

La caracterización de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de nariz revela su potencial para causar enfermedad en conejos

Characterization of nasal carried Staphylococcus aureus strains reveals their potential to cause disease in rabbits

Selva L.^{1*}, Viana D.¹, Penadés J.R.², Corpa J.M.¹

¹ Dept. Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad CEU-Cardenal Herrera, Edificio Seminario s/n, 46113 Moncada (Valencia), España

² Centro de Investigación y Tecnología Animal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Apdo. 187, Polígono La Esperanza 100, 12400 Segorbe (Castellón), España
*Dirección de contacto: jmcropa@uch.ceu.es

Resumen

Staphylococcus aureus es una importante causa de mastitis, pododermatitis y abscesos subcutáneos en conejos. Suele colonizar diferentes localizaciones, destacando la cavidad nasal por su frecuencia. Se examinaron 283 conejos procedentes de 12 granjas con el objetivo de detectar *S. aureus* en nariz y lesiones. El estudio mostró que el 43,81% de los conejos portaba *S. aureus* en su nariz, con una mayor incidencia en los animales que presentaban lesiones por *S. aureus* (75,75%) comparado con animales aparentemente sanos (15,89%). El tipado molecular de las cepas aisladas de 65 animales portadores nasales con lesiones, reveló que en un 92% de los casos las cepas eran iguales. Además, se estudió la presencia en dichas cepas de genes de virulencia, como toxinas exfoliativas, leucotoxinas, superantígenos y MSCRAMMs. Los resultados mostraron que las cepas aisladas de nariz contenían la misma combinación de factores de virulencia que las cepas aisladas de lesiones. Estos datos sugieren que la combinación de genes necesaria para causar enfermedad podría ser también necesaria para la colonización nasal y, además, el desarrollo de lesiones podría depender en mayor medida de factores del hospedador.

Palabras clave: *S. aureus*, conejo, colonización, tipado.

Abstract

Staphylococcus aureus is an important cause of mastitis, pododermatitis and subcutaneous abscesses in rabbits. Different body sites can be colonized (nares, ears, perineum, etc.) being the first the most frequently colonized. Two hundred eighty-three rabbits from 12 rabbitries were examined for the presence of *S. aureus* in nares and lesions. The study showed that 43.81% of rabbits carried *S. aureus* in their nares, with significantly higher incidence in animals with staphylococcal-related lesions (75.75%) compared with apparently healthy animals (15.89%). The molecular typing analysis of the strains isolated from 65 nasal carriers animals with lesions, revealed that strains were undistinguished in 92% of cases. Moreover, the pathogenic arsenal of the strains was screened for the presence of relevant *S. aureus* virulence genes, including exfoliative toxins, leucotoxins, superantigens and MSCRAMMs. The results showed that the nasal carried strains contained the same combination of virulence factors that strains isolated from lesions. Our data suggest that the *S. aureus* gene combinations necessary for invasive diseases may also be necessary for nasal colonization and, therefore, the development of lesions is strongly dependent of host factors.

Key words: *S. aureus*, rabbit, colonization, typing.

Introducción

S. aureus coloniza la piel y mucosas de humanos y animales. En conejos, esta bacteria infecta lesiones dérmicas e invade el tejido subcutáneo (Okerman et al., 1984) causando diferentes lesiones: mastitis, pododermatitis y abscesos

(Segura et al., 2007; Corpa et al., 2009). Aunque múltiples sitios del cuerpo pueden ser colonizados, en humanos la nariz es el más frecuente (Wertheim et al., 2005). Sin embargo, en animales existen pocos estudios acerca de la presencia de portadores nasales de *S. aureus*. El porcentaje de portadores nasales varía según las diferentes especies estudiadas: 7,9% en caballos (Burton et al., 2008), 29% en ovejas (Vautor et al., 2005) y 32,1% en conejos (Hermans et al., 1999).

En humanos, una relación causal entre portador nasal de *S. aureus* e infección se apoya en el hecho de que las cepas nasales y las infectantes muestran el mismo genotipo (von Eiff et al., 2001). Feil et al. (2003) no encontraron diferencias significativas en la distribución de genotipos entre cepas aisladas de portadores y de pacientes con enfermedad. Además, otro estudio comparó cepas aisladas de personas sanas versus enfermas, sin conseguir identificar marcadores genéticos asociados a la infección (Lindsay et al., 2006).

En conejos, aunque sí se ha descrito la presencia de portadores nasales (Hermans et al., 1999), el papel de estas cepas en el proceso patológico no está claro, aunque se acepta la idea general de que las infecciones por *S. aureus* aparecen en la granja tras la introducción de animales asintomáticos que son portadores nasales (Devriese et al., 1981). El objetivo de este trabajo es comparar las cepas aisladas de conejos sanos portadores nasales y de animales con lesión en busca de posibles diferencias entre ellas.

Material y métodos

EXAMEN CLÍNICO, RECOGIDA DE MUESTRAS Y CULTIVO MICROBIOLÓGICO

Se estudiaron 12 granjas industriales con estafilococia. Se recogieron un total de 283 conejas: 151 sin lesiones aparentes y 132 con diferentes tipos de lesiones compatibles con infecciones por *S. aureus*. Se recogieron muestras de nariz y lesiones con ayuda de un hisopo estéril, y fueron inoculadas en agar sangre (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Se incubaron en aerobiosis a 37°C durante 24-48 horas, identificando *S. aureus* en base a sus características morfológicas y propiedades hemolíticas (Devriese et al., 1996).

COMPARACIÓN GENÓMICA DE ASILADOS DE *S. AUREUS* MEDIANTE TIPADO MOLECULAR, MLST, AGR, Y ESTUDIO DE TOXINAS Y MSCRAMMS

El método de tipado molecular utilizado se basa en el análisis de las regiones polimórficas de los genes *coa*, *spa* y *clfB*, como se describe en Viana et al. (2007). El tipado por MLST se realizó siguiendo la metodología descrita por Enright et al. (2000) y el polimorfismo en el gen *agr* fue analizado de acuerdo a Gilot et al. (2002). Además, se analizó la presencia de los factores de patogenicidad de *S. aureus* más importantes: *bbp*, *clfA*, *cna*, *ebpS*, *fnbA*, *fnbB*, *fib*, *m/eap* y *sdrC*, los cuales codifican MSCRAMMs y toxinas (enterotoxinas: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq* and *selu*, *tst*, *hlg* y *pvl*) mediante PCR.

MASTITIS ESTAFILOCÓICA EXPERIMENTAL

Comparamos la respuesta obtenida tras la infección de la glándula mamaria de 5 conejas en lactación, con 2 cepas con el mismo origen clonal, pero aisladas de animales diferentes, una de un conejo portador nasal sano y otra de una mamitis. Para ello utilizamos el procedimiento experimental utilizado por Adlam et al. (1976) con algunas variaciones.

Resultados y discusión

Una parte de este estudio consistía en conocer la tasa de portadores nasales de *S. aureus*. El 43,81% de los conejos portaban la bacteria en su nariz, con una mayor prevalencia en los animales que presentaron lesiones por *S. aureus* (75,75%) comparado con los animales sanos (15,89%).

Existe cierta controversia acerca de si todas las cepas de *S. aureus* tienen el mismo potencial para producir enfermedad o si la aparición de lesiones va asociada a genotipos particularmente virulentos. En conejos, a nivel individual, los signos clínicos son los mismos, no importa qué cepa de *S. aureus* esté involucrada (Vancreaynest et al., 2006; Viana et al., 2007). Sin embargo, a nivel de granja, se han descrito clásicamente 2 tipos de cepas, las de alta y baja virulencia. Para conocer si las cepas aisladas de nariz estaban relacionadas genéticamente con las aisladas de lesión, se llevó a cabo el tipado molecular de las cepas obtenidas de 65 animales con lesiones que también resultaron ser portadores nasales de *S. aureus*. En el 92% de los casos, las cepas eran idénticas. El genotipo más extendido fue el A1/II1/δ, como se describe en Viana et al. (2007). El análisis por MLST de los 4 genotipos más exten-

TABLA 1. Comparación genómica de aislados de *S. aureus* mediante tipado molecular, MLST, *agr*, y estudio de toxinas y MSCRAMMs.

Origen cepas	Genotipo	MLST	<i>agr</i>	<i>clfA</i>	<i>fnbA</i>	<i>sdhC</i>	<i>ny/eap</i>	<i>fib</i>	<i>hbp</i>	<i>ebpS</i>	<i>cna</i>	<i>fnbB</i>	<i>tst</i>	<i>hlg</i>	<i>pvf</i>
Mastitis	A1 III ♂	121	IV	+	+	+	2	+	+	+	3	-	-	+	-
Mastitis	A1 III ♂	121	IV	+	+	+	2	+	+	+	3	-	-	+	-
Nariz	A1 III ♂	121	IV	+	+	+	2	+	+	+	3	-	-	+	-
Mastitis	A1 III ♂	121	IV	+	+	+	2	+	+	+	3	+	-	+	-
Nariz	A1 III ♂	121	IV	+	+	+	2	+	+	+	3	+	-	+	-
Mastitis	B1 IV1 ♂	96	III	+	+	+	1	+	-	+	1	+	-	+	-
Nariz	B1 IV1 ♂	96	III	+	+	+	2	+	-	+	1	+	-	+	-
Mastitis	B1 IV2 ♂	96	III	+	+	+	1	+	-	+	1	+	-	+	-
Nariz	B1 IV2 ♂	96	III	+	+	+	2	+	-	+	1	+	-	+	-

TABLA 2. Comparación del patrón de enterotoxinas entre aislados de *S. aureus*.

Origen cepas	Genotipo	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sef</i>	<i>see</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>sej</i>	<i>selm</i>	<i>sehr</i>	<i>selo</i>	<i>selp</i>	<i>setq</i>	<i>setr</i>
Mastitis	A1 III ♂	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
Mastitis	A1 III ♂	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
Nariz	A1 III ♂	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
Mastitis	A1 III ♂	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
Nariz	A1 III ♂	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
Mastitis	B1 IV1 ♂	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Nariz	B1 IV1 ♂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mastitis	B1 IV2 ♂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Nariz	B1 IV2 ♂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 3. Evaluación macroscópica y microscópica de la mastitis experimental.

Nº conejo	MIM			VH	MIN		
	Inflamación	Necrosis	VH		Inflamación	Necrosis	VH
1	Moderada	Ligera	2	Moderada	Ligera	2	
2	Severa	Severa	1	Severa	Severa	1	
3	Ligera	Negativa	0	Moderada	Ligera	3	
4	Severa	Severa	1	Severa	Severa	1	
5	Ligera	Negativa	0	Ligera	Ligera	3	

MIM: mama inoculada con cepa de mastitis, MIN: mama inoculada con cepa nasal, VH: valoración histopatológica.

Los aislados confirmaron que las cepas de igual genotipo, pertenecían al mismo linaje (tabla 1). Del mismo modo, los aislados de nariz y lesión de igual genotipo presentaban idéntico *agr* (Tabla 1).

Se ha descrito que algunos factores de virulencia, como las toxinas, son portados en la bacteria en elementos genéticos móviles (Lindsay y Holden, 2006), por ello analizamos la posibilidad de que cepas relacionadas clonalmente tuvieran distinto arsenal de factores de virulencia. Como se muestra en las Tablas 1 y 2, estudiamos 27 genes de relevancia clínica. Obteniendo, de nuevo, homología en su arsenal de virulencia entre todos los pares de cepas analizados, excepto en 7 casos (sombreado Tablas 1 y 2).

En resumen, las cepas aisladas de lesión resultaron ser idénticas a las aisladas de portadores nasales asintomáticos, confirmando el potencial de estas últimas para desarrollar estafilococias en conejos.

Por último, y para confirmar que efectivamente las cepas aisladas de nariz eran capaces de producir lesión, llevamos a cabo una mastitis experimental. Las lesiones fueron valoradas macroscópicamente, en base a la extensión de la inflamación producida (tabla 3): negativa (<0,5 cm), ligera (0,5-2 cm), moderada (2-5 cm), y severa (>5 cm). El área de necrosis fue definida como: negativa, ligera (<2 cm), moderada (2-5 cm), y severa (>5 cm). Las lesiones histopatológicas fueron clasificadas de acuerdo a su tamaño y grado de necrosis e inflamación: 0) sin inflamación o

necrosis, 1) ligera inflamación y necrosis, 2) moderada inflamación y necrosis y 3) intensa inflamación y necrosis. La cepa aislada de un conejo portador nasal sano produjo el mismo tipo de lesión que la cepa aislada de una mastitis clínica, lo que confirmaba nuestra hipótesis.

Aunque queda por determinar si existe una correlación entre el estado de portador nasal y la aparición de lesiones por *S. aureus* en conejos, cabe destacar que las cepas nasales poseen la misma combinación de genes que las cepas clínicas. Algunos clones han demostrado ser más virulentos que otros, sin embargo, este estudio podría apoyar la hipótesis de que, dadas las condiciones clínicas adecuadas, todas y cada una de las cepas de *S. aureus* podrían convertirse en patógenas.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por proyectos de investigación de varias entidades: Universidad CEU Cardenal Herrera (Banco Santander/CEU-UCH: Programa Copernicus y PRCEU-UCH 33/09), Generalitat Valenciana (GV05/202, BEST/2007/160, ACOMP/2009/207 y ACOMP/2010/062) y la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (AGL2008-00273/GAN).

Bibliografía

- Adlam C., Thorley C.M., Ward P.D., Collins M., Lucken R.N., Knight P.A. 1976, *Natural and experimental staphylococcal mastitis in rabbits*. *J. Comp. Pathol.*, 86:581-593.
- Burton S., Reid-Smith R., McClure J.T., Weese J.S. 2008, *Staphylococcus aureus* colonization in healthy horses in Atlantic Canada. *Can. Vet. J.* 49:797-799.
- Corpa J.M., Hermans K., Haesebrouck F. 2009. *Main pathologies associated with Staphylococcus aureus infections in rabbits: a review*. *World Rabbit Sci.*, 17:115-125.
- Devriese L.A., Godard C., Okerman L., Renault L. 1981. *Characteristics of Staphylococcus aureus strains from rabbits*. *Ann. Rech. Vet.*, 12:327-332.
- Devriese L.A., Hendrickx W., Godard C., Okerman L., Haesebrouck F. 1996. *A new pathogenic Staphylococcus aureus type in commercial rabbits*. *Zentralbl Veterinarmed B*, 43:313-315.
- Enright M.C., Day N.P., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G. 2000. *Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 38:1008-1015.
- Feil E.J., Cooper J.E., Grundmann H., Robinson D.A., Enright M.C., Berendt T., Peacock S.J., Smith J.M., Murphy M., Spratt B.G., Moore C.E., Day N.P. 2003. *How clonal is Staphylococcus aureus?* *J. Bacteriol.*, 185:3307-3316.
- Gilot P., Lina G., Cochard T., Poutrel B. 2002. *Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of Staphylococcus aureus strains isolated from cows with mastitis*. *J. Clin. Microbiol.*, 40:4060-4067.
- Hermans K., De Herdt P., Devriese L.A., Hendrickx W., Godard C., Haesebrouck F. 1999. *Colonization of rabbits with Staphylococcus aureus in flocks with and without chronic staphylococcosis*. *Vet. Microbiol.*, 67:37-46.
- Lindsay J.A., Holden M.T. 2006. *Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of Staphylococcus aureus*. *Funct. Integr. Genomics*, 6:186-201.
- Lindsay J.A., Moore C.E., Day N.P., Peacock S.J., Witney A.A., Stabler R.A., Husain S.E., Butcher P.D., Hinds, J. 2006. *Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of Staphylococcus aureus has a unique combination of surface-associated and regulatory genes*. *J. Bacteriol.*, 188:669-676.
- Okerman L., Devriese L.A., Maertens L., Okerman F., Godard C. 1984. *Cutaneous staphylococcosis in rabbits*. *Vet. Rec.*, 114:313-315.
- Segura P., Martinez J., Peris B., Selva L., Viana D., Penades J.R. Corpa, J.M. 2007. *Staphylococcal infections in rabbit does on two industrial farms*. *Vet. Rec.*, 160:869-872.
- Vancraeynest D., Hermans K., Haesebrouck F. 2006. *Prevalence of genes encoding exfoliative toxins, leucotoxins and superantigens among high and low virulence rabbit Staphylococcus aureus strains*. *Vet. Microbiol.*, 117:211-218.
- Vautour E., Abadie G., Guibert J.M., Chevalier N., Pepin M. 2005. *Nasal carriage of Staphylococcus aureus in dairy sheep*. *Vet. Microbiol.*, 106:235-239.
- Viana D., Selva L., Segura P., Penades J.R., Corpa J.M. 2007. *Genotypic characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from rabbit lesions*. *Vet. Microbiol.*, 121:288-298.
- von Eiff C., Becker K., Machka K., Stammer H., Peters G. 2001. *Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia*. *Study Group. N. Engl. J. Med.*, 344:11-16.
- Wertheim H.F., Melles D.C., Vos M.C., van Leeuwen W., van Belkum A., Verbrugh H.A., Nouwen J.L., 2005. *The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections*. *Lancet Infect. Dis*, 5:751-762.