



CEU

Universidad
Cardenal Herrera

Facultad de Veterinaria

GRADO EN VETERINARIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Staphylococcus aureus:
EFECTO DE LAS COAGULASAS
EN EL CONEJO

SARA PÉREZ FUENTES





Facultad de Veterinaria

GRADO EN VETERINARIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Staphylococcus aureus: EFECTO DE LAS
COAGULASAS EN EL CONEJO

SARA PÉREZ FUENTES

5º DE GRADO EN VETERINARIA

TUTOR: DAVID VIANA MARTÍN

TRABAJO EXPERIMENTAL

FECHA DE ENTREGA: 5 DE JUNIO DE 2015

RESUMEN

Staphylococcus aureus es una bacteria cosmopolita que en el último siglo ha provocado muchos problemas tanto a humanos como a animales. Se han realizado numerosos estudios sobre esta bacteria con el fin de encontrar una vacuna eficaz. Produce dos coagulasas, la Coagulasa (Coa) y la proteína de unión al factor Von Willebrand (Vwbp), dos proteínas esenciales para el desarrollo de la patogenicidad, las lesiones y la enfermedad. Con el objetivo de conocer el efecto de estas coagulasas, en este trabajo se obtuvo un mutante de *S. aureus* en Coa en una cepa aislada de una lesión de conejo. Con esta cepa mutante y la salvaje se realizaron 4 ensayos con un modelo cunícola (curva de crecimiento, prueba de hemólisis, prueba de coagulación en plasma de conejo y prueba de supervivencia en sangre de conejo), que demostraron que hay diferencia entre las dos cepas: la cepa mutante tenía mayor crecimiento, diferente hemólisis y falta de coagulación. A la luz de estos resultados, es importante repetir los ensayos y realizar otros diferentes, tanto *in vitro* como *in vivo* para conocer con exactitud el efecto de la Coa en el conejo.

Palabras clave: ***Staphylococcus aureus*, coagulasa, conejo.**

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a cosmopolitan bacterium that has caused many problems in the last century, both humans and animals. There have been numerous studies of this bacterium in order to find an effective vaccine. It produces two coagulases, the Coagulase (Coa) and the Von Willebrand factor-binding protein (Vwbp), two essential proteins for the development of the pathogenesis, the injuries and the disease. In order to know the effect of these coagulases, in this work a mutant of *S. aureus* in Coa was obtained from a strain of a rabbit lesion. It is a strain which lacks the gene *coa* encoding coagulase. With the mutant strain and the wild (Jwt) were performed four tests with rabbit model (growth curve, haemolysis test, coagulation test in rabbit plasma and blood test of survival rabbit). They showed difference between the two strains: the mutant strain had higher growth, different haemolysis and lack of coagulation. In view of these results, it is important to repeat the tests and perform others, both *in vitro* and *in vivo* to know the exact effect of Coa in rabbits.

Este trabajo se engloba dentro del proyecto de investigación de la Universidad Cardenal Herrera CEU titulado “Estudio del sistema inmune de diferentes líneas genéticas cunícolas y su respuesta frente a desafíos productivos e infecciosos”, en el cual participo mediante una beca de colaboración del ministerio.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
1.2. Importancia clínica	9
1.3. Patogenia de las infecciones de <i>S. aureus</i>	10
1.4. Factores de virulencia.....	10
1.5. Genes implicados en la coagulación	11
1.6. Uso de un modelo cunícola	12
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1. Cepas, plásmidos, cebadores y medios utilizados.	15
3.2. Realización del mutante.....	16
3.3. Caracterización <i>in vitro</i> del mutante.....	22
4. RESULTADOS	24
5. DISCUSIÓN	29
6. CONCLUSIONES.....	32
7. BIBLIOGRAFÍA	33

ADN	ácido desoxirribonucleico
Coa	Proteína coagulasa
<i>coa</i>	Gen coagulasa
DO _(nm)	densidad óptica a una cierta longitud de onda (nm)
F1	flanqueante 1
F2	flanqueante 2
F1-2	flanqueantes 1 y 2 unidas
g	unidades internacionales de intensidad del campo gravitatorio
h	hora
Jwt	cepa J salvaje (wild type)
J Δ coa	cepa J mutante en <i>coa</i>
LB	medio luria bertani
min	minuto
mL	mililitro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
TSA	medio tripticasa soja agar
TSB	caldo tripticasa soja
UFC	unidades formadoras de colonia
<i>vwb</i>	gen que codifica para la proteína de unión al factor von Willebrand
Vwbp	proteína de unión al factor von Willebrand
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido
μ L	microlitro
μ g	microgramo
$^{\circ}$ C	grados centígrados

Índice de tablas:

Tabla 1. Página: 15

Tabla 2. Página: 16

Tabla 3. Página: 24

Tabla 4. Página: 28

Índice de figuras:

Figura 1. Página: 18

Figura 2. Página: 25

Figura 3. Página: 26

Figura 4. Página: 27

Figura 5. Página: 28

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria perteneciente a la familia *Staphylococcaceae*, y dentro de esta, al género *Staphylococcus*. Los *Staphylococcus* se dividen a su vez en coagulasa positivo y coagulasa negativo. *S. aureus* es coagulasa positivo. Es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, inmóvil y no esporulado. Coloniza la piel, uñas y fosas nasales de humanos y animales. Es un patógeno oportunista, es decir, de forma normal no provoca ninguna enfermedad, pero si el hospedador sufre alguna lesión cutánea o inmunodepresión, la bacteria se multiplica e invade los tejidos, provocando más comúnmente abscesos. También puede provocar otros cuadros clínicos como neumonía, shock séptico, enteritis, meningitis, osteomielitis e intoxicaciones alimentarias.

1.2. Importancia clínica

En las últimas décadas, en medicina humana, este patógeno ha provocado numerosos problemas de infecciones secundarias en hospitales y otros centros, agravadas por las resistencias a antibióticos a causa del uso masivo de éstos desde los años 50. Una de las resistencias más importantes debido a los problemas que está causando es el *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (en inglés MRSA). Se denominan así a los *S. aureus* que adquieren resistencia a este antibiótico.

En el ámbito de la medicina veterinaria, *S. aureus* provoca numerosas pérdidas económicas. Es uno de los agentes principales de las mamitis en ganado lechero (Bergonier et al, 2003, Ózsvári et al., 2003) y de la eliminación de madres en las granjas cunícolas (Segura et al., 2007, Corpa et al, 2009), aunque afecta a prácticamente todas las especies de producción. Debido al amplio número de especies afectadas y las

elevadas resistencias a antibióticos que presentan las cepas de *S. aureus*, se están realizando numerosas investigaciones para profundizar en los mecanismos patogénicos de esta bacteria y poder diseñar tratamientos eficaces y profilaxis mediante vacunas.

1.3. Patogenia de las infecciones de *S. aureus*

Debido a que *S. aureus* es un patógeno oportunista, necesita de factores predisponentes, como se ha comentado anteriormente. Normalmente la infección empieza cuando hay una rotura de la barrera cutánea, que es la primera línea de defensa del organismo. La bacteria penetra y comienza una compleja respuesta celular (Kobayashi et al, 2015). Los neutrófilos son los primeros en llegar al sitio de la infección, y comienzan a fagocitar las bacterias y a producir moléculas para eliminarlas. A su vez, estas poseen numerosos mecanismos para evadir la respuesta inmune y en 4 días se forma alrededor de la comunidad de bacterias una capa de fibrina, formándose la pseudocápsula del absceso, que más tarde madura, haciéndose fibrosa (Cheng et al, 2011). Mientras tanto, continúa el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos. *S. aureus* provoca la lisis de estos leucocitos y la necrosis del tejido circundante, lo que da lugar a un contenido purulento (Thammavongsa et al, 2013). Una vez formado, el absceso puede romperse, con la consecuente liberación de las bacterias al torrente sanguíneo e invasión de otros órganos y tejidos (Cheng et al, 2011). En ausencia de un tratamiento antibiótico, normalmente se produce una sepsis y la muerte del individuo.

1.4. Factores de virulencia

S. aureus posee numerosos factores de virulencia, que son necesarios para su mecanismo patógeno. Pero no todos se expresan a la vez. Depende de la fase de infección en la que se encuentre, del lugar de entrada y de la respuesta inmune del hospedador.

El grupo de los MSCRAMM (Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz) facilita al *S. aureus* la adhesión al fibrinógeno, al colágeno y a la elastina entre otros. Dentro de los MSCRAMM se encuentra el ácido teicoico y el clumping factor B (Johannessen et al, 2012).

Otro grupo es el de las hemolisinas, que como su nombre indica, provoca la lisis de las células sanguíneas. Las hemolisinas, así como otros factores de virulencia como la coagulasa y la proteína A, son reguladas por *arg* (accessory gene regulator), que controla la expresión de estas proteínas. El *S. aureus* produce tres hemolisinas diferentes: α -hemolisina, β -hemolisina y δ -hemolisina. La β -hemolisina aumenta la hemólisis producida por la δ -hemolisina, mientras que inhibe la hemólisis de la α -hemolisina (Traber et al, 2008).

Otros factores de virulencia son las diferentes toxinas como la PLV (Panton–Valentine leukocidin), la α -toxina y otras citotoxinas. Las PSMs (phenol-soluble modulins) son modulinas capaces de reclutar, activar y lisar los neutrófilos (Watkins et al, 2012).

1.5. Genes implicados en la coagulación

Como se ha mencionado anteriormente, *arg* regula la expresión de unos factores de virulencia muy importantes, las coagulasas, proteínas segregadas por el *S. aureus* que son capaces de provocar la coagulación del plasma sanguíneo. Son la coagulasa (Coa) y la proteína de unión al factor de von Willebrand, en inglés von Willebrand-factor binding protein (Vwbp).

La coagulasa (Coa) es una proteína que se conoce desde hace más de 100 años. Está codificada por el gen *coa* y se expresa durante la infección. Esta proteína es muy utilizada para las pruebas diagnósticas, ya que es secretada por todas las cepas de *S. aureus* y se puede identificar fácilmente a este agente. La coagulasa se une a la protrombina

y la activa, iniciando esta la transformación del fibrinógeno en fibrina (Cheng et al, 2010). Por otra parte, la coagulasa tiene un importante efecto antigénico, como lo demuestran los estudios de Cheng y col. (2010; 2012), según los cuales se desarrolla una respuesta inmunitaria eficaz que provoca una disminución de los efectos y las lesiones. Esto lleva a pensar en su uso en una posible vacuna.

La otra coagulasa es la proteína de unión al factor Von Willebrand (Vwbp). Esta proteína se descubrió a principios de este siglo (Bjerketorp et al, 2002). Se une al factor von Willebrand y también a la protrombina, desencadenando la coagulación. Recientemente se ha descubierto que Vwbp es muy específico de hospedador, ya que el gen *vwb* tiene diferentes alelos. Además, posee islas de patogenicidad muy móviles, lo que facilita que las cepas se adapten a diferentes hospedadores (Viana et al, 2010). Por último, al igual que la coagulasa, Vwbp también es un potente antígeno y es muy importante para que el hospedador desarrolle inmunidad (Cheng et al, 2010; 2012).

Cuando se delecionan ambos genes, la bacteria es incapaz de coagular el plasma y, por tanto, no se forma la pseudocápsula del absceso y disminuye la gravedad de la infección. Pero el efecto de la coagulasa es mayor que el de Vwbp, ya que delecionando el gen *coa*, la bacteria tarda más tiempo en coagular el plasma que delecionando solo el *vwb* (Cheng et al, 2010).

1.6. Uso de un modelo cunícola

Cheng y col. (2010; 2012) realizaron los estudios en ratones, que son muy resistentes a las infecciones por *S. aureus* y es un modelo poco extrapolable a los humanos. Holtfreter y col (2013) critican que se usen cepas humanas para infectar ratones, ya que *S. aureus* es muy específico de hospedador y los resultados de esos experimentos pueden estar lejos de la realidad. Por eso defienden la necesidad de usar cepas adaptadas a los hospedadores con los que se quieren realizar las pruebas. Aislaron

una cepa adaptada a los ratones y compararon la capacidad de infección de esta con la de una cepa adaptada a los humanos. Vieron que la cepa humana era incapaz de infectar a los ratones y la cepa adaptada sí los infectaba.

En conclusión, es necesario usar un modelo adaptado a las cepas a estudiar para entender mejor la patogenia del *S. aureus*. Recientemente se han realizado estudios en conejos (Malachowa et al, 2015), cuyo perfil de infección es muy semejante al humano, es una especie fácil de manejar, barata y que muestra rápidamente las lesiones. Por último, se ha descubierto que la cepa adaptada a los conejos solo se diferencia de la adaptada a los humanos en un único nucleótido (Viana et al, 2015).

2. OBJETIVOS

Staphylococcus aureus es un patógeno muy importante en medicina veterinaria y medicina humana. La coagulasa se ha mostrado esencial en la patogenia de esta enfermedad en algunos modelos animales y se ha demostrado que tiene un gran papel en la respuesta inmunitaria. Además, el conejo es una especie muy interesante a estudiar porque es un hospedador natural de *S. aureus*. Por todo esto, el objetivo de este trabajo es el siguiente:

La caracterización del papel de la coagulasa (Coa) de *S. aureus* en el conejo, mediante la delección del gen *coa* que codifica para esta proteína y compararlo con la cepa salvaje.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cepas, plásmidos, cebadores y medios utilizados.

Las cepas que se emplearon son las especificadas en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Cepas empleadas en este trabajo y sus características.

Cepa	Nombre real	Especie	Descripción	Referencia
CEU 199	Jwt	<i>S. aureus</i>	Cepa salvaje	Viana et al, 2015
CEU 67	RN4220	<i>S. aureus</i>	Acepta ADN de <i>E. coli</i>	Kreiswirth et al, 1983
CEU 384	JΔcoa	<i>S. aureus</i>	Mutante en Coagulasa	Este trabajo
CEU 69	DH5 α	<i>Escherichia coli</i>	Cepa de laboratorio	Sambrook et al, 1989
CEU 348	DH5 α + pMAD	<i>Escherichia coli</i>	Cepa anterior con el plásmido pMAD.	Arnaud et al, 2004

Los medios que se utilizaron son el TSB (Tryptic Soy Broth), normalmente para cultivar *S. aureus* en líquido; el TSA (Tryptic Soy Agar), para cultivar *S. aureus* en placa; el LB agar (Luria-Bertani Agar), para cultivar *E.coli* en placa y el caldo LB (Luria-Bertani Broth) para cultivar *E.coli* en líquido. Se añadieron en determinados pasos los antibióticos eritromicina (20 µg/mL o 2,5 µg/mL) con citrato (para *S. aureus*), ampicilina (100 µg/mL) (para *E.coli*) y el producto X-gal (20 mg/mL) (Roche).

Se cultivaron todas las cepas a 37°C excepto la CEU 348 que se cultivó a 32°C y se generó un stock de cada una que se guardó a -80°C.

Los cebadores se diseñaron a partir de las bases de datos de genes. Se buscó la secuencia de *coa* y con un programa se determinó la secuencia a emplear para cada cebador. Se necesitaron 6 cebadores (Tabla 2).

Tabla 2. Lista de cebadores utilizados en este estudio. Las letras mayúsculas son las secuencias añadidas para que la enzima de corte reconozca el sitio de unión.

Nombre	Utilización	Secuencia
Coa-11m	Comprobar por PCR f-f los mutantes del gen coa en ST121	catacttcgatcgttctataag
Coa-12c	Comprobar por PCR f-f los mutantes del gen coa en ST121	ttgcatctattaaagaagtagg
Coa-5mB	Delecionar gen de coa en ST121	CGCGGATCCtcatgacgatacttccagagg
Coa-6c	Delecionar gen de coa en ST121	cccaatctacattaaagaaac
Coa-7m	Delecionar gen de coa en ST121	ggtaattacattttggaggaaaactctatccataga catacag
Coa-8cE	Delecionar gen de coa en ST121	CCGGAATTCgtacgaatgtgaatggtggc

3.2. Realización del mutante

En este trabajo se obtuvo un mutante en el gen *coa* mediante delección, con la ayuda del plásmido pMAD, que permite realizar delecciones por recombinación homóloga. Para ello se insertó el plásmido con la secuencia sin el gen *coa* en una cepa de *E. coli*, posteriormente en la cepa de *S. aureus* RN4220 y por último en la cepa Jwt, donde se produjo la recombinación. El proceso completo y detallado se explica a continuación.

I. Purificación del ADN genómico.

La purificación del ADN genómico es el primer paso de la mutagénesis. Se partió de una cepa salvaje de *S. aureus* aislada de mastitis de conejo (Jwt -CEU 199-), que se sembró en triple estría en una placa petri de TSA y se dejó 24 h a 37°C. Después se inoculó una colonia aislada en un tubo estéril con medio TSB y se dejó crecer a 37°C durante 24 horas en agitación. El ADN cromosómico de *S. aureus* se extrajo mediante el kit "Genelute Bacteril Genomic DNA" (Sigma), siguiendo el protocolo del fabricante y se conservó a -20°C.

II. Extracción de plásmido.

El ADN plasmídico se extrajo de la cepa *E. coli* DH5 α + pMAD (CEU 348), que contiene el plásmido. Este contiene un origen de replicación para bacterias Gram-negativas y otro origen de replicación termosensible para bacterias Gram-positivas. Además contiene un gen que proporciona resistencia a eritromicina y un gen que codifica para la enzima β -galactosidasa, que produce un metabolito de color azul al metabolizar la sustancia X-gal (Arnaud et al, 2004). Se usó esta cepa porque produce gran cantidad de plásmido (Sambrook et al, 1989).

Primero se sembró el stock de esta cepa en triple estría en una placa de LB con ampicilina. Se dejó 24 horas a 37°C y después se sembró una colonia aislada en un tubo estéril con LB y ampicilina. Se dejó creciendo a 37°C toda la noche en agitación. Posteriormente se extrajo el plásmido utilizando el kit “Genelute plasmad miniprep” (Sigma) siguiendo las indicaciones del fabricante. El plásmido purificado se conservó a -20°C.

III. Amplificación de las flanqueantes mediante PCR

Para eliminar el gen de la coagulasa es necesario obtener las dos flanqueantes de este gen y después unir ambas de forma que se obtenga una secuencia sin el gen. Para ello, se realizó una PCR por cada flanqueante en un termociclador, que previamente se programó según los cebadores utilizados (coa-5mB y coa-6c para la primera flanqueante y coa-7m y coa-8ce para la segunda flanqueante) (Figura 1). Posteriormente se unieron las flanqueantes mediante una “doble PCR”, utilizando los cebadores coa-5mB y coa-8ce. Este fragmento se denominó F1-2 y se comprobó con una electroforesis que tuviera el tamaño adecuado, es decir, la suma de los tamaños de las dos flanqueantes.

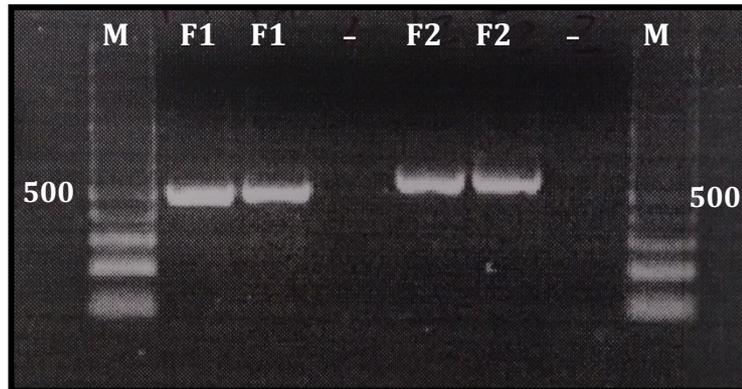


Figura 1. A ambos lados se observa el marcador de 100 pb. Las bandas de la izquierda corresponden a la flanquante 1 y las de la derecha a la flanquante 2, con sus respectivos negativos.

IV. Clonaje de las flanqueantes y plásmido

Después se debe insertar F1-2 en el plásmido. Para ello, es necesario cortar los extremos de F1-2 y del plásmido de forma que sean complementarios. Estos se digirieron con los enzimas de restricción *BamH1* y *EcoR1* y la siguiente mezcla: 16,4 μ l de agua bidestilada, 3 μ l de Buffer B, 0,3 μ l de la enzima *BamH1*, 0,3 μ l de la enzima *EcoR1* y 10 μ l de F1-2. Se dejó 1,5 h en el baño de 37°C. Después, mediante electroforesis se comprobó la correcta digestión, es decir, que no hubiera degradación del ADN ni sobredigestión, que no hubiera cambio del tamaño de las bandas (solo se eliminaron unas pocas bases) y la intensidad de las bandas para saber las cantidades aproximadas de plásmido.

Para insertar F1-2 en el plásmido se utilizó la T4-DNA ligasa (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las ligaciones se realizaron a 16°C durante 2 h. Así se obtuvo el plásmido pMAD con F1-2.

V. Transformación en *E. coli*.

Una vez obtenido el vector pMAD con las flanqueantes clonadas para realizar la mutagénesis, se transformó en *Escherichia coli*, en concreto la cepa DH5 α (CEU 69). Esta cepa está modificada en el laboratorio, tiene

gran capacidad de adquirir genoma extraño y además permite gran replicación del plásmido (se necesita una gran cantidad de plásmido para poder transformar posteriormente en *S. aureus*). Antes de transformar es necesario preparar la cepa *E. coli* DH5 α para la adquisición de ADN externo (“células competentes”):

Se sembró *E. coli* DH5 α (CEU 69) en triple estría en LB agar y se dejó crecer 24 h a 37°C. A partir de una colonia aislada se inoculó 10 mL de caldo LB y se crecieron durante toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente, se añadieron 2 mL de este cultivo a 20 mL de caldo LB y se dejó crecer en agitación a 37°C hasta DO₆₀₀ entre 0,3 - 0,4. Se enfriaron rápidamente en baño de hielo y se centrifugaron 10 min a 3500 rpm a 4°C. El pellet se resuspendió en solución salina fría y se mantuvo 45 min en hielo. Posteriormente, se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron con solución salina complementada con glicerol al 75%. Las alícuotas se guardaron en eppendorfs de 200 μ l a -80°C.

Posteriormente se descongeló una alícuota (200 μ l) de células competentes lentamente en hielo y se añadió el plásmido purificado, incubando durante 30 min en hielo. A continuación se provocó un choque térmico, que consistió en pasar la muestra bruscamente a baño de 55°C, incubar 90 s y enfriar de nuevo rápidamente en el hielo. Así se generan microporos en las células, lo que permite la introducción de ADN exógeno (transformación) de forma eficiente. Después se resuspendieron las células en 600 μ l de LB, se incubaron 1 hora a 37°C en agitación y se sembraron en placas de LB con ampicilina. Se dejaron 24-48 horas en estufa de 37°C.

Por último se extrajo el plásmido mediante el kit “Genelute plasmad miniprep” (Sigma) siguiendo las indicaciones del fabricante. El plásmido purificado se comprobó mediante electroforesis y se conservó a -20°C.

VI. Transformación en *S. aureus*.

El siguiente paso fue la transformación en *S. aureus*. La transformación de especies Gram-positivas con ADN extraño tiene gran dificultad debido a las características de su pared celular. Por tanto es necesario recurrir a la electroporación como método de transformación para *S. aureus*.

Primero se prepararon las células competentes. Se utilizó la cepa RN4220 (CEU 67), ya que es fácilmente transformable porque tiene mutados los sitios de restricción. Se realizó una dilución 1/50 a partir de un cultivo en 50 mL de medio LB y se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO₅₄₀ de 0,2. Las bacterias se enfriaron 10 minutos en hielo y se centrifugaron después a 3.000 rpm durante 10 min a 4°C. Posteriormente se lavaron 2 veces con 10 mL de sacarosa 0,5 M fría y finalmente se resuspendieron las células con 1 mL de sacarosa fría, dejándolas en hielo durante 20 min. Por último, se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en 0,5 mL de sacarosa 0,5 M fría.

Para la electroporación se utilizaron cubetas de electroporación de 0,1 cm (Bio-Rad) en las que se mezclaron 50 µl de bacterias competentes con 10µl del plásmido resuspendido en H₂O bidestilada para evitar el riesgo de arco eléctrico. Se utilizó un electroporador Bio-Rad (modelo Gene Pulser II) junto con la unidad Pulse Controller Plus, en el que se seleccionó 2,5 Kv de voltaje, 25 µF de capacitancia y la resistencia a 100Ω.

Inmediatamente después del pulso se añadieron 0,6 mL de TSB. Tras un tiempo de recuperación (1 h a 37°C en agitación), el cultivo se sembró en placas de TSA con eritromicina más citrato.

Una vez transformada la cepa RN4220, se extrajo el plásmido de esta y se transformó en la cepa Jwt (CEU 199) siguiendo el mismo protocolo anterior.

VII. Recombinación

La recombinación es el proceso por el cual un fragmento de ADN se inserta en algún punto de otra cadena de AND. En este caso, se quiso insertar el fragmento F1-2 contenido en el plásmido en la cepa Jwt (CEU 199). Se creció esta cepa previamente transformada con el plásmido pMAD más F1-2 a 37°C en TSB durante toda la noche y se sembraron diluciones del cultivo en fase estacionaria en TSA conteniendo eritromicina, citrato y X-gal a 44°C (temperatura restrictiva). Debido a que el plásmido no puede replicarse a 44°C, las colonias que crecieron en eritromicina correspondían a las bacterias donde se había producido integración del plásmido en el cromosoma bacteriano por recombinación homóloga de alguno de los dos fragmentos flanqueantes (primera recombinación). Se picaron algunas de estas colonias y se sembraron en TSB sin antibiótico, se sembraron diluciones del cultivo estacionario en TSA a 44°C (temperatura restrictiva) conteniendo X-gal y se seleccionaron aquellas colonias que eran blancas, ya que habían perdido el plásmido en la segunda recombinación (el plásmido es el responsable del cambio de color). Finalmente se comprobó que se había producido el genotipo deseado (mutante por delección del gen *coa*) mediante una PCR con cebadores (*coa*-11m y *coa*-12c) flanqueantes a la delección (PCR “fuera-fuera”).

3.3. Caracterización *in vitro* del mutante.

Curva de crecimiento:

Esta prueba se realizó midiendo la absorbancia con una DO_{600} de cultivos de la cepa salvaje (Jwt –CEU 199-) y mutante en coagulasa ($J\Delta$ coa –CEU 384-) en TSB a 37°C en agitación cada media hora durante 7 horas. Para ello se sembraron 5 colonias aisladas de la cepa Jwt y de la cepa $J\Delta$ coa en 20 mL de TSB. El experimento se realizó por triplicado.

Prueba de hemólisis:

Se sembró en agar Columbia una colonia aislada de la cepa RN4220 (CEU 67) formando una línea en el centro de la placa. A continuación se sembraron dos cepas de Jwt (CEU 199) y dos de $J\Delta$ coa (CEU 384) formando líneas perpendiculares a la RN4220 pero sin que se toquen unas con otras (Figura 1) (Traber et al, 2008). Se dejó crecer 24 horas a 37°C.

Coagulación de plasma de conejo:

Se extrajo sangre de 3 conejos diferentes con EDTA, se mezclaron y se extrajo el plasma, centrifugando a 1000 g durante 10 min. En 5 tubos diferentes se añadieron 300 μ l de este plasma. A dos tubos se les añadió un inóculo de Jwt (CEU 199), a otros dos un inóculo de $J\Delta$ coa (CEU 384) y el quinto tubo se utilizó como control negativo, al cual se le añadió únicamente el plasma. Estos inóculos, que contenían 10^8 ufc, se obtuvieron mediante la siembra durante toda la noche de las dos cepas, Jwt y $J\Delta$ coa, que posteriormente se centrifugaron 20 min a 4000 rpm, se resuspendieron en 500 μ l de TSB, se midió la absorbancia y se calculó el volumen necesario para esa cantidad de bacterias (Concentración = $DO_{600} \times 4,9 \times 10^9$). La mezcla se cultivó durante 4 horas a 37°C y cada media hora se comprobó si había coagulación volteando ligeramente los tubos.

Supervivencia en sangre de conejo:

Primero se cultivó una colonia de Jwt (CEU 199) y una de JΔcoa (CEU 384) durante toda la noche a 37°C en 10 mL de TSB. Estos cultivos se diluyeron a 1:100 en 3 mL de TSB y se crecieron hasta una $DO_{600} = 0,8$. Posteriormente se centrifugaron los cultivos 20 minutos a 4000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en TSB, dejando el cultivo a una concentración de 4×10^5 ufc/mL (Concentración = $DO_{600} \times 4,9 \times 10^9$). A continuación, en 9 eppendorfs (4 por cada cepa más el control negativo), se mezclaron 25 µl de esta dilución con 75 µl de sangre entera extraída con heparina. Por último, se incubaron a 37°C durante 3 h con agitación suave. El número de bacterias supervivientes se determinó a tiempo 0, 1 h, 2 h y 3 h mediante la siembra de los cultivos puros y diluidos a 1:100. Además se comprobó el inóculo mediante la siembra de este, a dos diluciones diferentes (1:100 y 1:1000), en placas de TSA. También se sembró la sangre en TSA para comprobar que era negativa.

4. RESULTADOS

Curva de crecimiento:

Esta prueba se realizó para comparar el crecimiento de ambas cepas en un medio sin restricciones y con las mismas condiciones.

Los datos de las absorbancias se introdujeron en un fichero Excel y se realizó la media de las 3 absorbancias obtenidas en cada tiempo de cada cepa. En la *Tabla 3* se muestran estas medias. En la *Figura 2* aparece representada la curva de crecimiento de ambas cepas a partir de las absorbancias obtenidas. Se observa un crecimiento mayor de la cepa mutante que de la salvaje.

Tabla 3. Absorbancias a DO_{600} de las dos cepas estudiadas. El símbolo \pm indica la desviación estándar.

Tiempo (h)	ABSORBANCIAS	
	Jwt	JΔCoa
0	0,0040±0,0017	0,0067±0,0015
0,5	0,0037±0,0012	0,0053±0,0021
1	0,0047±0,0012	0,0060±0,0010
1,5	0,0060±0,0030	0,0063±0,0006
2	0,0050±0,0017	0,0057±0,0015
2,5	0,0043±0,0015	0,0067±0,0021
3	0,0060±0,0020	0,0090±0,0010
3,5	0,0060±0,0026	0,0120±0,0026
4	0,0060±0,0020	0,0180±0,0026
4,5	0,0077±0,0025	0,0420±0,0060
5	0,0107±0,0050	0,0707±0,0130
5,5	0,0167±0,0091	0,1303±0,0268
6	0,0307±0,0153	0,2383±0,0552
6,5	0,0497±0,0272	0,3963±0,0847
7	0,1007±0,0574	0,6257±0,0905

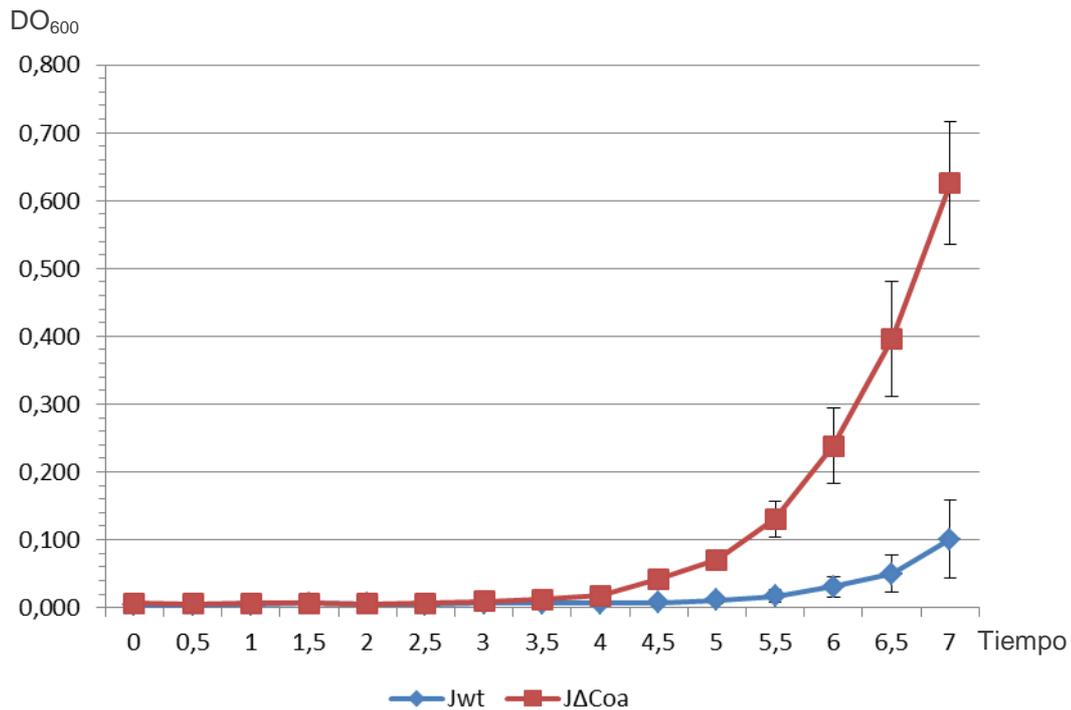


Figura 2. Representación gráfica del crecimiento de ambas cepas. Las líneas verticales representan la desviación estándar.

Prueba de hemólisis:

Esta prueba se realizó para conocer si había algún cambio en la hemólisis al eliminar el gen de *coa*. Debido a que la cepa RN4220 solo produce la hemolisina β , mediante esta prueba se puede conocer el tipo de hemólisis de las cepas estudiadas y, por tanto, las hemolisinas que producen.

En la *Figura 3* se observa la placa de agar con las colonias y los halos de hemólisis a su alrededor después de 24 horas. Pude verse que la hemólisis de Jwt difiere de la producida por JΔ*coa*. La cepa Jwt produjo las tres hemolisinas porque hay una hemólisis completa y homogénea en toda la estría, mientras que la cepa JΔ*coa* produjo una hemólisis parcial homogénea, lo que indica que produjo solo la hemolisina β .

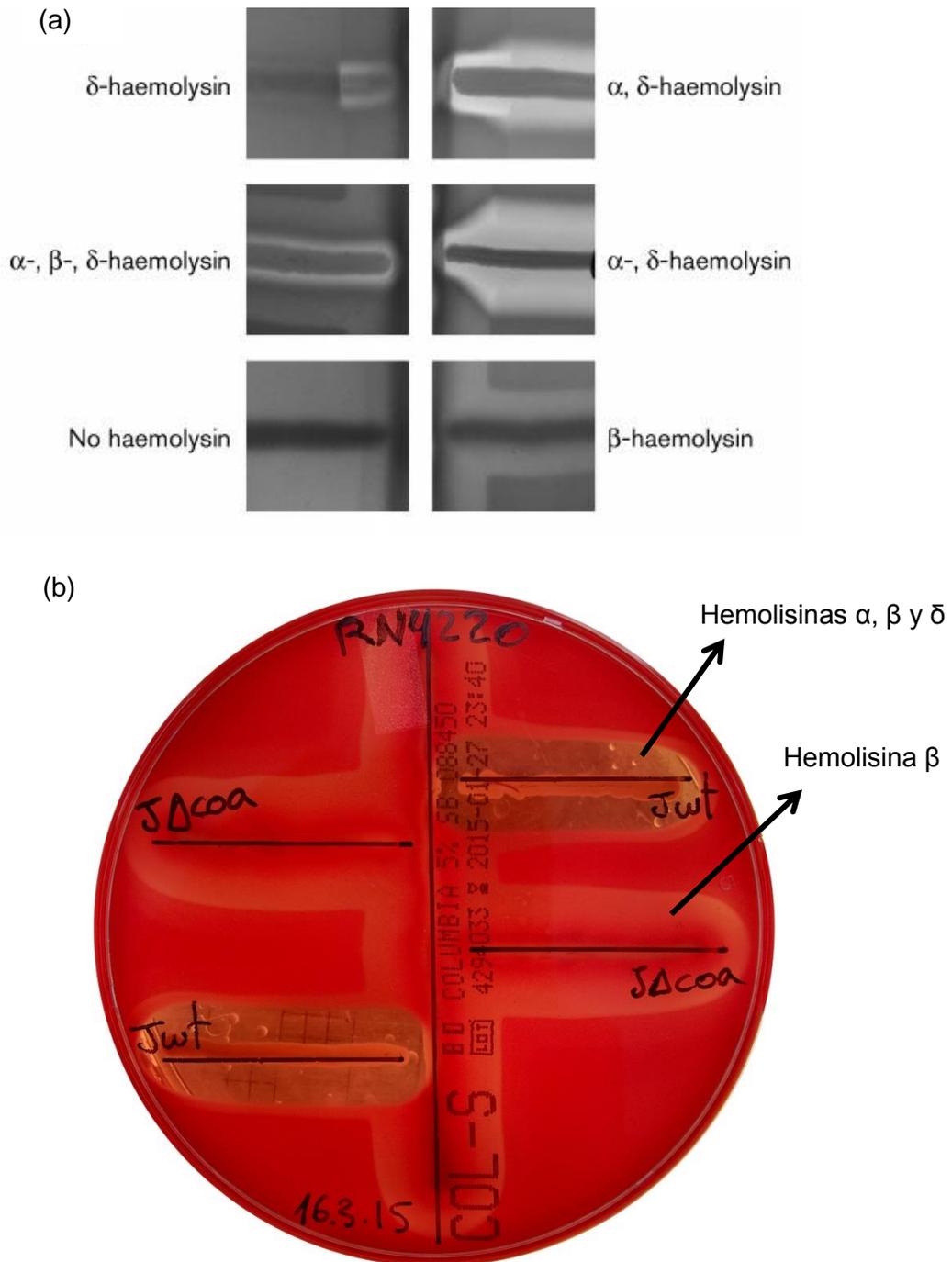


Figura 3. a) Tipos de hemólisis producidas por las diferentes hemolisinas. Obtenido de Traber y col, 2008. b) Hemólisis producida por las cepas en estudio.

Coagulación de plasma de conejo:

Esta prueba se realizó para saber qué efecto directo tenía el gen *coa* sobre el plasma del conejo.

Se comprobó la presencia de coágulo cada media hora, pero no se produjo coagulación aparente en las 4 primeras horas en ninguno de los tubos. Por tanto, se dejó cultivando toda la noche en las mismas condiciones. Transcurridas 12 h se comprobó que la cepa Jw_t había producido una coagulación importante del plasma, mientras que la cepa J Δ coa prácticamente no había producido coagulación (Figura 4). Por tanto, hay una diferencia significativa entre ambas cepas y un efecto importante de la coagulasa.

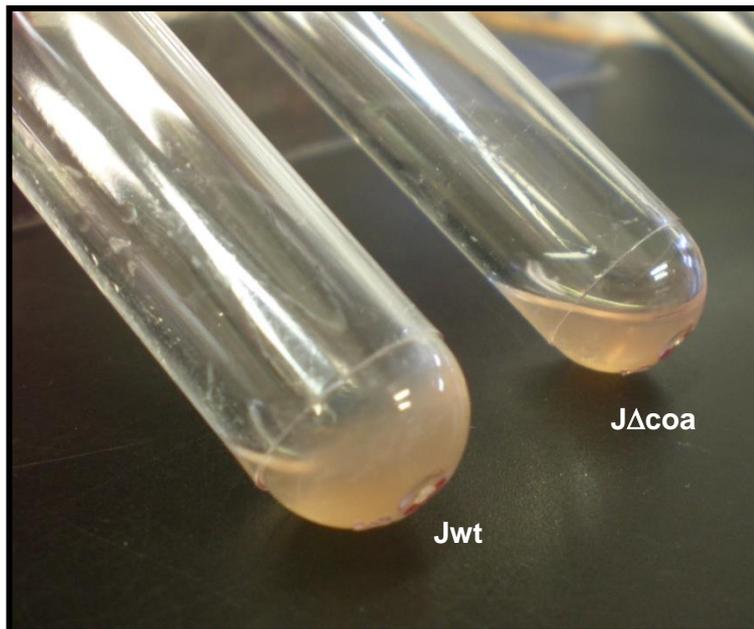


Figura 4. El tubo de la izquierda corresponde a la cepa Jw_t y el tubo de la derecha corresponde a J Δ coa.

Supervivencia en sangre de conejo:

Esta prueba se realizó para valorar la capacidad de evasión de la respuesta innata de las bacterias, cultivadas en sangre entera de conejo.

A las 24 horas se hizo el recuento de unidades formadoras de colonia de cada placa, de cada cepa y de cada tiempo (Tabla 4). En la *Figura 5* aparece representado el crecimiento de ambas cepas en la sangre.

A las 0 horas, es decir, inmediatamente después de sembrar el inóculo, hay una cantidad de bacterias determinada. Durante la primera hora se produce un aumento del número de bacterias. A las 2 horas vuelve a disminuir y a las 3 horas se produce un crecimiento exponencial, siendo imposible realizar el recuento.

Tabla 4. Ufc/mL de ambos cultivos en sangre de conejo.

	RECuento DE UFC/100µL EN SANGRE DE CONEJO	
	Jwt	JΔcoa
0 horas	2052	3048
1 hora	5048	8820
2 horas	1504	852
3 horas	Incontable	Incontable

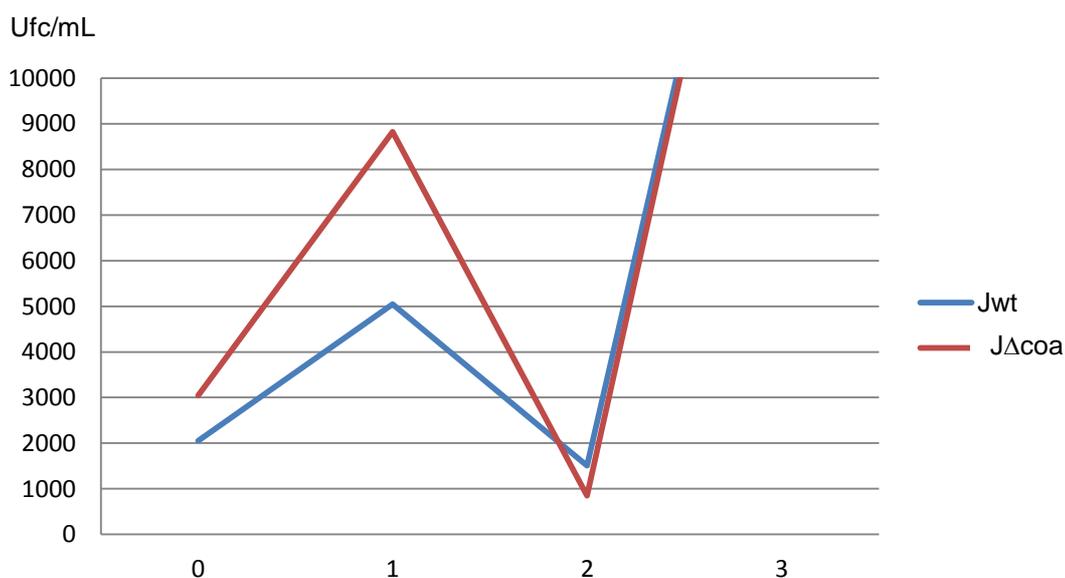


Figura 5. Representación del crecimiento obtenido en el cultivo con sangre de conejo.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo el objetivo fue determinar el efecto de la Coagulasa en un modelo cunícola. Para ello se realizaron 4 ensayos con dos cepas diferentes, la Jwt y una cepa mutada sin el gen *coa*. Se ha observado una diferencia importante entre las dos cepas en los resultados de los ensayos.

En estudios con ratones (Cheng et al, 2010; McAdow et al, 2012) se ha demostrado que las coagulasas son necesarias para la formación de los abscesos, ya que si la bacteria carece de ambas coagulasas, no se produce la coagulación del plasma. Si solo tiene una, el efecto es intermedio, siendo más efectiva la Coagulasa que el Vwbp. Aunque como se ha comentado anteriormente, el modelo de ratón tiene diversos inconvenientes. Por ello, este estudio se basa en un modelo cunícola.

Es muy importante conocer que también hay diferencias cuando se realiza el estudio en conejos, ya que es un hospedador natural y los resultados son más representativos de lo que pasa en la realidad.

En el ensayo de la curva de crecimiento se obtuvo un crecimiento mayor de la cepa mutante. Si las condiciones fueron las mismas y la cantidad de bacterias inicial también, se puede pensar que el motivo de esta diferencia sea la Coagulasa. Puede deberse a que cepa mutante no invierte energía en producir la Coa y dispone de mayor cantidad para multiplicarse. Sin embargo, es necesario repetir el ensayo cambiando las condiciones, el número de bacterias inicial, el medio utilizado y realizando estudios estadísticos.

En la prueba de la hemólisis también apareció diferencia entre la cepa salvaje (Jwt) y la mutante (J Δ coa). Esto puede ser debido a que exista una regulación inversa entre la Coa y *agr*. Este regula tanto la expresión de *coa* como la producción de hemolisinas. A mayor expresión de *agr*, menor expresión de coagulasa (Lebeau et al, 1994). Al desaparecer el

gen *coa* y por tanto la existencia de *Coa*, puede ser que la expresión de *agr* cambie y por tanto, cambie el tipo de hemólisis producida. Esto es un hecho importante, ya que si es así, eliminando la *Coa* no solo se consigue evitar la aparición de abscesos sino también otro factor de virulencia como son las hemolisinas.

La prueba de coagulación del plasma de conejo mostró también diferencias entre las dos cepas, ya que *Jwt* había provocado la coagulación y *JΔcoa* prácticamente no lo había hecho. Pero no se sabe con certeza cuántas horas tardó en coagular la cepa salvaje (*Jwt*) y tampoco se sabe si el plasma con la cepa mutante hubiera coagulado horas más tarde. Por ello es necesario repetir esta prueba con diferente cantidad de bacterias, dejando más tiempo y supervisando continuamente. En los ensayos de Cheng y col. (2010) con sangre de ratón, el mutante en coagulasa tardó 36 horas en producir la coagulación, mientras que la cepa salvaje lo hizo en menos de 12 horas. Debido a la existencia de otra coagulasa, el *Vwbp*, se entiende que el plasma coagule en ausencia de *Coa*, aunque en este ensayo lo hace en mucha menor medida.

Los resultados de la prueba de supervivencia en sangre no muestran una diferencia clara en el crecimiento de ambas cepas. Y el crecimiento no ha sido paralelo al obtenido en el ensayo de la curva de crecimiento. Esto puede deberse a que es un medio diferente y el crecimiento bacteriano se ve afectado por los componentes de la sangre. En el momento de inoculación de las bacterias hubo un crecimiento rápido porque la respuesta innata no estaba organizada y habría tardado en empezar a actuar. Posteriormente, esta respuesta innata fue eliminando gran parte de las bacterias, hasta que finalmente las células sanguíneas murieron y la bacteria se multiplicó exponencialmente en ausencia de restricciones. No se ha encontrado ningún estudio que reporte el crecimiento de estas cepas y por tanto, no se puede comparar, pero se esperaba que la cepa salvaje creciera más en sangre que la mutante, porque en este caso,

tener Coa implica una ventaja. Sin embargo, es necesario repetir también este experimento para poder obtener unos resultados más fiables.

Además de continuar haciendo pruebas con el mutante en *coa*, es necesario crear un mutante de *vwb* y un doble mutante y realizar más pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* para profundizar en la función que desarrollan estos genes en el conejo y determinar el efecto de su delección.

También sería interesante investigar sobre la relación existente entre la Coa y las hemolisinas, por ser ambos factores de virulencia muy importantes en las infecciones por *S. aureus*.

6. CONCLUSIONES

El objetivo del trabajo era conocer el efecto que tenían las coagulasas en el conejo, y después de realizar los diferentes ensayos y valorar sus resultados, se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. En la curva de crecimiento, en la prueba de hemólisis y en la prueba de coagulación se ha comprobado que la cepa mutante en Coa tiene diferente comportamiento que la cepa salvaje.
2. El crecimiento de las bacterias depende del medio y las condiciones en las que se desarrollen.
3. El mutante tiene una ventaja en un medio sin restricciones, mientras que en un medio hostil (sangre), no parece que se vea afectado.
4. La Coa tiene un efecto evidente en la coagulación del plasma sanguíneo.
5. La delección del gen *coa* tiene efectos sobre la expresión de las hemolisinas.
6. Es necesario seguir realizando pruebas y repetirlas, además de generar el mutante en *vwb* y el doble mutante para conocer exactamente el efecto de las coagulasas en el conejo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Arnaud M, Chastanet A, Débarbouillé M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Applied and environmental microbiology* 2004; 70(11): 6887-6891.
- Bergonier D, de Cremoux R., Rupp, R., Lagriffoul, G. y Berthelot, X. Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research* 2003; 34: 689-716.
- Bjerketorp J, Nilsson M, Ljungh Å, Flock JI, Jacobsson K and Frykberg L. A novel von Willebrand factor binding protein expressed by *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 2002; 148(7): 2037-2044.
- Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T, Missiakas DM, and Schneewind O. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. *PLoS pathogens*, 2010; 6(8).
- Cheng AG et al. A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. *Trends Microbiology* 2011; 19(5): 225-232.
- Corpa JM, Hermans K and Haesebrouck, F. Main Pathologies associated with *Staphylococcus aureus* infections in rabbits: a review. *World Rabbit Science* 2009; 17: 1-11.
- Holtfreter S, Radcliff FJ, Grumann D, Read H, Johnson S, Monecke, S et al. Characterization of a mouse-adapted *Staphylococcus aureus* strain. *PloS one*, 2013; 8(9).
- Johannessen M, Sollid JE and Hanssen AM. Host-and microbe determinants that may influence the success of *S. aureus* colonization. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2012; 2.

- Kobayashi SD, Malachowa N and DeLeo FR. Infectious disease theme issue: Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Abscesses. American Journal of Pathology, 2015; 185(6): 1518-1527.
- Lebeau C, Vandenesch F, Greenland T, Novick RP and Etienne J. Coagulase expression in *Staphylococcus aureus* is positively and negatively modulated by an agr-dependent mechanism. Journal of bacteriology, 1994; 176(17): 5534-5536.
- Malachowa N, Kobayashi SD, Sturdevant DE, Scott DP and DeLeo F. Insights into the *Staphylococcus aureus*-Host Interface: Global changes in host and pathogen gene expression in a rabbit skin infection model. PLoS ONE 2015; 10(2).
- McAdow M, DeDent AC, Emolo C, Cheng AG, Kreiswirth BN, Missiakas DM and Schneewind O. Coagulases as determinants of protective immune responses against *Staphylococcus aureus*. Infection and immunity 2012; 80(10): 3389-3398.
- Ózsvári L, Fux A, Illés BC and Bíró O. The quantification of the economical losses caused by *Staphylococcus aureus* in a large-scale Holstein-Friesian dairy cattle farm. Magyar Állatorvosok Lapja 2003; 125: 579-584.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. NY: Cold Spring Harbor. 1989
- Segura P, Martinez J, Peris B, Selva L, Viana D, Corpa JM et al. Staphylococcal infections in rabbit does on two industrial farms. Veterinary Record 2007; 160: 869-873.
- Thammavongsa V, Missiakas DM and Schneewind O. *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. Science, 2013; 342(6160): 863-866.

- Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsin B and Novick RP. *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology* 2008; 154: 2265-2274.
- Viana, D. Estafilococia en conejos: relación entre genotipos, virulencia y lesiones (Tesis de Doctorado). Moncada, Valencia: Universidad CEU-Cardenal Herrera. Facultad de Veterinaria; 2009.
- Viana D, Blanco J, Tormo-Más MÁ, Selva L, Guinane CM, Baselga R, et al. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. *Molecular microbiology*, 2010; 77(6): 1583-1594.
- Viana D, Comos M, McAdam PR, Ward MJ, Selva L, Guinane C et al. A single natural nucleotide mutation alters bacterial pathogen host tropism. *Nature genetics*, 2015; 47(4): 361-366.
- Watkins RR, David MZ and Salata RA. Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of medical microbiology*, 2012; 61(9): 1179-1193.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Juan Manuel Corpa que pensara en mí para unirme a ellos en su proyecto de investigación, a partir del cual he desarrollado este trabajo.

Quiero agradecer a David Viana el tiempo y los conocimientos que ha compartido conmigo, y también la ayuda y la paciencia.

También quiero agradecer a mi compañera de laboratorio, Susi, su inestimable ayuda en el laboratorio, su simpatía y su compañía.

No quiero olvidarme de todos los que están conmigo pase lo que pase, mis padres, mi hermano, mi familia y mis amigos, que me han apoyado siempre y en todo.

Por último, y no menos importante, quiero agradecer a Vicent todo lo que ha hecho por mí, por aguantarme en los peores momentos, comprenderme, apoyarme y quererme durante estos 5 años de esta maravillosa carrera.