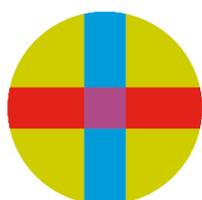


**Universidad CEU Cardenal Herrera**

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



**CEU**

*Universidad  
Cardenal Herrera*

Mecanismos de adaptación al  
hospedador de *Staphylococcus aureus*:  
Una aproximación desde la  
secuenciación de genomas

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Dña. María Amparo Comos Carrión

Dirigida por: Dr. D. José R. Penadés Casanova

Dr. D. David Viana Martín

VALENCIA

2015



Este trabajo ha sido realizado gracias a las ayudas de:

- Programa Consolider-Ingenio. Ministerio de Ciencia e Innovación. CSD2009-00006.
- Programa Eranet-pathogenomics. Ministerio de Ciencia e Innovación. PIM2010EPA-00606.
- Ministerio de Ciencia e Innovación. BIO2011-30503-C02-01.



## ABREVIATURAS

---



---

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

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

# ÍNDICE

---



## ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.1. Importancia clínica	1
1.1.2. Clasificación filogenética	2
1.2. Localización de los genes relacionados con adaptación al hospedador	3
1.2.1. Bacteriófagos	4
1.2.2. Islas de patogenicidad	5
1.2.3. Cromosoma bacteriano	6
1.3. Hospedadores	8
1.3.1. <i>S. aureus</i> en conejos	9
1.3.2. <i>S. aureus</i> en ovejas	11
1.4. Pared bacteriana	13
1.5. Evolución de <i>S. aureus</i>	16
1.5.1. Epigenética	18
2. Objetivos	23
3. Material y métodos	27
3.1. Bacterias, plásmidos y medios utilizados en este estudio	27
3.2. Métodos de biología molecular	31
3.2.1. Extracción del ADN genómico	31
3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa	31
3.2.3. Mutagénesis por recombinación	34
3.2.4. Transformación de <i>E. coli</i>	36
3.2.4.1. Preparación de células competentes por el método del CaCl <sub>2</sub>	36
3.2.4.2. Transformación por choque térmico	37
3.2.5. Electroporación de <i>S. aureus</i> .	37
3.2.5.1. Preparación de <i>S. aureus</i> electrocompetentes	37
3.2.5.2. Condiciones de electroporación	37
3.2.6. Extracción de plásmido	38
3.2.7. Movilización de plásmidos entre cepas	38
3.2.7.1. Inducción de cepas	38
3.2.7.2. Infección de cepas	38
3.2.7.3. Transducción de cepas	38
3.2.8. Selección de los mutantes	39
3.2.9. Tipado por MLST (MultiLocus Sequence Typing)	39
3.2.10. Secuenciación de los productos de PCR	39
3.2.11. Purificación y precipitación del ADN para secuenciación en masa	39
3.3. Secuenciación genómica	40
3.3.1. Secuenciación de la cepa IVIA-1	40
3.3.2. Análisis computacional de IVIA-1	40
3.4. Selección de las cepas ST121	40
3.4.1. Secuenciación de las cepas ST121	41
3.4.2. Análisis computacional	41
3.4.3. Análisis bayesianos evolutivos	42
3.4.4. Análisis estadísticos	42

3.5. Infección animal.....	42
3.5.1. Preparación del inóculo.....	42
3.5.1.1. Preparación del inóculo.....	42
3.5.1.2. Infección intradérmica en conejo.....	43
3.5.1.3. Examen macroscópico e histológico de las lesiones.....	43
3.5.2. Infección en ovejas.....	43
3.5.2.1. Preparación del inóculo para ovejas.....	43
3.5.2.2. Infección en glándula mamaria de oveja.....	44
3.5.2.3. Muestreo de leche de oveja.....	44
3.5.2.4. Infecciones 2ª a 7ª de ovejas.....	44
3.5.2.5. Pases de cepas humanas y ovinas en el laboratorio.....	45
3.5.2.6. Experimentos de tasa de crecimiento.....	45
3.5.2.7. Coinfección de cepas humanas y ovinas.....	45
3.5.3. Comprobación de las cepas.....	45
3.6. Estudio de los cambios fenotípicos en los mutantes DltB.....	46
3.6.1. Resistencia a Nisina.....	46
3.6.2. Análisis de la composición aminoacídica de la pared bacteriana.....	46
3.6.3. Análisis de la pared bacteriana.....	46
3.6.4. Western blot.....	47
3.6.5. Supervivencia en sangre.....	47
4. Resultados.....	51
4.1 Estudio del mecanismo de adaptación de <i>S. aureus</i> a conejo.....	51
4.1.1. Secuenciación de cepas ST121 humanas y de conejo.....	51
4.1.2. Relación evolutiva entre las cepas ST121 humanas y de conejo.....	51
4.1.3. Elementos genéticos móviles en la adaptación a conejo.....	53
4.1.4. Distintos genes según el hospedador.....	56
4.1.5. Infectividad de las cepas ST121 en conejo.....	63
4.1.6. Estudio específico de los genes implicados.....	64
4.1.6.1. Rot.....	66
4.1.6.2. DltB.....	68
4.1.7. Función de DltB.....	73
4.1.8. Importancia de DltB en el reino Bacteria.....	79
4.1.8.1. DltB en otros MLST.....	79
4.1.8.2. DltB en otras especies bacterianas.....	82
4.2 Adaptación de <i>S. aureus in vivo</i> a un nuevo hospedador.....	85
4.2.1. Evolución forzada de cepas humanas.....	85
4.2.2. Modificaciones sufridas durante la evolución.....	87
4.2.3. Competición bacterias originales vs. evolucionadas.....	93
4.2.4. Competición bacterias no evolucionadas.....	94
5. Discusión.....	99
5.1. Importancia del estudio del gen implicado en adaptación a conejos.....	99
5.2. Análisis de los genes implicados.....	103
5.3. El conejo como hospedador ancestral para <i>S. aureus</i> .....	108
5.4. Evolución forzada en glándula mamaria de oveja.....	109
6. Conclusiones.....	117
7. Bibliografía.....	123









# 1. INTRODUCCIÓN

---



### **1.1. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram-positiva de la familia de las Micrococcaceae. Son bacterias redondeadas, que no poseen flagelo y crecen formando agrupaciones en racimo (del griego: Staphyle) (Biberstein, 1994, Quinn, 1999). *S. aureus* es una bacteria catalasa positiva, anaerobia facultativa y es capaz de utilizar los glúcidos por oxidación o fermentación (Biberstein, 1994). A pesar de su incapacidad de producir esporas, su pared celular contiene peptidoglicanos y ácidos teicoicos. Por este motivo, pueden resistir frente a variadas condiciones adversas. Resisten la desecación durante largos periodos de tiempo, siendo capaces de vivir con actividades de agua de hasta 0,83 y son capaces de sobrevivir en concentraciones de NaCl de hasta un 20 %, a temperaturas de hasta 60 °C durante 30 minutos y a pH variable entre 4 y 9,5. Todas estas características le permiten sobrevivir en el medio ambiente, manteniéndose en espera hasta que llegue el momento en que pueda comenzar su proceso infectivo.

#### **1.1.1. Importancia clínica**

Por lo que respecta a su importancia clínica, *S. aureus* es capaz de infectar a múltiples hospedadores, desde humanos a conejos, caballos, ganado vacuno u ovino y aves. *S. aureus* es un microorganismo comensal de la piel, donde aguarda condiciones favorables para el inicio de una infección. A este tipo de bacterias se las conoce como patógenas oportunistas. En humanos puede encontrarse en las axilas, en la región perianal o en las fosas nasales. Cerca del 30 % de la población humana es portador nasal persistente de *S. aureus* (Peacock et al., 2001, Wertheim et al., 2005). En pacientes con dermatitis atópica estos reservorios pueden ser un foco de infección hasta en un 73% de los casos (Hon et al., 2005, Falanga et al., 1985, Kim et al., 1996).

La mayoría de infecciones que produce ocurren por deficiencias en la defensa local, tras cortes en la piel, traumas foliculares o lesiones quirúrgicas. Estas infecciones dan lugar a abscesos, foliculitis o forúnculos que forman el punto inicial desde donde posteriormente la infección podrá diseminarse para luego producir enfermedades de carácter más grave como endocarditis, neumonía o sepsis (Tenover & Gayne, 2000). En los animales lactantes suelen producir infecciones intramamarias que si no se tratan acaban derivando en mastitis crónicas, produciendo graves pérdidas económicas para el ganadero (Barkema et al., 2006, Bergonier et al., 2003).

En los pasos del proceso infeccioso, se forman abscesos para que la bacteria se proteja del sistema inmune del hospedador. A pesar de que la formación de los abscesos no es una característica única de *Staphylococcus*, *S. aureus* emplea unos factores de virulencia específicos que hacen que estos abscesos sean característicos (Cheng *et al.*, 2011). En el inicio de la infección, *S. aureus* se vale de una variedad de proteínas de superficie, denominadas MSCRAMMs (del acrónimo en inglés “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”), que facilitan la colonización del hospedador. Tras la colonización, la bacteria puede permanecer en el foco de infección o diseminarse vía sanguínea. En este último caso, y tras la entrada al torrente sanguíneo, *S. aureus* sobrevive en la sangre o dentro de los neutrófilos que la han fagocitado. Una vez se ha distribuido y llega a los tejidos periféricos, se reclutan neutrófilos y células inmunitarias al foco de la infección. Este reclutamiento y el posterior ataque de las células inmunitarias es utilizado por la bacteria para generar una cápsula depositando fibrina en el exterior. En el interior, las bacterias se replican protegidas del sistema inmunitario. Finalmente, el absceso se rompe para liberar el exudado purulento, que se disemina a otras superficies o entra en la linfa o la sangre. El pus hace que se movilicen las bacterias a nuevas localizaciones, donde el patógeno puede repetir el ciclo infeccioso. Alrededor de una quinta parte de las infecciones estafilocócicas en piel o en tejidos blandos de un individuo son capaces de recidivar posteriormente (Chambers, 2005). De hecho, en muchos de los casos en los que no se administra una terapia antibiótica correcta el sistema inmunitario no es capaz de eliminar las bacterias dentro de los abscesos, por lo que es posible que se produzca una recidiva a los 30-60 días (Cheng *et al.*, 2011).

### **1.1.2. Clasificación filogenética**

La clasificación filogenética de *S. aureus* se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante la determinación de susceptibilidades a un panel antimicrobiano, el análisis del perfil de plásmidos y el fagotipado. Sin embargo, estos métodos no son suficientemente rigurosos y se prefiere utilizar métodos de tipado basados en técnicas moleculares. Una opción es la electroforesis en gel por campo pulsado, aunque es un método poco eficiente y que presenta problemas a la hora de interpretar los resultados.

Con la disminución de los costes de la secuenciación, el tipado MLST se ha convertido en el método más ampliamente extendido. Este tipado se realiza mediante la secuenciación de 7 genes presentes en todas las cepas de *S. aureus* (Enright & Spratt, 1999). Los genes se

secuencian y se comparan con la base de datos de <http://saureus.mlst.net/>. Las mutaciones puntuales que se encuentran en estos genes permiten establecer grupos y según el conjunto de mutaciones que tengan sus genes se establecen grupos genéticos denominados ST (sequence type), en los que la secuencia de los 7 genes se comparte. Para establecer grupos más amplios se utilizan los CC (clonal complex), que identifican cepas que comparten 5 de las 7 secuencias. La filogenia estudiada mediante el tipado por MLST relaciona las cepas capaces de infectar a un determinado hospedador con su evolución del genoma core (Shepherd *et al.*, 2013).

Aunque hasta hace poco tiempo se consideraba *S. aureus* como un importante agente zoonótico y a pesar de su facilidad para provocar infecciones, estudios recientes sugieren la existencia de una elevada especificidad de hospedador para los distintos clones de *S. aureus* (Herron-Olson *et al.*, 2007). Así, clones procedentes de infecciones humanas tendrían una elevada capacidad para infectar humanos, pero poca para infectar otras especies animales. Lo mismo sería cierto para clones obtenidos de otros hospedadores, los cuales infectarían bien su hospedador de origen, pero no otras especies animales, entre las que se encontrarían los humanos.

Por lo tanto, los STs que se localizan infectando a una especie suelen ser muy restringidos. De este modo, el ST mayoritario en ovejas es el ST133, en humanos el complejo clonal CC30, en cerdos el ST398, en aves de corral el CC5 y en conejos es el ST121 (Guinane *et al.*, 2010, Sung *et al.*, 2008, Vancraeynest *et al.*, 2006). Sin embargo, esto no excluye que haya aislados que pertenezcan al mismo ST y sean capaces de infectar a distintas especies. Una muestra de esto lo encontramos en el complejo clonal 398, descrito inicialmente en cerdos, pero presente también de forma habitual en humanos (Voss *et al.*, 2005, Ward *et al.*, 2014). El ST121 que se trata en esta tesis es otro ejemplo, pues aunque también se encuentra en aislados humanos, infecta de forma mayoritaria a conejos (Viana *et al.*, 2007).

## **1.2. Localización de los genes relacionados con adaptación al hospedador**

Aunque los mecanismos moleculares que explican por qué ciertos clones son específicos de hospedador, mientras que otros son más promiscuos, no se han establecido todavía, resultados previos analizando los genomas de las clones mayoritarios presentes en los rumiantes y en las aves sugieren que los elementos genéticos móviles (EGMs), entre los que destacan los bacteriófagos y las islas de patogenicidad de *S. aureus* (SaPIs), pueden desempeñar un papel esencial en este proceso (Resch *et al.*, 2013).. Como se discutirá más

adelante, la relevancia de estos elementos se basa en su capacidad para codificar importantes factores de virulencia, entre los que encontramos toxinas, inhibidores del complemento, y proteínas implicadas en la formación de biofilm o en la adaptación al hospedador (Yamaguchi *et al.*, 2000, van Wamel *et al.*, 2006, Tormo *et al.*, 2005, Viana *et al.*, 2010).

### 1.2.1. Bacteriófagos

Los EGMs más ampliamente estudiados son los bacteriófagos. En *Staphylococcus*, los bacteriófagos son mayoritariamente lisogénicos y pertenecen al orden *Caudovirales*, principalmente a la familia *Syphoviridae*, y tienen una cola larga y no contráctil. Su información genética se transporta codificada en el interior de las cápsides como ADN de doble cadena. Los bacteriófagos tienen una estructura conservada en módulos. Para lisogenizar a una bacteria, el bacteriófago se integra en el cromosoma bacteriano en un punto concreto de éste, denominado *att<sub>B</sub>*. Se han identificado 12 sitios de integración para los bacteriófagos de *S. aureus* (Goerke *et al.*, 2009). Cada uno de ellos presenta una secuencia identificativa y la recombinación se realiza mediante una integrasa, característica para cada *att*, codificada en el bacteriófago.

En los bacteriófagos, la gran mayoría de proteínas patógenas se codifican en la región más alejada de la integrasa, después del módulo de lisis, aunque en algunos casos se presentan en otras localizaciones (Sumby & Waldor, 2003). Los bacteriófagos codifican importantes factores de virulencia, entre los que se encuentran proteínas inhibitoras del sistema inmune del hospedador, como pueden ser Sak, una estafiloquinasa moduladora de la respuesta inmune responsable de la destrucción tisular del hospedador (Lack, 1948); Chp, una proteína inhibitoria de la quimiotaxis (de Haas *et al.*, 2004) o SCIN, que inhibe el sistema del complemento (Rooijackers *et al.*, 2005). Otros factores de virulencia son los superantígenos (Sea, Seq, Sek, Sek2, Sep, Seq), que son enterotoxinas que causan intoxicaciones alimentarias, síndrome del shock tóxico y fascitis necrotizante (Iandolo *et al.*, 2002, Coleman *et al.*, 1989). Además, también pueden codificar PVL, que es una citotoxina compuesta por lukF-PV y lukS-PV y las leucocidinas relacionadas lukM y lukF que forman poros en los leucocitos y causan infecciones necróticas (Loffler *et al.*, 2010). La toxina exfoliativa A, finalmente, está involucrada en infecciones severas de piel (Deghorain & Van Melderen, 2012).

Cuando un bacteriófago se atempera en una cepa, lisogenizándola, le proporciona un arsenal del que no disponía. De manera contraria, los bacteriófagos también pueden truncar la secuencia de genes que codifican para proteínas relacionadas con virulencia, como el gen *hly*, convirtiendo a la cepa en *hly*-negativa, lo que elimina la capacidad de la cepa de ser  $\beta$ -hemolítica. En concreto, los bacteriófagos que se integran en este gen codifican para la integrasa de tipo III, y se caracterizan por codificar además para los factores de virulencia Sak, SCIN, Sea y Chp. Al existir un compromiso entre la funcionalidad de *hly* y la presencia del bacteriófago, puede verse desequilibrado a favor de la presencia o de la ausencia del bacteriófago según las necesidades impuestas por el hospedador en que se encuentre (van Wamel *et al.*, 2006).

Por otra parte, los bacteriófagos también son importantes puesto que son los encargados de movilizar las islas de patogenicidad.

### **1.2.2. Islas de patogenicidad**

Las islas de patogenicidad de *S. aureus* (SaPIs) son regiones del genoma bacteriano capaces de ser transferidas horizontalmente con la ayuda de bacteriófagos a los que parasitan (Novick *et al.*, 2010). Las SaPIs son las primeras islas de patogenicidad (IPs) claramente definidas en patógenos Gram-positivos y por ello las más estudiadas. Al igual que ocurría con los fagos, todas las cepas de *S. aureus* secuenciadas presentan al menos uno de estos elementos, lo que demuestra la importancia de las SaPIs en la biología de la bacteria (Ram *et al.*, 2014). Las SaPIs presentan una estructura muy conservada, diferenciándose en módulos que se regulan en cascada para controlar el momento exacto de su transcripción.

Las islas son capaces de identificar el momento en el que el bacteriófago comienza su replicación ya que utilizan como inductoras de su ciclo una proteína codificada por el fago (Tormo-Mas *et al.*, 2010). Una vez inducidas, las islas se transfieren generando partículas infectivas a partir de las proteínas codificadas por los fagos (Tormo *et al.*, 2008). Tras la lisis de la bacteria por las enzimas codificadas por el fago, las islas infectan una nueva célula huésped, donde se integran en el *att<sub>B</sub>* del cromosoma bacteriano por actividad de la integrasa codificada en la isla (Ubeda *et al.*, 2003, Ruzin *et al.*, 2001). Hasta la fecha se han identificado cinco sitios de integración diferentes, que serán reconocidos por el mismo número de integrasas correspondientes (Tabla 1.1). Por lo tanto, una cepa podría llegar a portar simultáneamente cinco islas, integradas cada una de ellas en su *att<sub>B</sub>* específico.

**Tabla 1.1.** Tipos de integrasas presentes en las SaPIs (Novick *et al.*, 2010).

Integrasa tipo:	Isla de referencia	Cepa de referencia	Sitio att <sub>B</sub>
I	SaPI4	MRSA252 ( <i>S. aureus</i> )	AAAGAAGAACAATAATAT
II	SaPIbov1	RF122 ( <i>S. aureus</i> )	TAATTATTCCCACTCAAT
III	SaPImw2	MW2 ( <i>S. aureus</i> )	TCCCGCCGTCTCCAT
IV	SaPI3	COL ( <i>S. aureus</i> )	TTATTTAGCAGGAATAA
V	SaPI <sub>n</sub> 1	N315 ( <i>S. aureus</i> )	GTTTTACCATCATTCCCGGCAT

Aunque las integrasas de las islas sean similares en funcionamiento a las de los fagos, sus secuencias y los att<sub>B</sub> que reconocen son distintos. De esta manera, las islas y los fagos han conseguido diferenciarse evolutivamente para no tener que competir por sus sitios de integración.

Al igual que ocurría con los fagos, las SaPIs codifican distintos factores de virulencia. Los superantígenos (SAGs) son uno de ellos, y entre ellos encontramos la toxina TSST, responsable del síndrome del shock tóxico (Lindsay *et al.*, 1998). También codifican para las enterotoxinas B, K y Q, que son una de las causas más importantes de intoxicaciones alimentarias (Yarwood *et al.*, 2002).

Por otra parte podemos encontrar otro tipo de factores de virulencia, que son los encargados de interactuar con el hospedador para evitar la respuesta inmune. Dentro de estos está Bap, relacionado con la formación del biofilm y que se encuentra en la isla SaPIbov2 (Úbeda *et al.*, 2003), o la isla SaPIbov4, que codifica el gen *vwb* que es una coagulasa específica de hospedador (Viana *et al.*, 2010). SplE es una proteasa secretada cuyo operón está localizado en la isla de patogenicidad vSaβ. Las proteasas tienen múltiples roles durante el proceso infeccioso (Zdzalik *et al.*, 2013).

Anteriormente se ha demostrado una asociación entre los EGMs, en concreto las SaPIs, con cepas que infectan especies animales determinadas, lo que sugiere un posible papel de los EGMs en la especificidad de hospedador. Puesto que la base molecular por la cual *S. aureus* se adapta a un hospedador no se ha dilucidado todavía, el estudio del papel que juegan los EGMs en la adaptación a un nuevo hospedador será uno de los objetivos de esta tesis.

### 1.2.3. Cromosoma bacteriano

Además de la alta implicación de los EGMs en virulencia, en el cromosoma bacteriano de *S. aureus* también encontramos genes y SNPs implicados en virulencia y adaptación al hospedador (Abdelbary *et al.*, 2014, Edwards *et al.*, 2012). Los genes con los

que se trabajará en la primera parte de la tesis tienen localización cromosómica, por lo que procederemos a comentarlos a continuación.

Un grupo de genes cromosómicos implicados en virulencia que es fácilmente observable e identificativo lo forman las hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . Son proteínas secretadas por la bacteria que se unen a la pared de los eritrocitos y otras células sanguíneas del hospedador, provocando poros en sus membranas celulares y lisis de ellas (Bhakdi & Trantum-Jensen, 1991). Su identificación se realiza de manera rutinaria en placas de agar-sangre 5%, pues  $\alpha$  y  $\delta$ -toxinas generan un halo transparente. La beta-hemolisina genera un halo translúcido (Traber *et al.*, 2008), puesto que cuando se une a los eritrocitos no provoca que viertan todo su contenido al medio y solo los perfora. Esta actividad hemolítica permite que se use como característica identificativa de cepas.

Ess es un sistema de secreción proteica de tipo VII que no es necesario para el crecimiento en laboratorio, pero se requiere en virulencia y también se encuentra codificado en el cromosoma bacteriano. En el operón en el que se encuentra *essB* están también *essA* y *essC*, que codifican para proteínas que están unidas a la membrana y son esenciales para la secreción de otra proteína del mismo operón, *EssA*, que es un antígeno capaz de activar a los linfocitos T (Kneuper *et al.*, 2014). Se demostró que este grupo de proteínas estaban implicadas en la virulencia y la formación de abscesos en ratones y recientemente se ha visto que también participa en la colonización nasal e incrementa la supervivencia bacteriana en infecciones de ratón (Burts *et al.*, 2008, Kneuper *et al.*, 2014).

Implicada en la virulencia de *S. aureus* también se encuentra la proteína MatE que pertenece a la familia MATE de bombas de flujo. Estas proteínas exportan al exterior de la célula compuestos dañinos para la bacteria, permitiendo de esta manera una resistencia frente a ellos. La función fisiológica de las bombas de flujo en las bacterias está relacionada con la eliminación de metabolitos endógenos, la secreción de factores de virulencia y las respuestas de estrés celular, sugiriendo que el transporte de fármacos descrito es un uso accidental de las mismas (Costa *et al.*, 2013). Respecto a su papel en las infecciones, esta familia de proteínas no sólo se encarga de exportar fármacos sino que puede conferir resistencia frente a sustancias producidas por el hospedador como bilis, hormonas o moléculas de defensa del hospedador, incrementando la capacidad de persistencia y colonización de la bacteria (Pidcock, 2006).

La lipasa extracelular de *S. aureus* interacciona con los granulocitos humanos, modificando su capacidad quimiotáctica y provocando su agregación, lo que conlleva una reducción de la fagocitosis de bacterias (Rollof *et al.*, 1992). La lipasa también está relacionada con la formación de biofilm, y una delección del gen de la lipasa en una cepa sometida a infección *in vivo* en ratón resultaba en una menor capacidad de producción de abscesos peritoneales y una recuperación de bacterias de los órganos analizados inferior a la de la cepa original (Hu *et al.*, 2012)

Alrededor de un 90% de las cepas MRSA son capaces de hidrolizar urea mediante la producción de ureasa, también codificada en el cromosoma bacteriano (Murchan *et al.*, 2004). La producción de ureasa está directamente asociada con la formación de piedras en el riñón y contribuye a la patogénesis de pielonefritis, coma hepático, incrustación de catéteres urinarios y ulceración péptica. También se ha sugerido que puede participar en la inactivación del complemento (Mobley & Hausinger, 1989).

Durante esta tesis trataremos también con la proteína Rot, que también está codificada en el cromosoma bacteriano. Rot fue descrito por primera vez como un represor de toxinas, pero en realidad también regula transcripcionalmente a otros genes que juegan distintos papeles en la biología, incluyendo metabolismo de carbohidratos y proteínas, síntesis de la pared celular y transporte. Negativamente regula las toxinas *hla* y *hly*, el operón de proteasas *Spl* y la lipasa *geh* entre otros. Positivamente regula la proteína estafilocócica A (*spa*), *hlgB* y *hlgC* (Said-Salim *et al.*, 2003).

### 1.3. Hospedadores

La relación de los EGMs en la adaptación a hospedador es clara y, como se ha comentado anteriormente, se han producido adaptaciones en múltiples ocasiones. En este aspecto, existen islas que están relacionadas con una misma especie hospedadora, debido a los factores de virulencia que codifican. Por ejemplo, las islas SaPI<sub>bov</sub> están relacionadas con rumiantes, las SaPI<sub>ov</sub> están relacionadas con ganado ovino y SaPI<sub>h1</sub> con humanos.

Evolutivamente, todos los aislados de origen animal parecen provenir de cepas humanas (Sung *et al.*, 2008). En cualquier caso además, la fecha estimada en la que ocurrieron los saltos de hospedador parece encontrarse tras la domesticación animal, cuando la relación de los humanos con los animales fue más estrecha (Guinane *et al.*, 2010, Lowder *et al.*, 2009, Price *et al.*, 2012). Habitualmente el estudio de la transferencia zoonótica se ha realizado situando a los humanos como el objetivo al que se adaptan las

bacterias porque estos estudios resultan de importancia para la salud pública por los riesgos que podría conllevar. Sin embargo, la colonización de humanos relacionados con la ganadería como portadores de *S. aureus* convierte a esta especie en un vehículo de transmisión entre especies animales. En humanos, *S. aureus* puede reproducirse y adquirir nuevas características con las que infectar nuevamente al ganado (Messenger *et al.*, 2014). Esto significa también un peligro a tener en cuenta, pues se podrían generar nuevas patologías en este transcurso interespecífico.

El objetivo de esta tesis se centra en la búsqueda del modo en que clones de *S. aureus* se adaptan a determinados hospedadores. Una manera de afrontar este estudio es identificar cuáles son las diferencias que existen entre cepas actualmente adaptadas y no adaptadas al hospedador de estudio (Wain *et al.*, 2007). El clon ST121, que infecta humanos y conejos, es un buen candidato para su investigación debido a que se pueden encontrar aislados de dicho clon de ambos hospedadores. Utilizando los mecanismos de secuenciación a gran escala podemos localizar las mutaciones existentes entre ambas cepas. Gracias a este tipo de secuenciación seremos capaces de localizar todas las diferencias realizando un barrido completo del genoma de la bacteria. Posteriormente, mediante mutagénesis dirigida procederemos a estudiar el efecto que cada una de las mutaciones produciría en una cepa no adaptada. De este modo podremos recrear la cepa ancestral que mutó para iniciar la infección en el nuevo hospedador.

Otra aproximación con la que podemos intentar comprender la adaptación al hospedador de *S. aureus* puede realizarse mediante el estudio de los cambios sucedidos en una adaptación forzada a un nuevo hábitat, en este caso a un nuevo hospedador (Hinshaw *et al.*, 1981). Para estudiar esos cambios en esta tesis, utilizaremos cepas humanas que se verán obligadas a infectar ovejas. Este experimento en el cual se permite la acumulación de mutaciones espontáneas se ha utilizado previamente de manera exitosa en organismos modelo como *Echerichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* y *Arabidopsis thaliana* (Denver *et al.*, 2009, Lynch *et al.*, 2008, Ossowski *et al.*, 2010, Barrick *et al.*, 2009). Durante esta transición podremos *evaluar* también el comportamiento de los EGMs.

### **1.3.1. *S. aureus* en conejos**

Las explotaciones cunícolas en España comenzaron su modernización en la década de los 50 con la utilización de jaulas metálicas y continuaron en los años 60 gracias a la

industria de piensos alimentarios (Rosell, 1996). La alta densidad de animales en las explotaciones provocó el incremento de la afección de los agentes infecciosos dentro de las mismas, produciéndose un incremento de los brotes por *S. aureus* en Europa a partir de los años 80 (Hermans et al., 2003).

En conejos la estafilococia se caracteriza por una inflamación supurativa en prácticamente cualquier órgano y localización de los animales y con frecuencia concluye con una septicemia fatal (Flatt, 1974). Las infecciones producidas por *S. aureus* en explotaciones cunícolas tienen una elevada importancia debido a que son el principal agente causal aislado de lesiones infectadas y son, a su vez, uno de los motivos más importantes de desvieje en granjas (Segura et al., 2007). Casi la práctica totalidad de las granjas presentan casos de infección por *S. aureus*, que pueden diferenciarse en dos tipos: en el caso de afectar a gazapos lactantes, los cuadros típicos son pequeños abscesos en la piel, a veces subcutáneos o internos, que provocan cuadros subagudos y muerte del animal. En el caso de las infecciones en conejos adultos, se producen principalmente mastitis, pododermatitis, abscesos subcutáneos y en órganos internos, rinitis-conjuntivitis y metritis (Peris & Corpa, 2003, Rosell et al., 2000).

En el caso concreto de las infecciones en piel, que estudiaremos a lo largo de esta tesis, las bacterias inicialmente producen una respuesta inflamatoria formando abscesos de hasta 2,5 cm de diámetro que provocan necrosis en los tejidos circundantes. Estos abscesos pueden abrirse, descargando el material purulento al exterior. En ocasiones, también la piel puede presentar un aspecto apergaminado sin que la lesión llegue a abrirse al exterior (Corpa, 2009).

A pesar de la importancia en este hospedador, pocos estudios han profundizado en el estudio de los mecanismos moleculares empleados por *S. aureus* para infectar a este hospedador. En un estudio realizado previamente en nuestro grupo se analizaron aislados de mamitis de conejo, observándose que el clon más ampliamente distribuido en la costa mediterránea española es el ST121 (Viana et al., 2007, Viana et al., 2010). Esto estaba de acuerdo con lo propuesto por el grupo de Hermans para cepas de conejo a nivel internacional (Vancraeynest et al., 2006).

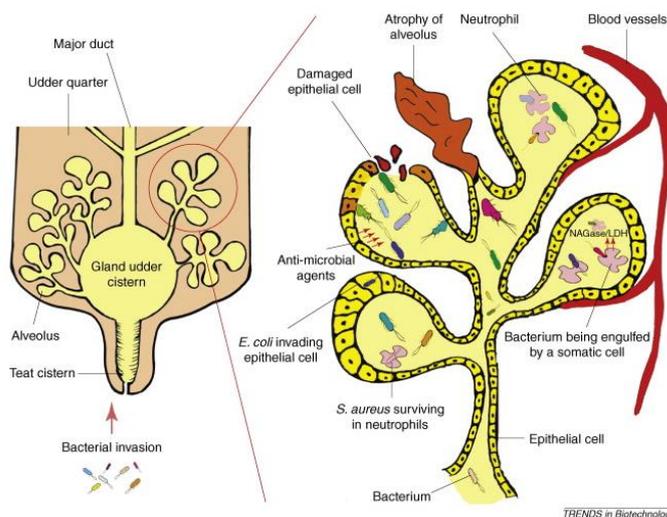
Existe una creciente preocupación por el clon ST121, puesto que además de conejo, también infecta a humanos. Las cepas ST121 relacionadas con humanos tienen una alta probabilidad de codificar también la toxina PVL (Conceicao et al., 2010). Estudios recientes

de aislados de *S. aureus* obtenidos de niños mostraron que la mayoría de aislados de este ST eran MRSA (Nickerson *et al.*, 2009). MSSA ST121 se aísla de lesiones de piel en Africa, Rusia, India y Estados Unidos. Estudios recientes involucran a las cepas MSSA-ST121-PVL positivos en brotes de forunculosis y en terapia de sepsis refractaria (Cupane *et al.*, 2012). En otro estudio, el clon MSSA PVL-positivo más frecuente era ST121 (Goering *et al.*, 2008). Todo esto revela una significatividad creciente de este clon (Cupane *et al.*, 2012).

### 1.3.2. *S. aureus* en ovejas

*S. aureus* es el principal agente causal en mastitis en ganado ovino. En un estudio del año 2007 el 40% de los casos naturales con mastitis unilateral provocada por *S. aureus* presentó *S. aureus* infectando de forma subclínica a la otra glándula mamaria (Mork *et al.*, 2007). La mastitis es una enfermedad importante en las ovejas. Esta enfermedad no sólo es preocupante en los rebaños dedicados a la producción láctea, sino que también afecta a los dedicados a la producción de carne o lana. Los casos clínicos son habitualmente severos, presentando signos sistémicos y con una condición dolorosa. Las glándulas clínicamente afectadas sufren frecuentemente un daño parcial o total y no recuperan su función normal. La reducción del rendimiento lácteo conlleva un crecimiento mermado de los corderos, aumentando el problema. Esto conlleva una pérdida económica asociada debida tanto a los tratamientos como al sacrificio, debido al daño permanente que se produce en la ubre. *S. aureus*, por tanto, tiene un gran impacto tanto en la economía como en el bienestar animal en la producción ovina.

La mastitis se origina en la mayoría de los casos por la entrada de la bacteria por el canal del pezón (Figura 1.1). Entonces se adaptan y multiplican en la leche, consiguiendo acceder a la parte superior de la glándula. Se adhieren al epitelio de los conductos y alveolos mamarios y comienzan ahí la producción de toxinas, provocando la activación de los macrófagos y la migración de los neutrófilos desde la sangre hasta la leche, incrementando el recuento de células somáticas existentes en leche y provocando la inflamación de la zona. De este modo, la bacteria logra alcanzar las capas basales subepiteliares, se une al fibrinógeno, entre otras proteínas del hospedador, y establece la infección (Foster & Hook, 1998).



**Figura 1.1:** Etapas de la infección natural en ubre de rumiantes (Viguier *et al.*, 2009).

Numerosos estudios genéticos poblacionales han identificado la existencia de genotipos de *S. aureus* asociados con vacas, ovejas, y cabras pero rara vez se aíslan de humanos, lo que sugiere que están especializados en infectar hospedadores rumiantes (Kapur *et al.*, 1995, Jorgensen *et al.*, 2005). Como se ha indicado previamente, varios estudios indican la existencia de un único complejo clonal (CC133) responsable de la mayoría de las infecciones intramamarias de pequeños rumiantes, incluyendo ovejas y cabras y que también puede causar mastitis en vacas (Ben Zakour *et al.*, 2008, Smyth *et al.*, 2009). En 2010 se realizó un estudio filogenético que indicaba que estas cepas tenían un origen humano. Éstas sufrieron diversificación y deterioro génico y adquisición de EGM que se identificaron por primera vez en estas cepas (las islas Saov1, Saov2 y los bacteriófagos  $\phi$ Saov1,  $\phi$ Saov2, y  $\phi$ Saov3) (Guinane *et al.*, 2010). El aislado ST133 se encuentra en animales rumiantes en varios países de Europa y de EE.UU. Esto parece indicar que este clon está particularmente bien adaptado a su hospedador.

Una característica que ayuda a *S. aureus* a infectar a ganado bovino y a pequeños rumiantes es la capacidad de coagular su plasma. Para este fin, la bacteria codifica dos proteínas en su cromosoma; Coa y vWbp, que provocan la coagulación del plasma alrededor de la bacteria. Ambas interaccionan con el fibrinógeno y la protrombina para evitar la conversión del fibrinógeno a fibrina, que produce los coágulos (Cheng *et al.*, 2010). La proteína vWbp que coagula específicamente plasma de su hospedador se localizó por primera vez en la isla SaPIbov4 y esta copia de la proteína se encuentra codificada en islas (Viana *et al.*, 2010). En el caso concreto de las ovejas, se identificó una isla: SaPIov2. Esta SaPI se encontraba específicamente en cepas CC133 y codifica una copia de *vwb* en su

secuencia. Estudios realizados delecionando la isla completa demostraron que SaPlov2 era capaz de coagular específicamente plasma de oveja, muy probablemente mediante la actividad de vWbp (Guinane *et al.*, 2010). Este ejemplo implica activamente a las SaPIs codificadas en *S. aureus* de aislados de pequeños rumiantes en su adaptación al hospedador.

Actualmente existe la necesidad de averiguar cómo *S. aureus* controla su especificidad de infección al hospedador puesto que un posible salto de hospedador hacia los humanos sería problemático. Con esta cuestión en mente decidimos estudiar el proceso que siguen las cepas a la hora de sufrir modificaciones que les permitan infectar a nuevos hospedadores. Este estudio lo llevaremos a cabo con análisis *in silico* de secuencias en cepas adaptadas a conejos y posteriormente en infecciones *in vivo*. Por otra parte, afrontaremos esta misma investigación trabajando con cepas humanas de *S. aureus* que se enfrentarán a la infección a ovejas por primera vez.

#### 1.4. Pared bacteriana

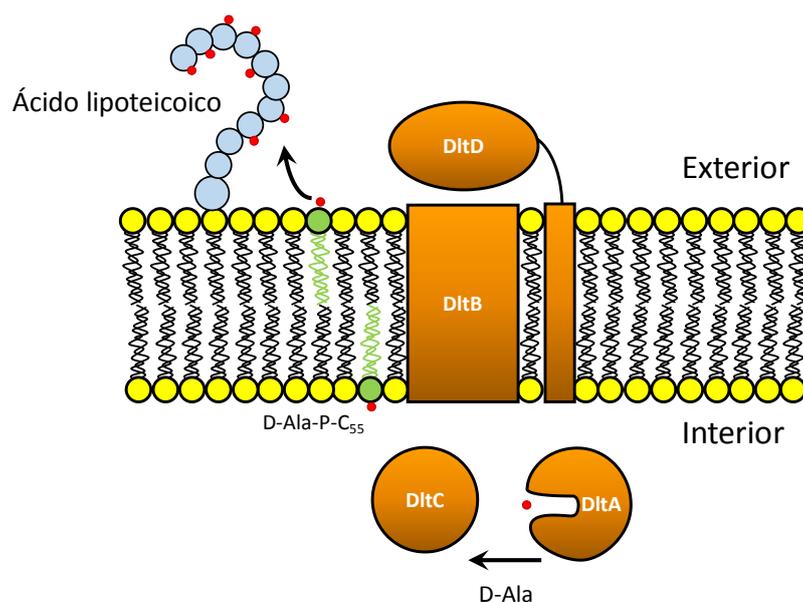
Cuando los patógenos invaden un hospedador, el hospedador pone en marcha la respuesta inmune innata y adaptativa y comienzan la identificación reconociendo a las bacterias mediante receptores de antígenos. Éstos están en la superficie de los linfocitos B y T para la respuesta adaptativa y son citoquinas y quimioquinas en la respuesta innata (Fournier & Philpott, 2005). Es de destacar el hecho de que las estructuras reconocidas por el sistema inmune innato suelen ser esenciales para las bacterias y no se encuentran en las células del hospedador (Medzhitov & Janeway, 2000). Los componentes de la pared de *S. aureus* como el peptidoglicano, los ácidos teicoicos y lipoteicoicos y su alanilación estimulan la producción de citoquinas, quimioquinas como interleucinas y el factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$  (Danforth *et al.*, 1995, Keller *et al.*, 1992, Standiford *et al.*, 1994, Heumann *et al.*, 1994, Kristian *et al.*, 2003).

La pared gruesa que poseen las bacterias Gram-positivas rodea a toda la célula y mantiene la forma de la bacteria, evitando las tensiones producidas por la presión osmótica. Esta pared de *S. aureus* se constituye de dos derivados de azúcares: N-acetilglucosamina y ácido N-acetil murámico unidos entre ellos mediante enlaces peptídicos a través de los aminoácidos L-alanina, D-alanina, D-glutámico y L-lisina (Dengler *et al.*, 2011). Mediante puentes de cinco glicinas unidas entre los aminoácidos de las distintas cadenas, se establecen uniones entre ellas para formar múltiples capas que hacen resistente la pared. Este cinturón protector para la bacteria ha de anclarse a la membrana de algún modo. Ahí

es donde entran en juego los ácidos teicoicos y lipoteicoicos. Estos ácidos están formados por unidades de ribitolfosfato unidos por ésteres fosfato y a ellos se les unen D-alaninas. En el caso de los ácidos lipoteicoicos están compuestos por una cadena principal formada por poliglicerolfosfatos que está unida a la membrana externa por un enlace glicolípidico (Reichmann & Grundling, 2011). Por el contrario, los ácidos teicoicos están compuestos por una cadena de ribitolfosfato unida al ácido murámico del peptidoglicano (Brown *et al.*, 2008, Neuhaus & Baddiley, 2003). Ambos polímeros están rodeados por ésteres con D-alanina, que confieren una carga positiva al polímero negativo.

En una infección, el hospedador utiliza el péptidoglicano de las bacterias para reconocerlas como elemento extraño. Para las bacterias Gram-positivas, los ácidos teicoicos y lipoteicoicos que tienen en la pared tienen la finalidad de protección puesto que la cantidad de estos ácidos unidos a la pared está directamente relacionada con la capacidad de supervivencia de la bacteria. Los ácidos teicoicos y lipoteicoicos provocan un impedimento estérico e impiden el reconocimiento de la bacteria por parte del sistema inmune (Atilano *et al.*, 2011). Estos ácidos presentan unida D-alanina, que es el aminoácido cargado positivamente encargado de contrarrestar la carga negativa de la pared bacteriana. De esta manera se evita la unión de las proteínas defensivas del hospedador. Este sistema de defensa por parte del animal utiliza moléculas anfipáticas con actividad formadora de poros o desintegradora de la bicapa de la membrana bacteriana (Peschel *et al.*, 1999). Los péptidos catiónicos son moléculas antimicrobianas producidas por el hospedador, y están ampliamente distribuidos en la naturaleza, existiendo en organismos desde insectos hasta plantas, pasando por animales mamíferos y vertebrados no mamíferos (Brown & Hancock, 2006). En ratones, los ácidos teicoicos D-alanilados de las bacterias producen una reducción de la producción de superóxido por parte de sus macrófagos, con lo que la supervivencia bacteriana aumenta. Entre organismos la respuesta provocada por la acción de los ácidos teicoicos D-alanilados de las bacterias difiere, pero en todos ellos las bacterias lo utilizan para evadir la respuesta inmune, tanto en insectos como en mamíferos (Tabuchi *et al.*, 2010).

El operón *dltABCD* es responsable de la D-alanilación tanto de los ácidos teicoicos como lipoteicoicos (Tabuchi *et al.*, 2010). Estos genes están codificados en el cromosoma de *S. aureus*. Los genes del operón *dltABCD* actúan de manera conjunta para conseguir unir la D-alanina en la parte externa de la pared, aunque su unión se produce primero a los ácidos lipoteicoicos, para desde ellos, transferirse a los ácidos teicoicos (Reichmann *et al.*, 2013). La función de las proteínas DltA y DltC está clara, mientras que se han propuesto dos funciones posibles para DltB y DltD (Reichmann *et al.*, 2013). En ese mismo estudio de 2013 se eliminó la posibilidad de una de las dos hipótesis planteadas, quedando el modelo de Fischer, en el que DltC se mantiene en el interior de la membrana, como el único probable (Figura 1.2.). Para cualquiera de los dos modelos, DltA está localizado en el citoplasma y usa ATP para activar la D-alanina para formar D-alanil-AMP. En un segundo paso, DltA transfiere este intermediario al transportador DltC. DltC es un pequeño transportador de D-alanil que se une a través de un enlace tioéster de su grupo prostético fosfopanteteina a la D-alanina (Yonus *et al.*, 2008). Una vez DltC está cargado, la proteína DltB, que atraviesa la membrana, transfiere la D-alanina desde DltC a C<sub>55</sub>-P, según la hipótesis de Fischer, resultando en la formación del intermediario de membrana D-alanina-P-C<sub>55</sub>. La existencia de este intermediario transmembrana es una hipótesis que no se ha corroborado, puesto que no se ha podido observar experimentalmente. DltD, con su extremo C-terminal en la cara externa de la membrana plasmática, sería el encargado de establecer la unión entre el ácido



**Figura 1.2.:** Estructura de acción de las proteínas Dlt según la hipótesis de Fischer (Reichmann *et al.*, 2013)

lipoteicoico y D-alanina (Reichmann *et al.*, 2013). Esta D-alanina se unirá a la cadena principal de glicerol fosfato de los ácidos lipoteicoicos (Neuhaus & Baddiley, 2003).

Este operón se ve extremadamente regulado por cationes monovalentes y especialmente por divalentes. La regulación transcripcional depende de elementos *cis* localizados entre 325 y 171 pares de bases aguas arriba del primer codón de *dltA* y es dependiente del sistema de dos componentes ArlSR. El inicio de la transcripción del operón empieza 250 pares de bases aguas arriba de la metionina de *dltA* y el transcrito producido incluye otra pauta de lectura abierta que está conservada en el operon *dlt*. Ni la existencia ni la función de este posible gen, denominado *dltX*, ha sido demostrada experimentalmente (Koprivnjak *et al.*, 2006, Reichmann *et al.*, 2013).

A la hora de iniciar la infección en el hospedador, la pared de la bacteria es la región mediante la cual el sistema inmune reconoce a la bacteria para comenzar el proceso de fagocitosis. Para evitar este reconocimiento, la bacteria posee múltiples sistemas de evasión. Antes de que las células inmunitarias lleguen a contactar con la célula existen proteínas secretadas por *S. aureus* codificadas por *spa*, *scn* o *coa*. La proteína Spa, más conocida como proteína A, aglutina las inmunoglobulinas uniéndose a ellas por su región constante evitando así su acción (Lindmark *et al.*, 1983). SCIN bloquea el sistema de complemento, inhibiendo la actividad de la C3 convertasa, por lo que se impide a su vez la formación de anafilotoxina. De este modo, las células fagocíticas no se verán atraídas (Serruto *et al.*, 2010). La proteína Coa reacciona con la protrombina convirtiendo el fibrinógeno en fibrina y produciendo coágulos que rodean a la bacteria, protegiéndola del ambiente (Cheng *et al.*, 2010).

A pesar de que existen estudios respecto a la actividad de las proteínas DltA, DltC y DltD, no se conoce el mecanismo de actuación de la proteína DltB. Dada la implicación que presentará en nuestro estudio, realizaremos un análisis exhaustivo de su actividad enfocándonos en su función patogénica.

### **1.5. Evolución de *S. aureus***

A pesar de que las bacterias se reproducen asexualmente, actualmente es reconocido por todos que las bacterias no se ajustan al modelo de evolución clonal (Smith *et al.*, 1993). Los genomas accesorios de la bacteria son una fuente importante de variación bacteriana que facilitan la rápida adaptación mediante la transferencia horizontal. Del mismo modo, la adaptación que ocurre en el genoma core también es un punto crítico para la supervivencia a corto y largo plazo, y para dar respuesta a presiones de selección. Por

ejemplo, la resistencia a antibióticos puede ser conseguida mediante sustituciones en genes altamente conservados del cromosoma bacteriano como pueden ser *gyrA* o *rpoB* (Wright, 2007, MacLean *et al.*, 2010, Gordon *et al.*, 2014). En ausencia de recombinación homóloga mediada por transferencia horizontal, la adaptación en el genoma core se ve limitada a la incorporación de nuevas mutaciones y a la interferencia clonal, en la que varios clones conviven en un escenario sin selección (Everitt *et al.*, 2014).

En el comienzo de una infección existe un proceso de selección muy estricto que también puede provocar mutaciones. Al inicio, la exposición a las especies reactivas de oxígeno (en inglés: ROS) creadas por el sistema inmune están entre los acontecimientos más frecuentes a los que se tiene que enfrentar *S. aureus*. Una vez la bacteria ha entrado en el hospedador, se encuentra con neutrófilos y macrófagos que desatan una respuesta respiratoria capaz de dañar las proteínas o el ADN de la bacteria. Para contrarrestar esta respuesta inmune, *S. aureus* comienza una respuesta de estrés oxidativo para prevenir o tratar el daño generado por ROS. *S. aureus* se ha de enfrentar a la reparación del ADN cuando la prevención del daño falla. Aunque ROS es un mecanismo excepcional para eliminar bacterias por parte del hospedador, cuando alguna bacteria sobrevive a este paso, ocurre una situación promutagénica, que lleva a la bacteria a adaptarse al nuevo hospedador. Bajo estas circunstancias, las mutaciones que han ocurrido en la bacteria pueden seleccionarse y dar lugar a la adaptación (Canfield *et al.*, 2013), al igual que las mutaciones que existían en la población inicial.

Una vez ha ocurrido el daño al ADN, se pone en marcha el sistema SOS de la bacteria, que regula genes involucrados en la reparación del ADN y la supervivencia celular. Esta respuesta se controla por los reguladores LexA y RecA, que están reprimiendo un conjunto de proteínas. LexA es una proteína autocatalítica que se degrada bajo la acción de los rayos UV o productos químicos (Witkin, 1976, Walker, 1984) y así se permite la transcripción de los genes regulados. Si el nivel de daño al ADN es demasiado grande para no poder ser reparado por las proteínas del sistema SOS, se activa la fase mutagénica del sistema SOS. Esta fase está mediada por polimerasas con baja fidelidad como la polimerasa IV o V que también se encuentran reguladas por LexA. Éstas son ADNpolimerasas que permiten la replicación del DNA en ausencia de cadena molde, con lo que se intentan corregir las mutaciones ocurridas, aunque generando otras nuevas (Patel *et al.*, 2010). Este mismo proceso es el que ocurre debido a la actividad de antibióticos o de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Maiques *et al.*, 2006, Selva *et al.*, 2009).

Además de esta selección propiciada por el hospedador, las bacterias sufren otros procesos evolutivos como la deriva genética, pues las características del conjunto de bacterias que entran en contacto con el hospedador proporcionan unas características diferenciales que se implantarán, provocando, si tienen éxito, una explosión poblacional que cambiará la estructura de la población bacteriana.

### 1.5.1. Epigenética

Las características epigenéticas modifican la actividad del ADN sin modificar su secuencia. En eucariotas por ejemplo, los fenómenos epigenéticos incluyen impronta genética sobre genes del padre o de la madre, modificación de histonas y metilación del ADN (Casadesus & Low, 2006). Para las bacterias, el mecanismo epigenético más conocido es la metilación selectiva de las adeninas del ADN. La metilación del ADN ocurre tras su replicación y añade una información secundaria a la información de la propia secuencia nucleotídica. Esta nueva información provocará cambios a nivel de transcripción, transposición, iniciación de la replicación del cromosoma y prevendrá de las posibles mutaciones que podrían producirse por los mecanismos de reparación celular (Marinus & Casadesus, 2009)

El modo de acción de las metilasas suele verse asociado a la infección por bacteriófagos. Para evitar la entrada en la bacteria de un ADN exógeno, la bacteria codifica enzimas de restricción que son capaces de identificar secuencias de 4 a 6 nucleótidos y cortarlas. Para que estas enzimas no corten el ADN propio, la bacteria cuenta con metilasas que protegen al ADN bacteriano. En algunas ocasiones, las metilasas pierden los sistemas de restricción que las acompañan, quedando “huérfanas”. Son este tipo de metilasas desaparejadas las que se dedican a la regulación epigenética (Casadesus & Low, 2006).

Las bacterias pueden utilizar la metilación de su ADN para adaptarse al medio en el que se encuentran. Un ejemplo de esta adaptación la encontramos en el caso del áfido del guisante *Acyrtosiphon pisum*, que puede ser verde o naranja según la temperatura a la que vivan. Éste presenta una bacteria endosimbionte, *Regiella insecticola*, que es capaz de aportar al áfido características como resistencias a patógenos fúngicos y parásitos, adaptación al calor, etc. Esta bacteria también puede inducir cambios morfológicos en el áfido, como cambios de coloración según la temperatura que parecen mediados por metilaciones o desmetilaciones en el ADN de la bacteria. La acción de estas modificaciones podría afectar la expresión de genes relacionados con la adaptación al frío o la aparición y

desaparición del pigmento verde (Reingold et al., 2014). Como se ve en este caso, la regulación epigenética puede permitir una rápida respuesta a los organismos unicelulares frente a señales o estrés ambiental.

Un ejemplo de metilasa ampliamente estudiado en bacterias lo encontramos en la metilasa *dam* (DNA adenine methyltransferase). La regulación por *dam* puede ser muy estricta como se observa en *Salmonella enterica*, donde la ausencia de su expresión causa una disminución de la dosis letal 50 para ratón de  $10^3$  por vía oral o  $10^4$  peritonealmente (Garcia-Del Portillo et al., 1999, Heithoff et al., 1999).

Cambios en la expresión de Dam son capaces de modificar la infectividad de las bacterias en uno u otro sentido. En el caso de *Pasteurella multocida*, una sobreexpresión de Dam disminuye la infectividad de la bacteria (Chen et al., 2003), mientras que para *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, una supresión de la expresión de dam incrementa la síntesis y secreción de leucotoxina a la vez que disminuye su capacidad invasiva (Wu et al., 2006).

Al tener un efecto pleiotrópico, puesto que puede controlar múltiples procesos, la metilación del ADN es un buen sistema de regulación. Lo podemos comprobar en *S. enterica*, donde se han descrito varios mecanismos de virulencia que se ven afectados por la metilación del ADN. Estos mutantes en *dam*, ven mermada la capacidad de invasión del epitelio, presentan motilidad reducida, incrementan la expresión de la proteína fimbrial *std* y se sensibilizan frente a la acción de las sales biliares. Todo esto modifica ampliamente la capacidad infectiva de la bacteria (Marinus & Casadesus, 2009).

En *S. aureus* la influencia de las características epigenéticas en el proceso infeccioso no ha sido estudiada aún y consideramos su estudio como un objetivo de esta tesis. Investigaremos la participación de la metilación en los primeros estadios del establecimiento de la infección y analizaremos cómo los cambios epigenéticos existentes en dos cepas idénticas pueden influir en la cepa que se implantará finalmente en la lesión.



## 2. OBJETIVOS

---



## 2. Objetivos

Los objetivos que nos planteamos para la realización de la tesis doctoral serán los siguientes:

- Estudiar el comportamiento de las islas de patogenicidad de *Staphylococcus aureus* en un proceso evolutivo *in vivo*.
- Identificar los cambios que se producen en el genoma en el proceso de cambio de hospedador de humano a oveja.
- Caracterizar los genes involucrados en la adaptación al hospedador desde el hombre al conejo.



## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

---



### 3. Material y métodos

#### 3.1. Bacterias, plásmidos y medios utilizados en este estudio

Las cepas utilizadas se indican en la tabla 3.1.

Las cepas utilizadas se crecieron rutinariamente en TSB o TSA (caldo de triptona y soja, Scharlau) a 32, 37 o 42 °C durante toda la noche. Cuando fue conveniente se incorporaron al cultivo los antibióticos eritromicina (2,5 µg/ml), cloranfenicol (20 µg/ml) o el producto X-gal (20 mg/ml) (Sigma). Para mantener una copia de reserva de la cepa se guardó como glicerinado (glicerina 15%) a -80°C.

Las cepas de *Escherichia coli* DH5α se crecieron en caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) o en placas de agar Luria-Bertani (Pronadisa) a 37°C de manera rutinaria. Para seleccionar las bacterias con construcción en *E. coli* se utilizó el antibiotico ampicilina (100 µg/ml).

**Tabla 3.1.:** Cepas utilizadas en este estudio

Cepa	Descripción	Referencia
J	Cepa DV3 (JP3934) Aislado por Vancraeynest 2006. A1/II1/δ. MLST121 HV conejo. Francia. 2002. Número de accesión: ERS400835	(Vancraeynest <i>et al.</i> , 2006)
I	KH119 (JP311) Aislado por: U. Lipsinka. A1/II1/δ. MLST121 HV conejo. Bélgica. 1997. Número de accesión: ERS400834	(Vancraeynest <i>et al.</i> , 2006)
IVIA-1	IVIA-1 A1/II1/δ. MLST121 Mamitis de conejo. Valencia. 2003. Número de accesión: ERS400836	(Viana, 2009)
A	A4599 (JP7687) Aislado por Jérôme Etienne. MLST121 Humano. Francia. 1981. Número de accesión: ERS400826	Este estudio
B	ST20070579 (JP7690) Aislado por Jérôme Etienne. MLST121 Humano. EEUU. 2001 Número de accesión: ERS400827	Este estudio
C	HT20020235 (JP7692) Aislado por Jérôme Etienne. MLST121 Humano. España. 2002. Número de accesión: ERS400828	Este estudio
D	HT20030134 (JP7696) Aislado por Jérôme Etienne. MLST121 Humano. Bélgica. 2003. Número de accesión: ERS400829	Este estudio

**Tabla 3.1.:** Cepas utilizadas en este estudio

Cepa	Descripción	Referencia
E	HT20050331 (JP7700) Aislado por Jérôme Etienne. MLST121 Humano. Antillas Menores. 2005. Número de accesión: ERS400830	Este estudio
F	HT20070227 (JP7705) Aislado por Jérôme Etienne. MLST121 Humano. Reino Unido. 2007 Número de accesión: ERS400831	Este estudio
G	ST20101201 (JP7707) Aislado por Jérôme Etienne. MLST121 Humano. India. 2009. Número de accesión: ERS400832	Este estudio
H	E269 (JP3929) Aislado por Jérôme Etienne. A1/II1/δ. MLST121. Humano. Dinamarca. 1957 Número de accesión: ERS400833	Este estudio
DV602	6872/1/10 (JP7966) MLST121. Mamitis de conejo. Italia. 25-Oct-2010. Número de accesión: ERS400837	Este estudio
DL688	DL688 MLST121. Conejo. España. 20-Jun-2007. Número de accesión: ERS400839	Este estudio
DL645	DL645 MLST121. Conejo. España. 20-Jun-2007. Número de accesión: ERS400838	Este estudio
JP8795	<i>J essB<sup>h</sup></i>	Este estudio
JP8779	<i>J matE<sup>h</sup></i>	Este estudio
JP8796	<i>J histidinol<sup>h</sup></i>	Este estudio
JP8348	<i>J rot<sup>h</sup></i>	Este estudio
JP8974	<i>J lipase<sup>h</sup></i>	Este estudio
JP8780	<i>J NADH<sup>h</sup></i>	Este estudio
JP8853	<i>J aspartate<sup>h</sup></i>	Este estudio
JP8816	<i>J urease<sup>h</sup></i>	Este estudio
JP8750	<i>J oxidoreductase<sup>h</sup></i>	Este estudio
JP8613	<i>J ΔhIb</i>	Este estudio
JP9548	<i>J dItB<sup>h</sup></i>	Este estudio
JP8350	<i>I rot<sup>h</sup></i>	Este estudio
JP9014	<i>I ΔhIb</i>	Este estudio
JP10035	<i>I dItB<sup>h</sup></i>	Este estudio

Tabla 3.1.: Cepas utilizadas en este estudio

Cepa	Descripción	Referencia
JP8569	F <i>rot</i> <sup>r</sup>	Este estudio
JP10310	F <i>dltB</i> <sup>r</sup>	Este estudio
JP8897	F Δbacteriofago integrasa tipo 3 ( <i>hIb</i> +) )	Este estudio
JP10770	F <i>dltB</i> <sup>r</sup> T113K	Este estudio
JP10500	F <i>dltB</i> <sup>r</sup> Y260H	Este estudio
JP9692	F <i>dltB</i> <sup>r</sup> *405Y	Este estudio
JP10311	F <i>dltB</i> <sup>r</sup> , <i>Rot</i> <sup>r</sup>	Este estudio
JP8781	J Δ <i>rot</i>	Este estudio
JP9982	J Δ <i>dIb</i>	Este estudio
JP11398	J Δ <i>SpI</i> E	Este estudio
JP11399	F <i>DltB</i> <sup>r</sup> T113K restaurado a <i>DltB</i> <sup>h</sup>	Este estudio
JP8707	DH5α pJP1486 pMAD para restaurar <i>essB</i> de la cepa de conejo ( <i>essB</i> <sup>h</sup> )	Este estudio
JP8708	DH5α pJP1487 pMAD para restaurar <i>matE</i> de la cepa de conejo ( <i>matE</i> <sup>h</sup> )	Este estudio
JP8754	DH5α pJP1488 pMAD para restaurar histidinol de la cepa de conejo (histidinol <sup>h</sup> )	Este estudio
JP8343	DH5α pJP1478 pMAD para restaurar <i>Rot</i> de la cepa de conejo ( <i>rot</i> <sup>h</sup> )	Este estudio
JP8837	DH5α pJP1490 pMAD para restaurar la lipasa de la cepa de conejo (lipase <sup>h</sup> )	Este estudio
JP8676	DH5α pJP1483 pMAD para restaurar NADH de la cepa de conejo (NADH <sup>h</sup> )	Este estudio
JP8678	DH5α pJP1485 pMAD para restaurar aspartate de la cepa de conejo (aspartate <sup>h</sup> )	Este estudio
JP8755	DH5α pJP1489 pMAD para restaurar la ureasa de la cepa de conejo (urease <sup>h</sup> )	Este estudio
JP8677	DH5α pJP1484 pMAD para restaurar la oxidoreductasa de la cepa de conejo (oxidoreductase <sup>h</sup> )	Este estudio
JP8611	DH5α pJP1482 pMAD para deletar el gen <i>hIb</i>	Este estudio
JP8844	DH5α pJP1492 pMAD para restaurar <i>DltB</i> de la cepa de conejo (3SNPs)( <i>dltB</i> <sup>h</sup> )	Este estudio
JP8749	DH5α pJP1491 pMAD para deletar del gen <i>rot</i>	Este estudio
JP8351	DH5α pJP1480 pMAD para introducción de la secuencia de <i>rot</i> de conejo en los clones humanos ( <i>rot</i> <sup>r</sup> )	Este estudio
JP10148	DH5α pJP1496 pMAD para introducción de la secuencia de <i>dltB</i> de conejo en los clones (3SNPs) ( <i>dltB</i> <sup>r</sup> )	Este estudio
JP8408	DH5α pJP1481 pMAD para la deletación del bacteriófago con integrasa tipo 3 ( <i>hIb</i> +) )	Este estudio
JP10312	DH5α pJP1497 pMAD para generación de <i>DltB</i> T113K	Este estudio
JP10319	DH5α pJP1498 pMAD para generación de <i>DltB</i> Y250H	Este estudio
JP9620	DH5α pJP1493 pMAD para generación de <i>DltB</i> *405Y	Este estudio
JP1499	DH5α pJP1493 pMAD para generación de Δ <i>SpI</i> E	Este estudio

**Tabla 3.1.:** Cepas utilizadas en este estudio

Cepa	Descripción	Referencia
OV1	N315 Cepa usada en la infección inicial de las ovejas	(Kuroda <i>et al.</i> , 2001)
OV2	CH3657 Cepas usadas en la infección inicial de las ovejas	(Herbert <i>et al.</i> , 2010)
OV3	ED133 Cepas usadas en la infección inicial de las ovejas	(Guinane <i>et al.</i> , 2010)
OV4	DS74 Cepas usadas en la infección inicial de las ovejas	(Guinane <i>et al.</i> , 2010)
OV5	DS83 Cepas usadas en la infección inicial de las ovejas	(Guinane <i>et al.</i> , 2010)
OV1903	CH3657 con 395 días en oveja (6 pases). Obtenida de la oveja 88596. Colonia 1	Este estudio
OV1918	CH3657 con 340 días en oveja (5 pases). Obtenida de la oveja 18864. Colonia 1	Este estudio
OV1933	CH3657 con 323 días en oveja (5 pases). Obtenida de la oveja 20112. Colonia 1	Este estudio
OV1928	CH3657 con 364 días en oveja (6 pases). Obtenida de la oveja 19136. Colonia 1	Este estudio
OV1953	CH3657 con 338 días en oveja (5 pases). Obtenida de la oveja 19292. Colonia 1	Este estudio
OV1978	N315 con 331 días en oveja (7 pases). Obtenida de la oveja 92697. Colonia 1	Este estudio
OV1983	N315 con 378 días en oveja (7 pases). Obtenida de la oveja 40792. Colonia 1	Este estudio
OV1988	N315 con 402 días en oveja (7 pases). Obtenida de la oveja 270	Este estudio
OV1993	N315 con 333 días en oveja (6 pases). Obtenida de la oveja 23901	Este estudio
OV2023	ED133 con 223 días en oveja (2 pases). Obtenida de la oveja 19280	Este estudio
OV2081	CH3657 con 121 días en laboratorio.	Este estudio
OV2086	CH3657 con 120 días en laboratorio.	Este estudio
OV2077	N315 con 120 días en laboratorio.	Este estudio
OV1955	CH3657 con 338 días en oveja (5 pases). Obtenida de la oveja 19292. Colonia 2	Este estudio
OV1956	CH3657 con 338 días en oveja (5 pases). Obtenida de la oveja 19292. Colonia 3	Este estudio
OV1929	CH3657 con 364 días en oveja (6 pases). Obtenida de la oveja 19136. Colonia 2	Este estudio
OV1930	CH3657 con 364 días en oveja (6 pases). Obtenida de la oveja 19136. Colonia 3	Este estudio
OV1984	N315 con 378 días en oveja (7 pases). Obtenida de la oveja 40792. Colonia 2	Este estudio
OV1985	N315 con 378 días en oveja (7 pases). Obtenida de la oveja 40792. Colonia 3	Este estudio
OV1998	N315 con 370 días en oveja (6 pases). Obtenida de la oveja 19275. Colonia 1	Este estudio
OV1999	N315 con 370 días en oveja (6 pases). Obtenida de la oveja 19275. Colonia 2	Este estudio

**Tabla 3.1.:** Cepas utilizadas en este estudio

Cepa	Descripción	Referencia
OV2000	N315 con 370 días en oveja (6 pases). Obtenida de la oveja 19275. Colonia 3	Este estudio
JP9473	DH5 $\alpha$ pJP1501 para añadir sitio de corte EcoRI en vWbp de la cepa CH3657.	Este estudio
JP10461	DH5 $\alpha$ pBT2 lacZ pJP1502 ArlR ara añadir sitio de corte HindIII de N315 con sitio HindIII.	Este estudio
JP10586	OV2 cuyo vWbp tiene el sitio de corte EcoRI	Este estudio
JP10775	OV1 cuyo ArlR tiene el sitio de corte	Este estudio
OV1938	CH3657 con 261 días en oveja (4 pases). Obtenida de la oveja 6115. Colonia 1	Este estudio
OV1939	CH3657 con 261 días en oveja (4 pases). Obtenida de la oveja 6115. Colonia 2	Este estudio
OV1940	CH3657 con 261 días en oveja (4 pases). Obtenida de la oveja 6115. Colonia 3	Este estudio
OV1904	CH3657 con 395 días en oveja (6 pases). Obtenida de la oveja 88596. Colonia 2	Este estudio
OV1905	CH3657 con 395 días en oveja (6 pases). Obtenida de la oveja 88596. Colonia 3	Este estudio

### 3.2. Métodos de biología molecular

#### 3.2.1. Extracción del ADN genómico

La extracción del ADN cromosómico se realizó mediante el kit “Genelute bacterial genomic DNA” de Sigma, siguiendo las instrucciones del fabricante, excepto porque las bacterias se lisaban previamente con lisostafina (Sigma; 12,5 $\mu$ g/ml) a 37°C durante una hora.

#### 3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa.

Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó un termociclador modelo Techne Progene. La mezcla de reacción contenía 2 mM de ión Mg<sup>2+</sup>, 200  $\mu$ M de cada uno de los nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP. Amersham Pharmacia), 200 nM de cada uno de los cebadores (Tabla 3.2.), 0,5 unidades de ADN polimerasa (Taq Polimerasa HiFi o DreamTaq DNA Polimerasa -Thermo Scientific-), 40 a 80 ng de ADN purificado y agua hasta un volumen final de 25  $\mu$ l.

**Tabla 3.2.:** Oligonucleótidos usados en este estudio.

Plásmido	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')
pJP1478	Rot-1mB	CGCGGATCCCTTGAAAAATAACCAATTTAGCC
	Rot-2c	GTTCTTTCATCGTCGACAGGACGCTCTTTTGAAATCCATTC
	Rot-3m	GAATGGATTACTAAAGAGCGTCCTGTCGACGATGAAAGA AC
	Rot-4cE	CCGGAATTCGATTTAGCTTTGGAAAATACACG
pJP1480	Rot-1mB	CGCGGATCCCTTGAAAAATAACCAATTTAGCC

**Tabla 3.2.:** Oligonucleótidos usados en este estudio.

Plásmido	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')
	Rot-5c	GTTCTTTCATCGTCGACAGGACGCTCTTT GTAATCCATTC
		GAATGGATTAC
	Rot-6m	AAAGAGCGTCCTGTGACGATGAAAGAAC
	Rot-4cE	CCGGAATTCGATTTAGCTTTGGAAAATACACG
pJP1481	h1b-1mB	CGCGGATCCCAGTATATTTGCTTGCTTCG
	h1b-4cE	GGAATTCGCCTGTAAGTGTGTCTGAAGG
pJP1482	h1b-1mB	CGCGGATCCCAGTATATTTGCTTGCTTCG
	h1b-2c	TTTACCATCATTATCACTCC
	h1b-3m	GGAGTGATAATGATGGTAAAGATCATTACCCAATCAAAG CC
	h1b-4cE	GGAATTCGCCTGTAAGTGTGTCTGAAGG
pJP1483	NADH-1mBglII	GAAGATCTAAGCGGATTAACAACAGACCG
	NADH-2c	CGTGAGGCATGGATCCTTTATGACGTTACGTTGTACAATG G
	NADH-3m	CCATTGTACAACGTGAACGTCATAAAGGATCCATGCCTCAC G
	NADH-4cE	GGAATTCGTGAAACAGCATGTTTCATTAGG
pJP1484	oxidoreductase-1mB	CGCGGATCCTAAGTTCCTAGGAAGATTGGG
	oxidoreductase-2c	GCTACACAGTTCCTCGAATTCCTTTGGTCTAATTC
	oxidoreductase-3m	GAATTAGGACCAAAGGAATTCGAGTGAAGTGTGTAGC
	oxidoreductase-4cS	ACGCGTCGACATCAGTACTTCTACGGGCAGC
pJP1485	Aspartate-1mS	ACGCGTCGACAGATTACTGTCTGCTAACAGC
	Aspartate-2c	CACAAGGTATTTGATTACTAACAGCAAGTGCCACAGCGGT CGTATCGGATCCACCTCTGCC
	Aspartate-3m	GGCAGAGGTGGATCCGATACGACCGCTGTGGCACTTGCTG TTAGTAATCAAATACCTTGTG
	Aspartate-4cE	GGAATTCCTTTTCTACCGCTTGTTGCC
pJP1486	essB-1mB	CGCGGATCCGCGGACTTAATATTGATGTGC
	essB-2c	CCATCAGCGATTTGATAATCGATGAGTCGATCATTTTCAAC
	essB-3m	GTTGAAAATGATCGACTCATCGATTATCAAATCGCTGATGG
	essB-4cE	GGAATTCGTTGTCATACCGATAGCAACC
pJP1487	MatE-1mS	ACGCGTCGACGTTGTTGTGTTGATTCAACGC
	MatE-2c	GTGAATCCCATTAAGATACTCATTAAAAATGCAGGGATCCC TATTTTAAAG
	MatE-3m	CTTAAAAATAGGGATCCCTGCATTTTAAATGAGTATCTTAAT GGGATTCAC
	MatE-4cE	GGAATTCACCATAATCTACGCGACCACC
pJP1488	histidinol-1mB	CGCGGATCCAACATCCAGAAATTAAGAAACCG
	histidinol-2c	CTGCTCTAGAAATCATTAAATATAAC
	histidinol-3m	GTTATATTAATGATTTCTAGAGCAG
	histidinol-4cE	GGAATTC AATTGTAATTCTAACACCAGTTGG
pJP1489	urease-1mB	CGCGGATCCGTTCCGATTCACAGGCAATGG
	urease-2c	GCTTTTGTCTTCTGAATTCGACAAATTGGCAATATTGCC

Tabla 3.2.: Oligonucleótidos usados en este estudio.

Plásmido	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')
pJP1490	urease-3m	GGCAATATTGCCAATTTGTCGAATTCAGAAAAACAAAAGC
	urease-4cS	ACGCGTCGACGATACCAAGCAATCCATGGGC
	lipase-1mS	ACGCGTCGACGTTGTTGTGTTGATTCAACGC
	lipase-2c	CGTTGTCGATTGGGATCCATTACGTTACAGCATGACGGGTAT TTTGAACCTGATCATTGG
	lipase-3m	CCAAAATGATCAGTTCAAATACCCGTCATGCTGAACGTA ATGGATCCCAATCGACAACG
lipase-4cE	GGAATTCACCATAATCTACGCGACCACC	
pJP1491	Rot-12mB	CGCGGATCCACGATGGCTCATATTCATGAC
	Rot-13c	AACAAACATCCCAACAATCCC
	Rot-14m	GATTGTTGGGATGTTTGT ATTGCTGTGTAAGTTTAATAGC
	Rot-15cE	GGAATTCGAAATCTTATCAAGGCTTGCG
pJP1492	Lipoteichoic-1mB	CGCGGATCCGGCTACAGAATGGAATTAGAAG
	Lipoteichoic-2c	CTTTGTAACACTTTCACTAGTGCTAATGGCAATATTG
	Lipoteichoic-3m	CAATATTGCCATTAGCACTAGTGAAAGTGTACAAAG
	Lipoteichoic-6c	CTCCTTTATTATATAAGCTTACCTGAGAAGATTA AAAAGC
	Lipoteichoic-5m	GCTTTTTAATCTTCTCAGGTAAGCTTATATAATAAAGGAG
	Lipoteichoic-4cE	CCGGAATTCGAAACTGTAATAAACGTTGTGC
pJP1493	lipoteichoic-11mB	CGCGGATCCAATTC AATTTATTTTCATTCTTCCC
	lipoteichoic-13c	CTCCTTTAATATATAAGCTTACCTGAGAAGATTA AAAAGC
	lipoteichoic-12m	GCTTTTTAATCTTCTCAGGTAAGCTTATATATTA AAGGAG
	Lipoteichoic-4cE	CCGGAATTCGAAACTGTAATAAACGTTGTGC
pJP1494	lipoteichoic-11mB	CGCGGATCCAATTC AATTTATTTTCATTCTTCCC
	Lipoteichoic-6c	CTCCTTTATTATATAAGCTTACCTGAGAAGATTA AAAAGC
	Lipoteichoic-5m	GCTTTTTAATCTTCTCAGGTAAGCTTATATAATAAAGGAG
	Lipoteichoic-4cE	CCGGAATTCGAAACTGTAATAAACGTTGTGC
pJP1495	DltB-1mS	ACGCGTCGACCGCTTAATGAAGAACAGTATGG
	DltB-2c	CTGAGAAGATTA AAAAGCCAACCGTTAATTACCTCTGCAAT TT
	DltB-3m	TTGGCTTTTTAATCTTCTCAGG
	Lipoteichoic-4cE	CCGGAATTCGAAACTGTAATAAACGTTGTGC
pJP1496	Lipoteichoic-1mB	CGCGGATCCGGCTACAGAATGGAATTAGAAG
	lipoteichoic-22c	CCTAACCATTTACTTTGTAACACTTTCACTAGTGCTAATGGC AATATTG
	lipoteichoic-21m	CAATATTGCCATTAGCACTAGTGAAAGTGTACAAAGTAAA TGGTTAGG
	lipoteichoic-13c	CTCCTTTAATATATAAGCTTACCTGAGAAGATTA AAAAGC
	lipoteichoic-12m	GCTTTTTAATCTTCTCAGGTAAGCTTATATATTA AAGGAG
	Lipoteichoic-4cE	CCGGAATTCGAAACTGTAATAAACGTTGTGC
pJP1497	Lipoteichoic-1mB	CGCGGATCCGGCTACAGAATGGAATTAGAAG
	lipoteichoic-22c	CCTAACCATTTACTTTGTAACACTTTCACTAGTGCTAATGGC AATATTG
	lipoteichoic-21m	CAATATTGCCATTAGCACTAGTGAAAGTGTACAAAGTAAA TGGTTAGG
	lipoteichoic-20cE	CCGGAATTCGATACCATGCCAAATCCC
pJP1498	lipoteichoic-16mB	CGCGGATCCAACGGATGATTCCATATGGTG

**Tabla 3.2.:** Oligonucleótidos usados en este estudio.

Plásmido	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')
	lipoteichoic-18c	GTCAAAGAATAAATGTAAGCTGTATGCGTACATATATAACC ACAAATTGACAAAGCCATGGAAGTCTAATTGTAA
	lipoteichoic-17m	TTACAATTAGACTTCCATGGCTTTGTCAATTTGTGGTTATAT ATGTACGCATACAGCTTACATTTATTCTTTGAC
	lipoteichoic-19cE	CCGGAATTCCTTCAAAAATTTCTACGTCTGG
pJP1499	SplE-1mB	CGCGGATCCAGCATCATGAATAAACAGAGG
	SplE-2c	ATGTGCAATGATATGTGCGCC
	SplE-3m	GCGCACATATCATTGCACATTGTTCACTTTGGTGGTAACGG
	SplE-4cE	CCGGAATTCAGGATTGGGTGAATGTCTAAG
pJP1501	vWbp8325-1mS	ACGCGTCGAC GGGATTATTAGCATCAATAGG
	vWbp8325-2c	CAATTTCTTTTAAGAATTCCTCACTTTGTTTTTC
	vWbp8325-3m	GAAAAACAAAGTGAGGAATTCCTAAAAGAAATTG
	vWbp8325-4cB	CGCGGATCC ATTTGTTGCTGAGTTTGACGC
pJP1502	ArIRN315-1mB	CGCGGATCC GCAATCAGAATTAACAGAATGC
	ArIRN315-2c	CGATCGTATGGTTAAGCTTGTTTCGTAAATATC
	ArIRN315-3m	GATATTTACGAAACAAGCTTAAACCATACGATCG
	ArIRN315-4cS	ACGCGTCGAC GAATAATTTGTAATGGTGTTCG

Una alícuota de 5 µl del producto de PCR de cada gen era analizada por electroforesis en un gel de agarosa (Molecular Netline, Need) al 1% en tampón Tris-Acetato-EDTA pH=8,3 (0,4 M Tris, 0,01 M EDTA, 0,2M ácido acético), en presencia de bromuro de etidio (Apex) y eran fotografiados bajo luz UV.

### 3.2.3. Mutagénesis por recombinación

Para conseguir insertar las variantes de los genes de las cepas humanas en las cepas de conejo, se procedió a la creación de plásmidos de recombinación usando el vector pMAD (Arnaud *et al.*, 2004) (Tabla 3.3.) Si la cepa era resistente a eritromicina 2,5µg/ml, como en el caso de N315, se utilizó el vector pBT2 con resistencia a cloranfenicol 10µg/ml y el gen lacZ (Bruckner, 1997). El protocolo empleado fue el mismo para los dos casos. Una vez el plásmido se encontraba en la cepa a mutar, se sometía a los cultivos a 32°C con el antibiótico al que resistía el plásmido para permitir la recombinación y se sembraron en placas de TSA con antibiótico y X-Gal y se hacían crecer a 42°C para impide la replicación del plásmido extracromosomal. En estas placas, las colonias azules más claras habían integrado el plásmido. Éstas se volvían a hacer crecer toda la noche a 32°C sin antibiótico y cuando se sembraban en placas de TSA-X-Gal y eran blancas, obteníamos alrededor de un 50% de colonias en las que la recombinación había sido exitosa.

Tabla 3.3.: Plásmidos usados en este estudio

Plásmido	Descripción	Referencia
pMAD	Vector lanzadera con origen termosensible para <i>S. aureus</i> , gen de resistencia a erm y el gen lacZ	(Arnaud <i>et al.</i> )
pBT2	Vector lanzadera con origen termosensible para <i>S. aureus</i> , gen de resistencia a cat y el gen lacZ	(Bruckner, 1997)
pJP1486	pMAD para restauración de <i>essB</i> de conejo ( <i>essB<sup>h</sup></i> )	Este estudio
pJP1487	pMAD para restauración de <i>matE</i> de conejo ( <i>matE<sup>h</sup></i> )	Este estudio
pJP1488	pMAD para restauración del gen histidinol-phosphate aminotransferase de conejo (histidinol-phosphate aminotransferase <sup>h</sup> )	Este estudio
pJP1478	pMAD para restauración de <i>rot</i> de conejo ( <i>rot<sup>h</sup></i> )	Este estudio
pJP1490	pMAD para restauración del gen lipase de conejo(lipase <sup>h</sup> )	Este estudio
pJP1483	pMAD para restauración del gen NADH dehydrogenase de conejo (NADH <sup>h</sup> )	Este estudio
pJP1485	pMAD para restauración del gen aspartate kinase de conejo (aspartate kinase <sup>h</sup> )	Este estudio
pJP1489	pMAD para restauración del gen urease de conejo (urease <sup>h</sup> )	Este estudio
pJP1484	pMAD para restauración del gen oxidoreductase de conejo (oxidoreductase <sup>h</sup> )	Este estudio
pJP1482	pMAD para delección de <i>hIb</i> ( $\Delta hIb$ )	Este estudio
pJP1492	pMAD para restauración de la secuencia del <i>dIb</i> humano en clones de conejo. DItB <sup>h</sup> (K113T, H250Y, Y405*)	Este estudio
pJP1480	pMAD para intercambio de la secuencia de <i>rot</i> en clones humanos por la secuencia de conejo. ( <i>rot<sup>f</sup></i> )	Este estudio
pJP1496	pMAD para intercambio de la secuencia de <i>dIb</i> en clones humanos por la secuencia de conejo. DItB <sup>f</sup> (T113K, Y250H, *405Y)	Este estudio
pJP1481	pMAD para restauración de <i>hIb</i> humano (delección del bacteriofago con integrasa tipo 3)	Este estudio
pJP1497	pMAD para generación de DItB T113K	Este estudio
pJP1498	pMAD para generación de DItB Y250H	Este estudio
pJP1493	pMAD para generación de DItB *405Y	Este estudio
pJP1491	pMAD para delección de <i>rot</i> ( $\Delta rot$ )	Este estudio
pJP1495	pMAD para delección de <i>dIb</i> ( $\Delta dIb$ )	Este estudio
pJP1494	pMAD para generación de DItB Y405*	Este estudio
pJP1499	pMAD para delección de <i>spE</i> ( $\Delta spE$ )	Este estudio
pJP1501	pMAD para introducción del sitio de corte EcoRI en el pseudogen <i>vwb</i> de CH3657	Este estudio
pJP1502	pBT2 para introducción del sitio de corte HindIII en el pseudogen <i>ar/R</i> de N315	Este estudio

Para realizar el seguimiento de los SNPs modificados o únicamente añadir sitios de corte en los genes, introdujimos cambios nucleotídicos que generaban sitios de corte sin modificar el patrón de lectura de la proteína (Tabla 3.4.).

**Tabla 3.4.:** Sitios de restricción creados en los genes de las cepas restauradas.

Anotación	Distancia (nucleótidos)	Cambio de nucleótido	Sitio de restricción en gen <sup>h</sup>
EssB	72	ATTGAT → ATCGAT	Clal
MatE	26	GATTC → GGATCC	BamHI
Histidinol-phosphate aminotransferase	-		Se crea XbaI
Rot (repressor of toxins)	14	GTTGAC → GTCGAC	Sall
Lipase precursor	34	GGATCA → GGATCC	BamHI
Conserved hypothetical protein (NADH dehydrogenase superfamily)	22	GGATCA → GGATCC	BamHI
Aspartate kinase II	33	GGTCC → GGATCC	BamHI
Urease accessory protein	5	AAATTC → GAATTC	EcoRI
Probable oxidoreductase	15	GAATTA → GAATTC	EcoRI
DltB 1 <sup>er</sup> SNP	20	ACTTGT → ACTAGT	SpeI
DltB 2 <sup>o</sup> SNP	46	ACATGG → CCATGG	NcoI
DltB 3 <sup>er</sup> SNP	9	AACTT → AAGCTT	HindIII
N315 ArIR	-	AAGTTA → AAGCTT	HindIII
CH3657 vWbp	-	GAGTTC → GAATTC	EcoRI

### 3.2.4. Transformación de *E. coli*.

#### 3.2.4.1. Preparación de células competentes por el método del CaCl<sub>2</sub>.

A partir de una colonia de *E. coli* DH5 $\alpha$  aislada en una placa reciente, se inocularon 10 ml de medio LB y se crecieron durante toda la noche a 30°C. Al día siguiente, se usaron 4 ml de este cultivo para inocular 400 ml de LB. Se crecieron en agitación a 37°C hasta DO<sub>600</sub> entre 0,3 - 0,4. Se enfriaron rápidamente en baño de agua-hielo y se centrifugaron 10 minutos a 4000 rpm y 4 °C. El botón celular se resuspendió en 80 ml de solución salina fría y se mantuvo 30 minutos - 2 horas en hielo. Se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron las células en 16 ml de solución salina complementada con glicerol 15%, previamente enfriado. En este estado permanecían toda la noche. Se repartían alícuotas de 200  $\mu$ l en tubos de microcentrífuga previamente enfriados, congelándolas inmediatamente en un baño de nitrógeno líquido. Las alícuotas se guardaron a -80°C hasta su uso.

### **3.2.4.2. Transformación por choque térmico.**

Se descongeló una alícuota de células competentes lentamente en hielo y se añadió el ADN (plásmido purificado o ligación) incubando durante 30 minutos en hielo. El choque consistió en pasar la muestra bruscamente a baño de 42°C, donde se incubaba 90 segundos y enfriar de nuevo rápidamente en el hielo durante 2 minutos. Se resuspendieron las células en 600 µl de medio LB (Sambrook *et al.*, 1989), se incubaron 60 minutos a 37°C en agitación y se sembraron en placas LB con ampicilina 100µg/ml.

### **3.2.5. Electroporación de *S. aureus*.**

La transformación de especies Gram-positivas con ADN foráneo presenta gran dificultad debido a las especiales características de su pared celular. Ello obliga a recurrir a la electroporación como método de transformación para *S. aureus*. Para la transformación nos basamos en el protocolo descrito por Schenk (Schenk & Laddaga, 1992) con algunas modificaciones.

#### **3.2.5.1. Preparación de *S. aureus* electrocompetentes.**

Se realizó una dilución 1/50 a partir de un cultivo estacionario de RN4220 en 100 ml de medio LB y se incubó a 37°C, a 120 rpm, hasta alcanzar una DO<sub>540</sub> de 0,2. Las bacterias se enfriaron 10 minutos en hielo y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 minutos 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.

#### **3.2.5.2. Condiciones de electroporación.**

Se utilizaron cubetas de electroporación de 1 mm (Bio-Rad) en las que se mezclaron 50 µl de bacterias competentes con 1 µl de plásmido concentrado, resuspendido en H<sub>2</sub>O 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 seleccionaron 2,5 Kv de voltaje, 25 µF de capacitancia y la resistencia se fijó a 100 Ω.

Inmediatamente después del pulso se añadió 600 µl de TSB. Tras una hora a 37°C para su recuperación, el cultivo se sembró en placas de TSA con 2,5µg/ml de eritromicina o cloranfenicol 10µg/ml respectivamente.

### 3.2.6. Extracción de plásmido

El ADN plasmídico se extrajo utilizando el kit “Genelute plasmid miniprep” (Sigma) siguiendo el protocolo del fabricante, excepto que, al igual que en la extracción de ADN genómico, Los cultivos de *S. aureus* se lisaban previamente con lisostafina (Sigma, 12,5 µg/ml) a 37°C durante 1 hora

### 3.2.7. Movilización de plásmidos entre cepas

En el caso de las cepas ST121, se observó empíricamente que el mejor método era transducir el plásmido con ayuda del bacteriófago 71. En el caso de las cepas N315 y CH3657, se usó el  $\phi 80\alpha$ .

#### 3.2.7.1. Inducción de cepas

De un cultivo crecido a 37°C durante toda la noche, se tomó una alícuota y se dejó crecer hasta  $DO=0,3-0,4$ . Se añadió mitomicina (2µg/ml) y se dejó crecer entre 4 horas y toda la noche a 32°C, 80 rpm hasta que el cultivo dejara de estar turbio. Posteriormente se filtraba con un filtro de 0,2µm de diámetro de poro, para eliminar los residuos bacterianos.

#### 3.2.7.2. Infección de cepas

Una dilución 1:50 en TSB del cultivo de toda la noche de las bacterias donadoras se ponía a crecer a 37°C hasta que alcanzara  $DO_{650}$  de 0,15. Entonces se centrifugó 5 minutos a 4000 rpm y se resuspendió el botón celular en la mitad de volumen de TSB y la otra mitad de Phage Buffer (0,1MMgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> 1M, Tris 2,5M pH=7,8, NaCl 0,059g/ml). Añadimos 100µl de lisado fágico y se incubó durante 4 horas o toda la noche, hasta que el cultivo estuviera claro. Posteriormente se filtraba con un filtro de 0,2µm de diámetro de poro, para eliminar los residuos bacterianos.

#### 3.2.7.3. Transducción de cepas

Se medía la  $DO_{540}$  de un cultivo de toda la noche de las bacterias aceptoras y se diluía hasta obtener  $DO_{540}$  de 1,4. Se añadía CaCl<sub>2</sub> hasta dejarlo a 4,4 mM. 1ml de este cultivo se mezclaba con 100µl del lisado que transporta el plásmido. Se dejó a 37°C 30 minutos y se sembraba en placa con el antibiótico correspondiente. Por transducción generalizada, el plásmido que se transporta les dará a las bacterias resistencia y serán sólo estas las que serán capaces de crecer en la placa.

### 3.2.8. Selección de los mutantes

Seguimos el método de recombinación de (Arnaud *et al.*, 2004). Se seleccionaron colonias blancas sin resistencia antibiótica tras la segunda recombinación y se efectuó una PCR de la zona a mutar de un tamaño menor de 700 pb. Posteriormente, en el caso de que fuera necesario para la discriminación, se realizaba la digestión del producto de PCR con el enzima adecuado. (Tabla 3.4) (Roche, Fermentas) En el caso de la selección de las quimeras de DltB, las PCRs para discriminar cada sitio de corte se realizaban por separado. Tras la obtención de positivos, se extrajo ADN de ese clon y se utilizó como molde para realizar una PCR que cubría toda la zona recombinada que se llevó a secuenciar.

### 3.2.9. Tipado por MLST (MultiLocus Sequence Typing)

Siguiendo el método descrito por (Enright *et al.*, 2000) se amplificaron por PCR los siete genes constitutivos utilizados para este tipado: *arc* (Carbamate kinase), *aro* (Shikimate dehydrogenase), *glp* (Glycerol kinase), *gmk* (Guanylate kinase), *pta* (Phosphate acetyltransferase), *tpi* (Triosephosphate isomerase), *yqi* (Acetylcoenzyme A acetyltransferase). Posteriormente se secuenciaron y compraron con la base de datos contenida en la página web <http://saureus.mlst.net/>. Las cepas analizadas se seleccionaron sólo en el caso de que fueran ST 121, cuya combinación de alelos era la siguiente:

ST	<i>arc</i>	<i>aro</i>	<i>glp</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqi</i>
121	<u>6</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>2</u>	<u>7</u>	<u>14</u>	<u>5</u>

### 3.2.10. Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR se secuenciaron en el IBMCP-UPV donde se resolvía la secuencia mediante la amplificación por el método de Sanger marcado por fluorocromos, con los cebadores utilizados para la PCR, en un secuenciador automático modelo ABI377 (PE Biosystems; Foster City, California).

### 3.2.11. Purificación y precipitación del ADN para secuenciación en masa

Para la secuenciación, tras obtener el ADN cromosómico bacteriano se añadió el mismo volumen de fenol-cloroformo alcohol isoamílico 25|24|1. Tras centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos, se recuperaba el sobrenadante. En nuevo tubo se le añadió 1/10 de su volumen de Acetato Sódico 3M pH=5,2. Tras mezclar suavemente, se añadió 2,25 volúmenes de etanol 100 % frío. Se volteó suavemente y se mantuvo 30 minutos a -80 °C. Se centrifugó a 13000 rpm 20 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante para limpiar el

precipitado con etanol 70 %. Se centrifugó durante 5 minutos a 4 °C a 13000 rpm y se eliminó el sobrenadante, dejando secar el precipitado toda la noche. Finalmente se resuspendió en TE (Tris-EDTA).

### **3.3. Secuenciación genómica**

#### **3.3.1. Secuenciación de la cepa IVIA-1**

Para la secuenciación completa del genoma de *S. aureus* se extrajo una muestra de ADN conforme al protocolo descrito con anterioridad. En un gel de agarosa al 2 % se corrió una alícuota de la muestra para comprobar que no existía degradación.

En el caso de la cepa IVIA-1, una muestra de 10 µg de ADN se envió a la empresa 454 Life Science Corporation (Bradford, Connecticut, EEUU) para secuenciarla mediante pirosecuenciación. El resto de la muestra se empleó para completar las secuencias inciertas de ADN (“gaps”) mediante secuenciación de fragmentos.

#### **3.3.2. Análisis computacional de IVIA-1**

Las secuencias obtenidas mediante la secuenciación de productos de PCR se analizaron con los programas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 2.0 del servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul *et al.*, 1997) y el programa Vector NTI (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California). La secuencia genómica de IVIA-1 fue anotada y comparada con otros genomas disponibles mediante el programa online RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (<http://rast.nmpdr.org>), en el apartado compare/sequence based. (Glass *et al.*, 2010)

### **3.4. Selección de las cepas ST121**

La selección de cepas a secuenciar se realizó en base a cuatro parámetros. El primero fue el hospedador; ST121 es el genotipo más ampliamente aislado de infecciones cunícolas. Así mismo, crecientes casos de ST121 se están descubriendo en infecciones humanas, siendo un problema el acuciante número de casos MRSA relacionados con este MLST.

El segundo de los requisitos fue la localización de las cepas: En el caso de conejo, ya que la cepa IVIA-1 había sido aislada en Valencia, España, se decidió seleccionar aislados de otros países; se secuenciaron dos cepas de Francia y Bélgica. Para las humanas, la mayor variabilidad posible se dio en este punto, la selección fue de cepas de Francia, EE.UU., España, Bélgica, Las Antillas, Reino Unido e India.

En tercer lugar, se eligieron por el año de aislado. Puesto que entre las posibles cepas, para una misma procedencia había diferentes años de la toma de muestra, se escogieron los aislados más antiguos con la intención de comparar la evolución dentro del MLST de los elementos genéticos móviles y su adquisición a lo largo del tiempo.

Por último, el tipado en base a la amplificación por PCR y RFLP de *coa* y *spa* y la amplificación por PCR del gen *clfB*, que se había realizado con anterioridad sobre las cepas de conejo y que proporciona para un mismo ST una aproximación mayor a la filogenia de las cepas. Se seleccionaron las cepas que tenían tipados diferentes en este aspecto.

A lo largo de la evolución, pequeñas mutaciones puntuales pueden ocasionar la disrupción del patrón de lectura originando secuencias, codificantes o no, con una alta homología a genes funcionales. Mediante análisis *in silico*, analizaremos las secuencias, esperando, si nuestra hipótesis es válida que los genomas de las cepas humanas, al haber tenido más trayectoria evolutiva, presenten un mayor número de ellos (Lerat & Ochman, 2005).

#### **3.4.1. Secuenciación de las cepas ST121**

Para la secuenciación del resto de cepas ST121, las muestras se enviaron al Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP), donde se secuenciaron al menos 2 µg de cada muestra con el secuenciador FLX+System (Roche 454) y se ensamblaron mediante Roche GS De Novo Assembler v2.6. Para disminuir el número de contigs, posteriormente se enviaron 50 µg del ADN a Lifesequencing S.L. para secuenciar por la técnica paired-ends en Illumina HiSeq y ensamblándolos con Velvet v1.2.08.

#### **3.4.2. Análisis computacional**

Los contigs se alinearon usando el algoritmo Mauve progresivo, filtrado para bloques colineares de más de 1000 nucleótidos y los gaps se eliminaron. El alineamiento se llevó a cabo por recombinación usando BRATNextGen, excluyendo las regiones predichas como recombinantes de los siguientes análisis filogenéticos. Los genes específicos de los aislados de conejo se identificaron comparando sus secuencias genómicas con las de las cepas humanas usando la función `print_novel_contigs` function de `cortex_var` v1.0.5.20.

Los genomas se alinearon con la cepa ED133 (número de accesoión NC\_017337.1). Se tuvieron en cuenta como mutaciones puntuales o indels, sólo en el caso de que esas regiones tuvieran una calidad de mapeo estándar y estuvieran cubiertas por más de 30 lecturas

(scores). Cuando se predijeron mutaciones, se analizaron manualmente en Integrative Genomes Viewer (Robinson *et al.*, 2011). La presencia o ausencia de factores de virulencia se confirmó mediante comparaciones en BLAST.

### **3.4.3. Análisis bayesianos evolutivos**

Basándonos en el alineamiento del genoma “core” generado por Mauve, se reconstruyó la filogenia de ST121 usando el programa BEAST v1.6.1 con el modelo de sustitución nucleotídica GTR (General time-reversible), una corrección gamma para la tasa de heterogeneidad y un horizonte previo de árbol coalescente. Simultáneamente, utilizamos una distribución lognormal no relacionada para modelar la tasa de evolución y limitamos los extremos de la filogenia a las fechas de aislado para calibrarla (Drummond *et al.*, 2006). Las probabilidades posteriores se estimaron de 3 muestras de cadenas de Markov-MonteCarlo (MCMC) independientes de 3 análisis independientes, cada uno ejecutado  $1 \times 10^8$  repeticiones, con muestreo cada 1000 generaciones y un 10% de descarte como burn-in.

### **3.4.4. Análisis estadísticos**

Todos los datos se almacenaron en hojas de datos Excel 2010 (Office) y los parámetros estadísticos se calcularon utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1.

## **3.5. Infección animal**

### **3.5.1. Infección en conejos**

#### **3.5.1.1. Preparación del inóculo**

En el caso de la infección en piel de conejo, de un cultivo de toda la noche se realizó una dilución 1:50 en TSB estéril y se dejó crecer a 37°C 120 rpm durante 6 horas, en donde las bacterias se encuentran en una fase exponencial tardía. (D.O.  $A_{600} \approx 0,8$ ). Se recogieron 2 ml del cultivo y se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 5 minutos. Se resuspendieron y lavaron las células dos veces con tampón sodio-fosfato. Finalmente se resuspendieron en PBS y se midió su densidad óptica. Se calculó el número de bacterias presentes en la resuspensión, teniendo en cuenta que  $1 \text{ D.O.}_{600} = 4.9 \times 10^9$  ufc de *S. aureus*. Se realizaron diluciones seriadas en PBS para conseguir obtener las ufc/ml deseadas. Antes de infectar, se sembraron 100  $\mu\text{l}$  en placas de TSA para comprobar que la infección se realizara con el inóculo correspondiente.

### **3.5.1.2. Infección intradérmica en conejo.**

Se seleccionaron conejos albinos de dos meses de edad. Para infectarlos, se sedaron con una combinación de ketamina y xylazina y se les afeitó el lomo. Usando una jeringuilla de 1ml con aguja de 25G, se inocularon 100µl de cultivo en la dermis. Cada animal se inoculó por duplicado con la cepa a testar y una cepa de control, habitualmente la cepa original. Cada cepa testada se infectó en un mínimo de 20 conejos. El día 7 se eutanasiaron los conejos mediante inyección intravenosa con barbitúrico (Dolethal, Vétoquinol). De todos los puntos de inoculación se tomó una muestra mediante hisopos estériles para su cultivo y posterior comprobación.

### **3.5.1.3. Examen macroscópico e histológico de las lesiones.**

Durante los 7 días de infección se fue controlando la evolución de las lesiones visualmente y mediante palpación. Se midieron la longitud y anchura de las lesiones y se evaluó la presencia de necrosis de la epidermis. Tras el examen post mórtem y la toma de muestra microbiológica, se tomaron muestras de piel para realizar un estudio histológico. Las muestras se procesaron de forma rutinaria y se tiñeron mediante la tinción de hematoxilina-eosina y la tinción de Gram. Las lesiones estudiadas se clasificaban en cuatro grupos según su tamaño y evolución: negativo, leve, moderado y severo.

## **3.5.2. Infección en ovejas.**

### **3.5.2.1. Preparación del inóculo para ovejas.**

El protocolo de preparación es el mismo que el que se utilizaba para conejos (apartado 3.5.1.1.). En el caso de la primera infección en mama de oveja, las bacterias sólo se dejaron crecer tras la dilución del cultivo de toda la noche durante 2 horas, llegando a una D.O de 0,3-0,4.

Para el caso de las coinfecciones, los inóculos se preparaban de igual manera por separado y se juntaban en el momento de realizar la dilución para cargar las jeringuillas. En los casos en que se enfrentaban cepas humanas evolucionadas y originales, las 3 colonias crecidas en TSB durante toda la noche de las cepas evolucionadas se juntaban a la hora de recoger pellet. Se mezclaban 750 µl de cada una en el mismo eppendorf y se centrifugaban. Para juntarlas con la cepa original se preparaban los inóculos por separado y se juntaban en la última dilución antes de cargar las jeringuillas. En todos los casos en los que participaba

más de una bacteria en la misma infección, se sembraron los inóculos del total de bacterias, así como también un inóculo equivalente de cada una de las bacterias participantes.

### **3.5.2.2. Infección en glándula mamaria de oveja**

Las infecciones en la glándula mamaria se realizaron a través del pezón. Previamente a la infección, las ovejas se mantuvieron 2 horas separadas de los corderos en distintos parques. A la hora de la infección, el pezón se esterilizó con ayuda de etanol 70% y se limpió con papel. Se descartaron los primeros chorros de leche y mediante una cánula estéril (bovivet) se introdujo 1 ml de PBS con la cantidad de bacterias a inocular a través del pezón, extrayendo después la cánula con cuidado. Sujetando la abertura del pezón para mantenerlo cerrado, se masajó para movilizar el inóculo hacia la parte superior de la mama y evitar que escapase. Para asegurar la persistencia de la bacteria en la mama y evitar que los corderos mamasen y se perdiera la infección, se les mantuvo separados de sus madres hasta 4 horas después (Cucarella *et al.*, 2002).

### **3.5.2.3. Muestreo de leche de oveja.**

La toma de muestra se realizó siempre en tubos estériles previamente rotulados. Los corderos se separaron 2 horas antes del muestreo para facilitar el ordeño. De cada oveja se tomó leche de ambas mamas, como control, ya que sólo se había infectado una de ellas. En las siguientes dos horas, se sembraron las muestras de la mama infectada en agar-sangre y en TSB las de la mama control. En los casos en los que las muestras tuvieron un recuento muy elevado de bacterias, se realizó un nuevo muestreo y se diluyó la leche para obtener colonias aisladas. Así mismo, de cada muestreo se guardó 1 ml de leche con glicerol 15% (867µl de leche + 133µl de glicerol 75%), porcentaje óptimo de conservación para *S. aureus* en leche (Hunt, 2003)

### **3.5.2.4. Infecciones 2ª a 7ª de ovejas.**

Para evitar el efecto de la deriva genética quisimos re infectar con la mayor cantidad de bacterias posibles. Para ello, de los crioviales con la leche guardada el último día de la infección anterior en el caso de las cepas humanas, rascamos fragmentos con un asa de nicromo estéril sin que llegaran a descongelarse. Estas gotas se descongelaron en una placa de agar sangre y se repartieron mediante bolas estériles de cristal. La cantidad de leche que se depositó en la placa dependió de la concentración de bacterias calculada el día que se guardó. Al día siguiente, se recogieron de 50 a 100 colonias de cada una de las placas de

agarsangre. Se resuspendieron en PBS y se lavaron 2 veces con PBS (3500 rpm 5 minutos) para volverse a resuspender en PBS y calcular el número de bacterias que había según su D.O.

#### **3.5.2.5. Pases de cepas humanas y ovinas en el laboratorio.**

Cada cepa se sembró por triplicado en 5 ml de TSB estéril y se mantuvo a 37°C en agitación. Cada 12 horas se fueron tomando 5 µl de estos cultivos crecidos y pasándose a 5 ml de TSB estéril nuevo. Una vez por semana se guardó 1 ml con glicerol 10% (800µl + 200µl de glicerol 75%) en un criovial, se mezclaron y se guardaron a -80°C. En este mismo proceso, se sembraron 100µl de cada cultivo en placas de agar-sangre de cordero 5%. 10 colonias, se resuspendieron y se utilizaron directamente como molde para realizar una PCR de comprobación de *coa*.

#### **3.5.2.6. Experimentos de tasa de crecimiento**

De un cultivo crecido durante toda la noche se hizo una dilución 1/50 en TSB estéril y se dejó crecer una hora. Entonces se centrifugaron 2 ml de cada cultivo a 3500 rpm durante 5 minutos y se lavó con PBS dos veces. Se resuspendió con PBS y se midió la absorbancia a  $\lambda=600\text{nm}$ . Con esa medición se procedió a calcular la cantidad de bacterias en la resuspensión y se calculó para obtener 100 ufc/ml de leche o TSB. Cada mezcla de bacterias + leche se mezcló bien y se repartió en tantos eppendorf como tiempos de muestreo se fueran a muestrear. Cada eppendorf sólo se utilizó para un tiempo.

#### **3.5.2.7. Coinfección de cepas humanas y ovinas**

Para la identificación de las cepas ovinas o humanas se utilizaron sus características fenotípicas. Una vez recolectada la leche se sembró en placas de TSA y placas de TSA + 2,5 µg/ml eritromicina en el caso de N315. Sólo las que crecían en eritromicina eran N315. En el caso de la identificación de CH3657 sólo se cultivaron en TSA, y la identificación se llevó a cabo por el color de las colonias, pues las de CH3657 son amarillas, al contrario que las ovinas que son blancas.

#### **3.5.3. Comprobación de las cepas**

Para comprobar que las infecciones que se observaron fueran producidas por las bacterias inoculadas se tomaron muestras de las lesiones para realizar estudios microbiológicos. Las muestras se cultivaron en placas de agar sangre de cordero 5% (Bd). En el caso de la infección de oveja se sembraban 100µl de leche, mientras que en el caso de las

muestras de conejo, los hisopos se extendieron mediante triple estría sobre la placa. Las cepas se identificaban mediante 2 patrones:

- Hemólisis: las cepas humanas ST121 no tenían  $\beta$ -hemólisis y las de conejo sí. En infección en oveja, las cepas humanas y ovinas tenían distintos halos de hemólisis.
- PCR: las bacterias inoculadas en la infección ovina tenían distinto tamaño en la secuencia de la coagulasa. Las cepas ST121 modificadas tenían patrones de corte introducidos en la mutagénesis diferentes respecto a la misma cepa original.

### **3.6. Estudios de los cambios fenotípicos en los mutantes DltB**

#### **3.6.1. Resistencia a Nisina**

De cada cepa se realizó una dilución 1:50 de un cultivo de toda la noche y se dejó crecer a 37°C hasta fase exponencial (D.O.<sub>540</sub>:0,3-0,4). Conociendo la D.O. se calculó para realizar diluciones que estuvieran a D.O.<sub>540</sub>: 0,05. Una vez en tubos de 5 ml, se añadió nisina (Sigma) para que la concentración final fuera de 10 $\mu$ g/ml en cada cultivo. Se colocó en el agitador de 37°C y se midió la D.O.<sub>540</sub> cada hora. Así mismo, se sembraron 100 $\mu$ l en placas de TSA para comprobar la correlación en el crecimiento bacteriano.

La concentración de nisina para realizar el experimento se seleccionó en base a experimentos previos en que se utilizaron 4, 10, 50, 100 y 1000  $\mu$ g/ $\mu$ l, seleccionando la concentración de 10  $\mu$ g/ $\mu$ l, por ser en la que más diferencias se podían observar.

#### **3.6.2. Análisis de la composición aminoacídica de la pared bacteriana**

Los cultivos se crecieron en TSB hasta fase exponencial (O.D.<sub>540</sub>=0,3-0,4) y se aislaron las paredes bacterianas. Se realizó una hidrólisis ácida y una derivatización precolumna (OPA). LA HPLC se realizó con un gradiente en 30 minutos y se utilizaron tampón sodio-fosfato como A y acetonitrilo/metanol/agua como tampón B.

#### **3.6.3. Análisis de la pared bacteriana**

Los cultivos se crecieron en TSB hasta fase exponencial (O.D.<sub>540</sub>=0,3-0,4) y se aislaron las paredes bacterianas, que se fraccionaron con muramidasa y se analizaron con UHPLC, utilizando un tampón sodio-fosfato 100 mM como tampón A y tampón sodio-fosfato en metanol como tampón B. Las muestras se pasaron a través de la columna en un gradiente lineal de 60 minutos.

#### **3.6.4. Western blot**

Se dejó crecer las cepas hasta fase exponencial o fase estacionaria, se lavaron y se resuspendieron en tampón de lisis (Tris-HCl 50mM pH=7,5, MgCl<sub>2</sub> 20mM, suplementado con rafinosa al 30%) con lisostafina. Se sedimentaron los protoplastos por centrifugación (6000 xg) y la fracción del sobrenadante, donde se localizan las proteínas asociadas a la pared, se analizó en un gel de poliacrilamida de electroforesis de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

#### **3.6.5. Supervivencia en sangre**

De cada cepa se realizó una dilución 1:50 de un cultivo de toda la noche y se dejó crecer a 37°C hasta fase exponencial (D.O.<sub>540</sub>:0,3-0,4). Se centrifugaron 3500 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con PBS. Se midió la absorbancia<sub>600</sub> de cada cepa y se calculó y diluyó para tener 4x10<sup>4</sup> ufc en 100 µl de PBS, que se pipetearon con cuidado a 4 ml de sangre de conejo recién extraída en tubos de heparina. Se mezcló cada tubo durante 30 segundos volteándolo y se dejó a 37°C durante las siguientes 2 horas, tomando muestras en los distintos tiempos, y sembrándolas en TSA. Para representarlo calculamos la media ± el error estándar de tres experimentos realizados por separado y con ellos realizamos un test ANOVA, usando ajustes de Bonferroni. En la gráfica únicamente resaltamos las diferencias significativas (p<0,05).



## 4. RESULTADOS

---



#### 4.1 Estudio del mecanismo de adaptación de *S. aureus* a conejo

##### 4.1.1. Secuenciación de cepas ST121 humanas y de conejo

Las infecciones por parte de *S. aureus* en explotaciones cunícolas son un problema creciente. En estudios anteriores del grupo se identificó el clon ST121 como aislado mayoritario, pero no se conocían los motivos por los que esto era así. Para dilucidar qué hacía de este grupo el mayor agente patógeno en conejos, decidimos llevar a cabo una investigación más profunda de la base molecular de los mecanismos implicados en la especificidad de hospedador. Para ello se secuenciaron completamente 12 cepas del clon ST121 siendo ocho de ellas cepas humanas, y seis de conejo.

Para conseguir la mayor representatividad posible, la selección de cepas intentó ampliar al máximo el rango de localizaciones de las muestras y el año en el que se obtuvieron, como se muestra en la tabla 4.1.1. Para ello se seleccionaron cepas de 8 países diferentes (abarcando 3 continentes) y obtenidas en un periodo de 50 años.

**Tabla 4.1.1.:** Origen y características de las cepas de *Staphylococcus aureus* secuenciadas

Cepa	Nombre original	Hospedador	Origen Geográfico	Fecha de Aislado	Número de Acceso
J	DV3	Conejo	Francia	2002	ERS400835
I	KH119	Conejo	Bélgica	1997	ERS400834
IVIA-1		Conejo	España	2003	ERS400836
DV602		Conejo	Italia	2010	ERS400837
DL688		Conejo	España	2007	ERS400838
DL645		Conejo	España	2007	ERS400839
A	A4599	Humano	Francia	1981	ERS400826
B	ST20070579	Humano	Estados Unidos	2001	ERS400827
C	HT20020235	Humano	España	2002	ERS400828
D	HT20030134	Humano	Bélgica	2003	ERS400829
E	HT20050331	Humano	Antillas Menores	2005	ERS400830
F	HT20070227	Humano	Reino Unido	2007	ERS400831
G	ST20101201	Humano	India	2009	ERS400832
H	E269	Humano	Dinamarca	1957	ERS400833

##### 4.1.2. Relación evolutiva entre las cepas ST121 humanas y de conejo.

Las cepas se secuenciaron con el secuenciador Roche 454 y se depositaron en la base de datos con los números de acceso correspondientes (tabla 4.1.1.). La cepa IVIA-1 se utilizó como base para alinear el resto, puesto que previamente se había cerrado completamente su genoma.

El método paired-ends es utilizado para secuenciar por sus dos extremos los fragmentos originados al crear la biblioteca genómica; esto permite colocalizar las parejas de fragmentos secuenciados. Secuenciamos las cepas también mediante este método y analizando los resultados de ambos tipos de secuenciación conjuntamente, se consiguió disminuir el número de contigs de cada secuencia (Tabla 4.1.2.).

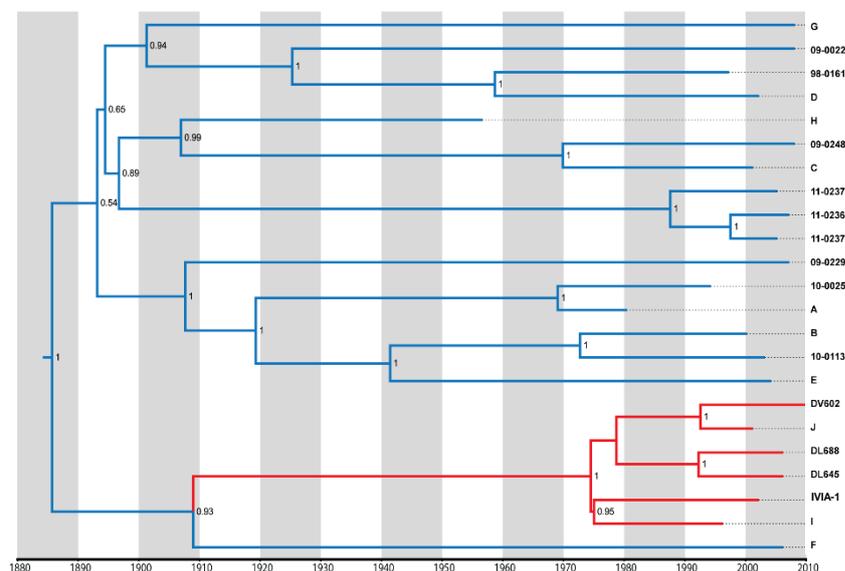
Cepa	Número de contigs
A	47
B	61
C	56
D	59
E	46
F	52
G	40
H	38
IVIA-1	1
I	35
J	42
DV602	63

Aplicamos el método Bayesiano coalescente en el programa BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) y empleando un modelo de reloj molecular relajado reconstruimos la filogenia del ST121 humano y de conejo. En la base de datos pública existían secuencias genómicas de 11 cepas de origen humano pertenecientes al clon ST121 (Kurt *et al.*, 2013) que se utilizaron también para la comparación y la elaboración del árbol filogenético, que nos serviría para relacionar las cepas y poder señalar su origen evolutivo.

El árbol filogenético resultante (Figura 4.1.1) presenta ramas largas en las cepas humanas, lo cual indica un alto nivel de diversidad entre ellas. Por el contrario, en las cepas de conejo las ramas son más cortas, demostrando que las cepas de conejo son mucho más similares entre ellas, a pesar de haber sido aisladas en fechas distantes hasta 20 años entre ellas y haberse obtenido de 4 países distintos. (Tabla 4.1.1.).

La tasa de evolución calculada para estas secuencias ST121 fue de  $1.83 \times 10^{-6}$  sustituciones por año (valor normal para *S. aureus*). Gracias a ella, se pudo definir la fecha de la existencia del ancestro común más reciente (MRCA) del clado de conejo en 1976 (con un intervalo de confianza entre 1942 y 1990). La cepa que más similitud presenta con el grupo de las cepas de conejo es la cepa humana F. Entre ambos grupos podemos definir un

MRCAs que existió en el año 1909 (con un intervalo de confianza entre 1804 y 1958; Figura 4.1.1)



**Figura 4.1.1.:** Historia evolutiva del complejo clonal ST121. Reconstrucción filogenética bayesiana del linaje CC121 basado en el alineamiento del genoma “core” con ramas rojas para los conejos y azules para las humanas.

Según la estructura del árbol filogenético podemos hipotetizar que existió una cepa humana ancestral que dio lugar a las cepas de conejo. Ésta tendría similitudes con la cepa F y las cepas de conejo, al ser un paso intermedio entre ellas.

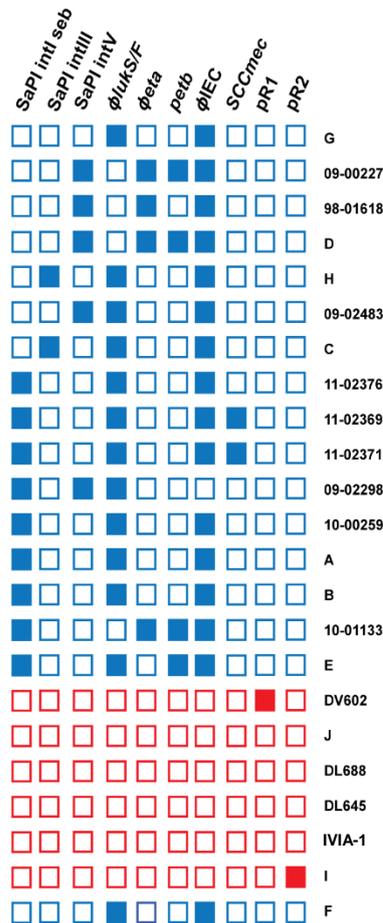
Dada la agrupación de todas las cepas de conejo bajo un único ancestro común, la explicación más plausible para la existencia del clado agrupado de conejo, es que existiera un único salto de *S. aureus* desde el humano al conejo y que éste ocurrió hace más de 38 años. Esta infección interespecífica debió de ocurrir en el ámbito cunicultor, provocando la emergencia de un nuevo clon asociado a epidemias en granjas de conejos.

#### 4.1.3. Elementos genéticos móviles en la adaptación a conejo

Habitualmente en los EGM se encuentran localizados genes que codifican factores de virulencia. Éstos podrían ser los responsables de la infección selectiva a distintas especies, puesto que ya se ha visto que ocurre en la adaptación de *S. aureus* a rumiantes, aves y cerdos (Guinane *et al.*, 2010, Lowder *et al.*, 2009, Price *et al.*, 2012).

En el análisis comparativo del genoma accesorio de las cepas ST121 y teniendo en cuenta también las secuencias de la base de datos, encontramos que la mayoría de cepas humanas sí que contienen elementos genéticos móviles (Figura 4.1.2.) que codifican

potentes toxinas involucradas en la patogénesis de enfermedades como la Panton-Valentine leucocidina (PVL) y las toxinas exfoliativas (ET). Las cepas de conejo, por el contrario, precinden de las toxinas codificadas en EGM.



**Figura 4.1.2.:** Localización de EGM en cepas ST121. La presencia o ausencia de EGMs se marcan por los recuadros coloreados o no respectivamente. Los EGM incluidos son Islas de patogenicidad estafilocócicas (SaPIs), bacteriófagos ( $\phi$ ), o plásmidos (p). Éstos pueden contener genes como *lukF/S* (Panton-Valentine leukocidin), *eta* (toxina exfoliativa A), *etb* (toxina exfoliativa B), *seb* (enterotoxina estafilocócica B), IEC (Cluster de evasión inmune), *SCCmec* (cassette estafilocócico cromosómico *mec*), y plásmidos codificando resistencias a bleomicina, kanamicina, compuestos de amonio cuaternarios y trimetoprima (pR1) o a teicoplanina (pR2), respectivamente. En azul se muestran aislados humanos y en rojo aislados de conejo.

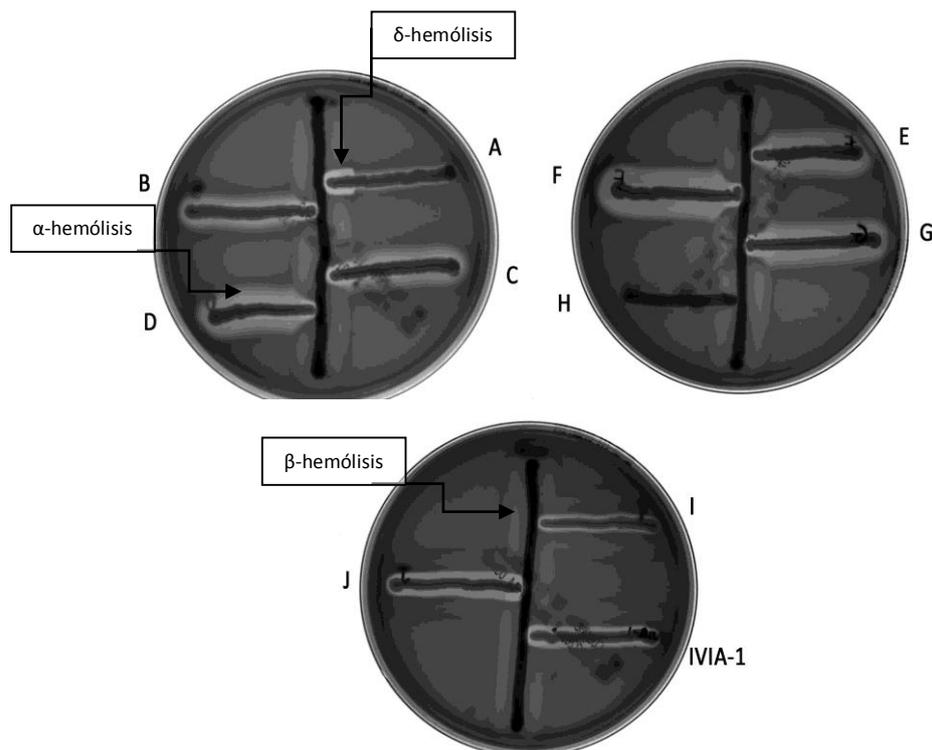
Frente al resultado observado en la figura 4.1.2, una opción es que las cepas de conejo ST121 no porten EGMs de ningún tipo. Por otra parte, los EGMs no sólo codifican toxinas, sino que pueden llevar otro tipo de genes capaces de proporcionar ventaja evolutiva como pueden ser resistencias frente a antibióticos, proteínas moduladoras de inmunidad,... Por tanto, la otra opción es que no hubiéramos localizado los responsables de la ventaja evolutiva con este rastreo. Para confirmar cuál de las dos hipótesis era correcta, decidimos

realizar una búsqueda de EGMs *in silico* utilizando la secuencia aminoacídica de las integrasas de bacteriófagos e islas de *S. aureus* como cebo y enfrentándolas frente a las secuencias completas. El resultado se muestra en la tabla 4.1.3.

<b>Tabla 4.1.3.: Islas y bacteriófagos presentes en las cepas ST121</b>				
<b>Cepa</b>	<b>Hospedador</b>		<b>Integrasas islas</b>	<b>Integrasas bacteriófagos</b>
A	Humano	secuencia	1 Isla incompleta	3, 12
B	Humano	secuencia	1 Isla incompleta	2,3,5,12
C	Humano	secuencia	3 Integrasa incompleta	2,3,5,6,12
D	Humano	secuencia	5	1,3,6,12
E	Humano	secuencia	1	3, 12
F	Humano	secuencia		1,2,3,12
G	Humano	secuencia		1,3,12
H	Humano	secuencia	3 Integrasa incompleta	2,3,12
I	Conejo	secuencia		12
J	Conejo	secuencia		12
IVIA-I	Conejo	secuencia		12
DV602	Conejo	secuencia		12

El único EGM que se localiza en las cepas de conejo se encuentra también en todas las cepas humanas. Éste es un fago atípico, porque posee una integrasa poco común, la integrasa de tipo 12. Se encuentra insertado en una proteína con homología a la glutamine synthetase, a la cual interrumpe. Este fago también presenta homología con el fago presente en la cepa Newbould (Bouchard *et al.*, 2012) (aislado procedente de una mastitis bovina perteneciente al ST115), aunque la homología del 99% se da sólo en los genes que se localizan antes de la helicasa, donde continua conformando un bacteriófago distinto, sugiriendo recombinación. Este tipo de integrasa sólo se encuentra en cepas de este ST.

En la totalidad de las cepas humanas observamos que se encuentra el fago con la integrasa de tipo 3 que evita que las cepas sean betahemolíticas. Este bacteriófago codifica en su genoma el clúster de evasión inmuno-específico para humanos (IEC). La localización del sitio de integración provoca que al insertarse el fago se interrumpa la ORF que codifica la  $\beta$ -hemolisina (*hly*), generando fenotipos fácilmente diferenciables en placas de agar-sangre puesto que estas cepas son incapaces de producir el halo de  $\beta$ -hemólisis (Traber *et al.*, 2008) En las cepas de conejo *hly* está completo, permitiendo una fácil diferenciación por el halo de betahemólisis que generan (Figura 4.1.3.).



**Figura 4.1.3.:** Hemólisis de las cepas humanas y de las cepas de conejo. Ninguna de las cepas humanas presenta  $\beta$ -hemólisis en comparación con RN4220 (estría vertical) usada como control. Las cepas de conejo son  $\beta$ -hemolíticas por tener el gen *hlyB* intacto.

Sorprendentemente, las cepas de conejo no contenían ningún bacteriófago o isla, a pesar de que era lo esperado. Esto implica que el tropismo de hospedador del clado de conejo de ST121 no está mediado por un grupo de genes accesorios específico para nicho como se había informado previamente para los clones de *S. aureus* asociados a aves de corral y rumiantes (Fitzgerald, 2012).

En base a estos resultados, concluimos que la capacidad de ST121 de infectar a conejos debía haber evolucionado a través de eventos mutacionales en el “core genome” de una cepa progenitora ST121 del clado de conejos.

#### 4.1.4. Distintos genes según el hospedador

Para analizar esta posibilidad, decidimos buscar genes que se localizaran exclusivamente en las cepas de conejo. Sólo se localizó uno, SplE, presente en todas las cepas de conejo, pero ausente en las humanas. También localizamos cambios en la secuencia que originaran pseudogenes, considerando dos tipos: inserciones y deleciones (indels) (tabla 4.1.4.) o polimorfismos de nucleótido único (SNPs) (tabla 4.1.5.) que afectaran a genes y se localizaran consistentemente en uno de los dos grupos de cepas. Los genes afectados serán candidatos a ser los responsables de la adaptación al hospedador.

**Tabla 4.1.4.:** Inserciones y deleciones ocurridas en los genes de las cepas de conejo.

Posición en ED133	secuencia original	nueva secuencia	anotación	% secuencia codificante afectada
279142	AAAATGAAATG	A	hypothetical protein EssB	97.5%
381320	TGGG	TGG	hypothetical protein MatE	42.9%
786424	TC	TCC	histidinol-phosphate aminotransferase	72.5%
1849323	T	TA	Repressor of toxins Rot	38.8%

**Tabla 4.1.5.:** Polimorfismos de nucleótido único localizados en las cepas de conejo.

Posición en ED133	SNP/ Indel	codon original	nuevo codón	Residuo		Secuencia codificante anotada
				original	Nuevo residuo	
11335	SNP	CCA	CTA	P	L	histidine ammonia-lyase
41389	SNP	ACA	ata	T	I	putative transposase
45510	SNP	GCA	ACA	A	T	conserved hypothetical protein
65511	SNP	GAT	GAG	D	E	Na/Pi cotransporter family protein
70555	SNP	GTT	GCT	V	A	L-lactate permease
109775	SNP	ATG	ATA	M	I	5' nucleotidase family protein
118223	SNP	GGT	GAT	G	D	capsular polysaccharide biosynthesis protein CapC
138492	SNP	GAT	GGT	D	G	conserved hypothetical protein
140409	SNP	AGA	AGT	R	S	hypothetical protein
140953	SNP	GTA	gaa	V	E	ABC transporter, permease protein
150450	SNP	CAT	TAT	H	Y	surfactin/siderphore synthetase
165057	SNP	CCT	CTT	P	L	hypothetical protein
166637	SNP	GTA	GCA	V	A	glucokinase regulator-related protein
170974	SNP	CCC	TCC	P	S	type I restriction-modification enzyme, R subunit
178367	SNP	AAG	GAG	K	E	Putative glutathione transporter, permease component
184278	SNP	GAT	AAT	D	N	gamma-glutamyltranspeptidase
199620	SNP	CAG	CGG	Q	R	Two-component sensor histidine kinase family protein
210606	SNP	CTC	TTC	L	F	acetyl-CoA acetyltransferase
213046	SNP	GTA	GGA	V	G	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase protein
219237	SNP	AAA	AGA	K	R	hypothetical protein
265897	SNP	TCC	TTC	S	F	Choloylglycine hydrolase family protein
283750	SNP	AGT	AAT	S	N	virulence protein EssC
294485	SNP	GGA	AGA	G	R	conserved hypothetical protein
306463	SNP	ACG	GCG	T	A	ABC transporter, ATP-binding protein
319553	SNP	CAG	TAG	Q	*	lipase precursor
370183	SNP	GAT	TAT	D	Y	NADH-dependent flavin oxidoreductase
373801	SNP	GGC	AGC	G	S	hypothetical protein
376156	SNP	TTC	TTA	F	L	transport protein, putative
394015	SNP	GCT	GTT	A	V	hypothetical protein
396787	SNP	GTG	TTG	V	L	conserved hypothetical protein
401320	SNP	CGC	TGC	R	C	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-- homocysteine methyltransferase
408832	SNP	GTA	ATA	V	I	Chromosome partitioning protein ParB
432638	SNP	GCT	GTT	A	V	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase
470721	SNP	CAA	GAA	Q	E	hypothetical protein
485848	SNP	GCG	GAG	A	E	hypothetical transmembrane protein
497132	SNP	AGC	AAC	S	N	LysM domain protein
501100	SNP	GAT	GCT	D	A	conserved hypothetical protein
503355	SNP	CCT	GCT	P	A	glutamate synthase, large subunit
504891	SNP	CAT	TAT	H	Y	glutamate synthase, large subunit
539424	SNP	GAT	AAT	D	N	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase
572279	SNP	GGA	AGA	G	R	nucleoside permease NupC
586608	SNP	CCA	CTA	P	L	hypothetical protein
586966	SNP	ATG	ATC	M	I	hypothetical protein
592700	SNP	CCA	TCA	P	S	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit

**Tabla 4.1.5.:** Polimorfismos de nucleótido único localizados en las cepas de conejo.

Posición en ED133	SNP/ Indel	codon original	nuevo codón	Residuo original	Nuevo residuo	Secuencia codificante anotada
599503	SNP	ACA	ATA	T	I	ribosomal L7Ae family protein
609241	SNP	ATT	ACT	I	T	L-ribulokinase, putative
617650	SNP	CGT	CAT	R	H	sdrC protein
619440	SNP	AAA	gaa	K	E	sdrC protein
635689	SNP	TTC	TTA	F	L	6-phospho-3-hexuloisomerase
650300	SNP	TCA	TTA	S	L	conserved hypothetical protein
654164	SNP	GAA	CAA	E	Q	Diphosphomevalonate decarboxylase
654861	SNP	ATA	ACA	I	T	Diphosphomevalonate decarboxylase
655484	SNP	GCG	ACG	A	T	phosphomevalonate kinase
656295	SNP	GAT	GAG	D	E	conserved hypothetical protein
675435	SNP	GGT	GAT	G	D	Hydrolase
678502	SNP	CAT	TAT	H	Y	probable esterase or lipase
689310	SNP	GCA	GTA	A	V	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter
706375	SNP	CGT	TGT	R	C	nucleoside permease NupC, putative
719366	SNP	GAA	aaa	E	K	two-component response regulator
729917	SNP	ACT	ATT	T	I	transcriptional regulator, AraC family
730649	SNP	CTT	CAT	L	H	transcriptional regulator, AraC family
732738	SNP	GCG	GTG	A	V	conserved hypothetical protein
761891	SNP	CCT	ACT	P	T	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase
813400	SNP	GTC	GCC	V	A	degV family protein
833512	SNP	CAT	CGT	H	R	thioredoxin reductase
837248	SNP	GCT	GTT	A	V	conserved hypothetical protein
839280	SNP	TGT	CGT	C	R	malate dehydrogenase
843498	SNP	GTC	GCC	V	A	hypothetical protein
847351	SNP	TTG	atg	L	M	phosphoglycerate kinase
849950	SNP	GTC	GCC	V	A	enolase 2-phosphoglycerate dehydratase
850259	SNP	GGT	GCT	G	A	enolase 2-phosphoglycerate dehydratase
851714	SNP	GAT	GGT	D	G	probable membrane protein
867101	SNP	GAT	AAT	D	N	staphylococcal thermonuclease precursor
885877	SNP	TAC	CAC	Y	H	conserved hypothetical protein
903320	SNP	ACA	AAA	T	K	D-alanine lipoteichoic acid and wall teichoic acid esterification protein
903730	SNP	TAT	CAT	Y	H	D-alanine lipoteichoic acid and wall teichoic acid esterification protein
904197	SNP	TAA	TAT	*	Y	D-alanine lipoteichoic acid and wall teichoic acid esterification protein
914437	SNP	GGA	GAA	G	E	conserved hypothetical protein
914456	SNP	CAA	TAA	Q	*	conserved hypothetical protein (NADH dehydrogenase superfamily)
929999	SNP	TTA	ATA	L	I	argininosuccinate lyase
936781	SNP	GAT	AAT	D	N	ATP-dependent nuclease subunit B
937594	SNP	GAT	AAT	D	N	ATP-dependent nuclease subunit B
943586	SNP	GCT	GTT	A	V	fumarylacetoacetate hydrolase family protein
943909	SNP	CGC	TGC	R	C	fumarylacetoacetate hydrolase family protein
946614	SNP	GCG	GTG	A	V	probable hydrolase
948776	SNP	CCA	CTA	P	L	Lipopolysaccharide modification acyltransferase
951585	SNP	TCA	TTA	S	L	putative ATP-dependent protease protein
952545	SNP	TCT	TTT	S	F	putative ATP-dependent protease protein
964210	SNP	GCA	GTA	A	V	oligopeptide transport system ATP-binding protein
964957	SNP	GTA	Cta	V	L	oligopeptide transport system ATP-binding protein
965060	SNP	AAG	ACG	K	T	oligopeptide transport system ATP-binding protein
966215	SNP	GAT	GCT	D	A	oligopeptide binding protein
968210	SNP	ACA	GCA	T	A	oligopeptide ABC transporter, oligopeptide-binding protein
972027	SNP	GAT	TAT	D	Y	oligopeptide ABC transporter, permease protein
976389	SNP	CAA	CCA	Q	P	probable competence-related protein
981313	SNP	TCA	TTA	S	L	conserved hypothetical protein
1001904	SNP	ATG	GTG	M	V	Serine protease
1016199	SNP	ACA	ATA	T	I	Heme ABC type transporter HtsABC, heme-binding protein
1021920	SNP	GAG	AAG	E	K	probable hydrolase
1036100	SNP	ATT	TTT	I	F	probable exported protein
1063044	SNP	GTG	GGG	V	G	conserved hypothetical protein

**Tabla 4.1.5.:** Polimorfismos de nucleótido único localizados en las cepas de conejo.

Posición en ED133	SNP/ Indel	codon original	nuevo codón	Residuo original	Nuevo residuo	Secuencia codificante anotada
1065279	SNP	GTA	ATA	V	I	phosphoenolpyruvate-protein phosphatase
1080147	SNP	TCA	TTA	S	L	Spermidine Putrescine transport ATP-binding protein potA
1092356	SNP	CGT	TGT	R	C	conserved hypothetical protein
1102818	SNP	GAT	AAT	D	N	probable exported protein
1180231	SNP	AGC	AGA	S	R	fibrinogen-binding protein
1183493	SNP	GAC	GGC	D	G	alpha-hemolysin precursor
1207772	SNP	TTA	TCA	L	S	cell division protein
1213204	SNP	GAT	GTT	D	V	hypothetical protein
1231095	SNP	AAA	AAT	K	N	orotate phosphoribosyltransferase
1237125	SNP	GGT	AGT	G	S	primosomal protein
1239905	SNP	ACA	GCA	T	A	hypothetical protein
1244241	SNP	ATA	ACA	I	T	conserved hypothetical protein
1256899	SNP	GCT	ACT	A	T	fatty acid/phospholipid synthesis protein
1261572	SNP	GAT	AAT	D	N	chromosome segregation SMC protein
1271122	SNP	CGT	TGT	R	C	hypothetical protein
1285909	SNP	GAA	GAC	E	D	ATP-dependent protease ATP-binding subunit of heat shock protein
1295264	SNP	GAG	AAG	E	K	prolyl-tRNA synthetase
1300223	SNP	ACA	ATA	T	I	DNA polymerase III, alpha subunit
1302552	SNP	GAT	GAA	D	E	N utilization substance protein A, putative
1310157	SNP	GAT	AAT	D	N	polyribonucleotide nucleotidyltransferase
1317257	SNP	ATT	ATG	I	M	zinc protease
1319722	SNP	GTG	CTG	V	L	acetoacetyl-CoA reductase, putative
1341913	SNP	CCG	TCG	P	S	glycerol kinase
1345777	SNP	GTT	GCT	V	A	tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase
1349126	SNP	ACG	ATG	T	M	aluminum resistance protein
1373590	SNP	GAT	GAG	D	E	threonine synthase
1395375	SNP	CAT	TAT	H	Y	aconitate hydratase
1416114	SNP	ACT	ATT	T	I	prephenate dehydrogenase
1422196	SNP	CAA	CTA	Q	L	indole-3-glycerol phosphate synthase
1432102	SNP	GAT	AAT	D	N	probable oligopeptide membrane permease
1444895	SNP	CAA	TAA	Q	*	aspartate kinase II
1447050	SNP	CCA	TCA	P	S	dihydrodipicolinate synthase
1450422	SNP	CTA	GTA	L	V	probable alanine racemase
1456935	SNP	CAA	AAA	Q	K	probable toxic ion resistance protein
1462261	SNP	CTC	TTC	L	F	conserved hypothetical protein
1480187	SNP	TTA	ATA	L	I	conserved hypothetical protein
1480834	SNP	CAT	CGT	H	R	conserved hypothetical protein
1482778	SNP	GTA	ATA	V	I	probable membrane protein
1523689	SNP	CCA	TCA	P	S	probable membrane protein
1527206	SNP	AAT	AGT	N	S	conserved hypothetical protein
1544426	SNP	ATT	CTT	I	L	conserved hypothetical protein
1556783	SNP	GAC	TAC	D	Y	30S ribosomal protein S1
1559039	SNP	ATC	AAC	I	N	L-asparaginase
1562624	SNP	GCG	TGC	R	C	cell surface elastin binding protein
1573416	SNP	ATG	ATA	M	I	site-specific recombinase
1584325	SNP	CCT	TCT	P	S	maltose operon repressor
1597515	SNP	TTG	GTG	L	V	Arginine pathway regulatory protein ArgR
1608787	SNP	GGT	GAT	G	D	glycine dehydrogenase subunit 2
1615420	SNP	GAT	TAT	D	Y	Late competence protein, putative
1616237	SNP	AAT	GAT	N	D	probable late competence protein
1624452	SNP	GAT	GTT	D	V	zinc-specific metalloregulator
1637719	SNP	GGT	gct	G	A	probable recombination protein
1643482	SNP	ATT	TTT	I	F	probable membrane protein
1647581	SNP	GGA	GAA	G	E	probable methyltransferase
1655981	SNP	ATT	ACT	I	T	GTP binding protein protein
1656757	SNP	GCT	GTT	A	V	conserved hypothetical protein
1661261	SNP	ACA	ATA	T	I	conserved hypothetical protein

**Tabla 4.1.5.:** Polimorfismos de nucleótido único localizados en las cepas de conejo.

Posición en ED133	SNP/ Indel	codon original	nuevo codón	Residuo original	Nuevo residuo	Secuencia codificante anotada
1682767	SNP	GGC	AGC	G	S	alanyl-tRNA synthetase
1688662	SNP	GAC	AAC	D	N	5-methylaminomethyl-2-thiouridylate- methyltransferase tRNA
1701330	SNP	TTC	CTC	F	L	GTP pyrophosphokinase
1710165	SNP	GGC	TGC	G	C	queuine tRNA-ribosyltransferase
1716935	SNP	GAC	ggc	D	G	probable membrane protein
1725221	SNP	CTT	TTT	L	F	valyl-tRNA synthetase
1731787	SNP	CGT	TGT	R	C	Porphobilinogen deaminase
1737022	SNP	GAC	GAG	D	E	trigger factor prolyl isomerase
1741714	SNP	GTT	GGT	V	G	lysine specific permease
1742444	SNP	GGA	AGA	G	R	lysine specific permease
1781264	SNP	CAT	TAT	H	Y	acetate kinase
1788714	SNP	GAT	TAT	D	Y	conserved hypothetical protein
1803503	SNP	GAT	GGT	D	G	Cell surface receptor IsdH for hemoglobin-haptoglobin complexes
1804318	SNP	AAG	AAT	K	N	Cell surface receptor IsdH for hemoglobin-haptoglobin complexes
1808304	SNP	GGT	AGT	G	S	acetyl-CoA synthetase
1821381	SNP	CAA	CCA	Q	P	SpoIIIE family cell division protein
1821514	SNP	CCT	TCT	P	S	SpoIIIE family cell division protein
1838939	SNP	GAT	GGT	D	G	cell wall surface anchor family protein
1855437	SNP	CCA	CAA	P	Q	riboflavin specific deaminase
1880131	SNP	CCA	TCA	P	S	probable lipoprotein
1908851	SNP	AAT	gat	N	D	leukotoxin D subunit
1920198	SNP	GAT	AAT	D	N	signal transduction protein
1925410	SNP	CAC	TAC	H	Y	probable peptidyl-prolyl cis-isomerase
1929559	SNP	ATC	ACC	I	T	conserved hypothetical protein
1943526	SNP	TTA	TTT	L	F	glutamate ATP-binding ABC transporter
2024806	SNP	ACA	ATA	T	I	two-component response regulator
2039791	SNP	GGC	AGC	G	S	glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B
2048130	SNP	CCT	CTT	P	L	DNA ligase
2048649	SNP	GCA	GTA	A	V	DNA ligase
2051736	SNP	TCT	TTT	S	F	ATP-dependent DNA helicase
2059268	SNP	CCA	TCA	P	S	nicotinate phosphoribosyltransferase
2059610	SNP	CGT	TGT	R	C	nicotinate phosphoribosyltransferase
2060995	SNP	CGT	CTT	R	L	probable nitric oxide synthase
2084165	SNP	TTA	ATA	L	I	beta-hemolysin
2086394	SNP	GAA	AAA	E	K	probable leukocidin F subunit
2088466	SNP	GTC	GCC	V	A	probable succinyldiaminopimelate desuccinylase
2090243	SNP	ATA	ATG	I	M	Permease of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily
2110581	SNP	CGT	TGT	R	C	60 kDa chaperonin protein
2121935	SNP	GGT	gct	G	A	sucrose-6-phosphate hydrolase
2134100	SNP	GCA	GTA	A	V	probable glycoprotein endopeptidase
2134380	SNP	ACA	GCA	T	A	probable glycoprotein endopeptidase
2142489	SNP	GTC	ATC	V	I	3-isopropylmalate dehydrogenase
2159939	SNP	GAT	GGT	D	G	alanine racemase 1
2162049	SNP	CAA	GAA	Q	E	probable membrane protein
2164340	SNP	ACC	GCT	T	A	potassium-transporting ATPase C chain
2174923	SNP	GAT	AAT	D	N	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2, 6-diaminopimelate-D-alanyl-D-alanine ligase
2186457	SNP	CCA	TCA	P	S	hypothetical protein
2215378	SNP	ATT	ACT	I	T	CTP synthase
2245709	SNP	GGC	GAC	G	D	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase
2247099	SNP	CAA	AAA	Q	K	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase
2249215	SNP	ACA	AAA	T	K	PTS system mannitol-specific IIBC component
2276085	SNP	GGA	GTA	G	V	probable hemolysin
2278165	SNP	TCG	TGG	S	W	probable membrane protein
2282243	SNP	CAT	TAT	H	Y	ferrichrome ABC transporter
2283319	SNP	AAA	GAA	K	E	ferrichrome ABC transporter lipoprotein
2300522	SNP	CGT	TGT	R	C	PTS system, lactose-specific IIA component

**Tabla 4.1.5.:** Polimorfismos de nucleótido único localizados en las cepas de conejo.

Posición en ED133	SNP/ Indel	codon original	nuevo codón	Residuo original	Nuevo residuo	Secuencia codificante anotada
2315823	SNP	GCT	GTT	A	V	alpha-acetolactate synthase
2325198	SNP	AAT	GAT	N	D	DNA-directed RNA polymerase alpha chain
2338068	SNP	AAG	ATG	K	M	30S ribosomal protein S10
2346432	SNP	TCC	TTC	S	F	conserved hypothetical protein
2349214	SNP	ATT	GTT	I	V	multidrug efflux transporter
2374530	SNP	GGT	AGT	G	S	urease alpha subunit
2375137	SNP	TCA	tga	S	*	urease accessory protein
2384488	SNP	GCG	ACG	A	T	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter NhaC
2395287	SNP	CCA	TCA	P	S	formate dehydrogenase alpha subunit
2397406	SNP	TAC	TGC	Y	C	probable extragenic supressor protein
2404764	SNP	GAT	AAT	D	N	conserved hypothetical protein
2413360	SNP	GGA	TGA	G	*	probable oxidoreductase
2416509	SNP	GGA	GAA	G	E	imidazolonepropionase
2419255	SNP	GTT	ATT	V	I	LysR family regulatory protein
2424939	SNP	GCG	GTG	A	V	probable epimerase
2429121	SNP	CGT	CAT	R	H	probable membrane protein
2431024	SNP	ACA	CCA	T	P	sodium/glutamate symporter
2442856	SNP	AGA	AAA	R	K	bicyclomycin and teicoplanin resistance protein
2457670	SNP	TAT	GAT	Y	D	hypothetical protein
2468732	SNP	GTA	ATA	V	I	truncated conserved hypothetical protein
2478422	SNP	CCA	GCA	P	A	nitrite extrusion protein
2478884	SNP	AAA	AGA	K	R	conserved hypothetical protein
2482344	SNP	TCT	TGT	S	C	two component sensor histidine kinase
2485258	SNP	CAA	CAC	Q	H	nitrate reductase beta chain
2498449	SNP	GAT	aAT	D	N	probable zinc-binding lipoprotein
2502411	SNP	CAT	CGT	H	R	fmhA protein
2510648	SNP	GTT	GCT	V	A	immunoglobulin G-binding protein
2528037	SNP	ACC	AGC	T	S	probable transporter protein
2540458	SNP	GCA	ACA	A	T	probable 2-dehydropantoate 2-reductase
2544472	SNP	GAT	AAT	D	N	betaine-carnitine-choline ABC transporter
2554534	SNP	GAG	GAT	E	D	ATP-binding ABC transporter
2564514	SNP	GAT	GGT	D	G	oligopeptide transporter putative membrane permease domain protein
2598798	SNP	ACT	ATT	T	I	fibronectin-binding protein A
2638247	SNP	GTA	GCA	V	A	pyruvate oxidase
2668994	SNP	GGA	GAA	G	E	probable phytoene dehydrogenase
2675690	SNP	GGT	AGT	G	S	probable membrane-embedded regulatory protein
2683784	SNP	CCA	CTA	P	L	probable cobalmin synthesis protein
2687285	SNP	TTC	CTC	F	L	hypothetical protein
2732696	SNP	GGC	GAC	G	D	alkaline phosphatase III precursor
2745714	SNP	GAC	GAA	D	E	zinc metalloproteinase aureolysin
2753259	SNP	CGT	TGT	R	C	mannose-6-phosphate isomerase
2764923	SNP	CAT	TAT	H	Y	conserved hypothetical protein
2776821	SNP	GAA	AAA	E	K	LPXTG cell wall surface anchor family protein
2780361	SNP	CGC	TGC	R	C	LPXTG cell wall surface anchor family protein
2817525	SNP	GTC	GGC	V	G	high-affinity nickel-transport protein
2827683	SNP	GTT	ATT	V	I	glucose-inhibited division protein B

Para elucidar cuál de los cambios era el más importante en el cambio de hospedador, seleccionamos los genes que implicaban un cambio en el tamaño de la proteína codificada. (Tabla 4.1.6.). Los genes que se seleccionaron estaban mayoritariamente relacionados con virulencia.

Hlb es la toxina betahemolítica (Katayama *et al.*, 2013). SplE es una serina-proteasa que forma parte del operón SplA-F (Zdzalik *et al.*, 2013) y se localiza en la isla genómica vSaβ. EssB es una proteína relacionada con la secreción de toxinas (Burts *et al.*, 2005). MatE es una bomba de flujo de fármacos que pertenece a la familia de proteínas MATE (multidrug and toxic compound extrusion) (Costa *et al.*, 2013). Rot fue caracterizado como represor de toxinas (Said-Salim *et al.*, 2003). La lipasa está involucrada en la formación de biofilms (Hu *et al.*, 2012). DltB está implicado en la d-alanilación de la pared para defenderse del sistema inmune del hospedador. Por su parte, la ureasa es también un factor de virulencia al encargarse de degradar la urea (Konieczna *et al.*, 2012).

Histidinol-phosphate aminotransferase, NADH dehydrogenase, aspartate kinase y oxidoreductase son enzimas del metabolismo.

En la lista de genes seleccionados encontramos por una parte grandes mutaciones e indels y por otra parte SNPs (Tabla 4.1.6.). Hay dos grandes deleciones: *hIb* sólo es funcional en las cepas de conejo, y aunque su secuencia se encuentra completa en todas las cepas, en las cepas humanas se encuentra truncada por la inserción de un bacteriófago. Por su parte, *spI*E se encuentra sólo en las cepas de conejo, puesto que en las humanas está delecionado por completo.

Dentro de los indels encontramos tanto deleciones como inserciones. EssB presenta una deleción de 10 nucleótidos en el comienzo de la proteína, lo que propicia que la traducción comience más tarde. MatE cambia la pauta de lectura, ocasionando una parada cuatro residuos más adelante del sitio de la mutación. Respecto a las inserciones, en Histidinol-phosphate aminotransferase se modifica el patrón de lectura, e inmediatamente después del residuo modificado aparece un codón de parada, eliminando 255 residuos de la proteína original. En el caso de Rot, es la propia inserción la que genera el codón de parada, acortando 51 residuos la proteína.

En el caso de los SNPs, son los propios cambios los que generan el codón de parada. La proteína hipotética "NADH dehydrogenase superfamily" pierde 138 residuos de la proteína original. Aspartate kinase II pierde 236 residuos. El gen probable oxidoreductase pierde 77 residuos. En el gen Lipase precursor se modifica una glicina y se pierden 549 residuos de la proteína original humana. Todas estas modificaciones acortan las proteínas por sus extremos C-terminal. En el gen Urease accessory protein la modificación hace que la proteína pierda 69 residuos del extremo N-terminal, lo que hace improbable que pueda

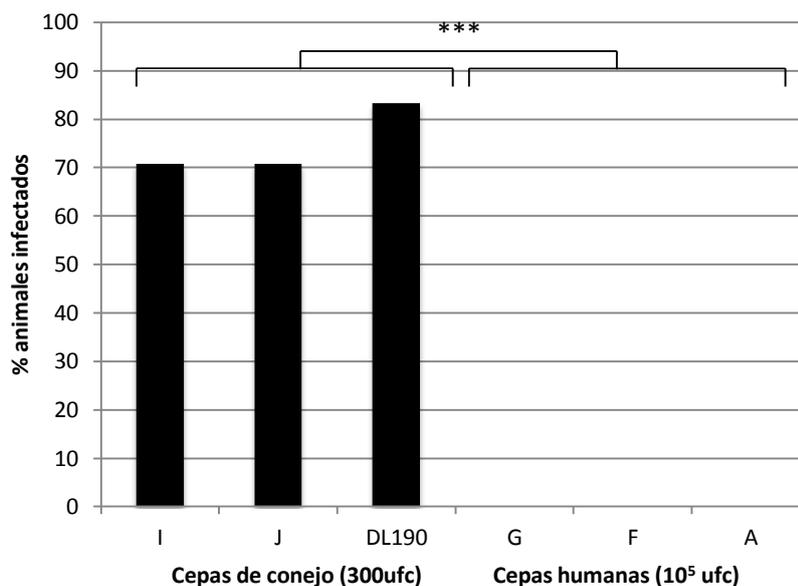
traducirse en las cepas de conejo. Contrariamente al resto de SNPs, el gen D-alanine lipoteichoic acid and wall teichoic acid esterification protein (DltB), prolonga en un residuo su secuencia en la cepa de conejo respecto a la proteína humana (Tabla 4.1.6.). Además del codón de parada, este gen presenta dos cambios de aminoácido en su secuencia.

**Tabla 4.1.6.:** Genes de cepas de conejo que ven alterada su traducción respecto a los de las cepas humanas.

Anotación	Modificación	Localización	Humano (residuos)	Conejo (residuos)	Tipo
$\beta$ -toxin gene ( <i>hIb</i> )	-phi int tipo 3		331	331	Delección
Serine protease SplE	-SplE		238	0	Delección
EssB	-10	N-terminal	445	432	Delección
MatE	-1	Central	452	259	Delección
Histidinol-phosphate aminotransferase	+1	N-terminal	352	97	Inserción
Rot	+1	C-Terminal	153	102	Inserción
Anotación	Residuo original	Nuevo residuo	Humano (residuos)	Conejo (residuos)	Tipo
Lipase precursor	G	*	691	142	SNP
Conserved hypothetical protein (NADH dehydrogenase superfamily)	Q	*	409	271	SNP
Aspartate kinase II	Q	*	401	165	SNP
Urease accessory protein (UreE)	S	*	150	81	SNP
Probable oxidoreductase	Q	*	293	216	SNP
D-alanine lipoteichoic acid and wall teichoic acid esterification protein (DltB)	*	Y	404	405	SNP

#### 4.1.5. Infectividad de las cepas ST121 en conejo

Dado que todas las cepas son muy similares puesto que pertenecen al mismo ST, queríamos comprobar si aun procediendo de distintos hospedadores, su capacidad infectiva era similar. Para ello se inyectaron intradérmicamente 300 ufc en 24 conejos. Las cepas A, F y G testadas se eligieron como representantes de 3 de las ramas del árbol separadas más antiguamente (Figura 4.1.1.). Con los resultados de la infección se realizaron  $\chi^2$  en comparaciones con dos cepas, considerando la cepa y el hospedador (Figura 4.1.4.)



**Figura 4.1.4.:** Porcentaje de animales infectados. N=24. La capacidad infectiva de las cepas ST121 en conejo es diferente según de dónde provenga el aislado.

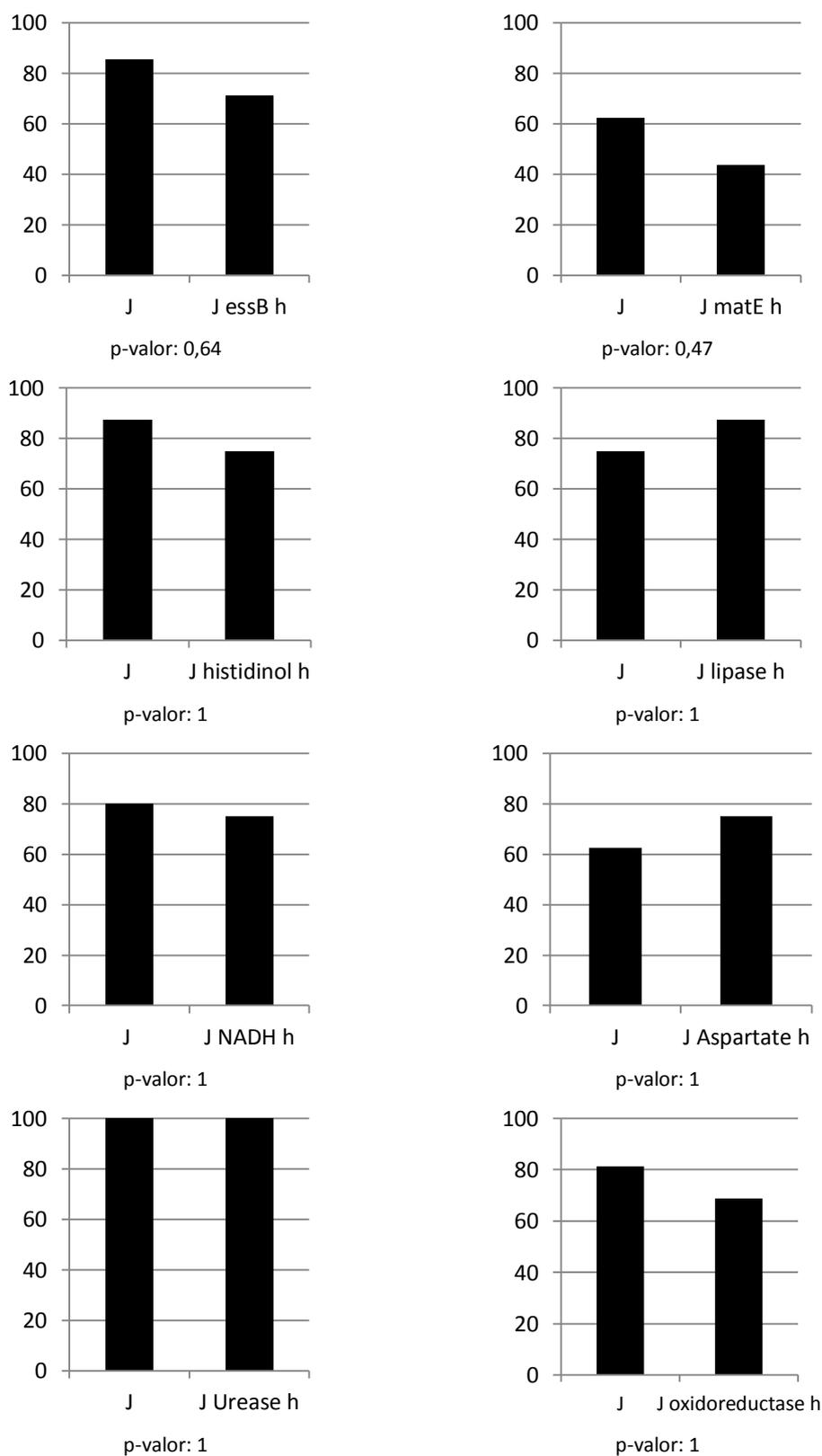
Sólo las cepas de conejo son capaces de infectar a su hospedador. Las cepas humanas no fueron capaces de infectar a conejos a dosis de 300,  $10^4$  o  $10^5$ , que son los datos aquí mostrados. Incluso con una dosis superior a la de conejo en tres órdenes de magnitud, las cepas humanas no tienen capacidad infectiva en conejo.

#### 4.1.6. Estudio específico de los genes implicados

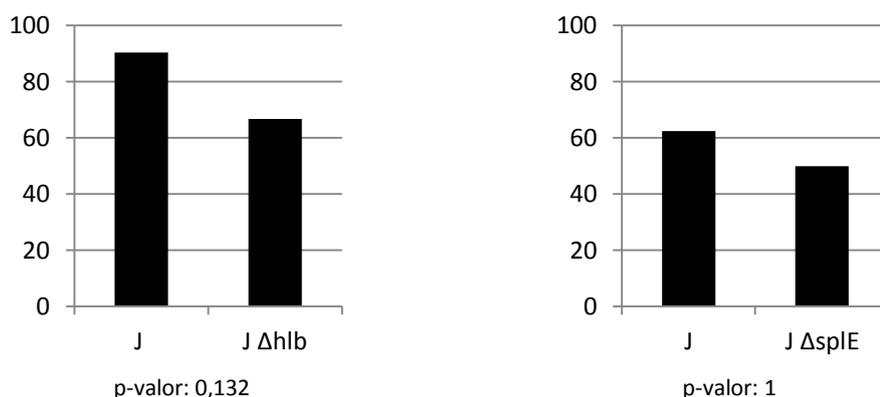
En nuestra búsqueda del gen responsable de la adaptación a conejo, seleccionamos los genes que comentamos en la tabla 4.1.6 para restaurar las cepas, con el fondo de la cepa de conejo, pero con la versión humana del gen seleccionado. Mediante recombinaciones con el plásmido pMAD, modificamos uno cada vez, los genes de la cepa de conejo J para que tuvieran la misma secuencia que las cepas humanas. Dado que la cepa de conejo original infecta a conejos a una dosis de 300 ufc, si el gen mutado fuese necesario, la cepa sería incapaz de infectar a la misma dosis que la cepa control.

Una vez obtenidos, se pasó a infectar mediante inyecciones intradérmicas en el lomo de conejos con inóculos de 300 ufc. Como control se infectaba la cepa J original con la misma cantidad de bacterias.

10 de las 12 mutaciones expuestas en la tabla 4.1.6. generaron lesiones significativamente distintas en comparación con la cepa J original. (Figura 4.1.5.)



**Figura 4.1.5.:** Comparación de las infecciones intradérmicas con la cepa asociada en la infección a cada conejo. Se adjunta el p-valor calculado con corrección de Yates de la  $\chi^2$  para cada una de las comparaciones. N=16. Dosis: 300ufc/100 $\mu$ l



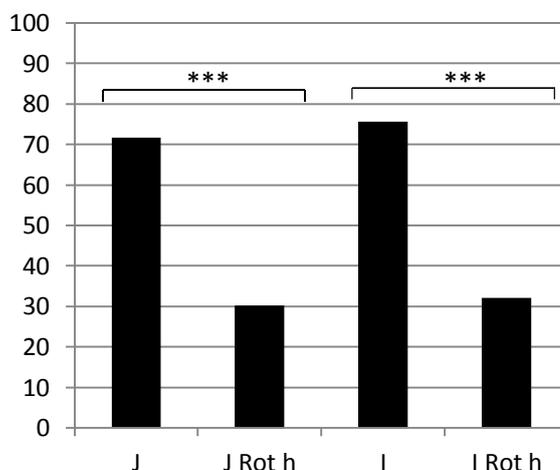
**Figura 4.1.5.:** Comparación de las infecciones intradérmicas con la cepa asociada en la infección a cada conejo. Se adjunta el p-valor calculado con corrección de Yates de la  $\chi^2$  para cada una de las comparaciones. N=16. Dosis: 300ufc/100 $\mu$ l

Únicamente en la quimera con *hIb* de humano puede identificarse una ligera tendencia que podría indicar que está parcialmente implicado en la adaptación.

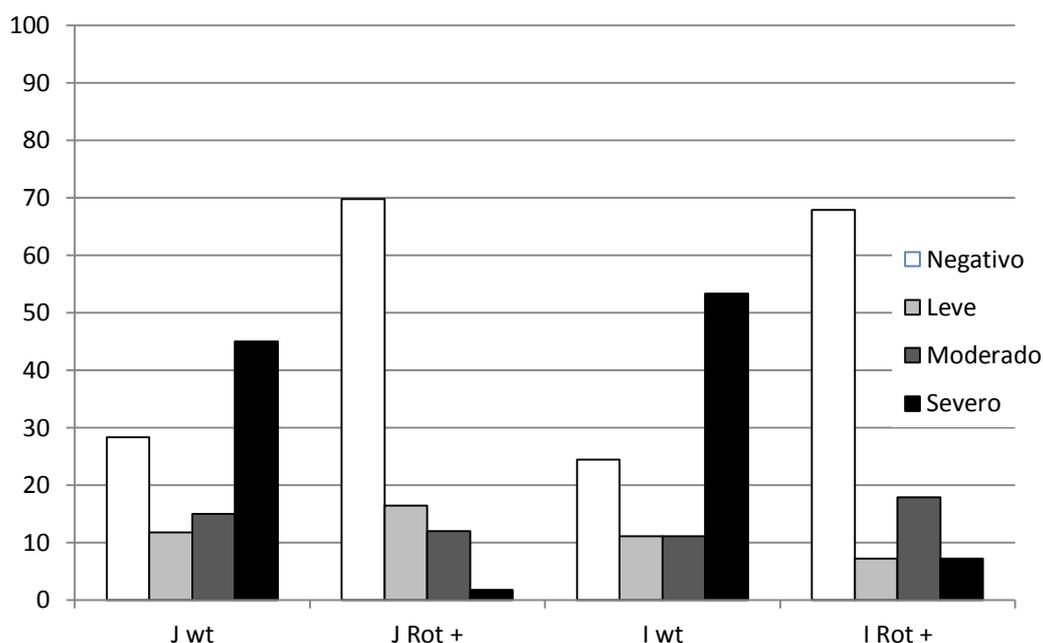
Los genes *rot* y *dItB* se comportaron de distinta manera, por lo que comentaremos los resultados más ampliamente en los siguientes apartados.

#### 4.1.6.1. Rot

Rot es una proteína encargada de regular la expresión de toxinas. La mutación encontrada en la cepa de conejo podría esperarse como relevante, puesto que la modificación de su actuación normal conllevará múltiples cambios metabólicos en el conjunto de proteínas reguladas. En el caso de esta mutación, la cepa de conejo restaurada perdió parte de la infectividad, tanto en lo que respecta al número de animales infectados (Figura 4.1.6.) como en la severidad de las lesiones provocadas (Figura 4.1.7.)



**Figura 4.1.6.:** A) Porcentaje de lesiones producidas respecto al total de puntos de inoculación. N=20. Dosis: 300ufc/100 $\mu$ l. p-valor con corrección de Yates: Jwt/JRot<sup>h</sup>: 0,044, I/I Rot<sup>h</sup>: 0,0013

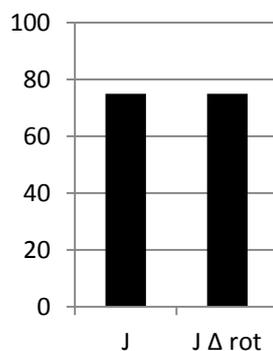


**Figura 4.1.7.:** Severidad de las lesiones producidas según la cepa inoculada. N=20. Dosis: 300ufc/100 $\mu$ l

Para confirmar que la pérdida de infectividad no se debía a un efecto de cepa y sólo era debida a la modificación del gen, la infección se realizó también en la cepa I, además de con la cepa J (Figura 4.1.6 y 4.1.7).

La versión de *rot* que se encontraba en las cepas de conejo producía una parada inesperada de la transcripción de la proteína, modificando la original de 153 a una de 102 residuos. Para elucidar si esta proteína generada era o no funcional procedimos a realizar un mutante delecional en la cepa de conejo.

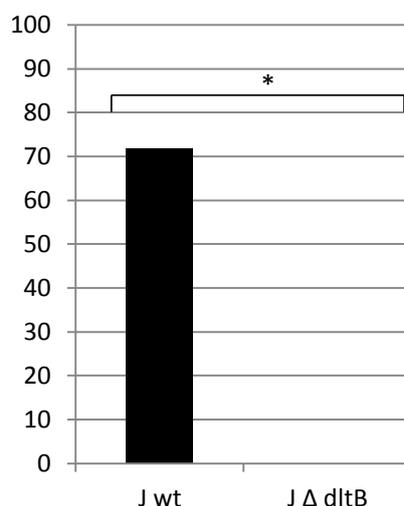
Como observamos en la figura 4.1.8., la cepa se comportaba igual que la cepa wt, lo que quería decir que la falta de función de la proteína en la cepa de conejo es la responsable del fenotipo observado.



**Figura 4.1.8.:** Poceraje de infección de la cepa con *rot* delecionado frente a la cepa original. N=20. Dosis: 300ufc/100 $\mu$ l. P-valor=1

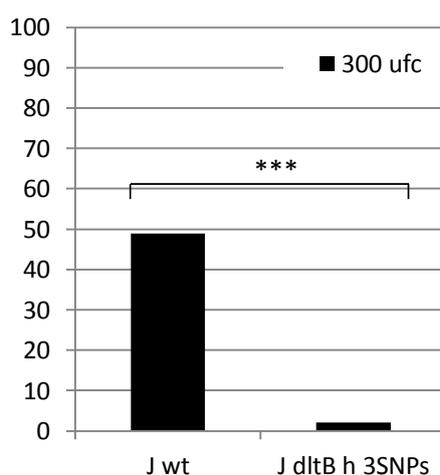


En primer lugar quisimos averiguar si la versión de la proteína que se producía en la cepa de conejo era funcional o no. Para ello, deletamos el gen *dltB* en la cepa J. (Figura 4.1.10.) Las infecciones en conejo nos muestran una cepa incapaz de infectar, con lo que concluimos que la versión de DltB de conejo sí es funcional.



**Figura 4.1.10.:** Porcentaje de lesiones en la cepa que no codifica *dltB* con inóculo de 300 ufc. p-Valor con corrección de Yates: 0. N=20

A la hora de hacer una aproximación, procedimos a modificar los 3 SNPs de DltB a la vez en la cepa J: K113T, H250Y, Y405\*, para que la proteína fuese igual a la codificada en las cepas humanas, y la probamos en infección, al igual que habíamos hecho con el resto de pseudogenes (Figura 4.1.11.). La pérdida de capacidad infectiva fue total.

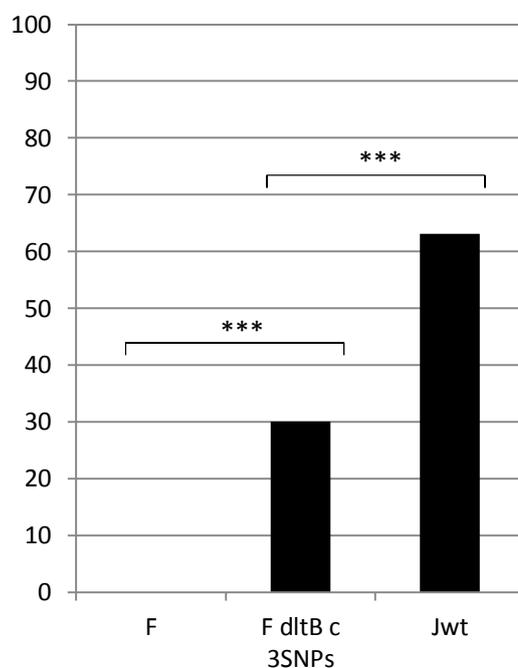


p-Valor con corrección de Yates: 0

**Figura 4.1.11.:** Porcentaje de infectados con la cepa de conejo ST121 restaurada en los 3 SNPs de DltB en comparación con la cepa original. N=20. Dosis: 300ufc/100μl

Para comprender mejor la pérdida de la actividad del gen de la cepa de conejo con la variante humana de DltB se realizaron comparaciones con la cepa humana, con cantidades de  $10^4$  y  $10^5$  bacterias, llegando a la conclusión que la cepa J DltB<sup>h</sup> (3SNPs) no es capaz de infectar, al igual que la cepa humana (p-valor:1).

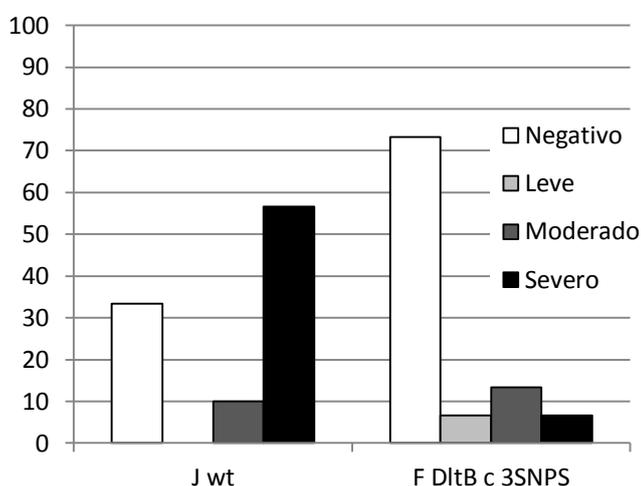
Estos resultados sugerían que la variante de DltB que se encuentra en las cepas de conejo es necesaria para que se produzca la infección. Era el momento de averiguar si la versión de conejo de DltB era suficiente para conferir infectividad a conejos a una cepa humana. Para ello, se realizó el mutante complementario en la cepa F, intercambiando la secuencia de su *dltB* por el de las cepas de conejo, convirtiéndola en DltB<sup>c</sup> T113K, Y250H, \*405Y y se repitió el experimento en piel. (Figura 4.1.12.)



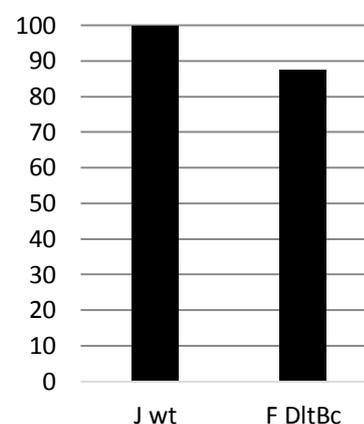
**Figura 4.1.12.:** Porcentaje de animales infectados con la cepa F con DltB como las cepas de conejo ST121. N=30. Dosis: 300 ufc/100 $\mu$ l. p-valores con corrección de Yates: F/F DltB<sup>c</sup> (3SNPs): 0.0038; J/F DltB<sup>c</sup> (3SNPs): 0.0097

Sorprendentemente, la cepa F DltB<sup>c</sup> 3SNPs era capaz de infectar y producir lesiones a una dosis tan baja como la cepa de conejo original, confirmando que este gen además de ser necesario, era suficiente para que una cepa ST121 sin ninguna otra adaptación a conejo pueda generar lesión en este hospedador, haciéndolo un requisito indispensable en la adaptación de las cepas humanas para infectar conejos.

No obstante, la capacidad lesiva de F DltB<sup>c</sup> 3SNPs no llegaba a ser la de la cepa original de conejo y no se recuperaban bacterias de la lesión el mismo número de veces que de la cepa original (Figura 4.1.13. y 4.1.14).

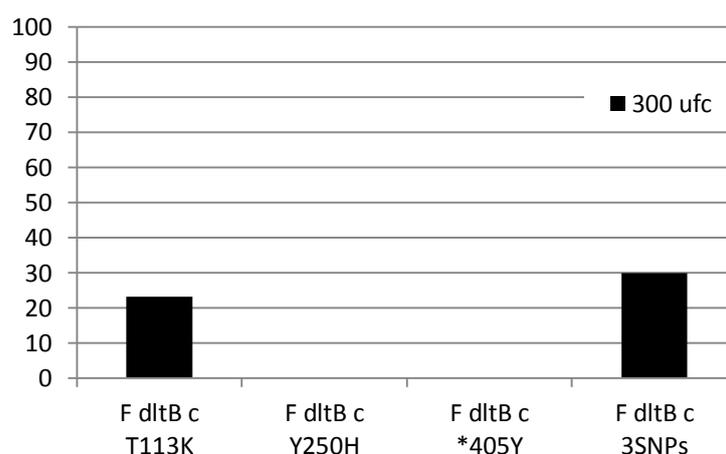


**Figura 4.1.13.:** Severidad de las lesiones producidas según la cepa inoculada. N=30. Dosis: 300ufc/100 $\mu$ l



**Figura 4.1.14.:** Porcentaje de recuperación de *S. aureus* respecto al total de las lesiones. P-valor: 0.1205 N=30

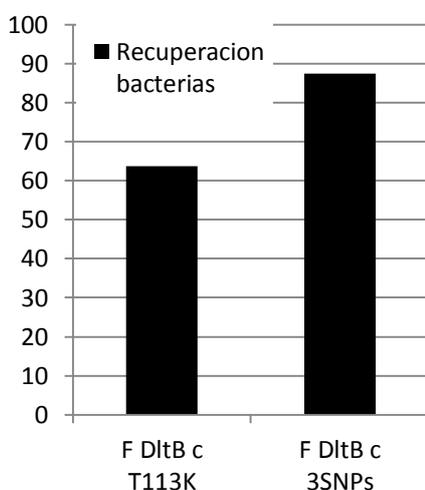
Necesitábamos estudiar ahora cuál era el aporte a la infectividad de cada uno de los 3 residuos modificados en las cepas de conejo ST121 en la proteína DltB. Para ello, se generaron 3 cepas del aislado F en las cuales se modificaron los residuos T113K, Y250H y \*405Y individualmente. Las comparaciones se realizaron al mismo inóculo, 300 ufc, puesto que si alguno de los SNPs era el responsable, originaría un resultado similar, evaluable a esta cantidad de bacterias (Figura 4.1.14.).



**Figura 4.1.14.:** Porcentaje de animales infectados con la cepa F con las distintas mutaciones en *dltB*. N=30. Dosis: 300 ufc/100 $\mu$ l. P-Valor con corrección de Yates F DltB<sup>c</sup> (3 SNPs)/F DltB T113K: 0,7703

El resultado de este experimento demostró que los dos últimos SNPs no eran los responsables iniciales del salto de especie y el primer SNP era el que le otorgaba la infectividad al DltB de conejo (Figura 4.1.14). El estadístico calculado nos indica que la obtención de la capacidad infectiva de F DltB<sup>c</sup> 3SNPs reside prácticamente de manera exclusiva en el primer SNP al cambiar de una treonina a una lisina.

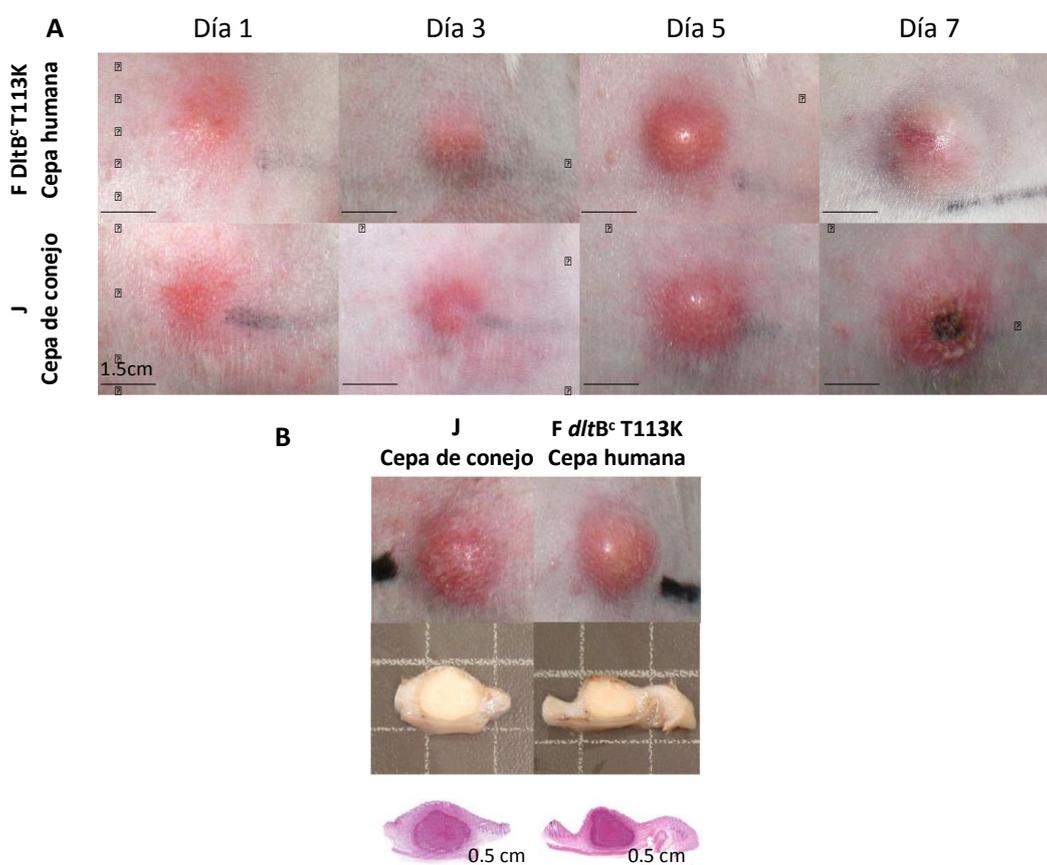
F DltB<sup>c</sup> T113K era capaz de infectar y producir lesión, aunque no siempre se recuperaban bacterias F DltB<sup>c</sup> T113K de las lesiones al final de cada infección (Figura 4.1.15.).



**Figura 4.1.15.:** Porcentaje de lesiones de las cepa F DltB<sup>c</sup> 3SNPs y F DltB<sup>c</sup> T113K de las cuales se pudieron aislar colonias. N=30. Dosis: 300 ufc/100µl.

Como se observa en la figura, en las infecciones con la cepa F3SNPs se recuperaban bacterias en el 87.5% de las lesiones al final de la infección, esto sugiere que las otras modificaciones de DltB en Y250H y \*405Y son necesarias para conseguir reforzar la acción de DltB, llegando a lograr en la cepa humana F DltB<sup>c</sup> (3SNPs) una infectividad similar a la de la cepa de conejo J Rot<sup>h</sup>, (p-valor con corrección de Yates: 0.78).

La implicación de la modificación de este residuo 113 es tal, que las lesiones provocadas por F DltB<sup>c</sup> T113K presentaron una histopatología similar a la de la cepa de conejo original J. Los abscesos dérmicos producidos evolucionaban hasta alcanzar 2 cm de diámetro el séptimo día de infección (Figura 4.1.16.).



**Figura 4.1.16.:** **Figura A:** evolución temporal de las lesiones en piel de conejo según la cepa (300 ufc). **Figura B:** secciones transversales de lesiones en piel de conejo y tinciones de las mismas con hematoxilina eosina, provocadas por la cepa de conejo y por la cepa humana con DltB modificado. Día 7 post-infección.

En las tinciones con hematoxilina-eosina se visualizaban abscesos formados por áreas de material purulento rodeadas por fibrosis e infiltrado de neutrófilos principalmente.

Para finalizar, quisimos comprobar que el cambio observado se debía únicamente a la acción de nuestra mutación. A lo largo del proceso de mutagénesis, se somete a la bacteria a sustancias tóxicas como es el X-gal y pasa por varias etapas de crecimiento a distintas temperaturas (32, 37 y 42°C), que podrían provocar mutaciones no deseadas. Para descartar la posibilidad de que el cambio que incrementaba la infectividad se hubiera producido aleatoriamente a lo largo de estos procesos de recombinación, decidimos revertir la mutación de F DltB<sup>c</sup> T113K, como control. El comportamiento de la cepa fue el esperado para la cepa F original, siendo incapaz de infectar con un inóculo de 300 ufc en ningún caso.

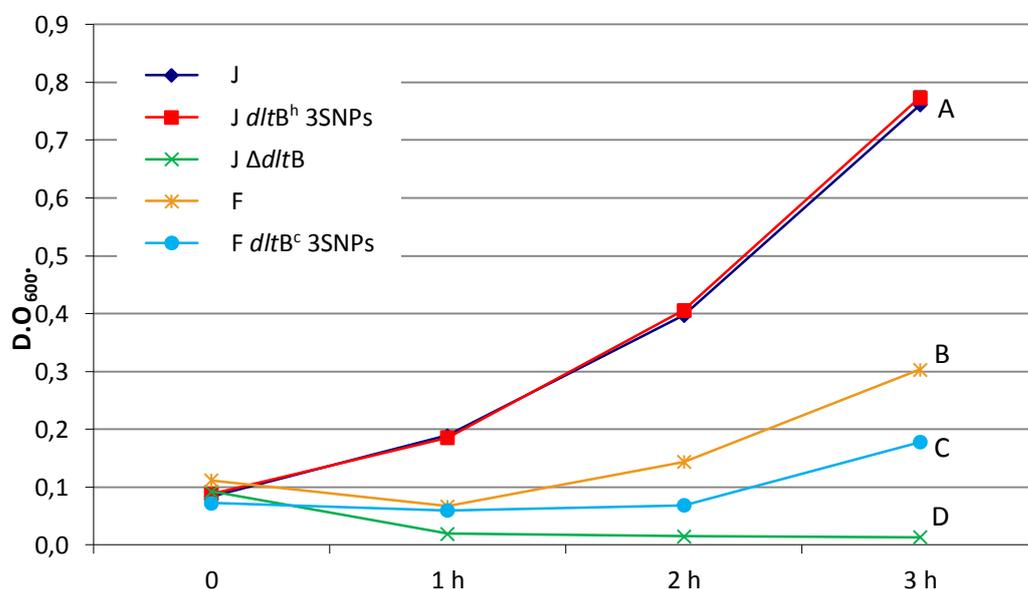
#### 4.1.7. Función de DltB

El operón DltABCD tiene como función modificar la pared para equilibrar las cargas negativas de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos con el fin de evitar la acción de las proteínas

del sistema inmune del hospedador que reconocen las cargas negativas como extrañas. Para ello, se exportan y unen a la pared D-alaninas; residuos con carga positiva que se unen a los ácidos lipoteicoicos modificando la carga neta exterior de la bacteria. En concreto, DltB es la proteína encargada del transporte transmembrana de la D-alanina (Peschel *et al.*, 1999). Uniendo esta información con nuestros datos, consideramos que un cambio en la actividad de la proteína generará un defecto o un exceso de D-alaninas en el exterior de la bacteria, que daría como resultado una diferencia en la supervivencia de las bacterias a la hora de enfrentarse al sistema inmune del hospedador.

Para los experimentos decidimos utilizar las cepas de conejo y humana salvajes y las versiones con *dltB* intercambiado de ambas cepas. Usamos también como control, la cepa de conejo con *dltB* delecionado.

Para estudiar esta resistencia a los péptidos catiónicos del sistema inmune enfrentamos a las cepas al péptido nisina, según se describe en el apartado material y métodos. Las cepas conformaron 4 grupos significativamente diferentes en el análisis estadístico ANOVA (Figura 4.1.17.).

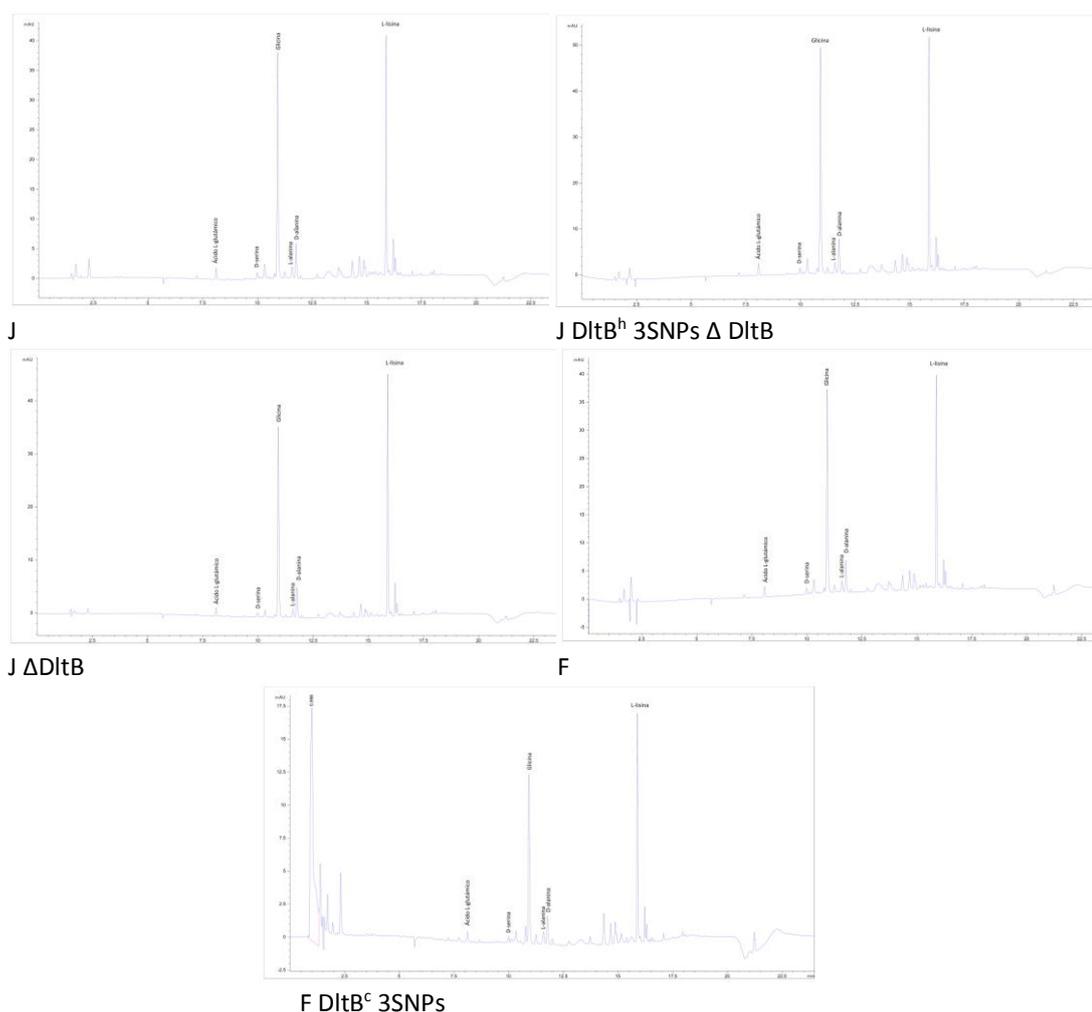


**Figura 4.1.17.:** Densidad óptica del cultivo con nisina medida a 600nm a diferentes tiempos de las diferentes cepas. Se realizó un test ANOVA con corrección de Bonferroni.

Las cepas de conejo J wt y J *dltB<sup>h</sup>* presentaban mayor resistencia a la nisina, mientras que la cepa de conejo con *dltB* delecionado no era capaz de sobrevivir en este medio. Las cepas humanas comenzaban a crecer más tarde, con diferencias significativas entre la

original y la cepa con *dltB* de conejo. Pero, al contrario de lo que esperábamos, era la cepa más parecida a la de conejo la que resistía peor de las dos.

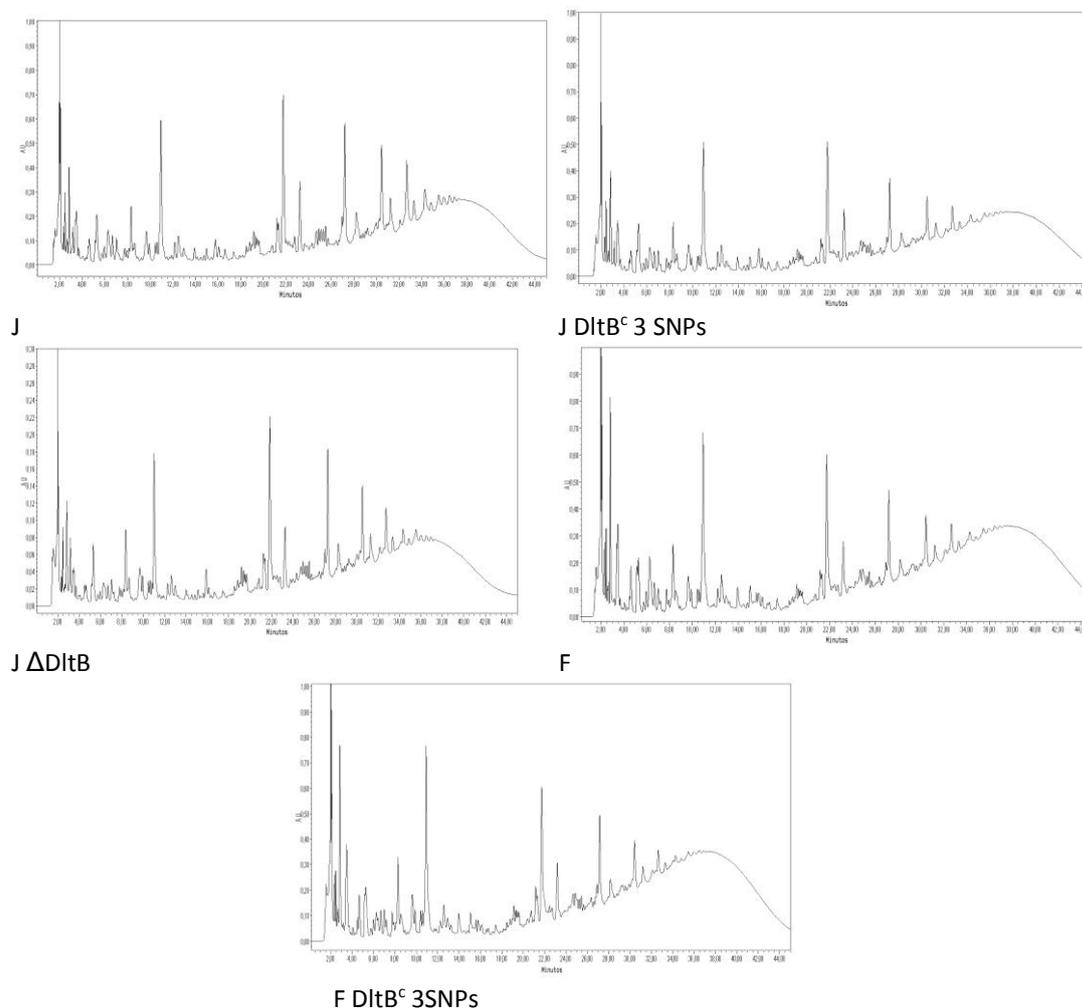
Dado que la acción del operón *DltABCD* parece estar implicado en la D-alanilación de la pared celular, una aproximación más directa del comportamiento de los mutantes es evaluar la cantidad de D-alaninas incorporadas a la pared celular de la bacteria. Se extrajo la pared celular de cada cepa y se analizaron las muestras por HPLC. La altura de los picos de D-alanina se mantuvo constante en todas las muestras (Figura 4.1.18.). No sólo respecto a D-alaninas, sino que tampoco se localizó ningún cambio que estuviera relacionado con *DltB* respecto a la composición aminoacídica global (Figura 4.1.18.).



**Figura 4.1.18.:** Curvas resultantes de HPLC de los aminoácidos unidos a la pared de las cepas de conejo y humanas

Si *DltB* estuviese implicado en la modificación de la pared celular, podríamos localizar diferencias si estudiamos la composición de esa pared en los distintos mutantes mediante UHPLC.

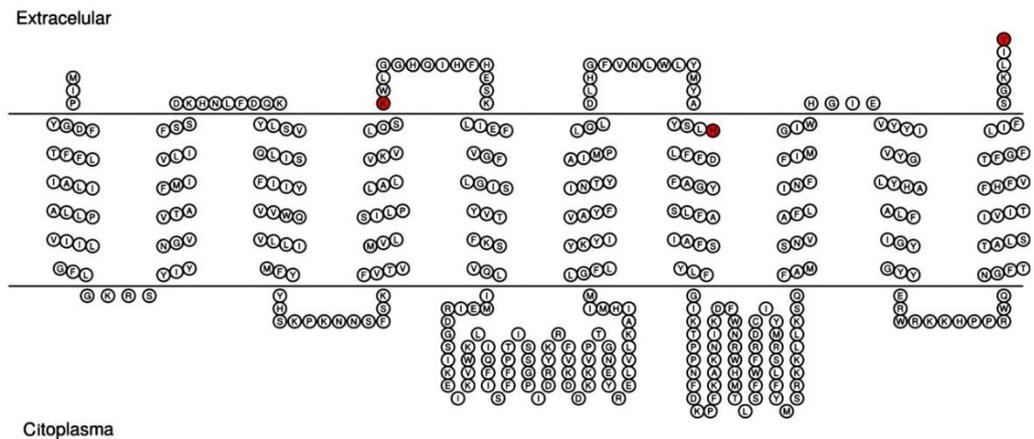
El patrón de las curvas es similar en todos los casos, identificándose únicamente un pico a los 4:30 minutos que se eleva en el caso de las dos cepas humanas, por tanto no relacionado con la actividad de DltB (Figura 4.1.19.).



**Figura 4.1.19.:** Curvas resultantes de HPLC del muropéptido de las cepas de conejo y humanas.

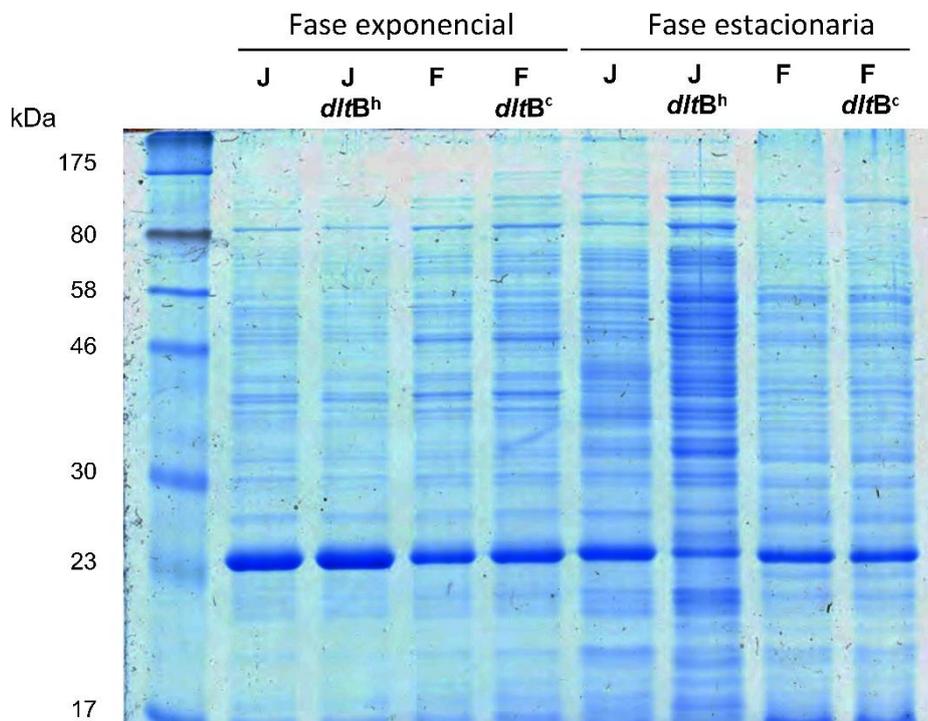
Podemos concluir así que no se encuentran diferencias en la composición del muropéptido debido a la alteración de la proteína DltB.

DltB es una proteína de membrana. Mediante una predicción de su topología realizada con el método TMHMM, se comprobó que la proteína traspasa la membrana 10 veces. Las 3 mutaciones encontradas en las cepas de conejo ST121 se localizan en la región más extracelular de la proteína (Figura 4.1.20.).



**Figura 4.1.20.:** Estructura prevista para la proteína DltB. En rojo se marcan las mutaciones encontradas en la proteína de las cepas de conejo ST121.

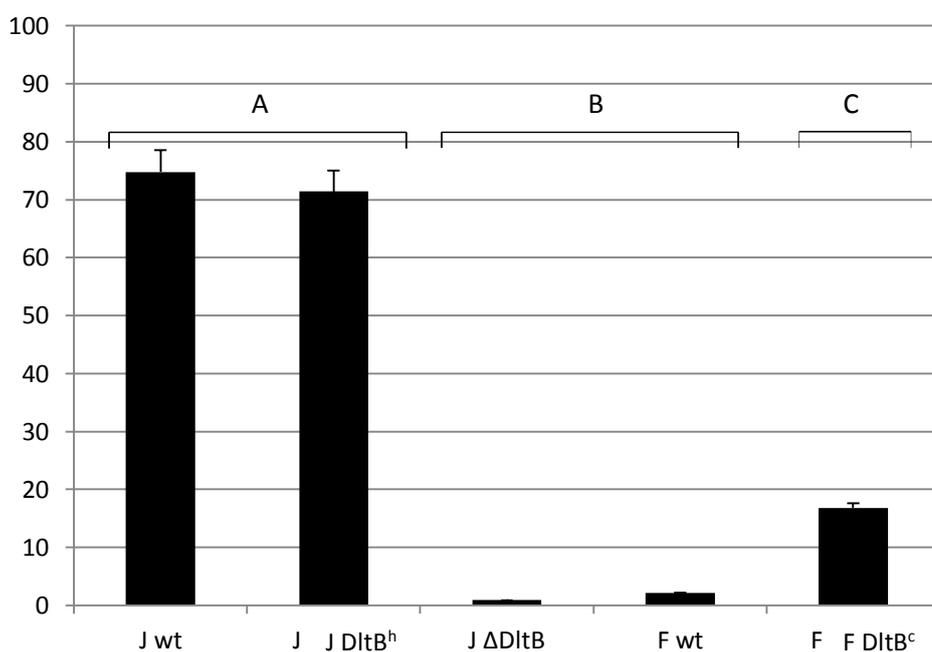
Para comprobar si DltB interfería con otros componentes de la pared celular que le pudieran ayudar en el proceso infectivo, realizamos un análisis de las proteínas de la superficie, que nos indicaría si existe alguna diferencia en la cantidad de proteínas unidas a la membrana. Este experimento se realizó mediante una electroforesis SDS-PAGE (Figura 4.1.21.).



**Figura 4.1.21.:** Electroforesis de las proteínas de membrana desnaturalizadas con SDS en gel de acrilamida.

Aunque existen bandas características de las cepas según el hospedador del que provengan, no se observan diferencias que estén relacionadas con la copia de *dltB* que se codifique.

Por otra parte, debido a su localización, DltB podría interactuar con los componentes de sistema inmune innato, justificando que diferentes DltB sean necesarios para la bacteria según el hospedador a infectar. Por este motivo decidimos realizar un experimento que tuviera en cuenta la interacción de las bacterias con el sistema inmune innato, emulando las condiciones a las que las bacterias se tienen que enfrentar en una infección real en conejo. Para ello, llevamos a cabo un experimento haciendo crecer las bacterias en sangre entera de conejo y sembrándolas en placa a las 2 horas, puesto que en experimentos preliminares constatamos que es el tiempo en el que mayor mortalidad de células se visualiza. Para ello se emplearon las cepas de conejo y humana salvajes y las versiones con *dltB* intercambiado de ambas cepas. Usamos también como control, la cepa de conejo con *dltB* delecionado (Figura 4.1.22.).



**Figura 4.1.22.:** Porcentaje de supervivencia en sangre entera de conejo medida a las 2 horas post-desafío.

En los resultados del test ANOVA se obtiene que los datos se reúnen en tres grupos. Una vez más, la cepa con *dltB* delecionado no es capaz de sobrevivir. A pesar de que F *dltB*<sup>c</sup> 3SNPs se comporta significativamente diferente a la cepa F original, su porcentaje de supervivencia es mucho menor que el de la cepa de conejo. Es más, la cepa J con *dltB*

humano no presenta diferencias con la cepa de conejo original. Todo esto indica que la supervivencia en sangre no está relacionada con la proteína DltB que se codifica.

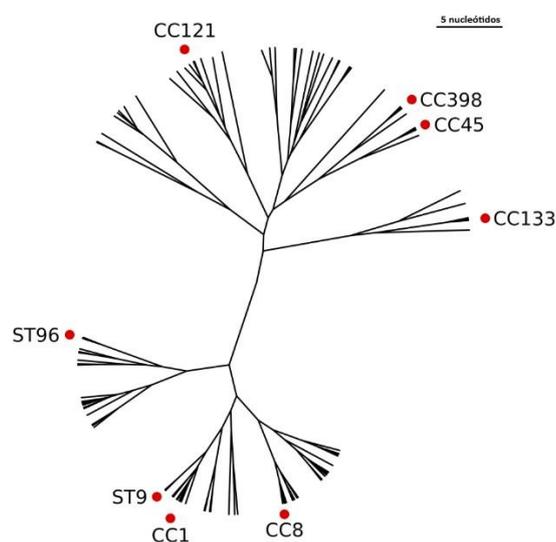
Desgraciadamente, no encontramos una función de DltB que explicara el efecto de la mutación de *dltB* en la infección en piel. Por ello, consideramos que DltB debe tener otra función alternativa que interviene en este caso.

#### 4.1.8. Importancia de DltB en el reino Bacteria

##### 4.1.8.1. DltB en otros MLST

Como ya hemos demostrado, el complejo clonal ST121 es capaz de cambiar de hospedador mediante un cambio en *dltB*. En este momento podemos plantearnos la hipótesis de que en otros STs de *S. aureus* haya ocurrido lo mismo.

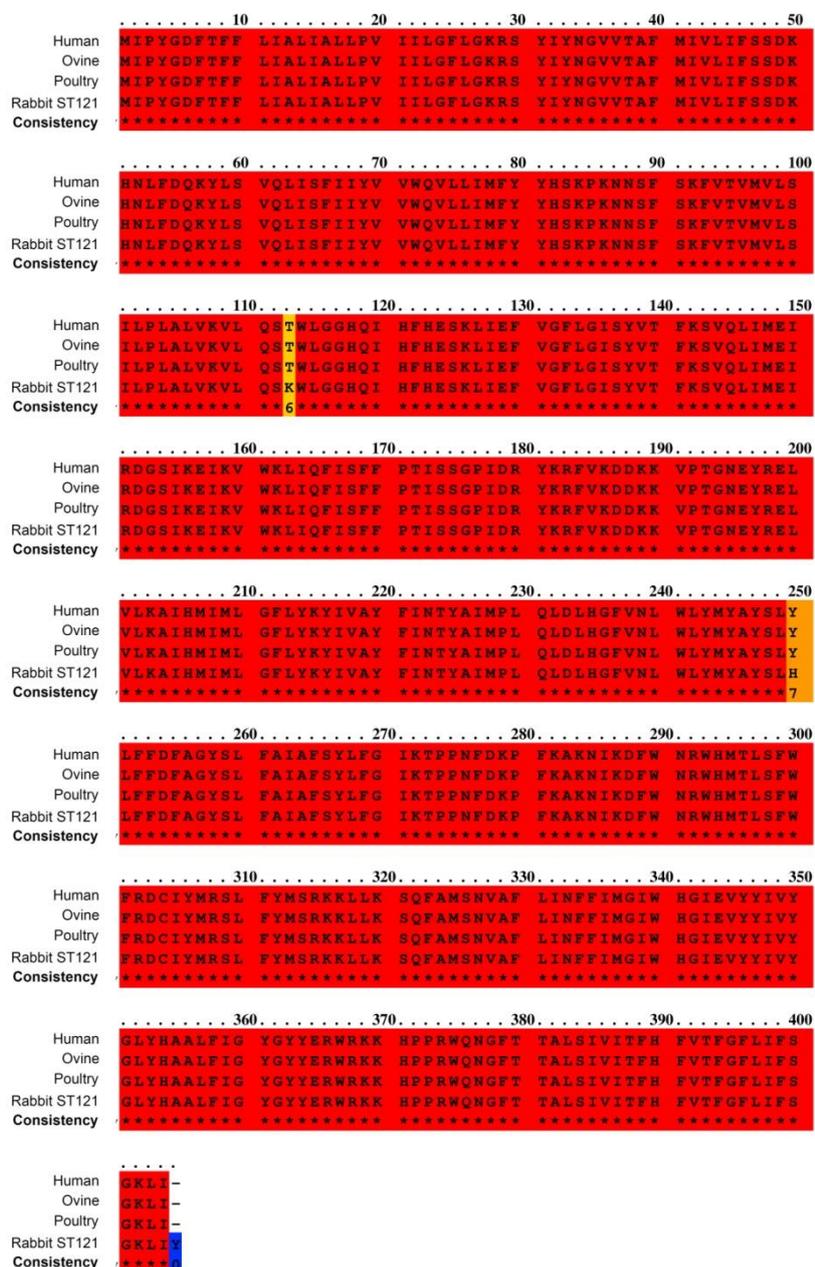
Un análisis filogenético de cepas de *S. aureus* basado en las secuencias de los genes que se secuencian para identificar el MLST produce un árbol sin raíz que presenta cepas de conejo en todas sus ramas principales (Figura 4.1.23.). Esto indica que la evolución de *S. aureus* al nuevo hospedador cunícola ocurrió varias veces, que podemos suponer en eventos evolutivos desde humano a conejo.



**Figura 4.1.23.:** Filogenia bayesiana de la especie *S. aureus* reconstruida utilizando la secuencia de 5 locus MLST no recombinantes. El árbol se calculó con 108 STs representantes de todo tipo de hospedadores. Señalados en rojo están los STs o complejos clonales (CC) que tienen representantes en conejo y humanos.

Como está indicado en el árbol, además del ST121, existen otros ST de *S. aureus* (ST1, ST8, ST9, ST45, ST96, ST133 y ST398) que se aíslan tanto de conejo como de humanos. De

estas cepas se secuenciaron sus *dltB* y se compararon con las secuencias de *dltB* de otros MLST y otros orígenes, no sólo de humanos sino también de rumiantes y aves (figura 4.1.24.).



**Figura 4.1.24.:** Alineación de la secuencia aminoacídica de los *DltB* de cepas de *S. aureus* con distinto hospedador realizada en el programa Praline.

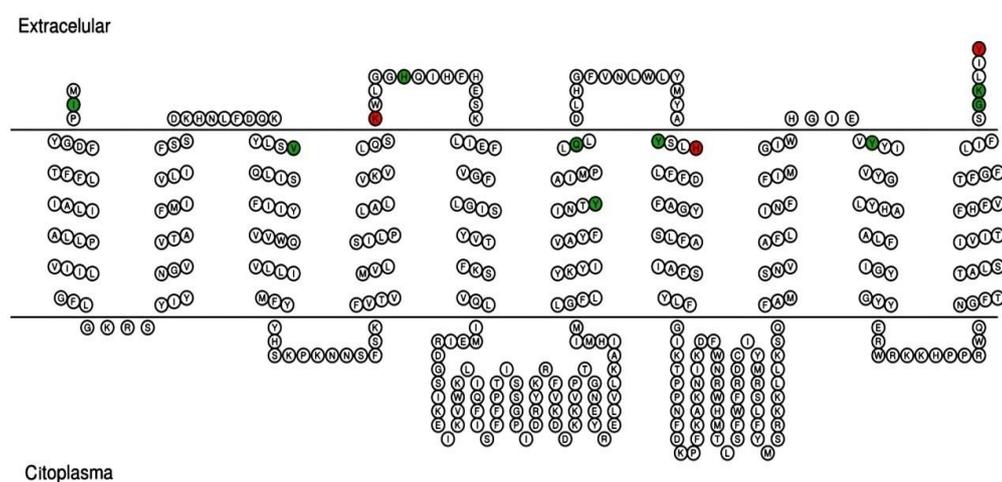
De las 445 cepas humanas examinadas sólo 8 *dltB* tenían una o más mutaciones no sinónimas. Esto representa un 1,8% del total. Sin embargo, de las 39 cepas de conejo, el 100% contenían una o más mutaciones no sinónimas. Esta diferencia indica que las cepas de conejo se han adaptado a este hospedador mediante la mutación de *dltB* y esto ha ocurrido en múltiples ocasiones, presentando adaptaciones ortólogas que muestran convergencia

evolutiva en *dltB*. Esta hipótesis se refuerza más aún por el hecho de que las secuencias de *dltB* dentro de un mismo tipo de secuencia también pueden ser diferentes, como en el caso de la ST1 y ST398, indicando al menos 2 saltos de hospedador diferentes del mismo tipo de secuencia (tabla 4.1.7.).

**Tabla 4.1.7.:** Polimorfismos no sinónimos en DltB de conejo en comparación con DltB de las cepas aisladas de humanos. En negrita los residuos que tienen polimorfismo en más de un clon.

Complejo clonal (CC)	Tipo de secuencia (ST)	Polimorfismos no sinónimos
1	1	I227T, G401D
	1	I2T, *405Q
	2780	I2T, *405Q
8	8	I227S, *405Q
	407	H121Q, I227T, *405Q
	879	H121Q, I227T, *405Q
9	9	G401D
45	45	V61G, Y346S
96	96	K402R, *405Q
121	121	T113K, Y250H, *405Y
133	133	Q231R, Y247H, Y346H, G401D
398	398	*405Q
	398	Y346C

Así, como apuntábamos en el apartado anterior, otro dato a destacar es que la mayoría de las mutaciones de *dltB*, no sólo en ST121 sino en todos los STs, están, según la predicción *in silico* de la molécula, ubicadas en la región de la proteína que se localiza hacia el exterior (Figura 4.1.25.). Esta porción de la proteína estará más expuesta a la acción de las moléculas del hospedador y por tanto sometida a mayor presión de selección.



**Figura 4.1.25.:** Estructura prevista para la proteína DltB. En rojo se marcan las mutaciones encontradas en la proteína de las cepas de conejo ST121. En verde están marcadas las que se encuentran modificadas en los otros STs que también se aíslan de conejo.

Esta diversidad alélica de *dltB* no se encuentra en otros genes como podría ser *rot*, que, excepto en el caso de ST121, en el resto de STs se encuentra conservado como en las cepas humanas; o *hIb*, que en la mayoría de las cepas de conejo con otros ST está interrumpido por el bacteriófago con integrasa tipo 3. Esta conservación de genes entre hospedadores indica que no son necesarios en el primer paso de la adaptación a conejo.

#### 4.1.8.2. DltB en otras especies bacterianas

Siguiendo con la comparativa, DltB no sólo participa en la adaptación de *S. aureus*, sino que en distintas especies bacterianas también representa un gran papel en el cambio de hospedador, presentando variantes según en cuál se encuentre. Existen 2 subtipos de *Bacillus amyloliquefaciens* que están adaptados a dos medios diferentes: FZB42 vive en las raíces de la planta, mientras que DSM7 está adaptado a vivir en el suelo. La versión de DltB de la cepa de suelo, DSM7, presenta mutaciones sinónimas y está alargado en un residuo más de Histidina respecto a la cepa de las raíces FZB42 (Figura 4.1.26.).

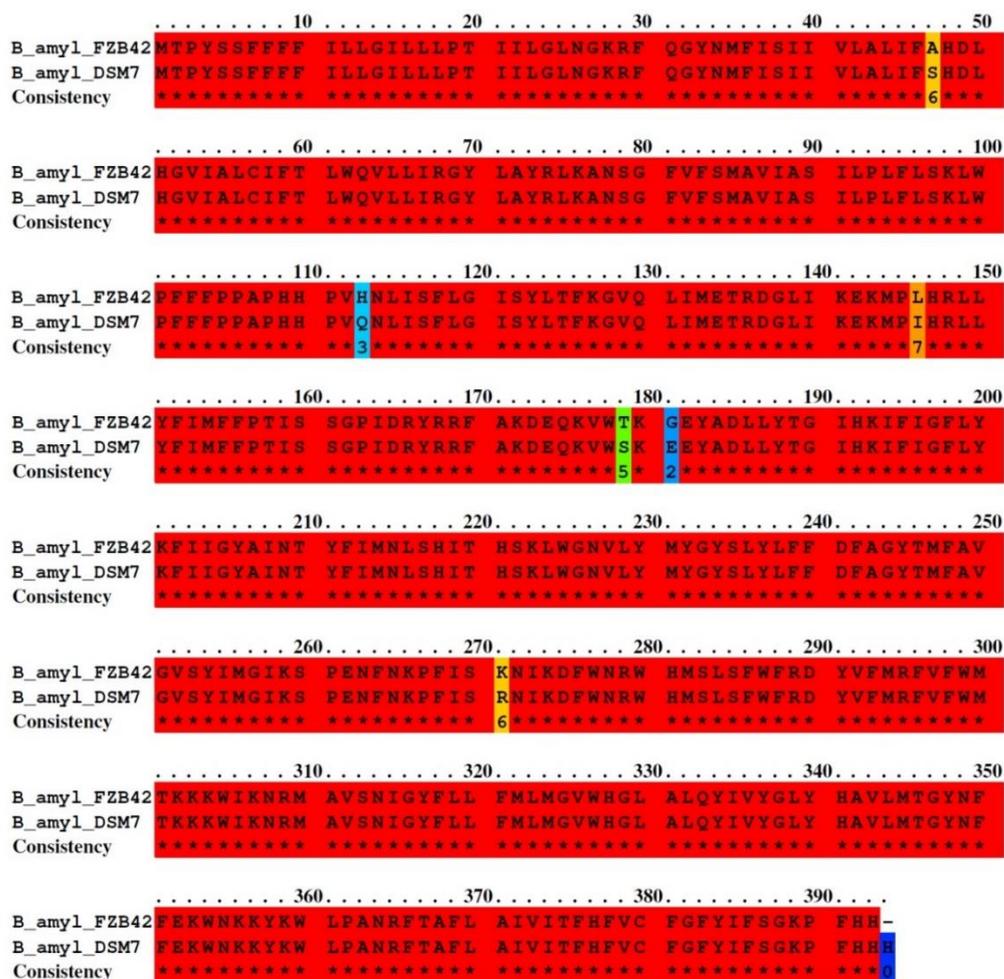


Figura 4.1.26.: Comparativa de la secuencia aminoacídica de DltB entre los 2 subtipos de *Bacillus amyloliquefaciens*

Encontramos otro ejemplo en el caso de *Streptococcus pneumoniae*, donde varias cepas humanas no relacionadas entre ellas, tras sufrir una presión selectiva y adaptarse a nuevas condiciones después del uso de vacunas en humanos presentan todas una secuencia proteica de DltB alargada en varios residuos (Figura 4.1.27.).

	..... 10 .....	..... 20 .....	..... 30 .....	..... 40 .....	..... 50
DltB_TIGR4	MMEFFQQLPH	LEPYGNPQYF	VYVIAATLPI	FIGLFFKKRF	AWYEVLVSLF
DltB_GA41301	MMEFFQQLPH	LEPYGNPQYF	VYVIAATLPI	FIGLFFKKRF	AWYEVLVSLF
DltB_GA17227	MMEFFQQLPH	LEPYGNPQYF	VYVIAATLPI	FIGLFFKKRF	AWYEVLVSLF
DltB_GA47901	MMEFFQQLPH	LEPYGNPQYF	VYVIAATLPI	FIGLFFKKRF	AWYEVLVSLF
Consistency	*****	*****	*****6*****	*****	*****
	..... 60 .....	..... 70 .....	..... 80 .....	..... 90 .....	..... 100
DltB_TIGR4	FIVTMLVGGK	TNQLAALGIY	LCWEILLLLF	YKHYRKSDBG	KWVFYLVSFL
DltB_GA41301	FIVTMLVGGK	TNQLAALGIY	LCWEILLLLF	YKHYRKSDBG	KWVFYLVSFL
DltB_GA17227	FIVTMLVGGK	TNQLAALGIY	LCWEILLLLF	YKHYRKSDBG	KWVFYLVSFL
DltB_GA47901	FIVTMLVGGK	TNQLAALGIY	LCWEILLLLF	YKHYRKSDBG	KWVFYLVSFL
Consistency	*****	*****	*****	*****	*****
	..... 110 .....	..... 120 .....	..... 130 .....	..... 140 .....	..... 150
DltB_TIGR4	SLLPPIIFVKV	QPAINGTQSL	LGFLGISYLT	FRSVGIVIEL	RDGVIKDFTL
DltB_GA41301	SLLPPIIFVKV	QPAINGTQSL	LGFLGISYLT	FRSVGIIIEL	RDGVIKDFTL
DltB_GA17227	SLLPPIIFVKV	QPAINGTQSL	LGFLGISYLT	FRSVGIIIEL	RDGVIKDFTL
DltB_GA47901	SLLPPIIFVKV	QPAINGTQSL	LGFLGISYLT	FRSVGIIIEL	RDGVIKDFTL
Consistency	*****	*****	*****	*****9*****	*****
	..... 160 .....	..... 170 .....	..... 180 .....	..... 190 .....	..... 200
DltB_TIGR4	WEFLRFLLFM	PTFSSGPIDR	FRRFNENYQA	IPERDELMDM	LDESVRVIMW
DltB_GA41301	WEFLRFLLFM	PTFSSGPIDR	FRRFNENYQA	IPERDELMDM	LDESVRVIMW
DltB_GA17227	WEFLRFLLFM	PTFSSGPIDR	FRRFNENYQA	IPERDELMDM	LDESVRVIMW
DltB_GA47901	WEFLRFLLFM	PTFSSGPIDR	FRRFNENYQA	IPERDELMDM	LDESVRVIMW
Consistency	*****	*****	*****	*****	*****
	..... 210 .....	..... 220 .....	..... 230 .....	..... 240 .....	..... 250
DltB_TIGR4	GFLYKFILAH	VLGETLLPPL	KNLALQSGGF	FNLYALAVMY	TFGLELFFDF
DltB_GA41301	GFLYKFILAH	VLGETLLPPL	KNLALQSGGF	FNLYALAVMY	TFGLELFFDF
DltB_GA17227	GFLYKFILAH	VLGETLLPPL	KNLALQSGGF	FNLYALAVMY	TFGLELFFDF
DltB_GA47901	GFLYKFILAH	VLGETLLPPL	KNLALQSGGF	FNLYALAVMY	TFGLELFFDF
Consistency	*****	*****	*****	*****	*****
	..... 260 .....	..... 270 .....	..... 280 .....	..... 290 .....	..... 300
DltB_TIGR4	AGYSMFALAI	SNLMGIRSPI	NFNKPFLSRD	LKEFWNRWHM	SLSFWFRDFV
DltB_GA41301	AGYSMFALAI	SNLMGIRSPI	NFNKPFLSRD	LKEFWNRWHM	SLSFWFRDFV
DltB_GA17227	AGYSMFALAI	SNLMGIRSPI	NFNKPFLSRD	LKEFWNRWHM	SLSFWFRDFV
DltB_GA47901	AGYSMFALAI	SNLMGIRSPI	NFNKPFLSRD	LKEFWNRWHM	SLSFWFRDFV
Consistency	*****	*****	*****	*****	*****
	..... 310 .....	..... 320 .....	..... 330 .....	..... 340 .....	..... 350
DltB_TIGR4	FMRMVMVLTR	KKVFKNRNV	SSMAYIVNML	IMGFWHGVTW	YYIAYGLFHG
DltB_GA41301	FMRMVMVLTR	KKVFKNRNV	SSMAYIVNML	IMGFWHGVTW	YYIAYGLFHG
DltB_GA17227	FMRMVMVLTR	KKVFKNRNV	SSMAYIVNML	IMGFWHGVTW	YYIAYGLFHG
DltB_GA47901	FMRMVMVLTR	KKVFKNRNV	SSMAYIVNML	IMGFWHGVTW	YYIAYGLFHG
Consistency	*****	*****	*****	*****	*****
	..... 360 .....	..... 370 .....	..... 380 .....	..... 390 .....	..... 400
DltB_TIGR4	LGLVINDAWV	RKKKTLNKER	KKAGKAALPE	NRWIQLLGMV	VTFHVVMLSF
DltB_GA41301	LGLVINDAWV	RKKKTLNKER	KKAGKAALPE	NRWIQLLGMV	VTFHVVMLSF
DltB_GA17227	LGLVINDAWV	RKKKTLNKER	KKAGKAALPE	NRWIQLLGMV	VTFHVVMLSF
DltB_GA47901	LGLVINDAWV	RKKKTLNKER	KKAGKAALPE	NRWIQLLGMV	VTFHVVMLSF
Consistency	*****	*****	*****	*****	*****
	..... 410 .....				
DltB_TIGR4	LIFSGFLNNL	WFKK---			
DltB_GA41301	LIFSGFLNNL	WFKK---			
DltB_GA17227	LIFSGFLNNL	WFKNKRK			
DltB_GA47901	LIFSGFLNNL	WFKNKRK			
Consistency	*****	***6111			

**Figura 4.1.27.:** Comparativa de la secuencia aminoacídica de DltB entre 4 subtipos de *Streptococcus pneumoniae*

Teniendo en cuenta tanto nuestros datos como éstos, podemos suponer que las variantes alélicas de DltB juegan un papel potencialmente importante en la adaptación a nichos ambientales o específicos de hospedador.

## 4.2 Adaptación de *S. aureus in vivo* a un nuevo hospedador

### 4.2.1. Evolución forzada de cepas humanas

Según el primer apartado de esta tesis podríamos hipotetizar que para comenzar a adaptarse a un nuevo hospedador los cambios que comienzan ocurriendo son pequeños. En el caso de *S. aureus* ST121, las cepas ya se encontraban adaptadas y hemos inferido los cambios originales necesarios para el cambio de hospedador mediante la secuenciación. Sin embargo, puede realizarse otra aproximación mediante un experimento en el que se fuerce a una cepa a adaptarse a un nuevo hospedador para estudiar de primera mano lo que ocurre en estos primeros estadíos.

Nos propusimos infectar la glándula mamaria de ovejas con cepas humanas, con el fin de conocer qué cambios genómicos ocurren al inicio del proceso de adaptación. Así mismo, esperábamos conocer cuál era el papel de los EGMs en esos estadíos iniciales puesto que al contrario que en las cepas de conejo, en las cepas de oveja sí que se suelen encontrar EGMs (Guinane *et al.*, 2010), así que nos propusimos también estudiar su movilización, selección y fijación en las cepas.

Las cepas humanas utilizadas fueron CH3657, que pertenece al ST8 y N315 del ST5. Las cepas ovinas fueron DS74, DS83 y ED133 (Guinane *et al.*, 2010) y pertenecían todas al ST133. Éstas últimas codificaban los bacteriófagos  $\phi$ Saov1,  $\phi$ Saov2 y  $\phi$ Saov3 y las islas SaPlov1 y SaPlov2. Estos EGMs podrían movilizarse y servirían para transferirse a las cepas humanas y ayudarles a establecer la infección en este nuevo hospedador.

Las ovejas se infectaron en mama a través del pezón. Al comienzo del estudio se tomaron por cada cepa humana 6 ovejas recién paridas, productoras de leche y sin infecciones en las glándulas mamarias y se inocularon con una dosis de 400 ufc/ml en 1ml de PBS estéril. Para propiciar una movilización de los EGMs a las cepas humanas, todas las ovejas convivieron en el mismo parque junto con otras ovejas infectadas con cepas de *S. aureus* ovinas del mismo modo, que actuaron como potenciales donadoras de EGM. Otras cepas donadoras podrían ser los *S. aureus* que se encontraban en las fosas nasales de las ovejas portadoras. La infección se prolongó hasta 60 días, que es el tiempo en el que los corderos empiezan a dejar de mamar y las ovejas proceden a su secado.

Se llevaron a cabo infecciones consecutivas en distintas ovejas con la intención de que cada cepa se adaptara, no sólo a las características de un animal sino a las características



Por desgracia, en algunos casos las bacterias no eran capaces de mantenerse en infección (Figura 4.2.1.).

#### 4.2.2. Modificaciones sufridas durante la evolución

Para confirmar que las cepas humanas en infección de oveja estaban sufriendo una presión de selección, procedimos a establecer cultivos por separado de las cepas humanas CH3657 y N315 y de la cepa ovina ED133, refrescando el medio de cultivo cada 12 horas. Las mutaciones que encontraríamos en las cepas con crecimiento en el laboratorio deberían ser distintas a las que se encontrarán en las cepas procedentes de la infección en oveja.

Con la intención de señalar los cambios ocurridos a lo largo del proceso adaptativo, se procedió a la secuenciación de las bacterias (Tabla 4.2.1.). Se seleccionaron para la secuenciación las cepas originales de las que se partió en el experimento para compararlas con las evolucionadas en oveja. Como representantes de éstas últimas, fueron secuenciadas completamente cinco cepas CH3657 y cuatro cepas N315 aisladas de la leche de las ovejas infectadas. La selección de estas cepas se realizó en base a que hubieran vivido en la cisterna del mayor número de ovejas.

Para comparar la tasa de cambio que se produce en *S. aureus* al estar en ese medio, se secuenció una cepa ovina con la que se había infectado a tres ovejas donadoras consecutivamente (OV2023) y se comparó con la secuencia de esa misma cepa al inicio del estudio (OV3). Por último, para ver cómo los cambios sufridos durante el crecimiento en laboratorio se fijan en la población, se seleccionaron los tres cultivos que más tiempo estuvieron dándose pases en el laboratorio, un cultivo de la cepa N315 y dos de la CH3657.

**Tabla 4.2.1.:** Cepas secuenciadas en este estudio.

Stock OV	Cepa	Oveja	Días de cultivo	Número de pases en oveja	Numero de generaciones	Lugar de crecimiento
OV1903	CH3657	<b>88596</b>	395	6	43754	Cepa humana en oveja
OV1918	CH3657	<b>18864</b>	340	5	37662	Cepa humana en oveja
OV1933	CH3657	<b>20112</b>	323	5	35778	Cepa humana en oveja
OV1928	CH3657	<b>19136</b>	364	6	40320	Cepa humana en oveja
OV1953	CH3657	<b>19292</b>	338	5	37440	Cepa humana en oveja
OV1978	N315	<b>92697</b>	331	7	23832	Cepa humana en oveja
OV1983	N315	<b>40792</b>	378	7	27216	Cepa humana en oveja
OV1988	N315	<b>270</b>	402	7	28944	Cepa humana en oveja
OV1993	N315	<b>23901</b>	333	6	23976	Cepa humana en oveja
OV2023	ED133	<b>19280</b>	223	2	-	Cepa ovina en oveja
OV2081	CH3657		121	-	5140	Cultivo en laboratorio
OV2086	CH3657		120	-	5097	Cultivo en laboratorio
OV2077	N315		120	-	5097	Cultivo en laboratorio



el otro SNP intergénico. Entre los genes afectados está el gen *rpsH*, la hialuronato liasa, relacionada con virulencia, el enzima Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, relacionado con la glucólisis y la “tape measure-protein” del bacteriófago 13. Esta modificación también la presentaron las cepas OV1933 y OV1918. La cepa OV1953 sólo presentó dos SNPs que modificaban el gen *essB* y la proteína C. Sólo en el caso de la cepa OV1903 hay un SNP que produce un codón de parada. Otro de sus SNPs afecta al gen de metabolismo *ispD*.

**Tabla 4.2.2.:** Modificaciones sufridas en las cepas CH3657 evolucionadas

	Posición	Nt. Previo	OV2086	OV2081	OV1953	OV1928	OV1933	OV1918	OV1903	Gen/Locus	Efecto	Producto	Función
SNPs	98945	C	-	-	-	A	-	-	-	SAOUHSC_00092	No sinónimo	Proteína hipotética	Transcripción
	120749	A	-	-	-	-	G	-	-	SAOUHSC_00115	No sinónimo	Proteína de biosíntesis de polisacárido de la cápsula	Superficie, virulencia
	245287	C	-	-	-	-	-	-	T	<i>ispD</i>	No sinónimo	proceso biosintético de isoprenoides	Metabolismo
	280449	T	-	-	C	-	-	-	-	SAOUHSC_00261	No sinónimo	Proteína hipotética, contiene el dominio a T7SS_EssB, asociado con secreción tipo VII	
	464931	A	-	-	-	-	-	G	-	SAOUHSC_00463	No sinónimo	Proteína hipotética	
	568990	C	-	-	-	T	-	-	-	SAOUHSC_00560	No sinónimo	Proteína hipotética	Desconocido
	588150	C	-	-	-	-	-	-	T	SAOUHSC_00586	No sinónimo	Proteína hipotética	Desconocido
	706223	C	-	-	-	T	-	-	-	SAOUHSC_00723	No sinónimo	Proteína hipotética, enzima de unión de corimato, para-aminobenzoato sintetasa	
	721884	T	-	-	-	C	-	-	-	SAOUHSC_00736	No sinónimo	Proteína hipotética, contiene el dominio catalítico de la diacylglycerol kinasa	
	778092	G	-	-	-	A	-	-	-	SAOUHSC_00795	No sinónimo	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Metabolismo
	1550169	C	-	-	-	-	-	-	T	SAOUHSC_01628	Stop	Proteína hipotética	Desconocido
	1727352	C	-	-	-	T	-	-	-	SAOUHSC_01821	No sinónimo	Proteína hipotética, Metilasa de ADN específica de Adenina (Replicación de ADN, recombinación y reparación)	
	2045511	G	-	-	-	T	T	T	-	SAOUHSC_02182	No sinónimo	Proteína de medición de la longitud de la cola del fago 13	
	2095322	G	-	-	A	-	-	-	-	SAOUHSC_02264	No sinónimo	Gen regulador accesorio de la proteína C	Regulación de la virulencia
2286918	C	-	-	-	T	-	-	-	SAOUHSC_02463	No sinónimo	Hialuronato liasa, factor de virulencia	Virulencia	
2311214	C	-	-	-	T	-	-	-	<i>rpsH</i>	No sinónimo	Proteína Ac Ribosómica S8		
Indels	624931	*	-	-	DEL	-	-	-	-	SAOUHSC_00634	Cambio de codón + deleción de codón	Proteína transportadora ABC de unión a sustrato	Transporte

**Tabla 4.2.2.:** Modificaciones sufridas en las cepas CH3657 evolucionadas

	Posición	Nt. Previo	OV2086	OV2081	OV1953	OV1928	OV1933	OV1918	OV1903	Gen/Locus	Efecto	Producto	Función
Indels	652687	*	'	'	'	'	'	DEL	'	SAOUHSC_00665	Cambio de pauta	Proteína hipotética, Sistema de dos componentes, familia <i>OmpR</i> , regulador de la respuesta a la resistencia de bacitracina	
	658823	*	'	'	'	INS	'	'	'	SAOUHSC_00670	Inserción de codón	Proteína hipotética, transportador inorgánico	Transporte
	1323612	*	'	'	'	'	DEL	'	'	SAOUHSC_01379	Cambio de pauta	Permeasa transportadora de oligopéptidos	Transporte
Grandes deleciones	1831000-1859000	*	'	'	'	DEL	'	'	'	SAOUHSC_01924-1953	Delección (28 kb)	Proteasas séricas SplA/F y EpiA/D	
	1923000-1967000	*	DEL	DEL	'	DEL	DEL	DEL	DEL	SAOUHSC-2014-02090	Delección (44 kb)	Bacteriofago 11	
	2032000-2075000	*	'	DEL	'	'	'	'	DEL	SAOUHSC-2164-02239	Delección (43 kb)	Bacteriofago 13 (contiene estafilokinasa, hidrolasa del péptidoglicano e hidrolasa)	

Por lo que respecta a la N315 (Tabla 4.2.3.), la línea en la que más modificaciones se han seleccionado fue la de OV1993, con la mayor delección de N315, de 8 Kb. También es la que más SNPs no sinónimos presenta, entre ellos la de la  $\beta$ -subunidad de la RNA polimerasa. OV1983 presenta pequeñas deleciones en *fnbB* y en *vraS*. OV1978 y OV1988 son casos curiosos, puesto que no presentan ninguna delección. OV1978 sólo tiene 4 SNPs; dos son codones de stop y 2 son cambios de residuo, pero todos ocurren en proteínas sin función conocida. OV1988 es la cepa que menos cambios presenta de todas; sólo 2 SNPs afectan a proteína: uno sobre una proteína hipotética y otro a la resolvasa de unión tipo Holliday, encargada de procesos recombinatorios y reparación de daño del ADN.

**Tabla 4.2.3.:** Modificaciones sufridas en las cepas N315 evolucionadas

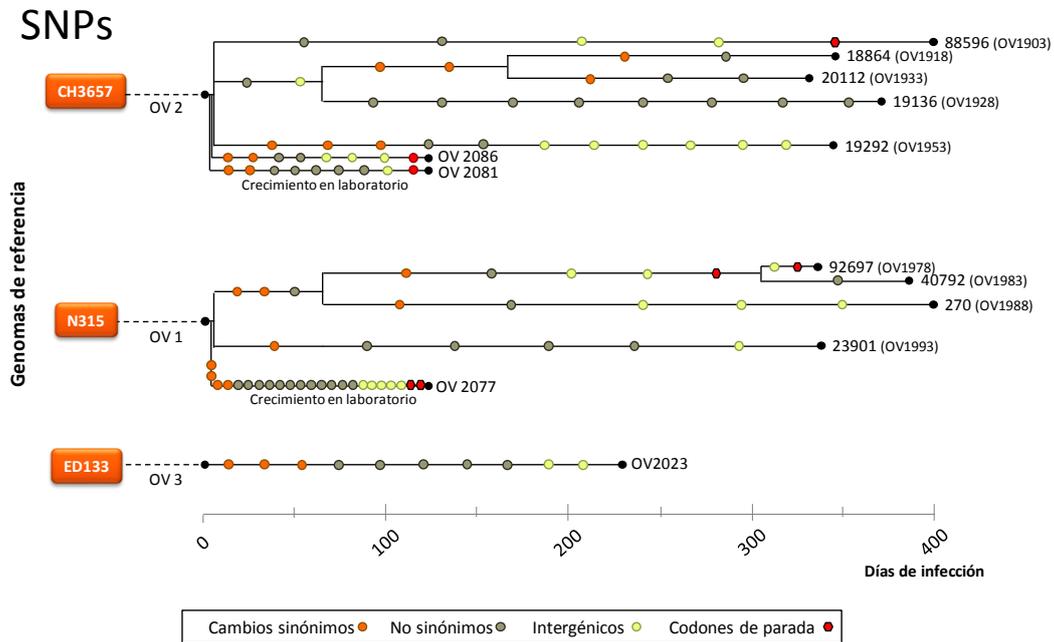
	Posición	Nt. previo	OV 2077	OV1993	OV1978	OV1983	OV1988	Gen/Locus	Efecto	Producto	Función
SNPs	580166	C	'	T	'	'	'	<i>rpoB</i>	No sinonimo	$\beta$ -subunidad de la ARN polimerasa	Transcripción
	758669	G	'	'	T	T	T	SA0664	No sinonimo	Proteína hipotética	Transporte
	1486091	A	'	'	G	'	G	<i>recU</i>	No sinonimo	Resolvasa de unión tipo Holliday	Separación correcta de los cromosomas y reparación de daño en ADN

Tabla 4.2.3.: Modificaciones sufridas en las cepas N315 evolucionadas

	Posición	Nt. previo	OV 2077	OV1993	OV1978	OV1983	OV1988	Gen/Locus	Efecto	Producto	Función
SNPs	1948268	A	'-	'-	'-	T	'-	vraS	No sinonimo	Sensor de membrana de la transducción de señal de fosfotransferencia del sistema VraRS	
	2035898	G	'-	'-	'-	T	'-	SA1790	Stop	Proteína hipotética	Desconocida
	2320771	G	'-	A	'-	'-	'-	SA2056	No sinonimo	hydrophobic/amphiphilic exporter-1, HAE1 family	Transporte (transporte de drogas)
	2575229	A	'-	'-	'-	G	'-	SA2292	No sinonimo	Proteína hipotética	Desconocida
	2626125	C	'-	A	'-	'-	'-	SA2339	No sinonimo	Exportador putativo de la superfamilia de la RND	Transporte (transporte de drogas)
	2743605	G	'-	'-	'-	'-	'-	SA2439	Stop	Proteína hipotética (con módulo GA)	
	2751067	G	'-	T	'-	'-	'-	SA2444	No sinonimo	Proteína accesoria de secreción Asp2	Transporte, superficie, virulencia
Indels	1473472	*	'-	DEL	'-	'-	'-	SA1271	Cambio de pauta	Treonina deshidratasa	Metabolismo
	1947712	*	'-	'-	'-	DEL	'-	vraS	Cambio de pauta	Sensor de membrana de la transducción de señal de fosfotransferencia del sistema VraRS	
	2568567	*	'-	'-	'-	DEL	'-	fnbB	Cambio de codón y deleción de codón	Proteínas de unión de fibronectina	
Grandes deleciones	605000-613000	*	'-	DEL	'-	'-	'-	SA0519-SA0521	Deleción (8 kb)	Región rica en Ser-Asp de union a fibrinógeno, proteína de unión a la sialoproteína de hueso	

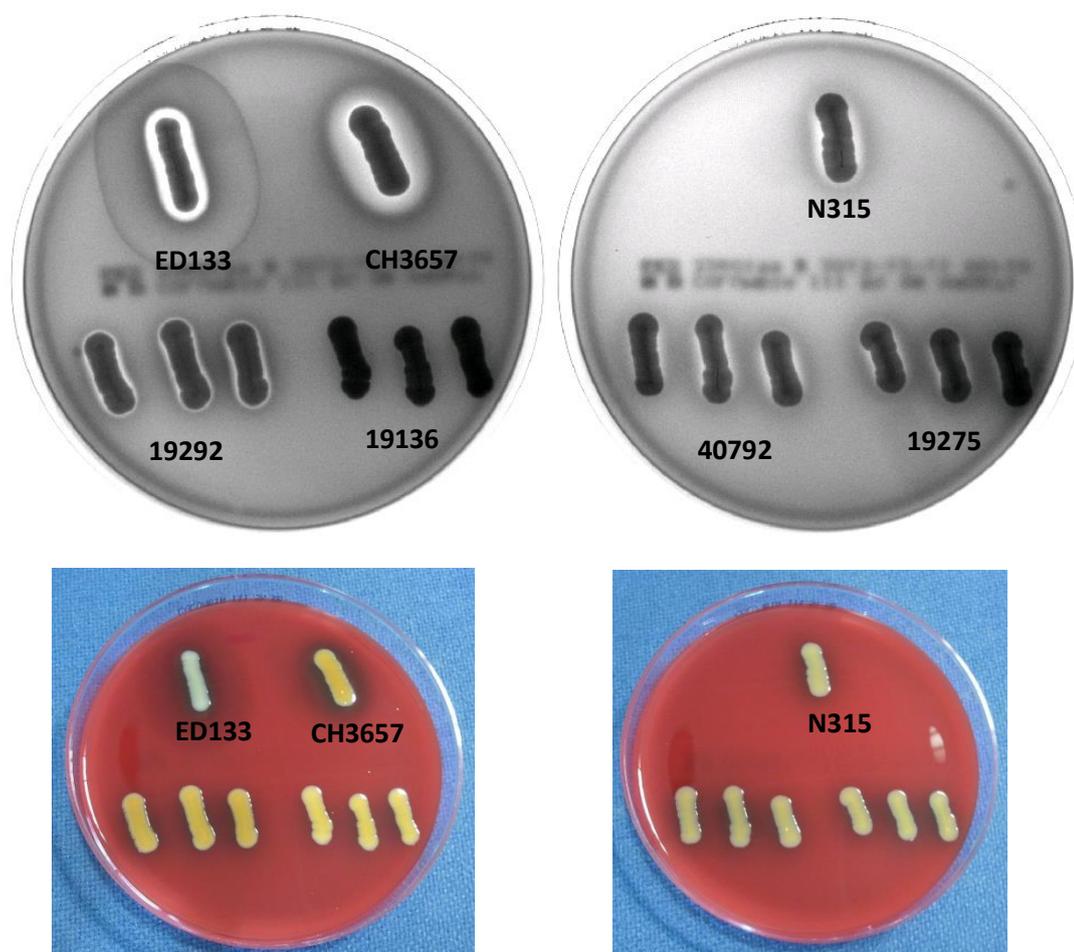
Como dato destacable sólo las cepas de CH3657 perdieron bacteriófagos completos en casi todos los casos, pero ninguna cepa de los dos grupos perdió islas. A pesar de que en un principio habíamos supuesto como más importante la participación de los EGMs y esperábamos una transferencia más rápida, las cepas ovinas están tan adaptadas que en el caso de coexistir en mama no había tiempo de que la cepa humana pudiera captar el bacteriófago o la isla para hacer frente a la ovina y la cepa humana se perdía rápidamente. Esta pérdida de EGMs de las cepas humanas, no obstante, podría ser un primer paso en la adaptación.

En las 3 cepas evolucionadas en laboratorio, tanto CH3657 como N315, la cantidad de SNPs fue mucho mayor que en las que crecieron en oveja, a pesar de que estuvieron creciendo entre la mitad y un tercio de días en comparación con las que estuvieron infectando oveja (Figura 4.2.3.). Esto confirma que el crecimiento en oveja supone una presión de selección, permitiendo sólo la aparición de las mutaciones beneficiosas.



**Figura 4.2.3.:** Polimorfismos de nucleótido único (SNPs) presentes en las cepas secuenciadas. El orden exacto en el que han ocurrido los cambios no se conoce.

Además de los cambios que se observaron a nivel de secuencia, a simple vista ya se observaron modificaciones respecto a las cepas originales. Las bacterias de la cepa CH3657 sufrieron cambios fenotípicos respecto a la coloración de las colonias y de la hemólisis producida por las mismas. Una de las líneas evolucionadas de CH3657 (oveja 19136) había perdido parte de la coloración amarilla y no era hemolítica. La otra línea evolutiva de CH3657 (oveja 19292) presentaba menos hemólisis, pero no cambió su coloración. Los motivos de las modificaciones deben ser distintos pues no comparten ninguna mutación entre ambas cepas. En el caso de las bacterias de N315 no se podía diferenciar ningún cambio ni de apariencia ni en hemólisis. (Figuras 4.2.4. y 4.2.5.)



**Figura 4.2.4.:** ED133 como comparación CH3657 y 3 réplicas de las cepas evolucionadas de las ovejas 19292 (izquierda) y 19136 (derecha)

**Figura 4.2.5.:** N315 y 3 réplicas de las cepas evolucionadas de las ovejas 40792 (izquierda) y 19275 (derecha)

#### 4.2.3. Competición bacterias originales vs. evolucionadas

Para comprobar si los cambios sufridos durante la evolución en oveja habían supuesto una ventaja adaptativa para las cepas humanas, realizamos coinfecciones con la cepa humana original y las cepas humanas evolucionadas (1000 ufc). Para identificar las cepas interfiriendo lo mínimo con su metabolismo, procedimos a introducir un sitio de corte en la región no codificante de un pseudogen: para CH3657 modificamos la parte final de *vwb* cromosómico y en el caso de N315, la región final de *ar/R*. De esta manera, en cada toma de muestras se tomaban al menos 10 ufc para realizar PCR y digestión de la zona modificada, para identificar el porcentaje de bacterias de uno u otro tipo que se encontraban presentes.

Las bacterias aisladas de las ovejas que se utilizaron en las coinfecciones se seleccionaron en base a poseer mayor distancia evolutiva, proviniendo de líneas diferenciadas desde la primera infección.

En todos los casos las infecciones fueron subclínicas. Las ovejas presentaron rápidamente sólo una de las dos bacterias. Así, los resultados están expresados en ovejas infectadas sólo con un tipo de bacteria.

De las cepas de N315, las bacterias evolucionadas de la oveja 19275 son significativamente más resistentes al nuevo hospedador si consideramos una probabilidad del 10%. Por su parte, en CH3657 la cepa 19136 es significativamente más eficiente para infectar a las ovejas con su genoma evolucionado (Tabla 4.2.4.). Esto demuestra una verdadera adaptación obtenida experimentalmente *in vivo*.

Las bacterias de 19292 así mismo, presentaban esa tendencia también, aunque no significativa (Tabla 4.2.4.).

**Tabla 4.2.4:** Ovejas que permanecieron infectadas sólo con un tipo de bacterias N=20 p-valor(19292)= 0,5224, p-valor(19136)= 0,0157, p-valor(19275)= 0,0974

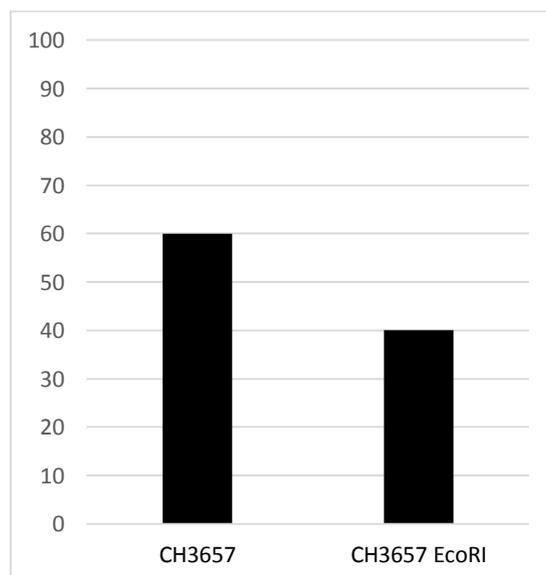
	Oveja	Bacterias originales	Bacterias evolucionadas
CH3657	19292	7	13
	19136	2	18
	6115	10	10
	88596	10	10
N315	40792	10	10
	19275	4	16

#### 4.2.4 Competición bacterias no evolucionadas.

Como hemos comentado previamente, en el resultado de estas coinfecciones esperábamos ver que las bacterias que estuvieron creciendo en oveja pero que no hubieran adquirido características adaptativas convivieran junto con las originales al no haber desarrollado capacidad para diferenciarse fenotípicamente. Sin embargo, cualquiera de los dos tipos de bacterias se apoderó rápidamente del medio, aún en los casos de 6115, 88596 y 40792, donde el número de ovejas que quedaban infectadas únicamente con la cepa evolucionada era igual al número de ovejas que quedaban infectadas exclusivamente con la original. Podíamos intuir que la implantación de una de las cepas se debía únicamente a procesos aleatorios, si suponemos que estas cepas no habían adquirido características beneficiosas. Estos cambios podrían modificar la actividad del ADN y aunque no sean modificaciones de secuencia, puedan ser heredables. Dichos cambios se denominan epigenéticos.

Si esto es cierto, dentro de un mismo inóculo, las bacterias descendientes de al menos una de las bacterias colonizadoras se apoderarán por completo del medio, implantándose y excluyendo al resto. Introduciendo el sitio de corte *EcoRI* en el pseudogen *vwb* modificamos de manera prácticamente imperceptible la cepa CH3657 para comprobar si en una infección con dos cepas virtualmente iguales una de ellas se acaba implantando exclusivamente en el medio. A estas dos cepas, que no habían infectado nunca a ovejas, se les hizo competir en ese nuevo medio, la glándula mamaria de oveja.

3 de las 21 ovejas se definieron ya el primer día, manteniendo esa dominancia hasta el final de la infección. El día 7 ya encontramos 12 ovejas definidas. Sólo en un caso se mantuvieron las dos cepas coinfectando durante largo tiempo, pero finalmente ocurrió la dominancia el día 42 (Figura 4.2.6)



**Figura 4.2.6.:** Porcentaje de aislados exclusivos en las ovejas coinfectadas. N= 20 p-valor: 0.7506

La cantidad de ovejas que se mantuvieron infectadas con una y otra cepa no es significativamente distinta, lo que concuerda puesto que las dos cepas son prácticamente la misma.

Con este resultado confirmamos que las bacterias que se establecen en una infección son seleccionadas desde el momento de la inoculación para acabar infectando sólo con una de las variantes infectadas



## 5. DISCUSIÓN

---



## **5. Discusión**

### **5.1.IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL GEN IMPLICADO EN ADAPTACIÓN A CONEJOS**

La transferencia zoonótica de patógenos bacterianos por contacto representa un riesgo importante para la salud pública. De particular importancia son los patógenos potenciales que muestran resistencias a tratamientos antimicrobianos utilizados en humanos como es el caso de *S. aureus* (de Boer et al., 2009, Garcia-Alvarez et al., 2011). MRSA ya se ha hecho común entre animales y uno de los tipos de secuencia que lo presentan, el ST398, ha llamado la atención debido a la alta transmisibilidad entre ganado y humanos. Incluso se han presentado casos de resistencia a vancomicina en cepas obtenidas de ganado bovino (Guinane et al., 2008). El riesgo que supone la existencia de reservorios de *Staphylococcus aureus* resistentes a este tipo de antibióticos en animales (Sung & Lindsay, 2007) remarca la necesidad de comprender la dinámica basal mediante la cual *S. aureus* es capaz de comenzar a infectar de manera interespecífica (Shepherd et al., 2013). Con esta idea en mente fue con la que decidimos comenzar el estudio objeto de esta tesis.

Por otra parte, la industria cunícola está muy arraigada en los países del sur del mediterráneo, como son Italia, Francia, Bélgica y España en los que anualmente se producen 5.71 kg, 2'76 kg, 2'73 kg, y 2'61 kg de carne de conejo por habitante al año respectivamente (Lebas, 1997). *S. aureus* es el patógeno más comúnmente aislado en lesiones de conejo en cualquiera de esos países, en concreto el clon ST121. Así mismo, se ha informado de casos en los que este clon se ha aislado de humanos, donde se encuentra en fosas nasales de personas de todo el mundo y se puede ver asociado tanto con infecciones de piel superficiales como con infecciones de larga duración (Kurt et al., 2013). La industrialización de la cría del conejo y los casos en humanos van a la par temporalmente. De hecho, cada vez más se presentan casos de ST121 en humanos, teniendo presencia propia como grupo en aislados de individuos sanos (Melles et al., 2004). En concreto, este clon suele presentarse como MSSA, pero tiene la posibilidad de adquirir la toxina PVL y *eta*, con lo que hay que prestarle especial atención (Chen et al., 2010). Existen clones de *S. aureus* que han sido relacionados como patógenos de otras especies animales y se ha identificado que la responsabilidad de dicha adaptación recaía en los EGMs, en concreto en las islas de patogenicidad. (Guinane et al., 2010, Lowder et al., 2009, Viana et al., 2010). Nos pareció necesario en este punto conocer a qué se debía la relación con el conejo y cuáles eran los motivos genéticos subyacentes responsables de dicha adaptación.

### **Análisis de los EGM según las proteínas patógenas que codifiquen.**

En el sistema hospitalario, en cuanto a la identificación de *S. aureus*, los patógenos se clasifican según las resistencias que presentan y se testan en base a los genes que proporcionan estas resistencias. Los EGM codifican estos genes de manera habitual, pues son los que les proporcionan características beneficiosas para su persistencia y expansión, ya que aumentan la capacidad infectiva de la bacteria. La identificación rutinaria en los hospitales de bacterias con estas características se puede realizar de dos maneras diferentes; mediante la amplificación por PCR de una región del EGM involucrado o mediante una reacción con un anticuerpo diseñado especialmente para reaccionar con la proteína objetivo (Poulsen *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2005). Entre los genes objeto de estudio se pueden encontrar lukF/lukS para PVL, meca (responsables del fenotipo MRSA) y *eta* y *etb* (toxinas exfoliativas)

Al igual que ocurre en otros hospedadores, hipotetizamos que para el conejo los genes responsables de la adaptación al hospedador se encontrarían codificados en EGMs (Guinane *et al.*, 2010, Lowder *et al.*, 2009, Viana *et al.*, 2010). Debido a que buscábamos EGMs relacionados con la capacidad infectiva diferencial entre hospedadores, las proteínas que éstos deberían codificar serían toxinas. Por eso, como objetivo de las búsquedas se utilizaron estas proteínas. Al no encontrarse consistentemente ninguna de dichas proteínas en ninguna de las cepas de conejo, se abrió la puerta a dos posibles hipótesis: Podía ser que la adaptación a conejo se realizara mediante proteínas nuevas que no habían sido estudiadas hasta el momento o la otra posibilidad podía ser que las cepas fueran capaces de adaptarse a conejo sin necesidad de EGMs, únicamente mediante su propio genoma. La existencia de nuevos genes adaptados a conejo codificados en bacteriófagos o islas no descritos era muy remota, pues se habrían localizado alguna similitud con proteínas de virulencia *in silico*, pero podía haber sido posible. Por otra parte, como ya hemos dicho, hasta ahora la adaptación de *S. aureus* siempre se había visto mediada por EGMs. Para poder averiguar si los EGMs estaban involucrados o no, decidimos realizar una búsqueda de bacteriófagos e islas mediante las secuencias de sus integrasas. Existen 12 integrasas diferentes para los bacteriófagos de *S. aureus* y 6 para sus islas (Goerke *et al.*, 2009, Novick *et al.*, 2010). En caso de encontrar alguna posteriormente se analizarían las proteínas que codificaran. El hallazgo fue que las cepas de conejo no sólo no codificaban ninguna isla en su genoma sino que sólo transportaban el genoma de un bacteriófago que también se encontraba en todas las cepas humanas ST121, por lo que no le debía proporcionar características identificativas para infectar conejos. Dicho bacteriófago codifica la integrasa de tipo 12, que es poco común (Goerke *et al.*, 2009) y no codifica factores de patogenicidad. En

estudios anteriores del grupo se comprobó que este bacteriófago no era capaz de movilizarse en presencia de la mitomicina C (Viana, 2009). Esto, junto a la presencia del mismo bacteriófago en las cepas humanas nos lleva a pensar que este bacteriófago se integró en el genoma y perdió su movilidad en un paso evolutivo previo a la adaptación al nuevo hospedador, y que por este motivo ya estaba presente en el genoma del ancestro común más reciente entre las cepas de conejo y humanas.

### **Cepas ST121**

Las cepas ST121 se establecieron como los clones que en mayor número de aislados se encontraban en conejo (Vancraeynest *et al.*, 2006). Las localizaciones de los aislados utilizados en esta tesis siguen la distribución de las del estudio de Vancraeynest, utilizando cepas de países tradicionalmente dedicados a la cunicultura como son Francia, España, Italia y Bélgica. Para los datos de las cepas españolas se utilizaron las que se habían aislado previamente en estudios previos del grupo. En una publicación anterior de nuestro grupo, se aislaron e identificaron 301 aislados de 259 conejos de 30 granjas de las regiones con mayor densidad de granjas de conejos había en la Comunidad Valenciana (Viana *et al.*, 2007). En dicho artículo, se tipaba mediante *coa*, *spa* y *clfB* las cepas, y se indicaba que la mayoría de ellas eran A1/II1/δ. Posteriormente se comprobó que todas ellas pertenecían al MLST121, lo que concordaba con los resultados obtenidos previamente a nivel europeo (Viana, 2009, Vancraeynest *et al.*, 2006).

En este estudio analizamos cepas ST121 de localizaciones de todo el mundo, obtenidas de países con sistemas de sanidad avanzados en distinta medida. Introdujimos un aislado obtenido de una isla, las Antillas menores, en caso de que estuviera filogenéticamente separado por barreras físicas. Para poder obtener una visión más global de la filogenia de ST121, también utilizamos aislados de distintos años, introduciendo en el estudio uno del año 1957. Este aislado antiguo, según nuestros resultados, es anterior al momento en que ocurrió el salto a conejo. Para obtener un árbol filogenético en el cual no hubiera sesgo debido a la recombinación, se excluyeron los EGMs de la comparativa, realizándose únicamente con el genoma cromosómico. El árbol presentó una estructura en la cual las cepas de conejo tienen una estrecha relación dentro de él. La probabilidad de la separación por grupos de conejo y humanos es muy alta, demostrando que las cepas de conejo sólo surgieron de un único salto entre hospedadores. En el árbol resultante, las cepas humanas no se agruparon evolutivamente según el país de procedencia ni por el año en que fueron aisladas.

### **Selección de cepas para las infecciones experimentales**

Para estudiar la capacidad de infección de las cepas humanas en conejo y poder generalizar el resultado, utilizamos cepas provenientes de distintas ramas del árbol. Esto lo hicimos así ya que cuanto más alejadas estuvieran las ramas, mayor distancia evolutiva existiría entre ellas y tanto más diferentes serían. Si queríamos comprobar que ninguna cepa de las estudiadas fuera capaz de infectar conejos, era el modelo más sencillo de tener a todas las cepas representadas con el menor número de experimentos.

En lo que respecta a las infecciones con las cepas de conejo, a pesar de que la cepa IVIA-1 tenía toda su secuencia cerrada y hubiera sido más adecuado utilizarla en los experimentos pues se conocía totalmente su secuencia, sus características no permitían la selección de mutantes durante el proceso de mutagénesis, puesto que son capaces de metabolizar el producto X-gal y las colonias se hacían azules, del mismo modo que debían hacerse las colonias transformantes. Por este motivo no pudo usarse su fondo genético en los intercambios con los genes humanos. Frente a esta situación, la cepa J fue la seleccionada para el estudio. El motivo fue que no sólo fue posible la selección de mutantes con ella, sino que fue más rápido trabajar con ella. A lo largo del proceso de mutagénesis se necesita transformar el plásmido pMAD para movilizar la nueva construcción desde RN4220 a la cepa de destino. En el caso de la cepa aceptora J, se obtenían muchas más colonias en esta cepa ST121 que en cualquier otra cepa utilizada en este estudio. El motivo de que únicamente la cepa J aceptara fácilmente ADN exógeno es que presenta una modificación en comparación con las otras cepas de conejo del sistema de modificación-restricción que codifica. La cepa J presenta la subunidad de especificidad S de dicho sistema acortada en 68 aminoácidos. Esto permite que el reconocimiento de secuencias extrañas a la bacteria esté mermado y pueda aceptar plásmidos metilados de distinta manera al tipo de metilación del grupo clonal que pertenece. Una vez el plásmido estaba en la cepa J, era más fácil conseguir transducirlo al resto de cepas, puesto que la metilasa encargada del sistema de modificación estaba conservado en todas las cepas ST121 del estudio.

En algunos casos, en las infecciones con la cepa de conejo J obteníamos resultados en los que se perdía infectividad mediante la modificación de un único SNP. Para evitar los falsos positivos que podríamos haber obtenido mediante la utilización de una única cepa y para poder corroborar que los resultados obtenidos se debían exclusivamente a la mutación y no al fondo genético de la cepa J en concreto, decidimos utilizar otra cepa de conejo. La cepa elegida fue I,

de origen francés, y que no presentó problemas en la mutagénesis. Con este experimento en el cual se utilizaba otra cepa nos asegurábamos que el resultado era generalizable. En el caso de haber utilizado solamente una, no hubiésemos podido saber si se debía a algún gen concreto que esté en la cepa J, pero no esté en el resto de cepas de conejo.

Para las mutaciones sobre cepas humanas, fue seleccionada la cepa F por su proximidad filogenética. En la figura 4.1.1. se puede observar que se diferencia del resto de cepas humanas, compartiendo con ellas el mismo ancestro común que las cepas aisladas de conejos. Siendo que esta cepa se había demostrado que infectaba humanos, puesto que fue aislada de ellos, y que estaba tan relacionada con las cepas de conejo, era la candidata ideal para que al provocarle la modificación adecuada fuera capaz de desarrollar infecciones en conejo con la mínima dificultad posible debida a la distancia filogenética. De todos modos, los resultados de F DltB<sup>c</sup> T113K se confirmaron introduciendo dicha mutación en las cepas humanas A y G, de otras ramas humanas más alejadas.

## **5.2. ANÁLISIS DE LOS GENES IMPLICADOS**

Al analizar las secuencias de las cepas, se localizaron dos genes que ejercían su función únicamente en las cepas de conejo. También se encontraron genes que presentaban consistentemente una secuencia en las cepas humanas y otra secuencia diferente en las cepas de conejo. Entre ellos, se encontraban pseudogenes. Así mismo, había un gen que alargó su secuencia un residuo en las cepas de conejo.

### **Betahemolisina**

La secuencia de la betahemolisina, en las cepas de conejo se encontraba interrumpida por un bacteriófago y no podía transcribirse. Desde el año 1965 se conoce la existencia de bacteriófagos capaces de modificar la capacidad de beta-hemólisis (Winkler *et al.*, 1965). El gen responsable de este fenotipo está codificado en el cromosoma de *S. aureus* y la integración o escisión del bacteriófago en el *attB* existente provoca su inactivación o recuperación de función (Coleman *et al.*, 1991). Se ha demostrado que la betahemolisina es responsable de una capacidad infectiva mayor en ratón (Katayama *et al.*, 2013). En esta tesis comprobamos que las cepas de conejo presentan *hlyB* intacto, por lo que hipotetizamos que la funcionalidad de *hlyB* podía tener alguna relación con la adaptación. En nuestros resultados observamos que esta proteína no era la principal responsable de la especificidad de hospedador, aunque el estadístico obtenido puede indicar que podría estar relacionada, no siendo la responsable del salto, pero aportando especificidad.

### **SpIE**

El otro gen que sólo se encontraba en las cepas de conejo fue SpIE, pues toda su secuencia está eliminada en las cepas humanas. La relación con el hospedador sea parasítica o simbiote, puede verse afectada por cambios muy pequeños en el genoma de las bacterias. El calamar *Euprymna scolopes*, presenta una bacteria bioluminiscente simbiote llamada *Vibrio fischeri*. *V. fischeri* también puede aislarse de peces, y estos aislados no son capaces de infectar al calamar. En un estudio del año 2009, se analizaron las secuencias de los genomas de *V. fischeri* aisladas de calamar y de pez para estudiar cuales eran las diferencias que originaban esa especificidad de hospedador. El gen responsable de dicha especificidad fue *rscS*, que es una quinasa sensora que activa un activador transcripcional encargado de la agregación de mucus del calamar, proceso involucrado en la colonización de este por parte de la bacteria (Mandel et al., 2009). En el caso de *S. aureus*, las cepas ST121 humanas y de conejo comparten todos los genes excepto uno. Sólo hay un gen que se encuentra exclusivamente en una de las cepas (SpIE). En un primer momento pensamos que este gen podría ser el responsable de la adaptación, pero al deletarlo en la cepa de conejo descubrimos que no era necesario para la infección en este hospedador, pues la capacidad infectiva de la cepa no se perdía.

### **SNPs**

Los SNPs son mutaciones que se producen en la secuencia genómica de forma aleatoria, debido a errores de la replicación del ADN. Si se localizan en el cromosoma y no se corrigen antes de la división celular, se convierten en heredables. Las mutaciones que suceden de manera aleatoria son base para la selección evolutiva, pudiendo proporcionar características beneficiosas a la bacteria que las codifica. Estas mutaciones puntuales pueden ocurrir en regiones codificantes o no. En el caso de que se modifique una secuencia no codificante el resultado puede no ser significativo, aunque en el caso de ocurrir en secuencias de reconocimiento para el inicio de la transcripción podrían suponer un problema. En las otras ocasiones, en las que los SNPs ocurren en secuencias codificantes, pueden desembocar en dos posibles resultados; si no se modifica el aminoácido que se codifica provocaría una mutación silenciosa. Es posible que incluso en este caso, aunque el aminoácido codificado sea el mismo, el uso de ese codón sea menor y los ARNt no sean tan abundantes en el citoplasma, lo que podría originar un descenso de la eficacia de la traducción, que provocara una menor eficiencia de producción de la proteína. En el último caso, en el que la modificación afecte a una secuencia

codificante y además provoque un cambio de residuo, puede mantenerse la proteína con otro residuo o generarse un codón de parada.

Continuando la búsqueda del gen implicado en la adaptación a hospedador, continuamos estudiando los pseudogenes. La selección de genes a estudiar se realizó seleccionando los genes que presentaban un codón de parada modificado entre los distintos hospedadores. Como ocurre en el caso de la cepa bovina ET3-1, la mayor parte de los genes que se localizaron implicados con un cambio de patrón de lectura están relacionados con la virulencia (Herron-Olson *et al.*, 2007).

### **Rot**

Rot es un regulador global que presenta similitud en su secuencia con homólogos de SarA (McNamara *et al.*, 2000). La acción de Rot mantiene a la bacteria en un estado poco infectivo, en el cual se priorizan acciones como la expresión de proteínas de superficie y la acción de SarS, que es a su vez un activador de la proteína estafilocócica A (SpA) (Cheung *et al.*, 2001). El regulador global Agr es responsable de inactivar transcripcionalmente a *rot* cuando se alcanza un número de bacterias mínimo. En ese momento, como Rot actúa controlando la expresión de genes relacionados con la virulencia, se empiezan a expresar proteínas como las toxinas, comenzando un proceso infectivo (Said-Salim *et al.*, 2003).

En esta tesis vimos que la actividad de Rot se encontraba disminuida en las cepas de conejo ST121. En la versión de conejo, *rot* presenta 153 residuos menos que en las cepas humanas. Esta pérdida de funcionalidad ocurre a pesar de que un 66.8% de la secuencia de la proteína se mantiene en las cepas de conejo. Estos resultados concuerdan con la estructura deducida de *rot*. Mediante cristalización, se consiguió conocer la estructura molecular. A la hora de efectuar su papel, dos moléculas de Rot se unen de forma dimérica. Las proteínas en esta conformación presentan un dominio WHTH (winged hélix-turn-helix: hélice alada-giro-hélice) y un motivo de horquilla-beta conectado mediante un giro flexible. (Zhu *et al.*, 2014). En otro estudio se consideran importantes los residuos R<sup>91</sup> porque está en el extremo del ala y podría jugar un papel con la unión al DNA y Y<sup>66</sup> porque puede unirse mediante este residuo a los promotores objeto de represión o activación (Killikelly *et al.*, 2015)

Respecto a la adaptación al hospedador, la hipótesis que barajamos fue que ya que la función reconocida de *rot* es actuar como represor, si éste no se encontraba activo completamente, la infectividad de la cepa sería superior. Al ser un regulador, pensábamos que podría ser un posible candidato a gen responsable de la adaptación puesto que su mutación

afecta a múltiples funciones de la célula. Sin embargo, la infección de las cepas de conejo con su propia versión de *rot* fue mayor que con la copia de *rot* humana.

Las cepas de conejo con *rot* humano, además de ser menos capaces de generar número de infecciones, también eran menos virulentas, pues un 16.4% de las infecciones que producían lesiones eran leves y un 12% eran moderadas, quedando exclusivamente un 1.7% que fueron severas, en comparación con la cepa de conejo J wt, que era capaz de producir una infección severa en un 44.9% de los casos.

### **DltB**

En este estudio fuimos capaces de reconocer que la proteína DltB que se generaba en las cepas de conejo era funcional, puesto que la comparación con un mutante deletional nos reveló que este último perdía totalmente la capacidad de infectar. Esto eleva el interés de la proteína DltB, pues indica que la modificación ocurrida en el salto evolutivo no es sólo un cambio aleatorio, sino que se realizó en un sentido en el que la actividad de la molécula se mantuviera. Además, esta modificación debió de ser valiosa, puesto que se mantuvo y se extendió en el nuevo hospedador localizándose en todas las cepas de conejo.

Cuando se modificó la cepa F humana con el gen *dltB* de la cepa de conejo para introducirle los 3 SNPs y comprobar si era este gen el responsable de la especificidad de hospedador se obtuvo un resultado muy favorable. Éste indicaba que únicamente con el gen *dltB* de conejo, una cepa humana era capaz de comenzar a infectar a conejos, como lo puede hacer una cepa de conejo actual. Este resultado señala que este gen fue, con una alta probabilidad, el responsable del inicio de la infectividad de las cepas ST121 en conejos. Entre los genes localizados en este estudio y que estaban modificados entre hospedadores y se mantenían conservados dentro de cada grupo de hospedadores (tabla 4.1.5.), podía existir otro gen que hiciera la misma función que DltB en el salto evolutivo, pero debido a la gran diferencia existente entre las cepas con y sin la modificación en *dltB*, lo más probable es que éste sea el cambio mayoritariamente responsable de la adaptación, permitiendo que otros genes se involucren en esta adaptación pero no en tan alto grado.

Además de localizar el gen responsable del salto de hospedador, localizamos en concreto la modificación ocurrida en él. Se comprobó la capacidad infectiva por separado de cada uno de los 3 SNPs que presenta la cepa de conejo en comparación con la cepa humana. En este resultado conseguimos identificar que de cada 30 lesiones que provoca F DltB<sup>c</sup>, F T113K

DltB<sup>c</sup> sería el responsable de provocar 23,3 lesiones. Esto explica un 77,6% de las infecciones debido a la modificación de un único nucleótido.

### **Otros casos de adaptación al hospedador**

Hasta este momento se habían descrito mutaciones en residuos de genes involucrados en virulencia en virus eucariotas. En el caso de la gripe aviar, la proteína PB2 es responsable de la afectación a aves, y una mutación en el residuo 627 modifica el glutamato por lisina, permitiendo la infección a células de mamífero (Subbarao *et al.*, 1993). En el VIH encontramos otro ejemplo en la proteína Gag. Se comprobó *in silico* que durante su evolución ocurrió una mutación del residuo 30 en la que se modificó una metionina de los virus de chimpancés a una lisina en los virus humanos. Este cambio permitió incrementar la replicación en linfocitos T CD4+ (Wain *et al.*, 2007). Estos ejemplos utilizaban análisis *in silico* e *in vitro* para demostrar las funciones de las proteínas implicadas, pero posteriormente se ha confirmado que para ambas, la adaptación a hospedadores mamíferos requiere de más de un gen (Naffakh *et al.*, 2008, Etienne *et al.*, 2013).

Respecto a la adaptación en bacterias, encontramos un caso en *Listeria monocytogenes*. En la infección de *L. monocytogenes* interviene la internalina A entre otras, e interacciona con la E-cadherina para introducirse dentro de células no fagocíticas como pueden ser las células epiteliales. La E-cadherina humana sólo se diferencia de la de ratón en un aminoácido, y el cambio de éste permite a las bacterias introducirse en las células del nuevo hospedador *in vitro* (Lecuit *et al.*, 1999). Inversamente, modificando dos residuos de la internalina *inIA*, se demostró *in vivo* que se incrementaba la internalización de las bacterias en un nuevo hospedador, porque se modificaba la interacción con la E-cadherina de los hospedadores (Wollert *et al.*, 2007). Una vez más, nuestro estudio se refleja más específico que éste, pues en este caso la modificación se debía a un residuo, mientras que en el caso de DltB la adaptación a hospedador se debe a una mutación en un único nucleótido.

Hasta ahora, el mecanismo de acción de DltB no se había averiguado y su función se había propuesto como algo hipotético (Reichmann *et al.*, 2013). En esta tesis no se consiguió elucidar la actividad realizada por DltB. Es por eso, que el siguiente paso en el estudio de DltB deberá ser la identificación de la estructura de la proteína y la localización tridimensional de los residuos, principalmente el 113, para averiguar la proximidad al posible sitio de interacción con D-Ala o con las otras proteínas del operón y averiguar así su modo de actuación.

En una comparativa *in silico* de la proteína contra la base de datos general, DltB presentó similitudes con proteínas de la familia MBOAT (del inglés membrane bound o-acyl transferase). Ésta es una familia de proteínas que transfiere ácidos orgánicos, típicamente ácidos grasos a grupos hidroxilo, ejerciendo una función señalizadora (Hofmann, 2000). De todos modos, esta actividad no se ha podido demostrar experimentalmente para DltB, pero podría ser un posible camino de estudio.

### **5.3. EL CONEJO COMO HOSPEDADOR ANCESTRAL PARA *S. aureus***

En estudios previos de adaptación de *S. aureus* al hospedador, los EGMs se han visto constantemente implicados en estos procesos. En esta tesis, es la primera vez que se observa un hospedador de *S. aureus* que se caracteriza por una ausencia total de EGMs en las cepas de conejo. Este hecho podría conducir a la hipótesis de que debido a que las bacterias no necesitan de ningún otro elemento accesorio, su evolución comenzara a partir de este hospedador. Esta hipótesis podría reforzarse debido al hecho de que en el genoma de *S. aureus* se encuentran genes que son funcionales únicamente en conejo. Es el caso de la coagulasa *coa* codificada en el cromosoma. Esta proteína, incluso la codificada por las cepas humanas, muestra su actividad en suero de conejo activamente, pero sin embargo no es capaz de hacerlo con plasma humano. La explicación más razonable sería que la proteína hubiese mantenido su función sobre plasma de conejo, pero aún no hubiese conseguido evolucionar para conseguir coagular plasma humano. Otro resultado que lleva a pensar esto es el gen *hly*. En el caso de conejo, *hly* está completo, produciendo su proteína, pero en las cepas humanas este gen está inactivado por la integración del bacteriófago en un 90% de los casos (Verkaik *et al.*, 2011).

### **Conejo como animal de experimentación**

Otro motivo por el que podemos sugerir que el hospedador ancestral de *S. aureus* es el conejo, lo vemos en la capacidad infectiva de las cepas en conejos. Las cepas ST121 de conejo con capaces de infectar a una dosis de 300 ufc. En ratón, la dosis en infección de piel necesita una cantidad mucho mayor de bacterias, que suele oscilar entre  $10^6$ - $10^8$  ufc (Tkaczyk *et al.*, 2013, Kwiecinski *et al.*, 2013). De cualquier manera, por este motivo, y añadiendo el hecho que una cepa humana modificada con un único nucleótido en *dltB* es capaz de infectar a esa dosis de 300 ufc, estamos en disposición de proponer al conejo como animal de experimentación en *S. aureus* y a la cepa F DltB<sup>c</sup> T113K como cepa de experimentación en modelos de experimentación *in vivo*.

#### **5.4. EVOLUCIÓN FORZADA EN GLÁNDULA MAMARIA DE OVEJA**

##### **Adaptación en leche.**

Decidimos que las infecciones se llevaran a cabo en las glándulas mamarias de las ovejas con las cepas humanas. La leche es un medio rico poco restrictivo que presenta azúcares disponibles para la bacteria. En leche humana, por ejemplo, existen además oligosacáridos que no se metabolizan por parte de la bacteria y que promueven el crecimiento de *S. aureus* en la glándula mamaria (Hunt *et al.*, 2012). Para los experimentos de adaptación de las bacterias humanas a un nuevo hospedador nos enfrentábamos a un compromiso en el cual, por una parte, necesitábamos que las bacterias fueran capaces de crecer y llevar a cabo sus funciones normalmente, para poder aceptar en el caso de que ocurriera, la transferencia de EGMs *in vivo*. Por otra parte, necesitábamos un medio que sí que fuera restrictivo, para poder suponer un reto al que las bacterias tuvieran que enfrentarse. Este compromiso se cumplió de una manera satisfactoria en el caso de este experimento. Por una parte, las bacterias fueron capaces de sobrevivir en la leche hasta el momento de su secado, permitiendo la evolución de éstas en un nuevo hospedador. Por otro lado, la cantidad de ovejas que fueron capaces de eliminar la infección producida por las cepas humanas de *S. aureus* fue muy alta, de 37.4% para CH3657 y de 46.3% para N315. Los motivos por los que unas ovejas fueron capaces de mantener la infección respecto a las que la eliminaron están en las características del animal. En ocasiones la cepa con la que se infectaba a distintas ovejas era la misma, provocando en unos animales la pérdida temprana de la infección y en otros casos dando lugar a una infección duradera.

##### **Establecimiento de la infección**

*S. aureus* sufre dos procesos evolutivos principalmente al inicio de una infección en mama de oveja. Estos dos mecanismos actúan conjuntamente, pero propiciados por dos motivos distintos. De las bacterias que se encuentran en piel o en el suelo, latentes para empezar la infección, sólo unas pocas conseguirán llegar al canal del pezón. Posteriormente llegarán a la cisterna para finalmente acabar invadiendo los alveolos. En primer lugar, las bacterias sufren un proceso de deriva genética. Ésta se da cuando las bacterias se recogen del suelo o se posicionan en el lugar correcto para introducirse en la mama, exclusivamente por azar. Por ejemplo, mediante este cuello de botella, una parte aleatoria de las bacterias de la población inicial será la responsable de comenzar la infección. Esto origina una ventaja en un grupo de bacterias, permitiendo que aun siendo clonales, una de las variedades pueda dominar.

Por otra parte, a la par que la deriva, actúa un proceso de selección. El sistema inmune de la oveja que se está infectando atacará a la bacteria con todo su arsenal. Éste realizará una criba, en la que únicamente las bacterias más preparadas para hacer frente a estos ataques serán seleccionadas y serán capaces de comenzar su implantación. En este paso juegan un papel importante los genes de virulencia adaptados al hospedador.

Las bacterias que se están seleccionando son todas iguales en secuencia, por lo que la implantación de una de ellas puede ocurrir por azar o por variaciones que estén en la bacteria y sean heredables, pero no estén codificadas en la secuencia. El primer caso es poco probable, puesto que evolutivamente no es beneficioso para una bacteria permitir que su supervivencia sea algo aleatorio. En el caso de que algunas de las bacterias sean seleccionadas, al ser clonales, sería en base a variaciones epigenéticas.

En la bibliografía se encuentran algunos casos de epigenética en relaciones patógeno-hospedador. Por ejemplo, en el caso de *Neisseria meningitidis* se describió una metiltransferasa, *mod*, que tiene bajo su control varios genes involucrados en colonización e infección, catalasas para la defensa frente a stress oxidativo producido por el hospedador... El gen *modD* es el único gen que se vio fuertemente asociado con el complejo clonal 41/44 y, junto con estos resultados, se sugiere que esta regulación por la metiltransferasa podía ayudar a las bacterias de este complejo clonal 41/44 a adaptarse a distintos medios en el hospedador (Seib *et al.*, 2011). En nuestro estudio comprobamos que en una cepa con el mínimo de variaciones en la secuencia (añadimos un sitio de corte en un pseudogen), la exclusión se producía de manera rutinaria, indicando la presencia de modificaciones epigenéticas, que no se encuentran en la secuencia, que provocan diferencias en la supervivencia bacteriana.

#### **Evaluación de RCS en leche para confirmar la actividad patógena de la bacteria.**

En cuanto a las bacterias humanas que se encontraban en la glándula mamaria de oveja quisimos comprobar que las bacterias a pesar de no estar adaptadas al nuevo hospedador estaban generando lesión en el epitelio de la glándula. La posibilidad a descartar era que en la leche obtenida en cada muestreo, las bacterias se encontraran allí simplemente creciendo en el medio líquido, sin estar afectando a las células animales.

Cuando ocurre una infección bacteriana, el principal mecanismo de defensa de la glándula mamaria es la fagocitosis de *S. aureus* por parte de los leucocitos polimorfonucleares (PMNL) (Sutra & Poutrel, 1994). En leche de ovejas sanas, los PMNL suponen un 74-80% del total de las células que se encuentran en la leche. Existe una gran correlación entre el porcentaje de

PMNL y el recuento total de células somáticas (RCS) en leche (Bergonier *et al.*, 2003). El RCS es un modo rápido de identificar una mastitis en leche (Dohoo *et al.*, 1981). Junto con su sencillez de análisis es el motivo por el que se utiliza para determinar la infección de una ubre en ganadería extensiva. En nuestro estudio se estimó el RCS de la ubre en la que habíamos infectado con *S. aureus* y lo comparábamos con el RCS de la ubre contraria, no infectada. En todos los casos el RCS se incrementaba al menos un orden de magnitud, pudiendo confirmar así que las bacterias estaban infectando realmente.

### **Transferencia de EGMs *in vivo*.**

A pesar de que existen experimentos *in vivo* de adaptación de bacterias frente a tratamientos antibióticos (Dobson *et al.*, 2014, Pereira *et al.*, 2014), no existía un estudio realizado *in vivo* que se centrara en la adaptación de una *S. aureus* a un hospedador ovino.

La transducción de bacteriófagos de *S. aureus in vivo* ya se describió en 1965, aunque 5 años antes ya se había descrito entre cepas de *Salmonella* en aves y ratones (Velaudapillai, 1960). Posteriormente, en el estudio de Jarolmen se observaron transductantes de *S. aureus* en riñón de ratón (Jarolmen *et al.*, 1965). En ovejas también había un estudio que se realizó en su sistema digestivo. En él se observó transducción *in vivo* para un bacteriófago. En este estudio se inoculaban dos cepas de *E. coli*, una portadora de un fago lisogénico (donadora) y otra aceptora para acabar encontrando transductantes en la heces (Cornick *et al.*, 2006). En todos estos experimentos, la presión selectiva era externa, pues se necesitaba de una dosis de antibiótico para forzar dicha transducción.

En el estudio que aquí presentamos quisimos evaluar la movilización de bacteriófagos e islas en *S. aureus* en una infección en mama, pero la diferencia es que la fuerza selectiva eran las proteínas codificadas por los EGMs responsables de la adaptación al hospedador. Encontramos resultados en los que las cepas de CH3657 habían perdido algún bacteriófago, como es el  $\phi 11$  en 4 cepas evolucionadas, además del  $\phi 13$  para una de ellas (OV1903). Las otras 3 líneas de CH3657 también modificaron la actividad del  $\phi 13$ , mutando su “tape measure protein”. Estos tímidos resultados nos sorprendieron, pues esperábamos no sólo pérdida de EGMs, sino también una ganancia de los elementos que portaban las cepas ovinas, con lo que las cepas humanas podrían adaptarse mejor a infectar ovejas. Nuestra hipótesis frente a estos resultados es que la evolución dirigida por esta presión de selección es menos intensa de lo que esperábamos y los resultados observados son los que se ven al inicio de la adaptación a un nuevo hospedador. En este proceso, las bacterias humanas comenzarían por desprenderse de aquellas

regiones móviles de su genoma que no necesitan, para posteriormente, cuando se encuentren con un EGM que les favorezca, poder aceptarlo para incrementar así su “fitness”. Esto podría dar lugar a un nuevo planteamiento de las ventajas que ofrecen los EGMs. Además de la acción de los genes que codifiquen, a una bacteria codificar islas en su genoma le ofrece un beneficio porque le protegen frente a infecciones de bacteriófagos (Ram *et al.*, 2012), y codificar bacteriófagos puede ayudarla protegerse frente a una infección lítica de un nuevo bacteriófago (Brussow *et al.*, 2004). De todos modos, nunca se ha realizado aproximación desde el punto de vista del coste que le supone a la bacteria codificar una isla o un bacteriófago.





## 6. CONCLUSIONES

---



## 6. Conclusiones

- Las cepas de *S. aureus* ST121 de conejo se agrupan evolutivamente cercanas y provienen de cepas humanas.
- El salto evolutivo de *S. aureus* desde humanos a conejos ocurrió una única vez hace alrededor de 40 años.
- Las cepas de conejo ST121 no presentan bacteriófagos ni islas de patogenicidad características que les den capacidad de adaptación al hospedador.
- Las cepas humanas 121 no son capaces de infectar conejo a dosis tan altas como  $10^5$  ufc.
- Las cepas de conejo ven mermada su capacidad de infectar a conejo con la versión humana del gen *rot* y pierden totalmente la capacidad de infectar con *dltB*, llegando al nivel de infectividad que presentaría una cepa humana ST121.
- La modificación del nucleótido 178 de la secuencia de *DltB* origina el cambio de residuo T113K, y fue necesaria y suficiente para permitir la infectividad de las cepas ST121 humanas en conejos.
- Las cepas de *S. aureus* que se encontraban por primera vez en mama de ovejas no fueron capaces de aceptar bacteriófagos o islas ovinas en un estado natural de infección *in vivo*.
- Tras 7 pases de las bacterias humanas sobre ovejas, se incrementó su capacidad de adaptación frente las cepas originales.
- Al principio de una infección en glándula mamaria de oveja, una porción del inóculo es capaz de apoderarse del medio, siendo el único tipo de bacteria que se aísla posteriormente de dicha lesión. El motivo de esta implantación no depende de la secuencia del genoma bacteriano.







## 7. BIBLIOGRAFÍA

---



## 7. Bibliografía

- Abdelbary, M.M., A. Wittenberg, C. Cuny, F. Layer, K. Kurt, L.H. Wieler, B. Walther, R. Skov, J. Larsen, H. Hasman, J.R. Fitzgerald, T.C. Smith, J.A. Wagenaar, A. Pantosti, M. Hallin, M.J. Struelens, G. Edwards, R. Bose, U. Nubel & W. Witte, (2014) Phylogenetic analysis of *Staphylococcus aureus* CC398 reveals a sub-lineage epidemiologically associated with infections in horses. *PLoS One* **9**: e88083.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D.J. Lipman, (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Arnaud, M., A. Chastanet & M. Debarbouille, (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6887-6891.
- Atilano, M.L., J. Yates, M. Glittenberg, S.R. Filipe & P. Ligoxygakis, (2011) Wall teichoic acids of *Staphylococcus aureus* limit recognition by the drosophila peptidoglycan recognition protein-SA to promote pathogenicity. *PLoS Pathog* **7**: e1002421.
- Barkema, H.W., Y.H. Schukken & R.N. Zadoks, (2006) The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci* **89**: 1877-1895.
- Barrick, J.E., D.S. Yu, S.H. Yoon, H. Jeong, T.K. Oh, D. Schneider, R.E. Lenski & J.F. Kim, (2009) Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature* **461**: 1243-1247.
- Ben Zakour, N.L., D.E. Sturdevant, S. Even, C.M. Guinane, C. Barbey, P.D. Alves, M.F. Cochet, M. Gautier, M. Otto, J.R. Fitzgerald & Y. Le Loir, (2008) Genome-wide analysis of ruminant *Staphylococcus aureus* reveals diversification of the core genome. *J Bacteriol* **190**: 6302-6317.
- Bergonier, D., R. de Cremoux, R. Rupp, G. Lagriffoul & X. Berthelot, (2003) Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary research* **34**: 689-716.
- Bhakdi, S. & J. Tranum-Jensen, (1991) Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev* **55**: 733-751.
- Biberstein, E., (1994) Estafilococos. In: Tratado de microbiología veterinaria. E.L. Biberstein & Y.C. Lee (eds). Zaragoza: Acribia, pp. 167-173.
- Bouchard, D., V. Peton, S. Almeida, C. Le Marechal, A. Miyoshi, V. Azevedo, N. Berkova, L. Rault, P. Francois, J. Schrenzel, S. Even, D. Hernandez & Y. Le Loir, (2012) Genome sequence of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild bovine mastitis. *J Bacteriol* **194**: 6292-6293.
- Brown, K.L. & R.E. Hancock, (2006) Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current opinion in immunology* **18**: 24-30.
- Brown, S., Y.H. Zhang & S. Walker, (2008) A revised pathway proposed for *Staphylococcus aureus* wall teichoic acid biosynthesis based on in vitro reconstitution of the intracellular steps. *Chemistry & biology* **15**: 12-21.
- Bruckner, R., (1997) Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosum*. *FEMS Microbiol Lett* **151**: 1-8.
- Brussow, H., C. Canchaya & W.D. Hardt, (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **68**: 560-602, table of contents.
- Burts, M.L., A.C. DeDent & D.M. Missiakas, (2008) EsaC substrate for the ESAT-6 secretion pathway and its role in persistent infections of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **69**: 736-746.

- Burts, M.L., W.A. Williams, K. DeBord & D.M. Missiakas, (2005) EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1169-1174.
- Canfield, G.S., J.M. Schwingel, M.H. Foley, K.L. Vore, K. Boonantanasarn, A.L. Gill, M.D. Sutton & S.R. Gill, (2013) Evolution in fast forward: a potential role for mutators in accelerating *Staphylococcus aureus* pathoadaptation. *J Bacteriol* **195**: 615-628.
- Casadesus, J. & D. Low, (2006) Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **70**: 830-856.
- Coleman, D., J. Knights, R. Russell, D. Shanley, T.H. Birkbeck, G. Dougan & I. Charles, (1991) Insertional inactivation of the *Staphylococcus aureus* beta-toxin by bacteriophage phi 13 occurs by site- and orientation-specific integration of the phi 13 genome. *Mol Microbiol* **5**: 933-939.
- Coleman, D.C., D.J. Sullivan, R.J. Russell, J.P. Arbuthnott, B.F. Carey & H.M. Pomeroy, (1989) *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J Gen Microbiol* **135**: 1679-1697.
- Conceicao, T., M. Aires-de-Sousa, N. Pona, M.J. Brito, C. Barradas, R. Coelho, T. Sardinha, L. Sancho, G. de Sousa, M. do Ceu Machado & H. de Lencastre, (2010) High prevalence of ST121 in community-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* lineages responsible for skin and soft tissue infections in Portuguese children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
- Cornick, N.A., A.F. Helgersson, V. Mai, J.M. Ritchie & D.W. Acheson, (2006) In vivo transduction of an Stx-encoding phage in ruminants. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5086-5088.
- Corpa, J.M., Hermans, K., Haesebrouck, F., (2009) Main pathologies associated to *Staphylococcus aureus* infections in rabbits: a review. *World Rabbit Science* **17**: 115-125.
- Costa, S.S., M. Viveiros, L. Amaral & I. Couto, (2013) Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *The open microbiology journal* **7**: 59-71.
- Cucarella, C., M.A. Tormo, E. Knecht, B. Amorena, I. Lasa, T.J. Foster & J.R. Penades, (2002) Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infection and immunity* **70**: 3180-3186.
- Cupane, L., N. Pugacova, D. Berzina, V. Cauce, D. Gardovska & E. Miklasevics, (2012) Patients with Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* infections run an increased risk of longer hospitalisation. *International journal of molecular epidemiology and genetics* **3**: 48-55.
- Chambers, H.F., (2005) Community-associated MRSA--resistance and virulence converge. *The New England journal of medicine* **352**: 1485-1487.
- Chen, H., Y. Liu, X. Jiang, M. Chen & H. Wang, (2010) Rapid change of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in a Chinese tertiary care hospital over a 15-year period. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 1842-1847.
- Chen, L., D.B. Paulsen, D.W. Scruggs, M.M. Banes, B.Y. Reeks & M.L. Lawrence, (2003) Alteration of DNA adenine methylase (Dam) activity in *Pasteurella multocida* causes increased spontaneous mutation frequency and attenuation in mice. *Microbiology* **149**: 2283-2290.
- Cheng, A.G., A.C. DeDent, O. Schneewind & D. Missiakas, (2011) A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. *Trends Microbiol* **19**: 225-232.
- Cheng, A.G., M. McAdow, H.K. Kim, T. Bae, D.M. Missiakas & O. Schneewind, (2010) Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. *PLoS Pathog* **6**.
- Cheung, A.L., K. Schmidt, B. Bateman & A.C. Manna, (2001) SarS, a SarA homolog repressible by agr, is an activator of protein A synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **69**: 2448-2455.

- Danforth, J.M., R.M. Strieter, S.L. Kunkel, D.A. Arenberg, G.M. VanOtteren & T.J. Standiford, (1995) Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in vivo and in vitro: the role of lipoteichoic acid. *Clinical immunology and immunopathology* **74**: 77-83.
- de Boer, E., J.T. Zwartkruis-Nahuis, B. Wit, X.W. Huijsdens, A.J. de Neeling, T. Bosch, R.A. van Oosterom, A. Vila & A.E. Heuvelink, (2009) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *International journal of food microbiology* **134**: 52-56.
- de Haas, C.J., K.E. Veldkamp, A. Peschel, F. Weerkamp, W.J. Van Wamel, E.C. Heezius, M.J. Poppelier, K.P. Van Kessel & J.A. van Strijp, (2004) Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med* **199**: 687-695.
- Deghorain, M. & L. Van Melderen, (2012) The *Staphylococci* phages family: an overview. *Viruses* **4**: 3316-3335.
- Dengler, V., P.S. Meier, R. Heusser, B. Berger-Bachi & N. McCallum, (2011) Induction kinetics of the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon in response to different cell wall active antibiotics. *BMC microbiology* **11**: 16.
- Denver, D.R., P.C. Dolan, L.J. Wilhelm, W. Sung, J.I. Lucas-Lledo, D.K. Howe, S.C. Lewis, K. Okamoto, W.K. Thomas, M. Lynch & C.F. Baer, (2009) A genome-wide view of *Caenorhabditis elegans* base-substitution mutation processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 16310-16314.
- Dobson, A.J., J. Purves & J. Rolff, (2014) Increased survival of experimentally evolved antimicrobial peptide-resistant *Staphylococcus aureus* in an animal host. *Evolutionary applications* **7**: 905-912.
- Dohoo, I.R., A.H. Meek, S.W. Martin & D.A. Barnum, (1981) Use of total and differential somatic cell counts from composite milk samples to detect mastitis in individual cows. *Canadian journal of comparative medicine. Revue canadienne de medecine comparee* **45**: 8-14.
- Drummond, A.J., S.Y. Ho, M.J. Phillips & A. Rambaut, (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS biology* **4**: e88.
- Edwards, A.M., M.G. Bowden, E.L. Brown, M. Laabei & R.C. Massey, (2012) *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein triggers TNFalpha release, promoting attachment to endothelial cells via protein A. *PLoS One* **7**: e43046.
- Enright, M.C., N.P. Day, C.E. Davies, S.J. Peacock & B.G. Spratt, (2000) Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **38**: 1008-1015.
- Enright, M.C. & B.G. Spratt, (1999) Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* **7**: 482-487.
- Etienne, L., B.H. Hahn, P.M. Sharp, F.A. Matsen & M. Emerman, (2013) Gene loss and adaptation to hominids underlie the ancient origin of HIV-1. *Cell host & microbe* **14**: 85-92.
- Everitt, R.G., X. Didelot, E.M. Batty, R.R. Miller, K. Knox, B.C. Young, R. Bowden, A. Auton, A. Votintseva, H. Lerner-Svensson, J. Charlesworth, T. Golubchik, C.L. Ip, H. Godwin, R. Fung, T.E. Peto, A.S. Walker, D.W. Crook & D.J. Wilson, (2014) Mobile elements drive recombination hotspots in the core genome of *Staphylococcus aureus*. *Nature communications* **5**: 3956.
- Falanga, V., D.E. Campbell, J.J. Leyden & S.D. Douglas, (1985) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and antistaphylococcal immunoglobulin E antibodies in atopic dermatitis. *J Clin Microbiol* **22**: 452-454.
- Fitzgerald, J.R., (2012) Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. *Trends Microbiol* **20**: 192-198.
- Flatt, R.E., (1974) Bacterial diseases. *En: The biology of the laboratory rabbit. Weisbroth, SH; Flatt, RE & Krauss, AK (eds), Academic press, Nueva York, NY, EE UU* **193-236**.
- Foster, T.J. & M. Hook, (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **6**: 484-488.
- Fournier, B. & D.J. Philpott, (2005) Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* **18**: 521-540.

- Garcia-Alvarez, L., M.T. Holden, H. Lindsay, C.R. Webb, D.F. Brown, M.D. Curran, E. Walpole, K. Brooks, D.J. Pickard, C. Teale, J. Parkhill, S.D. Bentley, G.F. Edwards, E.K. Girvan, A.M. Kearns, B. Pichon, R.L. Hill, A.R. Larsen, R.L. Skov, S.J. Peacock, D.J. Maskell & M.A. Holmes, (2011) Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet. Infectious diseases* **11**: 595-603.
- Garcia-Del Portillo, F., M.G. Pucciarelli & J. Casadesus, (1999) DNA adenine methylase mutants of *Salmonella typhimurium* show defects in protein secretion, cell invasion, and M cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11578-11583.
- Glass, E.M., J. Wilkening, A. Wilke, D. Antonopoulos & F. Meyer, (2010) Using the metagenomics RAST server (MG-RAST) for analyzing shotgun metagenomes. *Cold Spring Harb Protoc* **2010**: pdb prot5368.
- Goering, R.V., R.M. Shawar, N.E. Scangarella, F.P. O'Hara, H. Amrine-Madsen, J.M. West, M. Dalessandro, J.A. Becker, S.L. Walsh, L.A. Miller, S.F. van Horn, E.S. Thomas & M.E. Twynholm, (2008) Molecular epidemiology of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from global clinical trials. *J Clin Microbiol* **46**: 2842-2847.
- Goerke, C., R. Pantucek, S. Holtfreter, B. Schulte, M. Zink, D. Grumann, B.M. Broker, J. Doskar & C. Wolz, (2009) Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *J Bacteriol* **191**: 3462-3468.
- Gordon, N.C., J.R. Price, K. Cole, R. Everitt, M. Morgan, J. Finney, A.M. Kearns, B. Pichon, B. Young, D.J. Wilson, M.J. Llewelyn, J. Paul, T.E. Peto, D.W. Crook, A.S. Walker & T. Golubchik, (2014) Prediction of *Staphylococcus aureus* antimicrobial resistance by whole-genome sequencing. *J Clin Microbiol* **52**: 1182-1191.
- Guinane, C.M., N.L. Ben Zakour, M.A. Tormo-Mas, L.A. Weinert, B.V. Lowder, R.A. Cartwright, D.S. Smyth, C.J. Smyth, J.A. Lindsay, K.A. Gould, A. Witney, J. Hinds, J.P. Bollback, A. Rambaut, J.R. Penades & J.R. Fitzgerald, (2010) Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biol Evol* **2**: 454-466.
- Guinane, C.M., D.E. Sturdevant, L. Herron-Olson, M. Otto, D.S. Smyth, A.E. Villaruz, V. Kapur, P.J. Hartigan, C.J. Smyth & J.R. Fitzgerald, (2008) Pathogenomic analysis of the common bovine *Staphylococcus aureus* clone (ET3): emergence of a virulent subtype with potential risk to public health. *J Infect Dis* **197**: 205-213.
- Heithoff, D.M., R.L. Sinsheimer, D.A. Low & M.J. Mahan, (1999) An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science* **284**: 967-970.
- Herbert, S., A.K. Ziebandt, K. Ohlsen, T. Schafer, M. Hecker, D. Albrecht, R. Novick & F. Gotz, (2010) Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect Immun* **78**: 2877-2889.
- Hermans, K., L.A. Devriese & F. Haesebrouck, (2003) Rabbit staphylococcosis: difficult solutions for serious problems. *Vet Microbiol* **91**: 57-64.
- Herron-Olson, L., J.R. Fitzgerald, J.M. Musser & V. Kapur, (2007) Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **2**: e1120.
- Heumann, D., C. Barras, A. Severin, M.P. Glauser & A. Tomasz, (1994) Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun* **62**: 2715-2721.
- Hinshaw, V.S., R.G. Webster, B.C. Easterday & W.J. Bean, Jr., (1981) Replication of avian influenza A viruses in mammals. *Infect Immun* **34**: 354-361.
- Hofmann, K., (2000) A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends in biochemical sciences* **25**: 111-112.
- Hon, K.L., M.C. Lam, T.F. Leung, W.Y. Kam, M.C. Li, M. Ip & T.F. Fok, (2005) Clinical features associated with nasal *Staphylococcus aureus* colonisation in Chinese children with

- moderate-to-severe atopic dermatitis. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* **34**: 602-605.
- Hu, C., N. Xiong, Y. Zhang, S. Rayner & S. Chen, (2012) Functional characterization of lipase in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and biophysical research communications* **419**: 617-620.
- Hunt, C.B., A. J. ; National Mastitis Council, (2003) An Investigation of the Use of Cryopreservants to Enhance the Recovery of Mastitis Pathogens from Frozen Milk. *ANNUAL MEETING-NATIONAL MASTITIS COUNCIL INCORPORATED*; 286-287 2 Pages.
- Hunt, K.M., J. Preuss, C. Nissan, C.A. Davlin, J.E. Williams, B. Shafii, A.D. Richardson, M.K. McGuire, L. Bode & M.A. McGuire, (2012) Human milk oligosaccharides promote the growth of staphylococci. *Appl Environ Microbiol* **78**: 4763-4770.
- Iandolo, J.J., V. Worrell, K.H. Groicher, Y. Qian, R. Tian, S. Kenton, A. Dorman, H. Ji, S. Lin, P. Loh, S. Qi, H. Zhu & B.A. Roe, (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.
- Jarolmen, H., A. Bondi & R.L. Crowell, (1965) Transduction of *Staphylococcus Aureus* to Tetracycline Resistance in Vivo. *J Bacteriol* **89**: 1286-1290.
- Jorgensen, H.J., T. Mork, H.R. Hogasen & L.M. Rorvik, (2005) Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *J Appl Microbiol* **99**: 158-166.
- Kapur, V., W.M. Sisco, R.S. Greer, T.S. Whittam & J.M. Musser, (1995) Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J Clin Microbiol* **33**: 376-380.
- Katayama, Y., T. Baba, M. Sekine, M. Fukuda & K. Hiramatsu, (2013) Beta-hemolysin promotes skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **195**: 1194-1203.
- Keller, R., W. Fischer, R. Keist & S. Bassetti, (1992) Macrophage response to bacteria: induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. *Infect Immun* **60**: 3664-3672.
- Killikelly, A., M.A. Benson, E.A. Ohneck, J.M. Sampson, J. Jakoncic, B. Spurrier, V.J. Torres & X.P. Kong, (2015) Structure-Based Functional Characterization of Repressor of Toxin (Rot), a Central Regulator of *Staphylococcus aureus* Virulence. *J Bacteriol* **197**: 188-200.
- Kim, K.H., J.H. Hwang & K.C. Park, (1996) Periauricular eczematization in childhood atopic dermatitis. *Pediatric dermatology* **13**: 278-280.
- Kneuper, H., Z.P. Cao, K.B. Twomey, M. Zoltner, F. Jager, J.S. Cargill, J. Chalmers, M.M. van der Kooi-Pol, J.M. van Dijk, R.P. Ryan, W.N. Hunter & T. Palmer, (2014) Heterogeneity in ess transcriptional organization and variable contribution of the Ess/Type VII protein secretion system to virulence across closely related *Staphylococcus aureus* strains. *Mol Microbiol* **93**: 928-943.
- Konieczna, I., P. Zarnowiec, M. Kwinkowski, B. Kolesinska, J. Fraczyk, Z. Kaminski & W. Kaca, (2012) Bacterial urease and its role in long-lasting human diseases. *Current protein & peptide science* **13**: 789-806.
- Koprivnjak, T., V. Mlakar, L. Swanson, B. Fournier, A. Peschel & J.P. Weiss, (2006) Cation-induced transcriptional regulation of the *dlt* operon of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **188**: 3622-3630.
- Kristian, S.A., X. Lauth, V. Nizet, F. Goetz, B. Neumeister, A. Peschel & R. Landmann, (2003) Alanylation of teichoic acids protects *Staphylococcus aureus* against Toll-like receptor 2-dependent host defense in a mouse tissue cage infection model. *J Infect Dis* **188**: 414-423.
- Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N.K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi & K. Hiramatsu, (2001)

- Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**: 1225-1240.
- Kurt, K., J.P. Rasigade, F. Laurent, R.V. Goering, H. Zemlickova, I. Machova, M.J. Struelens, A.E. Zautner, S. Holtfreter, B. Broker, S. Ritchie, S. Reaksmey, D. Limmathurotsakul, S.J. Peacock, C. Cuny, F. Layer, W. Witte & U. Nubel, (2013) Subpopulations of *Staphylococcus aureus* clonal complex 121 are associated with distinct clinical entities. *PLoS One* **8**: e58155.
- Kwiecinski, J., G. Jacobsson, M. Karlsson, X. Zhu, W. Wang, T. Bremell, E. Josefsson & T. Jin, (2013) Staphylokinase promotes the establishment of *Staphylococcus aureus* skin infections while decreasing disease severity. *J Infect Dis* **208**: 990-999.
- Lack, C.H., (1948) Staphylokinase; an activator of plasma protease. *Nature* **161**: 559.
- Lebas, F.C., P.; de Rochambeau, H.; Thébault, R.G., (1997) The Rabbit - Husbandry, Health and Production. *FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS*.
- Lecuit, M., S. Dramsi, C. Gottardi, M. Fedor-Chaiken, B. Gumbiner & P. Cossart, (1999) A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *The EMBO journal* **18**: 3956-3963.
- Lerat, E. & H. Ochman, (2005) Recognizing the pseudogenes in bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **33**: 3125-3132.
- Lindmark, R., K. Thoren-Tolling & J. Sjoquist, (1983) Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. *Journal of immunological methods* **62**: 1-13.
- Lindsay, J.A., A. Ruzin, H.F. Ross, N. Kurepina & R.P. Novick, (1998) The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **29**: 527-543.
- Loffler, B., M. Hussain, M. Grundmeier, M. Bruck, D. Holzinger, G. Varga, J. Roth, B.C. Kahl, R.A. Proctor & G. Peters, (2010) *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog* **6**: e1000715.
- Lowder, B.V., C.M. Guinane, N.L. Ben Zakour, L.A. Weinert, A. Conway-Morris, R.A. Cartwright, A.J. Simpson, A. Rambaut, U. Nubel & J.R. Fitzgerald, (2009) Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 19545-19550.
- Lynch, M., W. Sung, K. Morris, N. Coffey, C.R. Landry, E.B. Dopman, W.J. Dickinson, K. Okamoto, S. Kulkarni, D.L. Hartl & W.K. Thomas, (2008) A genome-wide view of the spectrum of spontaneous mutations in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 9272-9277.
- MacLean, R.C., A.R. Hall, G.G. Perron & A. Buckling, (2010) The population genetics of antibiotic resistance: integrating molecular mechanisms and treatment contexts. *Nature reviews. Genetics* **11**: 405-414.
- Maiques, E., C. Ubeda, S. Campoy, N. Salvador, I. Lasa, R.P. Novick, J. Barbe & J.R. Penades, (2006) beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **188**: 2726-2729.
- Mandel, M.J., M.S. Wollenberg, E.V. Stabb, K.L. Visick & E.G. Ruby, (2009) A single regulatory gene is sufficient to alter bacterial host range. *Nature* **458**: 215-218.
- Marinus, M.G. & J. Casadesus, (2009) Roles of DNA adenine methylation in host-pathogen interactions: mismatch repair, transcriptional regulation, and more. *FEMS microbiology reviews* **33**: 488-503.
- McNamara, P.J., K.C. Milligan-Monroe, S. Khalili & R.A. Proctor, (2000) Identification, cloning, and initial characterization of rot, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **182**: 3197-3203.
- Medzhitov, R. & C. Janeway, Jr., (2000) The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* **8**: 452-456.
- Melles, D.C., R.F. Gorkink, H.A. Boelens, S.V. Snijders, J.K. Peeters, M.J. Moorhouse, P.J. van der Spek, W.B. van Leeuwen, G. Simons, H.A. Verbrugh & A. van Belkum, (2004) Natural

- population dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* **114**: 1732-1740.
- Messenger, A.M., A.N. Barnes & G.C. Gray, (2014) Reverse zoonotic disease transmission (zooanthroponosis): a systematic review of seldom-documented human biological threats to animals. *PLoS One* **9**: e89055.
- Mobley, H.L. & R.P. Hausinger, (1989) Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol Rev* **53**: 85-108.
- Mork, T., S. Waage, T. Tollersrud, B. Kvitle & S. Sviland, (2007) Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features. *Acta veterinaria Scandinavica* **49**: 23.
- Murchan, S., H.M. Aucken, L. O'Neill G, M. Ganner & B.D. Cookson, (2004) Emergence, spread, and characterization of phage variants of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 16 in England and Wales. *J Clin Microbiol* **42**: 5154-5160.
- Naffakh, N., A. Tomoiu, M.A. Rameix-Welti & S. van der Werf, (2008) Host restriction of avian influenza viruses at the level of the ribonucleoproteins. *Annual review of microbiology* **62**: 403-424.
- Neuhaus, F.C. & J. Baddiley, (2003) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **67**: 686-723.
- Nickerson, E.K., V. Wuthiekanun, G. Wongsuvan, D. Limmathurosakul, P. Srisamang, W. Mahavanakul, J. Thaipadungpanit, K.R. Shah, A. Arayawichanont, P. Amornchai, A. Thanwisai, N.P. Day & S.J. Peacock, (2009) Factors predicting and reducing mortality in patients with invasive *Staphylococcus aureus* disease in a developing country. *PLoS One* **4**: e6512.
- Novick, R.P., G.E. Christie & J.R. Penades, (2010) The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat Rev Microbiol* **8**: 541-551.
- Ossowski, S., K. Schneeberger, J.I. Lucas-Lledo, N. Warthmann, R.M. Clark, R.G. Shaw, D. Weigel & M. Lynch, (2010) The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **327**: 92-94.
- Patel, M., Q. Jiang, R. Woodgate, M.M. Cox & M.F. Goodman, (2010) A new model for SOS-induced mutagenesis: how RecA protein activates DNA polymerase V. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **45**: 171-184.
- Peacock, S.J., I. de Silva & F.D. Lowy, (2001) What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol* **9**: 605-610.
- Pereira, R.V., J.D. Siler, R.C. Bicalho & L.D. Warnick, (2014) In Vivo Selection of Resistant *E. coli* after Ingestion of Milk with Added Drug Residues. *PLoS One* **9**: e115223.
- Peschel, A., M. Otto, R.W. Jack, H. Kalbacher, G. Jung & F. Gotz, (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **274**: 8405-8410.
- Piddock, L.J., (2006) Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**: 629-636.
- Poulsen, A.B., R. Skov & L.V. Pallesen, (2003) Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci and in staphylococci directly from simulated blood cultures using the EVIGENE MRSA Detection Kit. *J Antimicrob Chemother* **51**: 419-421.
- Price, L.B., M. Stegger, H. Hasman, M. Aziz, J. Larsen, P.S. Andersen, T. Pearson, A.E. Waters, J.T. Foster, J. Schupp, J. Gillece, E. Driebe, C.M. Liu, B. Springer, I. Zdobc, A. Battisti, A. Franco, J. Zmudzki, S. Schwarz, P. Butaye, E. Jouy, C. Pomba, M.C. Porrero, R. Ruimy, T.C. Smith, D.A. Robinson, J.S. Weese, C.S. Arriola, F. Yu, F. Laurent, P. Keim, R. Skov & F.M. Aarestrup, (2012) *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *mBio* **3**.
- Quinn, P., (1999) *Staphylococcus* species. In: Clinical veterinary microbiology. P.J. Quinn, M.E. Carter, B. Markey & G.R. Carter (eds). London: Mosby, pp. 118-126.

- Ram, G., J. Chen, K. Kumar, H.F. Ross, C. Ubeda, P.K. Damle, K.D. Lane, J.R. Penades, G.E. Christie & R.P. Novick, (2012) Staphylococcal pathogenicity island interference with helper phage reproduction is a paradigm of molecular parasitism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 16300-16305.
- Ram, G., J. Chen, H.F. Ross & R.P. Novick, (2014) Precisely modulated pathogenicity island interference with late phage gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 14536-14541.
- Reichmann, N.T., C.P. Cassona & A. Grundling, (2013) Revised mechanism of D-alanine incorporation into cell wall polymers in Gram-positive bacteria. *Microbiology* **159**: 1868-1877.
- Reichmann, N.T. & A. Grundling, (2011) Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes. *FEMS Microbiol Lett* **319**: 97-105.
- Reingold, V., N. Luria, A. Robichon & A. Dombrovsky, (2014) Adenine methylation may contribute to endosymbiont selection in a clonal aphid population. *BMC genomics* **15**: 999.
- Resch, G., P. Francois, D. Morisset, M. Stojanov, E.J. Bonetti, J. Schrenzel, O. Sakwinska & P. Moreillon, (2013) Human-to-bovine jump of *Staphylococcus aureus* CC8 is associated with the loss of a beta-hemolysin converting prophage and the acquisition of a new staphylococcal cassette chromosome. *PLoS One* **8**: e58187.
- Robinson, J.T., H. Thorvaldsdottir, W. Winckler, M. Guttman, E.S. Lander, G. Getz & J.P. Mesirov, (2011) Integrative genomics viewer. *Nature biotechnology* **29**: 24-26.
- Rollof, J., E. Vinge, P. Nilsson-Ehle & J.H. Braconier, (1992) Aggregation of human granulocytes by *Staphylococcus aureus* lipase. *J Med Microbiol* **36**: 52-55.
- Rooijackers, S.H., M. Ruyken, A. Roos, M.R. Daha, J.S. Presanis, R.B. Sim, W.J. van Wamel, K.P. van Kessel & J.A. van Strijp, (2005) Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nature immunology* **6**: 920-927.
- Rosell, J.M., (1996) Situación actual y perspectivas de la cunicultura. In: *Zootecnia. Bases de Producción Animal. Producciones Cunicula y Avícolas Alternativas*. . C. Buxadé (ed). Madrid: Mundi-Prensa, pp. 17-29.
- Ruzin, A., J. Lindsay & R.P. Novick, (2001) Molecular genetics of SaPI1 - a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **41**: 365-377.
- Said-Salim, B., P.M. Dunman, F.M. McAleese, D. Macapagal, E. Murphy, P.J. McNamara, S. Arvidson, T.J. Foster, S.J. Projan & B.N. Kreiswirth, (2003) Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol* **185**: 610-619.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis, (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schenk, S. & R.A. Laddaga, (1992) Improved method for electroporation of *Staphylococcus aureus*. In: *FEMS Microbiology Letters*. pp. 133-138.
- Seib, K.L., E. Pigozzi, A. Muzzi, J.A. Gawthorne, I. Delany, M.P. Jennings & R. Rappuoli, (2011) A novel epigenetic regulator associated with the hypervirulent *Neisseria meningitidis* clonal complex 41/44. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**: 3622-3633.
- Selva, L., D. Viana, G. Regev-Yochay, K. Trzcinski, J.M. Corpa, I. Lasa, R.P. Novick & J.R. Penades, (2009) Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 1234-1238.
- Serruto, D., R. Rappuoli, M. Scarselli, P. Gros & J.A. van Strijp, (2010) Molecular mechanisms of complement evasion: learning from staphylococci and meningococci. *Nat Rev Microbiol* **8**: 393-399.
- Shepherd, M.A., V.M. Fleming, T.R. Connor, J. Corander, E.J. Feil, C. Fraser & W.P. Hanage, (2013) Historical zoonoses and other changes in host tropism of *Staphylococcus aureus*, identified by phylogenetic analysis of a population dataset. *PLoS One* **8**: e62369.

- Smith, J.M., N.H. Smith, M. O'Rourke & B.G. Spratt, (1993) How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4384-4388.
- Smyth, D.S., E.J. Feil, W.J. Meaney, P.J. Hartigan, T. Tollersrud, J.R. Fitzgerald, M.C. Enright & C.J. Smyth, (2009) Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* **58**: 1343-1353.
- Standiford, T.J., D.A. Arenberg, J.M. Danforth, S.L. Kunkel, G.M. VanOtteren & R.M. Strieter, (1994) Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis. *Infect Immun* **62**: 119-125.
- Subbarao, E.K., W. London & B.R. Murphy, (1993) A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *Journal of virology* **67**: 1761-1764.
- Sumby, P. & M.K. Waldor, (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.
- Sung, J.M. & J.A. Lindsay, (2007) *Staphylococcus aureus* strains that are hypersusceptible to resistance gene transfer from enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 2189-2191.
- Sung, J.M., D.H. Lloyd & J.A. Lindsay, (2008) *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology* **154**: 1949-1959.
- Sutra, L. & B. Poutrel, (1994) Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* **40**: 79-89.
- Tabuchi, Y., A. Shiratsuchi, K. Kurokawa, J.H. Gong, K. Sekimizu, B.L. Lee & Y. Nakanishi, (2010) Inhibitory role for D-alanylation of wall teichoic acid in activation of insect Toll pathway by peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* **185**: 2424-2431.
- Tenover, F. & R.P. Gayne, (2000) *The epidemiology of Staphylococcus infections*. En: *Gram-Positive Pathogens*. Fischetti, VA., Novick RP., Ferretti, JJ., Portnoy, DA. y Rood JJ eds., p. 414-421. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Tkaczyk, C., M.M. Hamilton, V. Datta, X.P. Yang, J.J. Hilliard, G.L. Stephens, A. Sadowska, L. Hua, T. O'Day, J. Suzich, C.K. Stover & B.R. Sellman, (2013) *Staphylococcus aureus* alpha toxin suppresses effective innate and adaptive immune responses in a murine dermonecrosis model. *PLoS One* **8**: e75103.
- Tormo-Mas, M.A., I. Mir, A. Shrestha, S.M. Tallent, S. Campoy, I. Lasa, J. Barbe, R.P. Novick, G.E. Christie & J.R. Penades, (2010) Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands. *Nature* **465**: 779-782.
- Tormo, M.A., M.D. Ferrer, E. Maiques, C. Ubeda, L. Selva, I. Lasa, J.J. Calvete, R.P. Novick & J.R. Penades, (2008) *Staphylococcus aureus* pathogenicity island DNA is packaged in particles composed of phage proteins. *J Bacteriol* **190**: 2434-2440.
- Tormo, M.A., E. Knecht, F. Gotz, I. Lasa & J.R. Penades, (2005) Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology* **151**: 2465-2475.
- Traber, K.E., E. Lee, S. Benson, R. Corrigan, M. Cantera, B. Shopsin & R.P. Novick, (2008) agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology* **154**: 2265-2274.
- Ubeda, C., M.A. Tormo, C. Cucarella, P. Trotonda, T.J. Foster, I. Lasa & J.R. Penades, (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.
- van Wamel, W.J., S.H. Rooijackers, M. Ruyken, K.P. van Kessel & J.A. van Strijp, (2006) The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol* **188**: 1310-1315.

- Vancraeynest, D., F. Haesebrouck, A. Deplano, O. Denis, C. Godard, C. Wildemaue & K. Hermans, (2006) International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **53**: 418-422.
- Velaudapillai, T., (1960) Transduction in vivo. *Zeitschr. f. Hygiene*. **146**: 470-480.
- Verkaik, N.J., M. Benard, H.A. Boelens, C.P. de Vogel, J.L. Nouwen, H.A. Verbrugh, D.C. Melles, A. van Belkum & W.J. van Wamel, (2011) Immune evasion cluster-positive bacteriophages are highly prevalent among human *Staphylococcus aureus* strains, but they are not essential in the first stages of nasal colonization. *Clin Microbiol Infect* **17**: 343-348.
- Viana, D., J. Blanco, M.A. Tormo-Mas, L. Selva, C.M. Guinane, R. Baselga, J.M. Corpa, I. Lasa, R.P. Novick, J.R. Fitzgerald & J.R. Penades, (2010) Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. *Mol Microbiol* **77**: 1583-1594.
- Viana, D., L. Selva, P. Segura, J.R. Penades & J.M. Corpa, (2007) Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from rabbit lesions. *Vet Microbiol* **121**: 288-298.
- Viana, D.P., J., (2009) Estafilococia en conejos: relación entre genotipos, virulencia y lesiones. *Tesis Doctoral UCH-CEU Cardenal Herrera*.
- Viguié, C., S. Arora, N. Gilmartin, K. Welbeck & R. O'Kennedy, (2009) Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in biotechnology* **27**: 486-493.
- Voss, A., F. Loeffen, J. Bakker, C. Klaassen & M. Wulf, (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging infectious diseases* **11**: 1965-1966.
- Wain, L.V., E. Bailes, F. Bibollet-Ruche, J.M. Decker, B.F. Keele, F. Van Heuverswyn, Y. Li, J. Takehisa, E.M. Ngole, G.M. Shaw, M. Peeters, B.H. Hahn & P.M. Sharp, (2007) Adaptation of HIV-1 to its human host. *Molecular biology and evolution* **24**: 1853-1860.
- Walker, G.C., (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **48**: 60-93.
- Ward, M.J., C.L. Gibbons, P.R. McAdam, B.A. van Bunnik, E.K. Girvan, G.F. Edwards, J.R. Fitzgerald & M.E. Woolhouse, (2014) Time-scaled evolutionary analysis of the transmission and antibiotic resistance dynamics of *Staphylococcus aureus* CC398. *Appl Environ Microbiol*.
- Wertheim, H.F., D.C. Melles, M.C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H.A. Verbrugh & J.L. Nouwen, (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet. Infectious diseases* **5**: 751-762.
- Winkler, K.C., J. de Waart & C. Grooten, (1965) Lysogenic conversion of staphylococci to loss of beta-toxin. *J Gen Microbiol* **39**: 321-333.
- Witkin, E.M., (1976) Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriological reviews* **40**: 869-907.
- Wollert, T., B. Pasche, M. Rochon, S. Deppenmeier, J. van den Heuvel, A.D. Gruber, D.W. Heinz, A. Lengeling & W.D. Schubert, (2007) Extending the host range of *Listeria monocytogenes* by rational protein design. *Cell* **129**: 891-902.
- Wright, G.D., (2007) The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol* **5**: 175-186.
- Wu, H., J.E. Lippmann, J.P. Oza, M. Zeng, P. Fives-Taylor & N.O. Reich, (2006) Inactivation of DNA adenine methyltransferase alters virulence factors in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol* **21**: 238-244.
- Yamaguchi, T., T. Hayashi, H. Takami, K. Nakasone, M. Ohnishi, K. Nakayama, S. Yamada, H. Komatsuzawa & M. Sugai, (2000) Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **38**: 694-705.
- Yarwood, J.M., J.K. McCormick, M.L. Paustian, P.M. Orwin, V. Kapur & P.M. Schlievert, (2002) Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J Biol Chem* **277**: 13138-13147.

- Yonus, H., P. Neumann, S. Zimmermann, J.J. May, M.A. Marahiel & M.T. Stubbs, (2008) Crystal structure of DltA. Implications for the reaction mechanism of non-ribosomal peptide synthetase adenylation domains. *J Biol Chem* **283**: 32484-32491.
- Zdzalik, M., M. Kalinska, M. Wysocka, J. Stec-Niemczyk, P. Cichon, N. Stach, N. Gruba, H.R. Stennicke, A. Jabaiah, M. Markiewicz, S. Kedracka-Krok, B. Wladyka, P.S. Daugherty, A. Lesner, K. Rolka, A. Dubin, J. Potempa & G. Dubin, (2013) Biochemical and structural characterization of SplD protease from *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **8**: e76812.
- Zhang, K., J.A. McClure, S. Elsayed, T. Louie & J.M. Conly, (2005) Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **43**: 5026-5033.
- Zhu, Y., X. Fan, X. Zhang, X. Jiang, L. Niu, M. Teng & X. Li, (2014) Structure of Rot, a global regulator of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **70**: 2467-2476.









