecedentes.

- Medicina humana:

En medicina humana, *S. aureus* es frecuentemente un agente causal de infecciones en ambientes comunitarios y en pacientes hospitalizados. Puede producir infecciones localizadas en piel y mucosas o invadir tejidos y órganos originando procesos graves como pleuritis, neumonía, endocarditis, artritis, osteomielitis o meningitis. El aumento de las resistencias de este microorganismo a un amplio rango de antibióticos complica el tratamiento de las infecciones estafilocócicas. Se ha producido un incremento en el número de infecciones producidas por cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina y vancomicina, constituyendo un grave problema de salud pública (Hiramatsu, 2001). A esta variedad de patologías hay que añadir las debidas específicamente a la producción de determinadas toxinas, como son las intoxicaciones alimentarias o el síndrome de shock tóxico (Dinges *et al.*, 2000).

- Medicina veterinaria:

En veterinaria, *S. aureus* destaca por su implicación en las infecciones de la glándula mamaria de hembras en lactación, que ocasionan graves pérdidas económicas (Sutra and Poutrel, 1994). En el ganado ovino y caprino es responsable de la mamitis gangrenosa aguda, al igual que de alteraciones cutáneas como la dermatitis y foliculitis. En el ganado bovino, sin embargo, la infección mamaria suele progresar hacia formas crónicas o subclínicas. La estafilococia ocasiona también graves pérdidas económicas en cunicultura, afectando a todos los niveles de la producción (Viana *et al.*, 2007). Se caracteriza por una inflamación supurativa en prácticamente todos los órganos y localizaciones de los animales y con frecuencia por una septicemia fatal (Flatt, 1974).

Básicamente, los cuadros lesionales ocasionados por *S. aureus* en el conejo por orden de importancia son mamitis, abscesos subcutáneos, pododermatitis y dermatitis exudativas neonatales (Okerman *et al.*, 1984; Segura *et al.*, 2006). Este microorganismo también puede diseminarse a partir de una lesión cutánea inicial, desencadenando una septicemia y originando abscesos en órganos internos, tales como hígado, pulmones y útero (Hermans *et al.*, 2003).

En los animales, a diferencia del hombre, no se han comunicado casos naturales de intoxicación alimentaria por endotoxinas, sólo daño tisular producto de la acción directa de *S. aureus* o de sus hemolisinas (Rolle and Mayr, 1978). Aunque *S. aureus* se asocia a numerosas enfermedades animales, existe poca información de la bacteria como productora de gastroenteritis (Biologics, 2004). Se han realizado estudios con la enterotoxina SEB aplicada en forma de aerosol a ratones y primates no humanos. En macacos Rhesus, la inhalación de la toxina causa diarrea y vómitos en un periodo de 24 horas, seguido de depresión, disnea y shock (Mattix *et al.*, 1995). En otro estudio realizado en aves, obtuvieron porcentajes dispares de genes de enterotoxinas entre los aislados de aves y humanos, sugiriendo un papel menos importante de la enterotoxinas en la patogenia de las enfermedades invasivas en las aves en comparación con las enfermedades en humanos (Hazariwala *et al.*, 2002).

Distribución de *S. aureus*.

S. aureus se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, estando considerado un hospedador habitual de piel y mucosas de humanos y animales, (Dahme and Weiss, 1983; Kloos and Schleifer, 1981).

El principal nicho ecológico, descrito en medicina humana, lo constituyen los orificios nasales (Kluytmans *et al.*, 1997; Schaffer *et al.*, 2006). Otros puntos donde típicamente se encuentra el microorganismo son piel, periné y faringe (Armstrong-Esther, 1976; Ridley, 1959; Williams, 1963). El tracto gastrointestinal (Rimland and Roberson, 1986), la vagina (Guinan *et al.*, 1982) y las axilas (Dancer and Noble, 1991), son lugares donde el aislamiento es menos frecuente (figura 1.1).

En el conejo, nuestra especie modelo de interés veterinario, *S. aureus* puede residir en senos nasales o pulmones (Flatt, 1974). Otros lugares de colonización del microorganismo son la piel (predominantemente en los pliegues del cuello, axila, región inguinal y zona interdigital), orejas (donde su diseminación puede dar lugar a infecciones del oído medio o interno) y periné (figura 1.1).

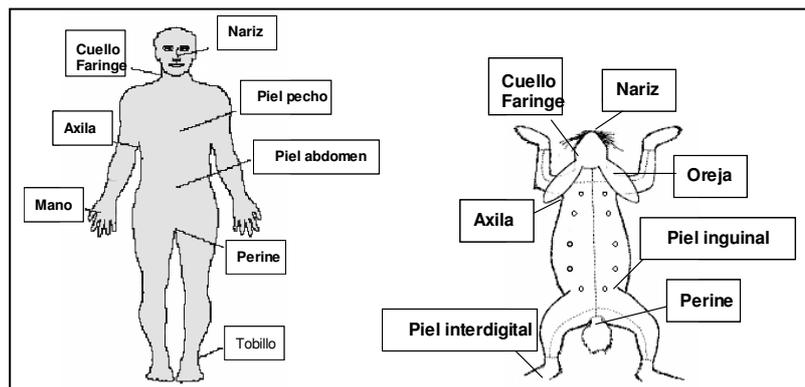


Figura 1.1 Nichos ecológicos de *S. aureus* en humanos y conejos.

Portadores nasales de *S. aureus*.

Los portadores nasales de *S. aureus* parecen tener un papel clave en la epidemiología y la patogénesis de las infecciones estafilocócicas. Los portadores nasales poseen un elevado riesgo de adquirir infecciones por este microorganismo (Wertheim *et al.*, 2005). Una relación causal entre portadores e infecciones está respaldada por el hecho de que las cepas de *S. aureus* aisladas de nariz y las infectantes muestran el mismo genotipo (Li *et al.*, 2009; von Eiff *et al.*, 2001).

Portadores nasales en medicina humana.

En humanos han sido descritos tres tipos de individuos en base a su capacidad para portar o no *S. aureus*: portador persistente, intermitente y no portador. Esta distinción es importante porque los portadores persistentes presentan un elevado número de *S. aureus* en la mucosa nasal y por tanto, un elevado riesgo de adquirir infecciones estafilocócicas (Nouwen *et al.*, 2005). Aproximadamente el 20% de la población pertenece a este grupo, cuyos miembros casi siempre portan un tipo de cepa. Una gran proporción de individuos (aproximadamente el 60%) porta *S. aureus* de forma intermitente, y las cepas cambian con una frecuencia variable. Finalmente, una minoría de la población (aproximadamente el 20%) casi nunca porta *S. aureus*, constituyendo los individuos no portadores (Kluytmans *et al.*, 1997).

- Determinantes del estado de portador:

Los portadores nasales de *S. aureus* han sido identificados como un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones nosocomiales en poblaciones hospitalarias: pacientes quirúrgicos, con diabetes mellitus, sometidos a hemodiálisis, pacientes con cirrosis, VIH (Padoveze *et al.*, 2008), con infecciones en la piel causadas por *S. aureus* y pacientes en cuidados intensivos (Garrouste-Orgeas *et al.*, 2001; Pujol *et al.*, 1996);

sin embargo los determinantes del estado de portador no están todavía claros. Nouwen *et al.* (2004) inocularon diferentes cepas de *S. aureus* a portadores nasales persistentes y no portadores, observando cómo los no portadores eliminaban rápidamente el inóculo, mientras que la mayoría de portadores persistentes seleccionaban su cepa residente original. Los investigadores concluyeron que las características del hospedador co-determinan sustancialmente el estado de portador de *S. aureus*. Este hecho se apoya también en hallazgos que demuestran que las tasas de portadores varían entre grupos étnicos, dependiendo también del sexo y la edad (Cole *et al.*, 2001; Peacock *et al.*, 2003).

La colonización nasal de *S. aureus* puede verse como el resultado entre las fuerzas de atracción y repulsión entre la bacteria y el hospedador (Wertheim *et al.*, 2005). Son tres los requisitos necesarios para convertirse en portador nasal. Primero, debe haber contacto de la nariz con *S. aureus*. Segundo, se ha de producir la adhesión de *S. aureus* a los receptores del nicho nasal y propagarse. Finalmente, deben superarse los mecanismos de defensa del hospedador. A continuación, se describen uno a uno dichos requisitos:

1. Contacto de la nariz con *S. aureus*:

S. aureus puede sobrevivir durante meses en cualquier tipo de superficie (Crossley and Archer, 1997). Las manos son el principal vector de transmisión de *S. aureus* desde las superficies al nicho nasal. Sin embargo, la transmisión aérea también es importante para la dispersión de los estafilococos. Se ha comprobado que los portadores nasales de *S. aureus* con rinitis pueden dispersar elevadas tasas de *S. aureus* al entorno (Wertheim *et al.*, 2005).

Los factores del entorno también pueden influir en el estado de portador nasal. Así, la hospitalización se ha mostrado como un importante factor de riesgo (El-Gilany and Fathy, 2009; Lucet *et al.*, 2003). Peacock *et al.* (2003) encontraron concordancia en el estado de portador entre madres e hijos. La mayoría de madres portaban la misma cepa que sus hijos, indicando su transmisión por contacto directo.

Las actividades que favorecen la aparición de lesiones en la piel, como ocurre en personas drogodependientes o en pacientes diabéticos, también están correlacionadas con elevadas tasas de portadores nasales (Kluytmans *et al.*, 1997). La repetida exposición a *S. aureus* en el entorno se considera un importante determinante de portador nasal, probablemente más importante que la genética del individuo.

2. Adhesión de *S. aureus* a los receptores del nicho nasal y propagación:

Bibel *et al.* (1982) demostraron la importancia de las células epiteliales queratinizadas en la adherencia de *S. aureus* a la mucosa nasal. Experimentos recientes han mostrado que ClfB (una proteína MSCRAMM que se une al fibrinógeno y a la queratina), así como la proteína de superficie SasG se unen a las células del epitelio nasal (O'Brien *et al.*, 2002; Roche *et al.*, 2003).

Diferencias en la expresión de los genes que codifican para todos estos factores, dependiendo del nicho ecológico, y otras adhesinas y receptores, probablemente sean la clave de los verdaderos determinantes del estado de portador.

3. Superación de los mecanismos de defensa del hospedador:

Un mecanismo de defensa innato en el hospedador es la producción de secreciones nasales. Los componentes de dichas secreciones (IgA e IgG, lisozima, lactoferrina y péptidos antimicrobianos) contribuyen a la respuesta inmune (Kaliner, 1991). Los portadores nasales de *S. aureus* deben presentar algunas irregularidades en dichos factores humorales (Cole *et al.*, 1999).

Para contrarrestar estos factores, *S. aureus* posee una amplia batería de factores de patogenicidad, que le ayudan a evadir la respuesta inmune, entre los que cabe mencionar la proteína A, que se une a la región Fc de las inmunoglobulinas, inactivándolas (Atkins *et al.*, 2008; Crossley and Archer, 1997). Además, *S. aureus* puede colonizar un área del vestíbulo nasal que carece de cilios y está relativamente libre de secreciones mucosas (Cole *et al.*, 2001).

- Riesgos asociados al estado de portador nasal:

La mayoría de estudios que recogen los riesgos de adquisición de infecciones en comunidad han investigado la relación entre portadores nasales e infecciones en la piel (Smith *et al.*, 1994), incluyendo furunculosis o impétigo (Li *et al.*, 2009), entre otras. Aproximadamente el 80% (rango 42-100%) de los pacientes con infecciones en la piel eran portadores nasales de *S. aureus*, y un 65% (rango 29-98%) presentaba el mismo fagotipo en nariz y lesión (Wertheim *et al.*, 2005).

S. aureus es la segunda causa más común de infecciones hospitalarias. Aproximadamente el 20% de los pacientes sometidos a cirugía adquieren una infección nosocomial, lo que supone un aumento de la morbilidad, la mortalidad y los costes hospitalarios (Kirkland *et al.*, 1999; Wisplinghoff *et al.*, 2004). Los tratamientos hospitalarios, usualmente, requieren atravesar nuestra primera barrera de defensa, la piel, dando lugar a un aumento del riesgo de infección. La mayoría de infecciones nosocomiales están producidas por el propio *S. aureus* del paciente, en un 80% de los

casos, presente en la piel o mucosas antes de la entrada al hospital (von Eiff *et al.*, 2001; Wertheim *et al.*, 2004).

En cualquier caso, son necesarios más estudios que identifiquen todos los componentes de la respuesta inmune que participan en la defensa de las infecciones nasales, con objeto de entender mejor la ecología, fisiopatología y epidemiología de los portadores nasales y las infecciones asociadas, y el desarrollo de nuevas medidas preventivas (Wertheim *et al.*, 2005).

Portadores nasales en veterinaria.

Al contrario que ocurre en medicina humana, son pocos los estudios realizados en animales acerca de la colonización nasal de *S. aureus*. Es conocido el nicho nasal como reservorio y las patologías asociadas a dicho microorganismo, pero se carece de bibliografía referente, por ejemplo, a los tres tipos de portadores nasales descritos en humana. Y, como se ha mencionado anteriormente, esta distinción es importante ya que los portadores persistentes poseen un elevado riesgo de adquirir infecciones.

Vautor *et al.* (2005) hablan de la glándula mamaria infectada como reservorio primario de *S. aureus* en ovejas. Sin embargo, existen pocos artículos que evalúen los orificios nasales como una importante fuente de infección. Adlam *et al.* (1976) en un estudio de mamitis realizado en conejas proponen la presencia de portadores subclínicos como explicación a la persistencia de la enfermedad en comunidades aparentemente sanas. Hermans *et al.* (2003) describen múltiples sitios de colonización de *S. aureus* en conejos, con la consecuente dificultad para el control de la estafilococia debido al gran número de animales portadores.

Estrés oxidativo frente a *S. aureus*.

Los organismos aeróbicos utilizan el O₂ para obtener energía, generando continuamente sustancias oxígeno reactivas (ROS), como el ión superóxido, el H₂O₂ o los radicales OH⁻, que poseen un amplio espectro de toxicidad bacteriana al dañar el DNA, RNA, proteínas y lípidos (Cabiscol *et al.*, 2000). Se habla de estrés oxidativo cuando la producción de ROS supera la capacidad de defensa del organismo. Asimismo, las células fagocíticas (como los neutrófilos o macrófagos), a través de la enzima NADPH oxidasa, utilizan el estrés oxidativo como arma frente a las invasiones de bacterias patógenas (Miller and Britigan, 1997) como *S. aureus*. Este mecanismo de acción también se ha observado en otras bacterias del género *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. Se ha visto que en las comunidades de

Streptococcus pneumoniae y *S. aureus*, el primero desplaza al segundo a nivel de la nasofaringe debido a la producción de H₂O₂, tóxico para *S. aureus* (Regev-Yochay *et al.*, 2006) o como la producción de H₂O₂ por *Lactobacillus gasseri* elimina a *S. aureus* a nivel del tracto vaginal de terneras (Otero and Nader-Macias, 2006). Sin embargo, el mecanismo por el que esto ocurre se desconoce, siendo este uno de los puntos a tratar en esta tesis.

Factores de virulencia de *S. aureus*.

La patogenicidad de *S. aureus* resulta de la acción combinada de más de 50 factores de virulencia que son expresados coordinadamente durante las diferentes fases de la infección (colonización, evasión de las defensas del hospedador, multiplicación y diseminación bacteriana). Al igual que ocurre en otras bacterias, una característica destacable de la patogénesis de *S. aureus* es el hecho de que muchos de los genes que codifican toxinas, adhesinas, invasinas u otros factores de virulencia, se encuentran codificados en elementos genéticos móviles tales como transposones, plásmidos, bacteriófagos o bien forman parte de regiones particulares del cromosoma bacteriano denominadas islas de patogenicidad (IPs). 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 deletionadas en bloque y sufrir duplicaciones y amplificaciones (Hacker *et al.*, 1997). 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 (Hacker and Kaper, 2000).

*Islas de patogenicidad de *S. aureus* (SaPIs).*

La gran mayoría de superantígenos (SAGs), toxinas de *S. aureus* caracterizadas por la estimulación no específica de un gran número de linfocitos-T en el hospedador lo que conduce a la producción de citoquinas, son codificados por IPs (Betley and Mekalanos, 1985; Lindsay *et al.*, 1998). Las islas de patogenicidad de *S. aureus* (SaPIs) fueron las primeras IPs claramente definidas en patógenos Gram-positivos. Entre ellas encontramos SaPI1, SaPI4 y SaPI_n1, procedentes de cepas humanas y SaPI_{bov}1 y SaPI_{bov}2, procedente de cepas bovinas, de las cuales SaPI1

y SaPIbov1 son los prototipos (Novick, 2003) (Tabla 1.1). 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 (Novick and Subedi, 2007).

Las SaPIs presentan una organización genética muy conservada. Cada SaPI se inserta en un sitio específico de integración (*att_B*), tienen un tamaño entre 14 y 17 kb, están flanqueadas por repeticiones directas, presentan una integrasa al lado del sitio de integración izquierdo (*att_L*), contiene un bloque de unas 10 a 12 ORFs con una gran homología entre las distintas IPs implicada, en la biología de estos elementos (Ubeda *et al.*, 2008) tienen varios genes que codifican para factores de virulencia (Figura 1.2).

La mayoría de estas SaPIs codifican para TSST-1 junto con dos o más SAGs (Novick, 2003), a excepción de algunas islas como SaPIbov2 y SaRI*fusB* (Tabla 1.1). SaPIbov2 codifica la proteína Bap (Cucarella *et al.*, 2001). Esta isla, además, posee un tamaño mayor que el resto de islas, unas 27 kb, ya que presenta integrado dentro de su estructura un transposón de 12 kb, que contiene el gen *bap* que codifica para una adhesina de unos 240 kDa involucrada en la formación del biofilm y que posee un importante papel en la mastitis bovina (Cucarella *et al.*, 2004). SaPIbov2, está estrechamente relacionada con SaPIbov1, compartiendo la integrasa y el mismo sitio de integración. Por otro lado, SaRI*fusB*, una nueva SaPI descrita recientemente, confiere resistencia al ácido fusídico (Diep *et al.*, 2006), posee una gran homología con SaPI1 y se integra en el mismo sitio que SaPI1. Además, varias SaPIs portan el gen *ear*, que codifica para un homólogo a la proteína de unión a penicilina, responsable de resistencias en *E. coli*. Sin embargo, la función de este gen en *S. aureus* no está clara.

Tabla 1.1. Islas de patogenicidad descritas en *S. aureus*.

Isla (cepa)	Tamaño (Kb)	Fago inductor	Secuencia sitio <i>att</i>	Genes de virulencia	Referencia
SaPI1 (RN4282)	15,2	φ80α, φ13	TTATTTAGCAGGA ATAA	<i>ear, tst, sek, seq</i>	(Lindsay <i>et al.</i> , 1998)
SaPI2 (RN3984)	14,7	φ80α	ATTTTACATCATT CCTGGCAT	<i>tst, eta</i>	(Ruzin <i>et al.</i> , 2001)
SaPI3 (COL)	15,6		TTATTTAGCAGGA ATAA	<i>ear, seb, sel, sek</i>	(Ruzin <i>et al.</i> , 2001)
SaPI4 (MRSA252)	15,1	Profagos endógenos	AAAGAAGAACAA TAATAT	Ninguno	(Holden <i>et al.</i> , 2004)
SaPIbov1 (RF122)	15,8 (escisión espontánea)	φ11, φ147, φ80α	AAAAAAGGCTGG AAACCGCGTAAT TACGGTAACTCC AGCCTATCATTTG CTATATATAATTA TTCCCACTCAAT	<i>tst, sel, sek</i>	(Fitzgerald <i>et al.</i> , 2001a)
SaPIbov2 (V329)	27 (escisión espontánea)	φ80α	TAATTATTCCCAC TCGAT	<i>bap</i>	(Ubada <i>et al.</i> , 2003)
SaPI _n 1 (n315) SaPI _m 1 (Mu50)	15	φ80α	GTTTTACCATCAT TCCCGGCAT	<i>tst, sel, sec3</i>	(Kuroda <i>et al.</i> , 2001)
SaPI _m 4 (mu50: SaGI _m vSa3 Type I)	14,4	Profagos endógenos	TCCCGCCGTCTC CAT	<i>fhuD</i>	(Baba <i>et al.</i> , 2002)
SaPI _m w2 (mw2: vSa3 Type II)	14,4	Profagos endógenos	TCCCGCCGTCTC CAT	<i>ear, se2I, sec4</i>	(Baba <i>et al.</i> , 2002)
SaPI1028 (NY940)	15,6	Profagos endógenos	AAAGAAGAACAA TAATAT	Ninguno	(Kwan <i>et al.</i> , 2005)
SaPI5 (USA300)	14		TTATTTAGCAGGA ATAA	<i>ear, sek, seq</i>	(Diep <i>et al.</i> , 2006)
SaRI _{fusB}	16,7		TTTTACATCATTC CTGGCAT	<i>fusB</i>	(Diep <i>et al.</i> , 2006)
SaPI122 (RF122)	17,9	Profagos endógenos	GTTTTACATCATT CCTGGCAT	<i>mdr</i>	GenBank NC-007622
SaPI6Δ (8325, COL, USA300, MSSA476, Newman. mw2: vSa4 Type II)	3,14 (escisión espontánea)		GTTTTACCATCAT TCCCGGCAT, GTTTTACATCATT CCTGGCAT	Ninguno	(Baba <i>et al.</i> , 2002)

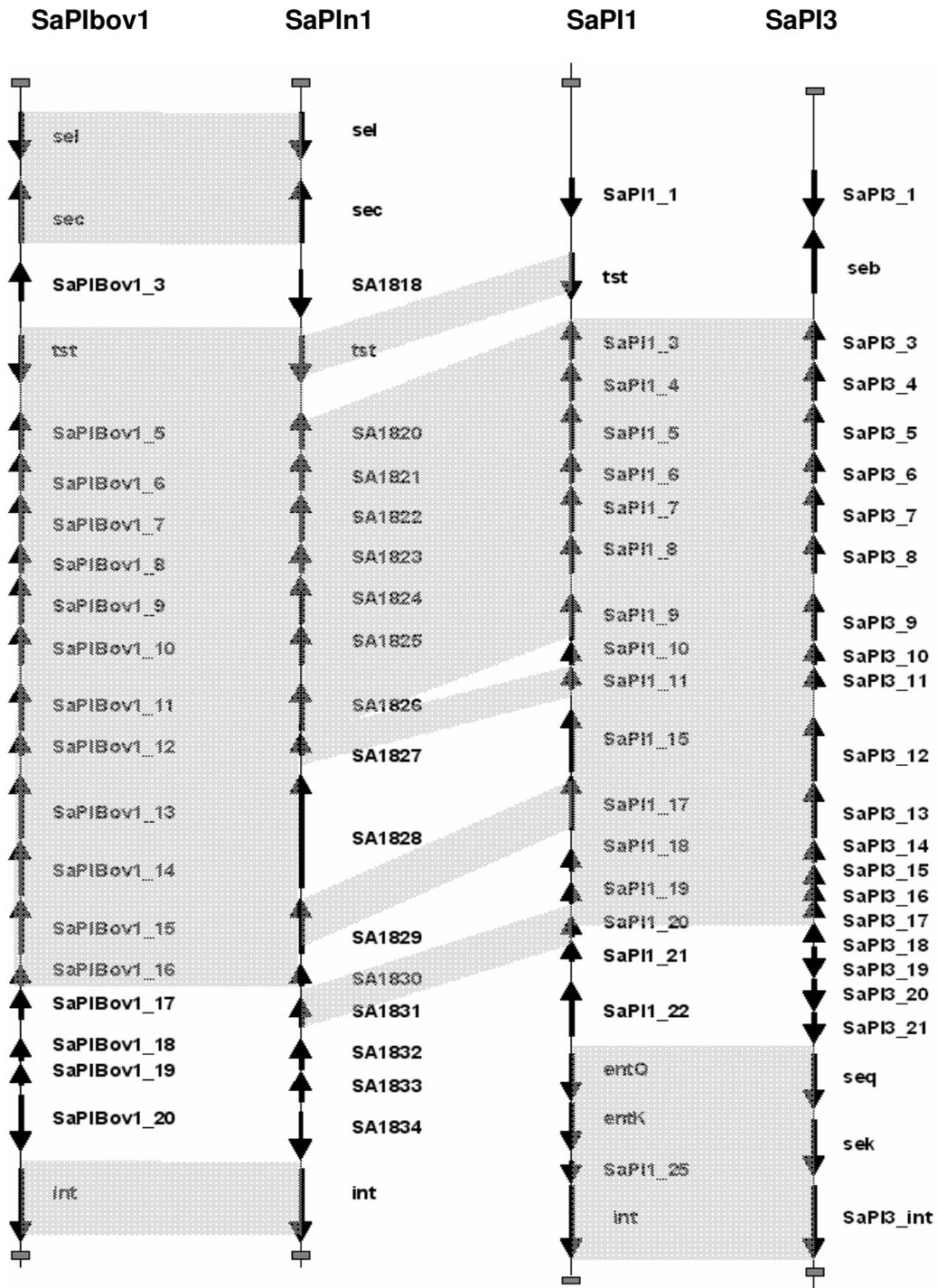


Figura 1.2. Mapa comparativo de las islas de patogenicidad SaPIbov1, SaPIin1, SaPI1 y SaPI3. Representación de la localización y orientación de las ORFs codificadas en las diferentes islas. Las regiones homólogas entre islas se indican mediante sombreado.

Recientemente se han caracterizado dos nuevas islas, denominadas SaPI4, presente en el genoma de la cepa MRSA252 (Holden *et al.*, 2004), y SaPI1028, descrita inicialmente como fago lisogénico en la cepa NY940 (Kwan *et al.*, 2005), que suponen una excepción a la definición general de SaPI, ya que no contienen ningún factor de virulencia, aunque poseen la misma organización genética y proteínas homólogas al resto de islas de patogenicidad caracterizadas.

Aunque la mayoría de las ORFs presentes en las distintas SaPIs no presentan homología con proteínas de función conocida, todas estas IPs presentan algunas proteínas con características comunes con proteínas fágicas. En todas ellas encontramos una integrasa y están flanqueadas por repeticiones directas, codifican para una subunidad pequeña de la terminasa muy similar a la codificada por algunos fagos como la del fago $\rho 15$ (Chai *et al.*, 1994) y PBSX (McDonnell *et al.*, 1994) de *Bacillus subtilis*, contienen un gen que codifica una proteína con actividad helicasa y codifican un represor que inhibe la replicación autónoma de la isla (Ubeda *et al.*, 2007). Todas estas características sugieren que estas IPs están estrechamente relacionadas con fagos. De hecho, SaPI1 y SaPIbov1, los prototipos de estas islas, puede ser movilizadas por el fago $\phi 80\alpha$ de *S. aureus* (Lindsay *et al.*, 1998; Novick and Subedi, 2007; Ubeda *et al.*, 2005).

Replicación, encapsidación y transferencia de SaPIs.

Las SaPIs presentan una relación muy estrecha con los fagos de *S. aureus*, similar a la relación que tienen los fagos P2 y P4 de *E. coli*, donde el fago satélite P4 parasita algunas de las funciones de P2 para poder transferirse (Ghisotti *et al.*, 1995). El estudio en profundidad de las bases moleculares del proceso de movilización de las SaPIs reveló su capacidad de ser escindidas y circularizadas con ayuda de los fagos, bien por la inducción de profagos residentes o por infección de cepas sensibles. SaPI1 escinde y circulariza con ayuda de los fagos $\phi 13$ y $\phi 80\alpha$ (Lindsay *et al.*, 1998) y SaPIbov1 gracias a los fagos $\phi 11$, $\phi 147$ y $\phi 80\alpha$ (Ubeda *et al.*, 2005). Tras la escisión, las islas se replican autónomamente y se encapsidan en partículas fágicas especiales más pequeñas acordes al menor tamaño de las SaPIs en comparación con el tamaño del fago (Figura 1.3) (Lindsay *et al.*, 1998; Ruzin *et al.*, 2001; Tormo *et al.*, 2008; Ubeda *et al.*, 2005). La replicación autónoma de SaPIbov1 ha sido demostrada en *E. coli* mediante la construcción de un plásmido que contenía las regiones *pri-rep-ori* de la isla (Ubeda *et al.*, 2007). Sin embargo, esta unidad con capacidad de replicación autónoma es muy inestable, probablemente porque la forma multimérica de este

producto de la replicación está diseñada para la encapsidación y no está preparada para el estilo de vida de un plásmido (Ubeda *et al.*, 2007).

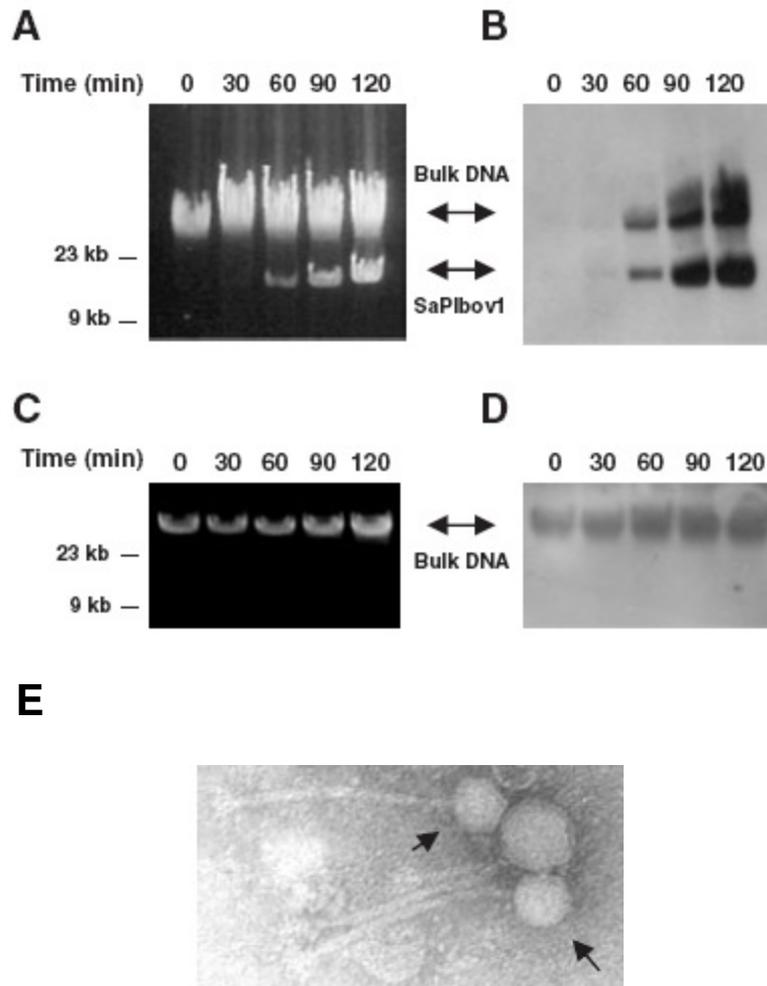


Figura 1.3. A y C. Inducción de la replicación de SaPIbov1 por exposición de la cepa JP44 (RN27 SaPIbov1 *tst::tetM*) y JP45 (RN4220 SaPIbov1 *tst::tetM*), respectivamente, a MC. El cultivo bacteriano se creció a 32°C, tomándose muestras a los 30, 60, 90 y 120 min para la extracción de su DNA, el cual fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio y fotografiado. **B y D.** Southern blot de las muestras A y C, hibridación o.n. con una sonda específica para SaPIbov1. **E.** Microscopía electrónica de lisados del fago 80α. Detalle de las cápsides pequeñas conteniendo SaPIbov1. Amplificación: 122 000x (Ubeda *et al.*, 2005).

Las SaPIs se empaquetan en partículas compuestas exclusivamente por proteínas del fago (Tallent *et al.*, 2007; Tormo *et al.*, 2008), y se ha observado como SaPI1 y SaPIbov1, remodelan dichas proteínas de la cápside del fago para generar cápsides más pequeñas, acordes al menor genoma de la isla. El DNA se empaqueta

tanto en cápsides pequeñas como en grandes, pero existen diferencias entre las islas prototipo. SaPI1 usa principalmente cápsides pequeñas, mientras que SaPIbov1 utiliza ambas con similar eficiencia (Novick and Subedi, 2007).

Una vez la bacteria es lisada mediante las enzimas líticas producidas por el fago, estas partículas fágicas infectan otras bacterias, integrándose en su genoma. Las SaPIs se integran independientemente de la proteína RecA en su sitio de integración específico en el cromosoma bacteriano (Ubeda *et al.*, 2003; Ubeda *et al.*, 2005) (*att_B*) gracias a la actividad de sus integrasas (Lindsay *et al.*, 1998; Ruzin *et al.*, 2001). La transferencia de las SaPIs a otras bacterias es extraordinariamente alta. Así, por ejemplo, el fago $\phi 80\alpha$ es capaz de generar más de 1×10^8 de partículas infectivas de SaPI1 por ml de cultivo inducido (Lindsay *et al.*, 1998), por lo que este proceso representa un mecanismo de diseminación horizontal de factores de virulencia mucho más eficaz que los descritos hasta el momento para IPs. Además, otros autores también han demostrado la transferencia de SaPIs a otras especies bacterianas. Así, Maiques *et al.* (2007) demostraron la transferencia de SaPIbov2 a *Staphylococcus epidermidis*, y más recientemente Chen and Novick (2009) transfirieron SaPI1 y SaPIbov1 a *Listeria monocytogenes*. Estos resultados sugieren que el rango de hospedadores de fagos y SaPIs puede ser más amplio de lo que se pensaba hasta el momento.

Una gran diferencia entre las islas de patogenicidad de *S. aureus* y las IPs de patógenos Gram-negativos es precisamente la presencia en las IPs de Gram-negativos de largas agrupaciones de genes que codifican toxinas con variaciones alélicas que permitirían a la bacteria la adaptación a los diferentes ambientes que serán colonizados durante la infección. Otra gran diferencia es que mientras que la mayoría de los estudios realizados en IPs de patógenos Gram-negativos se han enfocado en conocer la naturaleza y la organización de los factores de virulencia y sus genes, los estudios realizados en las IPs de *S. aureus* han ido más encaminados al conocimiento de la relación de estas IPs con fagos y su movilidad. Esto se debe probablemente a que la mayoría de factores de virulencia presentes en las IPs de *S. aureus* son SAGs y a que la estrecha relación que presentan con fagos les proporciona movilidad, mientras que en islas de patógenos Gram-negativos, aunque se sospecha, no se ha demostrado movilidad de las mismas en la mayoría de los casos (Novick, 2003).

La respuesta SOS.

La respuesta SOS bacteriana, extensamente estudiada en *Escherichia coli*, es una respuesta global al daño en el DNA, en la que se detiene el ciclo celular y se induce la expresión de diferentes genes, muchos de ellos implicados en la reparación del DNA. Los reguladores claves de esta respuesta son el represor LexA y la proteína RecA, que regulan de manera directa o indirecta la transcripción de los diversos genes de la respuesta SOS (Little and Mount, 1982). Un esquema representativo de esta regulación se observa en la Figura 1.4.

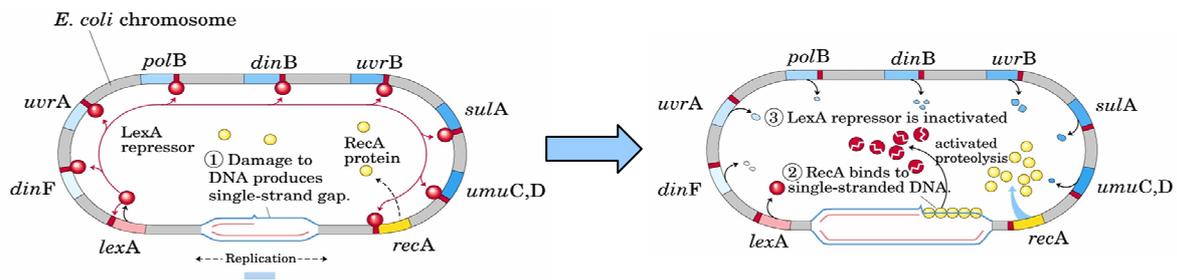


Figura 1.4. Esquema general de la respuesta SOS en *E. coli*. (Lehninger *et al.*, 1995).

La señal que provoca la activación de la respuesta SOS es la unión de la proteína RecA a DNA de cadena sencilla (ssDNA). Este DNA de cadena sencilla se produce cuando hay un daño severo en el DNA bacteriano. Estudios recientes han demostrado que alteraciones en la pared celular también pueden inducir la respuesta SOS (Maiques *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2004; Perez-Capilla *et al.*, 2005). El daño en el DNA se produce con radiaciones UV, agentes químicos como la mitomicina C y algunos antibióticos como las fluoroquinolonas (Phillips *et al.*, 1987) o los β -lactámicos (Maiques *et al.*, 2006). La unión del DNA monohebra actúa como una señal que activa a RecA (RecA+), la cual adquiere actividad co-proteasa, lo que le permite la degradación de la proteína LexA mediante la rotura de un enlace peptídico específico Ala-Gly (Little, 1991). En ausencia de inducción, LexA reprime todos los genes del sistema SOS, incluyendo *recA* (Little *et al.*, 1981), mediante la unión a regiones reguladoras específicas localizadas en el extremo 5' de estos genes, denominadas "LexA box". Cuando LexA es degradado por RecA+, cesa la represión del sistema SOS, comenzando la expresión de genes implicados en la reparación del DNA. Una vez las lesiones han sido reparadas, cesa la actividad de RecA y la proteína LexA

completa vuelve a niveles normales, reprimiendo de nuevo la transcripción de los genes SOS (Little and Mount, 1982).

El gen LexA está ampliamente extendido entre las bacterias y presente en muchos grupos filogenéticos, para los cuales se han descrito motivos de unión de LexA específicos. En *E. coli* tiene por ejemplo una secuencia consenso CTGTN₈ACAG (Walker, 1984). En un estudio reciente se ha descrito la presencia de LexA boxes (Cheo-boxes) en las regiones promotoras de genes inducibles por el daño del DNA en *S. aureus*. Este estudio propone que la actividad represora de LexA en *S. aureus* no sólo se centra en la represión de genes implicados en la reparación del DNA, sino que se extiende incluyendo la regulación de diferentes factores de virulencia (Bisognano *et al.*, 2004).

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. Así, la proteína RecA activada elimina el represor del fago permitiendo la activación del ciclo lítico del mismo (Little, 1993).

Papel de la respuesta SOS en la movilización de elementos genéticos móviles.

Además de las IPs, otros elementos genéticos móviles como plásmidos, bacteriófagos, transposones y casetes cromosómicos han sido identificados en *S. aureus* y, al igual que las IPs, contribuyen a la transferencia horizontal de material genético favoreciendo la evolución bacteriana. 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 SaPIs.

En *S. aureus* se han identificado y secuenciado un gran número de fagos (Bharate *et al.*, 2005; Kwan *et al.*, 2005). De hecho, en todas las cepas secuenciadas de *S. aureus* se han encontrado bacteriófagos que suponen hasta un 4 o 5% del genoma total (Baba *et al.*, 2002; Holden *et al.*, 2004). Mu50 y N315 presentan un fago muy similar que codifica para factores de virulencia conocidos: la enterotoxina P, un SAg implicado en intoxicaciones alimentarias, y la estafiloquinasa (Sak), un enzima extracelular capaz de aumentar el potencial invasivo de la bacteria (Kuroda *et al.*, 2001). En la cepa 8325 han sido descritos tres fagos, ϕ 11, ϕ 12, ϕ 13 (Iandolo *et al.*, 2002); éste último codifica también para Sak. Otros muchos fagos han sido

identificados en distintas cepas de *S. aureus* como el fago PS42-D que codifica para SEA (Betley and Mekalanos, 1985), el fago PVL que codifica para la leucocidina de Pantón-Valentine (Narita *et al.*, 2001) o el fago ETA, que codifica para una toxina exfoliativa (Yamaguchi *et al.*, 2000; Yoshizawa *et al.*, 2000). Todos estos datos sugieren que la mayoría de cepas de *S. aureus* contendrían fagos portadores de toxinas, y que por tanto el papel que presentan en la transferencia horizontal de factores de virulencia es de una gran relevancia. Estos bacteriófagos se encuentran integrados en el cromosoma de la bacteria y se mantienen en ciclo lisogénico, donde la replicación de su DNA se produce de forma pasiva. El mantenimiento del ciclo lisogénico ha sido muy bien estudiado en el fago λ de *E. coli* (Kim and Little, 1993). El genoma de este fago, como el de la gran mayoría de fagos, contiene genes que codifican para proteínas implicadas en su replicación, proteínas estructurales formadoras de la cápside, enzimas líticas, etc. La expresión de todos estos genes durante el ciclo lisogénico está inhibida por la expresión del represor *ci* codificado por el mismo fago. En condiciones normales se expresa este represor y el fago mantiene su ciclo lisogénico. Cuando se induce la respuesta SOS de la bacteria y la proteína RecA se activa adquiriendo la actividad co-proteasa, una de las consecuencias es la autodigestión del represor *ci* del fago λ en un punto muy concreto, entre una alanina y una glicina (al igual que la autodigestión del represor LexA), liberándose de esta forma la represión ejercida sobre los genes implicados en el ciclo lítico del fago (Little, 1984).

Además de los bacteriófagos, otros elementos genéticos móviles son sensibles a la activación de la respuesta SOS. Este es el caso de SXT, un elemento integrativo conjugativo de *Vibrio cholerae* que codifica para factores de resistencia a antibióticos y que contiene un represor (*setR*) tipo *ci* (Beaber and Waldor, 2004). Beaber *et al.* (2004) demostraron que cuando se inducía la respuesta SOS por ciprofloxacino, el represor SetR era autodigerido con la ayuda de la actividad co-proteasa de RecA, liberando la represión ejercida sobre los genes implicados en la transferencia de este elemento conjugativo. La activación de la respuesta SOS mediante antibióticos aumenta la transferencia de este elemento conjugativo, lo que explica su aparición en un gran número de cepas en los últimos años (Beaber *et al.*, 2004). Nuestro grupo ha realizado estudios similares sobre la implicación de la respuesta SOS en la transmisión de factores de patogenicidad codificados por IPs (Maiques *et al.*, 2006; Ubeda *et al.*, 2005). Ubeda *et al.* (2007) describen el papel de LexA en la inducción de las SaPIs. Las IPs de *S. aureus* poseen un operón que codifica para una terminasa (homóloga a la subunidad pequeña de la terminasa de los fagos y requerida para el empaquetamiento específico del DNA de la isla) y otras proteínas requeridas para la

formación de cápsides pequeñas. LexA se une a la región promotora de este operón y bloquea la transcripción. La inducción de la respuesta SOS elimina dicha represión dando lugar a la formación de cápsides pequeñas y la consecuente encapsidación de las SaPIs, favoreciendo su diseminación.

Teniendo en cuenta el gran número de fagos descritos en *S. aureus* y la relación que presentan con las IPs, la activación de la respuesta SOS posee una gran importancia en la diseminación de los factores de patogenicidad implicados en las enfermedades asociadas a *S. aureus*, así como en otras especies que también contengan fagos e IPs. Sería interesante saber qué ocurre con la expresión de las toxinas codificadas por estos elementos genéticos móviles durante la síntesis de los mismos, otro punto a tratar en esta tesis.

Capítulo II



Objetivos

Como se ha señalado en la introducción, *S. aureus* posee un rico arsenal genético que le dota de numerosos mecanismos de persistencia, como la adherencia al epitelio nasal y, mecanismos de virulencia, como las numerosas toxinas que es capaz de producir, muchas de las cuales están codificadas en elementos genéticos móviles. A pesar de ello, los organismos también poseen armas capaces de luchar frente a las infecciones estafilocócicas. Así, las células fagocíticas producen ROS tóxicas para el estafilococo, mecanismo también observado en bacterias del género *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp.

Por todo ello, los **objetivos** que nos hemos planteado en esta tesis doctoral han sido:

- ❖ Conocer la prevalencia de *S. aureus* en la mucosa nasal de conejas reproductoras y establecer la posible implicación del estado de portador en el desarrollo de la estafilococia.
- ❖ Caracterizar la importancia que el H₂O₂ puede tener en la diseminación de factores de patogenicidad codificados por SaPIs.
- ❖ Determinar el mecanismo por el cual el H₂O₂ producido por *S. pneumoniae* es capaz de lisar ciertas poblaciones de *S. aureus*.
- ❖ Estudiar la relación existente entre la replicación de elementos genéticos móviles y la producción de toxinas codificadas por ellos.

Capítulo III



Resultados

**I. PORTADOR NASAL DE *S. aureus*: UN FACTOR DE
RIESGO PARA EL DESARROLLO DE
ESTAFILOCOCIAS EN CONEJOS DE GRANJA**

Prevalencia de *S. aureus* en la mucosa nasal.

S. aureus coloniza la piel y mucosas de humanos y otras especies animales. Una proporción importante de las infecciones producidas por *S. aureus* en humanos parecen tener su origen en bacterias que colonizan la mucosa nasal (Wertheim *et al.*, 2005). Sin embargo, en conejos y aunque distintos sitios del cuerpo pueden ser teóricamente colonizados (Hermans *et al.*, 2000a), se ha dado poca importancia a los portadores nasales de *S. aureus*.

En veterinaria, *S. aureus* destaca por su implicación en las infecciones de la glándula mamaria (Sutra and Poutrel, 1994). Las mastitis por *S. aureus* en conejas son una de las principales causas de eliminación de estos animales en las granjas (Segura *et al.*, 2006). Conociendo estos datos, decidimos determinar la prevalencia de conejas portadoras nasales de *S. aureus* presentes en 4 granjas cunícolas de tipo industrial y establecer una posible relación entre el estado de portador nasal y el desarrollo de lesiones estafilocócicas, como la mastitis.

Para ello, se analizaron 133 hembras reproductoras, de las cuales 71 no presentaban lesiones características de infección por *S. aureus*, y un segundo grupo de 62 animales estaba formado por hembras con estafilococia (tabla 3.1).

Tabla 3.1. Número y porcentaje de animales portadores nasales de *S. aureus*.

	Nº de animales estudiados	Nº de animales positivos	Porcentaje de positivos
♀ con lesiones	62	49	79,03%
♀ sanas	71	14	19,71%
TOTAL	133	63	47,36%

Los siguientes resultados se encuentran resumidos en la tabla 3.1:

- El análisis microbiológico de los hisopos nasales mostró que el 47,36% (63 de 133) de los animales fueron portadores nasales, casi la mitad de la población estudiada.

- De las 62 hembras reproductoras con lesiones, 49 portaban la bacteria en su mucosa nasal, es decir un 79,03% de los casos. Por el contrario, tan sólo el 19,71% (14 de 71) de las conejas sanas eran portadores nasales de *S. aureus*.

Por lo tanto, se puede apreciar como el número de portadores nasales es más elevado entre las conejas con lesiones, lo que sugiere una relación entre portador nasal y lesión.

- Prevalencia según explotación de procedencia:

A continuación, se muestra el número de animales estudiados por explotación (Tabla 3.2) y el número de animales portadores nasales por granja (Tabla 3.3).

Tabla 3.2. Número de animales estudiados por explotación.

Granjas	Nº hembras		Total
	Con lesiones	Sin lesiones	
1	23	25	48
2	8	11	19
3	19	23	42
4	12	12	24
Total	62	71	133

Tabla 3.3. Número de animales portadores nasales positivos y negativos.

Granjas	Hembras con lesiones			Hembras sanas			Total
	+	-	+ (%)	+	-	+ (%)	+ (%)
1	16	7	69,56%	3	22	12%	39,58%
2	5	3	62,5%	-	11	0%	26,31%
3	16	3	84,21%	10	13	43,47%	61,90%
4	12	-	100%	1	11	8,33%	54,16%
Total	49	13	79,03%	14	57	19,71%	47,36%

+: Portador nasal positivo, -: portador nasal negativo.

En el cómputo global de portadores nasales por granja, se obtuvieron porcentajes elevados de animales positivos en todas ellas, desde un 25% de animales afectados, hasta incluso más del 60% de la población:

- Granja 1: 39,58%.

- Granja 2: 26,31%.

- Granja 3: 61,90%.

- Granja 4: 54,16%.

Analizando cada grupo de animales por separado, destaca la granja número 4 donde el 100% de las hembras con lesiones eran portadoras nasales de *S. aureus*. En el resto de granjas también existe una correlación entre animal con lesión-animal portador. Por lo que respecta a las hembras sin lesiones, el porcentaje de animales portadores se reduce, hasta el punto de no encontrar ningún animal en la granja 2. Cabe destacar la granja número 3, con un porcentaje bastante alto de portadores nasales.

- Análisis estadístico:

Las diferencias en la detección de portadores nasales entre animales con lesiones, provocadas por *S. aureus*, y sin ellas fueron analizadas mediante el test de Fisher. Se consideró significativo un valor de $P < 0,01$.

En las conejas con lesiones el porcentaje de portadores nasales fue más elevado que en las conejas sanas ($P < 0,0001$). Si analizamos las granjas por separado, granja 1 ($P < 0,00008$), granja 2 ($P < 0,005$), granja 3 ($P < 0,01$) y granja 4 ($P < 0,00001$) se observa que las diferencias entre portador nasal y animal enfermo, portador nasal y coneja sana, son significativas.

Descripción de las lesiones provocadas por *S. aureus*.

Las 62 hembras reproductoras que presentaron lesiones características de infección por *S. aureus*, fueron transportadas a la sala de necropsias del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad CEU-Cardenal Herrera, para ser eutanasiadas mediante inyección intravenosa de 1,5-2,0 ml de pentobarbital sódico (Dolethal®. Vetoquinol S.A, Lure, France), con objeto de realizar la necropsia de forma sistemática, completa y ordenada. En la siguiente tabla se muestran las lesiones halladas tras la necropsia:

Tabla 3.4. Número de animales con los distintos tipos de lesiones.

Granja	Mamitis	Pododermatitis	M/P ^a	Abscesos	P/A ^a	Otitis	Total
1	15	5	3				23
2	2	2	1	2	1		8
3	16	1	1			1	19
4	8	1	2		1		12
Total	41	9	7	2	2	1	62

a. M/P: Mamitis y pododermatitis, P/A: pododermatitis y abscesos.

La lesión observada con mayor frecuencia fue la mamitis purulenta, seguida de pododermatitis, abscesos y otitis en último lugar. Nueve animales presentaron 2 procesos patológicos simultáneos, siendo la asociación más frecuente mamitis-pododermatitis (M/P) en 7 ocasiones. Las 2 conejas restantes presentaron pododermatitis, que fue acompañada de la presencia de abscesos en pulmón (P/A) (figura 3.1).

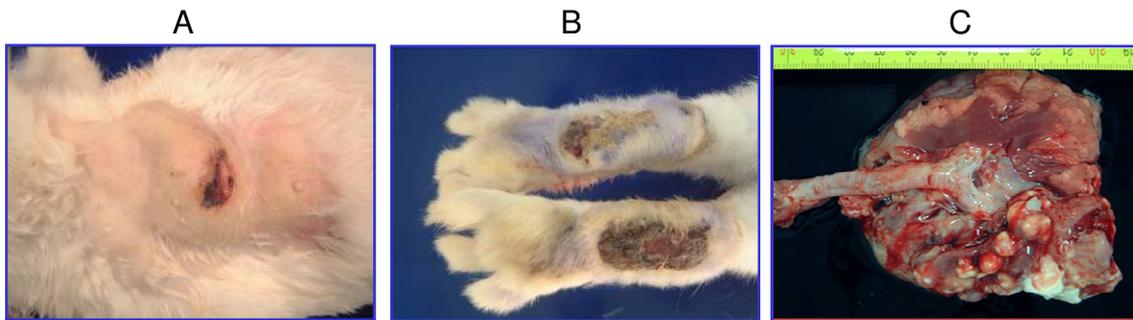


Figura 3.1. A: mamitis, se observaba el aumento de tamaño de la glándula mamaria y la presencia de una herida en la piel por la que drenaba pus al exterior. B: pododermatitis ulcerativa, en este caso con una importante reacción fibrosa. C: múltiples abscesos en pulmón.

Tras la realización de la necropsia, las muestras de tejido seleccionadas fueron fijadas en formol tamponado al 10%, talladas, incluidas en parafina, cortadas y finalmente teñidas con Hematoxilina-Eosina (H-E). A continuación describimos las principales lesiones observadas:

- Mamitis: Las glándulas afectadas estaban inflamadas (calientes, dolorosas, aumentadas de tamaño y consistencia al tacto), afectándose las zonas periféricas al pezón o zonas más alejadas, de una o varias glándulas. En ocasiones, la piel rosada que cubría la glándula aparecía de color púrpura. Este tipo de lesión mostraba, en todos los casos, un carácter crónico y purulento (figura 3.2).

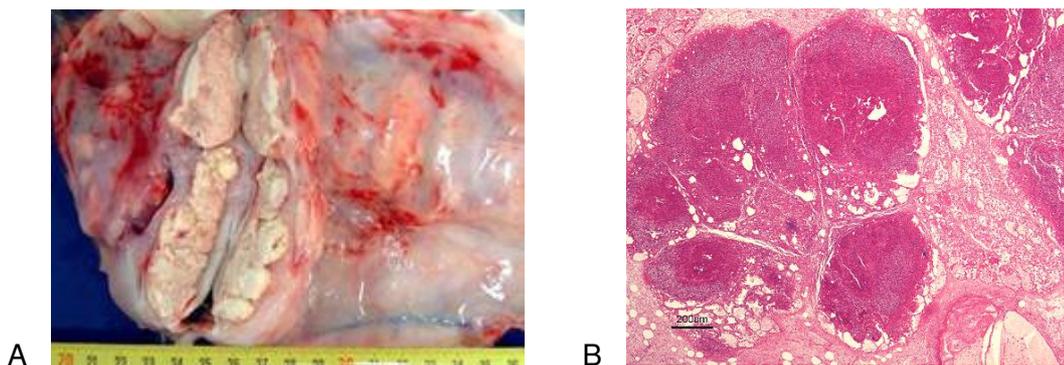


Figura 3.2. A: mamitis, corte sagital de la glándula mamaria inflamada con abundante material purulento en su interior. B: Imagen histológica de una mamitis crónica de carácter purulento. Se observan grandes focos de necrosis, numerosos heterófilos y abundantes bacterias, rodeados de tejido conjuntivo sin llegar a encapsularlos por completo. Tinción: H-E.

- Pododermatitis: Se caracteriza por la aparición de una dermatitis ulcerativa en la superficie palmar y plantar de las extremidades. La necrosis esta causada por la presión en la piel, usualmente como resultado de soportar un elevado peso corporal en jaulas de alambre. Frecuentemente se produce una dermatitis bacteriana secundaria, siendo *S. aureus* el agente aislado con mayor frecuencia.



Figura 3.3. Pododermatitis ulcerativa, en este caso observamos úlceras sangrantes en la superficie plantar, con escaso tejido cicatricial.

- Abscesos: Los abscesos de diferente tamaño, en su mayoría palpables desde el exterior del animal (figura 3.4), podían localizarse también en órganos internos. El tejido subcutáneo alrededor del absceso aparecía cianótico a causa de los desórdenes circulatorios, los cuales podían ir seguidos de necrosis y ulceración de la piel.

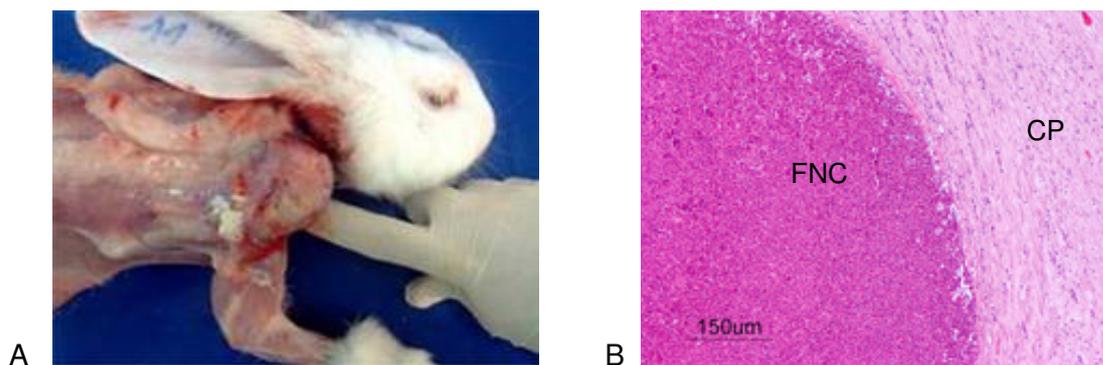


Figura 3.4. A: Absceso subcutáneo localizado a nivel de la escápula derecha. B: Absceso (imagen histológica): Se observa una gruesa cápsula fibrosa bien organizada (CP). El núcleo está formado por material necrótico (FNC) con abundantes heterófilos y restos celulares. Tinción: H-E.

Otitis: La otitis media era asintomática o, en caso de afección del oído interno, el animal desarrollaba tortícolis. Encontramos un caso en la granja 3, caracterizado por la aparición de tortícolis, y de un exudado de color blanquecino y consistencia cremosa en el oído.

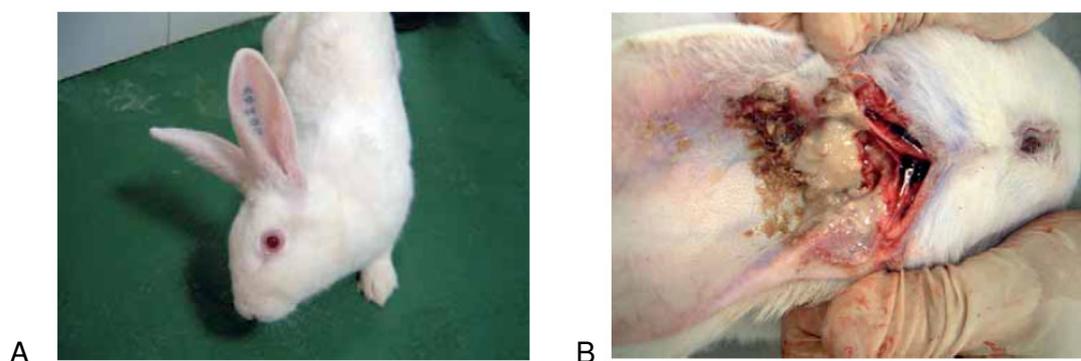


Figura 3.5. A: Tortícolis asociada a otitis media. B: Presencia de material purulento en el pabellón auditivo donde se aisló *S. aureus*.

Caracterización molecular de las cepas de *S. aureus* aisladas.

Con el fin de determinar si los diferentes aislados de *S. aureus*, procedentes de mucosa nasal y de lesiones purulentas, estaban relacionados genéticamente, se llevó a cabo el tipado molecular basado en el análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción de los genes *coa* y *spa* (PCR-RFLP) y el análisis por PCR del gen *clfB*. Se utilizó un código alfabético y numérico para identificar los diferentes *coa*, *spa* y *clfB*,

como se describe en Viana *et al.* (2007). El polimorfismo en el tamaño del producto de amplificación del gen *coa* permitió clasificar los aislados en 2 tipos: A y B (figura 3.6).

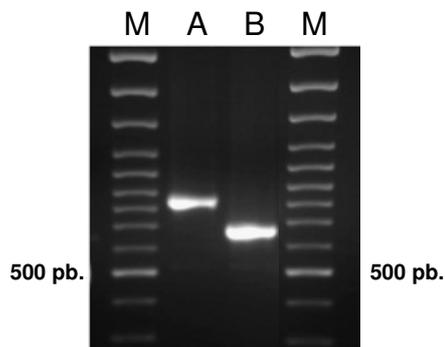


Figura 3.6. Análisis del producto de PCR del gen de la coagulasa por electroforesis en gel de agarosa. M: marcador de 100 pb (Fermentas).

La posterior digestión del producto de PCR del gen de la coagulasa con *CfoI*, dio lugar a dos patrones diferentes para cada producto de PCR. Obteniéndose finalmente 2 subtipos: A1 y B1 (figura 3.7).

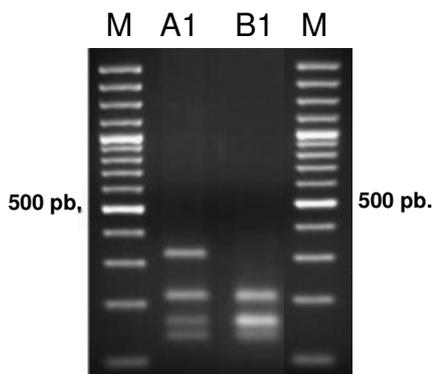


Figura 3.7. Patrones electroforéticos resultantes de la digestión del producto de PCR del gen de la coagulasa con *CfoI*. M: marcador 100 pb (Fermentas).

El análisis por PCR del gen de la proteína A dio lugar a 4 amplificados de distinto tamaño que se denominaron: I, II, III y IV (figura 3.8)

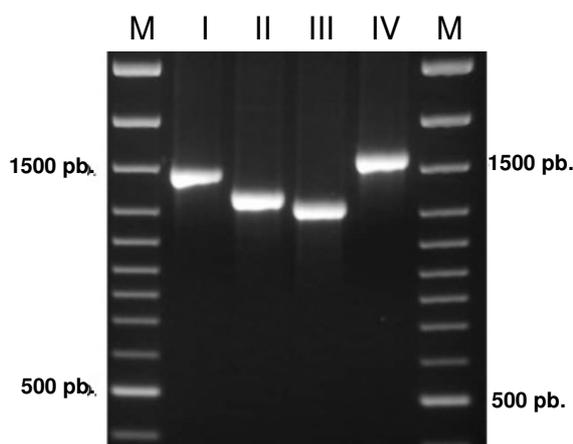


Figura 3.8. Análisis del producto de PCR d el gen *spa* por electroforesis en gel de agarosa. M: marcador de 100 pb (Fermentas).

La digestión del producto de PCR del gen *spa* con *CfoI*, dio lugar a 5 patrones diferentes: Un patrón para la PCR tipo I (I1), otro para la PCR tipo II (II1), un tercer patrón para el tipo III (III1) y por último 2 patrones más para el tipo IV (IV1 y IV2) (figura 3.9).

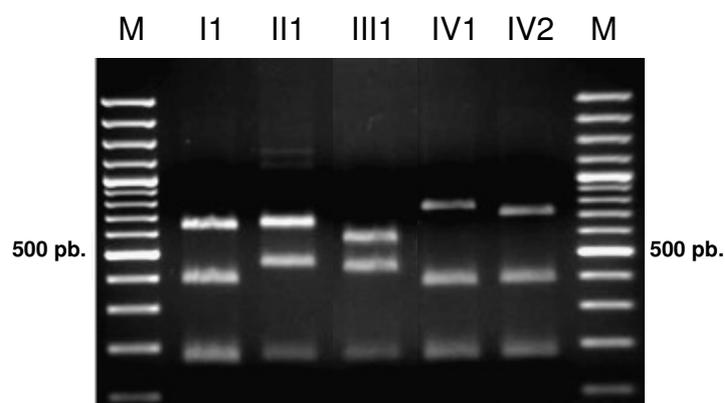


Figura 3.9. Patrones electroforéticos resultantes de la digestión del producto de PCR del gen de la proteína A con *CfoI*. M: marcador 100 pb (Fermentas).

En último lugar, el estudio de los aislados de conejo positivos a *S. aureus* mediante PCR del gen *clfB* dio lugar a 3 tipos diferentes que se denominaron utilizando letras del alfabeto griego: α , δ y κ .

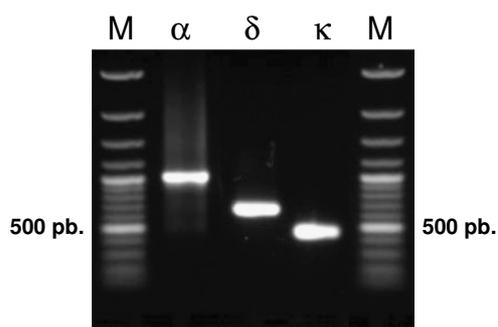


Figura 3.10. A: Análisis del producto de PCR del *clfB* por electroforesis en gel de agarosa. M: marcador de 100 pb (Fermentas).

En resumen, la combinación de tamaños obtenidos antes y después de la digestión, así como la combinación del análisis de los tres genes, dio lugar a 6 genotipos diferentes de *S. aureus*, determinados por los genes *coa/spa/clfB*: A1/III1/δ, A1/III1/κ, A1/III1/δ, B1/I1/α, B1/IV1/α, B1/IV2/α.

Análisis del genotipado de cepas de *S. aureus*.

Genotipos aislados de la mucosa nasal de animales portadores.

Se llevó a cabo el genotipado de las cepas de *S. aureus* aisladas de la mucosa nasal de las 63 conejas portadoras, obteniéndose los seis genotipos de *S. aureus* mencionados en el apartado anterior y que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3.5. Genotipos aislados, por granja, en animales sanos y en animales con lesiones.

Granja	Animales sanos	Animales con lesiones
1	A1/III1/δ	A1/III1/δ
2	-	A1/II1/δ, A1/II1/κ
3	A1/II1/δ, B1/I1/α, B1/IV1/α, B1/IV2/α	A1/II1/δ, B1/IV1/α
4	A1/II1/δ	A1/II1/δ

Tabla 3.6. Número de genotipos aislados, por granja, en conejas portadoras.

Genotipo	A1/II1/δ	A1/II1/κ	A1/III1/δ	B1/I1/α	B1/IV1/α	B1/IV2/α	Total
Granja							
1			19				19
2	4	1					5
3	21			2	3	2	28
4	13						13
Total	38	1	19	2	3	2	65

Como resumen podemos indicar que en la granja 1 sólo encontramos un genotipo de *S. aureus*, el A1/III1/δ, tanto en animales sanos como con lesiones. Además, dicho genotipo es exclusivo de esta granja. En la granja 2 aparecen dos genotipos: A1/II1/δ y A1/II1/κ; pero la ausencia de animales sanos portadores no nos permite comparar el genotipado. En la granja 3 es donde aparecen mayor número de genotipos: A1/II1/δ, B1/I1/α, B1/IV1/α y B1/IV2/α. Sin embargo, en animales con lesiones sólo encontramos dos de estos cuatro genotipos. Por último, en la granja 4 encontramos un único genotipo en animales sanos y con lesiones, el A1/II1/δ, además también presente en las granjas 2 y 3.

Genotipos aislados de lesiones.

Se estudiaron 62 conejas con lesiones, de las cuales 9 presentaron 2 procesos patológicos simultáneos, llevándose a cabo el genotipado de las cepas aisladas de ambas lesiones. Se obtuvieron 4 genotipos distintos: A1/II1/δ, A1/II1/κ, A1/III1/δ y B1/IV1/α. Dichos genotipos se encontraron también en la mucosa nasal. Sin embargo, no fuimos capaces de encontrar los genotipos B1/I1/α y B1/IV2/α de las lesiones.

Tabla 3.7. Genotipos aislados de las lesiones provocadas por *S. aureus*.

Granja	Genotipo	A1/II1/δ	A1/II1/κ	A1/III1/δ	B1/IV1/α	Total
		1	M P M/P A P/A O			15 5 3
2	M P M/P A P/A O	2 1	1			8
3	M P M/P A P/A O	16 1 1			1	19
4	M P M/P A P/A O	8 1 2 1				12
Total		35	3	23	1	62

* M: mastitis, P: pododermatitis, M/P: Mastitis y pododermatitis, A: absceso, P/A: pododermatitis y absceso, y O: otitis.

De los 6 genotipos aislados de mucosa nasal, como hemos reflejado en la tabla 3.6, el más extendido entre las explotaciones fue el A1/II1/δ, aislándose en 3 de las 4 explotaciones estudiadas. Además, dicho genotipo fue aislado en 38 ocasiones, un 58,46% de los casos, con lo cual también es el genotipo más extendido dentro de las explotaciones, a excepción de la granja 1. Si observamos el número de cepas aisladas de mucosa nasal genotipadas, 65, no corresponde con el número de conejas portadoras nasales, 63. Esto es debido a que en 2 ocasiones se aislaron 2 cepas con distinto genotipo en la mucosa nasal.

Al igual que ocurría en las cepas aisladas de mucosa nasal, el genotipo más extendido entre las diferentes lesiones y las granjas estudiadas, fue el A1/II1/δ, aislándose en 35 ocasiones.

Genotipos aislados de nariz y lesión de cada animal.

El tipado molecular se llevó a cabo con el fin de determinar si los diferentes aislados de *S. aureus*, procedentes de mucosa nasal y de lesiones, estaban relacionados genéticamente.

De las 62 hembras reproductoras con lesiones, 49 portaban *S. aureus* en la mucosa nasal. Al realizar el genotipado observamos como en el 99% de los casos, las cepas de *S. aureus* aisladas de la nariz presentaban el mismo genotipo que las cepas aisladas en la lesión. Tan solo en una ocasión, una coneja de la granja 2 presentó distinto genotipo: A1/II1/δ en la mucosa nasal y A1/II1/k en la lesión, concretamente un absceso.

Otro dato a tener en cuenta, son los dos casos de la granja 3 donde se aislaron dos cepas de *S. aureus* con distinto genotipo en la mucosa nasal. Es decir, aislamos el genotipo A1/II1/δ y B1/IV1/α simultáneamente en la nariz de dos conejas. En estos animales, sólo encontramos un genotipo en la lesión, siendo curiosamente en un caso de mamitis A1/II1/δ y en una coneja con otitis B1/IV1/α.

Nueve animales sufrieron dos procesos patológicos simultáneos, aislándose en todos los casos el mismo genotipo en ambas lesiones, que además fue igual al genotipo aislado de la mucosa nasal en los animales portadores.

En resumen, las colonias nasales de *S. aureus* suponen un foco de infección e individualmente estos microorganismos son capaces de transferirse a otros lugares del cuerpo dando lugar a lesiones de diferente índole. Queda por resolver si el estado de portador es un fenómeno primario o secundario a la presencia de lesiones.

**II. EL H₂O₂ INDUCE LA RESPUESTA SOS EN *S. aureus*
Y PROMUEVE LA TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE
GENES IMPLICADOS EN VIRULENCIA**

En el apartado anterior hemos hablado de uno de los mecanismos de persistencia de *S. aureus* en el hospedador, la adherencia al epitelio nasal. A pesar de ello, los organismos también poseen armas capaces de luchar frente a las infecciones estafilocócicas. Así, las células fagocíticas producen ROS, como el H_2O_2 , tóxicas para el estafilococo. El H_2O_2 daña el DNA induciendo SOS, mecanismo bien conocido en *Escherichia coli*. A continuación estudiamos este fenómeno en *S. aureus*.

El H_2O_2 induce la expresión de *recA* y *lexA*.

El H_2O_2 forma parte de las especies reactivas del oxígeno (ROS) involucradas en la defensa de microorganismos patógenos. Está producido por el sistema NADPH oxidasa, un complejo enzimático presente en células fagocíticas como los neutrófilos, y por algunas bacterias de los géneros *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp. y *Lactococcus* spp. Las ROS dañan el DNA induciendo SOS, donde *recA* y *lexA* son los dos reguladores principales de la respuesta. Conociendo dicha activación de la respuesta SOS por H_2O_2 en *E. coli* y otras bacterias (Goerlich *et al.*, 1989), sería lógico pensar que esta activación también se producirá en *S. aureus*. Para testar este hecho clonamos la región promotora de los genes *recA* y *lexA* en el plásmido de fusión transcripcional pCN41 (Charpentier *et al.*, 2004). Los plásmidos se introdujeron en las cepas RN4220 y RN4220 *lexA* Ind⁻. Esta cepa contiene un LexA no degradable al haberle introducido una mutación en el sitio de corte reconocido por RecA, G94E, dando como resultado un represor que no puede ser cortado y que no es sensible a la inducción por SOS (Maiques *et al.*, 2006). Dichas construcciones se analizaron en un ensayo de actividad β -lactamasa bajo condiciones estándar. Como se puede observar en la figura 3.11, a los 20 minutos de la adición de H_2O_2 a una concentración subletal para la bacteria (0,5 mM), se produjo un rápido aumento de la expresión de *recA* y *lexA* en la cepa RN4220, mientras que en la cepa mutante en *lexA* no se observó ningún efecto.

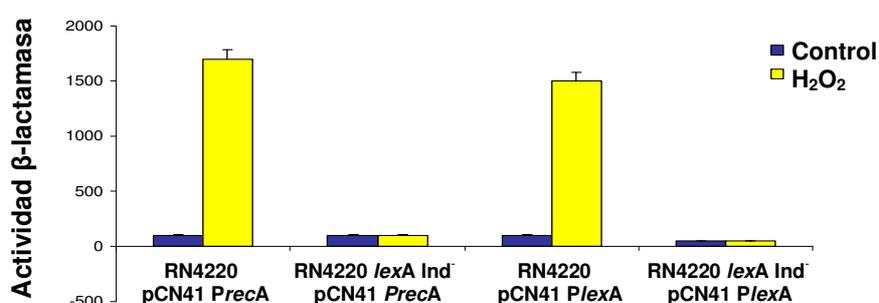


Figura 3.11. Inducción de la expresión de *recA* y *lexA* mediada por H_2O_2 .

El H₂O₂ induce profagos en *S. aureus*.

Una consecuencia de la inducción de la respuesta SOS en *S. aureus* es la inducción de profagos (Ubeda *et al.*, 2005). En un sistema inducido, la proteína RecA tiene la capacidad de catalizar la autohidrólisis de los represores de algunos profagos, con lo que se induce el ciclo lítico que provoca la muerte celular (Little, 1993; Sauer *et al.*, 1982). Para confirmar la inducción de la respuesta SOS tras la adición de H₂O₂, utilizamos dos cepas de *S. aureus* que contienen profagos inducibles: la cepa RN10359 y la cepa RN451, lisogénicas para los fagos ϕ 80 α y el ϕ 11, respectivamente.

Tabla 3.8. Título de fago tras la inducción con H₂O₂ de cepas lisogénicas de *S. aureus*^a.

Cepa donadora	Fago	Inductor ^b	Título fago ^c
RN10359	ϕ 80 α	NI	8.8 x 10 ⁵
		H ₂ O ₂ 0,05 mM	1.9 x 10 ⁶
		H ₂ O ₂ 0,1 mM	9.0 x 10 ⁷
		H ₂ O ₂ 0,5 mM	5.3 x 10 ⁹
		H ₂ O ₂ 1 mM	2.0 x 10 ⁸
		MC	3.6 x 10 ⁹
JP3592 (RN10359 cl G130E)	ϕ 80 α	NI	<10
		H ₂ O ₂ 0,05 mM	<10
		H ₂ O ₂ 0,1 mM	<10
		H ₂ O ₂ 0,5 mM	<10
		H ₂ O ₂ 1 mM	<10
		MC	<10
RN451	ϕ 11	NI	2.8 x 10 ⁴
		H ₂ O ₂ 0,05 mM	4.9 x 10 ⁴
		H ₂ O ₂ 0,1 mM	3.1 x 10 ⁵
		H ₂ O ₂ 0,5 mM	2.8 x 10 ⁶
		H ₂ O ₂ 1 mM	8.9 x 10 ⁵
		MC	2.4 x 10 ⁸
RN1030 (<i>recA</i> -)	ϕ 11	NI	<10
		H ₂ O ₂ 0,05 mM	<10
		H ₂ O ₂ 0,1 mM	<10
		H ₂ O ₂ 0,5 mM	<10
		H ₂ O ₂ 1 mM	<10
		MC	<10

a. La tabla muestra la media de 3 experimentos independientes, produciéndose una variación de $\pm 5\%$ en todos los casos.

b. MC: mitomicina C (2 μ g/ml); NI: no inducido.

c. N^o de calvas formadas por el fago por ml de cultivo, usando RN4220 como bacteria indicadora.

Asimismo, usamos como controles las cepas JP3592 (RN10359, en la cual introdujimos una sustitución G130E en el represor cl del fago $\phi 80\alpha$, resultando insensible a la inducción por medio de la activación de la respuesta SOS) y RN1030 (RN451 mutante *recA*-). Como se observa en la Tabla 3.8, la adición de H_2O_2 produjo una inducción, dosis-dependiente, de los fagos presentes en las cepas RN10359 y RN451, mientras que no se observó inducción en las cepas control JP3592 y RN1030, insensibles a la respuesta SOS.

Adicionalmente, y para confirmar el papel de LexA en la inducción de la respuesta SOS, utilizamos las cepas RN27 y RN451, con sus correspondientes controles LexA Ind⁻. En estudios anteriores nuestro grupo había introducido esta mutación LexA Ind⁻ (G94E) en el gen *lexA* de las cepas de *S. aureus* RN27 (lisógeno del $\phi 80\alpha$) y RN451 (lisógeno del $\phi 11$), generando así las cepas JP1868 y JP1869, respectivamente, ambas con una proteína LexA no degradable.

Tabla 3.9. Título de fago tras la inducción con H_2O_2 de las cepas lisogénicas de *S. aureus*^a RN27 y RN451, y sus respectivos *lexA* Ind⁻.

Cepa donadora	Fago	Inductor ^b	Título fago ^c
RN27	$\phi 80\alpha$	NI	5.3×10^5
		H_2O_2 0,5 mM	2.3×10^9
		MC	6.5×10^9
RN451	$\phi 11$	NI	2.8×10^4
		H_2O_2 0,5 mM	2.3×10^6
		MC	2.4×10^8
JP1868 (RN27 <i>lexA</i> Ind ⁻)	$\phi 80\alpha$	NI	3.4×10^4
		H_2O_2 0,5 mM	3.5×10^6
JP1869 (RN451 <i>lexA</i> Ind ⁻)	$\phi 11$	NI	3.4×10^4
		H_2O_2 0,5 mM	2.9×10^6

a. La tabla muestra los resultados de un experimento representativo.

b. MC: mitomicina C (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$); NI: no inducido.

c. N^o de calvas formadas por el fago por ml de cultivo, usando RN4220 como bacteria indicadora.

Tras la inducción de estas cepas, y como se puede observar en la Tabla 3.9, la cepa JP1868 (RN27 LexA Ind⁻) mostró una reducción en el título de fago $\phi 80\alpha$ tras el tratamiento con H₂O₂, confirmando así el papel de LexA en la inducción de la respuesta SOS mediada por H₂O₂. Sorprendentemente, a pesar de que el H₂O₂ induce el fago $\phi 11$, se obtuvieron títulos similares tras la inducción con H₂O₂ de las cepas JP1869 (RN451 *lexA* Ind⁻) y RN451 (Tabla 3.9), sugiriendo la existencia de una vía independiente a LexA en la inducción del fago $\phi 11$ por la activación de la respuesta SOS con H₂O₂.

El H₂O₂ favorece la replicación y transferencia horizontal de SaPIs mediada por fagos.

Trabajos previos de nuestro grupo habían demostrado que la inducción de la respuesta SOS en cepas lisogénicas que contenían SaPI1 o SaPIbov1 producía la replicación y la transferencia de estas islas. Para determinar si el H₂O₂ podía inducir la replicación y transferencia de las diferentes SaPIs, crecimos las cepas JP3603 (lisógeno del $\phi 80\alpha$, SaPIbov1 *tst::tetM*) y JP1794 (lisógeno del $\phi 11$, SaPIbov1 *tst::tetM*) en presencia de H₂O₂. Como se puede observar en la figura 3.12 y en la Tabla 3.10, se produjo un incremento de la replicación y transferencia de SaPIbov1.

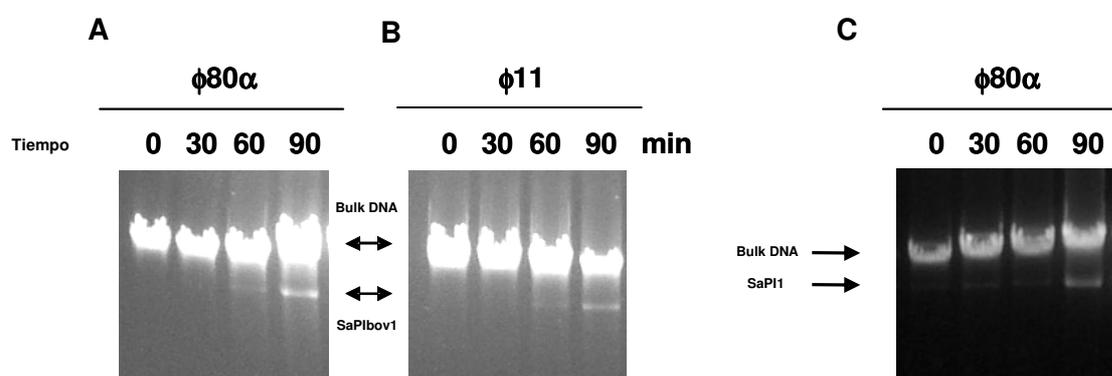


Figura 3.12. Inducción de la replicación de SaPIbov1 y SaPI1 por exposición a H₂O₂. Cultivos bacterianos de JP3603 (A), JP1794 (B) y JP3602 (C) fueron expuestos a H₂O₂, seguidamente se incubaron a 32°C. Se tomaron muestras a los tiempos indicados para la extracción de su DNA, el cual fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio y fotografiado.

Para confirmar que la estimulación de la transferencia de SaPIbov1 por el H₂O₂ era consecuencia de la inducción de la respuesta SOS, tratamos con H₂O₂ la cepa

JP1603 (cepa mutante *recA*- derivada de la RN1030, lisogénica para el fago ϕ 11, que posee SaPIbov1 *tst::tetM*). Como era de esperar, no se observó transferencia tras la inducción con H₂O₂ de la cepa JP1603 (Tabla 3.10).

Tabla 3.10. Frecuencia de transducción de distintas SaPIs tras la inducción con H₂O₂ de cepas lisogénicas de *S. aureus*^a.

Cepa donadora	Fago	SaPI	Inductor ^b	Transducción (Título) ^c
JP3603 (RN10359)	ϕ 80 α	SaPIbov1	NI	1.6 x 10 ⁴
			H ₂ O ₂ 0,5 mM	1.5 x 10 ⁷
			MC	1.0 x 10 ⁷
JP1794	ϕ 11	SaPIbov1	NI	3.2 x 10 ²
			H ₂ O ₂ 0,5 mM	3.6 x 10 ⁴
			MC	2.9 x 10 ⁷
JP1603 (<i>recA</i> mutante)	ϕ 11	SaPIbov1	NI	<10
			H ₂ O ₂ 0,5 mM	<10
			MC	<10
JP3656	ϕ 80 α cl G130E	SaPIbov1	NI	<10
			H ₂ O ₂ 0,5 mM	<10
			MC	<10
JP1625	ϕ 11 cl G131E	SaPIbov1	NI	<10
			H ₂ O ₂ 0,5 mM	<10
			MC	<10
JP3602 (RN10359)	ϕ 80 α	SaPI1	NI	6.7 x 10 ³
			H ₂ O ₂ 0,5 mM	1.5 x 10 ⁷
			MC	1.0 x 10 ⁷

a. La tabla muestra los resultados de un experimento representativo.

b. MC: mitomicina C (2 μ g/ml); NI: no inducido.

c. N^o de transductantes x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa aceptora.

Además, el papel del H_2O_2 en la transferencia de SaPI_{bov1} mediada por SOS se confirmó mediante el análisis de las cepas JP1625 y JP3656, cepas SaPI_{bov1} positivas, lisogénicas para el $\phi 11$ y $\phi 80\alpha$ respectivamente, que contienen una mutación que elimina el sitio de corte reconocido por RecA del represor (cI) del fago. El H_2O_2 no pudo incrementar la transferencia de la isla en estas cepas (Tabla 3.10).

Finalmente, nos planteamos la cuestión de si SaPI1, la isla de patogenicidad prototipo de *S. aureus*, podría escindir, replicar y transferirse después del tratamiento con H_2O_2 de una cepa lisogénica para el fago $\phi 80\alpha$. Con este propósito se indujo la cepa JP3602 (SaPI1 positiva, lisogénica para el $\phi 80\alpha$). La activación de la respuesta SOS mediada por H_2O_2 incrementó la replicación y transferencia de SaPI1 (figura 3.12 y tabla 3.10).

Papel de la catalasa en la inducción de la respuesta SOS por H_2O_2 .

S. aureus produce una potente catalasa como defensa frente a la toxicidad del H_2O_2 . Por ello, parece paradójico que bajas concentraciones de H_2O_2 puedan inducir SOS. Para evaluar el papel de la catalasa en la inducción de SOS por H_2O_2 , construimos mutantes en el gen que codifica para esta enzima (*katA*) en las cepas RN450 y RN10359 (lisógeno 80α), generando las cepas JP3852 (RN450 *kat*-mutante) y JP3853 (RN10359 *kat*-mutante). Las cepas WT y sus mutantes en catalasa se incubaron 6 horas en TSB con varias concentraciones de H_2O_2 .

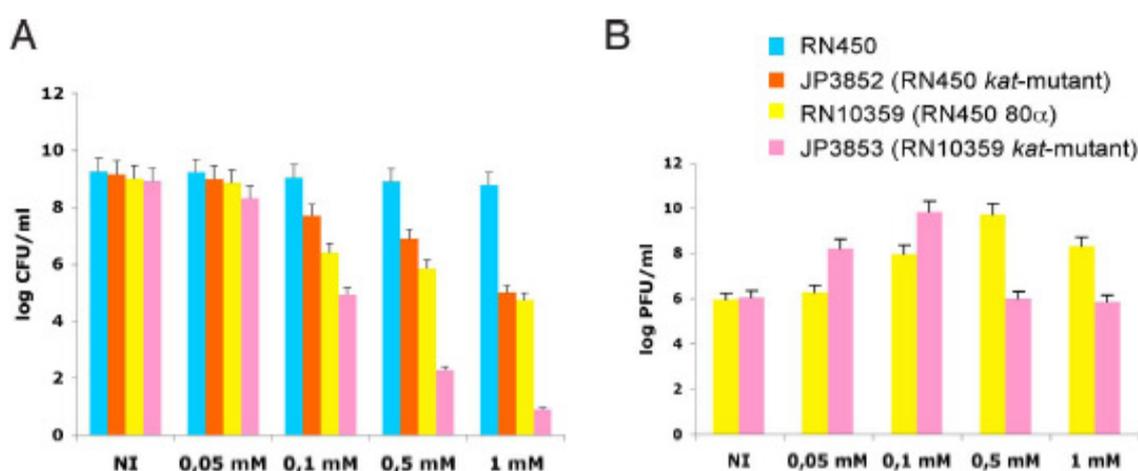


Figura 3.13. Papel de la catalasa en la inducción de la respuesta SOS por H_2O_2 . (A) Supervivencia de *S. aureus* en medio suplementado con H_2O_2 a diferentes concentraciones. Los valores representan la media de 3 experimentos independientes, produciéndose una variación de $\pm 5\%$ en todos los casos. (B) Título de fago obtenido en las cepas lisogénicas.

En primer lugar, si comparamos el comportamiento de la cepa RN450 frente a su respectivo mutante en catalasa (figura 3.13 A), observamos como la cepa WT no se vio afectada por ninguna de las concentraciones de H_2O_2 a las que fue expuesta, al contrario que su respectivo mutante, en el cual a partir de 0,1 mM empieza a verse un descenso en la supervivencia. Por lo tanto, la catalasa es importante para la supervivencia de *S. aureus* frente a la toxicidad del H_2O_2 .

A continuación comparamos la supervivencia de las cepa RN450 frente a su respectivo lisógeno en el fago 80 α (RN10359). Al igual que ocurría con la cepa RN450 *kat*-mutante, la supervivencia de la cepa RN10359 fue menor tras el contacto con H_2O_2 a una concentración de 0,1 mM, aunque el descenso esta vez fue más acusado. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la catalasa protege a la cepa RN450 frente a las concentraciones de H_2O_2 a las cuales fue expuesta, pero tiene un efecto mucho menos protector en la cepa RN10359, lo que indica que la catalasa posee una función protectora de viabilidad en presencia de H_2O_2 , pero no puede evitar la susceptibilidad a la inducción de la respuesta SOS. Esto podría ser debido a que la letalidad por H_2O_2 abarca un amplio rango de daños oxidativos, mientras que la inducción de SOS involucra sólo la vía RecA-LexA, la cual es inducida por mínimo daño en el DNA, mucho menos que el necesario para matar la célula. Quizás la catalasa no actúa lo bastante rápido o de manera eficiente a estas bajas concentraciones para prevenir el daño en el DNA. Por tanto, la KatA puede proteger a las cepas no lisógenas pero no a las lisógenas de la muerte por H_2O_2 a bajas concentraciones.

Por último, si comparamos la supervivencia de la cepa RN10359 con su respectivo mutante en catalasa, observamos como el número de bacterias que sobrevive ya se reduce a concentraciones de 0,05 mM; con 0,1mM el descenso es más brusco que en la cepa RN10359 y finalmente a concentraciones de 0,5 - 1 mM, la cepa JP3853 (lisógena y mutante en catalasa) apenas sobrevive, lo que sugiere una suma de procesos: inducción más toxicidad.

Para completar el estudio analizamos el título de fago obtenido en las cepas lisógenas al entrar en contacto con H_2O_2 (figura 3.13 B). Observamos como el título aumenta conforme se incrementa la concentración de H_2O_2 , hasta alcanzar una concentración de 0,5 mM, donde la cepa RN10359 tiene el máximo título de fago y su respectivo mutante en catalasa reduce dicho título. Esta baja producción de fagos en las cepas mutantes en *katA* a las concentraciones de H_2O_2 más elevadas es probablemente resultado de un descenso en la capacidad de las células para soportar el crecimiento del fago.

**III. ELIMINACIÓN DE COMPETIDORES POR INDUCCIÓN
DE FAGOS RESIDENTES: EL EJEMPLO DE LA LUCHA
ENTRE *S. pneumoniae* Y *S. aureus***

Un sorprendente ejemplo de competición entre especies es la producción por ciertas bacterias de H_2O_2 a concentraciones que son letales para otras. Un caso concreto de este proceso es la eliminación de la nasofaringe de *S. aureus* por *S. pneumoniae*, un hecho de gran relevancia clínica. Cómo ocurre, sin embargo, es un gran misterio. En el apartado anterior hemos demostrado cómo el H_2O_2 induce la respuesta SOS en *S. aureus*. Lo que aquí nos planteamos es analizar el mecanismo por el cual *S. pneumoniae* elimina a *S. aureus* en un cocultivo. Nuestra hipótesis es que la producción de H_2O_2 por parte de *S. pneumoniae* induce fagos residentes en *S. aureus*, cuya activación provoca la eliminación de la bacteria de su nicho de infección.

Supervivencia de *S. aureus* tras la inducción de fagos residentes por H_2O_2 .

Decidimos comenzar nuestro estudio analizando la supervivencia al H_2O_2 de diferentes cepas de *S. aureus* que portan fagos temperados. Para ello testamos 8 cepas de *S. aureus*: 2 no lisógenas (RN450 y V329) y 6 lisógenas (COL, Mu50, FRI-S6 RF122, RN10359 y LUG855, siendo esta última una cepa productora de la toxina PVL, codificada en un fago lisógeno de esta cepa, y últimamente implicada en graves infecciones estafilocócicas). Usamos H_2O_2 a una concentración de 0,5 mM, concentración esta comúnmente observada en cultivos de neumococo y que, como hemos observado en el apartado anterior, da lugar a un mayor título de fago. Como se muestra en la figura 3.14 y en las tablas 3.11 y 3.12, las cepas que portaban fagos temperados fueron muy sensibles al H_2O_2 , mientras que las no lisógenas fueron insensibles.

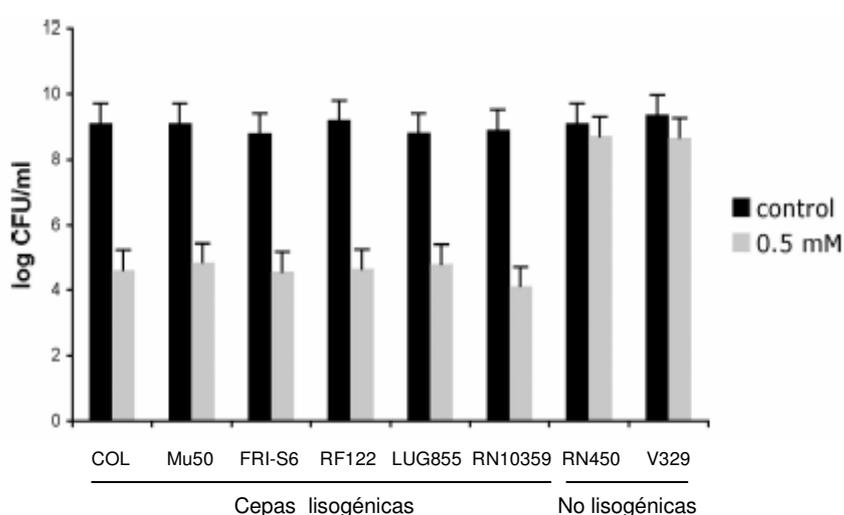


Figura 3.14. Lisis de *S. aureus* por H_2O_2 . Supervivencia de diferentes cepas de *S. aureus* que portan fagos temperados (COL, Mu50, FRI-S6, RF122, LUG855 y RN10359) o no (RN450 y V329) en medio suplementado con H_2O_2 0,5 mM o medio control. Los valores representan la media de 3 experimentos independientes, produciéndose una variación de $\pm 5\%$ en todos los casos.

Tabla 3.11. Título de fago y supervivencia tras la inducción con H₂O₂ de cepas de *S. aureus* que portan fagos temperados^a.

Cepa donadora	Inductor ^b	ufc ^c	Título fago ^d
COL	NI	1.3 x 10 ⁹	4.4 x 10 ⁵
	H ₂ O ₂ 0,05 mM	1.3 x 10 ⁹	4.6 x 10 ⁵
	H ₂ O ₂ 0,1 mM	1.0 x 10 ⁹	6.4 x 10 ⁵
	H ₂ O ₂ 0,5 mM	4.1 x 10 ⁴	7.4 x 10 ⁸
	H ₂ O ₂ 1 mM	6.7 x 10 ⁴	1.4 x 10 ⁸
Mu50	NI	1.3 x 10 ⁹	2.6 x 10 ⁵
	H ₂ O ₂ 0,05 mM	1.7 x 10 ⁹	3.8 x 10 ⁵
	H ₂ O ₂ 0,1 mM	6.3 x 10 ⁶	6.3 x 10 ⁶
	H ₂ O ₂ 0,5 mM	6.9 x 10 ⁴	5.1 x 10 ⁸
	H ₂ O ₂ 1 mM	9.2 x 10 ⁴	5.7 x 10 ⁸
FRI-S6	NI	2.3 x 10 ⁹	3.6 x 10 ⁴
	H ₂ O ₂ 0,05 mM	4.6 x 10 ⁸	1.4 x 10 ⁵
	H ₂ O ₂ 0,1 mM	2.9 x 10 ⁸	5.6 x 10 ⁵
	H ₂ O ₂ 0,5 mM	3.6 x 10 ⁶	4.0 x 10 ⁷
	H ₂ O ₂ 1 mM	7.7 x 10 ⁵	1.3 x 10 ⁸
RF122	NI	6.0 x 10 ⁷	ND
	H ₂ O ₂ 0,05 mM	9.0 x 10 ⁶	ND
	H ₂ O ₂ 0,1 mM	6.3 x 10 ⁶	ND
	H ₂ O ₂ 0,5 mM	7.5 x 10 ³	ND
	H ₂ O ₂ 1 mM	5.9 x 10 ³	ND
LUG855	NI	6.5 x 10 ⁸	1.4 x 10 ⁴
	H ₂ O ₂ 0,05 mM	8.0 x 10 ⁸	1.9 x 10 ⁴
	H ₂ O ₂ 0,1 mM	3.6 x 10 ⁸	2.3 x 10 ⁷
	H ₂ O ₂ 0,5 mM	6.3 x 10 ⁴	3.3 x 10 ⁹
	H ₂ O ₂ 1 mM	5.9 x 10 ⁴	6.4 x 10 ⁷

a. La tabla muestra la media de 3 experimentos independientes, produciéndose una variación de $\pm 5\%$ en todos los casos.

b. MC: mitomicina C (2 $\mu\text{g/ml}$); NI: no inducido.; ND: no determinado (los fagos de la cepa RF122 no infectan a la RN4220).

c. Número de ufc/ml recogidas después de 4 horas de incubación.

d. N^o de calvas formadas por el fago por ml de cultivo, usando RN4220 como bacteria indicadora.

Como se muestra en la tabla 3.11, donde llevamos a cabo la inducción con diferentes concentraciones de H₂O₂ de cepas naturales de *S. aureus* que portan fagos temperados, el H₂O₂ induce los profagos en las cepas testadas, de forma dosis-dependiente, dando lugar a una reducción en la viabilidad bacteriana. Sin embargo la respuesta al H₂O₂ fue bastante variable dependiendo de la cepa, quizás por diferentes respuestas al estrés oxidativo. A continuación llevamos a cabo el mismo estudio, pero en cepas de laboratorio.

Tabla 3.12. Título de fago y supervivencia tras la inducción con H₂O₂ de cepas lisogénicas y no lisogénicas de *S. aureus*^a.

Cepa donadora	Fago	Inductor ^b	ufc ^c	Título fago ^d
RN450		NI	8.4 x 10 ⁸	-
		H ₂ O ₂ 0,05 mM	7.1 x 10 ⁸	-
		H ₂ O ₂ 0,1 mM	2.9 x 10 ⁸	-
		H ₂ O ₂ 0,5 mM	1.8 x 10 ⁸	-
		H ₂ O ₂ 1 mM	6.3 x 10 ⁷	-
RN10359	φ80α	NI	5.9 x 10 ⁸	8.8 x 10 ⁵
		H ₂ O ₂ 0,05 mM	1.2 x 10 ⁹	1.9 x 10 ⁶
		H ₂ O ₂ 0,1 mM	2.9 x 10 ⁷	9.0 x 10 ⁷
		H ₂ O ₂ 0,5 mM	1.8 x 10 ⁴	5.3 x 10 ⁹
		H ₂ O ₂ 1 mM	5.6 x 10 ³	2.0 x 10 ⁸
JP3592 (RN10359 cl G130E)	φ80α	NI	6.7 x 10 ⁸	<10
		H ₂ O ₂ 0,05 mM	1.8 x 10 ⁸	<10
		H ₂ O ₂ 0,1 mM	1.9 x 10 ⁸	<10
		H ₂ O ₂ 0,5 mM	1.8 x 10 ⁸	<10
		H ₂ O ₂ 1 mM	0.8 x 10 ⁸	<10
RN451	φ11	NI	5.9 x 10 ⁸	2.8 x 10 ⁴
		H ₂ O ₂ 0,05 mM	4.2 x 10 ⁸	4.9 x 10 ⁴
		H ₂ O ₂ 0,1 mM	4.9 x 10 ⁷	3.1 x 10 ⁵
		H ₂ O ₂ 0,5 mM	3.8 x 10 ⁵	2.8 x 10 ⁶
		H ₂ O ₂ 1 mM	5.6 x 10 ⁴	8.9 x 10 ⁵
RN1030 (RN451 <i>recA</i> -mutante)	φ11	NI	ND	<10
		H ₂ O ₂ 0,05 mM	ND	<10
		H ₂ O ₂ 0,1 mM	ND	<10
		H ₂ O ₂ 0,5 mM	ND	<10
		H ₂ O ₂ 1 mM	ND	<10

a. La tabla muestra la media de 3 experimentos independientes, produciéndose una variación de ±5% en todos los casos.

b. MC: mitomicina C (2 µg/ml); NI: no inducido.; ND: no determinado.

c. Número de ufc/ml recogidas después de 4 horas de incubación.

d. Nº de calvas formadas por el fago por ml de cultivo, usando RN4220 como bacteria indicadora.

Para ello, expusimos las cepas RN450, RN10359 (RN450 lisógena para el fago 80 α) y RN451 (RN450 lisógena para el fago 11), a concentraciones de H₂O₂ que oscilaban entre 0,05 y 1 mM. Como controles usamos las cepas JP3592 (RN10359 cl G130E) y RN1030 (RN451 *recA*-mutante), ambas insensibles a la respuesta SOS. La inducción de los profagos en aquellas cepas con una respuesta SOS funcional fue, como era de esperar, acompañada de un descenso en la viabilidad. Por el contrario, no se observó un descenso en la viabilidad en aquellas cepas insensibles a la respuesta SOS, excepto una ligera reducción de la viabilidad producida directamente por la toxicidad del H₂O₂ a concentraciones elevadas. Por todo ello podemos concluir que el H₂O₂, a las concentraciones habitualmente producidas por neumococo, lisa las células que portan fagos temperados, pero no las cepas no lisógenas, y lo hacen al inducir la respuesta SOS. Como la mayoría de cepas de *S. aureus* portan fagos en forma lisogénica, la producción de H₂O₂ es una estrategia muy efectiva frente al estafilococo.

Efectos del cocultivo de *S. aureus* con *S. pneumoniae* productor de H₂O₂.

Los resultados anteriores nos llevaron a analizar los efectos de la producción de H₂O₂ por *S. pneumoniae* sobre la supervivencia de *S. aureus*. Para ello crecimos la cepa de *S. aureus* RN10359 (lisogénica para el fago 80 α) en presencia de las cepas de *S. pneumoniae* productoras naturales de H₂O₂, Pn20 y TIGR4. Un cultivo de *S. pneumoniae* crecido hasta unas 10⁷ ufc/ml produce aproximadamente 1 mM de H₂O₂. Como se observa en la tabla 3.13, el H₂O₂ producido por *S. pneumoniae* tiene los efectos esperados en el cocultivo con la cepa RN10359: inducción del fago 80 α y pérdida de viabilidad. Para confirmar este resultado, utilizamos la cepa RN10359 con el represor del fago mutado y vimos como fue insensible al H₂O₂, al igual que la cepa RN450 (no lisógena).

A continuación testamos 2 mutantes de las cepas Pn20 y TIGR4, con deleciones en el gen de la piruvato oxidasa, *spxB*, necesario para la producción de H₂O₂. Ninguno de los mutantes en *spxB* tuvo efecto en la viabilidad, ni en la inducción de profagos en estafilococo.

Tabla 3.13. Efectos del cocultivo de *S. aureus* con *S.pneumoniae* productor de H₂O₂^a.

Cepa donadora	Inductor ^b	ufc ^c	Título fago ^d
RN450	H ₂ O ₂	7.3 x 10 ⁸	-
	Pn-20	7.8 x 10 ⁸	-
	Pn-20 ΔspxB	1.1 x 10 ⁹	-
	TIGR4	1.2 x 10 ⁹	-
	TIGR4 ΔspxB	1.0 x 10 ⁹	-
	NI	1.1 x 10 ⁹	-
RN10359	H ₂ O ₂	7.0 x 10 ⁵	5.0 x 10 ⁹
	Pn-20	4.6 x 10 ⁵	8.7 x 10 ⁷
	Pn-20 ΔspxB	1.4 x 10 ⁹	3.3 x 10 ⁵
	TIGR4	4.2 x 10 ⁶	5.9 x 10 ⁷
	TIGR4 ΔspxB	1.2 x 10 ⁹	5.3 x 10 ⁵
	NI	1.9 x 10 ⁹	4.6 x 10 ⁵
JP3592 (RN10359 cl G130E)	H ₂ O ₂	5.3 x 10 ⁸	<10
	Pn-20	8.8 x 10 ⁸	<10
	Pn-20 ΔspxB	2.1 x 10 ⁸	<10
	TIGR4	1.2 x 10 ⁸	<10
	TIGR4 ΔspxB	9.7 x 10 ⁸	<10
	NI	1.0 x 10 ⁹	<10

a. La tabla muestra la media de 3 experimentos independientes, produciéndose una variación de ±5% en todos los casos.

b. NI: no inducido.

c. Número de ufc/ml recogidas después de 4 horas de incubación.

d. N° de calvas formadas por el fago por ml de cultivo, usando RN4220 como bacteria indicadora.

El cocultivo de *S. pneumoniae* y *S. aureus* induce la transferencia de SaPIbov1.

En apartados anteriores hemos visto como el H₂O₂ induce la transferencia de SaPIs. A la vista de estos resultados, sería lógico pensar que el cocultivo de cepas de *S. pneumoniae* productoras de H₂O₂ con *S. aureus*, lisogénicas y conteniendo SaPIs, induciría la transferencia de las islas. Como en el apartado anterior, llevamos a cabo el cocultivo de las cepas Pn20 y TIGR4, y sus respectivos mutantes en *spxB*, con las cepas de *S. aureus* JP3603 (RN10359 SaPIbov1) y JP3656 (JP3603 cl G130E). Como se observa en la tabla 3.14, el H₂O₂ producido por *S. pneumoniae* tiene los efectos esperados en el cocultivo con la cepa JP3603, aumento de la transferencia de SaPIbov1, mientras que en la cepa JP3656, insensible al H₂O₂ por tener el represor

del fago mutado, no se induce la transferencia de la isla. Además, ninguno de los mutantes en *spxB* indujo la transferencia de SaPIbov1.

Tabla 3.14. Frecuencia de transducción de cepas lisogénicas de *S. aureus*, que contienen SaPIbov1, tras la incubación con *S.pneumoniae*^a.

Cepa donadora	Fago	SaPI	Inductor ^b	Transducción (Título) ^c
JP3603	φ80α	SaPIbov1	H ₂ O ₂	3.8 x 10 ⁸
			Pn-20	1.7 x 10 ⁷
			Pn-20 ΔspxB	1.2 x 10 ⁵
			TIGR4	8.0 x 10 ⁶
			TIGR4 ΔspxB	1.1 x 10 ⁵
			NI	1.1 x 10 ⁵
JP3656 (JP3603 cl G130E)	φ80α	SaPIbov1	H ₂ O ₂	<10
			Pn-20	<10
			Pn-20 ΔspxB	<10
			TIGR4	<10
			TIGR4 ΔspxB	<10
			NI	<10

a. La tabla muestra la media de 3 experimentos independientes, produciéndose una variación de ±5% en todos los casos.

b. NI: no inducido.

c. N^o de transductantes x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa aceptora.

El H₂O₂ no induce SOS en *S. pneumoniae*.

Al igual que ocurre con *S. aureus*, la mayor parte de las cepas clínicas de *S. pneumoniae* contienen fagos residentes (Lopez and García, 2004), por lo que *a priori*, cabría esperar que el H₂O₂ no indujese SOS en *S. pneumoniae*. Para testar esta hipótesis, comparamos la sensibilidad de cepas de *S. pneumoniae* lisogénicas y no lisogénicas frente al H₂O₂ y a la mitomicina C (MC). La MC es un potente inductor de la respuesta SOS tanto en *S. aureus* como *S. pneumoniae*. Como se muestra en la figura 3.15, ninguna cepa de *S. pneumoniae* fue sensible al H₂O₂; sin embargo las cepas lisogénicas (623 y 949) si fueron sensibles a la inducción por MC, dando lugar a la lisis, y en consonancia a la inducción del fago (dato no confirmado en este estudio). Lo que queda claro es que ni las cepas de estreptococo lisógenas, ni las no lisógenas

son sensibles al H_2O_2 a las concentraciones encontradas en los cultivos y que el H_2O_2 no induce SOS en estreptococo, hecho que concuerda con la habilidad de este microorganismo para usar con impunidad el H_2O_2 como arma de destrucción masiva.

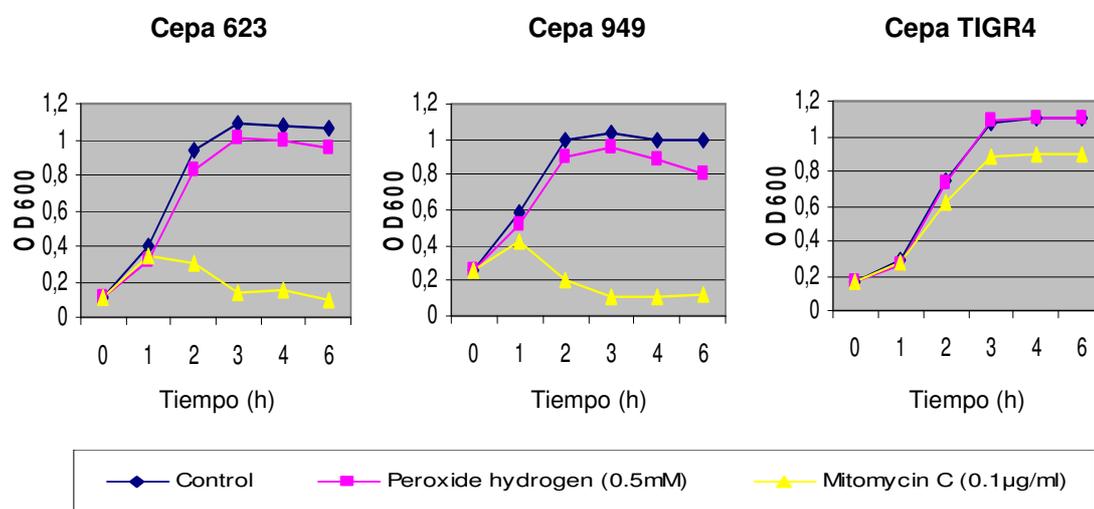


Figura 3.15. Lisis de *S. pneumoniae* inducida por H_2O_2 o mitomicina C. Adición a cultivos de *S. pneumoniae* lisogénicos (623 y 949) y no lisogénicos (TIGR4), crecidos hasta $DO_{600}=0,2$ (tiempo 0), de H_2O_2 (0,5 mM) o MC (0,1µg/ml) y monitorización a DO_{600} .

Las cepas de *S. aureus* que portan fagos temperados son más sensibles a los antibióticos inductores de la respuesta SOS.

Recientemente se ha visto que los antibióticos que producen daño en el DNA como las quinolonas o los β -lactámicos, inducen profagos y por ello promueven la difusión de toxinas codificadas por fagos e islas de patogenicidad (Maiques *et al.*, 2006; Ubeda *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2000). En base a nuestros resultados, podríamos predecir que las bacterias lisógenas serían más sensibles a los efectos bactericidas de los antibióticos que dañan el DNA debido a la lisis causada por inducción de fagos por SOS, al igual que ocurre con el H_2O_2 . Para testar esta hipótesis utilizamos las cepas RN450, RN10359 (RN450 lisógena para el fago 80 α) y RN451 (RN450 lisógena para el fago 11), y las incubamos en presencia de quinolonas (ciprofloxacino) a concentraciones que oscilaban entre 0,2 y 4 μ g/ml. Como controles usamos las cepas JP3592 (RN10359 cl G130E) y JP1622 (RN451 cl G131E). Como se observa en la figura 3.16 (A), las cepas RN10359 y RN451, dos lisógenos diferentes derivados de la cepa RN450, son más sensibles al ciprofloxacino que su pariente no lisógeno. Esta sensibilidad fue eliminada en ambos casos al mutar el

repressor del fago (cepas JP3592 y JP1622), haciéndolo insensible a la respuesta SOS. De forma similar, tal como se observa en la figura 3.16 (B) y en un test de antibiograma clásico en el que usamos un disco de enrofloxacino (quinolona), la cepa con el repressor del fago mutado (JP3592) presentó una menor sensibilidad al antibiótico que la cepa WT (RN10359), como se observa en el diámetro del halo de inhibición. En un sentido más general, podemos predecir que las bacterias lisógenas son más sensibles que las no lisógenas a la interferencia por antibióticos (inductores de la respuesta SOS) producidos en el ambiente, donde las concentraciones suelen ser bajas.

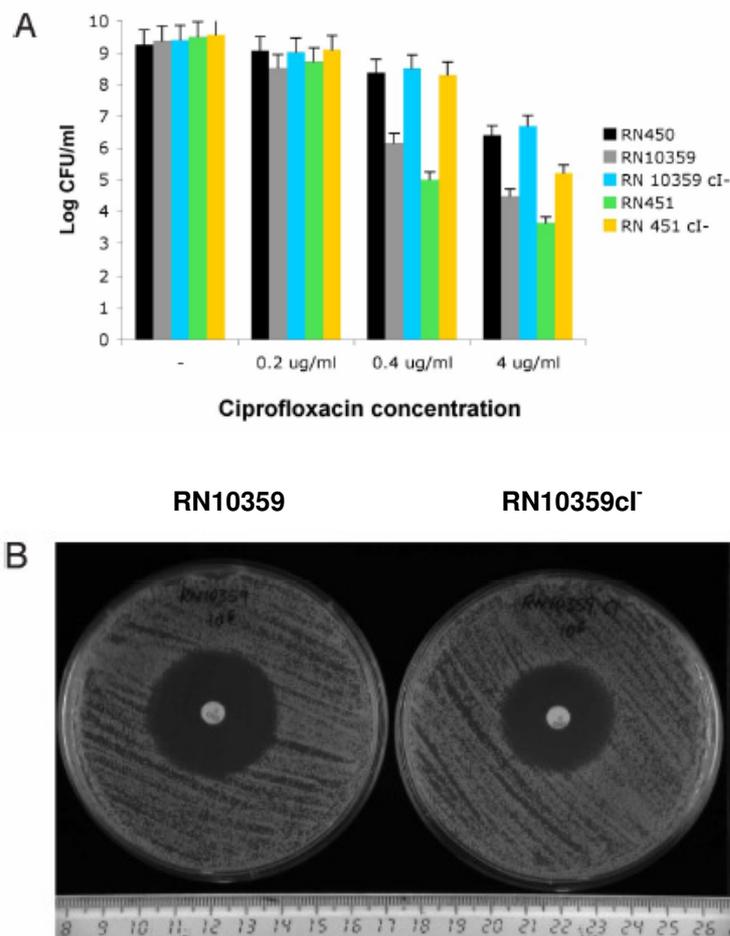


Figura 3.16. Lisis de *S. aureus* lisogénicos mediada por antibióticos. **(A)** Supervivencia de *S. aureus* en medio suplementado con diferentes concentraciones de ciprofloxacino. Los valores representan la media de 3 experimentos independientes, produciéndose una variación de $\pm 5\%$ en todos los casos. **(B)** Antibiograma que muestra la diferente susceptibilidad entre las cepas RN10359 (lisogénica para el $\phi 80\alpha$) y RN10359cI⁻ ($\phi 80\alpha$ no inducible por SOS) a enrofloxacina. Diámetro del halo de inhibición: RN10359, 36 mm; RN10359cI⁻, 30 mm.

**IV. LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS CODIFICADAS EN
FAGOS E IPs DE *S. aureus* DISMINUYE TRAS LA
INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS**

Una característica destacable de la patogénesis bacteriana es el hecho de que muchos de los genes bacterianos que codifican toxinas, adhesinas, invasinas u otros factores de virulencia, se encuentran codificados en elementos genéticos móviles tales como transposones, plásmidos, bacteriófagos o bien forman parte de regiones particulares del cromosoma bacteriano denominadas islas de patogenicidad (IPs).

La capacidad de *S. aureus* para producir enfermedades en el hospedador está relacionada, en gran medida, con su capacidad para producir un tipo concreto de factores de virulencia denominados superantígenos (SAGs), dentro de los cuales encontramos las enterotoxinas A, B, C, D, E, G, H, I, K, L y M, las toxinas exfoliativas A y B y la toxina del síndrome de shock tóxico (TSST). La gran mayoría de SAGs de *S. aureus* están codificados en IPs (Betley and Mekalanos, 1985; Lindsay *et al.*, 1998; Novick, 2003).

Como acabamos de ver, la inducción de la respuesta SOS en *S. aureus* induce profagos, promoviendo la transferencia horizontal de genes implicados en virulencia. Existen ejemplos claros donde los fagos poseen un importante papel en la virulencia de las cepas que los contienen, como es el caso de la toxina Shiga en *E. coli*. Los genes *stx* están localizados dentro de un profago relacionado con el fago λ . Como λ , este profago contiene unidades transcripcionales para varias funciones, como replicación, morfogénesis, lisis, etc., que son coordinadamente expresadas durante intervalos específicos. Los genes *stx* se encuentran en el último operón, por lo que son transcritos por el último promotor del fago junto con los genes encargados de la lisis y morfogénesis. La inducción del fago con mitomicina C incrementa la producción de toxina Shiga, al igual que la sobreexpresión de Q, un gen que codifica un antiterminador necesario para la eficiente expresión de los últimos genes en los fagos tipo λ (Wagner and Waldor, 2002). Teniendo en mente lo que ocurre en *E. coli*, nos planteamos conocer qué ocurriría con la producción de toxinas codificadas por SaPIs y fagos de *S. aureus*: ¿Se incrementarían al aumentar el número de copias del gen que las codifica?. ¿Existiría relación entre la replicación de los elementos móviles y la producción de toxinas codificadas por ellos?.

La producción de la toxina TSST-1 disminuye tras la inducción de la respuesta SOS.

Para iniciar este estudio, nos planteamos caracterizar la expresión de la toxina TSST-1 codificada en SaPI1.

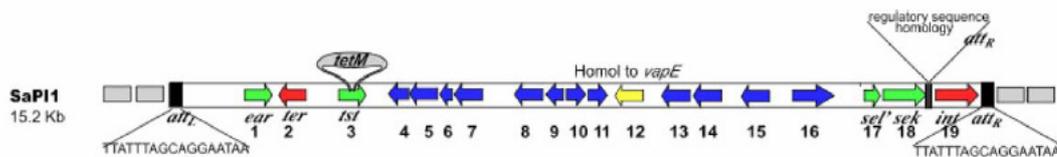


Figura 3.17. Mapa de SaPI1, tomado de Novick, 2003. Esta isla codifica para 3 SAGs, podemos ver sus genes representados: *tst*, *sel'* y *sek*.

Para analizar la expresión de TSST-1 mediante Western-blot utilizamos la cepa JP4753 (RN450 Δspa SaPI1 lisógena del $\phi 80\alpha$). Es importante decir que esta cepa es mutante para la proteína A, la cual interfiere con la detección de la toxina, al presentar productos de degradación que reaccionan con los anticuerpos. Llevamos a cabo la inducción del cultivo con MC y tomamos muestra del sobrenadante a los 90 y 180 minutos tras la inducción con MC (en esta toma de muestra el cultivo aparecía lisado). Para completar el estudio, y comprobar que se había producido la inducción tras el tratamiento con MC, titulamos el fago y la isla. Para el estudio del título de isla utilizamos la cepa JP5106 (RN450 Δspa SaPI1 *tst::tet* lisógena del $\phi 80\alpha$), que porta un casete de tetraciclina con objeto de su seguimiento. Como se observa en la figura 3.18, la cantidad de toxina es mayor a los 180 minutos en el cultivo no inducido que en el inducido (MC), lo que sugiere que el incremento en el número de copias del gen, producto de la replicación de la isla, no provoca un incremento en la síntesis de la toxina, más bien todo lo contrario. Sin embargo, como era de esperar, el título de fago y de isla fue mayor en el cultivo con MC (dato no mostrado).

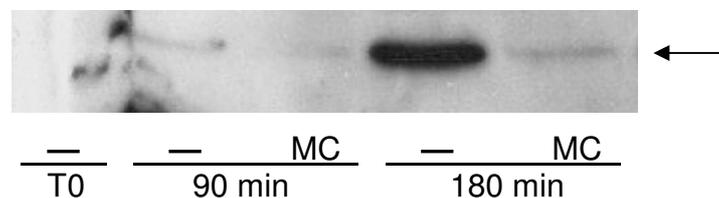


Figura 3.18. Análisis de la expresión de TSST-1 mediante Western-Blot. Inmunodetección con anticuerpo comercial TSST-1 anti-mouse monoclonal. T0: tiempo 0, cultivo exponencial de JP4753 $DO_{540}=0,3-0,4$; - : sin inducir, cultivo control sin adición de mitomicina C (MC).

A continuación, quisimos ver si la inhibición anterior era debida a la inducción del fago o a la adición de MC al cultivo. Para ello utilizamos las cepas JP5102 (RN450

Δspa SaPI1) y su respectivo lisógeno del $\phi 80\alpha$ (JP4753), y como en el experimento anterior, estas cepas se crecieron e indujeron con MC, tomándose muestra a los 90 y 180 minutos. Como control se usaron cultivos no inducidos con MC. Como se observa en la figura 3.19, no observamos diferencias entre la presencia o no de fago. Sin embargo, la inducción de la respuesta SOS, por adición de MC, produjo una disminución importante en la síntesis de la toxina (figura 3.19).

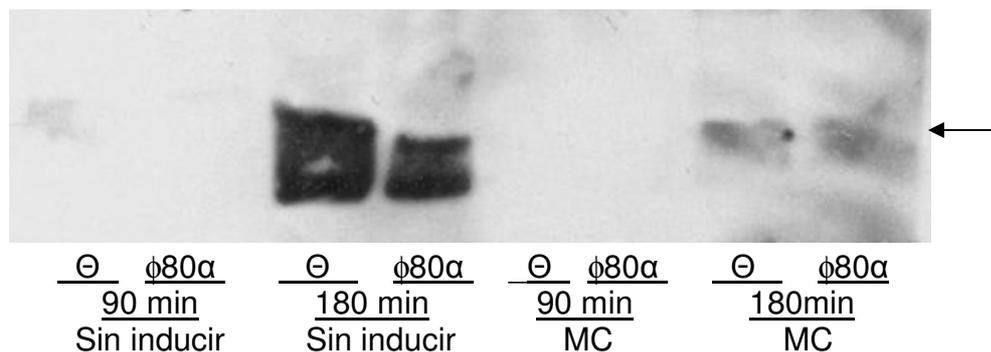


Figura 3.19. Análisis de la expresión de TSST-1 mediante Western-Blot. Inmunodetección con anticuerpo comercial TSST-1 anti-mouse monoclonal. Θ : JP5102 (RN450 Δspa SaPI1), $\phi 80\alpha$: JP4753 (RN450 Δspa SaPI1 $\phi 80\alpha$).

En base al resultado anterior, y teniendo en cuenta que tras la infección de *S. aureus* por fagos no se induce la respuesta SOS (resultado no publicado), decidimos estudiar cómo se afectaba la producción de toxina tras la infección de la cepa JP5102 (RN450 Δspa SaPI1) con el fago $\phi 80\alpha$, el cual replica la isla SaPI1, y comparamos la producción de toxina TSST-1 con la cepa JP4753 (RN450 Δspa SaPI1 lisógena del $\phi 80\alpha$) inducida con MC. Como control usamos la cepa JP5102 no infectada, ni puesta en contacto con MC. En la figura 3.20 podemos ver como no hay diferencias entre infección o inducción (carriles 1 y 2).

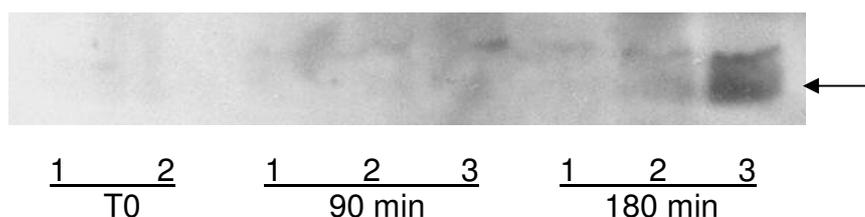


Figura 3.20. Análisis de la expresión de TSST-1 mediante Western-Blot. Inmunodetección con anticuerpo comercial TSST-1 anti-mouse monoclonal. (1) JP5102 infectada con el $\phi 80\alpha$, (2) JP4753 inducida con MC y (3) JP5102.

Estos resultados sugieren que además de por activación de la respuesta SOS, la síntesis de toxinas se inhibe por la replicación de la isla y/o el fago.

Para comprobar si la inhibición era consecuencia de la replicación de la isla, utilizamos la cepa RN450 SaPI1 Δ orf22. La ORF 22 de SaPI1 codifica para una proteína con motivo “helix-turn-helix” (HTH), típico de factores de regulación transcripcional. Dicha proteína presenta cierta homología con la familia de reguladores transcripcionales Cro/CI, mostrando similitudes con represores transcripcionales de fagos. Así, el mutante en la orf22 de SaPI1 se replica en ausencia de cualquier inductor (Ubeda *et al.*, 2008). Además, muestra un fenotipo anormal, ya que crece lentamente y adquiere un color amarillento-anaranjado consecuencia de la replicación de la isla.

Para estudiar el efecto de la replicación de la isla en la producción de la toxina, crecimos las cepas JP5102 (RN450 Δ spa SaPI1), su respectivo Δ orf22 (JP5110) y JP5104 (RN450 Δ spa SaPI1 *tst::tet*) como control negativo de TSST-1, hasta $DO_{540}=0,3-0,4$ (tiempo 0) y dejamos a 32°C en agitación lenta (80 r.p.m) durante 3 horas. Tomamos muestra de sobrenadante a los 90 y 180 minutos, llevando a cabo SDS-PAGE y Western-Blot. Como se observa en la figura 3.21, a los 90 minutos sólo aparecía banda de TSST-1 en el cultivo de la cepa JP5102, que es la cepa WT, mientras que a los 180 min observábamos banda tanto en esta cepa como en su respectivo Δ orf22 (carriles 1 y 2 a los 180 min), aunque esta segunda era menos intensa (figura 3.21).

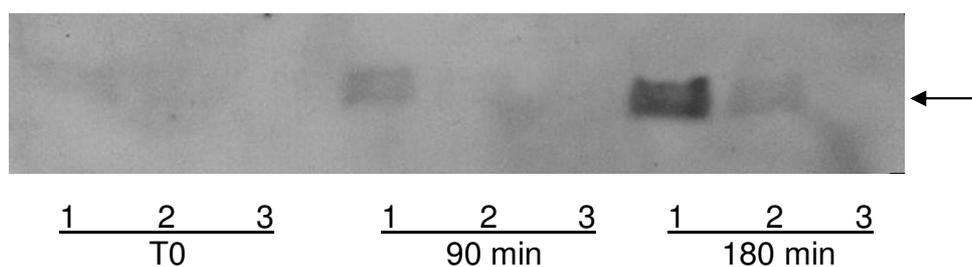


Figura 3.21. Análisis de la expresión de TSST-1 mediante Western-Blot. Inmunodetección con anticuerpo comercial TSST-1 anti-mouse monoclonal. (1) JP5102 (2) JP5110 (3) JP5104.

Por lo tanto, queda demostrado que la replicación de SaPI1, ya sea por activación de la respuesta SOS, infección o mutación del represor, da lugar a una reducción en la síntesis de la toxina TSST-1.

Estudio de la producción de las toxinas codificadas por SaPIbov1

SaPIbov1 codifica para tres toxinas: TSST-1, SEC y SEL.

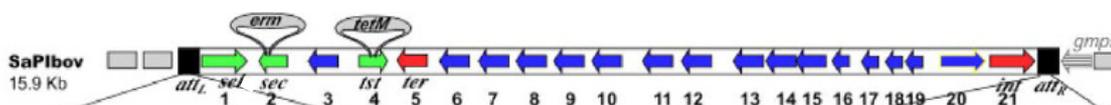


Figura 3.22. Mapa de SaPIbov1, tomado de Novick, 2003. Esta isla codifica para tres SAGs, podemos ver sus genes representados: *sel*, *sec* y *tst*.

En vista de los resultados anteriores, quisimos ver si nuestras conclusiones eran válidas en otra isla y con otras toxinas. Para ello analizamos la expresión de TSST-1, SEC y SEL, presentes en SaPIbov1 (figura 3.22). Estas toxinas son SAGs, los dos primeros dan lugar a enterotoxemias, mientras que TSST-1 está involucrada en el síndrome de shock tóxico.

Para analizar la expresión de TSST-1 mediante Western-blot utilizamos las cepa JP3528 (RN450 SaPIbov1 *sel::eri*, lisógena del $\phi 80\alpha$). Al igual que anteriormente, llevamos a cabo la inducción del cultivo con MC y tomamos muestra del sobrenadante a los 90 y 180 minutos (en la última toma de muestra el cultivo aparecía lisado). Para completar el estudio, y comprobar que se había producido la inducción tras el tratamiento con MC, titulamos el fago y la isla. Como se observa en la figura 3.23, la cantidad de TSST-1 es mayor a los 180 min en el cultivo no inducido, igual que ocurría con SaPI1. En este western también observamos una banda de 50 Kb aproximadamente, que se corresponde con la proteína A. De nuevo el título de fago y de isla fue mayor en la cepa inducida con MC que en la no inducida (dato no mostrado).

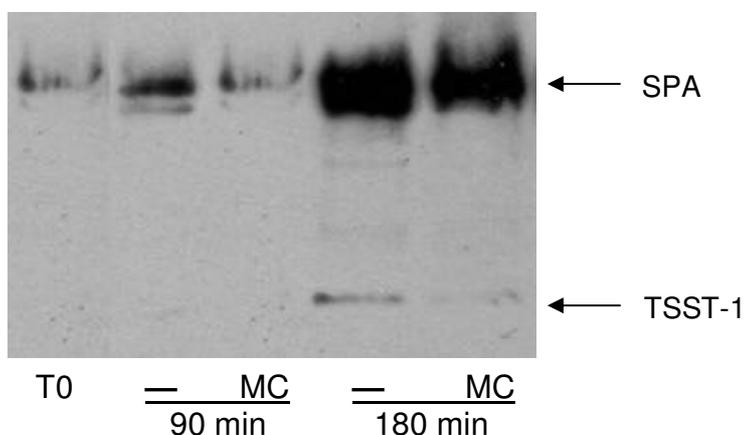


Figura 3.23. Análisis de la expresión de TSST-1 mediante Western-Blot. Inmunodetección con anticuerpo comercial TSST-1 anti-rabbit policlonal. T0: tiempo 0, cultivo exponencial de JP3528 $DO_{540}=0,3-0,4$; - : sin inducir, cultivo control sin adición de mitomicina C (MC).

A continuación, analizamos la expresión de las dos enterotoxinas presentes en SaPIbov1, SEC y SEL. En primer lugar, mediante doble recombinación utilizando el plásmido pMAD (Arnaud *et al.*, 2004), introdujimos una cola de histidinas al final de cada uno de los genes que codifican para las toxinas SEC y SEL (ver material y métodos), con el fin de detectar dichas toxinas en un Western-Blott con un anticuerpo comercial frente a la cola de Histidinas. Así obtuvimos la cepa JP5212 (RN450 SaPIbov1 *tst::tet*, lisógena del $\phi 80\alpha$ y que expresa SEC con una cola de His en el extremo C-terminal) y procedimos, como en experiencias anteriores, a su inducción con MC, tomando muestra a tiempo 0 y a los 90 y 180 minutos (fig. 3.24).

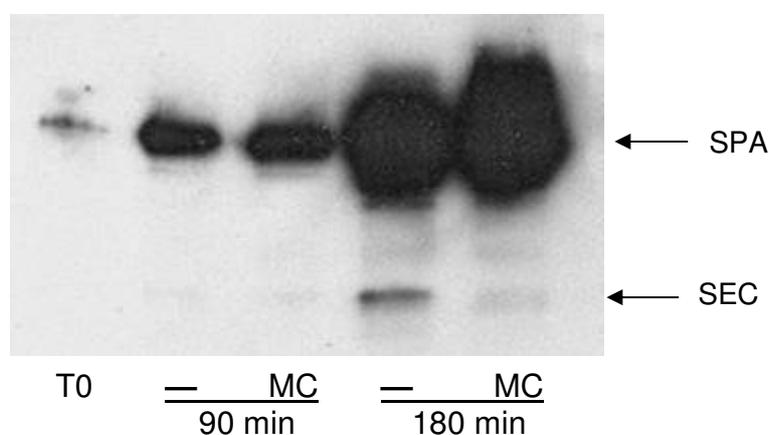


Figura 3.24. Análisis de la expresión de SEC mediante Western-Blot. Inmunodetección con anticuerpo comercial Mouse anti-His. T0: tiempo 0, cultivo exponencial de JP5212 $DO_{540}=0,3-0,4$; - : sin inducir, cultivo control sin adición de mitomicina C (MC).

Como se observa en la figura 3.24, obtuvimos el mismo resultado que para TSST-1, una banda de SEC más intensa a los 180 min en el cultivo sin inducir que en el inducido con MC. Por último, analizamos la producción de SEL en la cepa JP5479 (RN450 SaPIbov1 *tst::tet*, lisógena del $\phi 80\alpha$ y que expresa SEL con una cola de His en el extremo C-terminal). Como ocurría para SEC, también fue mayor la producción de toxina en el cultivo sin inducir a los 180 min que en el inducido (fig. 3.25).

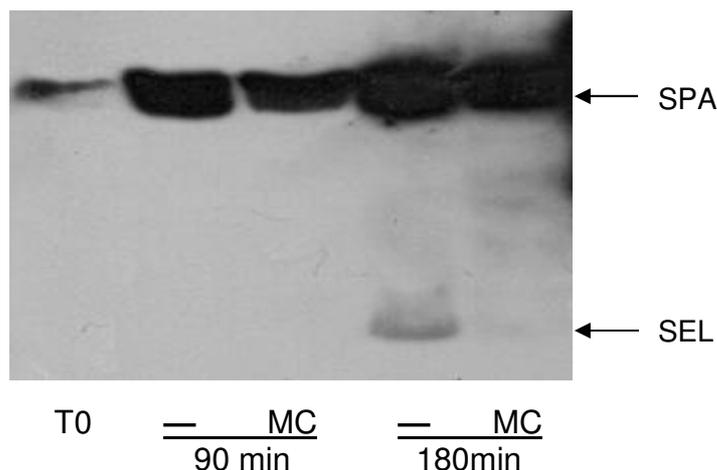


Figura 3.25. Análisis de la expresión de SEL mediante Western-Blot. Inmunodetección con anticuerpo comercial Mouse anti-His. T0: tiempo 0, cultivo exponencial de JP5479 DO₅₄₀=0,3-0,4.; - : sin inducir, cultivo control sin adición de mitomicina C (MC).

Por todo ello, podemos concluir que la activación de la respuesta SOS por MC inhibe la síntesis de las toxinas codificadas por SaPI_{bov1}: SEC, SEL y TSST-1.

Estudio de la producción de factores de virulencia codificados por el fago phiSa3ms

El fago phiSa3ms presente en la cepa de *S. aureus* MSSA 476 codifica 4 factores de virulencia: 3 enterotoxinas (SEA, SEG y SEK, representadas por una flecha negra en la figura 3.27) y una enzima extracelular, la estafiloquinasa (SAK). Este último factor de virulencia está más relacionado con mecanismos que aumentan el potencial invasivo de la bacteria (Lottenberg *et al.*, 1994) y contribuyen a la protección de *S. aureus* frente a las defensas del hospedador (Jin *et al.*, 2004).

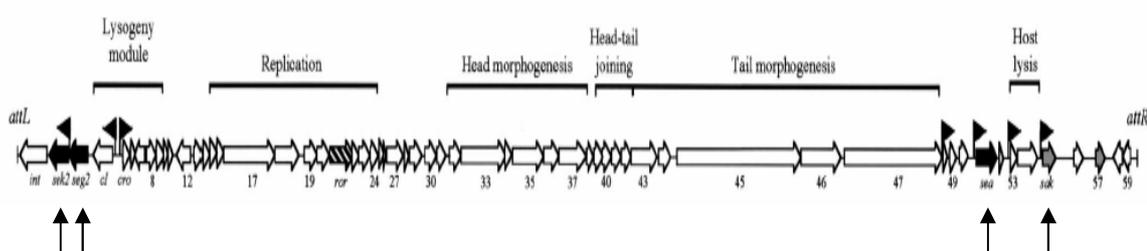


Figura 3.26. Mapa del ϕ phiSa3ms, tomado de Sumby and Waldor, 2003. Este fago codifica para 4 factores de virulencia, podemos ver sus genes representados: *sea*, *sak*, *sek2* y *seg2*.

Estudios anteriores habían descrito como la inducción del ϕ phiSa3ms con MC da lugar a un incremento de la transcripción de los 4 factores de virulencia codificados por este fago (Sumbly and Waldor, 2003). La MC activa los promotores latentes del fago que pueden iniciar la transcripción de los factores de virulencia y da lugar a la escisión y replicación del fago (al igual que ocurre en las SaPIs), incrementando la cantidad de DNA disponible para la transcripción. Sumbly y Waldor (2003) construyeron un ϕ phiSa3ms deficiente en la replicación (inactivando *ror*, como la inactivación de la helicasa en las SaPIs) para investigar su influencia en la transcripción de *sea* y *sak*, y vieron como el bloqueo de la replicación fue acompañado de una disminución en la transcripción de los genes, concluyendo que la replicación es crítica para aumentar la transcripción de los genes que codifican para las toxinas. La MC incrementaba la transcripción de los factores de virulencia, pero si ese incremento en transcripción se acompañó de un incremento en la producción de toxina se desconoce. Por ello nos planteamos el estudio de la expresión de la proteína SEA, como toxina codificada en fagos.

Para analizar la expresión de SEA mediante Western-blot crecimos la cepa MSSA 476 en TSB hasta $DO_{540}=0,3-0,4$; a continuación dividimos el cultivo en 2, añadiendo a uno de ellos MC y al otro no, y continuando el crecimiento del cultivo a 32°C en agitación lenta, tomando muestras de ambos cultivos a los 90 y 180 minutos. En este caso no pudimos titular el ϕ phiSa3ms ya que no infecta a nuestra cepa aceptora (RN4220). Como se observa en la figura 3.27, la cantidad de toxina es mayor a los 180 min en el cultivo no inducido, al igual que ocurría en el resto de toxinas analizadas. De nuevo el incremento en el número de copias del gen, producto de la replicación del fago, inhibe la síntesis de la toxina. Podemos observar como la producción de SPA no se vio afectada por efecto de la MC.

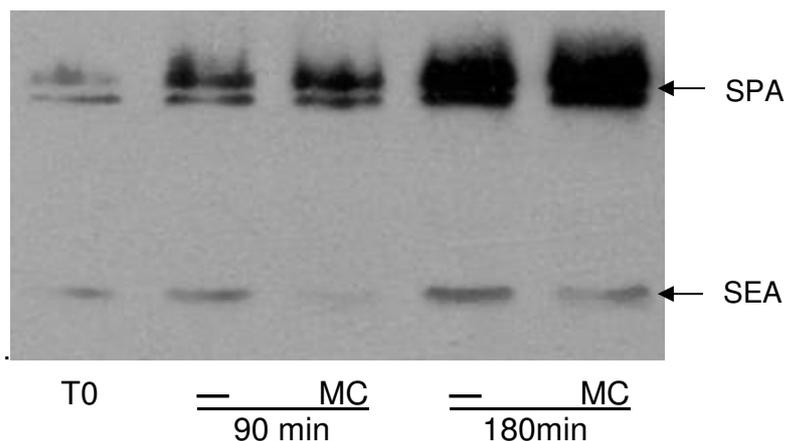


Figura 3.27. Análisis de la expresión de SEA mediante Western-Blot. Inmunodetección con anticuerpo comercial SEA anti-rabbit polyclonal. T0: tiempo 0, cultivo exponencial de MSSA476 $DO_{540}=0,3-0,4$; - : sin inducir, cultivo control sin adición de mitomicina C (MC).

Por todo ello, podemos concluir que la producción de toxinas codificadas en fagos e IPs de *S. aureus* disminuye tras la replicación de dichos elementos, ya sea por inducción de la respuesta SOS, infección o eliminación de su represor. El proceso de replicación es crítico para aumentar la transcripción de los genes que codifican para las toxinas (en los elementos testados), pero ese incremento en la transcripción no va acompañado de un incremento en la producción de toxina.

Capítulo IV

Discusión

PORTADOR NASAL DE *S. aureus*: UN FACTOR DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE ESTAFILOCOCIAS EN CONEJOS DE GRANJA.

Los portadores nasales de *S. aureus* están considerados una importante fuente de infección en humanos (Wertheim *et al.*, 2005). Aproximadamente, un tercio de la población es portador nasal, con variaciones según las comunidades estudiadas (personal hospitalario, pacientes hospitalizados, drogodependientes, etc). Otros factores que pueden influir en el porcentaje de portadores nasales de *S. aureus* son la presencia de anomalías nasales, la edad, el estatus hormonal en las mujeres, la ecología de la flora nasal y las infecciones virales del tracto respiratorio superior (Kluytmans *et al.*, 1997). En contraste, en los animales existen pocos estudios acerca de la colonización de *S. aureus* en diferentes localizaciones del cuerpo. Recientemente un estudio mostró como el 29% de las ovejas sanas portaban *S. aureus* en su nariz (Vautor *et al.*, 2005). El porcentaje de portadores nasales en conejas sanas que encontramos en este trabajo fue más elevado (69,4%) que las tasas de infección encontradas en humanos u ovejas. Estas diferencias pueden ser debidas a varias razones: al estudio de una población con problemas crónicos de estafilococosis; a la comparación de diferentes especies o a diferencias en la calidad del muestreo y de las técnicas de cultivo utilizadas en estos estudios.

Adicionalmente, los resultados muestran como el porcentaje de portadores nasales fue considerablemente más elevado en conejas que presentaban lesiones (94,3%) comparado con las conejas aparentemente sanas (46,4%). Hallazgos similares han sido descritos en humanos donde la tasa de portadores nasales más elevada se encontró en pacientes con infecciones en piel por *S. aureus*, comparado con la población normal (Kluytmans *et al.*, 1997).

Las colonias nasales de *S. aureus* suponen un foco de infección e individualmente estos microorganismos son capaces de transferirse a otros lugares del cuerpo (Wertheim *et al.*, 2006), incluso internamente, induciendo bacteriemia (von Eiff *et al.*, 2001), bronquitis y neumonía (Corne *et al.*, 2005). La asociación entre portadores nasales de *S. aureus* y enfermedad estafilocócica fue descrita por Danbolt en un estudio sobre furunculosis realizado en humanos (Solberg, 1965). Posteriormente, numerosos estudios han confirmado dichos hallazgos (Perl *et al.*, 2002; Williams, 1963). La difusión bacteriana de la nariz a otras partes del cuerpo ha sido inducida experimentalmente en conejos después de la inoculación intranasal de *S. aureus* (Hermans *et al.*, 2000a). En este trabajo analizamos la posibilidad de que los animales infectados por *S. aureus* fuesen portadores nasales de esta bacteria, siendo

éste un importante factor de riesgo para el desarrollo de una estafilococia. Para ello, genotipamos mediante PCR o PCR-RFLP, utilizando oligos específicos para los genes *coa*, *spa* y *clfB*, diferentes aislados de *S. aureus*. El genotipado mediante la combinación de estos tres genes (*coa*, *spa* y *clfB*) es un método de tipado rápido, sencillo, barato y reproducible que permite discriminar entre diferentes cepas de *S. aureus* en estudios epidemiológicos (Viana *et al.*, 2007). En el presente estudio las cepas aisladas de la cavidad nasal y de la lesión estaban relacionadas genéticamente en el 99% de los animales, lo que sugería el posible origen nasal de la enfermedad. Además, la presencia de animales portadores sin lesión sugiere que éstos pueden actuar como focos de diseminación de la bacteria. Sin embargo, no podemos descartar la vía contraria, en la que algunos animales sufren primero la lesión y posteriormente adquieren el estado de portador nasal.

Existe cierta controversia acerca de si todas las cepas de *S. aureus* son patógenas, teniendo el mismo potencial de producir enfermedad, o si la capacidad de invasión está relacionada con genotipos particularmente virulentos. Algunos clones han mostrado ser más virulentos que otros; sin embargo, dándose las condiciones clínicas apropiadas, todas y cada una de las cepas de *S. aureus* pueden llegar a convertirse en un patógeno que amenaza la vida (Wertheim *et al.*, 2005). En este estudio, la cepa A1/II1/δ de *S. aureus* fue el aislado predominante, tanto en la mucosa nasal como en las lesiones. De los 6 genotipos aislados de mucosa nasal, el más extendido entre las explotaciones fue éste, aislándose en 3 de las 4 explotaciones estudiadas. Este dato concuerda con un estudio realizado por nuestro grupo de investigación (Viana *et al.*, 2007), en el cual el genotipo más representado geográficamente fue el A1/II1/δ presente en 20 explotaciones de la Comunidad Valenciana, de 30 estudiadas en su totalidad. Esta amplia distribución de un número limitado de cepas ha sido publicada anteriormente en ganado vacuno, ovejas y conejos (Hermans *et al.*, 2000b; Katsuda *et al.*, 2005; Mork *et al.*, 2005; Su *et al.*, 1999). Recientemente, Mork *et al.* (2005) sugirieron que las cepas más difundidas en la naturaleza presentaban una mayor capacidad de colonización e invasión, en contraste con las cepas esporádicamente distribuidas que, además eran más heterogéneas genéticamente. Adicionalmente, se ha demostrado la transferencia horizontal de genes de virulencia con un mismo origen (O'Brien *et al.*, 2002; Ubeda *et al.*, 2005).

S. aureus queda como un importante reto clínico y, aparentemente, algunas cepas podrían poseer ciertos factores de patogenicidad que las hagan más

prevalentes y/o patógenas que otras (Wertheim *et al.*, 2005). Esta amplia distribución de un número limitado de cepas virulentas podría explicar por qué las cepas de alta virulencia tienen mayor habilidad para colonizar el hospedador y, en el caso de la cepa A1/II1/δ, de desarrollar lesiones. Se ha publicado que la capacidad de colonización juega un papel importante en la virulencia de *S. aureus* en conejos (Hermans *et al.*, 2000a).

En el presente estudio varias cepas de *S. aureus* han sido aisladas simultáneamente de nariz y lesión. Encontramos 3 conejas que presentaron 2 cepas de *S. aureus* con diferente genotipo en la mucosa nasal, mientras que en el resto de los conejos estudiados sólo una cepa fue aislada. Se ha publicado que más de un bio- y/o fagotipo puede encontrarse circulando en las granjas de conejos y puede aislarse de un mismo animal (Hermans *et al.*, 1999). En la especie humana, los portadores persistentes son con frecuencia colonizados por una única cepa de *S. aureus* durante largos periodos de tiempo, mientras que los portadores intermitentes pueden portar diferentes cepas a lo largo del tiempo (Wertheim *et al.*, 2005). En este trabajo se realizó un único cultivo de nariz para clasificar los conejos como portadores nasales o no. Sería necesario realizar estudios longitudinales para distinguir los 3 modelos de portador nasal de *S. aureus* conocidos: portador persistente, portador intermitente y no portador (VandenBergh *et al.*, 1999; Wertheim *et al.*, 2005). Esta distinción es importante porque los portadores persistentes tienen una elevada tasa de *S. aureus* en la mucosa nasal y un elevado riesgo de adquirir infecciones estafilocócicas (Nouwen *et al.*, 2005; White, 1963).

Finalmente, y por todo lo dicho anteriormente, los portadores nasales parecen tener un papel clave en la patogénesis, pudiendo constituir un reservorio para el microorganismo en la granja y una fuente de contaminación para el resto de animales. Por ello, el desarrollo e implantación de estrategias que interrumpieran la transmisión de *S. aureus* mediante la eliminación de portadores nasales podrían, posiblemente, prevenir infecciones sistémicas por este microorganismo.

CONSECUENCIAS DE LA ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA SOS MEDIANTE EL USO DE H₂O₂.

En este trabajo hemos descrito como el H₂O₂ induce la expresión de *recA* y *lexA*, los dos reguladores principales de la respuesta SOS. Es bien conocida la activación de la respuesta SOS por H₂O₂ en *E. coli* (Imlay and Linn, 1987) y en otras

bacterias (Goerlich *et al.*, 1989), por lo que era lógico pensar que esto también sucedería en *S. aureus*, aunque ningún experimento claro sobre esto se había publicado.

La respuesta SOS es un mecanismo global de la bacteria para la reparación del DNA, inducible por exposición a sustancias tales como radiaciones ultravioletas, agentes xenotóxicos y algunos agentes antimicrobianos (Friedberg *et al.*, 2003). Aunque la frecuencia de exposición a alguno de estos agentes causantes de daños en el DNA, como las radiaciones o ciertos productos químicos, no es probablemente muy elevada (aunque no parece que haya mucha literatura a este respecto), si lo es la exposición a antibióticos, bien a antibióticos del tipo de las fluoroquinolonas, que es bien sabido su capacidad de inducir la respuesta SOS (Phillips *et al.*, 1987), o la exposición a ROS, como el ión superóxido, el H₂O₂ o los radicales OH⁻, que poseen un amplio espectro de toxicidad bacteriana al dañar el DNA, RNA, proteínas y lípidos (Cabiscol *et al.*, 2000). El H₂O₂ no es por si mismo un radical libre capaz de dañar el DNA e inducir SOS, pero se convierte fácilmente por medio de las reacciones de Fenton o de Haber-Weiss, en el radical hidroxilo (OH⁻) en presencia de Fe²⁺ o Cu⁺ celular. Asimismo, las células fagocíticas (como los neutrófilos o macrófagos), a través de la enzima NADPH oxidasa, utilizan el estrés oxidativo como arma frente a las invasión de bacterias patógenas, como *S. aureus*. Este mecanismo de acción también se ha observado en otras bacterias del género *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp. y *Lactobacillus* spp.

En este trabajo hemos demostrado que la exposición a H₂O₂ induce profagos en *S. aureus* y favorece la replicación y transferencia horizontal de las SaPIs mediada por fagos. En un sistema inducido, la proteína RecA tiene la capacidad de catalizar la autohidrólisis de los represores de algunos profagos, con lo que se induce el ciclo lítico que provoca la muerte celular (Little and Mount, 1982). Esto produciría una amplificación de los fagos, que con una alta probabilidad promovería la dispersión de SaPIs. Un subproducto de la inducción de los fagos lisogénicos por H₂O₂ es la liberación de fagos al entorno. Este hecho podría promover la extensión de toxinas codificadas por fagos como el ϕ PVL (en el caso de la cepa LUG855 vimos anteriormente como aumentaba el título de fago tras la exposición al H₂O₂), y la difusión de islas, muchas de las cuales codifican para TSST-1 (como SaPI_{bov1}) u otras toxinas (como las enterotoxinas SEC y SEL codificadas también por SaPI_{bov1}).

PAPEL DE LA CATALASA EN LA INDUCCIÓN DE SOS POR H₂O₂

S. aureus produce una potente catalasa como defensa frente a la toxicidad del H₂O₂. Por ello, parecía paradójico que bajas concentraciones de H₂O₂ pudieran inducir SOS. Son muchos los artículos que han estudiado el posible papel de la catalasa en la resistencia al estrés por peróxido (Cosgrove *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008). Es bien conocida su función en la detoxificación frente al H₂O₂, descomponiéndolo en H₂O y O₂, pero también se le han atribuido otros papeles como determinante de virulencia en *S. aureus*. Mandell (1975) ya describe como las cepas que producen bajos niveles de KatA eran más sensibles a la muerte por los neutrófilos. En este estudio hemos observado como la supervivencia, frente al H₂O₂ de las cepas de *S. aureus* que portaban fagos en forma lisogénica, era inferior a la de las cepas no lisógenas. Además, generamos mutantes en *katA* de dichas cepas, observando cómo las cepas que no tenían fago eran inmunes a las concentraciones de H₂O₂ a las que eran expuestas, al contrario que sus respectivos mutantes en *katA*. De estas experiencias, podemos deducir que la catalasa otorga protección a las cepas sin fago, pero tiene un efecto mucho menos protector en las cepas lisógenas. La catalasa puede proteger a *S. aureus* frente a la toxicidad del H₂O₂, pero no puede evitar la susceptibilidad a la inducción de la respuesta SOS. Esto podría ser debido a que la letalidad por H₂O₂ abarca un amplio rango de daños oxidativos, mientras que la inducción de SOS involucra sólo la vía RecA-LexA, la cual es inducida por mínimo daño en el DNA, mucho menos que el necesario para matar la célula. Quizás la catalasa no actúa lo bastante rápido o de manera eficiente a estas bajas concentraciones para prevenir el daño en el DNA. Por tanto, la KatA puede proteger a las cepas no lisógenas pero no a las lisógenas de la muerte por H₂O₂ a bajas concentraciones.

En conclusión, sugerimos que la inducción de transferencia de genes de virulencia a través de la activación mediada por H₂O₂ de la respuesta SOS, posee gran relevancia clínica, ya que muchos de los genes bacterianos responsables de enfermedades, como se puede observar en la tabla 4.1, se encuentran codificados en elementos genéticos móviles, tales como profagos, plásmidos, transposones e islas de patogenicidad, entre las que se incluyen las SaPIs. Las ROS, como el H₂O₂ producido en las infecciones estafilocócicas por las células fagocíticas, como los neutrófilos, así como por algunas bacterias, como *S. pneumoniae*, podrían afectar de forma adversa, aumentando el daño que produce la enfermedad y favoreciendo la dispersión de los genes que codifican las toxinas causantes de estas enfermedades.

Tabla 4.1. Enfermedades producidas por toxinas codificadas en elementos genéticos móviles inducibles por la activación de la respuesta SOS.

Enfermedad	Toxina	Organismo	Elemento
Difteria	Toxina diftérica	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Profago
Antrax	Toxina del antrax	<i>Bacillus anthracis</i>	Plásmido
Cólera	Toxina del cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	Profago
Disentería	Toxina Shiga	<i>Shigella dysenteriae</i>	Profago
Botulismo	Toxina botulínica	<i>Clostridium botulinum</i>	Profago
Enterocolitis	Toxina Cpe	<i>Clostridium perfringens</i>	Transposón
Tétanos	Toxina del tétanos	<i>Clostridium tetani</i>	Plásmido
Enterocolitis	Enterotoxina	<i>Clostridium difficile</i>	IP
Diarrea	Toxina lábil (LT)	<i>Escherichia coli</i>	Plásmido
Diarrea	Toxina estable (ST)	<i>Escherichia coli</i>	Transposón
Síndrome del shock tóxico	TSST-1	<i>Staphylococcus aureus</i>	IP
Intoxicación alimentaria, TSS	Enterotoxina A	<i>Staphylococcus aureus</i>	Profago
Intoxicación alimentaria, TSS	Enterotoxina B, C	<i>Staphylococcus aureus</i>	IP
Intoxicación alimentaria, TSS	Enterotoxina D	<i>Staphylococcus aureus</i>	Plásmido
Síndrome de la piel escaldada	Exfoliatina A	<i>Staphylococcus aureus</i>	Profago
Síndrome de la piel escaldada	Exfoliatina B	<i>Staphylococcus aureus</i>	Plásmido
Neumonía necrotizante	Leucocidina	<i>Staphylococcus aureus</i>	Profago
Fiebre escarlata	SPEA, C	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Profago

ELIMINACIÓN DE COMPETIDORES POR INDUCCIÓN DE FAGOS RESIDENTES: EL EJEMPLO DE LA LUCHA ENTRE *S. pneumoniae* Y *S. aureus*.

Las interacciones entre comunidades bacterianas son muy complejas, pero a la vez extremadamente interesantes. Interacciones como la competición directa por los nutrientes, cooperación mútua por la conversión de los sustratos en metabolitos útiles, transferencia de DNA, interferencia o inhibición mediada por productos antibacterianos, incluyendo bacteriocinas, antibióticos y componentes tóxicos de bajo peso molecular como el H₂O₂ son de enorme interés, aunque en muchos casos los mecanismos moleculares se desconocen (Bassler and Losick, 2006). Muchas especies bacterianas tienen actividad bactericida mediada por H₂O₂, tóxico para *S. aureus* (Regev-Yochay *et al.*, 2006; Strauss, 2000). *Lactobacillus gasseri* elimina *S. aureus* del tracto vaginal de terneras debido a la producción de H₂O₂ (Otero and

Nader-Macias, 2006). Numerosos estudios epidemiológicos han mostrado una asociación negativa entre portadores nasales de *S. aureus* y *S. pneumoniae* (Bogaert *et al.*, 2004; Regev-Yochay *et al.*, 2004). Recientemente se ha publicado cómo la vacunación masiva por *S. pneumoniae* en niños ha dado lugar a un aumento en la colonización e infección por *S. aureus* (Bogaert *et al.*, 2004). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la interferencia entre estos 2 patógenos está relacionada con la producción de H₂O₂ por *S. pneumoniae*, el cual es bactericida para *S. aureus* (Park *et al.*, 2008; Regev-Yochay *et al.*, 2006; Uehara *et al.*, 2001). Se han encontrado casos similares también en otras bacterias. Así Pericone y colaboradores (2000) describen el desplazamiento de *Haemophilus influenzae* por *S. pneumoniae* a nivel del tracto respiratorio superior debido a la toxicidad del H₂O₂. Es muy intrigante cómo los niveles relativamente bajos de H₂O₂ producidos por algunas bacterias son bactericidas para otras, dada la abundancia en las bacterias de mecanismos protectores frente al daño oxidativo, como los antioxidantes (Cosgrove *et al.*, 2007), la producción de enzimas que inactivan el peróxido de hidrógeno, como la catalasa, o los sistemas de reparación de daño en el DNA (Goerlich *et al.*, 1989). Algunos artículos hablan de cómo bajas concentraciones de H₂O₂ pueden no ser tóxicas pero pueden inducir estrés oxidativo (Claverys *et al.*, 2006; Prudhomme *et al.*, 2006). En este trabajo, hemos examinado esta estrategia de interferencia bacteriana por producción de H₂O₂, demostrando, en el caso de *S. pneumoniae* versus *S. aureus*, como el primero actúa a través de la inducción letal de profagos residentes en el organismo diana. Estos resultados aportan un mayor conocimiento al universo de las bacterias y los fagos.

El fenómeno de lisogenia es extremadamente común entre las bacterias. En *S. aureus* se han identificado y secuenciado un gran número de fagos (Bharate *et al.*, 2005; Kwan *et al.*, 2005). De hecho, en todas las cepas secuenciadas de *S. aureus* se han encontrado bacteriófagos que suponen hasta un 4 o 5% del genoma total (Baba *et al.*, 2002; Holden *et al.*, 2004). Como ejemplos, podemos indicar que las cepas Mu50 y N315 presentan un fago muy similar que codifica para factores de virulencia conocidos: la enterotoxina P, un SAg implicado en intoxicaciones alimentarias, y la estafiloquinasa (Sak), un enzima extracelular capaz de aumentar el potencial invasivo de la bacteria (Kuroda *et al.*, 2001). En la cepa 8325 han sido descritos tres fagos, ϕ 11, ϕ 12, ϕ 13 (Iandolo *et al.*, 2002); éste último codifica también para una Sak. Otros muchos fagos han sido identificados en distintas cepas de *S. aureus* como el fago PS42-D que codifica para la toxina SEA, responsable de las toxiinfecciones alimentarias (Betley and Mekalanos, 1985), el fago PVL que codifica para la leucocidina de Pantón-Valentine (Narita *et al.*, 2001) o el fago ETA, que codifica para

una toxina exfoliativa (Yamaguchi *et al.*, 2000; Yoshizawa *et al.*, 2000). Todos estos datos sugieren que la mayoría de cepas de *S. aureus* contendrían fagos, por lo que la estrategia de interferencia bacteriana aquí caracterizada es de gran relevancia y universal. Nuestro trabajo ha demostrado cómo la lisogenia provoca vulnerabilidad a las influencias del entorno como la radiación o ciertos productos químicos que causan daño en el DNA, dando lugar a SOS, una respuesta al estrés cuyo objetivo es reparar el DNA. Desde el punto de la lucha bacteriana, este mecanismo podría constituir una maravillosa diana para la agresión por microorganismos competidores, con sólo causar daño en el DNA y en consecuencia inducir profagos. Como hemos mostrado anteriormente, la producción de H₂O₂, a concentraciones subletales, cumple este propósito de forma admirable. Sin embargo, resulta curioso que las cepas de *S. pneumoniae*, pese a tener también frecuentemente fagos en forma lisogénica e inducirse también la respuesta SOS tras daño en el DNA con agentes como la MC (Ramirez *et al.*, 1999), sea inmune a la exposición a H₂O₂. Con los antibióticos, el mecanismo protector de la bacteria que los produce es obvio y ha sido bien caracterizado, pero con el H₂O₂ no lo es tanto, ya que el organismo debe resistir a los productos tóxicos derivados de la reacción de Fenton, incluyendo resistencia a la inducción de SOS. Los neumococos además, no producen catalasa, la cual inactivaría el H₂O₂ pudiendo comprometer su uso como arma biológica; quizás sea esta la razón precisamente por la cual el neumococo ha perdido la catalasa, pudiendo predecir que otros microorganismos, también productores de H₂O₂, la han perdido por la misma razón.

In vivo la composición de las comunidades bacterianas puede ser controlada por la acción del sistema inmune, por los efectos fisiológicos de la nutrición del hospedador, y también por “enemigos naturales” de la bacteria como son los bacteriofagos (Letarov and Kulikov, 2009). Los fagos líticos son responsables del 10 al 80% de la mortalidad bacteriana en varios ecosistemas acuáticos, y representan un factor limitante importante para las poblaciones bacterianas (Weinbauer and Rassoulzadegan, 2004). Como consecuencia de estas acciones, los fagos ejercen una influencia significativa en la estructura, actividad, dinámica temporal y diversidad biológica de las comunidades microbianas (Letarov and Kulikov, 2009). Los bacteriofagos también contribuyen de forma importante a la variabilidad genética bacteriana, por su papel como agentes de transferencia horizontal de genes (Canchaya *et al.*, 2003) o por su efecto en el fenómeno de “killing the winner”, donde las poblaciones bacterianas más numerosas son lisadas por los fagos presentes en el sistema, favoreciéndose a las bacterias que se encuentran en menor número, las

cuales no serían atacadas por los bacteriófagos (Weinbauer and Rassoulzadegan, 2004). En este trabajo hemos implicado por primera vez a los virus lisogénicos en el control de poblaciones microbianas. Al contrario que en el fenómeno de “killing the winner”, en el que las poblaciones bacterianas dominantes (“winner”) son lisadas (“killing”) por los fagos, el control por fagos lisogénicos no depende de la concentración bacteriana en el nicho, sino de la producción, por parte de una bacteria competidora, de una molécula inductora de la respuesta SOS. Sin embargo, y aunque pudiese parecer una clara debilidad el portar un bacteriófago en forma lisogénica, en términos de resistencia frente a un competidor, es importante señalar que la lisogenia representa una estrategia simbiótica importante en la cual el profago, estable en el cromosoma, protege a la bacteria lisogénica frente al ataque de otros fagos, lo que favorece su persistencia en nichos ricos en virus líticos. Además, y gracias a los factores de virulencia que portan algunos de ellos, la presencia de estos virus lisogénicos aumenta la virulencia bacteriana.

Un último punto a tratar, como conclusión a este apartado, sería el relacionado con la mayor sensibilidad de las cepas que portan fagos a la lisis por antibióticos inductores de la respuesta SOS. En este trabajo, hemos observado cómo la lisis mediada por fluoroquinolonas era mayor en las cepas que portaban fagos temperados que las que no los portaban. Estudios recientes han demostrado que los antibióticos poseen otro papel además de cómo inhibidores del crecimiento microbiano (Martínez, 2008). Así, se ha visto que los antibióticos juegan un papel importante en la fisiología bacteriana, al actuar en la naturaleza como moléculas-señal implicadas en la comunicación intercelular (Davies *et al.*, 1998). Una forma de comunicación intercelular es el fenómeno de “quorum sensing” (capacidad de las bacterias para regular la expresión de ciertos genes dependiendo de la densidad de población). Fajardo *et al.* (2008) describieron el papel de los antibióticos como señales inductoras de “quorum sensing” cuando se encuentran a bajas concentraciones. Así, concentraciones subinhibitorias de antibióticos provocaban cambios transcripcionales específicos que son independientes a las vías bacterianas de respuesta al estrés (Goh *et al.*, 2002) y pueden tener consecuencias beneficiosas para la bacteria modulando las interacciones dentro de las comunidades (Fajardo and Martinez, 2008; Linares *et al.*, 2006).

En esa línea de trabajo en la que se proponen a los antibióticos como moléculas señalizadoras, en este trabajo hemos demostrado cómo la producción de una señal inductora de SOS, que activa profagos en organismos vecinos, es una

estrategia competitiva única, la cual sugerimos podría ser ampliamente utilizada como mecanismo de interferencia bacteriana. Sugerimos además que los profagos desempeñan un papel más importante en la ecología bacteriana de lo sospechado hasta el momento, siendo responsables de lo que podríamos llamar: “Muerte de un organismo diana por control remoto”. Finalmente, es importante señalar que los cambios producidos en los ecosistemas naturales, incluyendo la liberación de grandes cantidades de antimicrobianos, podría alterar la dinámica de poblaciones de microorganismos, incluyendo la aparición de resistencias, con consecuencias para la salud humana difíciles de predecir (Martinez, 2008).

LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS CODIFICADAS EN FAGOS E IPs DE *S. aureus* DISMINUYE TRAS LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS.

Las toxinas codificadas por fagos se descubrieron hace más de 50 años (Freeman, 1951). A pesar de esto, muy poco se conoce acerca del papel de los fagos en la patogénesis microbiana, salvo el ser reservorio de genes de virulencia. Aunque no hay mucha información acerca de si la inducción de la respuesta SOS incrementa la producción de algunos de los superantígenos codificados por fagos e IPs de *S. aureus*, empeorando la condición clínica asociada (ej. TSS), sería lógico pensar que el aumento en el número de copias del gen, por la simple replicación del fago y/o la isla, fuera acompañado de un aumento en la síntesis de la toxina, al igual que ocurre en la síntesis de la toxina Shiga de *E. coli*, donde la activación de la respuesta SOS produce un aumento en la producción de la toxina lo que provoca el empeoramiento del síndrome, a veces de forma fatal, al igual que amplifica la población de fagos que codifican la toxina favoreciendo su diseminación (Wagner *et al.*, 2002).

En este trabajo, hemos investigado el papel de la replicación de islas y fagos en la producción de factores de virulencia. En concreto estudiamos 3 SAGs codificados en SaPIS (TSST, SEC y SEL), y un cuarto SAG, SEA, una enterotoxina codificada por el fago phiSa3ms, presente en la cepa MSSA476.

De forma clásica, existen dos vías por la que los fagos pueden comenzar su ciclo replicativo, bien por la inducción de la respuesta SOS o bien tras infección de una cepa sensible. De igual manera, las SaPIs pueden comenzar su replicación después de la inducción por un fago residente (tras inducción de respuesta SOS) o tras la infección de una cepa sensible por un fago con capacidad para inducir a la isla. En el estudio de la toxina TSST-1 llevamos a cabo tanto la inducción como la infección de

las cepas que portaban la isla con la toxina, observando como tras este hecho, la producción de toxina era menor en todas las situaciones estudiadas. De igual modo, en la cepa mutante en el represor de SaPI1, con capacidad de autoreplicarse en ausencia de inductor, también producía una menor cantidad de la toxina TSST-1, concluyendo que la replicación de SaPI1 da lugar a una reducción en la síntesis de la toxina. Ampliando el estudio a otros SAGs presentes en SaPIs, observamos como tras la inducción con MC, la producción de las toxinas SEC y SEL también era menor. Finalmente, también analizamos la producción de la toxina SEA codificada en el fago phiSa3ms de la cepa MSSA476. Estudios previos habían analizado la relación entre el ciclo de vida del fago y la transcripción de los genes que codifican las toxinas presentes en este bacteriofago. Sin embargo, el estudio sólo se centro en el análisis transcripcional de los factores de virulencia, no analizando si la producción de toxina se modificaba en las distintas situaciones estudiadas. El fago phiSa3ms codifica 4 factores de virulencia: sak, sea, seg2 y sek2. Sumbly y Waldor (2003) encontraron que la inducción con MC de este fago daba lugar a un incremento en la transcripción de los 4 genes de virulencia. Sin embargo, tal como hemos visto en el presente trabajo, el incremento en la transcripción de sea no va acompañado de un incremento en la producción de la toxina. Estudios previos sugieren la idea que regulaciones posttranscripcionales influyen en la producción de SEA (Borst and Betley, 1994).

Estos datos además están en concordancia con estudios previos en *Streptococcus pyogenes* (Banks *et al.*, 2003), en los que observaron como tras el tratamiento de la cepa MGAS315 con MC, los niveles de transcrito de los diferentes factores de virulencia, así como los niveles de proteína disminuyeron, tal y como nosotros hemos observado en nuestras experiencias. Para explicar este hecho, Banks *et al.* (2003) llegan a la conclusión que existe una compleja interrelación entre las condiciones de cultivo del entorno, la inducción de profagos y la producción de factores de virulencia codificados por los mismos, ya que el cocultivo de la cepa con células del epitelio faríngeo humano dio lugar a la inducción del profago que codifica las toxinas SpeK, Sla y Sdn. En este trabajo nosotros no hemos valorado si algunos factores del hospedador son capaces de inducir la respuesta SOS y/o la expresión de los factores de virulencia codificados en islas o fagos, siendo este un importante tema de estudio. Tampoco queda clara, en el caso de que se confirme su disminución, cuál puede ser el papel fisiológico de esta disminución. Una posibilidad podría estar relacionada con el hecho de que alguno de los SAGs testados han sido descritos como moléculas reguladoras de la virulencia bacteriana (Vojtov *et al.*, 2002). Pudiera ser por tanto posible que la presencia de estas toxinas esté limitada en determinadas

situaciones en las que su papel como factor de virulencia sea poco relevante, favoreciendo otras respuestas celulares encaminadas al mantenimiento celular.

Queda por tanto claro que el control de la expresión de genes de virulencia a cargo de los fagos puede ser muy complejo, involucrando posiblemente a diferentes profagos y/o mirandolo en sentido inverso, un único profago puede influir en la virulencia de diferentes microorganismos. Además de todo lo mencionado anteriormente, recientemente han aparecido otras vías de control de la virulencia bacteriana relacionadas con la respuesta SOS. Así, y también en *S. aureus*, Bisognano *et al.* (2004) han demostrado que LexA regula la expresión de *fnbB*, que codifica un factor de virulencia que media la unión de la bacteria a la fibronectina del hospedador, y que puede ser inducido mediante la activación de la respuesta SOS tras la exposición a antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas. Adicionalmente, nuestro estudio ha demostrado que LexA regula la transferencia de factores de virulencia codificados en islas de patogenicidad de *S. aureus*, al controlar la expresión del operón I, presente en las SaPIs, que es el responsable de la producción de las cápsides de menor tamaño específicas para las SaPIs (Ubeda *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta estos y otros resultados, estamos convencidos que la respuesta SOS desempeña un importante papel no sólo en la competencia y virulencia bacterianas, sino que es un elemento central para comprender el funcionamiento bacteriano en distintos nichos y situaciones ambientales. Obviamente, muchos más estudios son necesarios para una correcta comprensión del papel que esta respuesta SOS tiene en la fisiología microbiana.

Capítulo V

Material y métodos

BACTERIAS, PLÁSMIDOS Y MEDIOS UTILIZADOS EN ESTOS ESTUDIOS.

Las cepas y los plásmidos utilizados se recogen en las Tablas 5.3 y 5.4.

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⁻¹ o 2,5 µgr ml⁻¹), tetraciclina (3 µgr ml⁻¹), cloranfenicol (20 µgr ml⁻¹) o el producto Xgal (20 mg ml⁻¹) (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⁻¹).

Para el crecimiento de *S. pneumoniae* se utilizó Todd-Hewitt broth suplementado con 0,5% yeast extract (THY) (Becton, Dickinson and Company) o placas de agar sangre (Sharlau). THY fue suplementado con kanamicina (200 µg/ml) cuando fue necesario.

ESTUDIO DE PORTADORES NASALES.

Con la finalidad de demostrar la presencia de *S. aureus* en la mucosa nasal, se llevó a cabo el cultivo microbiológico de las muestras nasales tomadas de 133 hembras reproductoras, procedentes de 4 granjas de tipo industrial localizadas en la provincia de Valencia.

Método de toma de muestra de mucosa nasal y lesiones.

Para la toma de muestras de mucosa nasal se introdujo una torunda estéril (Deltalab, Rubí, España) en el interior de cada uno de los orificios nasales, con ligera rotación y fricción sobre la pared (figura 5.1).



Figura 5.1. Detalle de la toma de muestras de mucosa nasal.

En la toma de muestra de lesión, los animales afectados fueron trasladados a la sala de necropsia del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad CEU-Cardenal Herrera, para ser eutanasiados mediante inyección intravenosa de 1'5-2'0 ml de pentobarbital sódico (Dolethal[®]. Vetoquinol S.A, Lure, France). Tras lo cual, se realizó la necropsia de forma sistemática, completa y ordenada. Las muestras del material de tipo purulento, presente en las distintas lesiones producidas por *S. aureus*, se recogieron en condiciones asépticas: tras la desinfección de la superficie con clorhexidina, se practicó una incisión en la piel con ayuda de hojas de bisturí estériles, introduciendo posteriormente la torunda en el material de tipo purulento.



Figura 5.2. Toma de muestra de una coneja con mamitis. Vease la incisión aplicada en la piel. Se puede observar el material purulento, objeto de estudio microbiológico.

Estudio microscópico de las lesiones.

Tras la realización de la necropsia, las muestras de tejido seleccionadas se fijaron con una solución de formol tamponado al 10% (Panreac), manteniéndose un mínimo de 36 horas, tras las cuáles se procedió a su tallado. Las muestras talladas se incluyeron en parafina (Panreac) mediante el procesador automático de tejidos (Histolab ZX-110), deshidratándose previamente a través de sucesivos pases por alcoholes de gradación creciente. El montaje definitivo de los bloques se llevó a cabo en la unidad formadora de bloques MYR 2500-III, para a continuación realizar secciones de 4 μm de espesor mediante microtomo de rotación (Microm HM 310), utilizando cuchillas desechables (Accu-Edge, LPB). Las secciones fueron recogidas en

portaobjetos de cristal (Marienfeld, Alemania) y secadas 24 horas en estufa a 37°C. Posteriormente se realizó la técnica convencional de tinción de Hematoxilina-Eosina. La observación de las muestras se realizó en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600) y las fotografías con cámara digital (Nikon DXM 1200).

Estudio microbiológico de las muestras obtenidas.

Las muestras recogidas con ayuda de los hisopos se transportaron en nevera frigorífica al laboratorio, se sembraron en placas de agar-sangre (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y se incubaron en condiciones de aerobiosis en estufa a 37°C durante 18-24 horas. Los aislados fueron identificados como *S. aureus* mediante métodos microbiológicos clásicos. De cada cultivo positivo, se seleccionaron varias UFC para posteriores estudios moleculares que evaluaran la posible presencia de múltiples cepas de *S. aureus* en un mismo animal.

Análisis estadístico.

El efecto de los portadores positivos a *S. aureus* fue analizado mediante el test de Fisher. Se consideró significativo un valor de $P < 0.01$.

ANTIBIOGRAMA

Preparación del inóculo: Sembramos en TSB las cepas objeto de estudio de forma rutinaria. Diluimos el cultivo o.n. hasta obtener 10^6 ufc/ml.

Inoculación: En el plazo de 15 min, sumergimos una torunda de algodón estéril en el inóculo y sembramos toda la superficie de una placa de agar Mueller Hilton (Sharlau). Dejamos que se absorba toda la humedad de la superficie y a continuación tomamos con ayuda de unas pinzas estériles un disco impregnado con el antibiótico de elección, en nuestro caso enrofloxacina (Becton, Dickinson and Company.), lo depositamos suavemente sobre la placa e incubamos en estufa a 37°C 24 horas. En último lugar medimos el halo de inhibición.

COCULTIVO DE *S. aureus* CON *S. pneumoniae*.

Las cepas de *S. aureus* y *S. pneumoniae* fueron crecidas rutinariamente como se indica en el primer punto de este apartado. Cultivos o.n de *S. aureus* fueron diluidos 1:100 y crecidos hasta $DO_{540}=0.3-0.4$. A continuación llevamos a cabo el cocultivo con *S. pneumoniae*, como previamente describieron Regev-Yochay *et al.* (2006). Tras lo cual hicimos diluciones seriadas del cultivo para plaquearlas en TSA suplementado

con 5 µg/ml optochin (SIGMA) -que impide el crecimiento de *S. pneumoniae*- con objeto de contar las colonias de *S. aureus* supervivientes.

MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Manipulación del DNA.

Las manipulaciones rutinarias del DNA se realizaron utilizando procedimientos estándar (Ausubel, 1990; Sambrook, 1989).

El DNA cromosómico de los diferentes *Staphylococcus* fue extraído utilizando el kit “Genelute bacterial genomic DNA” (Sigma), siguiendo las indicaciones del fabricante, a excepción de la lisis bacteriana llevada a cabo previamente con lisostafina (Sigma; 12,5 µgr ml⁻¹) a 37°C durante 1 hora.

El DNA plasmídico fue extraído de *S. aureus* utilizando el kit “Genelute plasmid miniprep” (Sigma) siguiendo el protocolo del fabricante, excepto que las bacterias eran lisadas previamente con lisostafina (Sigma; 12,5 µgr ml⁻¹) a 37°C durante 1 hora.

Los plásmidos fueron transformados en estafilococos mediante electroporación (Cucarella *et al.*, 2001).

Todas las enzimas necesarias para la manipulación del DNA fueron suministradas por MBI Fermentas, Roche y Amersham. Los cebadores se obtuvieron de Invitrogen (Tabla 5.3).

Para la hibridación mediante Southern blot, se purificó DNA cromosómico, se digirió en su caso si fue necesario y se separó mediante gel de electroforesis de agarosa. Los geles se transfirieron a membranas de nylon (Hbond-N 0.45 mm de diámetro de poro; Amersham Life Science) utilizando métodos estándar (Ausubel, 1990; Sambrook, 1989). El marcado de la sonda y su hibridación con el DNA se realizó de acuerdo al protocolo aportado por el kit de marcado de DNA PCR-DIG y detección de quemiluminiscencia (Roche).

Secuenciación del DNA.

El DNA fue secuenciado 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).

Tipado molecular de cepas de *S. aureus*.

Con el fin de estudiar la clonalidad de las poblaciones de *S. aureus* procedentes de los aislados de mucosa nasal y de lesiones de tipo purulento, se seleccionó un método de tipado suficientemente resolutorio, rápido y sencillo, que permitiese el procesamiento de un elevado número de muestras. El método elegido fue el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del producto de PCR de los genes de la coagulasa (PCR-RFLP-*coa*, (Hookey *et al.*, 1998)) y proteína A (PCR-RFLP-*spa*, (Frenay *et al.*, 1994; Shopsin *et al.*, 1999)). Y el polimorfismo en la longitud del producto de PCR del gen *clfB* (PCR-*clfB*, (Koreen *et al.*, 2005)).

Dichos genes contienen un número variable de repeticiones en su secuencia. Este polimorfismo ha sido comúnmente utilizado para la diferenciación entre cepas de *S. aureus* (Frenay *et al.*, 1994; Goh *et al.*, 1992), y adicionalmente, el uso de más de un marcador genético para dicha diferenciación ha sido recomendado (Shopsin *et al.*, 2000; Tenover *et al.*, 1994).

Reacción en cadena de la polimerasa.

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

- Coagulasa: 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 a una concentración 5 veces superior a la habitual. Las condiciones de PCR consistieron en una etapa de desnaturalización inicial de 94°C durante 4 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C durante 20 segundos (seg.), 57°C durante 15 seg. y 72°C durante 50 seg., con una etapa final de 72°C durante 5 minutos.

- Proteína A: La PCR del gen de la proteína A se llevó a cabo de forma análoga al método descrito por Frenay *et al.* (1994), con modificaciones. Se emplearon los oligonucleótidos *spa*-1m y *spa*-2c. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización inicial de 94°C durante 4 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C durante 20 seg., 50°C durante 20 seg. y 72°C durante 90 seg., con una etapa final de 72°C durante 5 minutos.

- Clumping factor B: Por último, para amplificar la región variable de este gen, nos basamos en el procedimiento descrito por Koreen *et al.* (Koreen *et al.*), empleándose los oligonucleótidos *clfB*-1m y *clfB*-2c. Las condiciones de PCR consistieron en: una etapa de desnaturalización inicial de 94°C durante 3 min., seguida de 35 ciclos de 94°C durante 20 seg., 60°C durante 20 seg. y 72°C durante 60 seg., y una etapa final de 72°C durante 5 min.

Electroforesis en gel de agarosa

Una alícuota de 5 µl del producto de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Molecular Netline, Need), al 2% (P/V) para el gen de la coagulasa y al 1% (P/V) para la proteína A y el gen clumping factor B.

Digestión del producto de PCR.

El resto del producto de PCR se precipitó con etanol/acetato sódico, para su posterior digestión con 5U del enzima de restricción *Cfo* I (Roche) a 37°C durante 2 horas. El resultado de la digestión se analizó también mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (P/V) en tampón Tris-Acetato-EDTA pH=8,3 (0,4M Tris, 0'01M EDTA, 0'2M ácido acético), en presencia de bromuro de etidio (Mercury).

Identificación de genotipos.

La combinación de tamaños obtenidos antes y después de la digestión del producto de PCR, de cada gen, sirvió para definir los distintos tipos de *S. aureus*.

Como se describe en (Viana *et al.*, 2007), un código alfabético (latino y griego) y numérico (arábigo y romano) se utilizó para identificar los diferentes patrones de *coa*, *spa* y *clfB*. 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 *clfB*.

METODOLOGÍA UTILIZADA EN LOS ESTUDIOS DE INDUCCIÓN DE SaPIs Y FAGOS.

Inducción de profagos.

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 de *S. aureus*, se realizó una dilución

1/50 en TSB de un cultivo estacionario y se creció hasta alcanzar una $DO_{540} = 0.3-0.4$. Seguidamente se añadió mitomicina C (Sigma, $2 \mu\text{gr ml}^{-1}$), peróxido de hidrógeno ($0.05-1 \text{ mM}$), ciprofloxacina ($0.2-4 \mu\text{gr ml}^{-1}$) o enrofloxacin (sustancias que activan la respuesta SOS). Posteriormente los cultivos se crecieron en agitación lenta (80 rpm) a 32°C . La lisis normalmente solía ocurrir sobre las 3 h. Antes de que ocurriera la lisis, en determinados experimentos, se tomaron muestras (1ml) a distintos tiempos de los cultivos inducidos que contenían SaPIs y se extrajo su DNA (ver apartado de extracción de DNA).

Los lisados obtenidos se filtraron en filtros de $0,2 \mu\text{m}$ para eliminar aquellas bacterias que no hubieran sido lisadas. Posteriormente estos lisados se guardaron a 4°C hasta su uso.

Alternativamente también se obtuvieron lisados por infección de bacterias sensibles a fagos. Los fagos penetrarían en la bacteria, comenzarían su ciclo lítico, amplificándose considerablemente la población de fagos que acabarían lisando la bacteria. Para ello se realizó una dilución 1/50 en TSB de un cultivo estacionario y se creció el cultivo hasta alcanzar una $DO_{540} = 0.45$. Posteriormente adicionamos a 1 ml de cultivo, 2ml de TSB y 2ml de Phage buffer (1 mM NaCl , $0.05\text{M Tris pH} = 7.8$, 1 mM MgSO_4 , 4 mM CaCl_2) y se infectó con el fago a una multiplicidad de fagos/bacterias 3:1 o 1:1. La lisis ocurría también sobre las 3h después de la infección.

Inducción de fagos de *S. pneumoniae*.

Al igual que ocurre en *S. aureus*, la mayor parte de cepas clínicas de *S. pneumoniae* contienen fagos residentes. Para demostrar la lisis de *S. pneumoniae* por inducción de profagos, crecimos cepas de *S. pneumoniae* lisogénicas en THB-Y a 37°C hasta $DO_{600}=0.2$. A continuación añadimos MC ($0,1\mu\text{gr ml}^{-1}$) y continuamos la incubación. El crecimiento fue monitorizado por densidad óptica.

Titulación de fagos.

Para cuantificar el número de partículas fágicas que contiene un lisado se diluyó un cultivo estacionario de la cepa RN4220 (sensible a la mayoría de los fagos de *S. aureus*) 1/50 en TSB y se creció hasta alcanzar una $DO_{540} = 0.4$. Se infectaron $50 \mu\text{l}$ de este cultivo con $100 \mu\text{l}$ de diluciones seriadas en, "phage buffer", del lisado a temperatura ambiente durante 5 minutos, tras los cuales, la mezcla de fagos y bacterias se plaqueó en placas de "phage base" (25 gr de Nutrient Broth N°2, Oxoid;

7gr de agar) suplementadas con CaCl_2 a una concentración final 10 mM. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se cuantificaron el número de calvas producidas por el fago y se multiplicó por el factor de dilución.

Transducción.

Para estudiar el proceso de transferencia de una SaPI se utilizaron los lisados obtenidos mediante el método de inducción o infección que se han comentado anteriormente con la particularidad que las cepas utilizadas contenían la isla en estudio integrada en su genoma. Cabe destacar que SaPIbov1 y SaPI1 (SaPIs que se estudiaron) contienen un marcador genético que confiere resistencia a tetraciclina a la bacteria, lo cual nos permite estudiar la transferencia de estas islas. El derivado SaPIbov1 *tst::tetM* que contiene el gen marcador *tetM* incluido en el gen *tst* de SaPIbov1 fue proporcionado por Ross Fitzgerald (Fitzgerald *et al.*, 2001b); el derivado SaPI1 *tst::tetM* que posee el marcador de tetraciclina en el gen *tst* de SaPI1 fue proporcionado por Richard Novick (Lindsay *et al.*, 1998).

Se realizaron diluciones seriadas de estos lisados en phage buffer. Cien microlitros de estas diluciones se añadieron a 1 ml de bacterias aceptoras crecidas hasta $\text{DO}_{540} = 1.4$ a las que se añadió CaCl_2 a una concentración final 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. Estas placas contenían Citrato Sódico (17 mM) para impedir que el fago lisara las bacterias. Se utilizó la cepa RN4220 como bacteria aceptora.

Extracción del DNA para el estudio de replicación de SaPIs.

Con el fin de identificar la inducción de una SaPI por fagos, se tomaron muestras a distintos tiempos durante la inducción de las cepas, que posteriormente se centrifugaron para precipitar las bacterias. Los precipitados obtenidos se resuspendieron en TES-sacarosa (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5 M sacarosa, pH 6) y se lisaron mediante lisostafina ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) en presencia de RNAsa pancreática ($500 \mu\text{gr ml}^{-1}$). El lisado obtenido se incubó con proteinasa K ($500 \mu\text{gr ml}^{-1}$) en presencia de SDS (1%) durante 30 min. a 37°C. Posteriormente se añadió tampón de carga y se vortió durante al menos 20 minutos. Seguidamente se introdujo la muestra en un baño de hielo seco hasta que el lisado se congeló y posteriormente se

descongeló en un baño de agua a 65°C. Esta operación se repitió dos veces más. Por último las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 0.7% y se dejaron correr durante toda la noche con un voltaje de 20V para poder separar mejor el DNA genómico de la posible banda de inducción de la SaPI. Finalmente el gel se fotografió y en los casos en los que fue necesario se transfirió el gel a una membrana de nylon para la realización de un Southern blot.

METODOLOGÍA UTILIZADA PARA LA OBTENCIÓN DE MUTANTES.

Obtención de mutantes por delección.

Para la mutación de un determinado gen, se lleva a cabo la clonación de fragmentos flanqueantes a la secuencia a deleccionar en el plásmido pMAD (Arnaud *et al.*, 2004), el cual permite realizar delecciones sin introducir ningún marcador cromosómico. Para ello, se amplifican los fragmentos flanqueantes a la zona a deleccionar utilizando dos parejas de cebadores (Figura 5.1). Una pareja amplificaría la región 5' a la delección (cebadores 1 y 2) y la otra pareja amplificaría la región 3' a la delección (cebadores 3 y 4). La secuencia del cebador 3 (delimita el extremo 3' de la delección) contiene una cola en su extremo 5' que es complementaria con la secuencia del cebador 2 (delimita el extremo 5' de la delección). En una segunda PCR utilizamos como DNA molde 1 μ l de los amplificadores obtenidos en la primera PCR y los cebadores 1 y 4 (cebadores externos). En los primeros ciclos de la PCR las secuencias complementarias de los cebadores 2 y 3 hibridan y permiten la obtención de un molde de DNA que contiene los dos amplificadores. En los siguientes ciclos de la PCR los cebadores externos 1 y 4 permiten la amplificación del nuevo molde de DNA formado. De esta forma un solo amplificado contendría los dos fragmentos necesarios para realizar la delección (Figura 5.1).

Los fragmentos amplificados pueden clonarse en los vectores pc-TOPO o pGEM-T (Promega), los cuales facilitan la ligación de los productos de PCR ya que no necesitan ser digeridos previamente. A continuación estos fragmentos fueron liberados de las construcciones generadas cortando con un par de enzimas de restricción, y fueron ligados en el plásmido pMAD que previamente había sido digerido con el mismo par de enzimas de restricción. El plásmido pMAD contiene un origen de replicación para Gram-negativos y un origen de replicación termosensible para Gram-positivos. También contiene un gen que confiere resistencia a eritromicina en *S. aureus* y un gen que codifica para la enzima β -galactosidasa que al metabolizar la

sustancia Xgal produce un metabolito de color azul. De esta forma, las bacterias que presenten el plásmido serán resistentes a eritromicina y en presencia de Xgal, las colonias que produzcan serán azules.

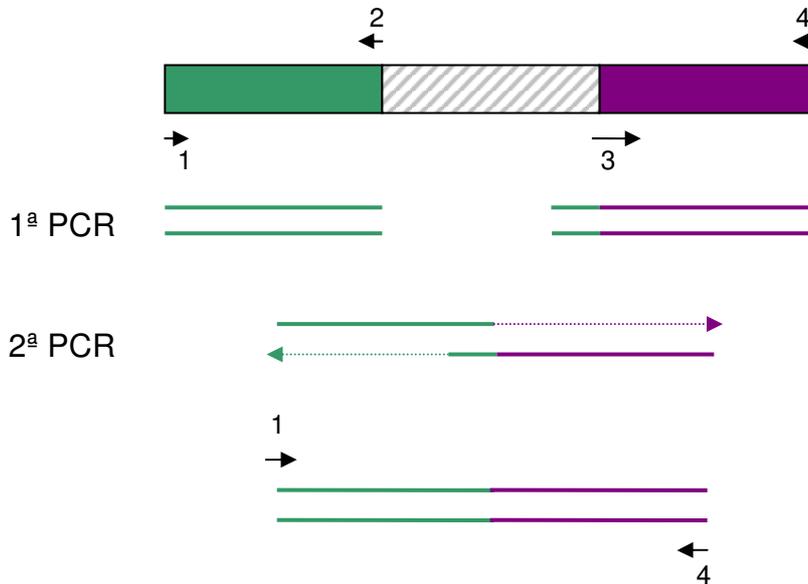


Figura 5.3. Representación esquemática de la doble PCR realizada para obtener los mutantes por delección. La caja rayada indica la zona a deleccionar. Las cajas verde y morada representan los fragmentos 5' y 3' flanqueantes a la delección amplificados en la PCR 1. Las flechas indican la posición donde hibridan los cebadores.

Las construcciones generadas en pMAD se transforman a una cepa de *S. aureus*, en nuestro caso la RN4220 por ser fácilmente transformable. Se crecen las bacterias obtenidas a 30°C en TSB y se plaquean diluciones del cultivo en fase estacionaria en TSA conteniendo eritromicina y Xgal a 43°C (temperatura restrictiva). El plásmido pMAD no puede replicar a 43°C, por lo que las colonias que crezcan en eritromicina serán bacterias con el plásmido integrado en el cromosoma bacteriano por recombinación homóloga de alguno de los dos fragmentos flanqueantes al gen a deleccionar. A continuación, se pican de 1 a 5 colonias en TSB sin antibiótico, se plaquean diluciones del cultivo estacionario en TSA conteniendo Xgal y se seleccionan aquellas colonias de color blanco, que serán las que hayan perdido el plásmido en la segunda recombinación. Finalmente se comprueba que se había producido el genotipo deseado mediante secuenciación del amplificado obtenido mediante PCR con cebadores flanqueantes a la delección. La Figura 5.2 muestra un esquema de la técnica de mutagénesis por delección mediante pMAD.

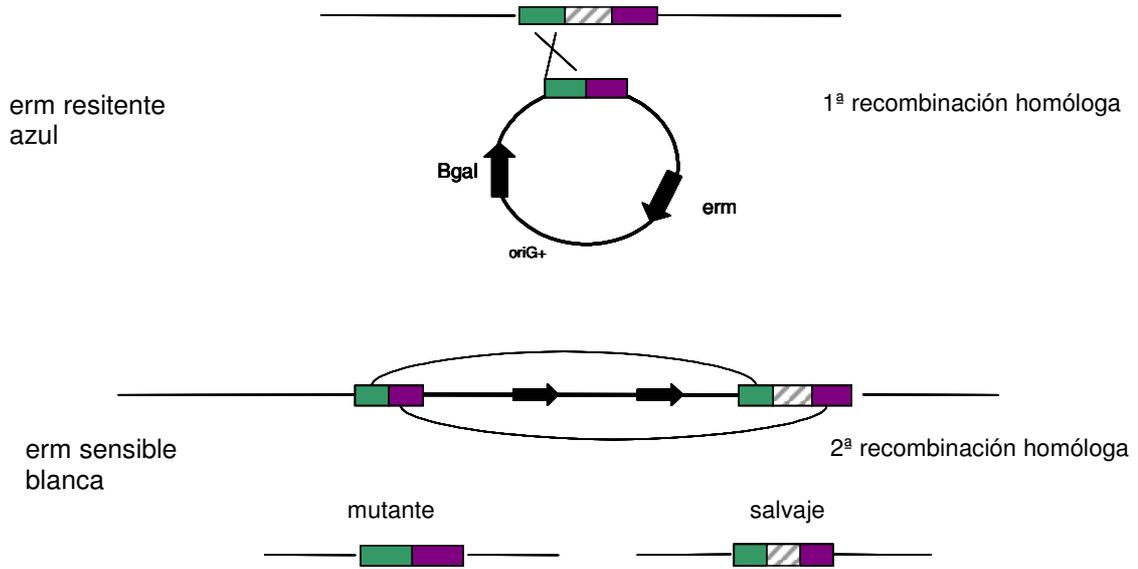


Figura 5.4. Esquema representativo de la mutagénesis por pMAD. En la 1ª recombinación homóloga (integración del plásmido) la bacteria es azul y es capaz de crecer en presencia de Erm. En la 2ª recombinación homóloga (delección del plásmido) la bacteria es blanca y sensible a Erm. En esta 2ª recombinación se pueden producir dos genotipos: mutante por delección ó restauración del genotipo salvaje.

Mutante no degradable del represor cI del fago $\phi 80\alpha$:

Para obtener el mutante del represor cI del fago $\phi 80\alpha$, donde un residuo de glicina fue sustituido por un residuo de glutámico, eliminando el sitio de corte Alanina-Glicina que es reconocido por la proteína RecA, se utilizó una estrategia similar a la descrita anteriormente.

Se realizaron dos PCRs con los cebadores phi11-1cB/phi11-3m y phi80 α -cl-9mE/phi11-4c (Tabla 5.3). Los cebadores phi11-3m y phi11-4c eran complementarios para permitir que los productos de la primera PCR hibridaran y su secuencia era idéntica a la del represor del fago excepto en dos nucleótidos que son los que producirían el cambio del aminoácido deseado. Se realizó una segunda PCR con los cebadores phi11-1cB y phi80 α -cl-9mE para obtener un fragmento individual. De esta forma, 1 μ l de cada una de las PCRs obtenidas anteriormente se mezclaron con 10pM de los cebadores externos y se amplificó mediante PCR. El producto obtenido resultado de la fusión de los dos productos de PCR anteriores se purificó y se clonó en los sitios *Bam*HI/*Eco*RI en el vector pMAD, y el plásmido resultante pJP468 se

transformó en la cepa de *S. aureus* RN4220, mediante electroporación, y a continuación se transdujo a la RN10359 (RN450 lisógeno del 80α). Se realizó la mutagénesis como se ha comentado anteriormente y se comprobó mediante secuenciación del amplificado obtenido con cebadores flanqueantes a la mutación.

Introducción de una cola de histidinas al final de los genes *sec* y *sel*:

Para introducir la cola de histidinas en *sec*, se realizaron dos PCRs con los cebadores SaPIbov1-192mE/SaPIbov1-193c y SaPIbov1-194m/SaPIbov1-195cS (Tabla 5.3). Los cebadores SaPIbov1-193c y SaPIbov1-194m eran complementarios en la cola de histidinas y el codón de parada para permitir que los productos de la primera PCR hibridaran. Se realizó una segunda PCR con los cebadores SaPIbov1-192mE y SaPIbov1-195cS para obtener un fragmento individual. De esta forma, 1 μl de cada una de las PCRs obtenidas anteriormente se mezclaron con 10pM de los cebadores externos y se amplificó mediante PCR. El producto obtenido resultado de la fusión de los dos productos de PCR anteriores se purificó y se clonó en los sitios *EcoRI/SalI* en el vector pMAD, y el plásmido resultante pJP676 se transformó en la cepa de *S. aureus* RN4220, mediante electroporación, y a continuación se transdujo a la RN450 SaPIbov1 *tst::tet*. Se realizó la mutagénesis como se ha comentado anteriormente y se comprobó mediante secuenciación del amplificado obtenido con cebadores flanqueantes a la cola de histidinas.

La introducción de la cola de histidinas en *sel* se realizó del mismo modo que para *sec*, salvo por los cebadores utilizados: sel-3mB/SaPIbov1-189c y SaPIbov1-190m/SaPIbov1-191cS. Utilizando en este caso las enzimas *BamHI/SalI* para el clonaje en pMAD, dando lugar al plásmido pJP677.

Mutagénesis por inserción.

Para estudiar el papel de la catalasa en la inducción de la respuesta SOS por H₂O₂ construimos mutantes en *katA* de las cepas RN450 y RN10359. Para ello transdujimos la mutación *katA::Tn917* desde la cepa KS100 (*katA::Tn917* ery; (Cosgrove *et al.*, 2007), con el fago φ11, a las cepas RN450 y RN10359, plaqueando el cultivo en placas de TSA que contenían 5μg/ml de eritromicina. Las colonias resultantes fueron replaqueadas de nuevo en placas de TSA-ery 5μg/ml y se comprobó su actividad catalasa de forma cualitativa, poniendo en contacto dichas colonias, crecidas en medio sólido, con una solución de H₂O₂ al 3%. Se observó si se

producía o no la liberación de burbujas, característica de la prueba de la catalasa por la descomposición del H₂O₂ en agua y oxígeno.

METODOLOGÍA PARA LA CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.

La construcción de plásmidos se realizó mediante el clonado de productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos de la Tabla 5.3. Todos los clones fueron comprobados por secuenciación en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia (IBMCP-UPV).

Plásmidos de fusión transcripcional:

Los plásmidos de fusión transcripcional pJP476 y pJP477 que contienen las fusiones transcripcionales *recA*- y *lexA*- β -lactamasa (*blaZ*) respectivamente, fueron contruidos por diferentes amplificadores de PCR que contienen las regiones promotoras de dichos genes dentro del plásmido pCN41 (Charpentier *et al.*, 2004) utilizando como enzimas de restricción EcoRI y *Bam*HI (Tabla 5.3).

MÉTODOS BIOQUÍMICOS.

Ensayo enzimático para la cuantificación de actividad β -lactamasa en los plásmidos de fusión transcripcional.

Para la realización de esta técnica se utilizó un cultivo de las cepas de interés crecido a 37° C o.n. en agitación. En primer lugar diluimos el cultivo 1:50 en TSB y crecimos hasta DO₅₄₀=0.3-0.4. En este momento partimos el cultivo en 2, añadiendo a una de las muestras H₂O₂ 0.5 mM. A los 20 minutos de la adición de H₂O₂ tomamos 50 μ l de muestra y le añadimos Azida Sódica (5 mM). Se transfiere a placas de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos y se procede a la lectura de la placa en el aparato THERMOmax (Molecular devices) a una longitud de onda de DO₆₅₀ y DO₄₉₀. A continuación añadimos 50 μ l de la solución de nitrocefina (132 μ g/ml en una solución de fosfato sódico 0.1M a pH 5,8) y se introduce de nuevo la placa en el aparato THERMOmax para su lectura durante 20 minutos a intervalos de 20 segundos.

Para el cálculo de las unidades de actividad β -lactamasa, se utilizaron las siguientes fórmulas:

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

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

Un incremento de absorbancia de 0.001 DO_{490} se define como 1 unidad de actividad β -lactamasa.

SDS-PAGE, Western blot y tinción de Coomassie.

Para la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se utilizaron las cubetas Mini-protean II de Bio-Rad siguiendo las instrucciones del fabricante. La preparación de las muestras se realizó como se describe en Ní Eidhin *et al.* (1998). Se tomaron muestras de sobrenadate, de cultivos con o sin MC crecidos a 32 °C, a diferentes tiempos.

Para el análisis por Western blot se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF (Immobilon P, Millipore) mediante transferencia en condiciones húmedas. Las membranas se bloquearon con leche al 5 % en PBS-tween 0.05 %.

Para los Western blot de TSST-1, utilizamos 2 tipos de anticuerpos (monoclonal o policlonal) según conveniencia:

1. Utilizamos el anticuerpo monoclonal TSST-1 anti-mouse de (Cucarella *et al.*, 2001) como primer anticuerpo, diluído 1/1.000 en leche 1% y PBS-tween 0.05%, y como segundo anticuerpo goat anti-mouse IgG-HRP:sc-2005 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.), diluído 1/5.000 en 1% leche - PBS-tween 0.05%, y se reveló con el sistema ECL Plus Western Blotting Detection (GE Healthcare).
2. Como anticuerpo policlonal contra TSST-1 utilizamos Rabbit polyclonal to Staphylococcus TSST1 (ab15933) de Abcam, diluido 1/10.000 en leche 1% y PBS-tween 0.05%, y como segundo anticuerpo goat anti-rabbit IgG-HRP:sc-2004 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.), diluído 1/5.000 en 1% leche - PBS-tween 0.05%, y se reveló con el sistema ECL Plus Western Blotting Detection (GE Healthcare).

Para los Western blot de SEL y SEC, tuvimos que introducir una cola de histidinas al final de cada uno de los genes para la posterior detección de la proteína con el anticuerpo Mouse anti-His (ZYMED Laboratorios) diluido 1/500 en leche 1% y PBS-tween 0.05%. La introducción de dicha cola se llevo a cabo mediante mutagénesis por pMAD (ver apartado anterior). Como segundo anticuerpo utilizamos goat anti-mouse IgG-HRP:sc-2005 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.), diluído

1/5.000 en 1% leche - PBS-tween 0.05%, y se reveló con el sistema ECL Plus Western Blotting Detection (GE Healthcare).

Por último para los Western blot de SEA, la inmunodetección se realizó utilizando como primer anticuerpo Rabbit polyclonal to Staphylococcus Enterotoxin A (ab15897) de Abcam, diluido 1/1000 en leche 1% y PBS-tween 0.05%, y como segundo anticuerpo goat anti-rabbit IgG-HRP:sc-2004 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.), diluido 1/5.000 en 1% leche - PBS-tween 0.05%, y se reveló con el sistema ECL Plus Western Blotting Detection (GE Healthcare).

Para estimar la extensión del efecto de la MC en la expresión de genes de *S. aureus*, llevamos a cabo la digestión de los cultivos bacterianos. Para ello se lavaron las bacterias con PBS conteniendo EDTA 5 mM y PMSF 1 mM y se resuspendieron en 100 µl de tampón de digestión (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 20 mM y 30 % de rafinosa (Sigma)) complementados con inhibidores de proteasas (mini-complet cocktail, Roche) y se digirieron durante 30 min a 37 °C en presencia de 2 mg ml⁻¹ de lisostafina. A continuación, se realizó SDS-PAGE y tinción de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Sigma).

Tabla 5.1. Cepas utilizadas en estos estudios.

Cepas de <i>S. aureus</i> utilizadas en el bloque 2 y 3 de resultados.		
Cepa	Descripción	Referencia
RN450	NCTC8325 curada de los fagos ϕ 11, ϕ 12 y ϕ 13.	(Novick, 1967)
RN4220	Derivado defectivo en restricción de RN450.	(Kreiwirth <i>et al.</i> , 1983)
RN27	RN450 lisogénica para 80 α , ϕ 13.	(Novick, 1967)
RN451	RN450 lisogénica para ϕ 11.	(Novick, 1967)
RN1030	Mutante <i>recA</i> ⁻ de RN451.	(Wyman <i>et al.</i> , 1974)
COL	Aislado clínico MRSA	(Gill <i>et al.</i> , 2005)
Mu50	Aislado clínico MRSA	(Baba <i>et al.</i> , 2002)
FRI-S6	Aislado clínico de <i>S. aureus</i> que codifica para la toxina Seb.	(Shafer and landolo, 1978)
RF122	Aislado clínico bovino, SaPIbov1-positivo.	(Fitzgerald <i>et al.</i> , 2001c)
LUG855	RN6390 contiene el fago phiSLT (PVL fago)	(Labandeira-Rey <i>et al.</i> , 2007)
V329	Aislado clínico bovino, <i>bap</i> positivo, biofilm positivo.	(Cucarella <i>et al.</i> , 2001)
RN10359	RN450 lisogénica para 80 α .	(Ubeda <i>et al.</i> , 2007)
JP1794	RN451 SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>	
JP1603	RN1030 SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>	
JP1622	RN451 cl G131E	
JP1625	JP1622 SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>	
JP1868	RN27 <i>lexA</i> Ind ⁻ (LexA G94E)	
JP1841	RN4220 <i>lexA</i> Ind ⁻ (LexA G94E)	
JP1869	RN451 <i>lexA</i> Ind ⁻ (LexA G94E)	
JP3592	RN10359 cl G130E	
JP3603	RN10359 SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>	
JP3602	RN10359 SaPI1 <i>tst::tetM</i>	
JP3656	JP3592 SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>	
JP3852	RN450 <i>katA</i> -mutant	
JP3853	RN10359 <i>katA</i> -mutant	

Cepa	Descripción	Referencia
JP3290	RN4220 pJP476	
JP3291	RN4220 pJP477	
JP3292	RN4220 <i>lexA</i> Ind ⁻ (LexA G94E) pJP476	
JP3293	RN4220 <i>lexA</i> Ind ⁻ (LexA G94E) pJP477	
Cepas de <i>S. pneumoniae</i>		
Cepa	Descripción	Referencia
Pn20	Aislado humano de nasofaringe	(Regev-Yochay <i>et al.</i> , 2006)
Pn20 Δ <i>spxB</i>	Pn20 <i>spxB::kan-rpsL</i>	(Regev-Yochay <i>et al.</i> , 2006)
TIGR4	Aislado humano de sangre	(Tettelin <i>et al.</i> , 2001)
TIGR4 Δ <i>spxB</i>	TIGR4 <i>spxB::kan-rpsL</i>	(Regev-Yochay <i>et al.</i> , 2006)
623	Cepa lisogénica	(Romero <i>et al.</i> , 1990)
949	Cepa lisogénica de la familia Spain ^{23F} -1	(Obregon <i>et al.</i> , 2004)
Cepas de <i>S. aureus</i> utilizadas en el bloque 4 de resultados.		
JP5102	RN450 Δ spa SaPI1	
JP5104	RN450 Δ spa SaPI1 <i>tst::tetM</i>	
JP4753	RN450 Δ spa SaPI1 lisógena del 80 α	
JP5106	RN450 Δ spa SaPI1 <i>tst::tetM</i> lisógena del 80 α	
JP5110	RN450 Δ spa SaPI1 <i>orf22::tetM</i>	
JP3528	RN450 SaPIbov1 <i>sel::eri</i> lisógena del 80 α	
JP5212	RN450 SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> lisógena del 80 α <i>sec</i> + His	
JP5479	RN450 SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> lisógena del 80 α <i>sel</i> + His	
MSSA476	Aislado clínico de osteomielitis	(Holden <i>et al.</i> , 2004)

Tabla 5.2. Plásmidos utilizados en estos estudios.

Plásmidos	Características relevantes	Referencia
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)
pJP468	Derivado del pMAD para obtener el mutante del represor <i>cl</i> del $\phi 80\alpha$.	
pJP676	Derivado del pMAD para introducir la cola de histidinas al final del gen <i>sec</i> de SaPIbov1.	
pJP677	Derivado del pMAD para introducir la cola de histidinas al final del gen <i>sel</i> de SaPIbov1.	
pJP679	Derivado del pMAD para obtener cepas de <i>S. aureus</i> mutantes en proteína A.	Iñigo Lasa (no publicado)
Plásmidos de fusión transcripcional		
pCN41	Utilizado en la fusión transcripcional de <i>staphylococcus</i> , portador de β -lactamasa <i>blaZ</i> , contiene resistencia a <i>erm</i>	(Charpentier <i>et al.</i> , 2004)
pJP476	Análisis transcripcional del promotor de <i>recA</i> , derivado de pCN41	
pJP477	Análisis transcripcional del promotor de <i>lexA</i> , derivado de pCN41	

Tabla 5.3. Cebadores utilizados en estos estudios. Están subrayadas las secuencias de sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas para los clonajes.

Cebadores utilizados para el genotipado de <i>S. aureus</i>	
Cebador	Secuencia (5'→3')
coa-1m	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G
coa-2c	GCT TCC GAT TGT TCG ATG C
spa-1m	GAT TTT AGT ATT GCA ATA CAT AAT TCG
spa-2c	CCA CCA AAT ACA GTT GTA CCG
clfB-1m	CAG CAG TAA ATC CGA AAG ACC C
clfB-2c	CAC CTT TAG GAT TTG ATG GTG C
Cebadores utilizados para obtener el mutante del represor <i>cl</i> en ϕ 80α	
Cebador	Secuencia (5'→3')
phi11-4m	GGTGCAACTGGTGCTGAGATAGGAGAAGAATTA
phi11-3c	TAATTCTTCTCCTATCTCAGCACCAGTTGCACC
phi80 α -cl-9mE	CCGGAATTCCACAGATTCGTTTTATTCC
phi11-1cB	CGCGGATCCAGTGTTAATGTGTATATGCTC
Cebadores utilizados para introducir la cola de His en <i>sec</i>	
Cebador	Secuencia (5'→3')
SaPIbov1-192mE	CCGGAATTCAAGAGTCGATTTATTTTCATGC
SaPIbov1-193c	TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTCCATTCTTTGTTGTAAGGTG
SaPIbov1-194m	AGTCACCACCACCACCACCCTAATGTTAATCCGATTTTGATA
SaPIbov1-195cS	ACGCGTCGACCCTGGATGTAGCGGCAA
Cebadores utilizados para introducir la cola de His en <i>sel</i>	
Cebador	Secuencia (5'→3')
sel-3mB	CGCGGATCCAGTCTTATCTAACGGCGATG
SaPIbov1-189c	TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTCTTTTTGAAATTTTCGACATC
SaPIbov1-190m	AGTCACCACCACCACCACCCTGATTCCAATTATTATAGTTTAG
SaPIbov1-191cS	ACGCGTCGACAAGTCTGTAGATAAATTTTTGG

Cebadores utilizados para realizar sondas para Southern Blot

Cebadores sonda SaPIbov1 y SaPI1

Tsst-3m CTAATCAAATAATCAAAACTGC

Tsst-4c TTTCCAATAACCACCCGTTT

Cebadores sonda fago 80α

Phi80α-1m AGTTTCTGCCAATACCAGTCC

Phi80α-2c CTACCTACTTTTGTGGTGGG

Cebador Secuencia (5'→3')

Cebadores utilizados para obtener plásmidos de fusión transcripcional

pJP476

NY-recA-1mB CGCGGATCCTATTAGAGTATGATGGTGT

NY-recA-2cE CCGGAATTCTAGCCACCTACACCTAGCGC

pJP477

NY-lexA-1mB CGCGGATCCGAGTGAGCACTAATGTTTCGC

NY-lexA-2cE CCGGAATTC AATAACTGGCACATGAATCG

Capítulo VI



Conclusiones

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

1. La presencia de portadores nasales de *S. aureus* en granjas cunícolas es un hecho frecuente, siendo el porcentaje de portadores más elevado en las conejas con estafilococia que sin ella.

2. Los estudios moleculares determinaron que el 99% de las conejas con estafilococia presentaron el mismo genotipo de *S. aureus* en la nariz y en la lesión. La obtención de dicho resultado sugiere el posible origen nasal de las infecciones estafilocócicas.

3. El H₂O₂ activa la respuesta SOS en *S. aureus*, lo que promueve la transferencia horizontal de genes implicados en virulencia.

4. El H₂O₂ producido por ciertas bacterias como *S. pneumoniae*, constituye una potente arma de destrucción frente a *S. aureus* gracias a la letalidad mediada por la inducción de fagos residentes.

5. Las cepas de *S. aureus* que portan fagos en forma lisogénica pueden ser más sensibles a los efectos bactericidas de los antibióticos que dañan el DNA, debido a la lisis causada por la inducción de los fagos.

6. La producción de toxinas codificadas en fagos e IPs de *S. aureus* disminuye tras la inducción de la respuesta SOS.

Capítulo VII

Bibliografía

- Adlam, C., Thorley, C.M., Ward, P.D., Collins, M., Lucken, R.N., and Knight, P.A. (1976) Natural and experimental staphylococcal mastitis in rabbits. *J Comp Pathol* **86**: 581-593.
- Armstrong-Esther, C.A. (1976) Carriage patterns of *Staphylococcus aureus* in a healthy non-hospital population of adults and children. *Ann Hum Biol* **3**: 221-227.
- Arnaud, M., Chastanet, A., and Debarbouille, M. (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6887-6891.
- Atkins, K.L., Burman, J.D., Chamberlain, E.S., Cooper, J.E., Poutrel, B., Bagby, S., Jenkins, A.T., Feil, E.J., and van den Elsen, J.M. (2008) *S. aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi: host specificity and mechanisms of immune complex formation. *Mol Immunol* **45**: 1600-1611.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1990) Current protocols in molecular biology. . *New York, N. Y.: John Wiley & Sons*.
- 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., and Hiramatsu, K. (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* **359**: 1819-1827.
- Bassler, B.L., and Losick, R. (2006) Bacterially speaking. *Cell* **125**: 237-246.
- Beaber, J.W., Hochhut, B., and Waldor, M.K. (2004) SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* **427**: 72-74.
- Beaber, J.W., and Waldor, M.K. (2004) Identification of operators and promoters that control SXT conjugative transfer. *J Bacteriol* **186**: 5945-5949.
- Betley, M.J., and Mekalanos, J.J. (1985) Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science* **229**: 185-187.

- Bharate, S.B., Bhutani, K.K., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Jacob, M.R., Khan, I.A., and Singh, I.P. (2005) Biomimetic synthesis, antimicrobial, antileishmanial and antimalarial activities of euglobins and their analogues. *Bioorg Med Chem*.
- Bibel, D.J., Aly, R., Shinefield, H.R., Maibach, H.I., and Strauss, W.G. (1982) Importance of the keratinized epithelial cell in bacterial adherence. *J Invest Dermatol* **79**: 250-253.
- Biologics, I.f.I.C.i.A. (2004) Staphylococcal Enterotoxin B. *The Center for Food Security & Public Health Iowa State University*.
- Bisognano, C., Kelley, W.L., Estoppey, T., Francois, P., Schrenzel, J., Li, D., Lew, D.P., Hooper, D.C., Cheung, A.L., and Vaudaux, P. (2004) A recA-LexA-dependent pathway mediates ciprofloxacin-induced fibronectin binding in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **279**: 9064-9071.
- Bogaert, D., van Belkum, A., Sluijter, M., Luijendijk, A., de Groot, R., Rumke, H.C., Verbrugh, H.A., and Hermans, P.W. (2004) Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet* **363**: 1871-1872.
- Borst, D.W., and Betley, M.J. (1994) Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression correlate with sea allele class. *Infect Immun* **62**: 113-118.
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., and Ros, J. (2000) Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 27393-27398.
- Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M.L., and Brussow, H. (2003) Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol* **6**: 417-424.
- Claverys, J.P., Prudhomme, M., and Martin, B. (2006) Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**: 451-475.

- Cole, A.M., Dewan, P., and Ganz, T. (1999) Innate antimicrobial activity of nasal secretions. *Infect Immun* **67**: 3267-3275.
- Cole, A.M., Tahk, S., Oren, A., Yoshioka, D., Kim, Y.H., Park, A., and Ganz, T. (2001) Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**: 1064-1069.
- Corne, P., Marchandin, H., Jonquet, O., Campos, J., and Banuls, A.L. (2005) Molecular evidence that nasal carriage of *Staphylococcus aureus* plays a role in respiratory tract infections of critically ill patients. *J Clin Microbiol* **43**: 3491-3493.
- Cosgrove, K., Coutts, G., Jonsson, I.M., Tarkowski, A., Kokai-Kun, J.F., Mond, J.J., and Foster, S.J. (2007) Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**: 1025-1035.
- Crossley, K., and Archer, G. (1997) The staphylococci in human disease. 1st edn. New York: Churchill Livingstone Inc.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., and Penades, J.R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **183**: 2888-2896.
- Cucarella, C., Tormo, M.A., Ubeda, C., Trotonda, M.P., Monzon, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., and Penades, J.R. (2004) Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **72**: 2177-2185.
- Chai, S., Kruff, V., and Alonso, J.C. (1994) Analysis of the *Bacillus subtilis* bacteriophages SPP1 and SF6 gene 1 product: a protein involved in the initiation of headful packaging. *Virology* **202**: 930-939.

- Charpentier, E., Anton, A.I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y., and Novick, R.P. (2004) Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6076-6085.
- Chen, J., and Novick, R.P. (2009) Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *Science* **323**: 139-141.
- Dahme, E., and Weiss, E. (1983) Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. 3^a ed., Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Dancer, S.J., and Noble, W.C. (1991) Nasal, axillary, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* among women: identification of strains producing epidermolytic toxin. *J Clin Pathol* **44**: 681-684.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewsky, B.H., Costerton, J.W., and Greenberg, E.P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295-298.
- Diep, B.A., Gill, S.R., Chang, R.F., Phan, T.H., Chen, J.H., Davidson, M.G., Lin, F., Lin, J., Carleton, H.A., Mongodin, E.F., Sensabaugh, G.F., and Perdreau-Remington, F. (2006) Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **367**: 731-739.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., and Schlievert, P.M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* **13**: 16-34, table of contents.
- El-Gilany, A.H., and Fathy, H. (2009) Risk factors of recurrent furunculosis. *Dermatol Online J* **15**: 16.
- Fajardo, A., and Martinez, J.L. (2008) Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr Opin Microbiol* **11**: 161-167.
- Fitzgerald, J.R., Monday, S.R., Foster, T.J., Bohach, G.A., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., and Smyth, C.J. (2001) Characterization of a putative pathogenicity island

- from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J Bacteriol* **183**: 63-70.
- Flatt, R.E. (1974) Bacterial diseases. *The biology of the laboratory rabbit*. Weisbroth, SH; Flatt, RE & Krauss, AK (eds), Academic press, Nueva York, NY, EE UU **193-236**.
- Freeman, V.J. (1951) Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Bacteriol* **61**: 675-688.
- Frenay, H.M., Theelen, J.P., Schouls, L.M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Verhoef, J., van Leeuwen, W.J., and 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.
- Friedberg, B., Hauer, E., Belkhirat, M., Watine, J., and Le Coustumier, A. (2003) Catalase-negative *Staphylococcus aureus*: a rare cause of catheter-related bacteremia. *Clin Microbiol Infect* **9**: 1253-1255.
- Garrouste-Orgeas, M., Timsit, J.F., Kallel, H., Ben Ali, A., Dumay, M.F., Paoli, B., Misset, B., and Carlet, J. (2001) Colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ICU patients: morbidity, mortality, and glycopeptide use. *Infect Control Hosp Epidemiol* **22**: 687-692.
- Ghisotti, D., Briani, F., Forti, F., Piazza, F., Polo, S., Sabbattini, P., Sturniolo, T., Terzano, S., Zangrossi, S., Zappone, M., and et al. (1995) Multiple regulatory mechanisms controlling phage-plasmid P4 propagation. *FEMS Microbiol Rev* **17**: 127-134.
- 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., and 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.
- Goerlich, O., Quillardet, P., and Hofnung, M. (1989) Induction of the SOS response by hydrogen peroxide in various *Escherichia coli* mutants with altered protection against oxidative DNA damage. *J Bacteriol* **171**: 6141-6147.
- Goh, E.B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J., Surette, M.G., and Davies, J. (2002) Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 17025-17030.
- Goh, S.H., Byrne, S.K., Zhang, J.L., and Chow, A.W. (1992) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* **30**: 1642-1645.
- Guinan, M.E., Dan, B.B., Guidotti, R.J., Reingold, A.L., Schmid, G.P., Bettoli, E.J., Lossick, J.G., Shands, K.N., Kramer, M.A., Hargrett, N.T., Anderson, R.L., and Broome, C.V. (1982) Vaginal colonization with *Staphylococcus aureus* in healthy women: a review of four studies. *Ann Intern Med* **96**: 944-947.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I., and Tschape, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* **23**: 1089-1097.
- Hacker, J., and Kaper, J.B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**: 641-679.
- Hazariwala, A., Sanders, Q., Hudson, C.R., Hofacre, C., Thayer, S.G., and 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.
- Hermans, K., De Herdt, P., Devriese, L.A., Hendrickx, W., Godard, C., and Haesebrouck, F. (1999) Colonization of rabbits with *Staphylococcus aureus* in flocks with and without chronic staphylococcosis. *Vet Microbiol* **67**: 37-46.

- Hermans, K., De Herdt, P., Devriese, L.A., Godard, C., and Haesebrouck, F. (2000a) Colonisation of rabbits with *Staphylococcus aureus* after experimental infection with high and low virulence strains. *Vet Microbiol* **72**: 277-284.
- Hermans, K., Haesebrouck, F., Vanechoutte, M., Devriese, L.A., Godard, C., and De Herdt, P. (2000b) 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., Devriese, L.A., and Haesebrouck, F. (2003) Rabbit staphylococcosis: difficult solutions for serious problems. *Vet Microbiol* **91**: 57-64.
- 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., and 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.
- Hookey, J.V., Richardson, J.F., and Cookson, B.D. (1998) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J Clin Microbiol* **36**: 1083-1089.
- Horsburgh, M.J., Aish, J.L., White, I.J., Shaw, L., Lithgow, J.K., and Foster, S.J. (2002) sigmaB modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional rsbU strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J Bacteriol* **184**: 5457-5467.
- Iandolo, J.J., Worrell, V., Groicher, K.H., Qian, Y., Tian, R., Kenton, S., Dorman, A., Ji, H., Lin, S., Loh, P., Qi, S., Zhu, H., and Roe, B.A. (2002) Comparative analysis

- of the genomes of the temperate bacteriophages phi 11, phi 12 and phi 13 of *Staphylococcus aureus* 8325. *Gene* **289**: 109-118.
- Imlay, J.A., and Linn, S. (1987) Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **169**: 2967-2976.
- Jin, T., Bokarewa, M., Foster, T., Mitchell, J., Higgins, J., and Tarkowski, A. (2004) *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol* **172**: 1169-1176.
- Kaliner, M.A. (1991) Human nasal respiratory secretions and host defense. *Am Rev Respir Dis* **144**: S52-56.
- Katsuda, K., Hata, E., Kobayashi, H., Kohmoto, M., Kawashima, K., Tsunemitsu, H., and 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.
- Kim, B., and Little, J.W. (1993) LexA and lambda CI repressors as enzymes: specific cleavage in an intermolecular reaction. *Cell* **73**: 1165-1173.
- Kirkland, K.B., Briggs, J.P., Trivette, S.L., Wilkinson, W.E., and Sexton, D.J. (1999) The impact of surgical-site infections in the 1990s: attributable mortality, excess length of hospitalization, and extra costs. *Infect Control Hosp Epidemiol* **20**: 725-730.
- Kloos, W., and Schleifer, K. (1981) The genus *Staphylococcus*. *The Prokaryotes*. Starr, MP; Stolp, H; Trupper, HG; Ballows, A & Schlegel HG (eds). SpringerVerlag, Berlin, Heidelberg.
- Kluytmans, J., van Belkum, A., and 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., Naidich, S., Koreen, I.V., Graff, G.R., Graviss, E.A., and 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.
- Kreiswirth, B.N., Lofdahl, S., Betley, M.J., O'Reilly, M., Schlievert, P.M., Bergdoll, M.S., and 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., and Hiramatsu, K. (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**: 1225-1240.
- Kwan, T., Liu, J., Dubow, M., Gros, P., and Pelletier, J. (2005) The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5174-5179.
- Labandeira-Rey, M., Couzon, F., Boisset, S., Brown, E.L., Bes, M., Benito, Y., Barbu, E.M., Vazquez, V., Hook, M., Etienne, J., Vandenesch, F., and Bowden, M.G. (2007) *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* **315**: 1130-1133.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., and Cox, M.M. (1995) Principles of Biochemistry, Second edition. *New York, N.Y.:Worth Publishers, Inc.*
- Letarov, A., and Kulikov, E. (2009) The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. *J Appl Microbiol.*
- Li, Y.Z., Ma, L., and Kong, F.R. (2009) Homology of *Staphylococcus aureus* isolated from skin lesions and nose of patients with impetigo. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* **31**: 10-12.

- Linares, J.F., Gustafsson, I., Baquero, F., and Martinez, J.L. (2006) Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 19484-19489.
- Lindsay, J.A., Ruzin, A., Ross, H.F., Kurepina, N., and 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.
- Little, J.W., Mount, D.W., and Yanisch-Perron, C.R. (1981) Purified *lexA* protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 4199-4203.
- Little, J.W., and Mount, D.W. (1982) The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* **29**: 11-22.
- Little, J.W. (1984) Autodigestion of *lexA* and phage lambda repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1375-1379.
- Little, J.W. (1991) Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie* **73**: 411-421.
- Little, J.W. (1993) LexA cleavage and other self-processing reactions. *J Bacteriol* **175**: 4943-4950.
- Lottenberg, R., Minning-Wenz, D., and Boyle, M.D. (1994) Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends Microbiol* **2**: 20-24.
- Lucet, J.C., Chevret, S., Durand-Zaleski, I., Chastang, C., and Regnier, B. (2003) Prevalence and risk factors for carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at admission to the intensive care unit: results of a multicenter study. *Arch Intern Med* **163**: 181-188.
- Maiques, E., Ubeda, C., Campoy, S., Salvador, N., Lasa, I., Novick, R.P., Barbe, J., and Penades, J.R. (2006) beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **188**: 2726-2729.

- Maiques, E., Ubeda, C., Tormo, M.A., Ferrer, M.D., Lasa, I., Novick, R.P., and Penades, J.R. (2007) Role of staphylococcal phage and SaPI integrase in intra- and interspecies SaPI transfer. *J Bacteriol* **189**: 5608-5616.
- Mandell, G.L. (1975) Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal--leukocyte interaction. *J Clin Invest* **55**: 561-566.
- Martinez, J.L. (2008) Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* **321**: 365-367.
- Mattix, M.E., Hunt, R.E., Wilhelmsen, C.L., Johnson, A.J., and Baze, W.B. (1995) Aerosolized staphylococcal enterotoxin B-induced pulmonary lesions in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Toxicol Pathol* **23**: 262-268.
- McDonnell, G.E., Wood, H., Devine, K.M., and McConnell, D.J. (1994) Genetic control of bacterial suicide: regulation of the induction of PBSX in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**: 5820-5830.
- Miller, C., Thomsen, L.E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., and Cohen, S.N. (2004) SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* **305**: 1629-1631.
- Mork, T., Tollersrud, T., Kvitle, B., Jorgensen, H.J., and Waage, S. (2005) Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from ovine intramammary infections in Norway. *Vet Microbiol* **106**: 265-273.
- Narita, S., Kaneko, J., Chiba, J., Piemont, Y., Jarraud, S., Etienne, J., and Kamio, Y. (2001) Phage conversion of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus*: molecular analysis of a PVL-converting phage, phiSLT. *Gene* **268**: 195-206.
- Nouwen, J., Boelens, H., van Belkum, A., and Verbrugh, H. (2004) Human factor in *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Infect Immun* **72**: 6685-6688.

- Nouwen, J.L., Fieren, M.W., Snijders, S., Verbrugh, H.A., and van Belkum, A. (2005) Persistent (not intermittent) nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is the determinant of CPD-related infections. *Kidney Int* **67**: 1084-1092.
- Novick, R. (1967) Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology* **33**: 155-166.
- Novick, R.P. (2003) Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **49**: 93-105.
- Novick, R.P., and Subedi, A. (2007) The SaPIs: mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*. *Chem Immunol Allergy* **93**: 42-57.
- O'Brien, L.M., Walsh, E.J., Massey, R.C., Peacock, S.J., and Foster, T.J. (2002) *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cell Microbiol* **4**: 759-770.
- Obregon, V., Garcia, J.L., Garcia, E., Lopez, R., and Garcia, P. (2004) Peculiarities of the DNA of MM1, a temperate phage of *Streptococcus pneumoniae*. *Int Microbiol* **7**: 133-137.
- Okerman, L., Devriese, L.A., Maertens, L., Okerman, F., and Godard, C. (1984) Cutaneous staphylococcosis in rabbits. *Vet Rec* **114**: 313-315.
- Otero, M.C., and Nader-Macias, M.E. (2006) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Anim Reprod Sci* **96**: 35-46.
- Padoveze, M.C., de Jesus Pedro, R., Blum-Menezes, D., Bratfich, O.J., and Moretti, M.L. (2008) *Staphylococcus aureus* nasal colonization in HIV outpatients: persistent or transient? *Am J Infect Control* **36**: 187-191.
- Park, B., Nizet, V., and Liu, G.Y. (2008) Role of *Staphylococcus aureus* catalase in niche competition against *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **190**: 2275-2278.

- Peacock, S.J., Justice, A., Griffiths, D., de Silva, G.D., Kantzanou, M.N., Crook, D., Sleeman, K., and Day, N.P. (2003) Determinants of acquisition and carriage of *Staphylococcus aureus* in infancy. *J Clin Microbiol* **41**: 5718-5725.
- Perez-Capilla, T., Baquero, M.R., Gomez-Gomez, J.M., Ionel, A., Martin, S., and Blazquez, J. (2005) SOS-independent induction of *dinB* transcription by beta-lactam-mediated inhibition of cell wall synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 1515-1518.
- Pericone, C.D., Overweg, K., Hermans, P.W., and Weiser, J.N. (2000) Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect Immun* **68**: 3990-3997.
- Perl, T.M., Cullen, J.J., Wenzel, R.P., Zimmerman, M.B., Pfaller, M.A., Sheppard, D., Twombly, J., French, P.P., and Herwaldt, L.A. (2002) Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **346**: 1871-1877.
- Phillips, I., Culebras, E., Moreno, F., and Baquero, F. (1987) Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J Antimicrob Chemother* **20**: 631-638.
- Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., and Claverys, J.P. (2006) Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **313**: 89-92.
- Pujol, M., Pena, C., Pallares, R., Ariza, J., Ayats, J., Dominguez, M.A., and Gudiol, F. (1996) Nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia among nasal carriers of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains. *Am J Med* **100**: 509-516.
- Regev-Yochay, G., Dagan, R., Raz, M., Carmeli, Y., Shainberg, B., Derazne, E., Rahav, G., and Rubinstein, E. (2004) Association between carriage of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in Children. *Jama* **292**: 716-720.

- Regev-Yochay, G., Trzcinski, K., Thompson, C.M., Malley, R., and Lipsitch, M. (2006) Interference between *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: In vitro hydrogen peroxide-mediated killing by *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **188**: 4996-5001.
- Ridley, M. (1959) Perineal carriage of *S. aureus*. *Br Med J* **1**: 270-273.
- Rimland, D., and Roberson, B. (1986) Gastrointestinal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **24**: 137-138.
- Roche, F.M., Meehan, M., and Foster, T.J. (2003) The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiology* **149**: 2759-2767.
- Rolle, M., and Mayr, A. (1978) *Microbiologie, infektions und seuchenlehre*. 4^a ed., Ferdinand Enke Verlag. Stuttgart.
- Romero, A., Lopez, R., Lurz, R., and Garcia, P. (1990) Temperate bacteriophages of *Streptococcus pneumoniae* that contain protein covalently linked to the 5' ends of their DNA. *J Virol* **64**: 5149-5155.
- Ruzin, A., Lindsay, J., and Novick, R.P. (2001) Molecular genetics of SaPI1--a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **41**: 365-377.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor.
- Sauer, R.T., Ross, M.J., and Ptashne, M. (1982) Cleavage of the lambda and P22 repressors by recA protein. *J Biol Chem* **257**: 4458-4462.
- Schaffer, A.C., Solinga, R.M., Cocchiario, J., Portoles, M., Kiser, K.B., Risley, A., Randall, S.M., Valtulina, V., Speziale, P., Walsh, E., Foster, T., and Lee, J.C. (2006) Immunization with *Staphylococcus aureus* clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. *Infect Immun* **74**: 2145-2153.

- Segura, P., Martínez, J., Peris, B., Selva, L., Viana, D., Penadés, J., and Corpa, J. (2007) Staphylococcal infections are the main pathological culling causes of rabbit does in two industrial farms. *Veterinary Record* **160(25)**: 869-872.
- Shafer, W.M., and landolo, J.J. (1978) Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. *Infect Immun* **20**: 273-278.
- Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S.O., Smith, D.H., Waddington, M., Dodge, D.E., Bost, D.A., Riehman, M., Naidich, S., and 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., and 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.
- Smith, K.J., Wagner, K.F., Yeager, J., Skelton, H.G., and Ledsky, R. (1994) *Staphylococcus aureus* carriage and HIV-1 disease: association with increased mucocutaneous infections as well as deep soft-tissue infections and sepsis. *Arch Dermatol* **130**: 521-522.
- Solberg, C.O. (1965) A study of carriers of *Staphylococcus aureus* with special regard to quantitative bacterial estimations. *Acta Med Scand Suppl* **436**: 1-96.
- Spellerberg, B., Cundell, D.R., Sandros, J., Pearce, B.J., Idanpaan-Heikkila, I., Rosenow, C., and Masure, H.R. (1996) Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **19**: 803-813.
- Strauss, E. (2000) Microbiology. Fighting bacterial fire with bacterial fire. *Science* **290**: 2231-2233.
- Su, C., Herbelin, C., Frieze, N., Skardova, O., and Sordillo, L.M. (1999) Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cattle in different geographical areas. *Epidemiol Infect* **122**: 329-336.

- Sumby, P., and Waldor, M.K. (2003) Transcription of the toxin genes present within the Staphylococcal phage phiSa3ms is intimately linked with the phage's life cycle. *J Bacteriol* **185**: 6841-6851.
- Sutra, L., and Poutrel, B. (1994) Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* **40**: 79-89.
- Tallent, S.M., Langston, T.B., Moran, R.G., and Christie, G.E. (2007) Transducing particles of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island SaPI1 are comprised of helper phage-encoded proteins. *J Bacteriol* **189**: 7520-7524.
- Tenover, F.C., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Hebert, G.A., Hill, B., Hollis, R., and et al. (1994) Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **32**: 407-415.
- Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M.R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hansen, C.L., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E.K., Holt, I.E., Loftus, B.J., Yang, F., Smith, H.O., Venter, J.C., Dougherty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K., and Fraser, C.M. (2001) Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**: 498-506.
- Tormo, M.A., Ferrer, M.D., Maiques, E., Ubeda, C., Selva, L., Lasa, I., Calvete, J.J., Novick, R.P., and Penades, J.R. (2008) *Staphylococcus aureus* pathogenicity island DNA is packaged in particles composed of phage proteins. *J Bacteriol* **190**: 2434-2440.
- Ubeda, C., Tormo, M.A., Cucarella, C., Trotonda, P., Foster, T.J., Lasa, I., and Penades, J.R. (2003) Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol* **49**: 193-210.

- Ubeda, C., Maiques, E., Knecht, E., Lasa, I., Novick, R.P., and Penades, J.R. (2005) Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Mol Microbiol* **56**: 836-844.
- Ubeda, C., Barry, P., Penades, J.R., and Novick, R.P. (2007) A pathogenicity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14182-14188.
- Ubeda, C., Maiques, E., Barry, P., Matthews, A., Tormo, M.A., Lasa, I., Novick, R.P., and Penades, J.R. (2008) SaPI mutations affecting replication and transfer and enabling autonomous replication in the absence of helper phage. *Mol Microbiol* **67**: 493-503.
- Uehara, Y., Kikuchi, K., Nakamura, T., Nakama, H., Agematsu, K., Kawakami, Y., Maruchi, N., and Totsuka, K. (2001) H₂O₂ produced by viridans group streptococci may contribute to inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns. *Clin Infect Dis* **32**: 1408-1413.
- VandenBergh, M.F., Yzerman, E.P., van Belkum, A., Boelens, H.A., Sijmons, M., and Verbrugh, H.A. (1999) Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *J Clin Microbiol* **37**: 3133-3140.
- Vautor, E., Abadie, G., Guibert, J.M., Chevalier, N., and Pepin, M. (2005) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in dairy sheep. *Vet Microbiol* **106**: 235-239.
- Viana, D., Selva, L., Segura, P., Penades, J.R., and Corpa, J.M. (2007) Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from rabbit lesions. *Veterinary Microbiology*. **121**: 288-298.
- Vojtov, N., Ross, H.F., and Novick, R.P. (2002) Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. *Proc Nat Acad Sci* **99**: 10102-10107.
- von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H., and Peters, G. (2001) Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* **344**: 11-16.

- Wagner, P.L., Livny, J., Neely, M.N., Acheson, D.W., Friedman, D.I., and Waldor, M.K. (2002) Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**: 957-970.
- Wagner, P.L., and Waldor, M.K. (2002) Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect Immun* **70**: 3985-3993.
- Walker, G.C. (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **48**: 60-93.
- Weinbauer, M.G., and Rassoulzadegan, F. (2004) Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environ Microbiol* **6**: 1-11.
- Wertheim, H.F., Vos, M.C., Ott, A., van Belkum, A., Voss, A., Kluytmans, J.A., van Keulen, P.H., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Meester, M.H., and Verbrugh, H.A. (2004) Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet* **364**: 703-705.
- Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., and Nouwen, J.L. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* **5**: 751-762.
- Wertheim, H.F., van Kleef, M., Vos, M.C., Ott, A., Verbrugh, H.A., and Fokkens, W. (2006) Nose Picking and Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol* **27**: 863-867.
- White, A. (1963) Increased Infection Rates in Heavy Nasal Carriers of Coagulase-Positive Staphylococci. *Antimicrobial Agents Chemother (Bethesda)* **161**: 667-670.
- Williams, R.E. (1963) Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev* **27**: 56-71.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P., and Edmond, M.B. (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of

24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **39**: 309-317.

Wyman, L., Goering, R.V., and Novick, R.P. (1974) Genetic control of chromosomal and plasmid recombination in *Staphylococcus aureus*. *Genetics* **76**: 681-702.

Yamaguchi, T., Hayashi, T., Takami, H., Nakasone, K., Ohnishi, M., Nakayama, K., Yamada, S., Komatsuzawa, H., and Sugai, M. (2000) Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **38**: 694-705.

Yoshizawa, Y., Sakurada, J., Sakurai, S., Machida, K., Kondo, I., and Masuda, S. (2000) An exfoliative toxin A-converting phage isolated from *Staphylococcus aureus* strain ZM. *Microbiol Immunol* **44**: 189-191.

Zhang, X., McDaniel, A.D., Wolf, L.E., Keusch, G.T., Waldor, M.K., and Acheson, D.W. (2000) Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis* **181**: 664-670.