

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Sanidad Animal**



**INFLUENCIA DE LA CATALASA Y DE LA  $\beta$ -TOXINA EN LA  
PATOGENESIS DE “STAPHYLOCOCCUS AUREUS”**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Susana Martínez Pulgarín

Bajo la dirección del doctor

Ricardo de la Fuente López

**Madrid, 2005**

**ISBN: 84-669-2854-5**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

**INFLUENCIA DE LA CATALASA Y DE LA  
 $\beta$ -TOXINA EN LA PATOGÉNESIS DE  
*Staphylococcus aureus***

**SUSANA MARTÍNEZ PULGARÍN**

Memoria presentada para optar al Título de Doctora  
por la Universidad Complutense de Madrid

**Director de la Tesis Doctoral:**

**Dr. D. Ricardo de la Fuente López**

**Madrid, 2005**



*A todos los que me han  
acompañado y apoyado  
durante este viaje: a Rubén,  
a mi familia, a mis amigos  
y, especialmente, a mis  
compañeros.*



**ÍNDICE**

---

---



<b>LISTADO DE FIGURAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTADO DE TABLAS</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. PATOGENIA DE LAS INFECCIONES POR <i>S. aureus</i> .....	4
1.2. FACTORES ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA DE <i>S. aureus</i> .....	6
1.2.1. Componentes superficiales.....	7
1.2.1.1. Polisacárido capsular.....	7
1.2.1.2. Polisacárido extracelular.....	7
1.2.1.3. Proteínas superficiales .....	8
1.2.2. Toxinas y enzimas extracelulares.....	9
1.2.2.1. Toxinas con actividad sobre membranas .....	9
1.2.2.2. Toxinas con actividad de superantígenos.....	10
1.2.2.3. Enzimas extracelulares .....	11
1.2.3. Regulación genética de los factores de virulencia.....	12
1.2.3.1. El sistema regulador Agr y otros sistemas reguladores de dos componentes ...	13
1.2.3.2. SarA y otras proteínas homólogas .....	14
1.2.3.3. Regulación genética frente al estrés oxidativo .....	15
1.3. DEFENSA INNATA DEL HOSPEDADOR: CÉLULAS FAGOCÍTICAS .....	17
1.3.1. Sistema citotóxico oxígeno-dependiente.....	18
1.3.2. Sistema citotóxico oxígeno-independiente .....	18
1.3.3. Actividad antimicrobiana de las células no fagocíticas .....	19
1.4. CATALASAS BACTERIANAS.....	20
1.4.1. Catalasa de <i>S. aureus</i> .....	21
1.5. ESFINGOMIELINASAS BACTERIANAS.....	22
1.5.1. $\beta$ -toxina de <i>S. aureus</i> .....	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>31</b>
3.1. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES POR DELECCIÓN DEL GEN <i>katA</i> , DEL GEN <i>hly</i> Y DE AMBOS EN <i>S. aureus</i> .....	33



3.1.1. Construcción del mutante $\Delta katA$ .....	34
3.1.2. Construcción del mutante $\Delta hlb$ .....	35
3.1.3. Construcción del doble mutante $\Delta katA \Delta hlb$ .....	37
3.2. COMPLEMENTACIÓN DE LOS MUTANTES OBTENIDOS.....	38
3.3. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LOS MUTANTES OBTENIDOS.....	39
3.4. ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA INTRACELULAR.....	40
3.4.1. Supervivencia intracelular de <i>S. aureus</i> 2386 y sus respectivos mutantes $\Delta katA$ , $\Delta hlb$ y $\Delta katA \Delta hlb$ en la línea celular J774A.1 .....	41
3.4.2. Supervivencia intracelular de <i>S. aureus</i> 2386 y sus respectivos mutantes $\Delta katA$ , $\Delta hlb$ y $\Delta katA \Delta hlb$ en la línea celular MAC-T .....	49
3.5. ENSAYOS DE VIRULENCIA EN UN MODELO MURINO .....	57
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>65</b>
4.1. CEPAS BACTERIANAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	67
4.2. PLÁSMIDOS .....	68
4.2.1. Construcción de los plásmidos pERkat y pERh1b .....	68
4.2.2. Construcción de los plásmidos pHkat, pHh1b y pHkath1b .....	72
4.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA .....	72
4.3.1. Oligonucleótidos .....	72
4.3.2. Reacción de PCR .....	74
4.4. EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSÓMICO .....	75
4.5. CLONAJE Y TRANSFORMACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN.....	75
4.6. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS.....	76
4.7. TRANSFORMACIÓN DE PROTOPLASTOS.....	76
4.8. MUTAGÉNESIS POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA .....	78
4.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALASA .....	78
4.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA .....	79
4.11. CURVAS DE CRECIMIENTO .....	80
4.12. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> DE SUPERVIVENCIA INTRACELULAR .....	80
4.12.1. Mantenimiento de las líneas celulares.....	80
4.12.2. Preparación de las suspensiones bacterianas .....	81
4.12.3. Ensayos de supervivencia intracelular .....	81
4.13. DETERMINACIÓN DE DOSIS LETAL 50 EN UN MODELO MURINO.....	83
4.13.1. Animales de experimentación.....	83
4.13.2. Preparación de las suspensiones bacterianas .....	83
4.13.3. Inoculación y determinación de la dosis letal 50 .....	83
4.14. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	84

<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>85</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>89</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>95</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>101</b>

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Esquema del sistema regulador Agr de <i>S. aureus</i> .....	14
<b>Figura 3.1A.</b> Comprobación por PCR de la transformación de <i>S. aureus</i> 2386 con pERkat .....	34
<b>Figura 3.1B.</b> Comprobación por PCR de la delección del gen <i>katA</i> en <i>S. aureus</i> 2386 .....	34
<b>Figura 3.2A.</b> Comprobación por PCR de la transformación de <i>S. aureus</i> 2386 con pERh1b.....	35
<b>Figura 3.2B.</b> Comprobación por PCR de la delección del gen <i>h1b</i> en <i>S. aureus</i> 2386 .....	35
<b>Figura 3.3.</b> Actividad hemolítica y reacción de CAMP en agar Columbia con un 5% de sangre de cordero .....	36
<b>Figura 3.4.</b> Comprobación por PCR de la delección de los genes <i>katA</i> y <i>h1b</i> en <i>S. aureus</i> 2386 .....	37
<b>Figura 3.5.</b> Comprobación por PCR de la complementación de los mutantes $\Delta katA$ , $\Delta h1b$ y $\Delta katA \Delta h1b$ de <i>S. aureus</i> 2386 con los plásmidos pHkat, pHh1b y pHkath1b, respectivamente .....	38
<b>Figura 3.6.</b> Curvas de crecimiento bacteriano de <i>S. aureus</i> 2386 y sus mutantes $\Delta katA$ , $\Delta h1b$ y $\Delta katA \Delta h1b$ .....	39
<b>Figura 3.7.</b> Supervivencia intracelular de <i>S. aureus</i> 2386, su mutante $\Delta katA$ y dicho mutante complementado en la línea celular J774A.1 .....	43
<b>Figura 3.8.</b> Supervivencia intracelular de <i>S. aureus</i> 2386, su mutante $\Delta h1b$ y dicho mutante complementado en la línea celular J774A.1 .....	45
<b>Figura 3.9.</b> Supervivencia intracelular de <i>S. aureus</i> 2386, su mutante $\Delta katA \Delta h1b$ y dicho mutante complementado en la línea celular J774A.1 .....	47
<b>Figura 3.10.</b> Supervivencia intracelular de <i>S. aureus</i> 2386, su mutante $\Delta katA$ y dicho mutante complementado en la línea celular MAC-T .....	51
<b>Figura 3.11.</b> Supervivencia intracelular de <i>S. aureus</i> 2386, su mutante $\Delta h1b$ y dicho mutante complementado en la línea celular MAC-T .....	53
<b>Figura 3.12.</b> Supervivencia intracelular de <i>S. aureus</i> 2386, su mutante $\Delta katA \Delta h1b$ y dicho mutante complementado en la línea celular MAC-T .....	55
<b>Figura 3.13.</b> DL <sub>50</sub> de <i>S. aureus</i> 2386, su mutante $\Delta katA$ y dicho mutante complementado en un modelo murino.....	58
<b>Figura 3.14.</b> DL <sub>50</sub> de <i>S. aureus</i> 2386, su mutante $\Delta h1b$ y dicho mutante complementado en un modelo murino .....	60
<b>Figura 3.15.</b> DL <sub>50</sub> de <i>S. aureus</i> 2386, su mutante $\Delta katA \Delta h1b$ y dicho mutante complementado en un modelo murino.....	62
<b>Figura 4.1.</b> Construcción de los plásmidos termosensibles pERkat y pERh1b.....	71
<b>Figura 4.2.</b> Construcción de los plásmidos de complementación pHkat, pHh1b y pHkath1b .....	73
<b>Figura 4.3.</b> Delección de un gen mediante mutagénesis por recombinación homóloga.....	79

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Factores asociados con la virulencia de <i>S. aureus</i> .....	6
<b>Tabla 4.1.</b> Cepas bacterianas empleadas en este estudio.....	69
<b>Tabla 4.2.</b> Plásmidos utilizados en este estudio .....	70
<b>Tabla 4.3.</b> Oligonucleótidos empleados para la amplificación de ADN.....	74

## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AIP</b>	Péptido señal autoinducible
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BHI</b>	Infusión de cerebro y corazón
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CAMP</b>	Test de Christie, Atkins y Muench-Petersen
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis Letal 50
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DS</b>	Desviación estándar
<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diamino-tetraacético
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>IIM</b>	Infecciones intramamarias
<b>J774A.1</b>	Línea celular de macrófagos de origen murino
<b>kb</b>	Kilobases
<b>MAC-T</b>	Línea celular epitelial mamaria bovina
<b>MDBK</b>	Línea celular epitelial renal bovina
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>PAB</b>	<i>Bacto Penassay Broth</i>
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEG</b>	Polietilen glicol
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares neutrófilos
<b>SCVs</b>	<i>Small colony variants</i>
<b>SM</b>	Esfingomiélin
<b>SMasa</b>	Esfingomiélinasa
<b>SmcL</b>	Esfingomiélinasa C de <i>Listeria ivanovii</i>
<b>SMM</b>	Solución tampón de sacarosa
<b>SMMP</b>	Medio hipertónico (SMM 2x: PAB 4x)
<b>TSST-1</b>	Toxina del síndrome del choque tóxico 1
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonia

## 1. INTRODUCCIÓN

---

---



*S. aureus* es un microorganismo ubicuo, que de forma natural se halla en la piel y las membranas mucosas de los mamíferos y las aves. En ocasiones actúa como agente etiológico de procesos patológicos tanto en el hombre como en los animales domésticos. Esto se debe a que posee un gran número de potenciales factores de patogenicidad que le permiten colonizar y sobrevivir en una amplia variedad de tejidos (Dinges *et al.*, 2000; Kerro Deogo *et al.*, 2002).

En el hombre *S. aureus*, además de producir infecciones localizadas en la piel y las mucosas, puede invadir tejidos y órganos diversos originando procesos graves, como neumonía, osteomielitis, endocarditis, artritis, pleuritis y meningitis. Esta bacteria es una de las causas más frecuentes y graves de infecciones nosocomiales, siendo especialmente importantes las estirpes que presentan multirresistencias a los antibióticos, sobre todo a la meticilina y a la vancomicina, ya que constituyen un grave problema de Salud Pública. A esta variedad de patologías hay que añadir las debidas específicamente a la producción de determinadas toxinas, como son las intoxicaciones alimentarias, el síndrome del choque tóxico y el síndrome estafilocócico de la piel escaldada (Alexander y Hudson, 2001).

En medicina veterinaria *S. aureus* destaca por su implicación en las infecciones intramamarias (IIM) de hembras en lactación, que ocasionan importantes pérdidas económicas (Sutra y Poutrel, 1994). En el ganado ovino y caprino es responsable de la mamitis gangrenosa aguda, caracterizada por una rápida multiplicación de la bacteria que ocasiona la necrosis generalizada del cuarterón. En el ganado bovino, sin embargo, la infección mamaria suele progresar hacia formas crónicas o subclínicas. En el ganado ovino y caprino es responsable, además, de alteraciones cutáneas como la dermatitis y la foliculitis estafilocócicas.



## 1.1. PATOGENIA DE LAS INFECCIONES POR *S. aureus*.

El primer paso para el establecimiento de la infección estafilocócica consiste en la adhesión de la bacteria a las células y tejidos del hospedador para llevar a cabo la colonización. El foco primario de infección suele desarrollarse en heridas presentes en la piel o las mucosas del hospedador, desde donde *S. aureus* puede diseminarse al torrente sanguíneo y, en consecuencia, a otros tejidos y órganos. En el caso de las infecciones intramamarias de rumiantes, la entrada de *S. aureus* a la glándula mamaria se produce a través del canal del pezón, principalmente durante el ordeño, siendo los cuarterones infectados y las lesiones en la piel de las ubres y los pezones los principales reservorios de *S. aureus* en estos procesos (Sutra y Poutrel, 1994).

Tras haberse producido la colonización inicial, *S. aureus* posee diversas herramientas que le permiten evadir la respuesta del sistema inmune del hospedador y favorecen el avance de la infección por el organismo (Foster y Bohach, 2000). Finalmente *S. aureus* produce un grave daño tisular, favoreciendo su adherencia a nuevos tejidos y, en consecuencia, su diseminación (Kerro Dego *et al.*, 2002). Las infecciones por *S. aureus* se caracterizan, además, por la formación de abscesos con una infiltración masiva de PMN que liberan una gran cantidad de enzimas lisosómicas al medio extracelular, contribuyendo con ello al daño tisular (Boulanger *et al.*, 2002).

Aunque *S. aureus* ha sido tradicionalmente considerado como un patógeno extracelular, diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que es capaz de adherirse y ser internalizado por una gran variedad de tipos celulares, pudiendo sobrevivir y, en ocasiones, multiplicarse en el interior de células epiteliales (Almeida *et al.*, 1996; Bayles *et al.*, 1998; Kahl *et al.*, 2000; Brouillette *et al.*, 2003; Hess *et al.*, 2003), endoteliales (Hamill *et al.*, 1986; Yao *et al.*, 1995; Menzies y Kourteva, 1998), fibroblastos (Fowler *et al.*, 2000), osteoblastos (Hudson *et al.*, 1995; Ahmed *et al.*, 2001) e, incluso, células fagocíticas (Gresham *et al.*, 2000; Hébert *et al.*, 2000; Brouillette *et al.*, 2003).

El mecanismo que utiliza *S. aureus* para adherirse a las células consiste en la formación de un puente de fibronectina entre las proteínas de unión a la fibronectina de la bacteria y las integrinas  $\alpha 5\beta 1$  de la célula eucariota (Dziewanowska *et al.*, 1999; Peacock *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999; Dziewanowska *et al.*, 2000; Fowler *et al.*, 2000; Massey *et al.*, 2001). Tras la adhesión se desencadenan una serie de señales intracelulares que dan lugar a la polimerización de los microfilamentos de actina de la célula en el punto de contacto con la bacteria, de manera que *S. aureus* es rodeado por pseudópodos e internalizado en un compartimento aislado denominado endosoma (Almeida *et al.*, 1996; Bayles *et al.*, 1998; Jevon *et al.*, 1999). Recientemente se ha observado que las proteínas tirosín-quinasa Src participan en las vías de transducción de señales intracelulares responsables de la internalización de *S. aureus* (Agerer *et al.*, 2003; Fowler *et al.*, 2003).

Diversos autores han descrito que después de la internalización, *S. aureus* escapa del endosoma y se multiplica en el citoplasma de la célula (Bayles *et al.*, 1998; Wesson *et al.*, 1998; Qazi *et al.*, 2001). Se ha observado que la expresión de Agr, un regulador global que activa la producción de hemolisinas entre otras toxinas, es necesaria para que se produzca la ruptura del endosoma y *S. aureus* pueda escapar al citoplasma celular (Qazi *et al.*, 2001; Shompole *et al.*, 2003).

Asimismo, se ha visto que *S. aureus* es capaz de inducir la apoptosis de las células invadidas (Bayles *et al.*, 1998; Menzies y Kourteva, 1998; Wesson *et al.*, 1998; Kahl *et al.*, 2000; Wesson *et al.*, 2000). Hasta el momento no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales *S. aureus* produce la apoptosis de la célula pero se ha demostrado que están controlados por los reguladores globales Agr y SarA (Wesson *et al.*, 1998). La  $\alpha$ -toxina parece jugar un papel importante, puesto que mutantes que no producen esta toxina son menos eficaces a la hora de producir apoptosis (Menzies y Kourteva, 2000). Asimismo se ha descrito que la internalización de *S. aureus* provoca la activación de las caspasas 3 y 8 de la célula, dos componentes clave de la principal cascada proteolítica que da lugar a apoptosis (Wesson *et al.*, 2000).

## 1.2. FACTORES ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA DE *S. aureus*.

La patogenicidad de *S. aureus* se considera un proceso complejo y multifactorial, resultado de la acción combinada de más de 50 factores de virulencia que son expresados coordinadamente durante las diferentes fases de la infección (colonización, evasión de las defensas del hospedador, multiplicación, diseminación bacteriana).

Estos factores se han dividido clásicamente en dos grandes grupos: componentes superficiales y toxinas y enzimas extracelulares (véase tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Factores asociados con la virulencia de *S. aureus*

---

### ➤ Componentes superficiales

- Polisacárido capsular
- Polisacárido extracelular
- Proteínas superficiales
  - Proteínas de unión a colágeno (Cna)
  - Proteínas de unión a fibronectina (FnBPA y FnBPB)
  - Proteínas de unión a fibrinógeno (ClfA y ClfB)
  - Proteína A (Spa)

### ➤ Toxinas y enzimas extracelulares

- Toxinas con actividad sobre membranas
    - Toxinas o hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$
    - Leucocidina
  - Toxinas con actividad de superantígenos
    - Enterotoxinas (A-E y G-J)
    - Toxina del síndrome del choque tóxico 1 (TSST-1)
    - Toxinas epidermolíticas o exfoliativas (A y B)
  - Enzimas extracelulares
    - Estafiloquinasa
    - Coagulasa
    - Hialuronidasa
    - Lipasas
    - Proteasas
    - ADNasa termoestable o termonucleasa
    - Catalasa
- 

Otros autores, sin embargo, basándose en su actividad biológica, han propuesto la división de los factores de virulencia de *S. aureus* en tres categorías funcionales (Kerro Deogo *et al.*, 2002):

- Factores que median la adhesión de la bacteria a la célula hospedadora.
- Factores que promueven el daño y la diseminación tisular.
- Factores que protegen a la bacteria del sistema inmune del hospedador.

Para detallar el papel que desempeñan estos factores en la patogénesis de *S. aureus* utilizaremos la clasificación clásica, puesto que algunos factores pueden ser englobados en varias categorías funcionales.

### 1.2.1. Componentes superficiales.

Dentro de este grupo se incluyen el polisacárido capsular, el polisacárido extracelular y las proteínas superficiales.

#### 1.2.1.1. Polisacárido capsular.

En *S. aureus* se han descrito 11 serotipos de polisacárido capsular (PC) (tipos 1 al 11), siendo el PC5 y el PC8 los más frecuentes (70%) dentro de las cepas humanas y de rumiantes (Baselga *et al.*, 1994). El polisacárido capsular forma generalmente una microcápsula, que también se conoce como *slime*. Su papel en la patogénesis no está del todo claro, parece ser que podría participar en la evasión del sistema inmune aumentando la resistencia de las bacterias a la fagocitosis (Thakker *et al.*, 1998; Luong y Lee, 2002), así como en la adherencia de *S. aureus* a los tejidos del hospedador (Aguilar *et al.*, 2001).

#### 1.2.1.2. Polisacárido extracelular.

*S. aureus* expresa también un polisacárido extracelular poli-*N*-succinil- $\beta$ -1-6-glucosamina denominado PIA/PNSG (McKenney *et al.*, 1999), responsable de la formación de películas bacterianas o *biofilms* (colonias adherentes rodeadas por una gran matriz de polisacárido) junto con la proteína Bap (proteína asociada a *biofilm*) (Cucarella *et al.*, 2001). La proteína Bap promueve tanto la unión a superficies inertes como la adhesión intercelular, mientras que PIA/PNSG parece estar implicado únicamente en la adhesión intercelular (Cucarella *et al.*, 2002). Muchas infecciones crónicas están asociadas

con estirpes productoras de *biofilms*, debido a que son muy difíciles de eliminar por fagocitosis y no responden bien al tratamiento antibiótico (Costerton *et al.*, 1999; Cucarella *et al.*, 2004).

### 1.2.1.3. Proteínas superficiales.

El primer paso en el establecimiento de la infección consiste en la adherencia a los tejidos del hospedador. *S. aureus* utiliza diferentes proteínas superficiales que están ancladas en la pared celular bacteriana para adherirse a varios componentes de la matriz extracelular. En este grupo se engloban las proteínas de unión al colágeno (Cna), a la fibronectina (FnBPA y FnBPB) y al fibrinógeno (ClfA y ClfB), así como la proteína A. Estas proteínas en conjunto se denominan MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) (Foster y Höök, 1998).

La proteína A (Spa) es un componente de superficie de la mayoría de las cepas virulentas de *S. aureus* y está presente en el 50-60% de las cepas aisladas de IIM bovinas (Sutra y Poutrel, 1994). Aunque no se conoce con certeza su papel en la patogénesis, se ha sugerido que altera la respuesta inmune del hospedador mediante la disminución de la opsonización y la fagocitosis porque es capaz de unirse a la fracción Fc de las IgG impidiendo la unión de la bacteria a los receptores específicos de las células del sistema inmune (Gemmell *et al.*, 1990). Además, recientemente se ha demostrado que la proteína A puede actuar como un factor de colonización ya que se adhiere al factor von Willebrand, una proteína importante en el proceso de hemostasis (Hartleib *et al.*, 2000).

En las infecciones por *S. aureus* son las proteínas de unión a la fibronectina y al colágeno, principalmente, las que permiten la adherencia de la bacteria a microlesiones del epitelio, donde quedan expuestos la lámina basal y el tejido conjuntivo ricos en fibronectina y colágeno (Sutra y Poutrel, 1994). Las proteínas de unión a fibronectina están implicadas, además, en la adherencia de *S. aureus* a las células del hospedador y su posterior

internalización (Dziewanowska *et al.*, 2000; Fowler *et al.*, 2000; Massey *et al.*, 2001).

### 1.2.2. Toxinas y enzimas extracelulares.

*S. aureus* puede producir una amplia gama de toxinas y enzimas extracelulares (Dinges *et al.*, 2000; Foster y Bohach, 2000), que contribuyen a su capacidad para colonizar y producir enfermedad en el hombre y los animales. Las exotoxinas producidas por *S. aureus* pueden dividirse en dos grupos: toxinas con actividad sobre membranas y toxinas con actividad de superantígenos.

#### 1.2.2.1. Toxinas con actividad sobre membranas.

Dentro de este grupo se incluyen las toxinas o hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  y la leucocidina. La  $\beta$ -toxina se trata detalladamente más adelante, en el apartado 1.5.1.

La  $\alpha$ -toxina es citotóxica para una amplia gama de células, entre las que se incluyen eritrocitos, células mononucleares del sistema inmune, células epiteliales, células endoteliales y plaquetas (Bhakdi y Tranum-Jensen, 1991; Bhakdi *et al.*, 1996). Esta toxina ejerce su acción citolítica formando poros en las membranas, alterando de esta forma la osmorregulación, el flujo de cationes y otras moléculas, llegando, incluso, a producir apoptosis (Jonas *et al.*, 1994; Menzies y Kourteva, 2000; Bantel *et al.*, 2001). Se ha observado que la  $\alpha$ -toxina es el principal factor responsable del daño tisular en varios modelos biológicos: mamitis en ratón (Bramley *et al.*, 1989), queratitis en conejo (O'Callaghan *et al.*, 1997; Dajcs *et al.*, 2002) y artritis séptica en ratón (Nilsson *et al.*, 1999). Por su actividad membranolítica, la  $\alpha$ -toxina podría estar implicada, además, en la ruptura del endosoma que engloba a la bacteria tras su internalización en la célula, permitiendo su liberación al citoplasma celular. La mayoría de las cepas de *S. aureus* de origen humano y un 20-50% de las cepas procedentes de IIM en ganado bovino producen esta toxina (Sutra y Poutrel, 1994).

La  $\delta$ -toxina es un polipéptido pequeño (26 aminoácidos) capaz de causar daños en la membrana de una amplia variedad de células (Dinges *et al.*, 2000). Se ha sugerido que la lisis causada por esta toxina es debida a la formación de canales en la membrana (Mellor *et al.*, 1988). La  $\delta$ -toxina es producida por el 97% de las cepas de *S. aureus*, pero su papel en la patogénesis no se conoce aún con exactitud. Esta toxina está codificada en el extremo 5' de RNAlII, la molécula efectora del sistema regulador Agr (Johansson y Cossart, 2003) y se ha insinuado que podría actuar como un péptido señal (Dinges *et al.*, 2000).

Los últimos miembros de este grupo son la  $\gamma$ -toxina y la leucocidina. Son citolisinas que por su estructura se incluyen en una misma familia de proteínas (leucotoxinas) ya que están compuestas por dos cadenas polipeptídicas denominadas S y F que actúan sinérgicamente para dañar las membranas de las células mediante la formación de poros (Foster y Bohach, 2000). La  $\gamma$ -toxina está presente en casi la totalidad de las cepas de *S. aureus*, ejerce su acción principalmente sobre los eritrocitos y, en menor medida, sobre neutrófilos y macrófagos (Foster y Bohach, 2000). Se ha visto que actúa como factor de virulencia en un modelo murino de artritis séptica, aunque sólo en combinación con la  $\alpha$ -toxina (Nilsson *et al.*, 1999), y en un modelo de queratitis en conejo (Dajcs *et al.*, 2002). La leucocidina, por el contrario, es sintetizada por un pequeño porcentaje de cepas y su acción se centra sobre las membranas de neutrófilos y macrófagos (Foster y Bohach, 2000). La expresión de esta toxina se ha relacionado con el desarrollo de infecciones cutáneas graves en el hombre (Cribier *et al.*, 1992). Existen otros miembros menos conocidos en la familia de las leucotoxinas, como es el caso de LukE-LukD, que se asocia con diarreas debidas a tratamientos antibióticos (Gravet *et al.*, 1998), y LukM-LukF<sup>2</sup>-PV, que es producida por cepas aisladas de mastitis bovinas (Kaneko *et al.*, 1997; Rainard *et al.*, 2003).

#### **1.2.2.2. Toxinas con actividad de superantígenos.**

Este grupo está formado por la familia de toxinas pirogénicas (PTSAGs), compuesta por las enterotoxinas (tipos A-E y G-J) y la toxina del

síndrome del choque tóxico 1 (TSST-1), y las toxinas exfoliativas (tipos A y B). Los superantígenos no son procesados por las células presentadoras de antígenos, sino que se unen a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) produciendo una estimulación masiva (proliferación policlonal) de linfocitos T y la liberación de citoquinas (Foster y Bohach, 2000). Esta modulación de la respuesta inmune puede contribuir a la evasión de las defensas del hospedador y a la persistencia bacteriana (Ferens y Bohach, 2000).

Las toxinas pirogénicas se caracterizan por producir fiebre, hipertensión, inmunosupresión y aumento de la sensibilidad al shock endotóxico. Las enterotoxinas estafilocócicas son una causa frecuente de intoxicación alimentaria en el hombre y también pueden producir el síndrome del choque tóxico, aunque este síndrome se debe principalmente a la acción de la TSST-1 (Foster y Bohach, 2000). En medicina veterinaria no se ha descrito ninguna enfermedad causada específicamente por estas toxinas, pero si se ha comprobado que pueden favorecer la inmunosupresión (Ferens y Bohach, 2000). Un 20% de las cepas aisladas de mamitis bovinas expresan conjuntamente la enterotoxina tipo C (SEC) y la TSST-1, cuyos genes se encuentran situados en la isla de patogenicidad SaPIBov (Fitzgerald *et al.*, 2001).

Las toxinas epidermolíticas o exfoliativas están implicadas en el síndrome estafilocócico de la piel escaldada (Bailey *et al.*, 1995). Aunque estas toxinas pertenecen al grupo de los superantígenos, su capacidad para estimular la proliferación de linfocitos T es aproximadamente 100 veces menor que la de las toxinas pirogénicas (Monday *et al.*, 1999). La producción de estas toxinas por cepas de *S. aureus* aisladas de IIM bovinas es poco frecuente (Akineden *et al.*, 2001; Larsen *et al.*, 2002).

### **1.2.2.3. Enzimas extracelulares.**

Entre las enzimas extracelulares destaca la estafiloquinasa. Esta enzima es un activador del plasminógeno y produce la descomposición de las mallas de



fibrina (Kuusela y Saksela, 1990; Christner y Boyle, 1996), con lo que aumenta el potencial invasivo de la bacteria (Lottenberg *et al.*, 1994). Recientemente se ha descrito que la estafiloquinasa es capaz de inducir la secreción de defensinas por los neutrófilos, unirse a ellas y neutralizar su efecto bactericida, contribuyendo a la protección de *S. aureus* frente a las defensas del hospedador (Jin *et al.*, 2004).

El papel concreto jugado en la patogénesis por otras enzimas extracelulares como la coagulasa, la hialuronidasa, las lipasas, las proteasas o la ADNasa no se conoce con exactitud, pero se considera que contribuyen a la capacidad invasiva de *S. aureus* y que podrían estar implicadas en la captación de nutrientes. Asimismo, se ha sugerido que las proteasas podrían participar en la regulación de la virulencia de *S. aureus* degradando las toxinas producidas por la bacteria cuando estas ya no son necesarias (Lindsay y Foster, 1999), así como en el procesamiento de las enzimas secretadas por *S. aureus* (Shaw *et al.*, 2004). La catalasa también pertenece a este grupo y será descrita posteriormente en el apartado 1.4.1.

### **1.2.3. Regulación genética de los factores de virulencia.**

La expresión coordinada de los factores de virulencia de *S. aureus* en respuesta a diversas señales medioambientales durante la infección (por ejemplo, expresión de adhesinas al principio, durante la colonización, y producción de toxinas más tarde para facilitar la diseminación tisular) se debe a la existencia de varios reguladores globales que pueden actuar de forma independiente o interactuar entre sí formando una compleja red de regulación.

Hasta el momento se han descrito dos grandes familias de reguladores globales en *S. aureus*: los sistemas reguladores de dos componentes (TCRS), de los cuales el más conocido es el sistema Agr, y la familia de proteínas homólogas a SarA (Arvidson y Tegmark, 2001; Novick, 2003; Cheung *et al.*, 2004).

### 1.2.3.1. El sistema regulador Agr y otros sistemas reguladores de dos componentes.

Los sistemas reguladores de dos componentes permiten a la bacteria detectar y responder a condiciones medioambientales incluso cuando los estímulos no penetran en el citoplasma. Estos sistemas constan de un sensor de membrana (histidín quinasa) y de un regulador de respuesta citoplásmico. En respuesta a una señal apropiada, se produce la autofosforilación de un residuo de histidina en el dominio citoplásmico del sensor y, a continuación, el grupo fosfato es transferido a un residuo de aspartato en el regulador de respuesta, que, al activarse, estimula o reprime la transcripción de sus genes diana, que elaboran una respuesta adecuada a la señal recibida (Yarwood *et al.*, 2001).

El sistema regulador Agr consta de un locus con dos unidades transcripcionales divergentes, RNAII y RNAIII, que están bajo el control de los promotores P2 y P3, respectivamente (véase figura 1.1) (Novick, 2003; Yarwood y Schlievert, 2003; Cheung *et al.*, 2004). RNAII codifica cuatro proteínas, AgrB, D, C y A, de las cuales, AgrA y AgrC forman el sistema regulador de dos componentes, siendo AgrC el sensor y AgrA el regulador de respuesta. AgrB es una proteína transmembrana implicada en el procesamiento y la secreción de AgrD, dando lugar al péptido señal autoinducible (AIP) (Yarwood y Schlievert, 2003). El sistema Agr es un regulador que responde a la densidad bacteriana (“*quorum sensing*”), de manera que, durante la fase postexponencial de crecimiento, cuando hay un gran número de bacterias, se alcanza una elevada concentración de AIP, éste se une al sensor AgrC, que se autofosforila y activa al regulador de respuesta AgrA, lo que da lugar a un incremento de la transcripción de RNAII y RNAIII (Yarwood y Schlievert, 2003; Cheung *et al.*, 2004). La molécula efectora de este sistema regulador es RNAIII, que actúa a nivel transcripcional inhibiendo la expresión de proteínas superficiales (proteína A, proteínas de unión a fibronectina, etc.) y activando la expresión de toxinas y enzimas extracelulares ( $\alpha$ -toxina,  $\beta$ -toxina, lipasas, proteasas, etc.), factores de virulencia relacionados con la adquisición de nutrientes, la supervivencia y la diseminación bacteriana. El mecanismo por el

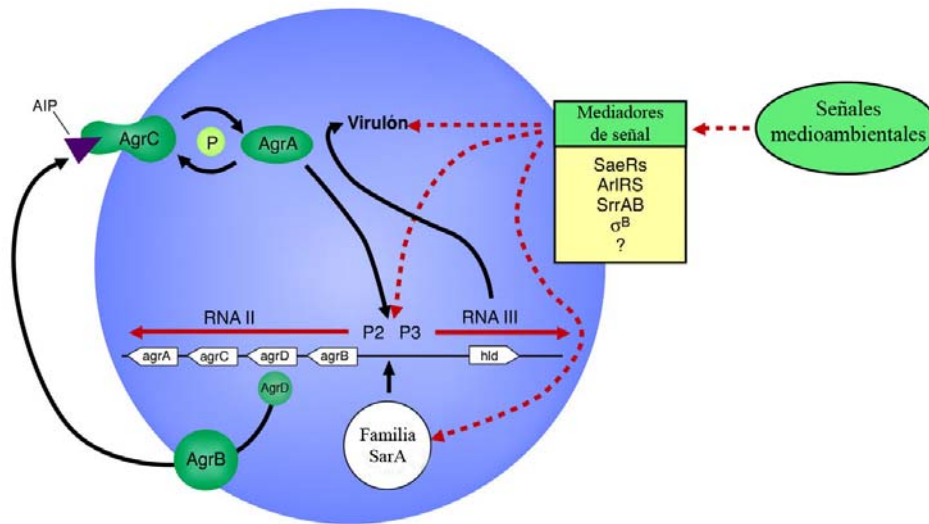
cual RNAIII regula la transcripción de estos genes es desconocido (Johansson y Cossart, 2003; Novick, 2003).

Otros sistemas reguladores de dos componentes descritos en *S. aureus* son SaeRS, ArlRS y SrrAB/SrhSR (Novick, 2003). Estos reguladores parecen actuar como mediadores entre las señales medioambientales (concentraciones de sal, glucosa, antibióticos, pH, niveles de oxígeno) y los reguladores globales Agr y SarA (Novick, 2003)

### 1.2.3.2. SarA y otras proteínas homólogas.

Estas proteínas son reguladores transcripcionales que actúan uniéndose a una secuencia consenso situada próxima al promotor de sus genes diana. El locus *sarA* se transcribe desde tres promotores, *sarP1*, *sarP2* y *sarP3*, que se activan en momentos distintos; los dos primeros se activan al comienzo

**Figura 1.1.** Esquema del sistema regulador Agr de *S. aureus*.



**Figura 1.1.** Esquema del sistema regulador Agr de *S. aureus*. El operón P2, a través de RNAII, codifica las proteínas AgrB, D, C y A. AgrA y AgrC constituyen el sistema regulador de dos componentes, siendo AgrC el sensor y AgrA el regulador de respuesta. AgrB es una proteína transmembrana implicada en el procesamiento y secreción de AgrD para dar lugar al péptido señal autoinducible (AIP). El operón P3 da lugar a RNAIII que actúa como la molécula efectora del locus *agr*. En la figura aparecen reflejados otros reguladores de *S. aureus*, así como los posibles caminos a través de los cuales intervienen en la regulación (líneas rojas discontinuas). Esta figura ha sido modificada de Yarwood y Schlievert (2003).

de la fase exponencial de crecimiento y el último durante la fase postexponencial por acción del factor  $\sigma^B$  en respuesta a estímulos medioambientales (Arvidson y Tegmark, 2001; Novick, 2003). La proteína SarA es requerida para activar la transcripción del locus *agr*, uniéndose para ello a una secuencia consenso situada entre los promotores P2 y P3 (Novick, 2003). Se ha descrito que SarA promueve la síntesis de las proteínas de unión a fibrinógeno y fibronectina,  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\delta$ -toxinas y *biofilm*, mientras que reprime la de las proteínas de unión a colágeno, proteína A y proteasas uniéndose directamente a los promotores de los genes diana, o indirectamente, por su efecto sobre otros reguladores (Novick, 2003; Cheung *et al.*, 2004).

Hasta la fecha se han descrito varias proteínas homólogas a SarA, entre las que destacan SarR, SarS, SarT, SarU, Rot y MgrA (Cheung *et al.*, 2004). Además de sus efectos directos sobre la transcripción de los factores de virulencia, estas proteínas interactúan entre sí y con Agr y SarA, formando parte de la compleja red de regulación de *S. aureus* (Cheung *et al.*, 2004).

### 1.2.3.3. Regulación genética frente al estrés oxidativo.

Los organismos aeróbicos utilizan el O<sub>2</sub> para obtener energía durante su metabolismo, generando continuamente sustancias oxígeno reactivas, como el ión superóxido, el peróxido de hidrógeno o los radicales hidroxilo, que poseen un amplio espectro de biotoxicidad dirigido a ADN, ARN, proteínas y lípidos (Cabiscol *et al.*, 2000). Cuando la generación de estas sustancias excede la capacidad de defensa del organismo se habla de estrés oxidativo y puede deberse a la acción de diversos agentes medioambientales, como las radiaciones ionizantes o las radiaciones ultravioletas. Asimismo, las células fagocíticas, a través de la enzima NADPH oxidasa, utilizan el estrés oxidativo como una herramienta frente a la invasión de bacterias patógenas (Cabiscol *et al.*, 2000).

Los iones metálicos, como el hierro o el manganeso, juegan un papel clave en la defensa de las bacterias frente al estrés oxidativo, ya que actúan como cofactores para las enzimas antioxidantes que poseen (catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa) (Agranoff y Krishna, 1998). El manganeso,

además, presenta propiedades antioxidantes por sí solo (Agranoff y Krishna, 1998). Por otro lado, elevadas concentraciones de hierro pueden ser perjudiciales para las bacterias ya que reaccionan con el peróxido de hidrógeno dando lugar a radicales hidroxilo, que son más tóxicos (Cabiscol *et al.*, 2000).

La respuesta genética frente al estrés oxidativo se produce en todos los organismos aeróbicos, incluidas las bacterias. En *S. aureus* se han descrito, hasta el momento, cuatro reguladores transcripcionales, PerR, Fur, MntR y Zur, que responden a niveles de iones metálicos y controlan la expresión de genes necesarios para la resistencia al estrés oxidativo. PerR es un represor de la expresión de varias enzimas antioxidantes, entre las que se encuentran la catalasa y la alquil hidropéroxido reductasa, de proteínas responsables del almacenamiento de hierro y de Fur en respuesta a concentraciones elevadas de manganeso en el medio (Horsburgh *et al.*, 2001a). Su expresión es inhibida por altas concentraciones de hierro y peróxido de hidrógeno (Horsburgh *et al.*, 2001a). Fur reprime la transcripción de proteínas necesarias para la captación de hierro y activa la transcripción de catalasa en respuesta a niveles elevados de hierro (Horsburgh *et al.*, 2001b). MntR actúa como represor de la expresión de proteínas encargadas de la captación de manganeso cuando los niveles de este ion en el medio son altos (Horsburgh *et al.*, 2002). Se ha observado que mutantes en estos reguladores presentan una menor virulencia a la hora de desarrollar abscesos cutáneos en un modelo murino, lo que sugiere que la regulación de la resistencia al estrés oxidativo y de la homeostasis del hierro y el manganeso es importante para la patogenicidad de *S. aureus* (Horsburgh *et al.*, 2001a; Horsburgh *et al.*, 2001b; Horsburgh *et al.*, 2002). Por último, Zur controla la homeostasis del zinc mediante la represión de proteínas transportadoras de este metal pero no parece ser esencial para la virulencia (Lindsay y Foster, 2001).

### 1.3. DEFENSA INNATA DEL HOSPEDADOR: CÉLULAS FAGOCÍTICAS.

Las células fagocíticas tienen como objetivo principal defender al organismo frente a agresiones externas. Están englobadas en dos grandes sistemas: el sistema polimorfonuclear y el sistema mononuclear fagocitario. Dentro del sistema polimorfonuclear el tipo celular predominante es el neutrófilo (PMN), siendo su actividad fagocítica el principal mecanismo de defensa del hospedador en los momentos iniciales de la infección (Sordillo *et al.*, 1997). El sistema mononuclear fagocitario está integrado por los monocitos, que se encuentran en la sangre y la médula ósea, y por los macrófagos, que derivan de los anteriores y se localizan en los tejidos y órganos linfoides.

Ante una infección bacteriana, las células fagocíticas son atraídas por factores quimiotácticos al foco de la infección, donde se llevan a cabo los procesos de reconocimiento, ingestión y destrucción intracelular de las bacterias. La fase de reconocimiento es más eficaz si se produce previamente la opsonización de las bacterias por inmunoglobulinas (Sutra y Poutrel, 1994). La unión del inmunocomplejo al receptor de la célula fagocítica origina una serie de cambios fisiológicos y metabólicos encaminados hacia la destrucción bacteriana (Curnutte *et al.*, 1994). La membrana de la célula se invagina rodeando a la bacteria, que queda englobada en un compartimento intracelular aislado, denominado fagosoma, donde posteriormente se fusionan los gránulos citoplásmicos primarios o azurófilos vertiendo factores bactericidas y bacteriostáticos. Simultáneamente al englobamiento de la bacteria en el fagosoma se produce la activación del sistema NADPH oxidasa, cuya función consiste en la generación de compuestos oxidantes.

Los mecanismos que poseen las células fagocíticas para llevar a cabo su actividad antimicrobiana se han dividido tradicionalmente en dos tipos: el sistema citotóxico oxígeno-dependiente y el sistema citotóxico oxígeno-independiente (Haas y Goebel, 1992).

### 1.3.1. Sistema citotóxico oxígeno-dependiente.

Este sistema se conoce también con el nombre de estrés oxidativo y consiste en la producción de sustancias reactivas de oxígeno, como el ión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ) o el ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) (Cabiscol *et al.*, 2000). Dentro de este sistema la NADPH oxidasa ocupa un lugar clave. Esta enzima se activa al inicio de la fagocitosis y cataliza la reducción del oxígeno a ión superóxido, utilizando NADPH como donador de electrones, provocando la liberación de grandes cantidades de  $O_2^-$  al interior del fagosoma, que constituye el punto de origen para la producción del resto de compuestos oxidantes (Klebanoff, 1999).

Hasta ahora se había considerado que la actividad antimicrobiana de las células fagocíticas era llevada a cabo principalmente mediante la acción directa de estos compuestos oxidantes sobre el ADN, ARN, proteínas y lípidos de los microorganismos, sin embargo, estudios publicados recientemente muestran que la destrucción de los microorganismos se realizaría mayoritariamente a través de la actividad de las proteasas vertidas al fagosoma tras la fusión de los gránulos azurófilos y que los productos de la NADPH oxidasa actuarían de forma indirecta proporcionando las condiciones óptimas para la activación de estas proteasas en el interior de la vacuola fagocítica (Reeves *et al.*, 2002; Reeves *et al.*, 2003; Ahluwalia *et al.*, 2004). Así, estos autores han descrito que la actividad de las sustancias oxígeno reactivas en el interior de la vacuola fagocítica daría lugar a la despolarización de la membrana y a un aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$ , lo que provocaría la apertura de canales en la membrana de la vacuola a través de los cuales entraría  $K^+$ . Esta entrada de  $K^+$  originaría un aumento de pH en el interior de la vacuola necesario para que se desarrolle la actividad de las proteasas granulares.

### 1.3.2. Sistema citotóxico oxígeno-independiente.

Tras la formación del fagosoma se produce la fusión de los gránulos citoplásmicos secundarios o específicos a la membrana plasmática de la célula

secretando al exterior su contenido, integrado por lactoferrina y un conjunto de péptidos entre los que destacan las defensinas y catelicidinas (Gudmundsson y Agerberth, 1999). Estas últimas presentan una amplia actividad microbicida dirigida a bacterias, virus y hongos (Ramanathan *et al.*, 2002). Además, tanto las defensinas como las catelicidinas ejercen una actividad quimiotáctica atrayendo a neutrófilos, linfocitos, monocitos, células dendríticas y mastocitos (Chertov *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001), lo que sugiere que el contenido de estos gránulos no es sólo mediador de la respuesta inmune innata sino que también actuaría como puente hacia la inmunidad adquirida (Chertov *et al.*, 2000; Yamashiro *et al.*, 2001).

Después de la fusión de los gránulos citoplásmicos secundarios se produce la fusión de los gránulos citoplásmicos primarios o azurófilos con el fagosoma donde se vierten una gran cantidad de hidrolasas (hidrolasas ácidas, lisozima, proteasas neutras, desoxirribonucleasas, etc.), la mieloperoxidasa (MPO), en el caso de PMN y macrófagos, y la peroxidasa (EPO), en el caso de los eosinófilos (Hurst y Barrette, 1989).

### **1.3.3. Actividad antimicrobiana de las células no fagocíticas.**

A pesar de que existen muchos estudios acerca de la destrucción de los microorganismos por las células fagocíticas mediante los mecanismos dependientes e independientes de radicales libres, poco se conoce sobre las herramientas utilizadas por otros tipos celulares.

Recientemente, se ha descrito, que una gran variedad de células pueden producir compuestos oxidantes mediante un sistema NADPH oxidasa similar al de las células fagocíticas (Meier, 2001). Aunque estas células generan superóxido a niveles más bajos que los fagocitos, es posible que estos niveles sean suficientes para afectar a la supervivencia intracelular de las bacterias. En este sentido, se ha observado que la expresión de superóxido dismutasa por *Campylobacter jejuni* (Day *et al.*, 2000) y *Escherichia coli* (Battistoni *et al.*, 2004) incrementa su supervivencia en el interior de células epiteliales, lo que sugiere que las sustancias reactivas de oxígeno pueden estar implicadas en los



mecanismos bactericidas de este tipo celular. Esta hipótesis se ve apoyada, además, por el hecho de que estímulos fagocíticos inducen la liberación de superóxido por células epiteliales (Falzano *et al.*, 2001). En relación a las células endoteliales, se ha visto que los radicales libres, especialmente el peróxido de hidrógeno, juegan un papel importante en la actividad antimicrobiana de estas células frente a microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* (De Assis *et al.*, 2000) o *Rickettsia conorii* (Feng y Walker, 2000), pero no frente a *S. aureus*, donde debe estar mediada por mecanismos oxígeno independientes (Zhang, B. *et al.*, 1997).

A pesar de las investigaciones realizadas hasta la fecha, los mecanismos responsables de la actividad antimicrobiana que presentan las células no fagocíticas no están del todo claros, observándose diferencias tanto en función del tipo celular como del microorganismo estudiado.

#### 1.4. CATALASAS BACTERIANAS.

Las catalasas son un grupo de enzimas que se halla presente en todas las células eucariotas y procariotas que poseen un sistema de citocromos (Lemberg y Legge, 1949). Su función consiste en descomponer el peróxido de hidrógeno generado durante el metabolismo aeróbico en agua y oxígeno molecular.

En el interior del fagosoma de las células fagocíticas la concentración de  $H_2O_2$  puede llegar a ser 100 mM (Hurst y Barrette, 1989). Este hecho hace pensar que las catalasas bacterianas pueden tener un papel relevante en la protección de los microorganismos frente al metabolismo oxidativo de las células eucariotas.

En diversos estudios se ha comprobado que la capacidad que tienen algunos microorganismos de sobrevivir en el interior de células fagocíticas está influenciada por la catalasa. Es el caso de *Nocardia asteroides* (Beaman *et al.*, 1985), *Mycobacterium tuberculosis* (Manca *et al.*, 1999), *Candida albicans* (Wysong *et*

*al.*, 1998; Nakagawa *et al.*, 2003), *Campylobacter jejuni* (Day *et al.*, 2000), *Edwardsiella tarda* (Mathew *et al.*, 2001) y *Helicobacter pylori* (Basu *et al.*, 2004). En *C. jejuni* se ha visto que, aunque la catalasa es importante en la supervivencia de esta bacteria en el interior de macrófagos, no parece tener función protectora alguna para la supervivencia en células epiteliales, donde dicha función parece recaer sobre la superóxido dismutasa (Day *et al.*, 2000).

#### 1.4.1. Catalasa de *S. aureus*.

Las primeras evidencias experimentales que relacionaron la catalasa con la virulencia de *S. aureus* fueron aportadas por Mandell (1975). Este autor observó que existía una correlación entre la actividad catalasa de varias cepas de *S. aureus* y su letalidad para el ratón. Asimismo, al comparar la destrucción intracelular *in vitro*, en PMN de humanos, de una cepa virulenta de *S. aureus* y de una cepa que presentaba una actividad catalasa muy baja obtenida por selección con rifampicina, encontró que la cepa virulenta era más resistente, sugiriendo que la catalasa podría actuar en la patogénesis de *S. aureus* protegiendo a las bacterias de la toxicidad del peróxido de hidrógeno generado por los PMN.

Posteriormente, Kanafani y Martin (1985) compararon cepas de *S. aureus* virulentas (aisladas de procesos patológicos) y no virulentas (aisladas de boca y fosas nasales de individuos sanos) en un modelo murino y observaron que las virulentas presentaban unos niveles de actividad catalasa significativamente superiores a las no virulentas, lo que apoyaría la hipótesis de que la catalasa podría ser un factor de virulencia relevante en la patogénesis de *S. aureus*.

Nishihara *et al.* (1985) estudiaron la sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro*, la supervivencia intracelular en leucocitos y la virulencia en un modelo murino de un mutante de *S. aureus*, obtenido de forma espontánea en el laboratorio, que presentaba una actividad catalasa muy débil frente a su cepa parental y no encontraron una correlación entre el nivel de actividad catalasa y la resistencia a la acción bactericida de los leucocitos, a pesar de que el mutante presentaba

una menor virulencia, por lo que concluyeron que la catalasa no parecía ejercer un papel importante en la protección de *S. aureus* frente a los leucocitos.

Martin y Chaven (1987) analizaron la sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* de dos mutantes catalasa negativos de *S. aureus* obtenidos tras un tratamiento con dietil-sulfonato y comprobaron que la sensibilidad de los mutantes era mayor que la de su cepa parental, por lo que sugirieron que la catalasa era un factor esencial en la defensa de *S. aureus* frente al peróxido de hidrógeno.

Asimismo, Horsburgh *et al.* (2001a) observaron que un mutante catalasa negativo, obtenido por inactivación del gen mediante la inserción de un transposón, presentaba una mayor sensibilidad al peróxido de hidrógeno *in vitro* que su cepa parental pero, sin embargo, era igual de virulento a la hora de producir abscesos cutáneos en un modelo murino.

Finalmente, Messina *et al.* (2002) estudiaron la virulencia de cepas de *S. aureus* catalasa positivas y negativas obtenidas en aislamientos clínicos. Estos autores midieron la capacidad de supervivencia bacteriana en el hígado de ratones inoculados por vía intravenosa y no observaron diferencias entre las cepas estudiadas, por lo que concluyeron que la ausencia de actividad catalasa no disminuye por sí sola la virulencia de *S. aureus* en un modelo experimental.

En el hombre se han descrito alrededor de 40 casos de aislamientos clínicos de *S. aureus* catalasa negativos. La gran mayoría de estos aislados fueron responsables de infecciones en sujetos inmunocomprometidos y sólo unos pocos se aislaron de pacientes inmunocompetentes, lo que ha llevado a plantear que los aislados catalasa negativos podrían ser menos virulentos (Bertrand *et al.*, 2002; Watine *et al.*, 2003).

## 1.5. ESFINGOMIELINASAS BACTERIANAS.

Las esfingomielinasas (SMasas) bacterianas son fosfolipasas C con alta especificidad por la esfingomielina (SM) (Titball, 1993; Titball, 1998). Son

SMasas neutras, es decir, su actividad catalítica se desarrolla a pH neutro y en presencia de  $Mg^{2+}$ . Se caracterizan por ser toxinas extracelulares que dañan las membranas de los eritrocitos y otras células de mamíferos mediante la hidrólisis de la SM, siendo su actividad sobre los eritrocitos la responsable de su carácter hemolítico. La lisis celular que producen se correlaciona con el contenido de SM de la membrana, por ello, los eritrocitos de rumiantes, que tienen el porcentaje de SM más alto de todos los mamíferos (51% oveja, 46% vaca y cabra, 27% hombre, 13,5% caballo, 11% perro y 11-13% pequeños roedores), son los más sensibles. Producen una hemólisis típica, denominada “calor-frío”, que consiste en un halo de hemólisis incompleta tras la incubación a 37°C que se hace completa cuando los eritrocitos se enfrían por debajo de 10°C. (Coleman *et al.*, 1986). Además de por su actividad sobre las membranas celulares, las SMasas bacterianas podrían estar involucradas en la patogénesis al interferir en las vías de transducción de señales de la célula eucariota infectada, puesto que la hidrólisis de la SM da lugar a la liberación de ceramida, un importante mensajero secundario implicado en procesos tan relevantes como el crecimiento y la diferenciación celular, la respuesta inflamatoria a través de la síntesis de citoquinas y la muerte celular por apoptosis (Hannun y Obeid, 1995; Levade y Jaffrezou, 1999; Sawai y Hannun, 1999; Ohanian y Ohanian, 2001).

Se han descrito SMasas C en *Staphylococcus aureus* ( $\beta$ -toxina) (Coleman *et al.*, 1986; Projan *et al.*, 1989), *Staphylococcus intermedius* (Dziewanowska *et al.*, 1996), *Staphylococcus schleiferi* (Linehan *et al.*, 2003), *Bacillus cereus* (Johansen *et al.*, 1988; Yamada *et al.*, 1988), *Leptospira interrogans* (Segers *et al.*, 1990), *Listeria ivanovii* (SmcL) (González-Zorn *et al.*, 1999; González-Zorn *et al.*, 2000), *Helicobacter pylori* (Chan *et al.*, 2000) y en la cepa de *Pseudomonas* sp. TK4 (Sueyoshi *et al.*, 2002) pero poco se conoce sobre el papel que desempeñan en la patogénesis de estas bacterias. La SMasa de *B. cereus* ha sido ampliamente utilizada para intentar mimetizar los efectos biológicos de la activación de SMasas endógenas eucariotas en cultivos tisulares y se ha observado que es capaz de inducir la apoptosis de la célula al ser expresada en el interior celular (Zhang, P. *et al.*, 1997; Birbes *et al.*, 2001). En *L. ivanovii* se ha descrito que SmcL contribuye a la disrupción de la vacuola fagocítica y a la correspondiente liberación de la bacteria al citoplasma de la célula hospedadora promoviendo su

proliferación intracelular (González-Zorn *et al.*, 1999; González-Zorn *et al.*, 2000). Asimismo, se ha asociado la producción de esta SMasa durante la infección intracelular de *L. ivanovii* con una elevación de los niveles de ceramida en la célula hospedadora, lo que se correlaciona con un aumento de la muerte celular por apoptosis (González-Zorn, 2001).

### 1.5.1. $\beta$ -toxina de *S. aureus*.

La  $\beta$ -toxina o  $\beta$ -hemolisina de *S. aureus* es producida por la mayoría de las cepas aisladas de IIM bovinas (75-100%) mientras que las cepas humanas raramente la expresan (Matsunaga *et al.*, 1993; Aarestrup *et al.*, 1999; Larsen *et al.*, 2002). Estas evidencias epidemiológicas apoyarían la hipótesis de que la  $\beta$ -toxina podría jugar un papel importante en la patogénesis de las infecciones intramamarias de rumiantes por *S. aureus*, sin embargo, y a pesar de los estudios realizados hasta el momento, su participación en la patogénesis no ha sido demostrada concluyentemente.

Se han llevado a cabo diversos estudios con la toxina purificada que deben ser interpretados con cautela por la posible presencia de contaminantes, principalmente  $\alpha$ -toxina, en las preparaciones. En estos estudios se ha visto que la  $\beta$ -toxina induce cambios inflamatorios moderados (infiltración difusa de neutrófilos) en la glándula mamaria de ratón (Calvinho *et al.*, 1993) y conejo (Ward *et al.*, 1979) y es citotóxica para células epiteliales mamarias bovinas en cultivo, sumando su efecto al de la  $\alpha$ -toxina (Cifrian *et al.*, 1996). Ambas observaciones apuntan hacia la hipótesis de que la  $\beta$ -toxina es un importante factor de virulencia en la mastitis bovina. También se ha descrito que la  $\beta$ -toxina tiene una acción citotóxica selectiva sobre neutrófilos (Marshall *et al.*, 2000) y monocitos (Walev *et al.*, 1996), pero no sobre granulocitos o linfocitos (Walev *et al.*, 1996).

Los estudios genéticos, utilizando mutantes que no expresen la  $\beta$ -toxina, son escasos y poco concluyentes. Bramley *et al.* (1989), en un modelo de mamitis en ratón, observaron que un mutante que no expresaba la  $\beta$ -toxina,

por inserción del fago  $\phi 42E$  en el gen codificante (*hbb*), era menos virulento, se recuperaba de la glándula mamaria en mayor número que su cepa parental y, sorprendentemente, estimulaba el flujo de neutrófilos al lugar de infección en mayor medida que ésta.

Cifrian *et al.* (1996), a su vez, encontraron que mutantes  $\beta$ -toxina negativos, obtenidos por inserción de un gen de resistencia a gentamicina en el gen *hbb*, presentaban una menor adherencia en un cultivo primario de células epiteliales mamarias y una menor proliferación que su cepa parental y sugirieron que la  $\beta$ -toxina podía favorecer la colonización de la glándula mamaria bovina por *S. aureus*.

Utilizando modelos no mamarios, como un modelo murino de artritis séptica (Nilsson *et al.*, 1999) y un modelo de queratitis en conejo (O'Callaghan *et al.*, 1997; Dajcs *et al.*, 2002), no se han encontrado diferencias apreciables en la virulencia entre cepas parentales y mutantes  $\beta$ -toxina negativos obtenidos por inserción de un fago en el gen *hbb*, observándose, además, en el segundo modelo, que la  $\beta$ -toxina era responsable únicamente del edema escleral, lo que se correlaciona con el alto contenido en SM presente en las membranas de las células epiteliales esclerales.

Por otro lado, como hemos visto anteriormente, *S. aureus* es capaz de ser internalizado por una gran variedad de tipos celulares y se ha descrito que puede escapar del endosoma e inducir la apoptosis de la célula (Bayles *et al.*, 1998). La  $\beta$ -toxina podría estar implicada tanto en la ruptura del endosoma como en la apoptosis celular. En este sentido se ha observado que, tras la internalización de *S. aureus*, se produce la activación del sistema regulador Agr, que se correlaciona con un aumento en la expresión de  $\alpha$ -toxina y  $\beta$ -toxina, dando lugar a la permeabilización de la membrana endosomal y a la liberación de la bacteria al citoplasma de la célula (Shompole *et al.*, 2003). Posteriormente se produce un segundo pico de expresión de Agr que coincide con la máxima expresión de  $\alpha$ -toxina y  $\beta$ -toxina y origina un incremento en la permeabilidad de la membrana celular (Shompole *et al.*, 2003).



## 2. OBJETIVOS

---

---





*S. aureus* es una bacteria muy ubicua, habitante natural de la piel y mucosas de los mamíferos y las aves, y causante de diversas enfermedades en el hombre y los animales domésticos. En estos últimos, *S. aureus* está principalmente implicado en las IIM, que ocasionan importantísimas pérdidas económicas en la producción bovina, ovina y caprina (Sutra y Poutrel, 1994).

Debido al fracaso de los tratamientos antibióticos, desde hace muchos años el desarrollo de vacunas para controlar la infecciones intramamarias producidas por *S. aureus* en los rumiantes ha recibido una atención preferente y han sido muchos y muy variados los preparados vacunales ensayados: células vivas, bacterinas, toxoides, bacterinas-toxoides, paredes celulares aisladas, polisacáridos capsulares, etc. (Nordhaug *et al.*, 1994a; Nordhaug *et al.*, 1994b; McKenney *et al.*, 1999; Tollersrud *et al.*, 2001; Leitner *et al.*, 2003). La eficacia de la mayoría de las vacunas ensayadas, sin embargo, es bastante limitada en condiciones de campo (Leitner *et al.*, 2003), por lo que se hace necesario el desarrollo de nuevas vacunas y/o la mejora de las existentes de una forma racional, basándonos en el conocimiento de los mecanismos moleculares íntimos de interacción patógeno-hospedador.

A raíz de la descripción de *S. aureus* subsp. *anaerobius* (De la Fuente *et al.*, 1985), un estafilococo catalasa negativo causante de la enfermedad de los abscesos, nuestro grupo se planteó el objetivo, en el que se enmarca esta Tesis Doctoral, de investigar el posible papel que la catalasa, una enzima implicada en el metabolismo básico, puede jugar en la patogénesis tanto de *S. aureus* subsp. *anaerobius* como de *S. aureus* (Sanz *et al.*, 2000; Díez, 2002). En algunas bacterias, como *Mycobacterium tuberculosis* (Manca *et al.*, 1999), *Campylobacter jejuni* (Day *et al.*, 2000) y *Helicobacter pylori* (Basu *et al.*, 2004), se ha demostrado que la catalasa influye en su capacidad de supervivencia intracelular protegiéndolas frente al metabolismo oxidativo de las células eucariotas, sin embargo, en

*S. aureus* no se ha determinado con precisión hasta la fecha el posible papel que esta enzima pueda jugar en su patogénesis.

Por otro lado, la  $\beta$ -toxina, una toxina citolítica expresada por *S. aureus*, podría desempeñar un papel significativo durante el ciclo de vida intracelular de la bacteria, al igual que ocurre en *Listeria ivanovii*, donde se ha descrito que una esfingomielinasa, similar a la  $\beta$ -toxina, está implicada en la ruptura de la vacuola fagocítica y posterior liberación de la bacteria al citoplasma de la célula infectada y en la inducción de apoptosis celular a través de la liberación de ceramida (González-Zorn *et al.*, 1999; González-Zorn *et al.*, 2000; González-Zorn, 2001). No obstante, la posible contribución de la  $\beta$ -toxina a la patogénesis de *S. aureus* no se ha demostrado concluyentemente hasta la fecha.

Basándonos en estos hechos, en este trabajo nos planteamos investigar el posible papel de la catalasa y de la  $\beta$ -toxina, así como del efecto combinado de ambas, en la patogenicidad de *S. aureus* utilizando diversos modelos biológicos.

Llegar al objetivo final de esta Tesis pasaría por la consecución de los siguientes objetivos concretos:

- Construir mutantes simples por delección de los genes *katA* (catalasa negativo) y *blb* ( $\beta$ -toxina negativo) y un mutante doble por delección de ambos genes.
- Estudiar la capacidad de supervivencia de los mutantes  $\Delta katA$ ,  $\Delta blb$  y  $\Delta katA \Delta blb$  en comparación con la de su cepa parental en la línea celular de macrófagos murinos J774A.1 y en la línea celular epitelial mamaria bovina MAC-T.
- Investigar la virulencia de los mutantes  $\Delta katA$ ,  $\Delta blb$  y  $\Delta katA \Delta blb$  de *S. aureus* en comparación con la de su cepa parental en un modelo murino de infección experimental.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

---



### 3.1. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES POR DELECCIÓN DEL GEN *katA*, DEL GEN *blb* Y DE AMBOS EN *S. aureus*.

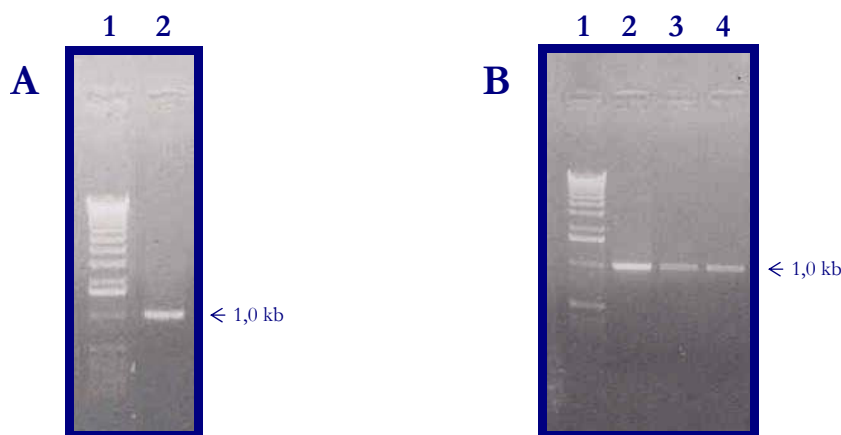
La investigación en el campo de la patogénesis bacteriana está encaminada al estudio de posibles factores de patogenicidad, determinando principalmente su papel durante el proceso infeccioso, sus mecanismos de actuación y cómo están regulados. La manipulación genética constituye una importante herramienta para este fin, ya que permite la obtención de mutantes en genes puntuales de una forma precisa mediante el uso de técnicas de recombinación de ADN o por inserción de un transposón. Tradicionalmente, se ha investigado el papel de los factores de virulencia en la patogenicidad de *S. aureus* comparando la virulencia de un mutante deficiente en un gen con la de su cepa parental, sin embargo, debido a que la patogenicidad de *S. aureus* es multifactorial y a que los potenciales factores de virulencia que produce son numerosos, los esfuerzos en los últimos años se han centrado en la identificación de determinantes cromosómicos que afecten a la expresión de estos factores de virulencia. De cualquier modo, en vista de la continua aparición de cepas multirresistentes a los antibióticos, el conocimiento de la patogénesis de *S. aureus* a nivel molecular es crucial en la lucha contra este patógeno, ya que puede ayudar en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

Con el fin de iniciar un estudio detallado de la posible contribución de la catalasa y la  $\beta$ -toxina a la patogénesis de *S. aureus* mediante una aproximación genética, el primer objetivo de este trabajo fue la construcción de mutantes simples por delección del gen de la catalasa y del gen de la  $\beta$ -toxina y de un mutante doble por delección de ambos genes en una cepa de *S. aureus* de origen bovino aislada de un caso de mastitis clínica, la 2386. Utilizando esta técnica genética nos asegurábamos de que la inactivación de los genes fuera estable, impidiendo la reversión al fenotipo salvaje, y de que no se produjeran

mutaciones secundarias para poder relacionar así las diferencias que pudieran aparecer en estudios posteriores con el gen estudiado.

### 3.1.1. Construcción del mutante $\Delta katA$ .

Para la obtención del mutante catalasa negativo se transformó *S. aureus* 2386 con el plásmido temperatura sensible pERkat (apartado 4.2.1) que vehicula la secuencia necesaria para llevar a cabo la delección del gen *katA* por recombinación homóloga, formada por dos fragmentos de aproximadamente 500 pb, que limitan el gen *katA*, unidos entre sí. La transformación se llevó a cabo mediante protoplastos, según se detalla en el apartado 4.7. Los transformantes se seleccionaron en medio sólido con eritromicina (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (resistencia conferida por el plásmido) y se comprobó que el plásmido portaba un fragmento de ADN del tamaño adecuado (1 kb) (figura 3.1A).



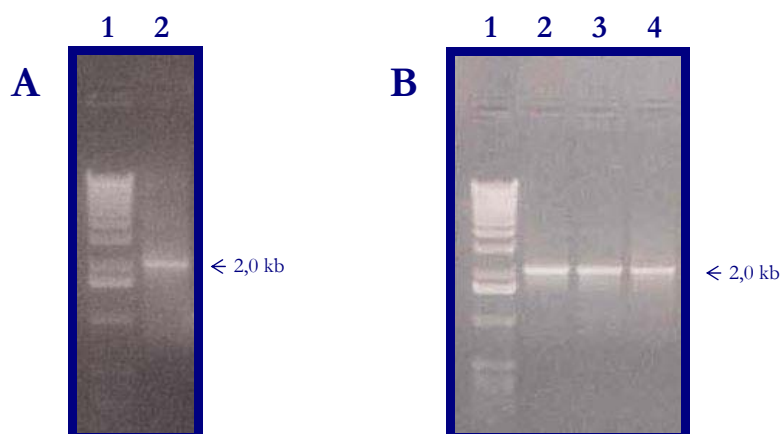
**Figura 3.1A.** Comprobación por PCR de la transformación de *S. aureus* 2386 con pERkat. **(1)** Marcador de peso molecular. **(2)** Fragmento con un tamaño aproximado de 1 kb correspondiente a la secuencia clonada en pERkat. Para esta reacción se usaron los oligonucleótidos KAT 1 y KAT 2 y plásmido extraído del transformante.

**Figura 3.1B.** Comprobación por PCR de la delección del gen *katA* en *S. aureus* 2386. Se amplifica un fragmento de aproximadamente 1 kb de tamaño, indicativo de la delección. El gen *katA* tiene un tamaño aproximado de 1,5 kb, en caso de no haberse producido la delección las bandas tendrían un tamaño de 2,5 kb. En esta reacción de amplificación se utilizaron los oligonucleótidos KAT 1 y KAT 2 y ADN extraído de los mutantes. **(1)** Marcador de peso molecular. **(2)**, **(3)** y **(4)** Clones de *S. aureus* 2386  $\Delta katA$ .

A continuación se indujo la mutagénesis por recombinación homóloga de uno de los transformantes según se describe en el apartado 4.8. Los mutantes se seleccionaron en medio sólido sin antibiótico por la ausencia de actividad catalasa al ser puestos en contacto con peróxido de hidrógeno al 3% y se comprobó mediante PCR que se había producido la delección del gen *katA* (figura 3.1B). El gen *katA* tiene un tamaño aproximado de 1,5 kb y la delección realizada es casi completa, conservando solamente 9 pb, ATGTCA en el extremo 5' y TAA en el extremo 3' del gen (véase figura 4.1).

### 3.1.2. Construcción del mutante *Δblb*.

Para conseguir el mutante β-toxina negativo se transformó *S. aureus* 2386 con el plásmido temperatura sensible pERh1b (apartado 4.2.1) en el que está clonada la secuencia apropiada para inducir la delección del gen *blb* mediante recombinación homóloga. Esta secuencia está formada por dos fragmentos de aproximadamente 1 kb, que limitan el gen *blb*, unidos entre sí.



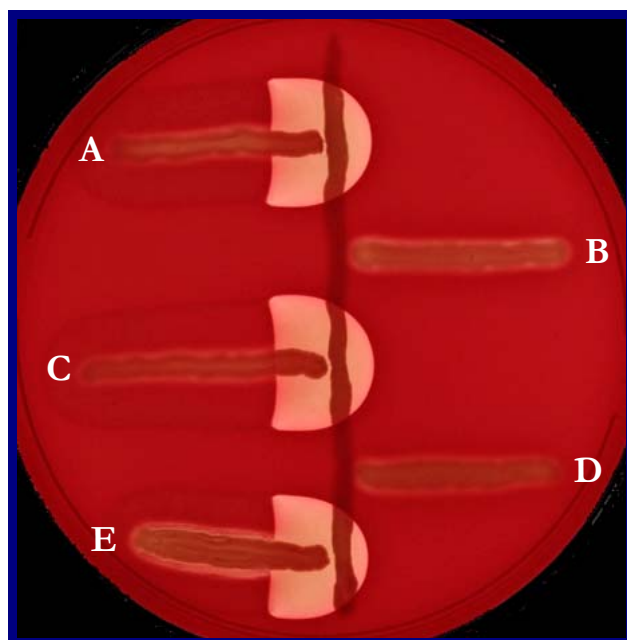
**Figura 3.2A.** Comprobación por PCR de la transformación de *S. aureus* 2386 con pERh1b. **(1)** Marcador de peso molecular. **(2)** Fragmento con un tamaño aproximado de 2 kb correspondiente a la secuencia clonada en pERh1b. Para esta reacción se usaron los oligonucleótidos HLB 1 y HLB 2 y plásmido extraído del transformante.

**Figura 3.2B.** Comprobación por PCR de la delección del gen *blb* en *S. aureus* 2386. Se amplifica un fragmento de aproximadamente 2 kb de tamaño, indicativo de la delección. El gen *blb* tiene un tamaño aproximado de 1 kb, en caso de no haberse producido la delección las bandas tendrían un tamaño de 3 kb. En esta reacción de amplificación se utilizaron los oligonucleótidos HLB 1 y HLB 2 y ADN extraído de los mutantes. **(1)** Marcador de peso molecular. **(2), (3)** y **(4)** Clones de *S. aureus* 2386 *Δblb*.



La transformación se realizó utilizando protoplastos según el método detallado en el apartado 4.7. Los transformantes se seleccionaron en medio sólido por presentar la resistencia a eritromicina conferida por el plásmido y se comprobó que éste contenía un fragmento de ADN del tamaño apropiado (figura 3.2A).

Posteriormente se provocó la mutagénesis por recombinación homóloga en uno de los transformantes utilizando las condiciones descritas en el apartado 4.8. Los mutantes se seleccionaron en agar Columbia con un 5% de sangre de cordero por carecer del amplio halo de hemólisis incompleta con que se manifiesta la actividad  $\beta$ -toxina. Asimismo, se observó la ausencia del característico efecto CAMP en forma de “pala” en presencia de *Rhodococcus equi* (figura 3.3) y que es consecuencia de la actividad esfingomielinasa de la  $\beta$ -toxina. Finalmente se comprobó mediante PCR que se había producido la delección del gen *hblb* (figura 3.2B). El gen *hblb* tiene un tamaño aproximado de 1 kb y la delección realizada es casi completa, conservando únicamente 12 pb,



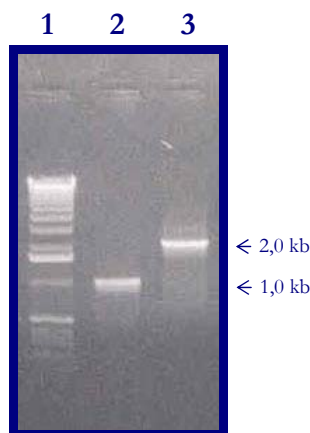
**Figura 3.3.** Actividad hemolítica y reacción de CAMP en agar Columbia con un 5% de sangre de cordero. Los mutantes  $\beta$ -toxina negativos carecen del halo de hemólisis incompleta y de la reacción de CAMP en forma de “pala” que presenta la cepa salvaje en presencia de *R. equi*. La complementación de los mutantes da lugar a la recuperación de estas características. **(A)** *S. aureus* 2386. **(B)** *S. aureus* 2386  $\Delta hblb$ . **(C)** *S. aureus* 2386  $\Delta hblb$  (pHhblb). **(D)** *S. aureus* 2386  $\Delta katA \Delta hblb$ . **(E)** *S. aureus* 2386  $\Delta katA \Delta hblb$  (pHkathblb).

ATGGTG en el extremo 5' y AAATAG en el extremo 3' del gen (véase figura 4.1).

### 3.1.3. Construcción del doble mutante $\Delta katA \Delta hlb$ .

Para la construcción de este doble mutante se partió de *S. aureus* 2386  $\Delta hlb$ , al que se transformó con el plásmido pERkat empleando la técnica de transformación por protoplastos igual que en los casos anteriores. Las bacterias transformadas se seleccionaron en medio sólido por expresar la resistencia a eritromicina proporcionada por el plásmido y se verificó por PCR que el plásmido vehiculaba el fragmento de ADN de 1 kb.

Utilizando las condiciones descritas en el apartado 4.8 se indujo la mutagénesis por recombinación homóloga. Los mutantes se seleccionaron por carecer de actividad catalasa al ser puestos en contacto con peróxido de hidrógeno al 3% y por presentar un fenotipo  $\beta$ -toxina negativo en agar Columbia con un 5% de sangre de cordero (figura 3.3). Posteriormente se comprobó por PCR que presentaban las dos deleciones (figura 3.4).

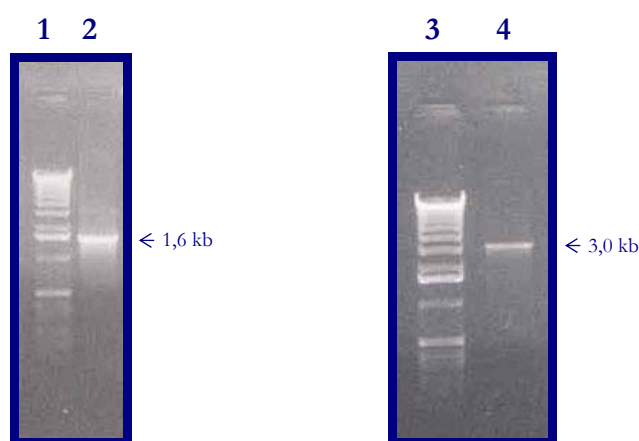


**Figura 3.4.** Comprobación por PCR de la deleción de los genes *katA* y *hlb* en *S. aureus* 2386. La reacción se realizó a partir de ADN extraído del doble mutante. **(1)** Marcador de peso molecular. **(2)** Fragmento de aproximadamente 1 kb que verifica la deleción del gen *katA* en *S. aureus* 2386  $\Delta katA \Delta hlb$ . En esta reacción de amplificación se emplearon los oligonucleótidos KAT 1 y KAT 2. **(3)** Fragmento de un tamaño aproximado de 2 kb indicativo de la deleción del gen *hlb* en *S. aureus* 2386  $\Delta katA \Delta hlb$ . Para esta reacción se utilizaron los oligonucleótidos HLB 1 y HLB 2.

### 3.2. COMPLEMENTACIÓN DE LOS MUTANTES OBTENIDOS.

Con el fin de descartar la presencia de cambios ajenos a la mutación deseada, como mutaciones en otros genes o efectos de polaridad, que puedan simular la existencia de la mutación cuando ésta realmente no se ha producido, hemos realizado experimentos de complementación en trans de los mutantes con un plásmido multicopia en el que se expresa el gen que ha sido mutado. De esta forma, si el proceso de mutagénesis se ha producido correctamente, los mutantes complementados recuperarán la actividad del gen y presentarán el mismo comportamiento que la cepa salvaje.

Para la complementación de los mutantes se utilizaron los plásmidos pHkat, pHhblb y pHkathlb (apartado 4.2.2), que portaban el gen *katA*, el gen *hblb* y ambos, respectivamente. La complementación se realizó mediante la técnica de transformación por protoplastos y los transformantes se seleccionaron en medio sólido con eritromicina (5 µg/ml). Asimismo, se comprobó que los mutantes complementados habían recuperado el fenotipo de la cepa salvaje (figura 3.3) y mediante PCR se verificó que los plásmidos vehiculaban los genes correspondientes (figura 3.5).

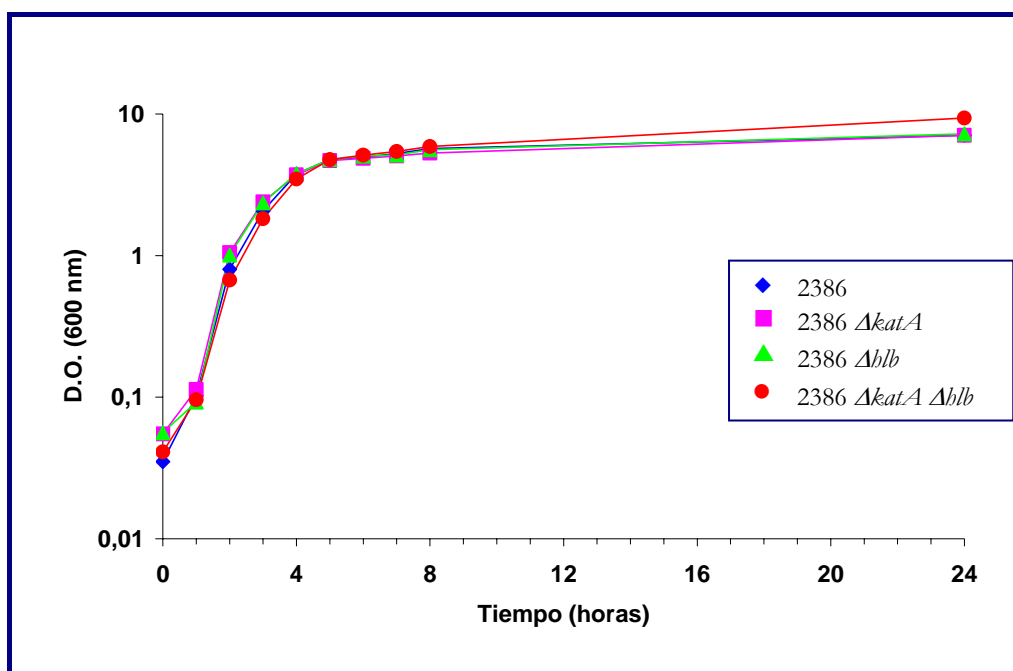


**Figura 3.5.** Comprobación por PCR de la complementación de los mutantes  $\Delta katA$ ,  $\Delta hblb$  y  $\Delta katA \Delta hblb$  de *S. aureus* 2386 con los plásmidos pHkat, pHhblb y pHkathlb, respectivamente. (1) y (3) Marcador de peso molecular. (2) Fragmento de aproximadamente 1,6 kb, clonado en los plásmidos pHkat y pHkathlb, que contiene el gen *katA* de *S. aureus* 2386. Para esta amplificación se usaron los oligonucleótidos CAT -1 y CAT 2. (4) Fragmento de aproximadamente 3 kb, clonado en los plásmidos pHhblb y pHkathlb, que contiene el gen *hblb* de *S. aureus* 2386. La reacción se llevó a cabo con los oligonucleótidos HLB 1 y HLB 2.

### 3.3. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LOS MUTANTES OBTENIDOS.

Iniciamos el estudio de los mutantes obtenidos analizando en detalle su fenotipo con el fin de detectar la posible presencia de alteraciones en otros caracteres como consecuencia de la ausencia de actividad catalasa y/o  $\beta$ -toxina. Para ello, se analizó la capacidad de crecimiento en medio BHI a 37°C (figura 3.6), la morfología y pigmentación de las colonias, el perfil bioquímico (analizado con el sistema API STAPH) y el patrón de utilización de azúcares (analizado con el sistema API 50CH) de los mutantes en comparación con los de la cepa parental, no detectándose diferencias significativas en ningún caso.

**Figura 3.6.** Curvas de crecimiento bacteriano de *S. aureus* 2386 y sus mutantes  $\Delta katA$ ,  $\Delta hlb$  y  $\Delta katA \Delta hlb$ .



**Figura 3.6.** Curvas de crecimiento de *S. aureus* 2386 y sus mutantes  $\Delta katA$ ,  $\Delta hlb$  y  $\Delta katA \Delta hlb$  cultivados en BHI a 37°C durante 24 horas. La densidad óptica se midió a 600 nm. Se puede observar que las cuatro cepas presentan cinéticas de crecimiento prácticamente idénticas.

### 3.4. ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA INTRACELULAR.

*S. aureus* ha sido considerado tradicionalmente como un patógeno extracelular. Sin embargo, estudios *in vitro*, con cultivos primarios y líneas celulares (Hudson *et al.*, 1995; Bayles *et al.*, 1998; Menzies y Kourteva, 1998; Hess *et al.*, 2003), así como estudios *in vivo* (Hébert *et al.*, 2000; Brouillette *et al.*, 2003) han puesto de manifiesto la capacidad de esta bacteria para internalizarse en diferentes tipos celulares, pudiendo sobrevivir y, en ocasiones, multiplicarse en el interior celular, incluso en células fagocíticas (Gresham *et al.*, 2000; Hébert *et al.*, 2000; Brouillette *et al.*, 2003). Tras la internalización, *S. aureus* puede escapar del endosoma, multiplicarse en el citoplasma e inducir la apoptosis de las células invadidas (Bayles *et al.*, 1998; Wesson *et al.*, 1998; Kahl *et al.*, 2000; Wesson *et al.*, 2000; Qazi *et al.*, 2001). La internalización de *S. aureus* por las células del hospedador puede contribuir a la persistencia de la infección al proporcionar una resistencia frente al sistema inmune y frente a los tratamientos antibióticos (Ferens y Bohach, 2000).

La supervivencia intracelular de *S. aureus* puede estar determinada por su capacidad para hacer frente a los mecanismos bactericidas de las células eucariotas. Así, en bacterias como *M. tuberculosis* (Manca *et al.*, 1999), *C. jejuni* (Day *et al.*, 2000) y *H. pylori* (Basu *et al.*, 2004) la catalasa, una enzima responsable de la degradación del peróxido de hidrógeno ha demostrado ser un factor esencial para su supervivencia en el interior de diversos tipos celulares.

Igualmente, la  $\beta$ -toxina, una enzima que actúa degradando la esfingomielina presente en las membranas celulares, podría jugar un papel importante durante el ciclo de vida intracelular de *S. aureus*, como ocurre en *L. ivanovii*, donde se ha observado que una esfingomielinasa, similar a la  $\beta$ -toxina, está implicada en la ruptura de la vacuola fagocítica y en la apoptosis de la célula infectada (González-Zorn *et al.*, 1999; González-Zorn *et al.*, 2000; González-Zorn, 2001).

Basándonos en estos hechos, nos planteamos investigar la posible participación de la catalasa y la  $\beta$ -toxina en la supervivencia y proliferación de

*S. aureus* en el medio intracelular de dos tipos celulares bajo condiciones *in vitro*. Concretamente elegimos para estos estudios la línea celular de macrófagos murinos J774A.1 y la línea celular epitelial mamaria bovina MAC-T, dos modelos que nos parecen relevantes para el estudio de la patogénesis de *S. aureus*.

### 3.4.1. Supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386 y sus respectivos mutantes $\Delta katA$ , $\Delta hlb$ y $\Delta katA \Delta hlb$ en la línea celular J774A.1.

Los macrófagos constituyen una de las piezas esenciales de la inmunidad innata, y participan activamente en la presentación de antígenos para inducir una inmunidad adquirida satisfactoria. J774A.1 es una línea celular de macrófagos de origen murino que mantiene la capacidad de activar los mecanismos oxígeno-dependientes necesarios para llevar a cabo una acción bactericida y ha sido ampliamente utilizada para el estudio de patógenos intracelulares (Wadsworth y Goldfine, 1999; Day *et al.*, 2000). Las condiciones bajo las que se realizó este experimento se recogen en el apartado 4.12.

Los análisis de significación (véase apartado 4.14) para comparar los resultados obtenidos en los experimentos de supervivencia intracelular en la línea J774A.1 entre *S. aureus* 2386 y sus respectivos mutantes se llevaron a cabo con los valores obtenidos en tres experimentos independientes. Se realizaron recuentos de las bacterias supervivientes transcurridas 4, 8 y 24 horas postinfección. El número de UFC (unidades formadoras de colonia) supervivientes en cada tiempo se expresó como un porcentaje referido a la cantidad total de UFC que habían sido fagocitadas.

En las figuras 3.7, 3.8 y 3.9 se muestra la capacidad de supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386 frente a la de cada uno de sus mutantes, así como la de los mutantes complementados. Los valores que se representan son las medias aritméticas de los porcentajes de las UFC supervivientes obtenidas en los diferentes experimentos. Asimismo, se representa la desviación estándar (DS) para cada media aritmética. En cada figura se muestra, además, una tabla donde se detallan los valores de las medias aritméticas y el valor de p obtenido

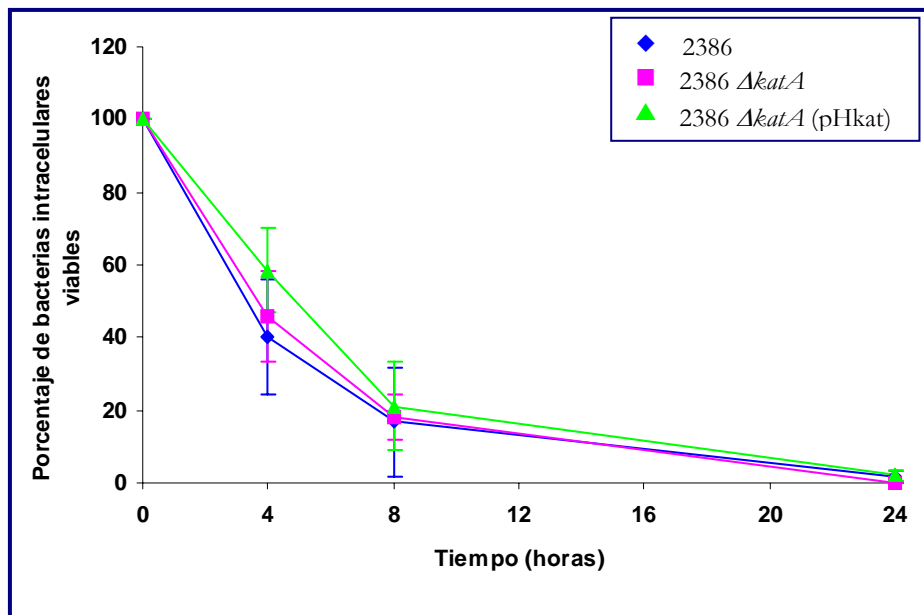
en el análisis de varianza. En la figura 3.9 se muestra una segunda tabla en la que se detalla el intervalo de confianza de la diferencia de las medias aritméticas para un nivel de significación del 95% obtenido en el test de Tukey-Kramer.

Diversos estudios han mostrado que *S. aureus* es fagocitado eficazmente por macrófagos y puede sobrevivir en su interior. Hébert *et al.* (2000), por ejemplo, observaron la presencia de *S. aureus* viables en macrófagos aislados de muestras de leche de vacas con mastitis crónicas, incluso en mayor porcentaje que en células epiteliales alveolares, sugiriendo que las bacterias estaban más protegidas en el interior de macrófagos. Asimismo, Brouillette *et al.* (2003), utilizando un modelo de mastitis en ratón, encontraron bacterias vivas y con evidencias de multiplicación dentro de macrófagos, neutrófilos y células epiteliales. Por último, Seral *et al.* (2003) han descrito que *S. aureus* es capaz de proliferar intracelularmente en macrófagos J774. Sin embargo, en los experimentos con la línea J774A.1 realizados en este trabajo, no se observó la existencia de proliferación intracelular (entendiendo por tal, en este estudio, el incremento en el número de bacterias intracelulares viables) ni en *S. aureus* 2386 ni en ninguno de los mutantes utilizados.

En la figura 3.7 se muestran los resultados de supervivencia intracelular en la línea J774A.1 de *S. aureus* 2386, del mutante  $\Delta katA$  y del mutante complementado. El comportamiento de las tres bacterias, como puede verse en la gráfica, fue análogo y en el análisis de varianza no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos considerados, hallándose una disminución progresiva de las bacterias viables. Por lo tanto, parece que la catalasa por sí sola no es un factor que influya en la supervivencia intracelular de esta bacteria en esta línea celular. Este resultado concuerda con lo descrito por otros autores, quienes observaron que la catalasa no parecía contribuir por sí misma a la protección de *S. aureus* frente a la actividad de leucocitos humanos (Nishihara *et al.*, 1985).

En el supuesto de que las sustancias generadas en el metabolismo oxidativo jueguen un papel en la actividad bactericida de las células fagocíticas, es posible que *S. aureus* utilice otras enzimas, además de la catalasa, para

Figura 3.7. Supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta katA$  y dicho mutante complementado en la línea celular J774A.1.



	4 horas	8 horas	24 horas
2386	40,1%	16,77%	1,53%
2386 $\Delta katA$	45,67%	18,1%	0,2%
2386 $\Delta katA$ (pHkat)	58,47%	21,13%	2,15%
p	0,3015	0,8979	0,2454

Figura 3.7. Supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta katA$  y dicho mutante complementado, fagocitados por macrófagos de la línea celular J774A.1 durante un periodo de tiempo de 24 horas. En los puntos de la gráfica correspondientes a las 4, 8 y 24 horas se muestran las medias del número de bacterias viables, más-menos su desviación estándar ( $\pm$ DS), expresado como porcentaje referido al total de bacterias presentes en el medio intracelular en el tiempo cero. En la tabla adjunta se muestran los valores de las medias aritméticas y el valor de p obtenido en el análisis de varianza para cada tiempo.

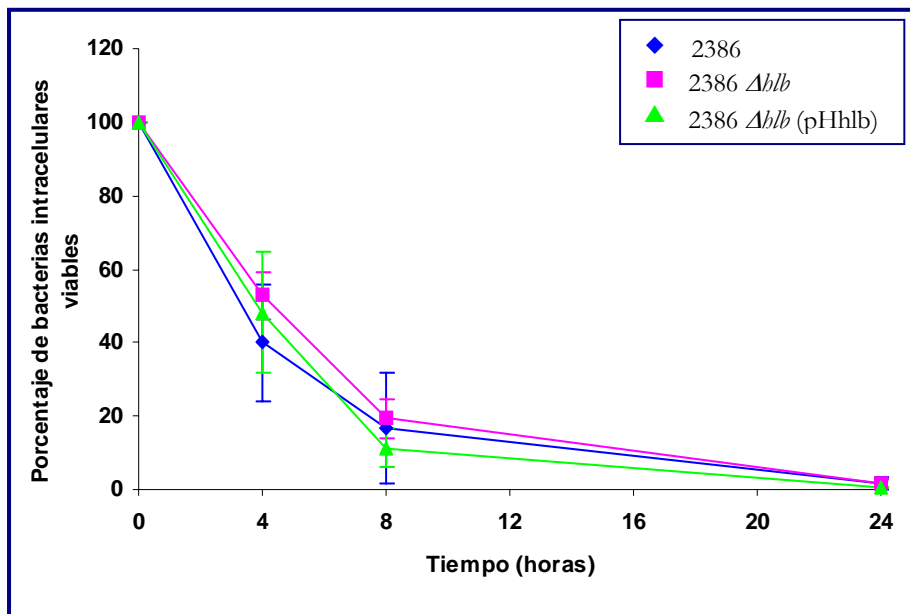


degradar el peróxido de hidrógeno, como la tiol peroxidasa (Bcp) o la alquil hidroperóxido reductasa (AhpC) (Horsburgh *et al.*, 2001a), que han sido descritas, también, en otras bacterias patógenas, como *E. coli* y *M. tuberculosis* (Jeong *et al.*, 2000). Asimismo, se ha relacionado la actividad de una metionina sulfoxido reductasa con la resistencia al peróxido de hidrógeno en *S. aureus* (Singh y Moskovitz, 2003).

Por otro lado, *S. aureus* puede haber desarrollado mecanismos alternativos para protegerse del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cuando éste no es degradado. En este sentido, en *N. gonorrhoeae*, se ha descrito un mecanismo de defensa frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que actúa sobre una de las rutas secundarias por las que se dirige este compuesto cuando no es degradado (Lorenzen *et al.*, 2000). Este mecanismo consiste en la producción de una proteína, una porina, que actúa sobre la membrana del fagosoma, impidiendo la fusión de los gránulos azurófilos, que transportan la mieloperoxidasa. De esta forma se evita que la MPO utilice el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no degradado para la formación de otros compuestos oxidantes más tóxicos, como son el ácido hipocloroso o las cloraminas, que ejercen su acción tóxica sobre los microorganismos que se encuentran aislados en el fagosoma. Este mismo mecanismo ha sido descrito en *H. pylori* y *Y. enterocolitica* (Tufano *et al.*, 1994a; Tufano *et al.*, 1994b).

Además del peróxido de hidrógeno pueden existir otras sustancias reactivas de oxígeno, así como mecanismos oxígeno-independientes que actúen como principales responsables de la destrucción de *S. aureus* en el interior de las células fagocíticas. Esto explicaría el hecho de que la destrucción de *S. aureus* en el medio intracelular sea casi completa, independientemente de la presencia o de actividad catalasa o cualquier otro mecanismo para protegerse del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En este sentido, Aratani *et al.* (2000) descartan que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sea un elemento crucial en la destrucción de *S. aureus*, otorgando ese papel a otros compuestos oxidantes como el peroxinitrito. Asimismo, Reeves *et al.* (2002) y Ahluwalia *et al.* (2004) consideran que son las proteasas granulares (elastasa, catepsinas, etc.), vertidas al fagosoma tras la fusión de los gránulos azurófilos, las principales responsables de la destrucción de las bacterias por las células fagocíticas y que la función de las sustancias oxígeno reactivas sería la de proporcionar las

**Figura 3.8.** Supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta bllb$  y dicho mutante complementado en la línea celular J774A.1.



	4 horas	8 horas	24 horas
2386	40,1%	16,77%	1,53%
2386 $\Delta bllb$	52,8%	19,35%	1,7%
2386 $\Delta bllb$ (pHh1b)	48,17%	11,37%	0,4%
P	0,5531	0,6187	0,4014

**Figura 3.8.** Supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta bllb$  y dicho mutante complementado, fagocitados por macrófagos de la línea celular J774A.1 durante un periodo de tiempo de 24 horas. En los puntos de la gráfica correspondientes a las 4, 8 y 24 horas se muestran las medias del número de bacterias viables, más-menos su desviación estándar ( $\pm$ DS), expresado como porcentaje referido al total de bacterias presentes en el medio intracelular en el tiempo cero. En la tabla adjunta se muestran los valores de las medias aritméticas y el valor de p obtenido en el análisis de varianza para cada tiempo.

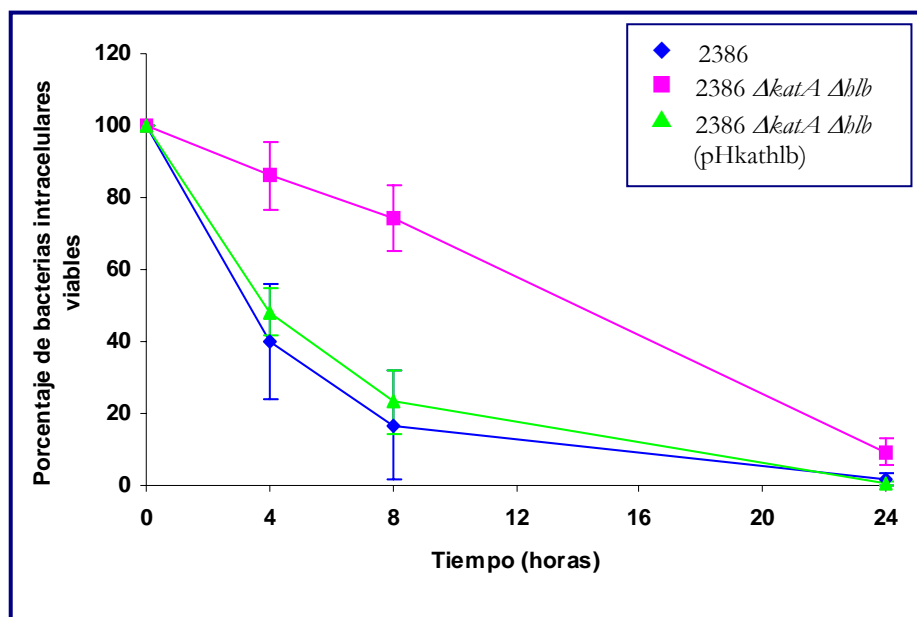
condiciones adecuadas para la activación de estas enzimas, provocando la entrada de iones  $K^+$  y, en consecuencia, un aumento del pH en el interior de la vacuola fagocítica.

Los resultados de los experimentos de supervivencia intracelular en la línea J774A.1 realizados con *S. aureus* 2386 y su mutante  $\Delta bllb$  aparecen reflejados en la figura 3.8. Al comparar estos resultados no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tiempos observados, por lo que parece que la  $\beta$ -toxina, uno de los factores membranolíticos que posee *S. aureus*, no jugaría por sí sola un papel importante en la supervivencia intracelular de esta bacteria en la línea celular utilizada.

Coincidiendo con este resultado, González-Zorn *et al.* (1999, 2000) tampoco observaron diferencias en el comportamiento intracelular de un mutante de *L. ivanovii* que no expresaba SmcL, una SMasa C similar a la  $\beta$ -toxina de *S. aureus*, con respecto a su cepa parental en células J774A.1 y atribuyeron este resultado al hecho de que el mutante expresaba niveles normales de los otros determinantes membranoactivos de *Listeria*, conservando, por tanto, su capacidad para escapar del fagosoma, y al bajo contenido en esfingomielina que presentan las membranas de estas células de origen murino.

Finalmente decidimos analizar el efecto conjunto que la ausencia de la catalasa y la  $\beta$ -toxina podría tener en el ciclo de vida intracelular de *S. aureus* en macrófagos J774A.1. Cuando se compararon los datos obtenidos en los estudios de supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386 y su doble mutante  $\Delta katA \Delta bllb$  en esta línea celular (figura 3.9) se observó que, contrariamente al comportamiento mostrado por los mutantes simples, el doble mutante presentaba una mayor persistencia intracelular que la cepa parental, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en el análisis de varianza a las 4 ( $p=0,0053$ ), 8 ( $p=0,0015$ ) y 24 horas ( $p=0,0080$ ). Mediante el test de Tukey-Kramer se comprobó que las diferencias observadas se debían exclusivamente a la delección de estos dos genes puesto que no se encontraron diferencias entre la cepa parental y el mutante complementado.

**Figura 3.9.** Supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta katA \Delta blb$  y dicho mutante complementado en la línea celular J774A.1.



	Tiempo		
	4 horas	8 horas	24 horas
2386	40,1%	16,77%	1,53%
2386 $\Delta katA \Delta blb$	86,03%	74,33%	9,4%
2386 $\Delta katA \Delta blb$ (pHkathlb)	48,27%	23,17%	0,55%
P	0,0053	0,0015	0,0080

Tiempo	2386 vs 2386 $\Delta katA \Delta blb$	2386 vs 2386 $\Delta katA \Delta blb$ (pHkathlb)	2386 $\Delta katA \Delta blb$ vs 2386 $\Delta katA \Delta blb$ (pHkathlb)
4 horas	-74,18 a 17,69	-36,41 a 20,08	9,52 a 66,01
8 horas	-86,06 a 29,07	-34,89 a 22,09	22,67 a 79,66
24 horas	-13,94 a 1,80	-5,09 a 7,06	2,78 a 14,92

**Figura 3.9.** Supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta katA \Delta blb$  y dicho mutante complementado, fagocitados por macrófagos de la línea celular J774A.1 durante un periodo de tiempo de 24 horas. En los puntos de la gráfica correspondientes a las 4, 8 y 24 horas se muestran las medias del número de bacterias viables, más-menos su desviación estándar ( $\pm$ DS), expresado como porcentaje referido al total de bacterias presentes en el medio intracelular en el tiempo cero. En la tabla superior se muestran los valores de las medias aritméticas y el valor de p obtenido en el análisis de varianza para cada tiempo. En la tabla inferior se analizan los resultados por parejas mediante el test de Tukey-Kramer y se muestra el intervalo de confianza (IC) de la diferencia de las medias aritméticas calculado para un nivel de significación del 95%.

Hasta la fecha no se han llevado a cabo estudios para determinar qué papel podrían desempeñar estas dos enzimas, de manera conjunta, en la supervivencia intracelular de *S. aureus*. En esta bacteria se ha descrito la persistencia intracelular que presentan las variantes de colonia pequeña (SCVs) (Balwit *et al.*, 1994; Vesga *et al.*, 1996; von Eiff *et al.*, 1997; von Eiff *et al.*, 2001). Estas subpoblaciones se caracterizan por ser auxotróficas en hemina o menadiona, dos compuestos necesarios para la síntesis de citocromos y menaquinona, respectivamente, componentes de la cadena respiratoria implicados en el transporte de electrones (von Eiff *et al.*, 1997; McNamara y Proctor, 2000). Este defecto en la cadena respiratoria se traduce en múltiples cambios fenotípicos, que incluyen, entre otros, un crecimiento más lento, ausencia de pigmentación, reducido rango de utilización de carbohidratos, mayor resistencia a antibióticos y una disminución en la producción de factores de virulencia, concretamente se ha visto que las SCVs producen niveles muy bajos de hemolisinas, proteína A y catalasa (McNamara y Proctor, 2000; Yarwood *et al.*, 2001). Se ha sugerido que la menor producción de hemolisinas, principalmente de  $\alpha$ -toxina, es la causa de la mayor persistencia intracelular que presentan las SCVs, al no ser capaces de lisar la célula hospedadora (von Eiff *et al.*, 1997). En este sentido, se ha observado que mutantes deficientes en la producción de  $\alpha$ -toxina (Vann y Proctor, 1988) y mutantes en el regulador Agr (Wesson *et al.*, 1998), que controla la producción de hemolisinas, presentan una mayor persistencia intracelular. Asimismo, Schwan *et al.* (2003) han observado que un mutante Agr negativo presenta una supervivencia selectiva, con respecto a la cepa parental, durante infecciones mixtas en abscesos y heridas en ratón y atribuyen este resultado a la pérdida de expresión de hemolisinas en el mutante. Sin embargo, en relación a los resultados obtenidos en este trabajo, la mayor persistencia intracelular observada en *S. aureus* 2386  $\Delta katA \Delta hlb$  no puede ser atribuida únicamente a la falta de expresión de  $\beta$ -toxina, puesto que el mutante simple  $\Delta hlb$  no presentó este comportamiento, sino al efecto combinado de la ausencia de actividad catalasa y  $\beta$ -toxina.

### 3.4.2. Supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386 y sus respectivos mutantes $\Delta katA$ , $\Delta hlb$ y $\Delta katA \Delta hlb$ en la línea celular MAC-T.

MAC-T es una línea de células epiteliales mamarias de origen bovino que mantiene la capacidad de diferenciación y secreción de productos específicos de la leche (Huynh *et al.*, 1991) y ha sido empleada en varios estudios para caracterizar la invasión intracelular por *S. aureus* (Almeida *et al.*, 1996; Bayles *et al.*, 1998; Wesson *et al.*, 1998; Qazi *et al.*, 2001). Asimismo, se ha descrito la presencia de *S. aureus* viables en el interior de células epiteliales mamarias *in vivo*, en un modelo murino de mamitis (Brouillette *et al.*, 2003). Las condiciones bajo las que se realizó este experimento se recogen en el apartado 4.12.

En las figuras 3.10, 3.11 y 3.12 se muestra la capacidad de supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386 frente a la de cada uno de sus mutantes, así como la de los mutantes complementados en la línea celular MAC-T.

Coincidiendo con lo descrito por otros autores (Bayles *et al.*, 1998; Wesson *et al.*, 1998; Qazi *et al.*, 2001), *S. aureus* 2386 fue capaz de invadir células MAC-T y multiplicarse intracelularmente. Este hecho queda patente en el recuento realizado a las 4 horas, momento en el cual se observa una clara proliferación intracelular, siendo el número de bacterias intracelulares viables aproximadamente 1,7 veces superior al número de bacterias internalizadas (véase figura 3.10). A las 8 y 24 horas postinfección, el número de bacterias intracelulares viables disminuyó, permaneciendo únicamente el 7,33% de las bacterias internalizadas a las 24 horas.

La destrucción de *S. aureus* observada podría estar asociada a la muerte celular debida a un aumento en la permeabilidad de la membrana de las células invadidas por acción de las hemolisinas (Shompole *et al.*, 2003), o a la apoptosis de dichas células desencadenada por factores secretados por *S. aureus* y regulados por Agr y SarA (Wesson *et al.*, 1998), como la  $\alpha$ -toxina (Menzies y Kourteva, 2000; Bantel *et al.*, 2001) o la  $\beta$ -toxina (Bayles *et al.*, 1998), provocando la entrada en contacto de la bacteria con la gentamicina presente

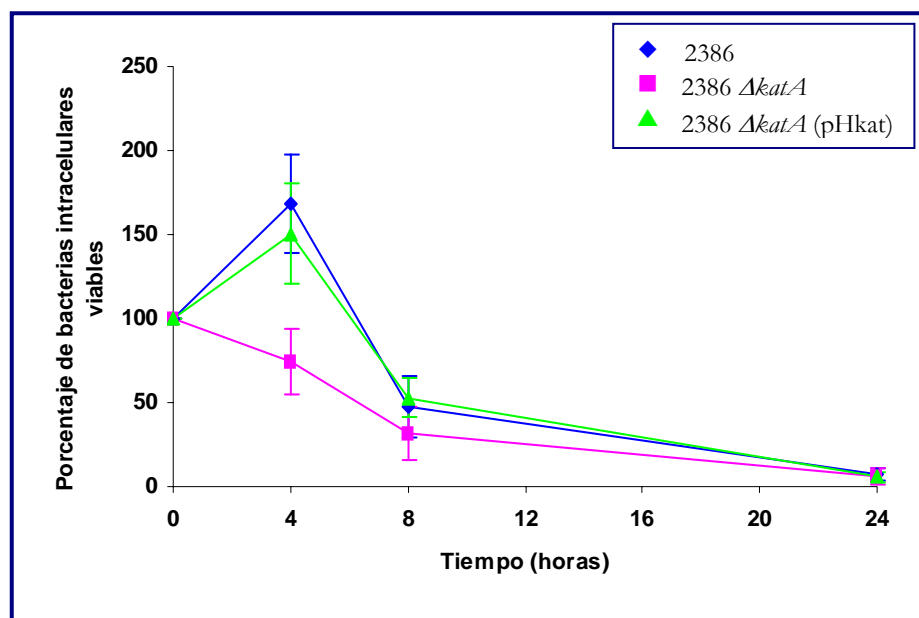
en el medio extracelular. Apoyando esta hipótesis, se ha observado que la multiplicación intracelular de *S. aureus* y la liberación de toxinas provocan cambios citotóxicos en las células en cultivo tras periodos largos de incubación (Agerer *et al.*, 2003).

Por otro lado, la destrucción de *S. aureus* en el interior de células MAC-T puede estar causada también por la acción de mecanismos bactericidas similares a los que poseen las células fagocíticas profesionales. En este sentido, se ha observado que la supervivencia intracelular de bacterias, como *C. jejuni* (Day *et al.*, 2000) y *E. coli* (Day *et al.*, 2000; Battistoni *et al.*, 2004), en células epiteliales, está limitada por la generación de superóxido por una NADPH oxidasa similar a la que poseen los fagocitos profesionales. Asimismo, otros autores han descrito que el peróxido de hidrógeno juega un papel importante en la actividad antimicrobiana de las células endoteliales frente a microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* (De Assis *et al.*, 2000) o *Rickettsia conorii* (Feng y Walker, 2000).

Como se puede apreciar en la figura 3.10 el mutante nulo en catalasa ( $\Delta katA$ ) mostró un comportamiento diferente al de la cepa parental. Así, se encontraron diferencias estadísticamente significativas a las 4 horas ( $p=0,0017$ ), comprobándose, mediante el test de Tukey-Kramer, que estas diferencias se debían a la delección del gen *katA*, puesto que no se hallaron diferencias entre la cepa parental y el mutante complementado.

Como se observa en la gráfica de la figura 3.10, la carencia de catalasa inhibió en buena medida la proliferación intracelular de la bacteria en las células MAC-T durante las primeras horas postinfección, es decir, que la catalasa parece jugar un papel determinante en la proliferación intracelular temprana de *S. aureus* en esta línea celular. Este hecho podría deberse a que en esta línea celular los mecanismos oxígeno-dependientes (estrés oxidativo) desempeñen un papel significativo en la defensa frente a los microorganismos, de manera que la catalasa protegería a la bacteria del peróxido de hidrógeno generado por la célula. Esta hipótesis se ve apoyada por las observaciones de

**Figura 3.10.** Supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta katA$  y dicho mutante complementado en la línea celular MAC-T.



	Tiempo		
	4 horas	8 horas	24 horas
2386	168,35%	47,73%	7,33%
2386 $\Delta katA$	74,08%	31,51%	6,13%
2386 $\Delta katA$ (pHkat)	150,48%	52,96%	5,83%
P	0,0017	0,1786	0,8563

Tiempo	2386 vs 2386 $\Delta katA$	2386 vs 2386 $\Delta katA$ (pHkat)	2386 $\Delta katA$ vs 2386 $\Delta katA$ (pHkat)
4 horas	41,39 a 147,16	-35,01 a 70,76	-129,28 a 23,52

**Figura 3.10.** Supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta katA$  y dicho mutante complementado en la línea celular MAC-T durante un periodo de tiempo de 24 horas. En los puntos de la gráfica correspondientes a las 4, 8 y 24 horas se muestran las medias del número de bacterias viables, más-menos su desviación estándar ( $\pm DS$ ), expresado como porcentaje referido al total de bacterias presentes en el medio intracelular en el tiempo cero. En la tabla superior se muestran los valores de las medias aritméticas y el valor de p obtenido en el análisis de varianza para cada tiempo. En la tabla inferior se analizan los resultados por parejas mediante el test de Tukey-Kramer para el tiempo 4 y se muestra el intervalo de confianza (IC) de la diferencia de las medias aritméticas calculado para un nivel de significación del 95%.

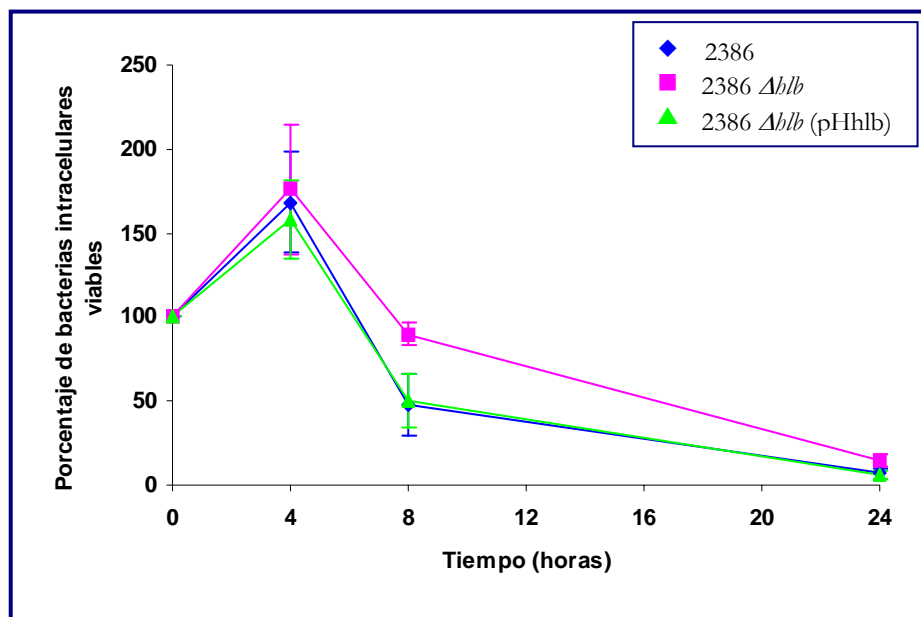


Day *et al.* (2000) y Battistoni *et al.* (2004) de que la supervivencia bacteriana en el interior de células epiteliales está limitada por la generación de superóxido por la célula. Además, coincidiendo con los resultados de este experimento, Battistoni *et al.* (2004) observaron que la destrucción bacteriana originada por los radicales oxidantes se producía, principalmente, en las primeras fases de la entrada de la bacteria en las células epiteliales.

Los estudios de supervivencia intracelular en la línea MAC-T de *S. aureus* 2386 en comparación con su mutante  $\Delta bllb$  (figura 3.11) revelaron que el porcentaje de bacterias intracelulares viables del mutante a las 8 ( $p= 0,0036$ ) y 24 horas ( $p= 0,0083$ ) eran significativamente mayores a los encontrados con la cepa parental y el mutante complementado, que mostraron un comportamiento similar entre sí. Con el test de Tukey-Kramer se confirmó que las diferencias eran debidas a la delección del gen *bllb*.

La delección del gen de la  $\beta$ -toxina, por lo tanto, no afectó a la proliferación de la bacteria en células MAC-T durante las primeras horas post-infección pero sí tuvo efecto sobre su persistencia intracelular a más largo plazo. El hecho de que la carencia de  $\beta$ -toxina no afecte a la proliferación durante las primeras horas podría indicar que las otras toxinas membranolíticas que posee *S. aureus*, especialmente la  $\alpha$ -toxina, serían suficientes para permitir a la bacteria escapar del endosoma y multiplicarse en el citoplasma. Diversos autores han descrito que mutantes en el regulador Agr, que expresan niveles muy bajos de estas toxinas permanecen englobados en el endosoma y no son capaces de multiplicarse en el interior celular (Wesson *et al.*, 1998; Shompole *et al.*, 2003). Según estos resultados, la  $\beta$ -toxina no ejercería un papel fundamental en la ruptura del endosoma en este tipo celular, sino que podría sumar su efecto al de las otras toxinas membranoactivas de *S. aureus*. Esto mismo sucede en *L. ivanovii*, donde se ha observado que un mutante nulo en SmcL pero capaz de expresar el resto de determinantes membranolíticos de *Listeria* escapa del endosoma y prolifera en el interior de células epiteliales MDBK, aunque en menor medida que su cepa parental (González-Zorn *et al.*, 1999; González-Zorn *et al.*, 2000). Contrariamente a nuestras observaciones, Cifrian *et al.* (1996), utilizando cultivos primarios de células epiteliales mamarias bovinas,

**Figura 3.11.** Supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta hlb$  y dicho mutante complementado en la línea celular MAC-T.



	4 horas	8 horas	24 horas
2386	168,35%	47,73%	7,33%
2386 $\Delta hlb$	175,87%	90,01%	14,47%
2386 $\Delta hlb$ (pHh1b)	158,45%	50,28%	5,99%
P	0,7379	0,0036	0,0083

Tiempo	2386 vs 2386 $\Delta hlb$	2386 vs 2386 $\Delta hlb$ (pHh1b)	2386 $\Delta hlb$ vs 2386 $\Delta hlb$ (pHh1b)
8 horas	-70,26 a 14,32	-30,52 a 25,42	11,77 a 67,71
24 horas	-13,31 a 0,98	-4,83 a 7,5	2,32 a 14,65

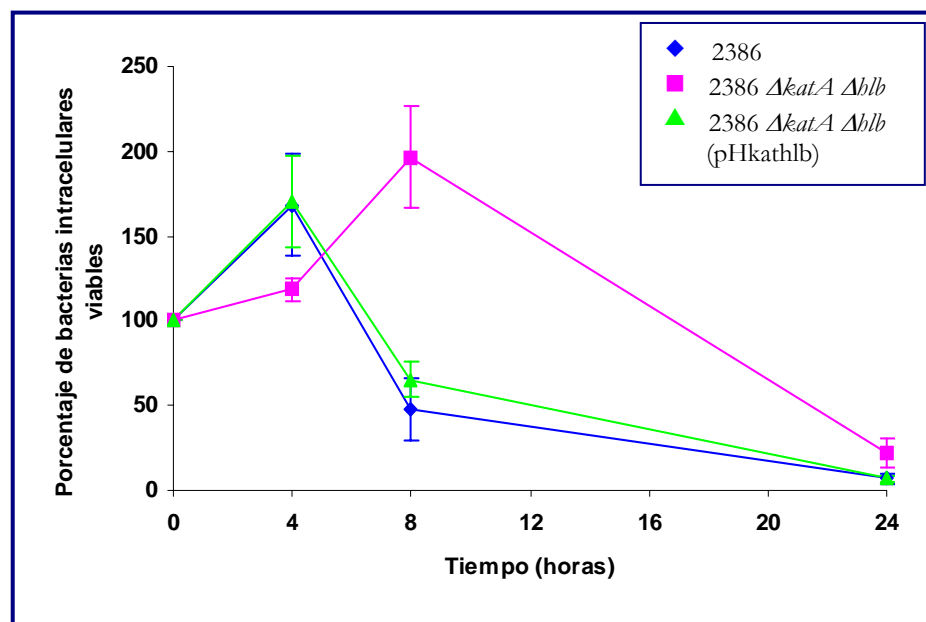
**Figura 3.11.** Supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta hlb$  y dicho mutante complementado en la línea celular MAC-T durante un periodo de tiempo de 24 horas. En los puntos de la gráfica correspondientes a las 4, 8 y 24 horas se muestran las medias del número de bacterias viables, más-menos su desviación estándar ( $\pm$ DS), expresado como porcentaje referido al total de bacterias presentes en el medio intracelular en el tiempo cero. En la tabla superior se muestran los valores de las medias aritméticas y el valor de p obtenido en el análisis de varianza para cada tiempo. En la tabla inferior se analizan los resultados por parejas mediante el test de Tukey-Kramer para los tiempos 8 y 24 y se muestra el intervalo de confianza (IC) de la diferencia de las medias aritméticas calculado para un nivel de significación del 95%.

observaron que un mutante  $\beta$ -toxina negativo de *S. aureus* presentaba una menor adherencia y proliferación que la cepa parental.

El efecto de la ausencia de  $\beta$ -toxina sobre la mayor persistencia intracelular de la bacteria en esta línea celular podría deberse a que la  $\beta$ -toxina participe en la lisis de la célula hospedadora, incrementando la permeabilidad de la membrana por la hidrólisis de la esfingomielina o desencadenando la apoptosis de la célula por mediación de la ceramida producida en esta hidrólisis, lo que permitiría el contacto de la bacteria con la gentamicina extracelular. En este sentido, se ha visto que mutantes  $\alpha$ -toxina negativos presentan una mayor persistencia intracelular al ser incapaces de lisar las células invadidas (Vann y Proctor, 1988). Esta persistencia intracelular también ha sido observada en las SCVs de *S. aureus*, que producen niveles muy bajos de hemolisinas (Balwit *et al.*, 1994; von Eiff *et al.*, 1997; von Eiff *et al.*, 2001) y en mutantes en el regulador Agr, que controla la expresión de las hemolisinas (Wesson *et al.*, 1998). El papel que pueda desempeñar la  $\beta$ -toxina de *S. aureus* en la producción de apoptosis en las células hospedadoras no se conoce por el momento, sin embargo, dado los resultados obtenidos con otras esfingomielinasas bacterianas (Zhang, P. *et al.*, 1997; González-Zorn, 2001; Tseng *et al.*, 2004), es probable que la  $\beta$ -toxina participe en este fenómeno. Coincidiendo con la mayor persistencia observada en el mutante  $\Delta bllb$ , aunque en un modelo completamente distinto (mamitis murina), Bramley *et al.* (1989) hallaron que un mutante  $\beta$ -toxina negativo era recuperado en mayor número que su cepa parental.

En los ensayos realizados con el doble mutante nulo en catalasa y  $\beta$ -toxina ( $\Delta katA \Delta bllb$ ) en la línea celular MAC-T (figura 3.12) se detectó un claro efecto tanto en la proliferación como en la persistencia intracelular, observándose un efecto sinérgico y potenciador entre las dos mutaciones. Las diferencias encontradas en los tres tiempos considerados, 4 (p= 0,0192), 8 (p< 0,0001) y 24 horas (p= 0,0055) fueron estadísticamente significativas y atribuibles, como muestra el test de Tukey-Kramer, a la delección de los genes *katA* y *bllb*.

**Figura 3.12.** Supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta katA \Delta bllb$  y dicho mutante complementado en la línea celular MAC-T.



	4 horas	8 horas	24 horas
2386	168,35%	47,73%	7,33%
2386 $\Delta katA \Delta bllb$	118,68%	196,66%	22,2%
2386 $\Delta katA \Delta bllb$ (pHkathlb)	170,5%	65,18%	6,85%
P	0,0192	<0,0001	0,0055

Tiempo	2386 vs 2386 $\Delta katA \Delta bllb$	2386 vs 2386 $\Delta katA \Delta bllb$ (pHkathlb)	2386 $\Delta katA \Delta bllb$ vs 2386 $\Delta katA \Delta bllb$ (pHkathlb)
4 horas	3,65 a 95,7	-48,18 a 43,88	-97,85 a 5,8
8 horas	-190,18 a -107,69	-58,69 a 23,79	90,26 a 172,73
24 horas	-25,9 a -3,85	-10,55 a 11,5	4,33 a 26,37

**Figura 3.12.** Supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta katA \Delta bllb$  y dicho mutante complementado en la línea celular MAC-T durante un periodo de tiempo de 24 horas. En los puntos de la gráfica correspondientes a las 4, 8 y 24 horas se muestran las medias del número de bacterias viables, más-menos su desviación estándar ( $\pm$ DS), expresado como porcentaje referido al total de bacterias presentes en el medio intracelular en el tiempo cero. En la tabla superior se muestran los valores de las medias aritméticas y el valor de p obtenido en el análisis de varianza para cada tiempo. En la tabla inferior se analizan los resultados por parejas mediante el test de Tukey-Kramer para los tiempos 4, 8 y 24 y se muestra el intervalo de confianza (IC) de la diferencia de las medias aritméticas calculado para un nivel de significación del 95%.

La proliferación del mutante fue más lenta que la de la cepa parental y la del mutante complementado alcanzándose más tarde el máximo de bacterias intracelulares viables (aproximadamente 2 veces el número de bacterias internalizadas) con respecto a la cepa parental. Este comportamiento se traduce en un aumento de la persistencia intracelular del doble mutante con respecto a su cepa parental. La mayor permisividad mostrada por las células MAC-T, en comparación con las células J774A.1, para la replicación del doble mutante, probablemente sea consecuencia de su menor patogenicidad para las células.

La reducción del número de bacterias intracelulares viables en el doble mutante se inicia más tarde, pero, al igual que en la cepa parental, ocurre cuando éste ha duplicado su número. Es posible que la muerte bacteriana sea debida a la entrada en contacto de *S. aureus* con la gentamicina del medio extracelular tras provocar la lisis de las células y que la multiplicación de *S. aureus* en el interior celular sea necesaria para que se produzca esta lisis. En este sentido, se ha visto que la multiplicación intracelular de *S. aureus* en una línea de células epiteliales de pulmón precede a la apoptosis de las células (Kahl *et al.*, 2000).

Las características observadas en el doble mutante se asemejan, de alguna manera, a las descritas en las variantes de colonia pequeña de *S. aureus* que, como se ha mencionado anteriormente, presentan un crecimiento más lento, una mayor persistencia intracelular y una disminución en la producción de toxinas extracelulares, entre ellas hemolisinas y catalasa (Yarwood *et al.*, 2001).

Al comparar los resultados obtenidos con las dos líneas celulares utilizadas se pone claramente de manifiesto la diferente permisividad que tienen para la supervivencia y proliferación de las bacterias investigadas. La línea macrofágica J774A.1 parece ser menos permisiva, puesto que no permitió la proliferación de *S. aureus* 2386 ni de ninguno de sus mutantes y el número de bacterias intracelulares viables, tanto en la cepa salvaje como en los mutantes, disminuyó mucho más rápidamente que en la línea epitelial mamaria MAC-T. Además, no parece que estas líneas celulares utilicen los mismos mecanismos

microbicidas, o al menos el peso relativo de ellos no sería el mismo, ya que la catalasa promueve la proliferación en las células MAC-T en las primeras horas postinfección pero no tiene un efecto detectable en la línea macrofágica.

Abundando en las diferencias, otro tanto cabe decir de la  $\beta$ -toxina, que no mostró ningún efecto en las células macrofágicas pero tuvo un efecto negativo a las 8 y 24 horas sobre la persistencia de la bacteria (su carencia aumentó el número de bacterias intracelulares) en las células MAC-T. Esto puede deberse a que las células MAC-T, que son de origen bovino, presenten una mayor porcentaje de esfingomiélinas en sus membranas que las células J774A.1, de origen murino, lo que les haría más susceptibles a la acción citolítica de esta toxina y se traduciría en un incremento de la destrucción bacteriana asociada a la muerte celular.

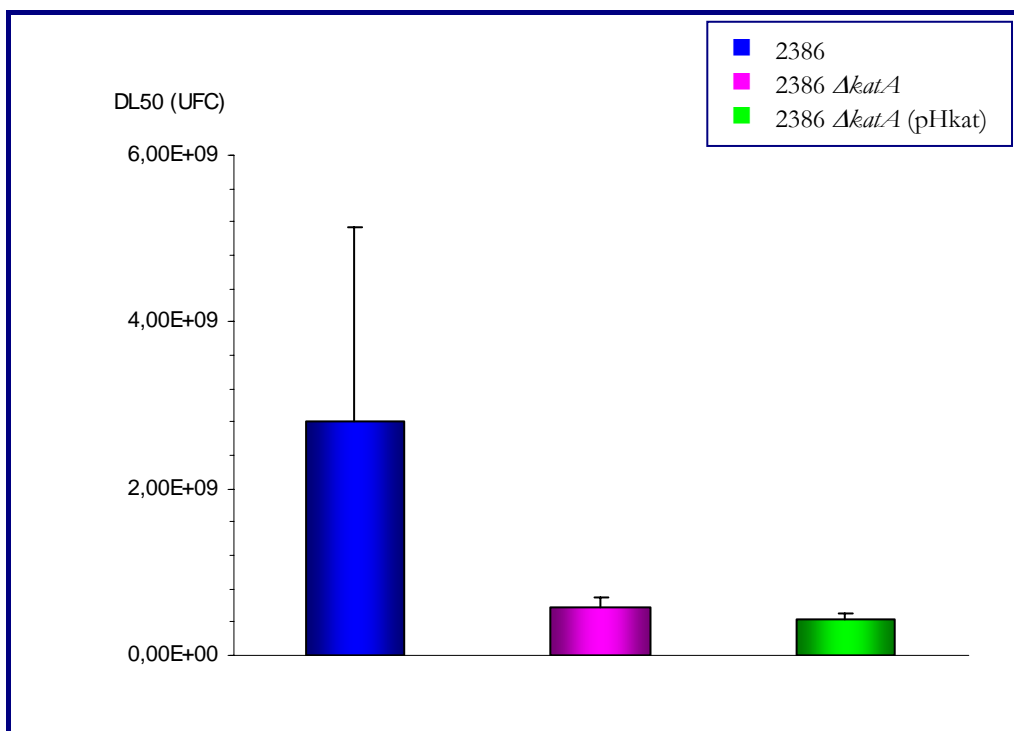
Por último, los resultados obtenidos con el doble mutante en las dos líneas celulares, aunque cuantitativamente diferentes, apuntan en la misma dirección desde el punto de vista cualitativo: una mayor permisividad de replicación y una mayor persistencia, como consecuencia probablemente de su menor patogenicidad.

### 3.5. ENSAYOS DE VIRULENCIA EN UN MODELO MURINO.

Con el fin de evaluar el efecto en la virulencia de la delección de los genes *katA*, *hly* y ambos, se estimó la dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ) de *S. aureus* 2386, de sus mutantes  $\Delta katA$ ,  $\Delta hly$  y  $\Delta katA \Delta hly$  y de estos mutantes complementados en un modelo murino de infección experimental utilizando el procedimiento detallado en el apartado 4.13.

Para determinar la  $DL_{50}$  de cada cepa se emplearon 5 lotes, con cinco ratones Swiss cada uno. La vía de inoculación fue intraperitoneal, inoculando a cada ratón 0,4 ml de la suspensión bacteriana que le correspondía a cada lote. Las dosis probadas oscilaron entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^{11}$  UFC/ml.

**Figura 3.13.** DL<sub>50</sub> de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta katA$  y dicho mutante complementado en un modelo murino.



	2386	2386 $\Delta katA$	2386 $\Delta katA$ (pHkat)
DL <sub>50</sub> (UFC)	2,8x10 <sup>9</sup>	5,68x10 <sup>8</sup>	4,26x10 <sup>8</sup>
p	0,1304		

**Figura 3.13.** DL<sub>50</sub> de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta katA$  y dicho mutante complementado en un modelo murino. En la gráfica se muestran las medias del número de UFC necesario para producir la muerte en el 50% de los individuos de estudio, más su desviación estándar (+DS). En la tabla adjunta se muestran los valores de las medias aritméticas y el valor de p obtenido en el análisis de varianza.

Se realizaron tres experimentos independientes para la determinación de la  $DL_{50}$ . Con los datos obtenidos se estimaron las medias aritméticas con su desviación estándar, para poder comparar así los resultados de *S. aureus* 2386 con los de cada mutante y su complementado. Los análisis de significación (véase apartado 4.14.) se realizaron mediante análisis de varianza y en los casos en los que el valor de  $p$  fue  $< 0,05$  se llevó a cabo un test de Tukey-Kramer para un nivel de confianza del 95%.

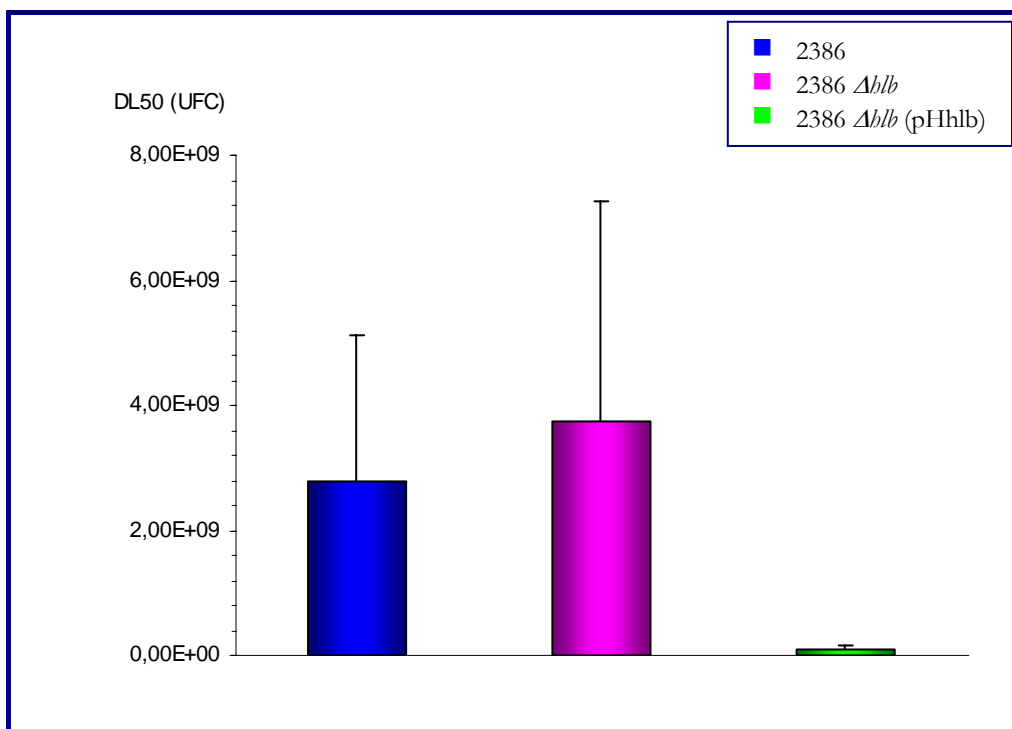
Los valores obtenidos de  $DL_{50}$  para *S. aureus* 2386, sus mutantes  $\Delta katA$ ,  $\Delta hlb$  y  $\Delta katA \Delta hlb$  y estos mutantes complementados aparecen reflejados en las figuras 3.13, 3.14 y 3.15. Los valores que se representan son las medias aritméticas de las  $DL_{50}$  obtenidas en los diferentes experimentos. Asimismo, se representa la desviación estándar (DS) para cada media aritmética. En cada figura se muestra, además, una tabla en la que se detallan los valores de las medias aritméticas y el valor de  $p$  obtenido en el análisis de varianza. En la figura 3.15 aparece una segunda tabla con el intervalo de confianza de la diferencia de las medias aritméticas para un nivel de significación del 95% obtenido en el test de Tukey-Kramer.

Como se muestra en la figura 3.13, las  $DL_{50}$  del mutante  $\Delta katA$  y el mutante complementado fueron inferiores (casi 5 veces) a las de la cepa parental 2386, si bien en el análisis de varianza estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Según estos resultados, se puede concluir que, al menos para la cepa de *S. aureus* utilizada y en este modelo, la catalasa por sí sola no es un factor que participe significativamente en su virulencia.

En la mayor parte de los estudios sobre la capacidad de virulencia que se han realizado con anterioridad con cepas de *S. aureus* con diferente actividad catalasa, e incluso aquellos que comparaban la virulencia de algunas cepas con mutantes con nula o muy baja actividad catalasa, no se ha empleado el método de  $DL_{50}$  por vía intraperitoneal, por lo que no existen trabajos directamente comparables.



**Figura 3.14.** DL<sub>50</sub> de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta hlb$  y dicho mutante complementado en un modelo murino.



	2386	2386 $\Delta hlb$	2386 $\Delta hlb$ (pHhlb)
DL <sub>50</sub> (UFC)	2,8x10 <sup>9</sup>	3,75x10 <sup>9</sup>	1x10 <sup>8</sup>
p	0,2416		

**Figura 3.14.** DL<sub>50</sub> de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta hlb$  y dicho mutante complementado en un modelo murino. En la gráfica se muestran las medias del número de UFC necesario para producir la muerte en el 50% de los individuos en estudio, más su desviación estándar (+DS). En la tabla adjunta se muestran los valores de las medias aritméticas y el valor de p obtenido en el análisis de varianza.

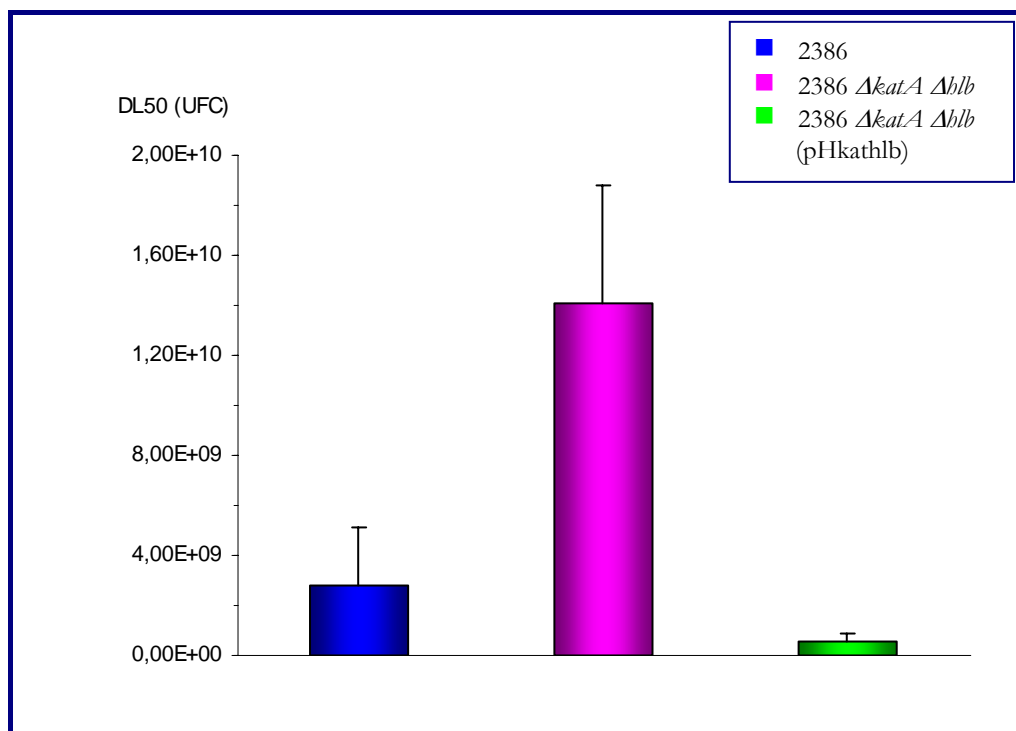
Nishihara *et al.* (1985) determinaron la  $DL_{50}$  por vía intravenosa de una cepa de *S. aureus* y de un mutante derivado de ésta que se había hallado de forma accidental en el laboratorio y que presentaba un nivel de actividad catalasa extremadamente bajo y, a pesar de que encontraron diferencias entre las  $DL_{50}$ , concluyeron que la menor virulencia del mutante parecía estar asociada a otros factores además del descenso en actividad catalasa.

Más recientemente, Horsburgh *et al.* (2001a) han observado que un mutante catalasa negativo es igual de virulento a la hora de producir abscesos cutáneos en un modelo murino que su cepa parental. Asimismo, Messina *et al.* (2002) estudiaron la capacidad de virulencia de un mutante catalasa negativo de *S. aureus* en comparación con aislados clínicos de *S. aureus* catalasa positivos, midiendo la capacidad de supervivencia bacteriana en el hígado de ratones inoculados por vía intravenosa y concluyeron que la ausencia de actividad catalasa no disminuye por sí sola la virulencia de *S. aureus*.

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las  $DL_{50}$  del mutante *Abllb*, el mutante complementado y la cepa parental (figura 3.14). La  $\beta$ -toxina, por sí misma, tampoco parece tener un papel significativo en la patogenicidad de *S. aureus* en este modelo. En estudios realizados con anterioridad para determinar el papel desempeñado por la  $\beta$ -toxina en la virulencia de *S. aureus* tampoco se ha utilizado el método de  $DL_{50}$  por vía intraperitoneal. Utilizando otros modelos, los resultados obtenidos con respecto al papel de la  $\beta$ -toxina en la virulencia de *S. aureus* son diversos, así, mientras que en un modelo murino de mamitis se ha descrito la menor virulencia de un mutante  $\beta$ -toxina negativo con respecto a su cepa parental (Bramley *et al.*, 1989), en modelos de artritis séptica en ratón (Nilsson *et al.*, 1999) y queratitis en conejo (O'Callaghan *et al.*, 1997; Dajcs *et al.*, 2002) no se han observado diferencias significativas en la virulencia.

La  $DL_{50}$  del doble mutante fue más de 5 veces superior a la de la cepa parental y a la del mutante complementado, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (figura 3.15). El doble mutante fue, por lo tanto, significativamente menos patógeno que su cepa parental en el modelo

**Figura 3.15.** DL<sub>50</sub> de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta katA \Delta blb$  y dicho mutante complementado en un modelo murino.



	2386	2386 $\Delta katA \Delta blb$	2386 $\Delta katA \Delta blb$ (pHkathlb)
DL <sub>50</sub> (UFC)	2,8x10 <sup>9</sup>	1,41x10 <sup>10</sup>	5,77x10 <sup>8</sup>
p	0,0032		

	2386 vs 2386 $\Delta katA \Delta blb$	2386 vs 2386 $\Delta katA \Delta blb$ (pHkathlb)	2386 $\Delta katA \Delta blb$ vs 2386 $\Delta katA \Delta blb$ (pHkathlb)
IC (95%)	-1,89x10 <sup>10</sup> a -3,75x10 <sup>9</sup>	-5,35x10 <sup>9</sup> a 9,79x10 <sup>9</sup>	5,97x10 <sup>9</sup> a 2,11x10 <sup>10</sup>

**Figura 3.15.** DL<sub>50</sub> de *S. aureus* 2386, su mutante  $\Delta katA \Delta blb$  y dicho mutante complementado en un modelo murino. En la gráfica se muestran las medias del número de UFC necesario para producir la muerte en el 50% de los individuos en estudio, más su desviación estándar (+DS). En la tabla superior se muestran los valores de las medias aritméticas y el valor de p obtenido en el análisis de varianza. En la tabla inferior se analizan los resultados por parejas mediante el test de Tukey-Kramer y se muestra el intervalo de confianza de la diferencia de las medias aritméticas calculado para un nivel de significación del 95%.

murino utilizado. Estos resultados indican claramente que el efecto combinado de la catalasa y la  $\beta$ -toxina desempeña un papel relevante en la virulencia de *S. aureus* en este modelo. La menor virulencia presentada por el mutante  $\Delta katA \Delta hlb$  en este modelo es achacable al hecho de carecer de dos factores de patogenicidad que parecen actuar sinérgicamente, aunque la ausencia de uno u otro factor de forma independiente no afecte a la virulencia.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que factores que de forma individual no han podido ser claramente implicados en la patogénesis de *S. aureus* pueden ejercer un papel relevante al actuar conjuntamente con otros factores, resaltando que la patogenicidad de *S. aureus* es el resultado de la acción combinada de sus factores de virulencia.

La mayor permisividad de replicación y persistencia intracelulares, así como, la menor patogenicidad, mostradas por el mutante  $\Delta katA \Delta hlb$ , le convierten en un candidato para su posible uso como vacuna atenuada frente a los procesos causados por *S. aureus*. De hecho, la evaluación de la seguridad y la eficacia de este mutante como vacuna atenuada frente a la mastitis estafilocócica de los rumiantes domésticos es uno de los objetivos prioritarios de nuestro grupo de investigación. Nuestros resultados proporcionan la base conceptual para el desarrollo de una estrategia alternativa en la obtención de nuevas cepas vacunales, basada en el efecto combinado de distintos factores, aparentemente no relacionados, pero que actúan de forma sinérgica en la patogénesis de *S. aureus*.

Los resultados presentados en este trabajo constituyen el primer paso en un largo camino que nos queda por recorrer, al final del cual esperamos llegar a descifrar con precisión cuál es el verdadero papel jugado por estas enzimas en la virulencia de *S. aureus* y en el proceso patogénico que resulta de la interacción de este microorganismo con los tejidos del hospedador. Hoy en día, aún se desconocen muchos aspectos sobre la patogenicidad intracelular de *S. aureus* que sería interesante descubrir porque quizás en ellos esté la clave del tratamiento frente a las infecciones crónicas y recurrentes producidas por esta bacteria, especialmente, las infecciones intramamarias.



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

---

---



#### 4.1. CEPAS BACTERIANAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Las cepas bacterianas empleadas en este estudio aparecen detalladas en la tabla 4.1.

El medio de cultivo empleado habitualmente para el crecimiento de *S. aureus* fue el caldo infusión cerebro y corazón (BHI; Difco), al que se añadió agar (Panreac, Oxoid) al 1,5% cuando se requirió medio sólido. El medio se complementó con eritromicina (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Sigma) cuando las bacterias portaban los plásmidos derivados de pE194 y pHpS9. También se empleó agar Columbia con un 5% de sangre de cordero (BioMérieux) en los casos en que fue necesario observar la actividad hemolítica.

Para el crecimiento de las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  y TOP10, utilizadas en las técnicas de clonaje molecular, se empleó el medio Luria-Bertani (LB; 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro sódico en un volumen final de 1 litro) con ampicilina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Sigma) cuando contenían el plásmido pCR2.1 o eritromicina (300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) si presentaban el plásmido pHpS9. Para facilitar la selección de clones con inserto mediante la técnica de  $\alpha$ -complementación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se añadió al medio sólido IPTG (40  $\mu\text{l}$  de una solución 100 mM) (isopropil- $\beta$ -D-tioglucopiranósido; Sigma) y X-Gal (40  $\mu\text{l}$  de una solución de 40 mg/ml) (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranósido).

Para la regeneración de protoplastos de *S. aureus* se utilizó el medio de cultivo DM3 (succinato sódico 0,5M, 100 ml de hidrolizado de caseína al 5%, 25ml de dextrosa al 20%, 100 ml de tampón fosfato potásico pH 7,4, cloruro



magnésico 1M y 10 ml de BSA al 5% en un volumen final de 1 litro) con eritromicina (5 µg/ml).

Los cultivos de *S. aureus* y *E. coli* se incubaron rutinariamente a 37°C y en agitación cuando se utilizó medio líquido. Las cepas bacterianas transformadas con los plásmidos termosensibles pERkat y pERh1b se incubaron a 32°C para evitar la curación del plásmido. Para inducir la mutagénesis por recombinación homóloga en estas cepas se incrementó la temperatura hasta 43°C con el fin de forzar la integración del plásmido en el cromosoma bacteriano.

Los perfiles bioquímicos y de utilización de azúcares se determinaron con los sistemas API STAPH (BioMérieux) y API 50CH (BioMérieux), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 4.2. PLÁSMIDOS.

En la tabla 4.2 aparecen reflejados todos los plásmidos empleados en este estudio. La construcción de los distintos plásmidos se detalla a continuación.

### 4.2.1. Construcción de los plásmidos pERkat y pERh1b.

Para la construcción de mutantes de *S. aureus* por delección del gen *katA*, del gen *h1b* o de ambos mediante recombinación homóloga se recurrió, en primer lugar, a la transformación de las cepas bacterianas con un vector temperatura sensible. El vector elegido fue el plásmido pE194 (Horinouchi y Weisblum, 1982), derivado de *S. aureus* que confiere resistencia a la eritromicina, al que se le había insertado, en el sitio de corte de la enzima de restricción *Xba* I, un fragmento del sitio de clonaje múltiple del plásmido pCR2.1 (Invitrogen) comprendido entre los sitios de corte de *Spe* I y *Xba* I (Díez, 2002).

Tabla 4.1. Cepas bacterianas empleadas en este estudio.

Cepas bacterianas	Genotipo	Fenotipo	Utilización	Procedencia
<i>Staphylococcus aureus</i>				
2386 *	<i>katA hlb</i>	Kat <sup>+</sup> , Hlb <sup>+</sup> , Em <sup>s</sup>	Transformación por protoplastos. Estudios comparativos.	Aislada de caso de mastitis clínica en vacuno lechero.
2386 (pERkat)	2386 $\Omega$ pERkat	Kat <sup>+</sup> , Hlb <sup>+</sup> , Em <sup>r</sup>	Mutagénesis por recombinación.	Este estudio.
2386 $\Delta katA$	$\Delta katA hlb$	Kat <sup>+</sup> , Hlb <sup>+</sup> , Em <sup>s</sup>	Transformación por protoplastos. Estudios comparativos.	Este estudio.
2386 $\Delta katA$ (pHkat)	2386 $\Delta katA \Omega$ pHkat	Kat <sup>+</sup> , Hlb <sup>+</sup> , Em <sup>r</sup>	Estudios comparativos.	Este estudio.
2386 (pERhhlb)	2386 $\Omega$ pERhhlb	Kat <sup>+</sup> , Hlb <sup>+</sup> , Em <sup>r</sup>	Mutagénesis por recombinación.	Este estudio.
2386 $\Delta hlb$	<i>katA \Delta hlb</i>	Kat <sup>+</sup> , Hlb <sup>-</sup> , Em <sup>s</sup>	Transformación por protoplastos. Estudios comparativos.	Este estudio.
2386 $\Delta hlb$ (pHhhlb)	2386 $\Delta hlb \Omega$ pHhhlb	Kat <sup>+</sup> , Hlb <sup>+</sup> , Em <sup>r</sup>	Estudios comparativos.	Este estudio.
2386 $\Delta hlb$ (pERkat)	2386 $\Delta hlb \Omega$ pERkat	Kat <sup>+</sup> , Hlb <sup>-</sup> , Em <sup>r</sup>	Mutagénesis por recombinación.	Este estudio.
2386 $\Delta katA \Delta hlb$	$\Delta katA \Delta hlb$	Kat <sup>+</sup> , Hlb <sup>-</sup> , Em <sup>s</sup>	Transformación por protoplastos. Estudios comparativos.	Este estudio.
2386 $\Delta katA \Delta hlb$ (pHkathlb)	2386 $\Delta katA \Delta hlb \Omega$ pHkathlb	Kat <sup>+</sup> , Hlb <sup>+</sup> , Em <sup>r</sup>	Estudios comparativos.	Este estudio.
<i>Escherichia coli</i>				
TOP10			Técnicas de clonaje molecular.	Invitrogen.
DH5 $\alpha$			Técnicas de clonaje molecular.	Nuestro laboratorio.
<i>Rhodococcus equi</i>				
			Test de CAMP.	Nuestro laboratorio.

\*Cepa cedida por el Dr. Eduardo Yus Respaliza. **Em<sup>r</sup>**: resistente a eritromicina; **Em<sup>s</sup>**: sensible a eritromicina.

Utilizando ADN extraído de *S. aureus* 2386, se amplificaron por PCR dos fragmentos de aproximadamente 500 pb a ambos lados del gen *katA* y de aproximadamente 1000 pb a ambos lados del gen *hblb*. Estos fragmentos se unieron mediante PCR recombinante y las construcciones obtenidas se clonaron en el plásmido pCR2.1.

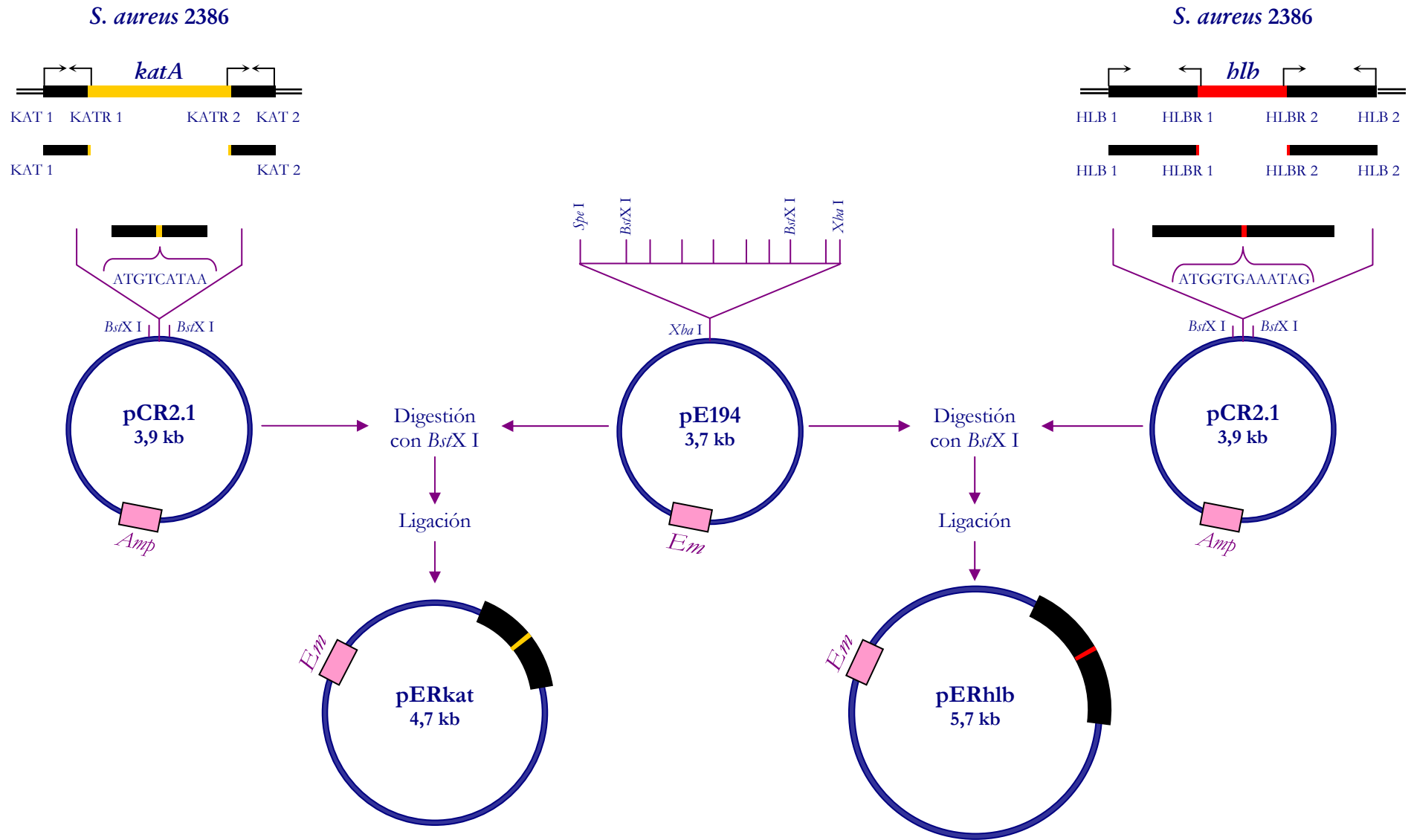
Posteriormente las construcciones fueron liberadas mediante la digestión de pCR2.1 con la enzima *Bst*X I y, finalmente, se realizó la ligación de cada una de ellas en el plásmido pE194 modificado, dando lugar a los plásmidos pERkat y pERhblb, que vehiculaban las secuencias necesarias para la delección de los genes *katA* y *hblb* respectivamente.

En la figura 4.1 se muestra un esquema de la construcción de los plásmidos pERkat y pERhblb.

**Tabla 4.2.** Plásmidos utilizados en este estudio

Plásmidos	Descripción	Referencia
pCR2.1	Vector para el clonaje directo de productos de PCR. Ampicilina <sup>r</sup> .	Invitrogen.
pE194	Plásmido termosensible de <i>S. aureus</i> para intercambio alélico. Eritromicina <sup>r</sup> .	Horinouchi y Weisblum (1982).
pERkat	pE194 conteniendo la secuencia apropiada para la delección del gen <i>katA</i> de <i>S. aureus</i> .	Este estudio.
pERhblb	pE194 conteniendo la secuencia apropiada para la delección del gen <i>hblb</i> de <i>S. aureus</i> .	Este estudio.
pHpS9	Plásmido multicopia bifuncional <i>E. coli</i> / <i>Bacillus subtilis</i> . Eritromicina <sup>r</sup> .	Haima <i>et al.</i> (1990).
pHkat	pHpS9 + fragmento de 1,6 kb con el gen <i>katA</i> de <i>S. aureus</i> 2386.	Este estudio.
pHhblb	pHpS9 + fragmento de 3 kb con el gen <i>hblb</i> de <i>S. aureus</i> 2386.	Este estudio.
pHkathblb	pHpS9 + fragmento de 1,6 kb con el gen <i>katA</i> y fragmento de 3 kb con el gen <i>hblb</i> de <i>S. aureus</i> 2386.	Este estudio.

Figura 4.1. Construcción de los plásmidos termosensibles pERkat y pERhlb.



#### 4.2.2. Construcción de los plásmidos pHkat, pHhblb y pHkathlb.

La complementación de los mutantes  $\Delta katA$ ,  $\Delta hblb$  y  $\Delta katA \Delta hblb$  requería la construcción de plásmidos multicopia que vehicularan los genes *katA*, *hblb* y ambos. Para ello se utilizó el plásmido pHpS9 (Haima *et al.*, 1990), un plásmido multicopia de 5,7 kb con capacidad de replicación en gram negativos y gram positivos.

A partir de ADN extraído de *S. aureus* 2386 se amplificaron por PCR dos fragmentos de 1,6 y 3 kb que contenían los genes *katA* y *hblb*, respectivamente. El fragmento con el gen *katA* se clonó, en primer lugar, en el plásmido pCR2.1, a continuación, se liberó mediante la digestión con *EcoR* I y, finalmente, se llevó a cabo la ligación con pHpS9 para dar lugar a pHkat. El fragmento con el gen *hblb* se insertó directamente en pHpS9, en el sitio de corte de la enzima *Sma* I, obteniéndose el plásmido pHhblb. Por último, para la construcción de pHkathlb se insertó el fragmento con el gen *katA*, liberado de pCR2.1, en el plásmido pHhblb.

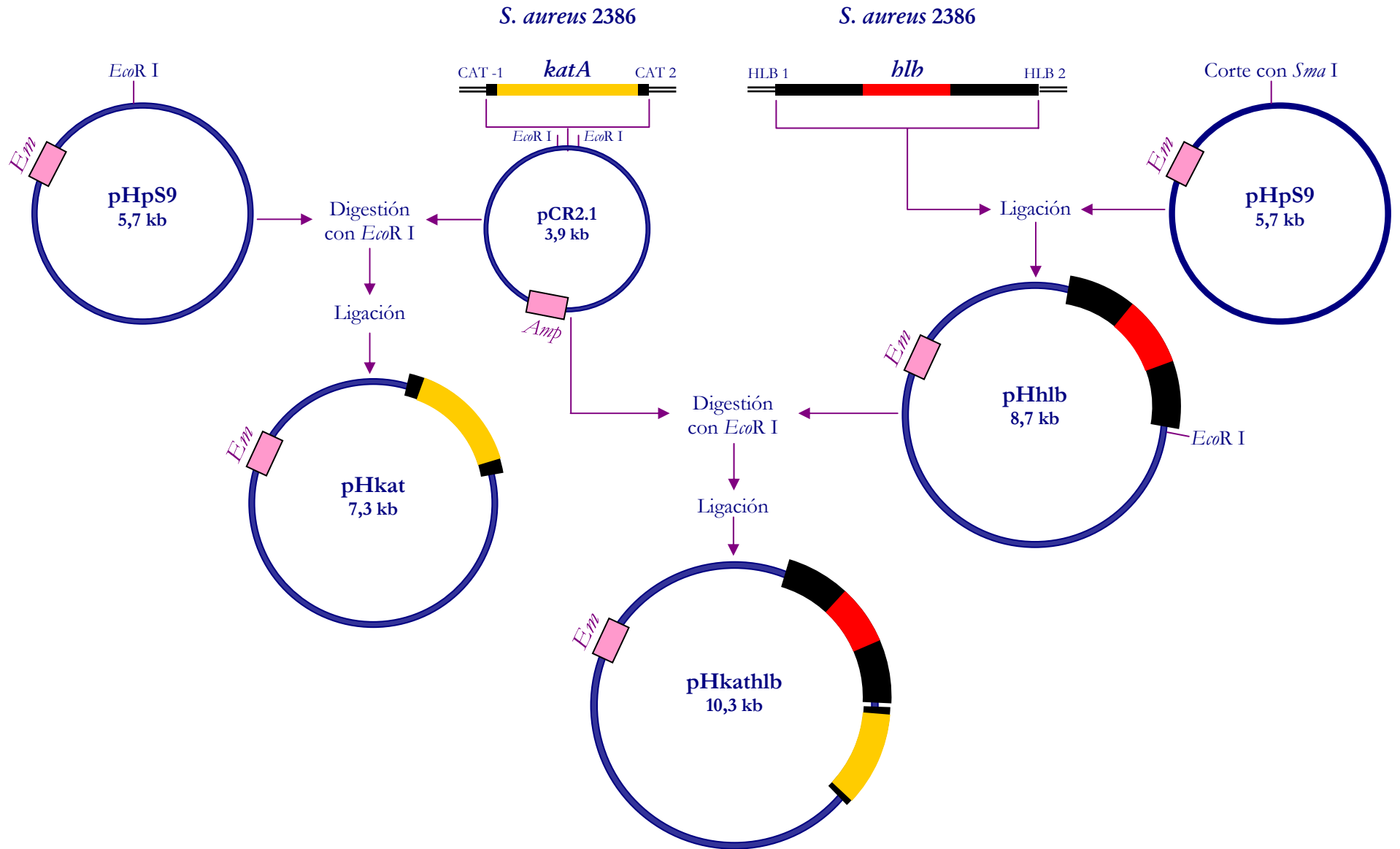
En la figura 4.2 se muestra un esquema de la construcción de los plásmidos pHkat, pHhblb y pHkathlb.

### 4.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

#### 4.3.1. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio para la amplificación de fragmentos de ADN (véase tabla 4.3) fueron diseñados en nuestro laboratorio a partir de secuencias del genoma de *S. aureus* COL (*TIGR Microbial Database*) y sintetizados por Isogen Bioscience B.V. Los oligonucleótidos para PCR recombinante fueron diseñados conforme a lo descrito por Vallejo *et al.* (1994).

Figura 4.2. Construcción de los plásmidos de complementación pHkat, pHhlb y pHkathlb.



### 4.3.2. Reacción de PCR.

Cada reacción de PCR se hizo generalmente en un volumen de 50  $\mu$ l siendo su composición la siguiente:

- 2  $\mu$ l (50 ng) de ADN cromosómico previamente extraído. En la PCR recombinante fue sustituido por los dos fragmentos de ADN a unir, amplificados previamente por PCR y purificados.
- 5  $\mu$ l de tampón de PCR 10x (Applied Biosystems Roche) (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3; KCl 500 mM).
- 3  $\mu$ l de solución de cloruro de magnesio (Applied Biosystems Roche) (MgCl<sub>2</sub> 25 mM).
- 8  $\mu$ l de la mezcla de dNTPs (Applied Biosystems Roche) (dATP, dCTP, dGTP y dTTP; 1,25 mM de cada uno).
- 1  $\mu$ l de cada oligonucleótido empleado (0,5 mg/ml).

**Tabla 4.3.** Oligonucleótidos empleados para la amplificación de ADN.

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Posición
KAT 1	ATGACCACAATGCCCAATACA	(-504)-(-484)*
KATR 1	ATCAAATTTATGACATAGTCATCCCTCCAC	(-14)-6 y 1515-1524*
KATR 2	GACTATGTCATAAAATTTGATATGTAGTTTC	(-4)-6 y 1515-1534*
KAT 2	TTCCGCTTTGAAATTTTAAAT	2004-2024*
HLB 1	AACITTCITTTGTTCCATTTTT	(-745)-(-725)#
HLBR 1	AGCACTATTTACCATCATTATCACTCCTT	(-14)-6 y 988-997#
HLBR 2	AATGATGGTGAAATAGTGCTGAACTAACTA	(-4)-6 y 988-1007#
HLB 2	TTATTCAGAGACGATTAGTTA	1718-1738#
CAT -1	AGTCTCCCATCTATTTAAAT	(-199)-(-180)*
CAT 2	TCATAAACTGCTCAACTACGC	1541-1561*

\* y # Posición de los oligonucleótidos referida al codón de iniciación ATG de los genes *katA* y *hllb* de *S. aureus* COL, respectivamente.

Señaladas en azul y rojo aparecen las secuencias complementarias entre cada pareja de oligonucleótidos diseñados para PCR recombinante.

- 0,25 µl de ADN polimerasa Amplitaq Gold (Applied Biosystems Roche) (5 U/µl).
- 30,75 µl de agua bidestilada.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* utilizando los siguientes parámetros generales:

- Desnaturalización inicial durante 10 minutos a 94°C.
- 30 ciclos de amplificaciones consistentes en una fase de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto; una fase de hibridación de oligonucleótidos durante 1 minuto a la temperatura adecuada, calculada de acuerdo con la fórmula general  $T=[2x(A+T)+3x(G+C)]-5$ , y una fase de elongación a 72°C durante 1-4 minutos en función del tamaño del fragmento a amplificar (1 kb ~ 1 minuto).
- Elongación final durante 10 minutos a 72°C.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% en TAE (TAE 50x: 242 g de Tris base, 57,1 ml de ácido acético glacial y 37,2 g de Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O pH 8 en un volumen final de 1 litro) con bromuro de etidio (1 mg/ml). Como marcador de peso molecular se utilizó *DNA Molecular Weight Marker X* (0,07-12,2 kbp) (Roche).

#### **4.4. EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSÓMICO.**

Las extracciones de ADN cromosómico se realizaron con el sistema comercial *GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit* (Amersham Pharmacia Biotech) con algunas modificaciones.

#### **4.5. CLONAJE Y TRANSFORMACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN.**

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR y los obtenidos mediante digestión con enzimas de restricción se purificaron con dos sistemas



comerciales: *Qiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen), para purificación directa del producto de PCR y *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), para purificación a partir de geles de agarosa.

El clonaje directo de productos de PCR purificados se llevó a cabo en el plásmido pCR2.1, y se transformaron en *E. coli* TOP10 mediante el sistema comercial *TOPO™ TA Cloning* (Invitrogen). La selección de colonias transformadas se hizo por PCR para amplificar el fragmento clonado a partir de bacterias lisadas en agua bidestilada estéril durante 10 minutos a 100°C.

Los clonajes realizados en el plásmido pHpS9 se transformaron en *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante choque térmico de las bacterias tratadas con CaCl<sub>2</sub>. La selección de colonias transformadas se llevó a cabo de la misma forma que en el caso anterior. En el caso de los clonajes en el plásmido pE194, la transformación se hizo directamente en *S. aureus* mediante protoplastos (véase apartado 4.7).

#### 4.6. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS.

Para la extracción de plásmidos se utilizaron dos sistemas comerciales, *RPM® Kit BIO 101* (QBIogene) y *Plasmid Purification Kit* (Qiagen), añadiendo una incubación con lisostafina durante 30 minutos a 37°C durante la fase de lisis en el caso de *S. aureus*.

#### 4.7. TRANSFORMACIÓN DE PROTOPLASTOS.

El método utilizado para la transformación de protoplastos de *S. aureus* fue el descrito por Götz *et al.* (1981).

Para la preparación de protoplastos se procedió del siguiente modo: un volumen de 50 ml de PAB (*Bacto Penassay Broth*, Difco) 2x se inoculó con 2 ml de un cultivo bacteriano que había crecido a 37°C, en agitación, durante 18

horas y se prolongó su incubación hasta alcanzar una  $DO_{540nm}$  de 0,5. Las bacterias se recogieron por centrifugación, se lavaron con 30 ml de SMM 1x (glucosa 0,5M, ácido maleico 0,02M,  $MgCl_2$  0,02M) y, finalmente, se resuspendieron en 5 ml de SMM 1x. En ese momento se añadió lisostafina (concentración final de 50  $\mu g/ml$ ) que se dejó actuar a 32°C durante 10 minutos. La lisis de la pared bacteriana se detuvo añadiendo 20 ml de SMMP (SMM 2x : PAB 4x [v/v]) y se hicieron dos lavados con SMMP. Finalmente los protoplastos se resuspendieron en SMMP en un volumen final de 5 ml, se distribuyeron en alícuotas de 500  $\mu l$  y se conservaron a -80°C.

La transformación de los protoplastos se realizó añadiendo 0,1-1  $\mu g$  de ADN plasmídico a 500  $\mu l$  de protoplastos, en presencia de SMM 2x y de PEG al 40% (Polietilen glicol 8000). Transcurrido un minuto se añadieron 5 ml de SMMP y se dejó un minuto más a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugó para eliminar el PEG, se resuspendieron los protoplastos en 500  $\mu l$  de SMMP y se mantuvieron durante 4 horas a 32°C para permitir la expresión del plásmido. Transcurrido este tiempo los protoplastos se sembraron en placas de medio de regeneración de protoplastos, DM3 (succinato sódico 0,5 M, 100 ml de hidrolizado de caseína al 5%, 25 ml de dextrosa al 20%, 100 ml de tampón fosfato potásico, pH 7,4, cloruro magnésico 1 M y 10 ml de BSA al 5% en un volumen final de 1 l) con un 0,8% de agar, en presencia de eritromicina (5  $\mu g/ml$ ) (resistencia conferida por el plásmido) y se incubaron a 32°C durante 2 o 3 días.

Para la selección de colonias transformadas con pERkat o pERh1b se realizó la amplificación por PCR de los fragmentos clonados a partir de plásmido extraído. En el caso de los plásmidos pHkat, pHh1b o pHkath1b, los transformantes se seleccionaron por haber recuperado el fenotipo de la cepa original y se comprobó mediante PCR que las mutaciones seguían presentes en su ADN y que portaban el plásmido de complementación.

#### 4.8. MUTAGÉNESIS POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA.

Para llevar a cabo la delección de los genes *katA* y *blb* en *S. aureus* 2386 se recurrió a la mutagénesis por recombinación homóloga con las construcciones clonadas en los plásmidos termosensibles pERkat y pERhblb.

Las bacterias transformadas con estos plásmidos se mantuvieron a 32°C en caldo BHI con eritromicina (5 µg/ml) hasta llegar a fase estacionaria. En ese momento se inocularon en medio de cultivo fresco y se incubaron a 43°C durante 6 horas para forzar la integración del plásmido en el cromosoma bacteriano. Transcurrido este tiempo se hicieron diluciones 1/100 a partir de este cultivo en caldo BHI sin antibiótico, reduciendo la temperatura de incubación a 37°C para facilitar la pérdida del plásmido. Estas diluciones se repitieron varias veces y se sembraron en agar BHI para obtener colonias aisladas. Tras una incubación a 37°C durante 24 horas las colonias se analizaron para comprobar la presencia de mutantes. Los mutantes  $\Delta katA$  se seleccionaron en medio sólido por la ausencia de actividad catalasa al ser puestos en contacto con peróxido de hidrógeno al 3%. Los mutantes  $\Delta blb$  se seleccionaron en agar Columbia con un 5% de sangre de cordero por carecer de halo de  $\beta$ -hemólisis y ser CAMP negativos en presencia de *Rhodococcus equi*. Posteriormente, se comprobó que los mutantes hubieran perdido la resistencia a eritromicina, si aún eran resistentes se continuaron las incubaciones a 37°C hasta conseguir la curación del plásmido. Por último se extrajo su ADN para confirmar la delección del gen mediante técnicas de PCR

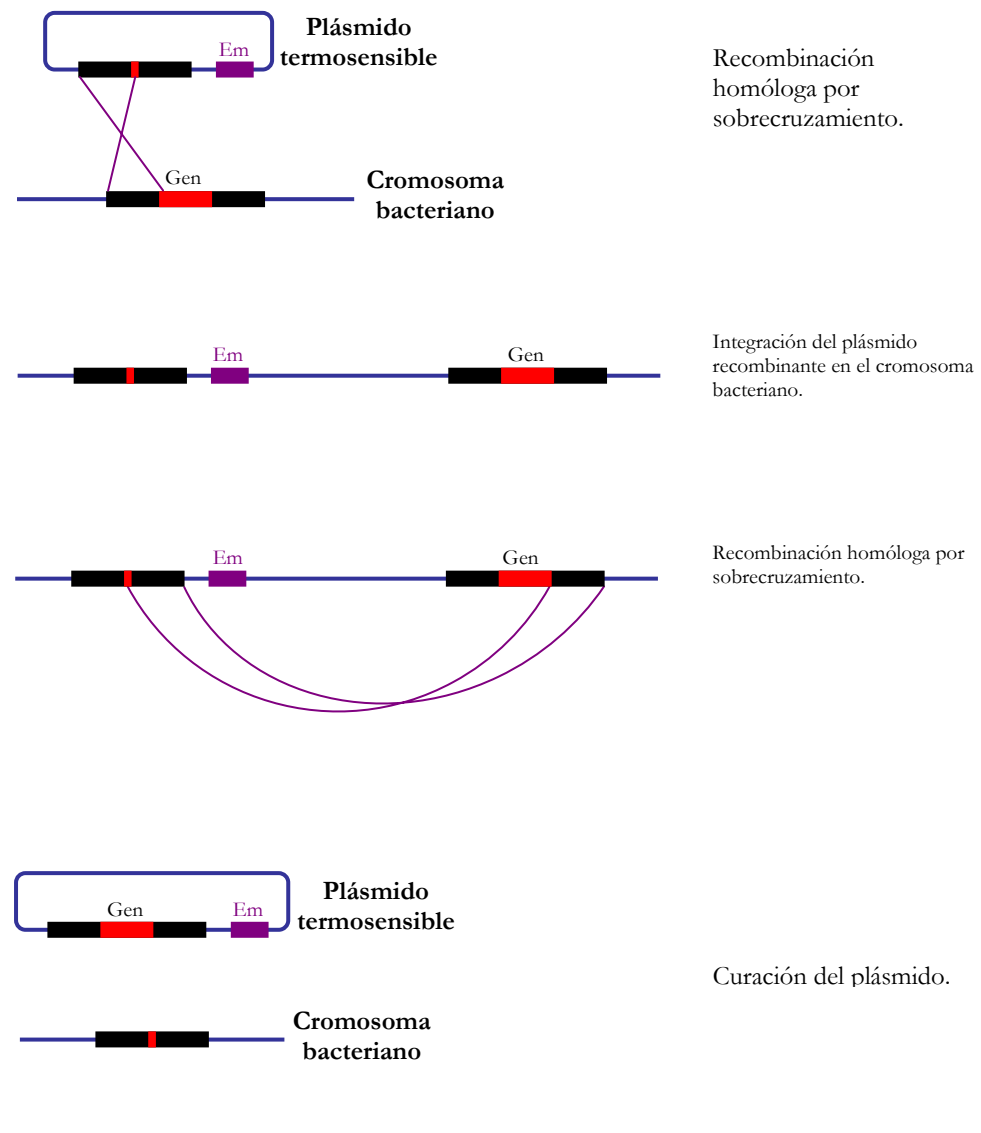
En la figura 4.3 se representa esquemáticamente el proceso de recombinación.

#### 4.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALASA.

Se realizó de forma cualitativa, poniendo en contacto las colonias bacterianas, crecidas en medio sólido, con una solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3%. Se observó si se producía o no la liberación de

burbujas, característica de la prueba de la catalasa por la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

**Figura 4.3.** Delección de un gen mediante mutagénesis por recombinación homóloga.



#### 4.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -HEMOLÍTICA.

Se determinó de forma cualitativa creciendo las colonias bacterianas en agar Columbia con un 5% de sangre de cordero. Se observó la presencia o ausencia de un amplio halo de hemólisis incompleta tras la incubación a 37°C

que se aclaraba al incubar posteriormente a 4°C (hemólisis “calor-frío”). También se comprobó la aparición o no de una reacción hemolítica cooperativa en forma de “pala” en presencia de *Rhodococcus equi* (reacción de CAMP). Ambos fenómenos son debidos a la actividad esfingomielinasa de la  $\beta$ -toxina (González-Zorn, 2001).

#### 4.11. CURVAS DE CRECIMIENTO.

Para estudiar las características de crecimiento de *S. aureus* 2386 y sus mutantes  $\Delta katA$ ,  $\Delta hlb$  y  $\Delta katA \Delta hlb$  se decidió realizar sus curvas de crecimiento. Para ello se inocularon 200  $\mu$ l de cultivos en fase estacionaria crecidos a 37°C en matraces de 250 ml que contenían 100 ml de caldo BHI (dilución 1/500). Estos cultivos se incubaron a 37°C en agitación (175 rpm) y se tomaron muestras cada hora durante las 8 primeras horas y una última muestra a las 24 horas para medir la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 600 nm. Las mediciones se realizaron sobre diluciones de cultivo, de forma que la DO nunca fuese superior a 1 y posteriormente se multiplicaron por el factor de dilución correspondiente. De esta forma se garantizaba la linealidad de los resultados.

#### 4.12. ESTUDIOS *IN VITRO* DE SUPERVIVENCIA INTRACELULAR.

Para los ensayos de supervivencia intracelular se utilizaron las líneas celulares J774A.1 y MAC-T. La línea J774A.1 (ATCC TIB-67) es una línea de macrófagos de origen murino, concretamente de la cepa BALB/c. La línea MAC-T es una línea epitelial mamaria de origen bovino (Huynh *et al.*, 1991).

##### 4.12.1. Mantenimiento de las líneas celulares.

El mantenimiento de la línea celular J774 se realizó con el medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) al que se añadió un 10% de suero fetal bovino inactivado (Gibco) y un 1% de Pen/Strep/Fungizone mix (Biowhittaker). Para

la línea celular MAC-T se utilizó el medio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM; Gibco) complementado con un 10% de suero fetal bovino, un 1% de Pen/Strep/Fungizone mix, 5 µg/ml de insulina (Sigma) y 1 µg/ml de hidrocortisona (Sigma). La incubación se hizo a una temperatura de 37°C en una estufa con un aporte constante de un 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.12.2. Preparación de las suspensiones bacterianas.**

Los cultivos se incubaron en 100 ml de caldo BHI con o sin eritromicina (5 µg/ml) durante 18-20 horas en agitación. Transcurrido este tiempo las bacterias se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 minutos, se lavaron dos veces con PBS (Oxoid), se resuspendieron en un volumen final de 20 ml de PBS con un 20% de glicerol (Panreac) y se distribuyeron en alícuotas de 1 ml, conservándose a -80°C.

Para determinar la concentración bacteriana de las alícuotas se descongeló una, se recogieron las bacterias a 4500 rpm durante 10 minutos, se lavaron dos veces y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Posteriormente se hicieron diluciones seriadas, se sembraron alícuotas de 100 µl en placas de agar BHI y se incubaron a 37°C para realizar el recuento de bacterias al día siguiente.

En el momento de realizar los ensayos, se descongelaron las alícuotas necesarias y se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se hicieron dos lavados con PBS y se resuspendieron en medio de invasión (medio de mantenimiento celular sin Pen/Strep/Fungizone mix) ajustando la concentración para una multiplicidad de infección (MOI) de 10: 1 en el caso de células J774 y de 50: 1 en el caso de MAC-T.

#### **4.12.3. Ensayos de supervivencia intracelular.**

Los ensayos se realizaron en placas de 24 pocillos. Aproximadamente dos días antes del experimento los pocillos se inocularon con 1 ml de una suspensión de células con una concentración aproximada de  $3 \times 10^4$  células/ml y

se mantuvieron a 37°C con un aporte constante de un 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente se sustituyó el medio de cultivo por medio de invasión y el día del experimento se comprobó mediante recuento de las células presentes en uno de los pocillos que hubiera aproximadamente de 5-6x10<sup>4</sup> células/pocillo.

Para llevar a cabo el ensayo se renovó, en primer lugar, el medio celular añadiendo 500 µl de medio de invasión a cada pocillo. Seguidamente se añadió a los pocillos correspondientes el mismo volumen de las suspensiones bacterianas en estudio. En este momento las placas se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos para facilitar el contacto bacteria-célula y así incrementar el porcentaje de internalización, proceso que se llevó a cabo posteriormente a una temperatura de 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> durante una hora. Pasado este tiempo se realizaron dos lavados con PBS y se añadió medio de invasión con gentamicina (100 µg/ml) para lisar las bacterias presentes en el medio extracelular. Los periodos de incubación con la gentamicina variaron en función de la medición que se fuera a hacer. El tiempo denominado cero correspondió a un periodo de una hora con la gentamicina y los tiempos denominados 4, 8 y 24 se correspondieron con un periodo de incubación con el antibiótico de 4, 8 y 24 horas, respectivamente. Tras la incubación con la gentamicina se realizaron dos lavados con PBS y se añadió Triton X-100 al 0,2% para lisar las células y liberar las bacterias supervivientes del medio intracelular. En ese momento el contenido de los pocillos se diluyó y se sembró en placas de agar BHI que fueron incubadas a 37°C durante 24 horas para realizar el recuento de UFC. El número de bacterias presentes en el tiempo cero (bacterias internalizadas) se tomó como referencia para seguir la evolución de éstas a lo largo del tiempo, expresando el número de UFC contabilizadas en cada tiempo como porcentaje de las obtenidas en el tiempo cero.

### **4.13. DETERMINACIÓN DE DOSIS LETAL 50 EN UN MODELO MURINO.**

#### **4.13.1. Animales de experimentación.**

En estos experimentos se utilizaron hembras Swiss de 4 semanas de edad y un peso aproximado de 21-23 g. Para cada cepa bacteriana se emplearon 25 ratones divididos en cinco grupos de cinco animales cada uno.

#### **4.13.2. Preparación de las suspensiones bacterianas.**

El día anterior al experimento se prepararon los cultivos bacterianos en 100 ml de caldo BHI con o sin eritromicina (5 µg/ml). Estos cultivos se mantuvieron en agitación durante 18-20 horas a 37°C para alcanzar la fase estacionaria. El día del experimento se recogieron las bacterias mediante una centrifugación a 4.500 rpm durante 10 minutos y se sometieron a dos lavados con 10 ml de PBS estéril. Finalmente se resuspendieron las bacterias en 5 ml de PBS obteniendo de esta forma la dosis más alta a inocular y a partir de ella se hicieron diluciones seriadas para preparar las demás dosis. Las dosis utilizadas oscilaron entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^{11}$  UFC/ml.

#### **4.13.3. Inoculación y determinación de la dosis letal 50.**

Cada grupo de animales se inoculó con una dosis bacteriana diferente con el objeto de determinar la dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ). La vía de inoculación fue intraperitoneal utilizándose un volumen de 0,4 ml de suspensión bacteriana (Hasegawa y Kondo, 1984). El periodo de observación tras el día de la inoculación fue de 7 días. El cálculo de la  $DL_{50}$  se realizó según el método de Reed y Muench (1938).



#### 4.14. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

Todos los experimentos realizados para los estudios de supervivencia intracelular en las líneas celulares J774A.1 y MAC-T y la determinación de dosis letal 50 en el modelo murino se hicieron por triplicado y con los datos obtenidos se estimaron las medias aritméticas con su desviación estándar. En todos los estudios se compararon los resultados de la cepa salvaje de *S. aureus* con los de cada mutante y su complementado buscando diferencias que fuesen estadísticamente significativas.

Los análisis de significación se realizaron mediante análisis de varianza y en los casos en los que el valor de  $p$  fue  $< 0,05$  se llevó a cabo un test de Tukey-Kramer para un nivel de confianza del 95%. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa informático GraphPad InStat versión 3.05.

## 5. CONCLUSIONES

---

---



### PRIMERA

La catalasa promueve la proliferación intracelular de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas MAC-T, contribuyendo a la defensa de la bacteria durante las primeras horas postinfección, pero no influye significativamente en la supervivencia de *S. aureus* en el interior de células macrofágicas murinas J774A.1. Esto revela que existen diferencias en el peso relativo del sistema citotóxico oxígeno-dependiente en la actividad bactericida de estos dos tipos celulares.

### SEGUNDA

La  $\beta$ -toxina no juega un papel relevante en la proliferación intracelular de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas, sin embargo, presenta un ligero efecto sobre la persistencia en estas células que no se produce en las células macrofágicas murinas, lo que podría estar relacionado con la diferente composición en esfingomielina de estos dos tipos celulares.

### TERCERA

La catalasa y la  $\beta$ -toxina actúan de forma sinérgica durante el ciclo de vida intracelular de *S. aureus*. La carencia simultánea de ambas enzimas se traduce en un retraso en la proliferación intracelular de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas y en un notable incremento en su persistencia en los dos tipos celulares estudiados, esto último como consecuencia, posiblemente, de una menor patogenicidad para la célula.

### CUARTA

La catalasa y la  $\beta$ -toxina, por sí solas, no juegan un papel decisivo en la virulencia de *S. aureus* en un modelo murino de infección, sin embargo, el efecto combinado de ambas enzimas juega un papel determinante en la virulencia de la bacteria en este modelo.



**RESUMEN**

---

---



*S. aureus* es un microorganismo ubicuo causante de diversas enfermedades tanto en el hombre como en los animales domésticos. En medicina veterinaria destaca principalmente por su implicación en las infecciones intramamarias, que ocasionan importantísimas pérdidas económicas en la producción bovina, ovina y caprina.

*S. aureus* ha sido considerado tradicionalmente como un patógeno extracelular, sin embargo, en los últimos años se ha puesto de manifiesto la capacidad de esta bacteria para internalizarse, sobrevivir y, en ocasiones, multiplicarse en diferentes tipos celulares, incluidas células fagocíticas. La capacidad de supervivencia intracelular que presenta *S. aureus* puede jugar un papel importante en la patogénesis contribuyendo a la persistencia de la infección en el organismo al proteger a la bacteria de la actividad del sistema inmune y de los tratamientos antibióticos y facilitar su diseminación, lo que explicaría las formas crónicas y recurrentes de las infecciones producidas por *S. aureus*, especialmente, las infecciones intramamarias.

La supervivencia intracelular de *S. aureus* puede estar determinada por su capacidad para hacer frente a la acción bactericida derivada del metabolismo oxidativo de las células eucariotas. Así, mientras que en bacterias como *M. tuberculosis*, *C. jejuni* y *H. pylori* se ha demostrado que la catalasa, una enzima responsable de la degradación del peróxido de hidrógeno generado durante este metabolismo en agua y oxígeno molecular, es un factor esencial para su supervivencia en el interior de diversos tipos celulares, en *S. aureus*, sin embargo, no se ha determinado con precisión hasta la fecha el posible papel que esta enzima pueda jugar en su patogénesis. La mayoría de las investigaciones que se han realizado hasta el momento se han basado en el estudio de aislados clínicos de cepas con diferente nivel de actividad catalasa o de mutantes catalasa negativos obtenidos por mutagénesis química o hallados de forma accidental en el laboratorio. Que tengamos conocimiento, únicamente en un estudio se ha comparado la patogenicidad de un mutante catalasa negativo obtenido mediante técnicas genéticas con la de su cepa parental, no encontrándose diferencias entre ambos en un modelo murino de abscesos cutáneos.

Igualmente, la  $\beta$ -toxina, una enzima que actúa degradando la esfingomielinina presente en las membranas celulares, podría jugar un papel importante durante el ciclo de vida intracelular de *S. aureus*, participando, al igual que otras esfingomielininas bacterianas, en la ruptura de la vacuola fagocítica, y posterior liberación de la bacteria al citoplasma de la célula infectada, y en la inducción de apoptosis celular a través de la liberación de ceramida. No obstante, la posible contribución de la



$\beta$ -toxina a la patogénesis de *S. aureus* no se ha demostrado concluyentemente hasta la fecha. La mayoría de los estudios realizados se han centrado en determinar el efecto de la  $\beta$ -toxina sobre diversos tipos celulares y tejidos, utilizando para ello toxina purificada y deben ser considerados con cautela por la posible presencia de contaminantes. Asimismo, los intentos de utilizar una estrategia genética para descifrar el papel de la  $\beta$ -toxina en la virulencia han sido escasos y poco concluyentes.

Basándonos en estos hechos, el objetivo principal que se planteó para esta Tesis Doctoral fue determinar el posible papel de la catalasa y de la  $\beta$ -toxina, así como del efecto combinado de ambas, en la patogénesis de *S. aureus*.

Para ello en una primera etapa se construyeron mutantes simples por delección de los genes *katA* (catalasa negativo) y *hly* ( $\beta$ -toxina negativo) y un mutante doble por delección de ambos genes a partir de una cepa de *S. aureus*, la 2386, que había sido aislada de un caso clínico de mastitis en ganado bovino.

Posteriormente se comparó el comportamiento de los mutantes con el de la cepa parental utilizando diversos modelos biológicos. Concretamente se estudió su capacidad de supervivencia intracelular en la línea macrofágica murina J774A.1 y en la línea epitelial mamaria bovina MAC-T y su virulencia en un modelo murino de infección experimental, mediante la estimación de la DL<sub>50</sub>.

En los ensayos realizados de supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386 en comparación con su mutante  $\Delta katA$  en la línea celular J774A.1 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas atribuibles a la catalasa. En la línea celular MAC-T, sin embargo, la ausencia de actividad catalasa afectó de forma significativa a la proliferación de la bacteria en las primeras horas postinfección. De este resultado se deduce que la catalasa promueve la proliferación intracelular de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas, contribuyendo a la defensa de la bacteria durante las primeras horas postinfección, pero no influye significativamente en la supervivencia de *S. aureus* en el interior de células macrofágicas murinas, revelando la existencia de diferencias en el peso relativo del sistema citotóxico oxígeno-dependiente en la actividad bactericida de estos dos tipos celulares.

Cuando se comparó la supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386 con la de su mutante  $\Delta hly$  en células J774A.1 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas atribuibles a la  $\beta$ -toxina. En células MAC-T, por el contrario, se observaron diferencias significativas a favor del mutante en la persistencia intracelular de la bacteria pero no en su proliferación. La  $\beta$ -toxina, por tanto, no juega un papel relevante en la proliferación intracelular de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas, presentando, sin embargo, un ligero efecto sobre la persistencia en estas células

que no se produce en las células macrofágicas murinas, lo que podría estar relacionado con la diferente composición en esfingomielina de estos dos tipos celulares.

Finalmente, en los estudios realizados sobre la capacidad de supervivencia intracelular de *S. aureus* 2386 y su mutante  $\Delta katA \Delta hlb$  se hallaron diferencias estadísticamente significativas a favor del doble mutante en las dos líneas celulares utilizadas. Estos estudios muestran que la catalasa y la  $\beta$ -toxina actúan de forma sinérgica durante el ciclo de vida intracelular de *S. aureus*, de manera que la carencia simultánea de ambas enzimas se traduce en un retraso en la proliferación intracelular de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas y en un notable incremento en su persistencia en los dos tipos celulares estudiados, esto último como consecuencia, posiblemente, de una menor patogenicidad para la célula.

Los ensayos de virulencia en el modelo murino ( $DL_{50}$ ) indican que la catalasa y la  $\beta$ -toxina, por sí solas, no juegan un papel decisivo en la virulencia de *S. aureus*, sin embargo, el efecto combinado de ambas enzimas juega un papel determinante en la virulencia de la bacteria en este modelo.

La mayor permisividad de replicación y persistencia intracelulares, así como la menor patogenicidad, mostradas por el doble mutante, le convierten en un buen candidato para su posible uso como vacuna atenuada frente a los procesos causados por *S. aureus*.



**SUMMARY**

---

---



*S. aureus* is an ubiquitous microorganism which causes several diseases both in humans and in domestic animals. In Veterinary Medicine *S. aureus* is mainly involved in intramammary infections, which cause severe economic losses in the bovine, ovine and caprine dairy produce.

Although *S. aureus* is traditionally considered as an extracellular pathogen, it has been demonstrated recently that *S. aureus* is able to be internalized, survive and, at times, multiplies inside different cell types, including phagocytic cells. The ability of *S. aureus* to survive in the eukaryotic intracellular environment may be important in bacterial pathogenesis. Internalization could promote the persistence of the infection in the host, providing a means of protection against the host immune system and antibiotics and enhancing bacterial dissemination. This would explain the recurrent and chronic forms of the *S. aureus* infections, especially, the intramammary infections.

The intracellular survival of *S. aureus* could depend on its ability to resist the bactericidal activity derived from the oxidative metabolism of eukaryotic cells. In bacteria such as *M. tuberculosis*, *C. jejuni* and *H. pylori*, catalase, an enzyme that breaks up the hydrogen peroxide generated by the oxidative metabolism into water and molecular oxygen, has been demonstrated to be an essential factor for the bacterial survival inside several cell types. However, the possible role of this enzyme in the *S. aureus* pathogenesis has not been determined precisely up to date. Most of the works done to the present are based on the study of clinical isolates with different levels of catalase or catalase negative mutants obtained by chemical mutagenesis or spontaneously in the laboratory. To the best of our knowledge, only one study has compared the pathogenicity of a catalase negative mutant obtained by genetic techniques with that of its respective wild type strain, and it did not report any differences in a murine skin abscess model of infection.

In addition,  $\beta$ -toxin, an enzyme that degrades the sphingomyelin of the cellular membranes, could play an important role during the intracellular life cycle of *S. aureus*. This enzyme, like other bacterial sphingomyelinases, could take part in the disruption of the phagocytic vacuole, and the subsequent release of bacteria into the cytosol of the infected cell, and in the induction of cellular apoptosis by ceramide generation. Nevertheless, the possible contribution of  $\beta$ -toxin to the *S. aureus* pathogenesis has not been demonstrated unequivocally up to date. Most of studies have been phocused on researching the effect of purified  $\beta$ -toxin on several cell types and tissues and they should be considered with caution because of the possible presence of contaminants.

Moreover, the attempts to utilize a genetic strategy to decipher the role of  $\beta$ -toxin in the virulence have been few and scarcely conclusive.

Based on these facts the principal objective of this Doctoral Thesis was to determine the possible role of catalase and  $\beta$ -toxin, as well as of the combined effect of both, on the pathogenesis of *S. aureus*.

Firstly, we constructed catalase-,  $\beta$ -toxin- and catalase/ $\beta$ -toxin null-mutants by deletion of *katA* and *hly* genes from *S. aureus* strain 2386, isolated from a case of mastitis in cow.

Subsequently, we compared the behavior of the mutants with their wild type strain in several biologic models. We investigated their ability to survive intracellularly in the murine macrophagic cell line J774A.1 and in the bovine mammary epithelial cell line MAC-T and their virulence in a murine model of experimental infection, by  $DL_{50}$  estimation.

In the experiments of intracellular survival of *S. aureus* 2386 in comparison with its  $\Delta katA$  mutant in the J774A.1 cell line we did not find any statistically significant difference due to the catalase. However, in the MAC-T cell line the lack of catalase activity significantly affected the bacterial proliferation during the first hours postinfection. In view of these results, we propose that catalase promotes the intracellular proliferation of *S. aureus* in bovine mammary epithelial cells, contributing to the defense of the bacteria during the first hours postinfection, but it does not significantly influence the intracellular survival of *S. aureus* in murine macrophages. This fact reveals the existence of differences in the relative weight of the oxygen-dependent cytotoxic system in the bactericidal activity of both cell types.

When we compared the intracellular survival of *S. aureus* 2386 with that of its  $\Delta hly$  mutant we did not find any statistically significant difference due to the  $\beta$ -toxin. Contrariwise, in MAC-T cells we found statistically significant differences in favor of the  $\Delta hly$  mutant in the bacterial intracellular persistence but not in the bacterial proliferation. Therefore,  $\beta$ -toxin does not play a relevant role in the intracellular proliferation of *S. aureus* in bovine mammary epithelial cells; however it has a slight effect on the bacterial persistence in these cells that does not happen in murine macrophages. This last fact could be related with the different sphingomyelin content in both cell types.

Lastly, in the experiments about the ability of intracellular survival of *S. aureus* 2386 and its  $\Delta katA \Delta hly$  mutant we found statistical significant differences in favor of the double mutant in

both cell lines studied. These experiments show that catalase and  $\beta$ -toxin act synergically during the *S. aureus* intracellular life cycle. The lack of both enzymes causes a delay in the intracellular proliferation of *S. aureus* in bovine mammary epithelial cells and a remarkable increment in its persistence in both studied cell types studied, possibly because of a decreased pathogenicity to the cell.

From the virulence assays in the murine model ( $DL_{50}$ ) it may be concluded that catalase and  $\beta$ -toxin by themselves do not play a decisive role in the virulence of *S. aureus*. However, the combined effect of both enzymes play an important role in the bacterial virulence in this model.

The higher ability of the double mutant to persist and replicate intracellularly, as well as its decreased pathogenicity, make it a good candidate for its possible use as an attenuated vaccine for the processes caused by *S. aureus*.





## **BIBLIOGRAFÍA**

---

---



- Aarestrup, F. M., H. D. Larsen, N. H. Eriksen, C. S. Elsberg and N. E. Jensen. 1999. Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *Apmis*, 107: 425-430.
- Agerer, F., A. Michel, K. Ohlsen and C. R. Hauck. 2003. Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem*, 278: 42524-42531.
- Agranoff, D. D. and S. Krishna. 1998. Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Mol Microbiol*, 28: 403-412.
- Aguilar, B., B. Amorena and M. Iturralde. 2001. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet Microbiol*, 78: 183-191.
- Ahluwalia, J., A. Tinker, L. H. Clapp, M. R. Duchon, A. Y. Abramov, S. Pope, M. Nobles and A. W. Segal. 2004. The large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel is essential for innate immunity. *Nature*, 427: 853-858.
- Ahmed, S., S. Meghji, R. J. Williams, B. Henderson, J. H. Brock and S. P. Nair. 2001. *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect Immun*, 69: 2872-2877.
- Akineden, Ö., C. Annemüller, A. A. Hassan, C. Lämmler, W. Wolter and M. Zschöck. 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8: 959-964.
- Alexander, E. H. and M. C. Hudson. 2001. Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56: 361-366.
- Almeida, R. A., K. R. Matthews, E. Cifrian, A. J. Guidry and S. P. Oliver. 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci*, 79: 1021-1026.
- Aratani, Y., F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, N. Maeda and H. Koyama. 2000. Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. *J Infect Dis*, 182: 1276-1279.
- Arvidson, S. and K. Tegmark. 2001. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, 291: 159-170.
- Bailey, C. J., B. P. Lockhart, M. B. Redpath and T. P. Smith. 1995. The epidermolytic (exfoliative) toxins of *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 184: 53-61.
- Balwit, J. M., P. van Langevelde, J. M. Vann and R. A. Proctor. 1994. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J Infect Dis*, 170: 1033-1037.

- Bantel, H., B. Sinha, W. Domschke, G. Peters, K. Schulze-Osthoff and R. U. Janicke. 2001. alpha-Toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *J Cell Biol*, 155: 637-648.
- Baselga, R., I. Albizu and B. Amorena. 1994. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Vet Microbiol*, 39: 195-204.
- Basu, M., S. J. Czinn and T. G. Blanchard. 2004. Absence of Catalase Reduces Long-Term Survival of *Helicobacter pylori* in Macrophage Phagosomes. *Helicobacter*, 9: 211-216.
- Battistoni, A., M. Ajello, S. Ammendola, F. Superti, G. Rotilio and P. Valenti. 2004. Involvement of reactive oxygen species in bacterial killing within epithelial cells. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 17: 71-76.
- Bayles, K. W., C. A. Wesson, L. E. Liou, L. K. Fox, G. A. Bohach and W. R. Trumble. 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun*, 66: 336-342.
- Beaman, B. L., C. M. Black, F. Doughty and L. Beaman. 1985. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun*, 47: 135-141.
- Bertrand, X., Y. Huguenin and D. Talon. 2002. First report of a catalase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 43: 245-246.
- Bhakdi, S. and J. Trantum-Jensen. 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev*, 55: 733-751.
- Bhakdi, S., H. Bayley, A. Valeva, I. Walev, B. Walker, M. Kehoe and M. Palmer. 1996. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol*, 165: 73-79.
- Birbes, H., S. El Bawab, Y. A. Hannun and L. M. Obeid. 2001. Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. *Faseb J*, 15: 2669-2679.
- Boulanger, V., X. Zhao and P. Lacasse. 2002. Protective effect of melatonin and catalase in bovine neutrophil-induced model of mammary cell damage. *J Dairy Sci*, 85: 562-569.
- Bramley, A. J., A. H. Patel, M. O'Reilly, R. Foster and T. J. Foster. 1989. Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. *Infect Immun*, 57: 2489-2494.
- Brouillette, E., G. Grondin, L. Shkreta, P. Lacasse and B. G. Talbot. 2003. In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb Pathog*, 35: 159-168.
- Cabiscol, E., J. Tamarit and J. Ros. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol*, 3: 3-8.
- Calvinho, L. F., W. J. Donnelly and K. Dodd. 1993. Effect of partially purified *Staphylococcus aureus* beta-haemolysin on the mammary gland of the mouse. *Zentralbl Veterinarmed B*, 40: 559-568.
- Chan, E. C., C. C. Chang, Y. S. Li, C. A. Chang, C. C. Chiou and T. Z. Wu. 2000. Purification and characterization of neutral sphingomyelinase from *Helicobacter pylori*. *Biochemistry*, 39: 4838-4845.

- Chertov, O., D. Yang, O. M. Howard and J. J. Oppenheim. 2000. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev*, 177: 68-78.
- Cheung, A. L., A. S. Bayer, G. Zhang, H. Gresham and Y. Q. Xiong. 2004. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 40: 1-9.
- Christner, R. B. and M. D. Boyle. 1996. Role of staphylokinase in the acquisition of plasmin(ogen)-dependent enzymatic activity by staphylococci. *J Infect Dis*, 173: 104-112.
- Cifrian, E., A. J. Guidry, A. J. Bramley, N. L. Norcross, F. D. Bastida-Corcuera and W. W. Marquardt. 1996. Effect of staphylococcal beta toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol*, 48: 187-198.
- Coleman, D. C., J. P. Arbuthnott, H. M. Pomeroy and T. H. Birkbeck. 1986. Cloning and expression in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* of the beta-lysin determinant from *Staphylococcus aureus*: evidence that bacteriophage conversion of beta-lysin activity is caused by insertional inactivation of the beta-lysin determinant. *Microb Pathog*, 1: 549-564.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318-1322.
- Cribier, B., G. Prevost, P. Couppie, V. Finck-Barbancon, E. Grosshans and Y. Piemont. 1992. *Staphylococcus aureus* leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. *Dermatology*, 185: 175-180.
- Cucarella, C., C. Solano, J. Valle, B. Amorena, I. Lasa and J. R. Penadés. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*, 183: 2888-2896.
- Cucarella, C., M. A. Tormo, E. Knecht, B. Amorena, I. Lasa, T. J. Foster and J. R. Penadés. 2002. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect Immun*, 70: 3180-3186.
- Cucarella, C., M. A. Tormo, C. Ubeda, M. P. Trotonda, M. Monzón, C. Peris, B. Amorena, I. Lasa and J. R. Penadés. 2004. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 72: 2177-2185.
- Curnutte, J. T., R. W. Erickson, J. Ding and J. A. Badwey. 1994. Reciprocal interactions between protein kinase C and components of the NADPH oxidase complex may regulate superoxide production by neutrophils stimulated with a phorbol ester. *J Biol Chem*, 269: 10813-10819.
- Dajcs, J. J., B. A. Thibodeaux, D. O. Girgis and R. J. O'Callaghan. 2002. Corneal virulence of *Staphylococcus aureus* in an experimental model of keratitis. *DNA Cell Biol*, 21: 375-382.
- Day, W. A., Jr., J. L. Sajecki, T. M. Pitts and L. A. Joens. 2000. Role of catalase in *Campylobacter jejuni* intracellular survival. *Infect Immun*, 68: 6337-6345.
- De Assis, M. C., A. O. Da Costa, T. C. Barja-Fidalgo and M. C. Plotkowski. 2000. Human endothelial cells are activated by interferon-gamma plus tumour necrosis factor-alpha to kill intracellular *Pseudomonas aeruginosa*. *Immunology*, 101: 271-278.
- De la Fuente, R., G. Suárez and K. H. Schleifer. 1985. *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* subsp. *nov*, the causal agent of abscess disease of sheep. *Int J Syst Bacteriol*, 35: 99-102.

- Díez, R. M. 2002. Influencia de la catalasa en la patogenicidad de *S. aureus* y *S. aureus* subsp. *anaerobius*. Tesis Doctoral. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- Dinges, M. M., P. M. Orwin and P. M. Schlievert. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, 13: 16-34.
- Dziewanowska, K., V. M. Edwards, J. R. Deringer, G. A. Bohach and D. J. Guerra. 1996. Comparison of the beta-toxins from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *Arch Biochem Biophys*, 335: 102-108.
- Dziewanowska, K., J. M. Patti, C. F. Deobald, K. W. Bayles, W. R. Trumble and G. A. Bohach. 1999. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun*, 67: 4673-4678.
- Dziewanowska, K., A. R. Carson, J. M. Patti, C. F. Deobald, K. W. Bayles and G. A. Bohach. 2000. Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. *Infect Immun*, 68: 6321-6328.
- Falzano, L., R. Rivabene, M. T. Santini, A. Fabbri and C. Fiorentini. 2001. An *Escherichia coli* cytotoxin increases superoxide anion generation via rac in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 283: 1026-1030.
- Feng, H. M. and D. H. Walker. 2000. Mechanisms of intracellular killing of *Rickettsia conorii* in infected human endothelial cells, hepatocytes, and macrophages. *Infect Immun*, 68: 6729-6736.
- Ferens, W. A. and G. A. Bohach. 2000. Persistence of *Staphylococcus aureus* on mucosal membranes: superantigens and internalization by host cells. *J Lab Clin Med*, 135: 225-230.
- Fitzgerald, J. R., S. R. Monday, T. J. Foster, G. A. Bohach, P. J. Hartigan, W. J. Meaney and C. J. Smyth. 2001. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J Bacteriol*, 183: 63-70.
- Foster, T. J. and M. Höök. 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, 6: 484-488.
- Foster, T. J. and G. A. Bohach. 2000. *Staphylococcus aureus* exotoxins. *Gram positive pathogens* (V. Fischetti, R. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy and J. I. Rood). pp: 367-378. ASM Press.
- Fowler, T., E. R. Wann, D. Joh, S. Johansson, T. J. Foster and M. Höök. 2000. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol*, 79: 672-679.
- Fowler, T., S. Johansson, K. K. Wary and M. Hook. 2003. Src kinase has a central role in in vitro cellular internalization of *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol*, 5: 417-426.
- Gemmell, C. G., R. Tree, A. Patel, M. O'Really and T. J. Foster. 1990. Susceptibility to opsonophagocytosis of protein A, alpha-haemolysin and beta-toxin deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele-replacement. *Zentralbl Bakteriologie*, 21: 273-277.
- González-Zorn, B., G. Domínguez-Bernal, M. Suárez, M. T. Ripio, Y. Vega, S. Novella and J. A. Vázquez-Boland. 1999. The *smcL* gene of *Listeria ivanovii* encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. *Mol Microbiol*, 33: 510-523.

- González-Zorn, B., G. Domínguez-Bernal, M. Suárez, M. T. Ripio, Y. Vega, S. Novella, A. Rodríguez, I. Chico, A. Tiérrez and J. A. Vázquez-Boland. 2000. SmcL, a novel membrane-damaging virulence factor in *Listeria*. *Int J Med Microbiol*, 290: 369-374.
- González-Zorn, B. 2001. Caracterización genética y papel en la patogénesis de SmcL, una esfingomielinasa C de *Listeria ivanovi*. Tesis Doctoral. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- Götz, F., S. Ahrne and M. Lindberg. 1981. Plasmid transfer and genetic recombination by protoplast fusion in staphylococci. *J Bacteriol*, 145: 74-81.
- Gravet, A., D. A. Colin, D. Keller, R. Giradot, H. Monteil and G. Prevost. 1998. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Lett*, 436: 202-208.
- Gresham, H. D., J. H. Lowrance, T. E. Caver, B. S. Wilson, A. L. Cheung and F. P. Lindberg. 2000. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol (Baltimore, Md.: 1950)*, 164: 3713-3722.
- Gudmundsson, G. H. and B. Agerberth. 1999. Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *J Immunol Methods*, 232: 45-54.
- Haas, A. and W. Goebel. 1992. Microbial strategies to prevent oxygen-dependent killing by phagocytes. *Free Radical Res Commun*, 16: 137-157.
- Haima, P., D. van Sinderen, H. Schotting, S. Bron and G. Venema. 1990. Development of a beta-galactosidase alpha-complementation system for molecular cloning in *Bacillus subtilis*. *Gene*, 86: 63-69.
- Hamill, R. J., J. M. Vann and R. A. Proctor. 1986. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect Immun*, 54: 833-836.
- Hannun, Y. A. and L. M. Obeid. 1995. Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci*, 20: 73-77.
- Hartleib, J., N. Kohler, R. B. Dickinson, G. S. Chhatwal, J. J. Sixma, O. M. Hartford, T. J. Foster, G. Peters, B. E. Kehrel and M. Herrmann. 2000. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood*, 96: 2149-2156.
- Hasegawa, N. and I. Kondo. 1984. Isolation and virulence of a caseinase- and bound coagulase-deficient mutant of *Staphylococcus aureus* BB. *J Infect Dis*, 149: 538-543.
- Hébert, A., K. Sayasith, S. Sénéchal, P. Dubreuil and J. Lagacé. 2000. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol Lett*, 193: 57-62.
- Hess, D. J., M. J. Henry-Stanley, E. A. Erickson and C. L. Wells. 2003. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* within cultured enterocytes. *J Surg Res*, 114: 42-49.
- Horinouchi, S. and B. Weisblum. 1982. Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics. *J Bacteriol*, 150: 804-814.



- Horsburgh, M. J., M. O. Clements, H. Crossley, E. Ingham and S. J. Foster. 2001a. PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 69: 3744-3754.
- Horsburgh, M. J., E. Ingham and S. J. Foster. 2001b. In *Staphylococcus aureus*, *fur* is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *J Bacteriol*, 183: 468-475.
- Horsburgh, M. J., S. J. Wharton, A. G. Cox, E. Ingham, S. Peacock and S. J. Foster. 2002. MntR modulates expression of the PerR regulon and superoxide resistance in *Staphylococcus aureus* through control of manganese uptake. *Mol Microbiol*, 44: 1269-1286.
- Hudson, M. C., W. K. Ramp, N. C. Nicholson, A. S. Williams and M. T. Nousiainen. 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb Pathog*, 19: 409-419.
- Hurst, J. K. and W. C. Barrette, Jr. 1989. Leukocytic oxygen activation and microbicidal oxidative toxins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 24: 271-328.
- Huynh, H. T., G. Robitaille and J. D. Turner. 1991. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. *Exp Cell Res*, 197: 191-199.
- Jeong, W., M.-K. Cha and I.-H. Kim. 2000. Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (Bcp) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (Tsa)/alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family. *J Biol Chem*, 275: 2924-2930.
- Jevon, M., C. Guo, B. Ma, N. Mordan, S. P. Nair, M. Harris, B. Henderson, G. Bentley and S. Meghji. 1999. Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect Immun*, 67: 2677-2681.
- Jin, T., M. Bokarewa, T. Foster, J. Mitchell, J. Higgins and A. Tarkowski. 2004. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J Immunol*, 172: 1169-1176.
- Johansen, T., F. B. Haugli, H. Ikezawa and C. Little. 1988. *Bacillus cereus* strain SE-1: nucleotide sequence of the sphingomyelinase C gene. *Nucleic Acids Res*, 16: 10370.
- Johansson, J. and P. Cossart. 2003. RNA-mediated control of virulence gene expression in bacterial pathogens. *Trends Microbiol*, 11: 280-285.
- Jonas, D., I. Walev, T. Berger, M. Liebetrau, M. Palmer and S. Bhakdi. 1994. Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. *Infect Immun*, 62: 1304-1312.
- Kahl, B. C., M. Goulian, W. van Wamel, M. Herrmann, S. M. Simon, G. Kaplan, G. Peters and A. L. Cheung. 2000. *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infect Immun*, 68: 5385-5392.
- Kanafani, H. and S. E. Martin. 1985. Catalase and superoxide dismutase activities in virulent and nonvirulent *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol*, 21: 607-610.
- Kaneko, J., K. Muramoto and Y. Kamio. 1997. Gene of LukF-PV-like component of Pantone-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* P83 is linked with *lukM*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 61: 541-544.

- Kerro Dego, O., J. E. van Dijk and H. Nederbragt. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet Q*, 24: 181-198.
- Klebanoff, S. J. 1999. Oxygen metabolites from phagocytes. *Inflammation: Basic principles and clinical correlates* (J. I. Gallin and R. Snyderman). Vol. 1. pp: 721-768. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Kuusela, P. and O. Saksela. 1990. Binding and activation of plasminogen at the surface of *Staphylococcus aureus*. Increase in affinity after conversion to the Lys form of the ligand. *Eur J Biochem*, 193: 759-765.
- Larsen, H. D., F. M. Aarestrup and N. E. Jensen. 2002. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Vet Microbiol*, 85: 61-67.
- Leitner, G., E. Lubashevsky and Z. Trainin. 2003. *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows, composition and evaluation of its immunogenicity in a mouse model. *Vet Immunol Immunopathol*, 93: 159-167.
- Lemberg, R. and J. W. Legge. 1949. *Hematin compounds and bile pigment*. pp: 415-444. Interscience. New York.
- Levade, T. and J. P. Jaffrezou. 1999. Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim Biophys Acta*, 1438: 1-17.
- Lindsay, J. A. and S. J. Foster. 1999. Interactive regulatory pathways control virulence determinant production and stability in response to environmental conditions in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet*, 262: 323-331.
- Lindsay, J. A. and S. J. Foster. 2001. *zur*: a Zn(2+)-responsive regulatory element of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 147: 1259-1266.
- Linehan, D., J. Etienne and D. Sheehan. 2003. Relationship between haemolytic and sphingomyelinase activities in a partially purified beta-like toxin from *Staphylococcus schleiferi*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 36: 95-102.
- Lorenzen, D. R., D. Gunther, J. Pandit, T. Rudel, E. Brandt and T. F. Meyer. 2000. *Neisseria gonorrhoeae* porin modifies the oxidative burst of human professional phagocytes. *Infect Immun*, 68: 6215-6222.
- Lottenberg, R., D. Minning-Wenz and M. D. Boyle. 1994. Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends Microbiol*, 2: 20-24.
- Luong, T. T. and C. Y. Lee. 2002. Overproduction of type 8 capsular polysaccharide augments *Staphylococcus aureus* virulence. *Infect Immun*, 70: 3389-3395.
- Manca, C., S. Paul, C. E. Barry, 3rd, V. H. Freedman and G. Kaplan. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro. *Infect Immun*, 67: 74-79.
- Mandell, G. L. 1975. Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. In vitro and in vivo studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. *J Clin Invest*, 55: 561-566.

- Marshall, M. J., G. A. Bohach and D. F. Boehm. 2000. Characterization of *Staphylococcus aureus* beta-toxin induced leukotoxicity. *J Nat Toxins*, 9: 125-138.
- Martin, S. E. and S. Chaven. 1987. Synthesis of catalase in *Staphylococcus aureus* MF-31. *Appl Environ Microbiol*, 53: 1207-1209.
- Massey, R. C., M. N. Kantzanou, T. Fowler, N. P. Day, K. Schofield, E. R. Wann, A. R. Berendt, M. Hook and S. J. Peacock. 2001. Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. *Cell Microbiol*, 3: 839-851.
- Mathew, J. A., Y. P. Tan, P. S. Srinivasa Rao, T. M. Lim and K. Y. Leung. 2001. *Edwardsiella tarda* mutants defective in siderophore production, motility, serum resistance and catalase activity. *Microbiology*, 147: 449-457.
- Matsunaga, T., S. Kamata, N. Kakiichi and K. Uchida. 1993. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J Vet Med Sci*, 55: 297-300.
- McKenney, D., K. L. Pouliot, Y. Wang, V. Murthy, M. Ulrich, G. Doring, J. C. Lee, D. A. Goldmann and G. B. Pier. 1999. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science*, 284: 1523-1527.
- McNamara, P. J. and R. A. Proctor. 2000. *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections. *Int J Antimicrob Agents*, 14: 117-122.
- Meier, B. 2001. Superoxide generation of phagocytes and nonphagocytic cells. *Protoplasma*, 217: 117-124.
- Mellor, I. R., D. H. Thomas and M. S. Sansom. 1988. Properties of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. *Biochim Biophys Acta*, 942: 280-294.
- Menzies, B. E. and I. Kourteva. 1998. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun*, 66: 5994-5998.
- Menzies, B. E. and I. Kourteva. 2000. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 29: 39-45.
- Messina, C. G. M., E. P. Reeves, J. Roes and A. W. Segal. 2002. Catalase negative *Staphylococcus aureus* retain virulence in mouse model of chronic granulomatous disease. *FEBS Lett*, 518: 107-110.
- Monday, S. R., G. M. Vath, W. A. Ferens, C. Deobald, J. V. Rago, P. J. Gahr, D. D. Monie, J. J. Iandolo, S. K. Chapes, W. C. Davis, D. H. Ohlendorf, P. M. Schlievert and G. A. Bohach. 1999. Unique superantigen activity of staphylococcal exfoliative toxins. *J Immunol*, 162: 4550-4559.
- Nakagawa, Y., T. Kanbe and I. Mizuguchi. 2003. Disruption of the human pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene decreases survival in mouse-model infection and elevates susceptibility to higher temperature and to detergents. *Microbiol Immunol*, 47: 395-403.
- Nilsson, I. M., O. Hartford, T. Foster and A. Tarkowski. 1999. Alpha-toxin and gamma-toxin jointly promote *Staphylococcus aureus* virulence in murine septic arthritis. *Infect Immun*, 67: 1045-1049.

- Nishihara, S., K. Seki and S. Masuda. 1985. Resistance of a mutant with an extremely low catalase production from *Staphylococcus aureus* Cowan-I strain to the bactericidal activity of human leukocytes. *Microbiol Immunol*, 29: 151-155.
- Nordhaug, M. L., L. L. Nesse, N. L. Norcross and R. Gudding. 1994a. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. *J Dairy Sci*, 77: 1267-1275.
- Nordhaug, M. L., L. L. Nesse, N. L. Norcross and R. Gudding. 1994b. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 2. Antibody response. *J Dairy Sci*, 77: 1276-1284.
- Novick, R. P. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol*, 48: 1429-1449.
- O'Callaghan, R. J., M. C. Callegan, J. M. Moreau, L. C. Green, T. J. Foster, O. M. Hartford, L. S. Engel and J. M. Hill. 1997. Specific roles of alpha-toxin and beta-toxin during *Staphylococcus aureus* corneal infection. *Infect Immun*, 65: 1571-1578.
- Ohanian, J. and V. Ohanian. 2001. Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cell Mol Life Sci*, 58: 2053-2068.
- Peacock, S. J., T. J. Foster, B. J. Cameron and A. R. Berendt. 1999. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology*, 145 ( Pt 12): 3477-3486.
- Projan, S. J., J. Kornblum, B. Kreiswirth, S. L. Moghazeh, W. Eisner and R. P. Novick. 1989. Nucleotide sequence: the beta-hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res*, 17: 3305.
- Qazi, S. N., E. Counil, J. Morrissey, C. E. Rees, A. Cockayne, K. Winzer, W. C. Chan, P. Williams and P. J. Hill. 2001. *agr* expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infect Immun*, 69: 7074-7082.
- Rainard, P., J. C. Corrales, M. B. Barrio, T. Cochard and B. Poutrel. 2003. Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF<sup>1</sup>-PV leukotoxin. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10: 272-277.
- Ramanathan, B., E. G. Davis, C. R. Ross and F. Blecha. 2002. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect*, 4: 361-372.
- Reed, L. and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg*, 27: 493-497.
- Reeves, E. P., H. Lu, H. L. Jacobs, C. G. M. Messina, S. Bolsover, G. Gabella, E. O. Potma, A. Warley, J. Roes and a. Segal et. 2002. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature*, 416: 291-297.
- Reeves, E. P., M. Nagl, J. Godovac-Zimmermann and A. W. Segal. 2003. Reassessment of the microbicidal activity of reactive oxygen species and hypochlorous acid with reference to the phagocytic vacuole of the neutrophil granulocyte. *J Med Microbiol*, 52: 643-651.
- Sanz, R., I. Marín, J. A. Ruíz-Santa-Quiteria, J. A. Orden, D. Cid, R. M. Díez, K. S. Silhadi, R. Amils and R. de la Fuente. 2000. Catalase deficiency in *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* is associated with natural loss-of-function mutations within the structural gene. *Microbiology*, 146 ( Pt 2): 465-475.

- Sawai, H. and Y. A. Hannun. 1999. Ceramide and sphingomyelinases in the regulation of stress responses. *Chem Phys Lipids*, 102: 141-147.
- Schwan, W. R., M. H. Langhorne, H. D. Ritchie and C. K. Stover. 2003. Loss of hemolysin expression in *Staphylococcus aureus agr* mutants correlates with selective survival during mixed infections in murine abscesses and wounds. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 38: 23-28.
- Segers, R. P., A. van der Drift, A. de Nijs, P. Corcione, B. A. van der Zeijst and W. Gaastra. 1990. Molecular analysis of a sphingomyelinase C gene from *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. *Infect Immun*, 58: 2177-2185.
- Seral, C., F. Van Bambeke and P. M. Tulkens. 2003. Quantitative analysis of gentamicin, azithromycin, telithromycin, ciprofloxacin, moxifloxacin, and oritavancin (LY333328) activities against intracellular *Staphylococcus aureus* in mouse J774 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 2283-2292.
- Shaw, L., E. Golonka, J. Potempa and S. J. Foster. 2004. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 150: 217-228.
- Shompole, S., K. T. Henon, L. E. Liou, K. Dziewanowska, G. A. Bohach and K. W. Bayles. 2003. Biphasic intracellular expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing. *Mol Microbiol*, 49: 919-927.
- Singh, V. K. and J. Moskovitz. 2003. Multiple methionine sulfoxide reductase genes in *Staphylococcus aureus*: expression of activity and roles in tolerance of oxidative stress. *Microbiology (Reading, England)*, 149: 2739-2747.
- Sinha, B., P. P. Francois, O. Nusse, M. Foti, O. M. Hartford, P. Vaudaux, T. J. Foster, D. P. Lew, M. Herrmann and K. H. Krause. 1999. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha 5\beta 1$ . *Cell Microbiol*, 1: 101-117.
- Sordillo, L. M., K. Shafer-Weaver and D. DeRosa. 1997. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci*, 80: 1851-1865.
- Sueyoshi, N., K. Kita, N. Okino, K. Sakaguchi, T. Nakamura and M. Ito. 2002. Molecular cloning and expression of Mn(2+)-dependent sphingomyelinase/hemolysin of an aquatic bacterium, *Pseudomonas* sp. strain TK4. *J Bacteriol*, 184: 540-546.
- Sutra, L. and B. Poutrel. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, 40: 79-89.
- Thakker, M., J. S. Park, V. Carey and J. C. Lee. 1998. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect Immun*, 66: 5183-5189.
- Titball, R. W. 1993. Bacterial phospholipases C. *Microbiol Rev*, 57: 347-366.
- Titball, R. W. 1998. Bacterial phospholipases. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*, 27: 127S-137S.
- Tollersrud, T., L. Zernichow, S. R. Andersen, K. Kenny and A. Lund. 2001. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugate and whole cell vaccines stimulate antibody responses in cattle. *Vaccine*, 19: 3896-3903.
- Tseng, H. J., C. C. Chan and E. C. Chan. 2004. Sphingomyelinase of *Helicobacter pylori*-induced cytotoxicity in AGS gastric epithelial cells via activation of JNK kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 314: 513-518.

- Tufano, M. A., F. Rossano, P. Catalanotti, G. Liguori, C. Capasso, M. T. Ceccarelli and P. Marinelli. 1994a. Immunobiological activities of *Helicobacter pylori* porins. *Infect Immun*, 62: 1392-1399.
- Tufano, M. A., F. Rossano, P. Catalanotti, G. Liguori, A. Marinelli, A. Baroni and P. Marinelli. 1994b. Properties of *Yersinia enterocolitica* porins: interference with biological functions of phagocytes, nitric oxide production and selective cytokine release. *Res Microbiol*, 145: 297-307.
- Vallejo, A. N., R. J. Pogulis and L. R. Pease. 1994. In vitro synthesis of novel genes: mutagenesis and recombination by PCR. *PCR Methods Appl*, 4: S123-130.
- Vann, J. M. and R. A. Proctor. 1988. Cytotoxic effects of ingested *Staphylococcus aureus* on bovine endothelial cells: role of *S. aureus* alpha-hemolysin. *Microb Pathog*, 4: 443-453.
- Vesga, O., M. C. Groeschel, M. F. Otten, D. W. Brar, J. M. Vann and R. A. Proctor. 1996. *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J Infect Dis*, 173: 739-742.
- von Eiff, C., C. Heilmann, R. A. Proctor, C. Woltz, G. Peters and F. Gotz. 1997. A site-directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. *J Bacteriol*, 179: 4706-4712.
- von Eiff, C., K. Becker, D. Metze, G. Lubritz, J. Hockmann, T. Schwarz and G. Peters. 2001. Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with darier's disease. *Clin Infect Dis*, 32: 1643-1647.
- Wadsworth, S. J. and H. Goldfine. 1999. *Listeria monocytogenes* phospholipase C-dependent calcium signaling modulates bacterial entry into J774 macrophage-like cells. *Infect Immun*, 67: 1770-1778.
- Walev, I., U. Weller, S. Strauch, T. Foster and S. Bhakdi. 1996. Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 64: 2974-2979.
- Ward, P. D., C. Adlam, A. C. McCartney, J. P. Arbuthnott and C. M. Thorley. 1979. A histopathological study of the effects of highly purified staphylococcal alpha and beta toxins on the lactating mammary gland and skin of the rabbit. *J Comp Pathol*, 89: 169-177.
- Watine, J., B. Friedberg, A. Le Coustumier, J. Watine, B. Friedberg and A. Le Coustumier. 2003. Comment on "first report of a catalase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*". *Diagn Microbiol Infect Dis*, 47: 451-452.
- Wesson, C. A., L. E. Liou, K. M. Todd, G. A. Bohach, W. R. Trumble and K. W. Bayles. 1998. *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect Immun*, 66: 5238-5243.
- Wesson, C. A., J. Deringer, L. E. Liou, K. W. Bayles, G. A. Bohach and W. R. Trumble. 2000. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspases 8 and 3. *Infect Immun*, 68: 2998-3001.
- Wysong, D. R., L. Christin, A. M. Sugar, P. W. Robbins and R. D. Diamond. 1998. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun*, 66: 1953-1961.

- Yamada, A., N. Tsukagoshi, S. Udaka, T. Sasaki, S. Makino, S. Nakamura, C. Little, M. Tomita and H. Ikezawa. 1988. Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for sphingomyelinase of *Bacillus cereus*. *Eur J Biochem*, 175: 213-220.
- Yamashiro, S., H. Kamohara, J. M. Wang, D. Yang, W. H. Gong and T. Yoshimura. 2001. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J Leukoc Biol*, 69: 698-704.
- Yang, D., O. Chertov and J. J. Oppenheim. 2001. Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J Leukoc Biol*, 69: 691-697.
- Yao, L., V. Bengualid, F. D. Lowy, J. J. Gibbons, V. B. Hatcher and J. W. Berman. 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect Immun*, 63: 1835-1839.
- Yarwood, J. M., J. K. McCormick and P. M. Schlievert. 2001. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 183: 1113-1123.
- Yarwood, J. M. and P. M. Schlievert. 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest*, 112: 1620-1625.
- Zhang, B., M. Centra, G. L. Cao, R. E. Ratych, J. B. Domachowske, H. L. Malech and G. M. Rosen. 1997. Are free radicals responsible for endothelial cell killing of *Staphylococcus aureus*? *Immunol Lett*, 58: 113-120.
- Zhang, P., B. Liu, G. M. Jenkins, Y. A. Hannun and L. M. Obeid. 1997. Expression of neutral sphingomyelinase identifies a distinct pool of sphingomyelin involved in apoptosis. *J Biol Chem*, 272: 9609-9612.