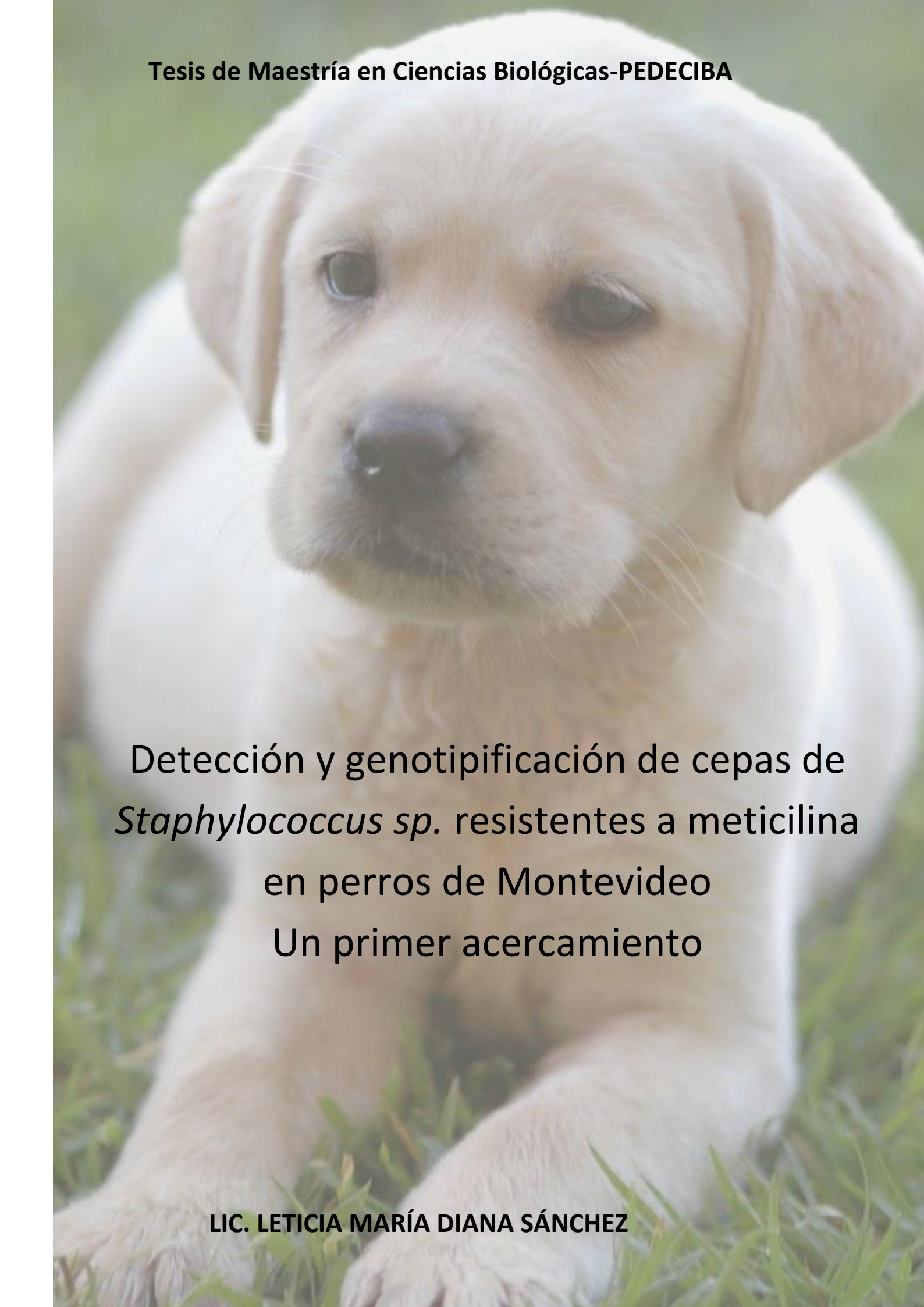




Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas-PEDECIBA

**Detección y genotipificación de cepas de
Staphylococcus sp. resistentes a meticilina
en perros de Montevideo
Un primer acercamiento**

LIC. LETICIA MARÍA DIANA SÁNCHEZ



Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas



Opción
Microbiología
PEDECIBA
Montevideo,
Uruguay Julio 2017

**Detección y genotipificación de cepas de
Staphylococcus sp. resistentes a meticilina en
perros de Montevideo.
Un primer acercamiento**

Lic. Leticia María Diana Sánchez

Orientador: Dr. Héctor Musto Mancebo

Tribunal: Dr. Héctor Romero

Dr. Raúl Platero

Dr. Rodrigo Puentes

Departamento de Ciencias Microbiológicas- Área Bacteriología

Facultad de Veterinaria – Universidad de la República



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hector Musto por siempre motivarme y apoyarme en todo lo referido a esta tesis.

A los miembros del tribunal por invertir tiempo en la corrección y brindar aportes para mejorar este y futuros trabajos.

A las Dras Cecilia Menéndez y Natalia Bartesagui del Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria UdelaR por la buena disposición para tomar las muestras día a día.

Al Dr Gustavo Varela y la Dra Lorena Pardo del Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene por el aporte de las cepas controles utilizadas en este trabajo.

A los integrantes del Departamento de Ciencias Microbiológicas de la Facultad de Veterinaria.

A la CSIC- CIDEA por financiar parte de este trabajo con la aprobación de un proyecto.

A la Faculta de Veterinaria que me ha brindado un lugar para poder crecer y formarme

A mis compañeros del día a día en el laboratorio de la facultad que aportaron con conocimiento, consejos y palabras de buena onda cuando las cosas no salían como esperaba y sobre todo por entender mi necesidad de concentración durante la redacción.

A la familia que a pesar de no entender mucho de qué se trataba esta peripecia estaba siempre.

A mis amigos científicos de la vida Ceci, Uriel, Manuel, Mariana, Jorge y Gaby.

A Tomás y Manuel que estaban ahí siempre con alegría y una sonrisa para enseñarme que se puede seguir trabajando y creciendo profesionalmente a pesar del cansancio.

A Andrés, el amor de mi vida y mi compañero en este camino que siempre me dio fuerza y me siguió en todas mis locuras sin importar nada. Gracias por tu aporte anímico y profesional.

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	8
2.1 Estafilococos coagulasa positivos (CoPS)	9
2.2 Estafilococos coagulasa negativos (CoNS)	9
2.3 Resistencia a meticilina en CoNS y CoPS	10
2.4 Genética de la resistencia a meticilina	12
2.5 Genotipificación de los estafilococos resistentes a meticilina	13
2.6 El casete cromosomal de <i>Staphylococcus</i> (SCCmec)	14
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo general	16
4.2 Objetivos específicos	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1 Recolección de muestras	17
5.2 Aislamiento bacteriano e identificación fenotípica de las cepas	18
5.3 Test de susceptibilidad a antibióticos	20
5.4 Extracción del ADN genómico	22
5.5 Detección y secuenciación del gen <i>mecA</i> por PCR en aislamientos con fenotipo resistente	22
5.6 Identificación de todas las cepas obtenidas por medio de PCR del ARNr 16S	23
5.7 Identificación de cepas en base de datos	25
5.8 Obtención de secuencias, de la base de datos y análisis filogenéticos	26
5.9 Determinación del tipo de SCCmec de las cepas de <i>Staphylococcus</i> resistentes a meticilina mediante Multiplex PCR	26
6. RESULTADOS	28
6.1 Muestreo	28
6.2 Identificación de las cepas por pruebas bioquímicas	29
6.3 Identificación de las cepas por secuenciación del ARNr 16S	31
6.4 Análisis filogenético del ARN 16S	32
6.5 Resistencia a nivel fenotípico y genotípico	35
6.6 Genotipificación	39
7. DISCUSIÓN	41
7.1 Validez del muestreo	41
7.2 Distribución filogenética de los aislamientos de <i>Staphylococcus</i> obtenidos	41

7.2.1 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	43
7.2.1.1 Variación intraespecífica	43
7.2.1.2 Resistencia a meticilina	43
7.2.2 <i>Staphylococcus argenteus</i>	44
7.2.2.1 Variación intraespecífica	45
7.2.3 <i>Staphylococcus xylosus</i>	47
7.2.3.1 Variación intraespecífica	47
7.2.4. <i>Staphylococcus sciuri</i>	49
7.2.4.1 Variación intraespecífica	49
7.2.5 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	50
7.2.5.1 Resistencia a meticilina	50
7.2.6 <i>Staphylococcus conii</i>	50
7.2.6.1 Variación intraespecífica	50
7.2.6.2 Resistencia a meticilina	51
7.2.7 <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	52
7.2.7.1 Variación intraespecífica	52
7.2.7.2 Resistencia a meticilina	52
7.2.8 <i>Staphylococcus schleiferi</i> subsp. coagulans	54
7.2.9 <i>Staphylococcus nepalensis</i>	55
7.2.10 <i>Staphylococcus arlettae</i>	56
7.3 Resistencia a antibióticos en <i>Staphylococcus</i>	57
7.3.1 Fenotipo de la resistencia	57
7.3.2 Origen de la resistencia a meticilina	58
7.3.3 Genotipificación, los CoNS como reservorios de SCCmec.....	59
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	60
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
10. ANEXOS	73
10.1 Anexo I.....	73
10.2 Anexo II.....	75
Tabla de resultados de pruebas bioquímica realizadas a las cepas seleccionadas según el criterio explicado anteriormente.	75
10.3 Anexo III.....	78
10.4 Anexo IV	80

1. RESUMEN

Desde hace mucho tiempo *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pseudintermedius* son reconocidos como patógenos de mayor importancia tanto en humanos como en animales, siendo la resistencia a antibióticos muy frecuentes en cepas de ambas especies. Varios estudios han demostrado que otras especies pertenecientes a este género podrían jugar un rol fundamental en la expansión de genes de resistencia, actuando como portadores y diseminadores de los mismos. En los últimos años han ido en ascenso los reportes de aparición de cepas de *Staphylococcus sp.* resistentes a meticilina, lo que ha tenido un gran impacto en medicina veterinaria, particularmente en pequeños animales y equinos. Las personas y los animales parecen estar compartiendo estos microorganismos, por lo que el papel que los animales pueden desempeñar como portadores es un elemento de discusión en muchos trabajos actuales.

El objetivo principal de esta tesis fue detectar y caracterizar cepas de *Staphylococcus spp.* en perros de Montevideo. Para esto, se muestrearon animales que ingresaron al Centro Hospitalario de la Facultad de Veterinaria de la UdelaR durante un período de un año. Se realizó un relevamiento primario para saber cuales son las principales especies de *Staphylococcus* que están circulando y cuales son sus perfiles de resistencia, en especial a la meticilina.

Se obtuvieron un total de 153 aislamientos, 65 de los cuales se identificaron mediante secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S. Las diferentes cepas de *Staphylococcus* aisladas pertenecieron a las siguientes especies: *pseudintermedius*, *argenteus*, *cohnii*, *haemolyticus*, *epidermidis*, *arlettae*, *scheiffleri*, *xylosus* y *nepalensis*. Por medio de análisis filogenéticos se pudo determinar, para algunas especies, la cantidad de linajes que podrían estar circulando.

Se obtuvieron diez cepas que se catalogaron como MDR (multi drug resistance) ya que mostraron fenotipo resistente a más de tres clases de antibióticos. Por otro lado los perfiles de resistencia indicaron que siete cepas fueron resistentes a meticilina portando el gen *mecA* que codifica para una PBP alternativa. Las siete cepas resistentes a meticilina fueron genotipificadas mediante el análisis del SCCmec dentro de los tipos III, IV y V.

Este estudio representa el primer trabajo que se realiza en el país con respecto al relevamiento de este género y su resistencia a antibióticos en perros.

2. INTRODUCCIÓN

El género *Staphylococcus* incluye una amplia variedad de especies bacterianas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza colonizando mamíferos y aves. Se encuentran normalmente formando parte de la microflora natural de la piel, del tracto respiratorio, del tracto urogenital y transitoriamente del tracto digestivo tanto en animales como en el hombre (Quinn 2005).

Muchas de las especies pertenecientes a este género son patógenos oportunistas de varios animales y el hombre, pudiendo transmitirse fácilmente por contacto o fomites. Los estafilococos no son grandes invasores y son capaces de formar colonias en los epitelios intactos de animales sanos sin causar ningún tipo de enfermedad, por lo que podemos decir que, como regla general, los animales sanos son portadores subclínicos de estafilococos (Quinn 2005).

Invaden el epitelio cuando este fue dañado por agresiones traumáticas (cortes), por infecciones previas con otros patógenos (demodicosis, dermatofitosis) o por trastornos clínicos. Las infecciones por estos patógenos generalmente se presentan como agudas, febriles y están asociadas a la formación de abscesos supurativos (Greene 1993).

La virulencia de los estafilococos está ampliamente relacionada a la presencia de determinados componentes de la envoltura celular así como también a la producción de exotoxinas y enzimas involucradas en el proceso de infección generando muchos cambios biológicos a nivel tisular en el huésped (Greene 1993).

Las bacterias pertenecientes a este género son cocos Gram positivos con un tamaño aproximado de 0.8 a 1 μm de diámetro, que al microscopio óptico se observan en grupos irregulares parecidos a racimos de uvas. Son bacterias anaerobias facultativas, halófilas, catalasa positivas, inmóviles, no esporuladas, con un metabolismo fermentativo y oxidasa negativas, además, son ampliamente resistentes a la sequedad y la desinfección.

Este género bacteriano presenta 45 especies y 21 subespecies que se clasifican dentro de dos grupos teniendo en cuenta su capacidad de producir la enzima coagulasa: estafilococos coagulasa negativos (CoNS) y estafilococos coagulasa positivos (CoPS) (Bergeron et al. 2011).

2.1 Estafilococos coagulasa positivos (CoPS)

Los CoPS normalmente se encuentran como comensales tanto en animales como en el hombre, considerándose patógenos oportunistas. Las infecciones por estos microorganismos pueden ser de origen endógeno o exógeno y las más importantes en animales domésticos incluyen: piemia por garrapatas (en corderos), epidermitis exudativa (en cerdos), botriomicosis (en caballos y cerdos), piodermas, otitis externas y otros cuadros supurativos (en perros y gatos) (Quinn 2005).

Algunas de las especies más relevantes que pueden causar infecciones en perros son: *S. intermedius*, *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. pseudintermedius*, *S. lutrae*, *S. delphini* y *S. hyicus* (Quinn 2005).

Es sabido que *S. aureus* está ampliamente distribuido en las infecciones intrahospitalarias y comunitarias en humanos, sin embargo, actualmente se lo reconoce como un patógeno cuya frecuencia de aparición va en aumento en animales de compañía (Hanselman et al. 2009; Devriese et al. 2005; Morris et al. 2006).

S. pseudintermedius es una nueva especie de CoPS identificada en el año 2005 (Van Hoovels et al. 2006). Desde entonces ha sido reconocido como un patógeno oportunista de una gran variedad de animales, en especial perros, siendo responsable de enfermedades como pioderma, otitis externas, infecciones urinarias, infecciones de partes blandas y otros tipos de infecciones en mascotas (Bannoehr & Guardabassi 2012). Algunos trabajos recientes indican que esta especie ha logrado colonizar al hombre y producir infecciones de manera ocasional (Stegmann et al. 2010; van Duijkeren, Kamphuis, et al. 2011; Somayaji et al. 2016; Lozano et al. 2017).

2.2 Estafilococos coagulasa negativos (CoNS)

El grupo de los CoNS incluye un gran número de especies, muchas de las cuales son patógenos oportunistas de animales o humanos y no producen toxinas agresivas (Otto 2004; 2009). Este grupo está representado por más de 40 especies diferentes dentro de las que se encuentran: *S. saprophyticus*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. carnosus*, *S. xilosus* entre otros (Greene 1993).

Podemos considerar que tanto los CoPS como los CoNS podrían ser potenciales patógenos zoonóticos de interés en medicina humana y veterinaria. En este sentido, no es claro el papel relativo que los animales pueden desempeñar como portadores y

transmisores de algunas cepas de estas especies para el hombre, siendo un elemento de discusión en la mayoría de los trabajos actuales (Couto et al. 2016, Godoy et al. 2016). Esta es una de las razones por las que la OIE y la OMS recomiendan avanzar en el concepto de “una salud” o “salud global” que estudie las interacciones humano-animal (www.oie.int).

2.3 Resistencia a meticilina en CoNS y CoPS

A lo largo de la historia se les ha prestado mayor importancia, en cuanto a la resistencia a meticilina, a dos CoPS principales, el *S. aureus* y el *S. pseudintermedius*.

La proliferación y diseminación al medio de estos microorganismos resistentes a antibióticos es uno de los problemas actuales de mayor relevancia tanto en medicina humana como veterinaria. Los tratamientos empleados en medicina humana basados tanto en el uso de penicilinas (por ejemplo meticilina o la oxacilina) y en cefalosporinas de primera generación, han llevado a una fuerte presión selectiva favoreciendo la emergencia de cepas resistentes a este tipo de antibióticos.

La meticilina fue introducida en la medicina humana a finales de los 50' para tratar infecciones por *S. aureus*. Diez años después, en el año 1961, Jevons reportó el primer caso de infección por una cepa de *S. aureus* con resistencia a la meticilina en humanos. Luego de este reporte los casos han ido en aumento en todos los demás países de Europa (Eriksen 1961). Durante los años 70's las cepas de *S. aureus* meticilino resistentes (MRSA por sus siglas en inglés) comenzaron a emerger como un problema serio en los Estados Unidos y para los 90's ya representaban un tema de máxima prioridad para la salud en todo el mundo (Ayliffe 1997). Asimismo los casos de infecciones por *S. pseudintermedius* meticilino resistente (MRSP por su sigla en inglés) también han aumentado drásticamente, además MRSP es también resistente a una gran variedad de antibióticos utilizados comúnmente en medicina veterinaria y aparentemente se comportaría como un gran reservorio de genes de resistencia a antibióticos (Perreten et al. 2010).

El MRSA y el MRSP son considerados los estafilococos emergentes de mayor importancia debido a los cuadros que producen, su epidemiología y sobre todo por la dificultad que supone la obtención de un tratamiento adecuado (van den Bogaard & Stobberingh 2000; Duquette & Nuttall 2004; Bywater 2004).

Esta situación no se da solo a nivel de medicina humana, siendo frecuente también en medicina veterinaria. En poblaciones animales han sido descritas una gran cantidad de cepas de MRSA y MRSP específicamente resistentes a oxacilina y vancomicina, con el consiguiente riesgo que implica esto en la salud pública.

En el año 1972 se reportó el primer aislamiento de MRSA en animales a partir de muestras de leche de vacas que tenían mastitis (Devriese et al. 1972). Al igual que pasó en humanos, desde este primer caso hasta el presente se han reportado un importante número de cepas de MRSA en una gran variedad de especies domésticas como perros, gatos, cerdos, caballos, ovejas y aves (Devriese et al. 1972; Leonard & Markey 2008). Es ampliamente aceptado que la resistencia de estas cepas a la meticilina fue adquirida a través de la transferencia horizontal de genes con otras bacterias resistentes. Esto las convierte en potenciales reservorios de resistencia para el hombre o para otras poblaciones de animales.

La posibilidad de que tanto perros como gatos actúen como una fuente de infecciones zoonóticas del MRSA y del MRSP fue propuesta hace muchos años atrás (Mann 1959). Inclusive varios reportes científicos han determinado que en muchos casos no existe diferencia entre los perfiles de resistencia y las características genéticas de las cepas de MRSA encontradas en humanos y sus mascotas (Leonard & Markey 2008).

Por otro lado el aumento en el reporte de CoNS como responsables de infecciones ha ido en aumento llevando a un mayor interés en cuanto a la presencia de mecanismos de resistencia (Piette & Verschraegen 2009).

Las diferentes especies de estafilococos (CoPS y CoNS) que comparten un nicho, ya sea en la superficie de un animal o un humano, están en contacto continuo. Esto lleva a que genes de resistencia y de virulencia puedan ser transferidos desde una especie a otra por mecanismos de transferencia horizontal (Holden et al. 2004; Otto 2013).

Los CoNS son considerados un gran reservorio de genes de resistencia a diferentes antibióticos y tienen una gran potencialidad de transferir estos genes a otras especies de estafilococos patógenos (Czekaj et al. 2015). Por ejemplo el *S. haemolyticus* resistente a meticilina ha sido reportado tanto en aislamientos de humanos (Barros et al. 2012) como de perros, así como también, se han reportado una gran cantidad de cepas de *S. epidermidis* resistentes a meticilina que están ampliamente diseminadas (Piette & Verschraegen 2009, Vanderhaeghen et al. 2012).

Por lo antes dicho es claro que las poblaciones animales podrían cumplir un rol fundamental en la transmisión y mantenimiento de cepas de *Staphylococcus sp.* resistentes a meticilina y otros antibióticos. Esta transmisión sería principalmente a los humanos debido a la interacción permanente entre ambos.

2.4 Genética de la resistencia a meticilina

La familia de los antibióticos β -lactámicos, a la cual pertenecen la penicilina, meticilina y oxacilina, entre otros, fue y es una de las más utilizadas en la clínica. En la práctica la meticilina dejó de ser usada debido a que se sintetizaron penicilinas similares y más estables, como la oxacilina, flucloxacilina y dicloxacilina. De hecho, actualmente se determina la resistencia a meticilina indirectamente, mediante la resistencia a oxacilina.

Los β -lactámicos son compuestos bactericidas que actúan lentamente y de manera casi independiente de la concentración plasmática. Por otra parte presentan poca toxicidad y tienen un amplio rango terapéutico (Gram positivos, Gram negativos y espiroquetas). Estos antibióticos actúan directamente en la síntesis de la pared celular bacteriana, inhibiendo específicamente el último paso de este proceso, la transpeptidación. Para ello deben llegar a su molécula diana, una proteína denominada PBP (*penicilin-binding protein* o proteína de unión a penicilina), situada en la parte externa de la membrana citoplasmática. Las PBP son enzimas que catalizan las reacciones pertenecientes al proceso de transpeptidación durante la síntesis de la pared celular.

La resistencia a meticilina (y oxacilina) por parte de los *Staphylococcus sp.* es debida a la presencia de una proteína PBP de baja afinidad por los β -lactámicos, denominada PBP 2a o PBP 2' para diferenciarla de la PBP estándar. El gen que codifica para esta proteína es el *mecA* que está presente en la mayoría de las cepas de estafilococos resistentes pero ausente en las cepas sensibles y localizado dentro de un elemento genético móvil llamado SCC*mec* (*Staphylococcal cassette chromosomal*) (Mann 1959).

Este gen está ampliamente distribuido y muy conservado entre cepas resistentes, incluso aparece conservado en otros estafilococos coagulasa negativos resistentes a meticilina (Gradeliski et al. 2001).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar su origen, en un principio se especuló que el gen *mecA* se podría haber originado en una cepa diferente a *S. aureus* (Berger-Bächi 1994), incluso pudo ser adquirido a partir de alguna especie de estafilococo coagulasa negativo (Archer & Niemeyer 1994).

2.5 Genotipificación de los estafilococos resistentes a meticilina

Hasta el momento se han desarrollado varias técnicas de genotipificación de las cepas de estafilococos resistentes a meticilina para complementar los estudios epidemiológicos de estos microorganismos. Estas técnicas incluyen electroforesis de campo pulsado (PFGE), tipificación por secuenciación de multilocus (MLST) y la más reciente técnica basada en la determinación del tipo de casete cromosomal *SCCmec*.

La PFGE se basa en la digestión del ADN cromosómico con una enzima de restricción con baja frecuencia de corte, generando un número variable de fragmentos de diferente tamaño que se separan en geles de agarosa. La separación electroforética se realiza en campo pulsado y los perfiles de ADN (pulsotipos) presentan entre 10 y 30 fragmentos de ADN con un tamaño variable, que oscila entre 10 y 800 kb. Esta técnica ha mostrado ser altamente reproducible y con un poder de discriminación elevado, por lo que se ha convertido en el método de referencia de tipificación para la mayoría de las bacterias con interés epidemiológico (Goering 2010).

Por otro lado el MLST consiste en la amplificación y posterior secuenciación de fragmentos internos de siete genes housekeeping. Para cada uno de los loci con diferentes secuencias se le asigna un número arbitrario, y los siete números asignados forman el perfil alélico o el secuenciotipo (ST) (Enright et al. 2000).

Por último la genotipificación por determinación del tipo de casete cromosomal, o *SCCmec*, se basa en la realización de una múltiplex PCR que se interpreta según el patrón de bandas obtenido, pudiendo genotipificar los estafilococos en varios tipos.

Se han propuesto una gran cantidad de protocolos de Multiplex PCR para lograr la tipificación del *SCCmec* de los MRSA, entre ellos en el 2001 Olivera y Lancastre propusieron una multiplex PCR para la tipificación pero la técnica no arrojó buenos resultados, principalmente debido a la complejidad de la interpretación y otras dificultades propias del método (Katayama et al. 2001; Oliveira & de Lancastre 2002). En base a este trabajo en el año 2005 Zhang y col (Zhang et al. 2005) y en el año 2007 Boye y col (Boye et al. 2007a) estandarizaron una multiplex más sencilla de realizar y

de interpretar, detectando de esta manera los diferentes tipos de SCC*mec*. Estos autores diseñaron cuatro juegos de primers que se utilizan en la multiplex PCR y el tipo de SCC*mec* es determinado en base al patrón de bandas obtenido (Boye et al. 2007a). Hasta el momento se han identificado 11 tipos de SCC*mec* para cepas de *Staphylococcus aureus* (www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html)

2.6 El casete cromosomal de *Staphylococcus* (SCC*mec*)

Uno de los elementos móviles más estudiados de los estafilococos resistentes a meticilina es el SCC*mec* el cual tiene un largo entre 21 y 67 Kb y, como se mencionó anteriormente, dentro de él se encuentra al gen que brinda resistencia a meticilina (gen *mecA*) (Katayama et al. 2000; Ito et al. 1999). El SCC*mec* está compuesto por el complejo *ccr* y el complejo *mec*. Este último porta, además del gen *mecA* (resistencia a metilcilina), genes reguladores (*mecRI*, *mecI* y Δ *mecRI*) y secuencias de inserción (*IS431* y *IS1272*) y ha sido clasificado en seis clases diferentes: A, B, C1, C2, D y E (Katayama et al. 2001).

Por otro lado el complejo *ccr* porta genes (*ccrC* o el par *ccrA* y *ccrB*) que codifican para recombinasas que participan en la integración o escisión del casete dentro y desde el cromosoma. Además, el SCC*mec* puede contener otra serie de genes de resistencia y varios elementos genéticos móviles como, secuencias de inserción, transposones y plásmidos (Hanssen & Ericson Sollid 2006), (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) 2009) (Chambers & Deleo 2009)). Finalmente, las regiones vecinas a los complejos *ccr* y *mec* son denominadas regiones J (J1-J3) (Katayama et al. 2000).

Los diferentes tipos de SCC*mec* han sido caracterizados y clasificados teniendo en cuenta los genes presentes en ambos complejos *ccr* y *mec*, habiéndose identificado 11 tipos (I-XI) hasta el momento (Katayama et al. 2000; Ito et al. 2001; Okuma et al. 2002; Zong et al. 2011). Además se han determinado variantes dentro del tipo IV (IVa, IVb, IVc, y IVd) teniendo en cuenta diferencias en las secuencias de las regiones J (Hanssen & Ericson Sollid 2006). Un esquema simplificado de la estructura de los SCC*mec* más comúnmente encontrados en las cepas de estafilococos resistentes a meticilina se muestra en la Fig.1.

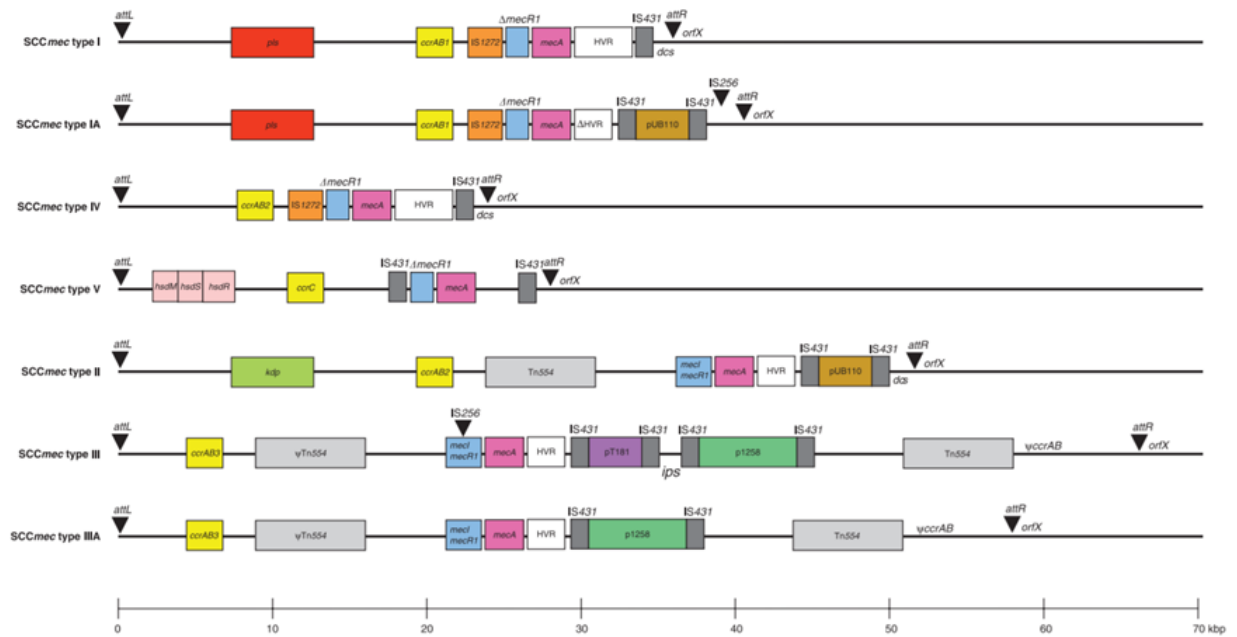


Figura.1. SCCmec del tipo I-V presentes en estafilococos (Hanssen & Ericson Sollid 2006). *Pls*: proteína superficial sensible a la plasmidina; *kdp*: operón *kdp* involucrado en el transporte de potasio a través de la membrana celular dependiente de ATP; HVR: región hipervariable; *dcs*: secuencia downstream conservada en SCCmec tipo I, II y IV entre la una copia de IS431 y el *orfX*; IS: secuencias de inserción; *ccr*: genes de recombinación

Es habitual encontrar cepas de CoNS resistentes a meticilina en aislamientos de diferentes especies por lo que se podría pensar que estas cepas serían una fuente de reserva de diferentes SCCmec, disponibles para ser pasados a cepas patógenas como el *S. aureus* u otros CoPS (Hanssen & Ericson Sollid 2006). En este sentido Hiramatsu et al. en el 2001 propusieron al SCCmec tipo IV presente en *S. epidermidis* como el responsable de la modificación de *S. aureus* comensal a MRSA (Hiramatsu et al. 2001).

Varios autores han determinado que los SCCmec presentes en cepas CoNS resistentes a meticilina son más diversos que los SCCmec de cepas CoPS resistentes, inclusive se han encontrado, y se siguen encontrando, nuevas variantes dentro de los genes que codifican para las recombinasas (*ccr*) (Ruppé et al. 2009); (Zhang et al. 2009).

Por todo lo antes mencionado queda claro que conocer la situación de resistencia de cepas de *Staphylococcus* sp. aisladas de animales de compañía es un primer paso fundamental para entender el papel que estos pueden desempeñar en el mantenimiento y transmisión de cepas resistentes. Hasta el momento no se han realizado estudios de este tipo en caninos en el Uruguay, lo cual es llamativo dado el rol de la enfermedad y los

antecedentes internacionales que relacionan al contagio entre animales y humanos en el mundo.

3. HIPÓTESIS

Este trabajo plantea las siguientes hipótesis: i) existe circulación de diferentes especies de *Staphylococcus* sp. en perros de Montevideo, mayoritariamente aquellas aisladas comúnmente a partir de este animal (*S. xylosus*, *S. pseudintermedius*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*), ii) la frecuencia de resistencia a meticilina es comparable a datos obtenidos de estudios en la región y el mundo, iii) las cepas resistentes pertenecen a los genotipos mayoritarios descritos hasta el momento, clasificados según el casete cromosomal que presentan y iv) los genotipos presentan una asociación especie específica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Detectar y caracterizar cepas de *Staphylococcus* en perros sanos y con sintomatología característica (piodermia y/o otitis) muestreados en Montevideo durante un período de un año (Mayo de 2016 - Mayo de 2017).

4.2 Objetivos específicos

- Muestrear al menos 100 perros ingresados al hospital veterinario, en todos los casos tomar hisopado faríngeo, perianal y de lesiones, si existieran.
- Detectar la presencia y aislar cepas de *Staphylococcus* sp. resistentes a meticilina.
- Determinar los perfiles de susceptibilidad a antibióticos de los aislamientos.
- Identificar todas las cepas resistentes mediante pruebas bioquímicas y secuenciación del ARNr 16S.
- Detectar la presencia del gen *mecA* que confiere la resistencia a meticilina.
- Determinar el tipo de casete SCC*mec* de todas las cepas resistentes, *mecA* positivas, mediante Multiplex PCR.
- Generar una colección de cepas de *Staphylococcus* resistentes y no resistentes.

- Obtener un árbol filogenético a partir del ARNr 16S que permita ubicar las cepas aisladas en Uruguay en los distintos linajes dentro de las especies en estudio.
- Realizar un análisis filogenético a partir de la secuencia de gen *mecA* para analizar el posible origen de la resistencia.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Recolección de muestras

El muestreo se realizó durante el período entre mayo de 2016 y mayo de 2017 en el hospital veterinario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República. Se consideraron dos grupos de perros. Por un lado se tomaron muestras de perros sanos siendo estos aquellos que al momento de ingresar al hospital presentaban un examen objetivo general libre de patologías de piel. A estos animales se les realizó un hisopado de la faringe y de la zona perianal. Por otro lado se tomaron muestras de perros que ingresaron al hospital con afecciones de la piel (piodermia) y/o otitis, ya que son afecciones donde es posible encontrar especies de *Staphylococcus* patógenas. Se les realizó un hisopado de faringe y zona perianal así como también de la lesión descrita por el médico veterinario tratante.

Todas las muestras fueron tomadas por profesionales veterinarios que desempeñaban funciones en el Centro Hospitalario mencionado. Estos fueron los responsables de determinar características clínicas relevantes para definir el tipo de toma de muestra, es decir si el paciente pertenecía al grupo sano o afectado.

Se utilizaron para muestrear hisopos estériles que fueron refrigerados hasta su llegada al laboratorio de microbiología. Una vez en el laboratorio, cada hisopo fue identificado con un número y estaba acompañado de una ficha con los datos del animal que se consideraron relevantes para los análisis posteriores. Estos datos eran: datos del propietario (barrio, nombre, dirección) y del paciente (raza, sexo, edad), anamnesis sanitaria (vacunaciones), anamnesis ambiental (relacionamiento con los dueños y con otros animales), tratamiento con antibióticos y descripción de la lesión (si hubiese).

5.2 Aislamiento bacteriano e identificación fenotípica de las cepas

Cada uno de los hisopos se cultivaron en medio líquido de enriquecimiento Tryptic Soy Broth (TSB. OXOID) con un 10% NaCl y se incubaron a 35 - 37°C durante 18 a 24Hs. Con el uso de TSB 10% NaCl se realizó una primera selección hacia el género *Staphylococcus* ya que estas bacterias, por ser halotolerantes, tienden a crecer muy bien en altas concentraciones de sal.

De cada uno de estos caldos se realizó un aislamiento en Manitol Sal Agar (MSA. OXOID) y se incubó durante 24 - 48 hs a 35 - 37°C. El medio MSA es un medio selectivo y diferencial para el género *Staphylococcus*. Es un medio que contiene alta concentración de sal lo que le brinda selectividad. Por otro lado gracias a un indicador de pH, rojo fenol, podemos determinar si la cepa cultivada en el medio fermenta o no el manitol. La fermentación del manitol se evidencia cuando el medio de cultivo con el crecimiento vira al color amarillo por el descenso de pH, resultando así una cepa manitol positiva (MSA+), una cepa que no fermenta el manitol se observará sin cambio de color en el medio siendo manitol negativa (MSA-).

Todas las cepas MSA+ que provenían de hisopado faríngeo, perianal y piel así como las cepas MSA- que provenían de piel se aislaron en placas de TSA (Trypticase Soy Agar) con el objetivo de obtener un cultivo puro para las pruebas posteriores. Las cepas MSA- que provenían de hisopados faríngeos y perianales también se aislaron en TSA pero solo con el objetivo de conservarlas a -80°C e incluirlas en el cepario del área.

Este criterio de selección de cepas se basó en la mayor probabilidad de encontrar cepas de *Staphylococcus* patógenos resistentes en lesiones de piel, sin importar si eran MSA+ o MSA-.

A todas las cepas se les realizó la tinción de Gram, para confirmar presencia de cocos Gram positivos, y la prueba de la catalasa. Esta determina la presencia de la enzima catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno (producto de deshecho de la respiración y tóxico para la célula) en agua y oxígeno en forma de gas.

La prueba se realiza colocando una gota de agua oxigenada 10 volúmenes sobre una placa de petri vacía o sobre un portaobjeto. Seguidamente se toma con el ansa una colonia a partir de un cultivo puro y se suspende la misma sobre la gota de peróxido, la aparición de burbujas indica un resultado positivo. Es una prueba que permite diferenciar de manera muy rápida entre un *Staphylococcus* (catalasa +) de un

Streptococcus (catalasa -).

Solamente a las cepas seleccionadas según el criterio descrito anteriormente se les realizó las siguientes pruebas bioquímicas: coagulasa en tubo, producción de acetoina (VP) y test de β -galactosidasa (sembrando en medio TSA con X-Gal) (Tse et al. 2012)

Coagulasa en tubo: algunas especies de *Staphylococcus* producen una enzima llamada coagulasa que une el fibrinógeno generando la coagulación del plasma. Esto lleva a la formación de una cubierta alrededor de la célula bacteriana que la protege del sistema inmune del huésped potenciando su capacidad patógena. Para realizar esta prueba se utilizó BBL Coagulase Plasma, Rabbit con EDTA® y para el procedimiento se siguieron las indicaciones del fabricante.

Prueba de producción de acetoina (VP) y test de β -galactosidasa: las pruebas de Voges Proskauer (VP) y detección de la enzima β -galactosidasa se realizaron con el objetivo de hacer una primera aproximación fenotípica a las diferentes especies de *Staphylococcus* ya que existen variaciones para estas dos pruebas en las diferentes especies. Las bacterias fermentan los azúcares por diferentes vías, una de ellas es la vía butanodiólica la cual produce como resultado final acetoina que se detecta en la prueba de VP. Para la realización de esta prueba se sembró una colonia en 1 mL de caldo Rojo Metilo-Voges Proskauer (RMVP) y se incubó durante 24 hs a 37°C. Luego se reveló colocando 12 gotas ($\approx$ 0,6 mL) de α -naftol al 5% en etanol y 4 gotas ($\approx$ 0,2 mL) de KOH al 40%, se agitó y después de 10-15 minutos se observó la aparición o no de un color rojo en la superficie del tubo. Este color rojo luego de revelar la prueba indica que esa bacteria fermenta azúcares por la vía butanodiólica.

Por otro lado la enzima β -galactosidasa cataliza la hidrólisis de galactósidos a monosacáridos. Uno de los galactósidos más comunes utilizados como fuente de energía por las bacterias es la lactosa. Algunas especies de estafilococos son capaces de degradar la lactosa por la presencia de esta enzima y otras no por carecer de ellas. Para la detección de esta enzima comúnmente se utilizan discos de ONPG. Estos discos están impregnados en orto-nitrofenilgalactopiranosido el cual es degradado por la β -galactosidasa liberándose o-nitro-fenol un compuesto de color amarillo dando una reacción positiva. Se ha reportado que algunas cepas de *Staphylococcus aureus* dan positivas a la prueba de ONPG cuando deberían dar negativas (Tse et al. 2012). Esto ocurre porque estas cepas producen un compuesto llamado 2-aminophenoxazin-3-one durante su metabolismo que genera una reacción con el disco de ONPG y cambia de color a amarillo. Por esta razón para este trabajo se realizó la detección de esta enzima

sembrando las cepas en placas de TSA con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido). Este compuesto es hidrolizado por la β -galactosidasa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol. Este último es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble y por ende el crecimiento bacteriano se observa de color azul cuando crece.

5.3 Test de susceptibilidad a antibióticos

Los análisis de susceptibilidad se realizaron por medio de antibiogramas siguiendo el método de Disco difusión de Kirby – Bauer bajo las recomendaciones del Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). Se analizó la susceptibilidad a 10 antibióticos (Rubin et al. 2011) utilizando como controles positivos de resistencia a meticilina una cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) y una cepa de *Staphylococcus pseudintermedius* meticilino resistente (MRSP) cedidas por el Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Higiene de la Universidad de la República, como control negativo se utilizó la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Los antibióticos se seleccionaron teniendo en cuenta el uso que se les da en medicina veterinaria y también con el objetivo de buscar resistencias nuevas en las cepas aisladas. Los antibióticos seleccionados fueron los siguientes: oxacilina, penicilina, amoxicilina/clavulánico, ampicilina/sulbactam, cefalotina, enrofloxacin, gentamicina, vancomicina, eritromicina y kanamicina.

La **penicilina** es un antibiótico β -lactámico que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, de esta manera genera una inestabilidad en la célula dada por un aumento en la permeabilidad. La presentación en general es parenteral ya que se inactiva con el pH ácido del estómago, viene generalmente combinada con un aminoglucósido como la estreptomicina ya que ambos antibióticos actúan sinérgicamente. El espectro de acción de las penicilinas naturales son las bacterias Gram positivas y los anaerobios.

La **oxacilina**, también un β -lactámico, es un derivado de la meticilina que puede administrarse por vía oral ya que es más estable que esta porque no se inactiva por el pH ácido del estómago. En este trabajo se utiliza principalmente con el objetivo de determinar la resistencia a meticilina. En nuestro país no es común el uso de oxacilina en la medicina veterinaria.

La **amoxicilina/clavulánico** y la **ampicilina/sulbactam** son una combinación de

un antibiótico β -lactámico con un inhibidor de β -lactamasa. Tanto el clavulanato como el sulbactam extienden el espectro del antibiótico que acompañan. La amoxicilina y la ampicilina tienen un espectro de acción más amplio que las penicilinas naturales ya que también son efectivas contra *Escherichia*, *Proteus* y *Salmonella*. Otra ventaja de estos antibióticos frente a las penicilinas naturales es que se pueden administrar tanto de forma parenteral como oral ya que son estables frente al ácido gástrico. En nuestro país se puede encontrar ampicilina/sulbactam para utilizar en lesiones ya que vienen presentaciones en forma de pomada para una acción local en la infección.

La **vancomicina** es un glucopéptido que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Es un antibiótico muy efectivo contra bacterias Gram positivas pero no contra bacterias Gram negativas. Es un antibiótico que puede presentar ototoxicidad (sordera) que se retira cuando se interrumpe el tratamiento por lo que está bastante reservado a infecciones por microorganismos multirresistentes que sean sensibles a vancomicina tanto en medicina humana como en medicina veterinaria.

La **cefalotina** es una cefalosporina de primera generación y su uso ha sido limitado ya que su aplicación intramuscular es muy dolorosa. Este antibiótico ha sido sustituido por la cefalexina que puede administrarse de manera oral o inyectable pero no es muy eficaz contra *Staphylococcus*.

La **kanamicina** y la **gentamicina** pertenecen al grupo de los aminoglucósidos y actúan interfiriendo en la síntesis de proteínas bacterianas ya que se unen a la subunidad 30S del ribosoma. Su espectro de acción abarca solo bacterias aerobias tanto Gram positivas como negativas. La presentación de estos antibióticos generalmente es como inyectable ya que son poco absorbidos por el intestino y actúan de manera eficaz contra *Staphylococcus*. En el caso de la gentamicina se ha visto que su utilización en cremas y soluciones tópicas tiene buenos resultados pero no se puede administrar más de tres días debido a que es tóxica y puede causar problemas a nivel renal. En algunas clínicas veterinarias este antibiótico se utiliza para realizar el lavado de cavidades durante una cirugía. Ambos se utilizan en infecciones genitourinarias, respiratorias, de piel y tejido blando, posquirúrgicas, gastrointestinales.

La **eritromicina** es un antibiótico perteneciente al grupo de los macrólidos, estos inhiben la síntesis proteica mediante la unión a la subunidad 50S del ribosoma. Es un antibiótico cuyo espectro se centra mayoritariamente en bacterias Gram positivas, es muy eficaz contra *Staphylococcus* y *Streptococcus*.

Por último la **enrofloxacin** es una fluoroquinolona muy utilizada en medicina

veterinaria. Este antibiótico actúa inhibiendo la síntesis de ADN ya que actúa sobre la enzima ADN girasa. El espectro de acción se concentra mayoritariamente sobre bacterias Gram negativas aerobias y anaerobias facultativas pero son eficaces también contra bacterias Gram positivas. La actividad contra *Staphylococcus* es variable pero algunas cepas resistentes a otros antibióticos son susceptibles a quinolonas. La presentación de este antibiótico puede ser inyectables y tabletas para administración oral.

Se clasificará como cepas resistentes a múltiples drogas: MDR (del inglés multidrug-resistant) a todas aquellas cepas que muestran resistencia a tres o más clases de antibióticos (Magiorakos et al. 2012).

5.4 Extracción del ADN genómico

La extracción del ADN genómico se realizó utilizando la enzima achromopeptidasa (Sigma-Aldrich® St. Louis, MO) siguiendo el protocolo concedido por el Dr Gustavo Varela y la Dra Lorena Pardo del Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Higiene de la Universidad de la República.

Trabajando en cabina de flujo laminar se colocaron 95 µl de agua ultrapura estéril en tubos para microcentrífuga de 1,5 ml estériles. Posteriormente se le agregaron 5 µl de la solución de achromopeptidasa a una concentración de 10U/µl y se resuspendieron 2 o 3 colonias en el tubo.

Los tubos se colocaron en un baño a 50°C durante 10 minutos seguido de un baño a 94°C durante 10 minutos más. Pasado este tiempo se centrifugaron a 13.500 rpm durante 5 minutos, 80-90 µl del sobrenadante se transfirieron a un tubo nuevo y se evaluó su pureza mediante Nano Drop y se guardó a -20°C hasta su uso en la PCR.

5.5 Detección y secuenciación del gen *mecA* por PCR en aislamientos con fenotipo resistente

La reacción de PCR se realizó utilizando MangoMix™ de Bioline según el protocolo descrito por Aklilu E. et al. (2010) y se utilizaron los primers publicados por Jonas et al. (2002) para obtener un tamaño de banda de 310 pb (Tabla 1).

Tabla 1: Secuencias de los primers utilizados para la amplificación del gen *mecA*.

TAMAÑO DEL AMPLICÓN	SECUENCIA	PRIMER
310 pb	5' GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA 3'	mecA F
	5' CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA 3	mecA R

La mezcla para las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µL: 12,5 µL de MangoMix™, 1,5 µL de cada primer a una concentración de 10 µM, 9 µL de H2O mQ estéril y 0,5 µL de ADN.

Como control positivo se utilizaron las cepas de *S. aureus* y *S. pseudintermedius* resistentes a meticilina cedidas por el Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Higiene de la Universidad de la República y la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 como control negativo.

Las condiciones de ciclado de la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos seguida de 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C terminando con una extensión final de 2 minutos a 72°C.

Para confirmar la presencia del fragmento amplificado, la mezcla de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE usando 5 µL de marcador de peso molecular GeneRuler 100pb de Thermo scientific. La corrida se realizó a 100V durante 45 minutos y los amplicones se visualizaron por tinción con SYBER® Safe DNA gel stain de Invitrogen y exposición a luz UV.

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por MacroGen Inc., Seúl, Corea del Sur. Para obtener la secuencia, el cromatograma recibido desde el servicio de secuenciación fue editado en el programa Bioedit (Hall 1999), mediante inspección visual se eliminaron los errores típicos del secuenciador Sanger. La secuencia de los primers *forward* (directo) y *reverse* (reverso) se empalmaron para conseguir una secuencia única también utilizando el programa Bioedit.

5.6 Identificación de todas las cepas obtenidas por medio de PCR del ARNr

16S

Para complementar la identificación por pruebas bioquímicas se confirmó la

identidad de todas la cepas aisladas mediante la amplificación y secuenciación del ARNr 16S. Para la amplificación de este gen se utilizaron dos pares de primers cuyos fragmento de amplificación se superponen en 124 nucleótidos, según su posición en la secuencia de referencia de *E. coli*. Cada muestra se amplificó con los dos pares de primers para luego reconstruir la secuencia completa.

Los primers utilizados en la amplificación fueron los siguientes: 63F-907R y 784F-1401R (Martínez-Rosales et al. 2011) (Tabla 2 y 3).

Tabla 2: Primers utilizados para amplificar la región 5' del gen del ARNr 16S

TAMAÑO DEL AMPLICÓN	SECUENCIA	PRIMER
844 pb	5' CAGGCCTAACACATGCAAGTC3'	63 F
	5' CCGTCAATTCCTTTTRAGTTT3'	907 R

Tabla 3: Primers utilizados para amplificar la región 3' del gen del ARNr 16S

TAMAÑO DEL AMPLICÓN	SECUENCIA	PRIMER
617 pb	5' AAACAGGATTAGATACCC 3'	784 F
	5' CCGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG 3'	1401 R

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando MangoMix™ de Bioline y la mezcla para las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µL: 12,5 µL de MangoMix™, 1 µL de cada primer a una concentración de 10 µM, 9,5 µL de H₂O mQ estéril y 1 µL de ADN.

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes.

- Para los primers 63F-907R:

Una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos seguida de 30 ciclos de 40 segundos a 94°C, 50 segundos a 58°C y 1 minuto a 72°C terminando con una extensión final de 1 minuto a 72°C.

- Para los primers 784F-1401R:

Una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos seguida de 30 ciclos de 45 segundos a 95°C, 50 segundos a 61°C y 1 minuto a 72°C terminando con una extensión final de 1 minuto a 72°C.

Para confirmar la presencia del fragmento amplificado, el producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE usando 5 µL de marcador de peso molecular GeneRuler 100pb de Thermo scientific. La corrida se realizó a 90V durante 1 hora y los amplicones se visualizaron por tinción con SYBER® Safe DNA gel stain de Invitrogen y exposición a luz UV.

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por Macrogen Inc., Seúl, Corea del Sur. Para obtener la secuencia, el cromatograma recibido desde el servicio de secuenciación fue editado en el programa Bioedit (Hall 1999), mediante inspección visual se eliminaron los errores típicos del secuenciador Sanger. La secuencia de los primers *forward* (directo) y *reverse* (reverso) se empalmaron para conseguir una secuencia única también utilizando el programa Bioedit.

Una vez obtenidas las secuencias se compararon mediante alineamiento con secuencias completas y parciales del mismo gen del mismo género. Estas secuencias fueron descargadas de la base de datos del Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

5.7 Identificación de cepas en base de datos

La identificación de las cepas se realizó utilizando el servidor online www.ezbiocloud.net. La herramienta se utiliza generalmente en taxonomía, genómica, ecología, metagenómica de bacterias y archaeas. Ezbiocloud ha sido desarrollada recientemente y es mantenida por el laboratorio “ChunLab” (<http://chunlab.com>) (Anon 2017). La red EzBioCloud es utilizada en más de 50 países diferentes por más de 22.000 usuarios, desde académicos, organizaciones de investigación sin fines de lucro, comunidades médicas, agencias gubernamentales y compañías globales.

Uno de los servicios brindados por esta base de datos es el “EzBioCloud's Identify Service” que brinda una forma simple de identificar cepas bacterianas utilizando las secuencias de ARNr 16S, estableciendo un grado de confianza para el resultado. Una vez que se crea un usuario dentro del sitio es posible realizar las identificaciones y además tiene la gran ventaja de que permite poder guardar y visualizar todos los análisis que uno realiza dentro de su propio usuario.

Una vez realizada la identificación el resultado se muestra en columnas: el nombre de nuestra propia cepa (*Name*), qué porcentaje del gen completo cubre mi secuencia (*Completeness %*), el nombre de la especie con más similaridad (*Top-hit taxon*), el porcentaje de similaridad (*Similarity %*) y la taxonomía de la especie que encontró más

parecida (*Top-hit taxonomy*).

Por otro lado esta herramienta nos permite, para cada una de las cepas a las cuales se le realizó la identificación, obtener la información de todos los nombres de las cepas bacterianas con las que tuvo alto porcentaje de identidad y un archivo en formato FASTA con todas las secuencias.

5.8 Obtención de secuencias, de la base de datos y análisis filogenéticos

Las secuencias de ARNr 16S y *mecA* del género disponibles en la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) fueron obtenidas mediante blast, blastn y tblastn, respectivamente, implementados en el servidor web. Los resultados se filtraron por identidad y cobertura, mínimo 80% y 90%, respectivamente. Se utilizaron múltiples *queries* como partida y los resultados fueron integrados. Finalmente las bases de datos quedaron compuestas por 1.929 secuencias en el caso del ARNr 16S y por 363 en el caso del gen *mecA*, a las que se sumaron las secuencias obtenidas en este trabajo. En el caso del *mecA* se utilizó el programa Cd-hit-est (Li & Godzik 2006) para agrupar secuencias redundantes, es decir que presentan 100% de identidad en el total de la secuencia. El mismo programa permite seleccionar un representante de cada uno de estos grupos.

Para realizar los alineamientos se utilizaron 2 programas, Mafft (con los parámetros de la opción *einsi*) (Nawrocki et al. 2009) y Muscle (Edgar 2004), con parámetros por defecto. Se obtuvieron árboles filogenéticos utilizando el método aproximado de Máxima Verosimilitud implementado en el programa FastTree versión 2.0 y por el método de Máxima Verosimilitud, implementado en el programa PHYML, versión 3.1 (Guindon et al. 2010). Finalmente los árboles se visualizaron utilizando el programa FigTree (Ronquist & Huelsenbeck 2003; Tamura et al. 2013) y Mega 6.0 (Ronquist & Huelsenbeck 2003; Tamura et al. 2013). El apoyo estadístico de las cepas se obtuvo mediante el método SH (implementado en ambos programas).

5.9 Determinación del tipo de SCCmec de las cepas de Staphylococcus resistentes a meticilina mediante Multiplex PCR

La tipificación de las cepas de *Staphylococcus. spp* resistentes se realizó utilizando como base el protocolo propuesta por Boye et al. (2007b) que estandarizaron una

multiplex sencilla de realizar y de interpretar detectando de esta manera los cinco tipos principales de SCCmec.

Los primers utilizados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Primers utilizados para realizar la múltiplex PCR con el fin de genotipificar las cepas de estafilococos resistentes a meticilina

Tipo de SCCmec que detecta	Amplicón esperado	SECUENCIA	PRIMER
II y IV	937 pb	5' ATTGCCTTGATAATAGCCYTCT 3'	β
		5' TAAAGGCATCAATGCACAAACACT3'	$\alpha 3$
III y V	518 pb	5' CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT3'	ccrC-F
		5' CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT 3'	ccrC-R
I y IV	415 pb	5' GCCACTCATAACATATGGAA 3'	1272-F
		5' CATCCGAGTGAAACCCAAA 3'	1272-R
V	359 pb	5' TATACCAAACCCGACAACACTAC 3'	5RmecA
		5' CGGCTACAGTGATAACATCC 3'	5R431

Se determinó el tipo de SCCmec en base al patrón de bandas obtenido. Los tipos IV y V se determinan por la obtención de dos bandas. En el caso del tipo V se debe obtener una banda de 518 pb y otra de 359 pb, mientras que en el tipo IV se debe obtener una banda de 937 pb y otra de 415 pb. Los tipos I, II y III se determinan por la presencia de una sola banda de 415 pb, 937 pb y 518 pb, respectivamente (Boye et al. 2007a).

La reacción de PCR se realizó utilizando MangoMix™ de Bioline y la mezcla se realizó en un volumen final de 25 μ L: 12,5 μ L de MangoMix™, 0,5 μ L de los primers β y $\alpha 3$, 0,625 μ L de los primers ccrC-F y ccrC-R, 0,2 μ L de los primers 1272-F y 1272-R y 0,25 μ L de los primers 5RmecA y 5R431 a una concentración de 10 μ M, 8,3 μ L de H₂O mQ estéril y 1 μ L de ADN.

Las condiciones de ciclado de la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C terminando con una extensión final de 4 minutos a 72°C.

Para confirmar la presencia del fragmento amplificado, la mezcla de PCR se

sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE usando 5 µL de marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb de Thermo scientific. La corrida se realizó a 100V durante 45 minutos y los amplicones se visualizaron por tinción con SYBER® Safe DNA gel stain de Invitrogen y exposición a luz UV (Ver Anexo I).

6. RESULTADOS

6.1 Muestreo

Se muestrearon un total de 74 perros que ingresaron al hospital veterinario durante el período de mayo de 2016 a mayo de 2017. Un 26% (n=19) de los perros muestreados eran cachorros es decir, de menos de un año, un 32% (n=24) eran perros adultos (1 a 7 años) y un 42% (n=31) correspondieron a perros gerontes (mayores de 7 años).

Con respecto al relacionamiento con los dueños un 61% (n=45) de los perros tenían una relación muy estrecha con sus dueños (compartir cama, utensilios, lamidos y besos) y un 39% (n=29) no tenían mayor relacionamiento con sus dueños.

Del total de perros muestreados un 26% (n=19) estaban en tratamiento con antibiótico al momento de tomar la muestra, mientras que el resto no lo estaba (Fig. 2).

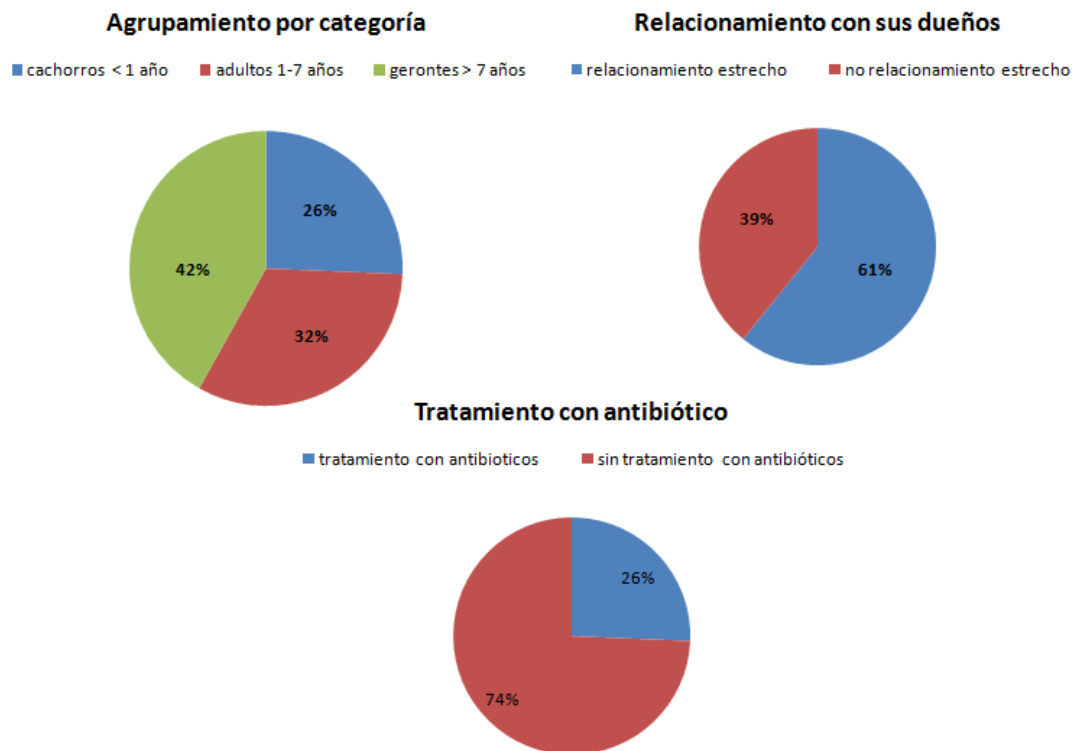


Figura 2: Representación gráfica de los perros muestreados en relación a edades, relacionamiento con sus dueños y si estaban bajo tratamiento con antibióticos.

Se obtuvieron un total de 188 hisopados de los cuales un 81% (n=153) resultaron positivos al crecimiento en caldo TSB con 10% de NaCl. El restante 19% (n=35) no creció en dicho caldo.

El 42,5% (n=65) de las cepas crecidas fueron obtenidas de la faringe, un 38,6% (n=59) de la zona perianal, un 17,6% (n=27) de lesiones de piel y un 1,3% (n=2) de oído (Fig. 3).

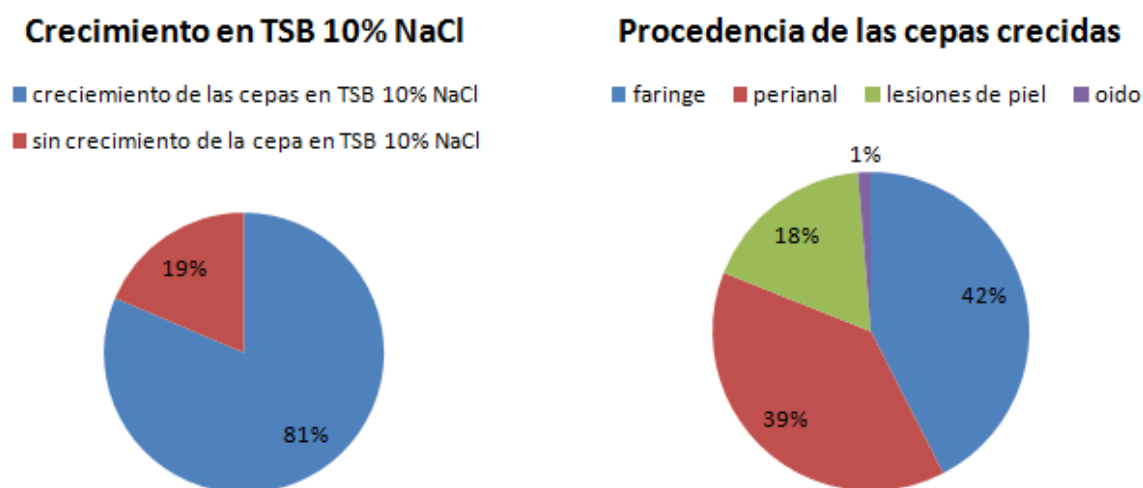


Figura 3: Representación gráfica de las cepas crecidas según su procedencia.

Todos los hisopados llegaron refrigerados al laboratorio en menos de 24 hs luego de tomada la muestra; y todas las cepas obtenidas están congeladas en glicerol a -80°C.

6.2 Identificación de las cepas por pruebas bioquímicas

Se trabajó con las 153 cepas obtenidas del crecimiento en TSB 10% NaCl y a todas ellas se les realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes detalladas en la Tabla del Anexo II.

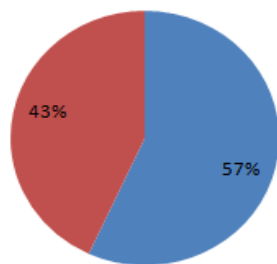
Del total de las cepas un 43% (n=66) resultaron manitol positivas, es decir, eran aislamientos fermentadores de manitol; mientras que un 57% (n=87) resultaron manitol negativas, es decir, corresponden a aislamientos no fermentadores de manitol (Figs. 3 y 4).

En cuanto a la morfología de las colonias en el medio TSA luego de 24 hs de incubación, fue muy variada. Algunas cepas presentaban colonias de pequeñas a medianas, algunas blancas y otras amarillas, todas ellas tenían una forma redondeada y bordes lisos.

Microscópicamente se observaron a la tinción de Gram cocos Gram positivos que en su mayoría se disponían como racimos, como era esperable ya que es la característica principal de este género cuando se realiza la tinción de Gram. El 100% de las cepas presentaron reacción positiva a la catalasa y en cuanto a la coagulasa, algunas cepas fueron coagulasa positivas a las 24hs y otras coagulasa negativas determinando así cuales cepas eran CoPS y cuales CoNS (Figs. 4 y 5).

Resultados fermentación del manitol en MSA

■ Manitol negativo ■ Manitol positivo



Resultados de la prueba de la coagulasa

■ Coag negativo ■ Coag positivo

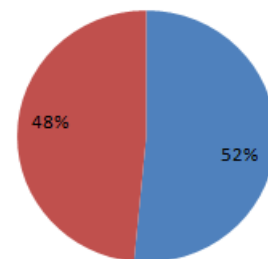


Figura 4: Porcentajes de cepas manitol positivas y negativas. Porcentajes de cepas coagulasa positivas y negativas

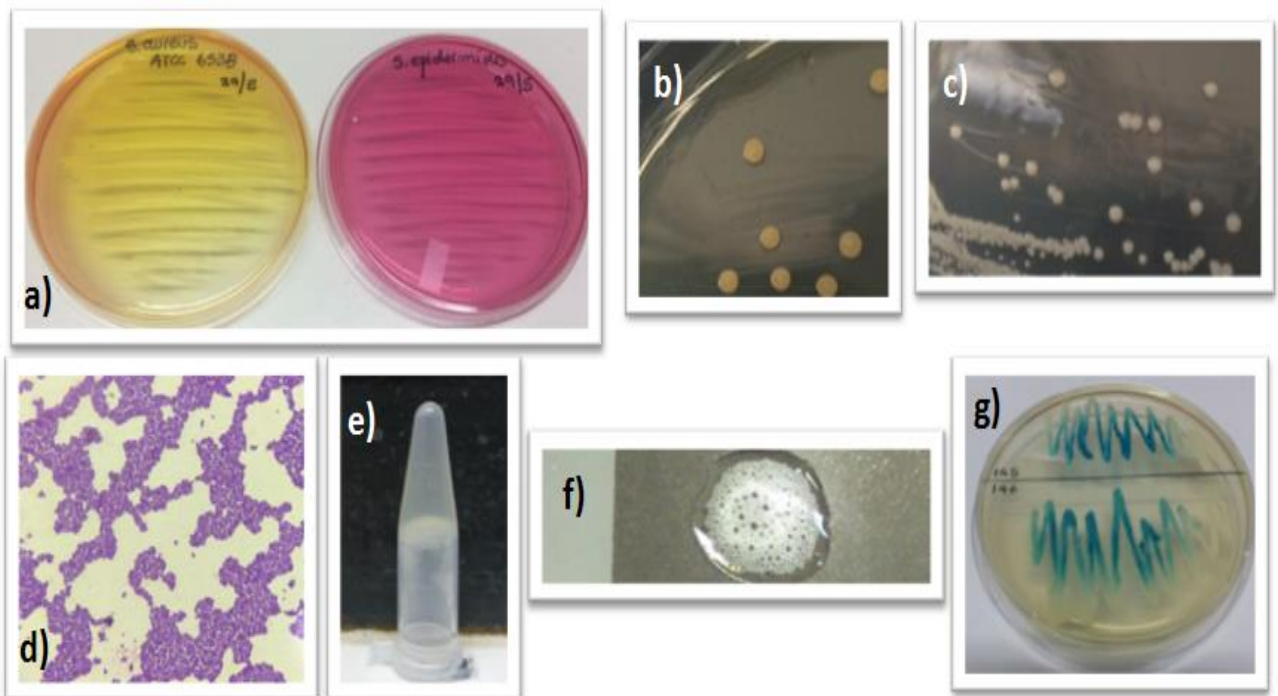


Figura 5: a) Placas de MSA con crecimiento de cepas controles manitol positiva, color amarillo (*Staphylococcus aureus*) y manitol negativa, color fucsia (*Staphylococcus epidermidis*). b y c) Colonias en TSA con diferentes aspectos. d) Tinción de Gram: Cocos Gram positivos. e) Prueba de la coagulasa: positiva. f) Prueba de la catalasa: positiva. g) Prueba de la β -galactosidasa en TSA con X-gal.

6.3 Identificación de las cepas por secuenciación del ARNr 16S

En la amplificación del gen del ARNr 16S con los dos pares de primers se obtuvieron bandas del tamaño esperado en todas las cepas, o sea una banda de aproximadamente 844 pb con los primers 63F- 907R y otra de aproximadamente 671 pb con los primers 784F-1401R. En la figura 6 se muestran las bandas obtenidas en ambas PCR de algunas de las cepas aisladas. Los controles negativos realizados con agua miliQ también fueron los esperados.

La construcción del fragmento de aproximadamente 1400 pb se realizó como se indica en la sección materiales y métodos. Se identificaron un total de 67 cepas según el criterio descrito previamente (todas las cepas manitol positivo y las cepas que fueron manitol negativo que provenían de piel) (Anexo I).

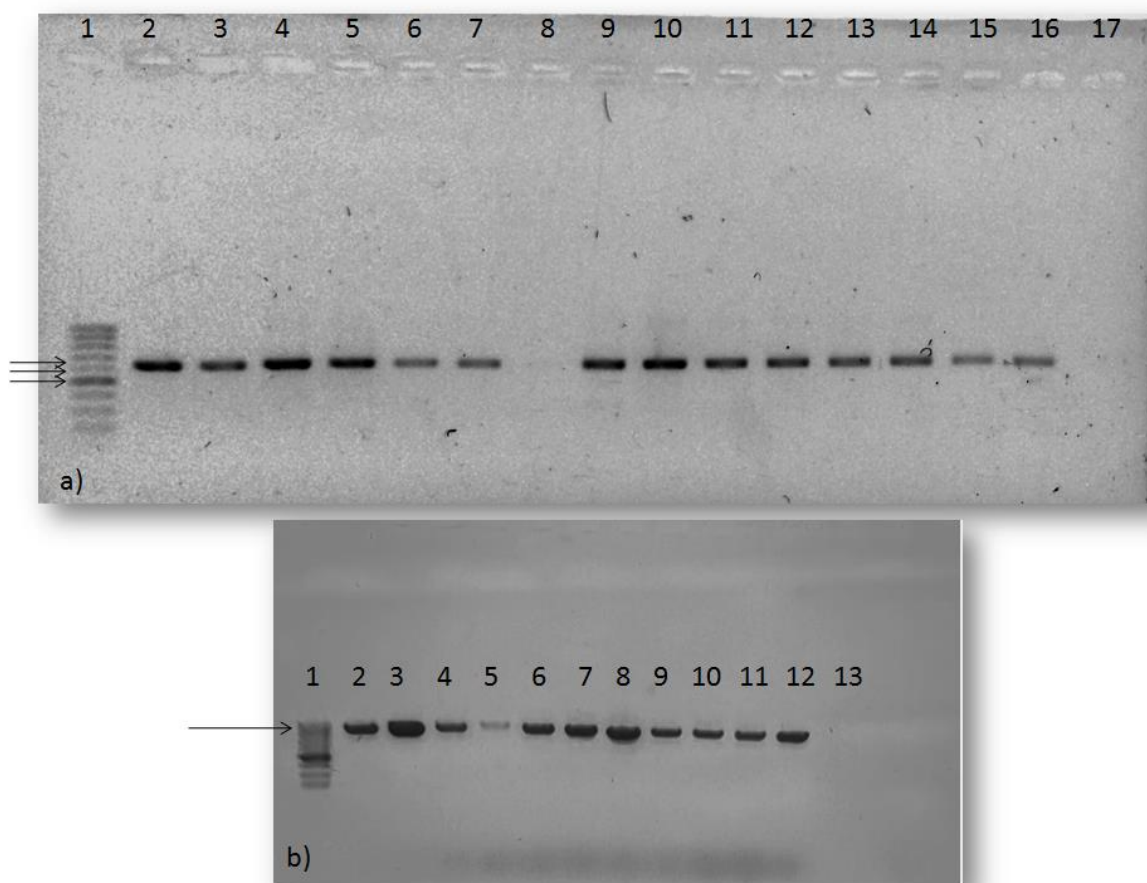


Figura 6: Amplificación por PCR del ARNr 16S. a) Corrida electroforética de la PCR para los primers 784F-14 01R. Carril 1: MPM (100 pb), Carril 2-7: muestras, Carriles 8 y 17: control negativo, Carriles 9-16: muestras. Las flechas indican las bandas del fragmento de 700, 600 y 500 pb del MPM. b) Corrida electroforética de la PCR para los primers 63F-907R. Carril 1: MPM (100pb), Carril 2-12: muestras, Carril 13: control negativo

Casi todas las secuencias obtenidas mostraron alta similitud con secuencias del género *Staphylococcus* publicadas en la base de datos del EZbiocloud. Solo en el caso de dos cepas, una que provenía de zona perianal y otra que provenía de piel se obtuvo una alta similitud con una cepa del género *Enterococcus* (Ver anexo III).

La mayoría de las cepas aisladas obtuvieron un alto porcentaje de similaridad con secuencias de *Staphylococcus pseudintermedius*, seguidas por las secuencias de *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus haemoliticum*. Las demás especies (*S. argenteus*, *S. cohnii*, *S. nepalensis*, *S. arlettae*, *S. sciuri*, *S. epidermidis* y *S. schleiferi*) fueron las que estuvieron menos representadas (Fig 7).

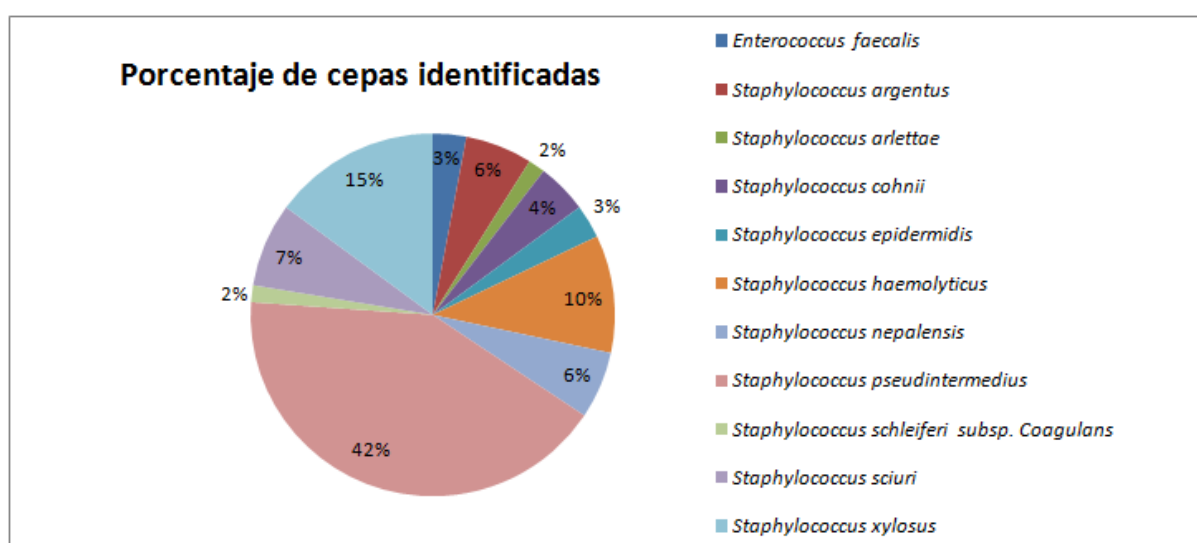


Figura 7: Porcentajes de aislamiento de las diferentes especies identificadas: *S. argenteus*: 6%; *S. arlettae*: 2%; *S. cohnii*: 4%; *S. epidermidis*: 3%; *S. haemolyticus*: 10%; *S. nepalensis*: 6%; *S. pseudintermedius*: 42%; *S. schleiferi subsp. Coagulans*: 2%; *S. sciuri*: 7%; *S. xylosus*: 15%.

6.4 Análisis filogenético del ARN 16S

En el árbol filogenético obtenido se puede observar cómo se distribuyen filogenéticamente las diferentes cepas de *Staphylococcus* incluyendo las identificadas en este trabajo (Fig. 8).

Las cepas obtenidas se agrupan dentro de la filogenia de manera mayormente coherente con las diferentes cepas obtenidas de la base de datos (Fig 8).

Todas las cepas de *S. xylosus* aisladas se agruparon en un clado formado por cepas de *S. xylosus*, *S. saprophyticus* y *S. succinus*. Las cepas de *S. aureus* obtenidas de la

base de datos se encuentran repartidas en tres clados diferentes y en dos de ellos se encuentran agrupadas con cepas de *S. haemolyticus*. En este trabajo no se aislaron cepas de *S. aureus* pero sí cepas de *S. haemolyticus*, las que se repartieron en los tres linajes, cercanas a cepas de *S. aureus* y *S. haemolyticus*. Por otro lado en dos de estos tres grupos también se ubicaron las cepas aisladas de *S. argenteus*.

Las cepas aisladas de *S. pseudintermedius* se agruparon en un único clado formado también por cepas de la base de datos pertenecientes a las especies *S. pseudintermedius* y *S. delphini*.

Las cepas pertenecientes a la especie *S. cohnii* obtenidas de la base de datos se dividieron en dos linajes principales, dos cepas aisladas de esta especie se encuentran cercanamente relacionadas a *Staphylococcus nepalensis* mientras que una tercera cepa se encuentra dentro de un cluster formado por cepas de *S. cohnii*.

Por su parte las cepas aisladas de *S. nepalensis* se ubicaron cercanas a las cepas de *S. nepalensis* de la base de datos.

Por último las cepas de *S. arlettae*, *S. sciuri* y *S. epidermidis*, formaron cada una un grupo monofilético dentro de los cuales se ubican las cepas de estas especies aisladas en este trabajo.

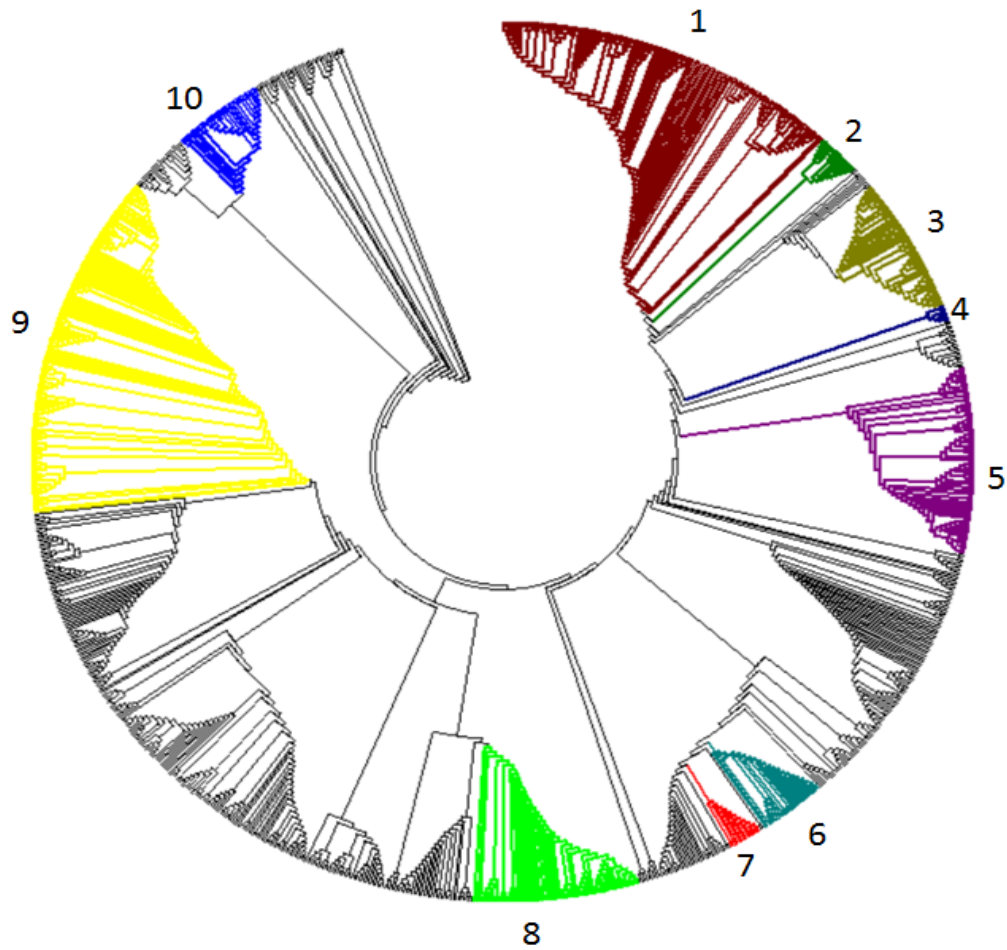


Figura 8: Árbol filogenético de las cepas identificadas realizado por el método aproximado de máxima verosimilitud implementado en el programa FastTree 2.0. En colores se indican clados monofiléticos en donde se ubican las cepas aisladas en este estudio.

- 1: Agrupa *S. xylosus*, *S. saprophyticus* y *S. succinus*: Cepas: 9, 5, 13, 15, 33, 46, 51, 85, 153 (*Staphylococcus xylosus*)
- 2: Agrupa *S. cohnii* y *S. nepalensis*: Cepas: 95 y 145 (*Staphylococcus nepalensis*), 55 y 125 (*Staphylococcus cohnii*)
- 3: Agrupa *S. aureus* y *S. haemolyticus*: Cepa: 159 (*Staphylococcus haemolyticus*)
- 4: Agrupa *S. aureus*: Cepas: 2 (*Staphylococcus argenteus*), 18, 19, 26, 57 y 72 (*Staphylococcus haemolyticus*)
- 5: Agrupa *S. aureus* y *S. haemolyticus*: Cepas: 59 y 86 (*Staphylococcus argenteus*), 136 (*Staphylococcus haemolyticus*)
- 6: Agrupa *S. arlettae*: Cepa: 114 (*Staphylococcus arlettae*)
- 7: Agrupa *S. cohnii*: Cepa: 115 (*Staphylococcus cohnii*)
- 8: Agrupa *S. sciuri*: Cepas: 11, 27, 43, 131 y 167 (*Staphylococcus sciuri*)
- 9: Agrupa *S. epidermidis*: Cepas 17 y 41 (*Staphylococcus epidermidis*)
- 10: Agrupa *S. pseudintermedius* y *S. delphini*: Cepas 1, 4, 7, 8, 21, 23, 24, 30, 34, 53, 58, 62, 64, 67, 75, 118, 129, 130, 135, 137, 138, 148, 149, 151, 161, 164, 169 y 172 (*Staphylococcus pseudintermedius*)

6.5 Resistencia a nivel fenotípico y genotípico

La resistencia observada frente a los diferentes antibióticos testados fue bastante variada dentro de las 67 cepas analizadas.

Se detectaron cepas que expresaron fenotipo de resistencia a meticilina en cuatro especies diferentes: *S. pseudintermedius*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. cohnii*. En detalle, tres cepas de *S. pseudintermedius*, una de *S. epidermidis*, dos de *S. haemolyticus* y una de *S. cohnii*. En los antibiogramas de estas cepas no se observó halo de inhibición y esta resistencia fue confirmada luego por detección por PCR del gen *mecA*.

Diecisiete cepas fueron sensibles a penicilina lo que arrojó un gran porcentaje de cepas resistentes a este antibiótico. No se observaron halos de inhibición para este antibiótico en las cepas resistentes.

La resistencia a cefalotina fue prácticamente nula, limitándose a dos cepas de las 67, siendo una de ellas también resistente a meticilina. Con respecto a la vancomicina las 67 cepas analizadas fueron sensibles a este antibiótico y solamente siete cepas fueron resistentes a kanamicina, cuatro de ellas resistentes también a meticilina. Doce cepas mostraron resistencia frente a enrofloxacin y 16 cepas fueron resistentes a eritromicina. Finalmente, tres cepas de las que eran metilino resistentes mostraron también resistencia frente a amoxi/clavulánico (Fig. 8).

Se aislaron diez cepas que fenotípicamente se podían clasificar como MDR (resistentes a múltiples drogas). Siete de estas diez cepas fueron *S. pseudintermedius* mientras que se obtuvo un aislamiento de *S. cohnii*, *S. epidermidis* y *S. argenteus* MDR. Es importante destacar que tres de estas cepas de *S. pseudintermedius* MDR además eran resistentes a meticilina así como también la cepa de *S. epidermidis* y *S. cohnii* MDR. Los resultados con respecto a la resistencia a antibióticos y las cepas MDR se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Número de cepas de cada especie resistente a cada antibiótico testeado y cantidad de cepas MDR

<i>Cepa (n=total)</i>	Cepas MDR de cada especie	Antibióticos testeados									
	Cepas MDR	OXA	P	KF	CN	K	VA	ENR	AMC	SAM	E
<i>S. sciuri (n=3)</i>	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S.arlettae (n=1)</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>S.Pseudintermedius (n=29)</i>	7	3	20	0	0	5	0	6	1	0	7
<i>S.argenteus (n=3)</i>	1	0	3	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>S. xylosus (n=10)</i>	0	0	7	0	0	0	0	3	0	0	0
<i>S. scheifflieri (n=1)</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. haemolyticus (n=4)</i>	0	2	3	0	0	0	0	0	1	0	2
<i>S. nepalensis (n=4)</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. cohnii (n=3)</i>	1	1	2	0	0	0	0	1	1	0	2
<i>S. epidermidis (n=2)</i>	1	1	2	1	0	1	0	1	0	0	0

OXA: oxacilina, P: penicilina, KF: cefalotina, CN: gentamicina, K: kanamicina, VA: vancomicina, AMC: amoxicilina/clavulanico, SAM: ampicilina/sulbactam, E: eritromicina

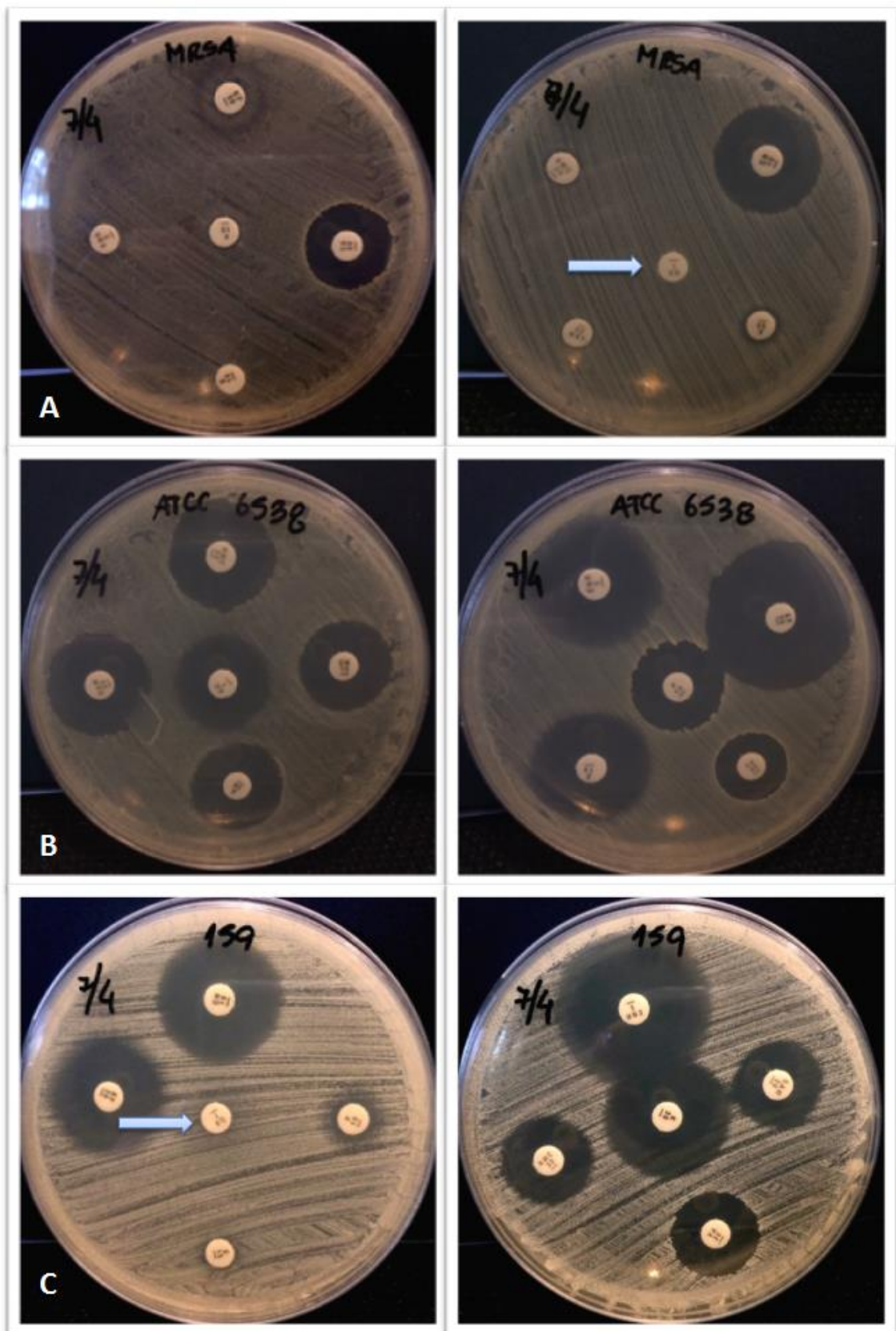


Figura 8: Placas de antibiograma de los controles y una muestra.
 Panel A: control positivo (MRSA), Panel B: control negativo (*S.aureus* ATCC 6538) y Panel C: cepa que mostró fenotipo de resistencia. Las flechas marcan el disco de oxacilina donde no se observa ningún halo de inhibición.

La detección del gen *mecA* se realizó para aquellas cepas que mostraron fenotipo de resistencia a oxacilina en el antibiograma. En todos los casos se logró amplificar el gen *mecA* y se observó una banda de tamaño esperado que correspondía a 310 pb aproximadamente (Fig. 9).

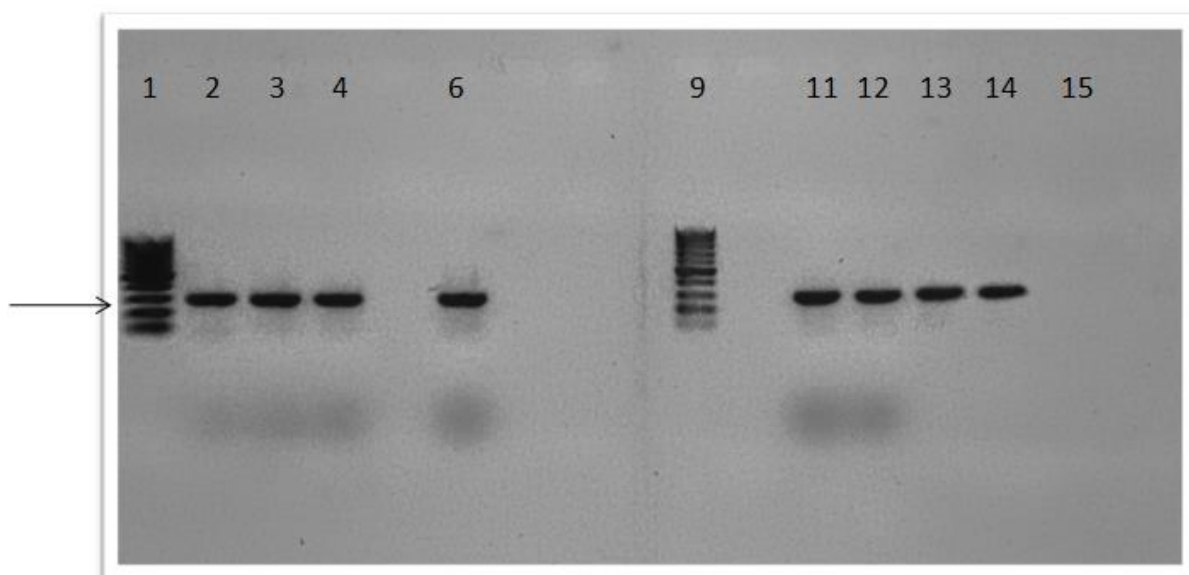


Figura 9: Electroforesis de los productos de PCR para detección del gen *mecA*. Carril 1 y 9: MPM (la flecha marca la banda de 300 pb), Carril 2: Cepa 7 (*S.pseudintermedius*), Carril 3: cepa 17 (*S.epidermidis*), Carril 4: Cepa 30 (*S.pseudintermedius*), Carril 6: Control positivo cepa MRSA, Carril 11: cepa 62 (*S.pseudintermedius*), Carril 12: Cepa 125 (*S. cohnii* subsp. *Urealyticus*), Carril 13: Cepa 136 (*S. haemolyticus*), Carril 14: Cepa 159 (*S. haemolyticus*) y Carril 15: Control negativo (cepa de *S. aureus* ATCC 6538)

Las siete secuencias del gen *mecA* obtenidas presentaban alta calidad y una vez editadas todas tenían un 100% de similitud con genes *mecA* de *Staphylococcus aureus* de la base de datos del GenBank. Para realizar el árbol filogenético a partir de estas secuencias primero se identificaron mediante blastn sobre la base de datos secuencias del gen *mecA*. De las secuencias identificadas se seleccionaron aquellas que presentaban un valor máximo de e-value de 1×10^{-10} y más de 90% de cobertura, totalizando finalmente 397 secuencias. Estas secuencias se agrupaban en 17 haplotipos. Estas 17 secuencias fueron incluidas en el análisis filogenético posterior. No se observó ningún haplotipo asociado a una especie en particular, es decir los haplotipos aparecen en diferentes especies y una misma especie podría tener diferentes haplotipos. Se identificaron cinco haplotipos en las siete secuencias obtenidas en este estudio. Los

resultados del análisis filogenético se muestran en la Figura 10. Los cinco haplotipos detectados se distribuyen en tres linajes cercanamente relacionados.

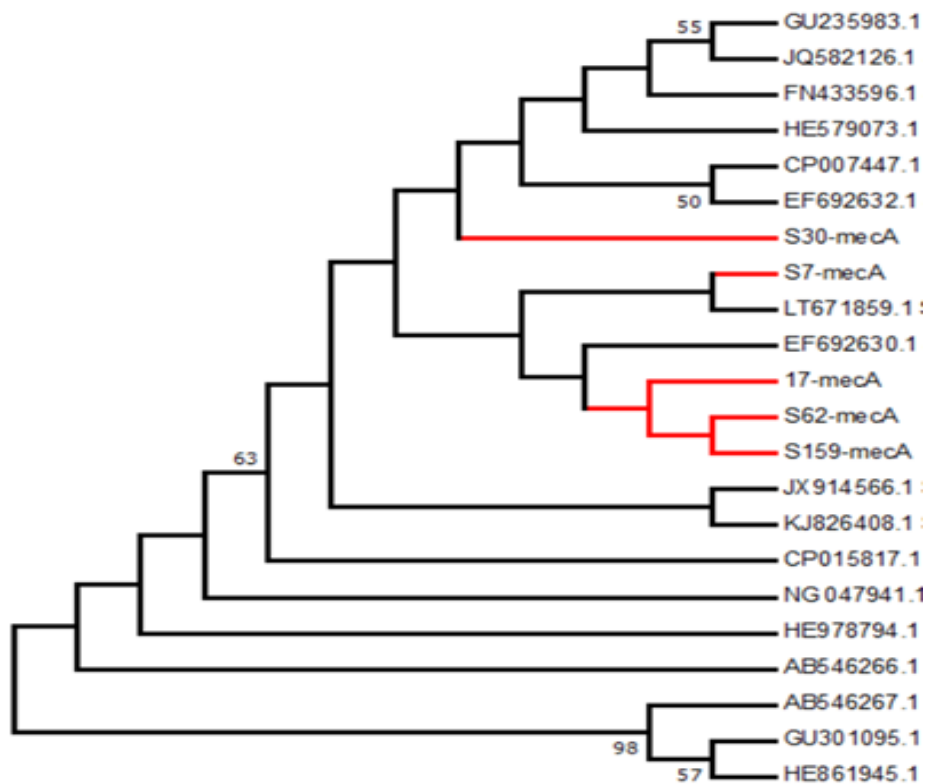


Figura 10: Árbol filogenético de los genes *mecA*. Las secuencias indicadas representan los 17 haplotipos del gen *mecA* en el género *Staphylococcus*, identificados en la base de datos GenBank. Las líneas rojas señalan las secuencias representantes de los haplotipos identificados en este estudio.

6.6 Genotipificación

A partir de la multiplex PCR se pudo determinar la presencia de tres variantes genotípicas del casete cromosomal (*SCC_{mec}*). La cepa 7 y la 17 presentan un casete de tipo IV, para ambas cepas se obtuvieron las dos bandas características, una de 930 pb y otra de 415 pb aproximadamente. Por otro lado, las cepas 30, 62, 136 y 159 presentaron casete *SCC_{mec}* de tipo V, presentando una banda de 500 pb y una de 350 pb aproximadamente. Por último la amplificación sobre la cepa 125 indicó que esta presentaba un casete de tipo III, obteniéndose una única banda de 500 pb aproximadamente (Fig. 11 y Tabla 6).

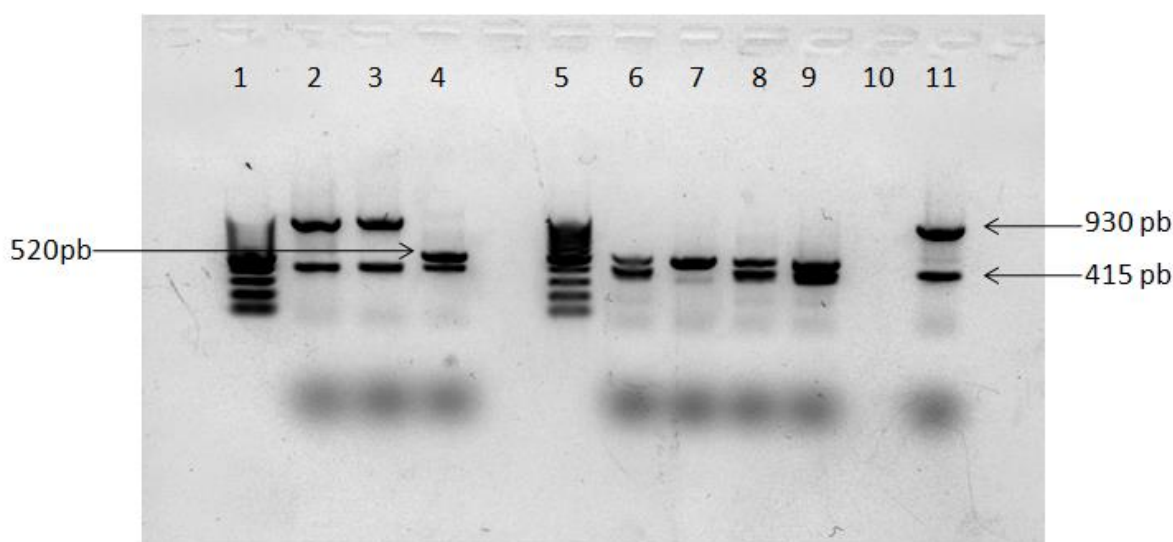


Figura 11: Electroforesis de los productos de PCR para genotipificación del SCCmec..

Carril 1 y 5: MPM, Carril 2: Cepa 7 (*S.pseudintermedius* tipo IV), Carril 3: cepa 17 (*S.epidermidis* tipo IV), Carril 4: Cepa 30 (*S.pseudintermedius* tipo V), Carril 6: cepa 62 (*S.pseudintermedius* tipo V), Carril 7: Cepa 125 (*S. cohnii* subsp. *Urealyticus* tipo III), Carril 8: Cepa 136 (*S. haemolyticus* tipo V), Carril 9: Cepa 159 (*S. haemolyticus* tipo V), Carril 10: Control negativo (cepa de *S. aureus* ATCC 6538) y Carril 11: Control positivo MRSA tipo IV

El casete cromosomal (SCCmec) mayoritariamente representado en las cepas aisladas fue el de tipo V, mientras que el menos frecuente fue el tipo III. Por otro lado, se pudo apreciar que muestras de diferente origen anatómico portaban casetes diferentes (Tabla 6).

Tabla 6: Resultados obtenidos de la genotipificación según el tipo de casete cromosomal

Nº cepa/ identificación	Procedencia	Tipo de SCCmec
7/ <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Faringe	IV
17/ <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Piel	IV
30/ <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Piel	V
62/ <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Faringe	V
125/ <i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>Urealyticus</i>	Perianal	III
136/ <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Perianal	V
159/ <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Faringe	V

7. DISCUSIÓN

7.1 Validez del muestreo

El muestreo realizado durante este trabajo se centró específicamente en obtener muestras de diferentes razas de perros, de diferentes lugares y diferentes edades, es decir, se obtuvieron muestras de perros que no tenían ningún contacto entre sí (o donde la probabilidad de contacto entre ellos fuera casi nula).

Teniendo en cuenta lo anterior podríamos suponer que la variabilidad de cepas obtenidas es una buena representación de la variabilidad existente en la población, dado el número de animales muestreados. Un muestreo que tenga un sesgo hacia una determinada zona geográfica o que considere animales que cohabitan o que están emparentados como independientes generaría artificialmente una menor variedad genética de *Staphylococcus* circulando. Por lo tanto podemos decir que esta baja probabilidad de contacto apoya el diseño del muestreo realizado y la variedad de cepas que se encuentre será una representación confiable de las diferentes cepas que coexisten en los perros de Montevideo.

7.2 Distribución filogenética de los aislamientos de *Staphylococcus* obtenidos.

Basándose en cuatro genes conservados de *Staphylococcus*, ARNr 16S, y tres genes que codifican para proteínas: dnaJ, rpoB y tuf, Lamers y colaboradores propusieron una clasificación para el género *Staphylococcus* (Lamers et al. 2012). Según estos autores las diferentes especies de *Staphylococcus* se agrupan en 15 clusters o grupos los que a su vez demostraron pertenecer a seis grupos de especies de acuerdo con sus características fenotípicas (Fig. 12)

Oxidasa	Negativa							
Novobiocina	Susceptible							
Coagulasa	Negativa	Positiva ¹ -Variable ² -Negativa ³		Negativa				
Grupo de Especie	Hyicus-Intermedius			Epidermidis-Aureus				
Cluster	Muscae	Hyicus	Intermedius	Aureus	Epidermidis	Warneri	Haemolyticus	Lugdunensis
Especies	S. muscae S. microti S. rostri	S.hyicus ² S.agentis ² S.chromogenes ³ S.felis ³	S. intermedius ¹ S. delphini ¹ S.lutrae ¹ S. pseudintermedius ¹ S.schleiferi ssp. scleiferi ³ ssp. coagulans ¹	S.aureus ssp. aureus ¹ ssp. anaerobius ¹ S.simiae ¹	S. epidermidis S. capitis ssp. capitis ssp. urealyticus S. caprae S. saccharolyticus	S. warneri S. pasteuri	S.haemolyticus S. devriesei S. hominis S. jettensis S. petrasii	S. lugdunensis

Oxidasa	Negativa						Positiva
Novobiosina	Susceptible			Resistente			
Coagulasa	Negativa						
Grupo de Especie	Auricularis	Simulans	Saprophyticus				Sciuri
Cluster	Auricularis	Simulans-Carnosus	Pettenkoferi-Massiliensis	Saprophyticus	Cohnii-Nepalensis	Arlettae-Kloosii	Sciuri
Especies	<i>S. auricularis</i>	<i>S. simulans</i> <i>S. carnosus</i> <i>S. condimenti</i> <i>S. piscifermentans</i>	<i>S. pattenkoferi</i> <i>S.massiliensis</i>	<i>S. saprophyticus</i> <i>S.equorum</i> <i>S. gallinarum</i> <i>S. succinus</i> <i>S.xylosus</i>	<i>S. chonii</i> <i>ssp. chonii</i> <i>ssp. urealyticus</i> <i>S. nepalensis</i>	<i>S. arlettae</i> <i>S. kloosi</i>	<i>S. sciuri</i> <i>S. fleuretti</i> <i>S. lentus</i> <i>S. stepanovicii</i> <i>S. vitulinus</i>

Figura 12: Representación esquemática de los grupos filogenéticos propuestos por Lambers et al..la figura fue adaptada de la reciente revisión “Coagulase-Negative Staphylococci” de (Becker et al. 2014).

El árbol filogenético obtenido a partir de los diferentes aislamientos de *Staphylococcus* mostró un patrón de ramificación altamente concordante con lo propuesto por Lamers y colaboradores, especialmente en relación a la formación de los grupos naturales mayores.

7.2.1 Staphylococcus pseudintermedius

En varios trabajos se ha establecido que aproximadamente el 90% de los perros sanos están colonizados por *S. pseudintermedius*, ya sea a nivel de piel o en mucosas (Devriese et al. 2005; Bannoehr & Guardabassi 2012). No es extraño entonces que casi un 50% de los aislamientos obtenidos de los perros muestreados pertenezca a esta especie. Además clínicamente esta especie es la causa más común de piodermia, otitis e infecciones urinarias en los perros (van Duijkeren et al. 2011; Ball et al. 2008).

7.2.1.1 Variación intraespecífica

En un relevamiento reciente, realizado en Canadá, se aislaron 78 cepas de *S. pseudintermedius*, de un total de 100 perros muestreados (Priyantha et al. 2016). Esto concuerda con la tendencia observada en este trabajo, ya que se aislaron un total de 28 cepas de *S. pseudintermedius* de un total de 74 perros muestreados. Todas las cepas de *S. pseudintermedius* aisladas pertenecerían al mismo linaje, ya que agruparon todas juntas en el árbol filogenético. Este resultado indicaría que este linaje sería el único o mayoritario circulando en Montevideo (Fig. 13).

7.2.1.2 Resistencia a meticilina

Históricamente las cepas de *S. pseudintermedius* han mostrado sensibilidad a un amplio grupo de antibióticos, sin embargo desde el año 2006 aproximadamente, se ha visto un aumento en la aparición de resistencia en esta bacteria, en especial resistencia a meticilina (van Duijkeren et al. 2011, Moodley et al. 2014).

En un trabajo realizado por Grönthal y colaboradores, en este mismo año en Finlandia, se determinó que el porcentaje de cepas de *S. pseudintermedius* resistentes a meticilina era de un 14% (Grönthal et al. 2017), en un total de 1958 aislamientos obtenidos de perros. En nuestro caso la resistencia a meticilina en esta especie representó un poco más del 10%. Las tres cepas resistentes (S7, S30 y S62, ver anexo III) pertenecen filogenéticamente al mismo linaje por lo que podemos decir que, *a priori*, las cepas pertenecientes a este linaje tienen la capacidad de adquirir genes de resistencia a meticilina.

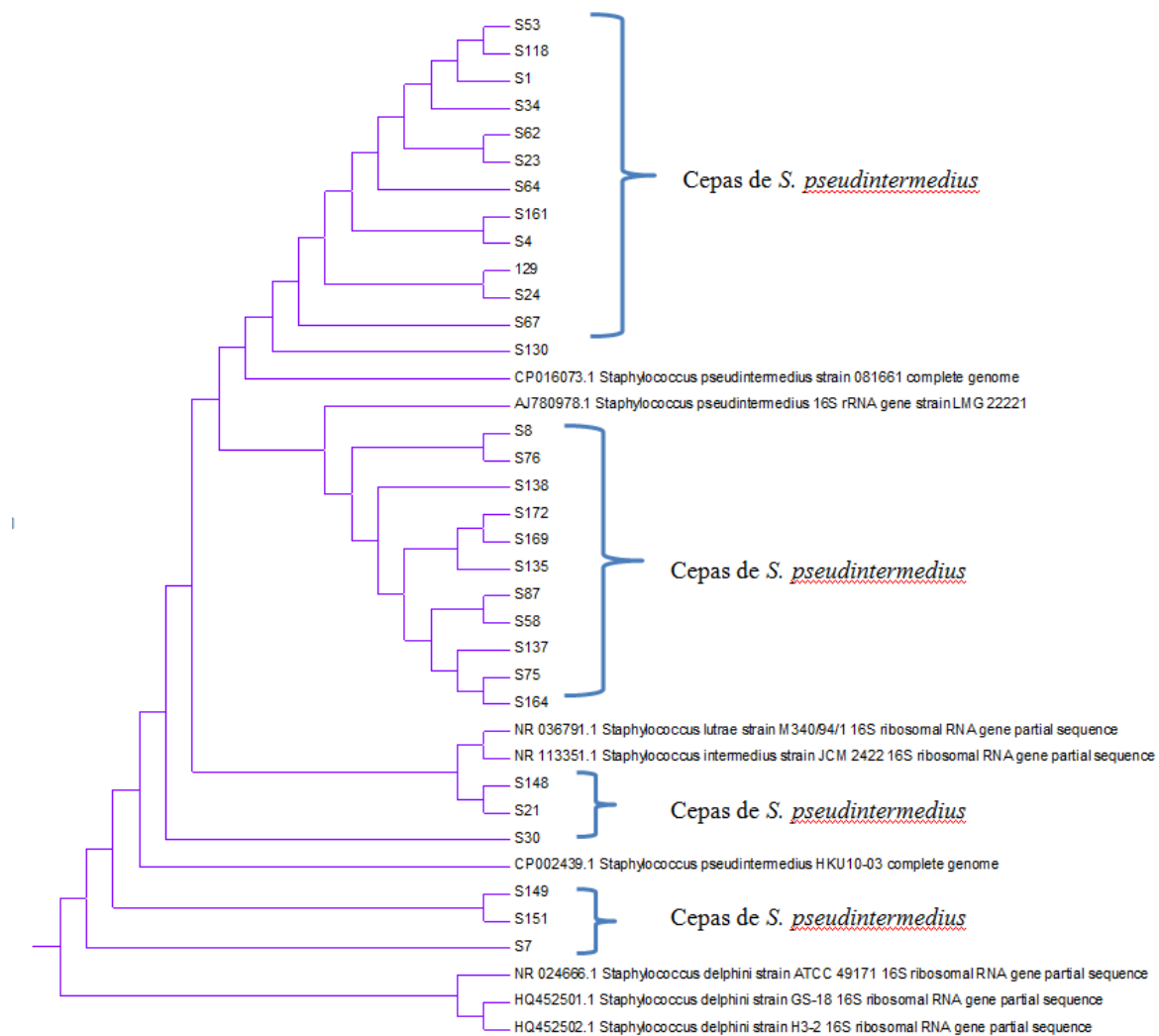


Figura 13: Árbol filogenético correspondiente al grupo de especies Hyicus-Intermedius según Lambers 2012 donde se agrupan las cepas de *S. psudintermedius* aisladas.

7.2.2 *Staphylococcus argenteus*

Esta especie es similar fenotípicamente a *S. aureus* pero cuando crecen en medios de cultivo las colonias presentan un color blanco y no amarillas debido a que carecen de un carotenoide llamado staphyloxantina (Tong et al. 2015, 2013).

La estructura genética de la población de *S. aureus* ha sido ampliamente estudiada y descrita en base al método MLST, sin embargo, una serie de aislamientos que se identificaron como supuestos *S. aureus* no pudieron ser tipificados por este método ya que los primers originales utilizados para amplificar los siete genes no amplificaban. Todos estos aislamientos fueron incluidos en lo que se denominó el complejo clonal 75 (CC75) (Enright et al. 2000).

Posteriormente se propuso el nombre de *Staphylococcus argenteus* a todas aquellas cepas pertenecientes al CC75 y los secuenciotipos relacionados (Holt et al. 2011), terminando en una clasificación taxonómica formal como *S. argenteus* sp. nov (Tong et al. 2015).

Varios trabajos han reportado que los *Staphylococcus* pertenecientes al CC75 han sido aislados y asociados a MRSA comunitarios presentes en el Norte de Australia, Camboya, Indonesia, Fiji y Trinidad y Tobago (Jenney et al. 2014; Monecke et al. 2014; McDonald et al. 2006). Por otro lado la información contenida en la base de datos del MLST indica que cepas de *S. argenteus* están presentes en Europa y África. Estos trabajos concluyen que la especie *S. argenteus* estaría en un proceso de dispersión que ha comenzado recientemente, aumentando su frecuencia de aparición. En animales existe un único reporte, una cepa de *S. argenteus* fue aislada de materia fecal de un murciélago frugívoro, lo que indicaría que esta especie podría también encontrarse en otras especies de animales (Akobi et al. 2012). Nuestro trabajo confirma esta observación y posiciona a los perros como posible elemento asociado a la dispersión y reservorio.

7.2.2.1 Variación intraespecífica

Las cepas de *S. argenteus* aisladas en este trabajo (S2, S59, S86 y S87, ver anexo III) pertenecen a dos linajes diferentes que estarían circulando en Montevideo (Figs. 14 y 15). Hasta donde sabemos los aislamientos obtenidos en este trabajo serían los primeros de la especie en perros y tampoco hay reportes de resistencia en esta especie. La identificación molecular de esta especie utilizando el marcador de ARNr 16S es confiable, si consideramos que los valores de identidad son de 99,7%, 100% y 100%, en las tres cepas aisladas (ver anexo III).

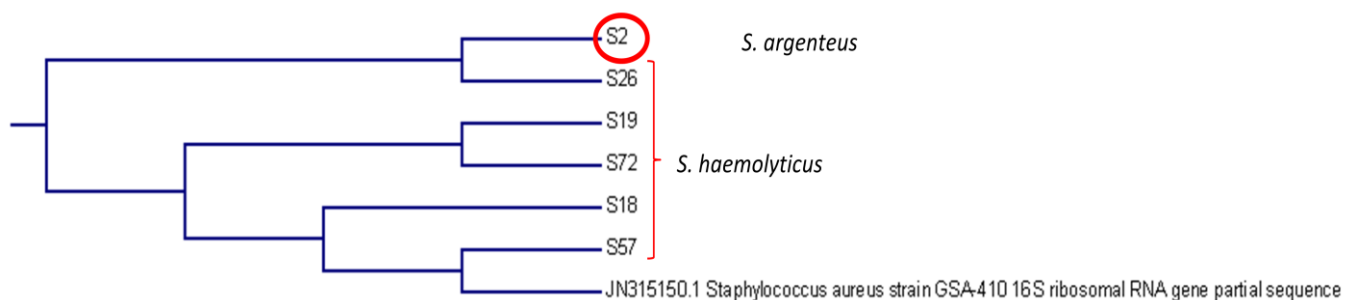


Figura 14: Árbol filogenético correspondiente al cluster Aureus según Lambers (2012) donde se agrupa una de las cuatro cepas de *S. argenteus* aisladas junto con cepas aisladas de *S. haemolyticus*.

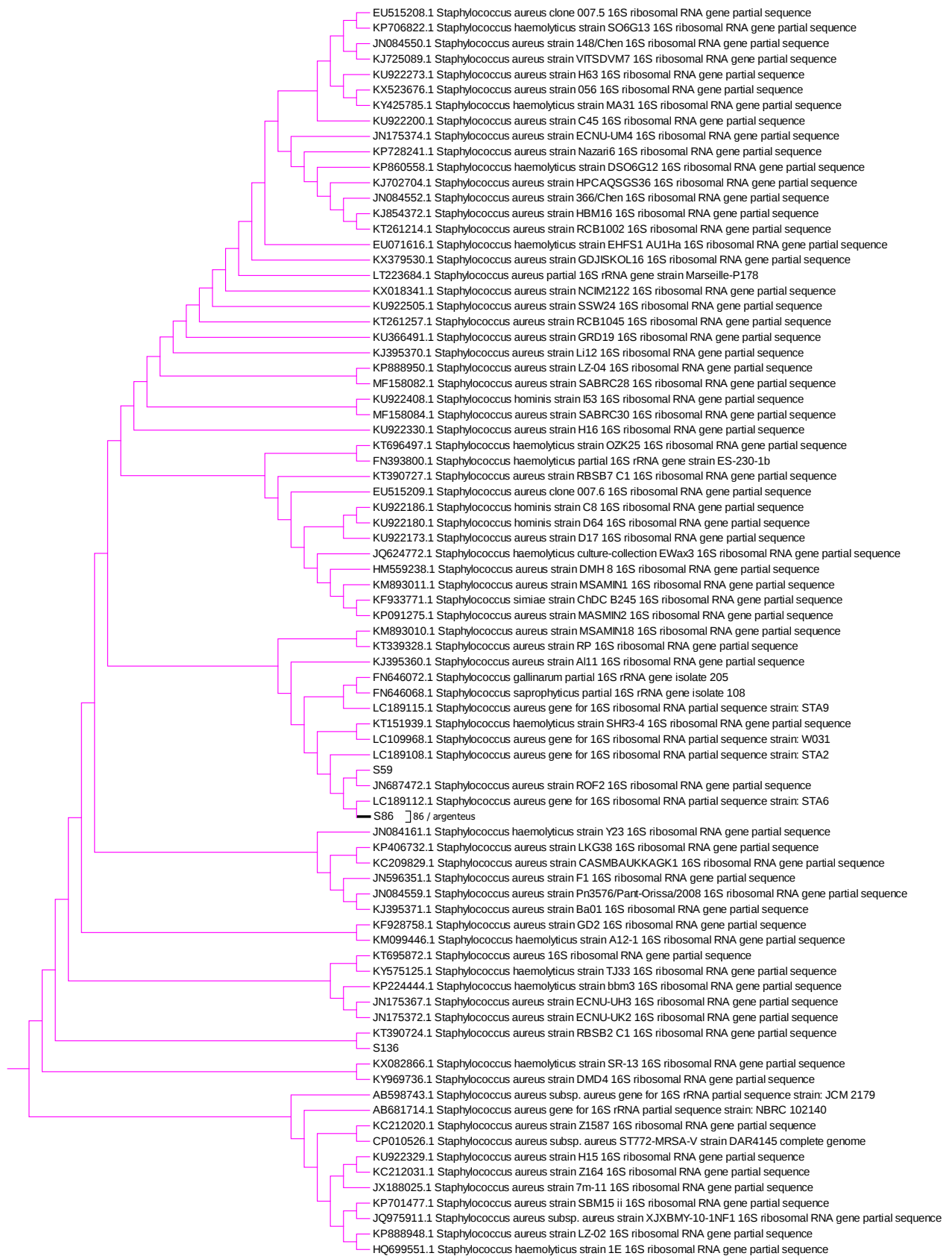


Figura 15: Árbol filogenético correspondiente al grupo de especie *Aureus-Epidermidis* según Lambers (2012) donde se agrupan dos de las cuatro cepas de *S. argenteus* aisladas.

7.2.3 *Staphylococcus xylosus*

S. xylosus es una especie que pertenece al grupo de los CoNS y normalmente se puede aislar de la piel y faringe de animales y ocasionalmente de humanos. Es una bacteria comensal que es capaz de colonizar una variedad de nichos, contaminando agua, forrajes, suelo, etc. Reportes recientes han determinado que en ciertas circunstancias puede causar infecciones en animales y humanos (Dordet-Frisoni et al. 2007).

7.2.3.1 Variación intraespecífica

Las diez cepas de *S. xylosus* aisladas en este trabajo (S5, S9, S13, S15, S22, S33, S46, S51, S85 y S153, ver anexo III) formarían parte de un único linaje, lo que sugiere que este es el único o mayoritario linaje circulando en Montevideo. El agrupamiento junto con cepas de *S. saprophyticus* y *S. xylosus* en la filogenia del ARNr 16S concuerda trabajos anteriores (Lamers et al. 2012). Un caso interesante es la similar ubicación de la cepa de *S. xylosus* (DMB3-Bh1) aislada de materia fecal de ratón y secuenciada por Kaur y colaboradores el año pasado, la cual también se ubicó en un clado representado por estas dos especies (Kaur et al. 2016). Todas las cepas de *S. xylosus* obtenidas fueron aisladas de muestras de faringe por lo que podríamos suponer que esta especie se habría adaptado a colonizar preferentemente este nicho en los perros (Fig. 16).

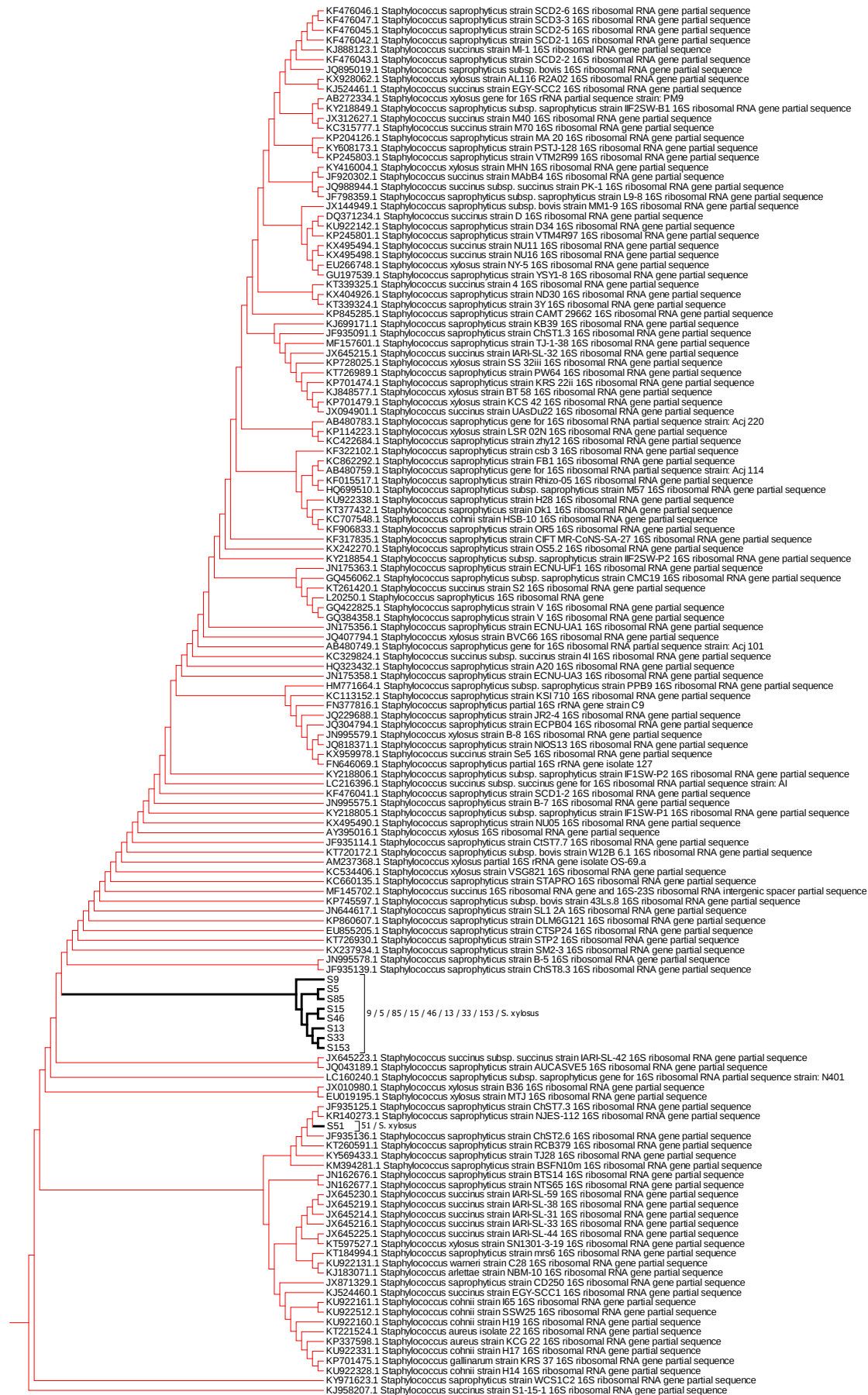


Figura 16: Árbol filogenético correspondiente al grupo de especies *Saprophyticus* según Lambers (2012) donde se agrupan todas las cepas de *S. xylosois* aisladas.

7.2.4. *Staphylococcus sciuri*

El *S. sciuri* es una especie que puede ser aislada de piel y mucosas de una amplio rango de animales, incluyendo mascotas y animales de granja (Hauschild & Schwarz 2003). También se han obtenido cepas de esta bacteria a partir de muestras de suelo, arena, agua y pasto (Kloos 1980).

7.2.4.1 Variación intraespecífica

En este trabajo se aislaron cinco cepas de *S. sciuri* (S11, S27, S43, S131 y S167, ver anexo III) las cuales forman un grupo monofilético en la filogenia del ARNr 16S. Este linaje circulante mayoritario, agrupa claramente dentro del clado formado exclusivamente por los *S. sciuri* de la base de datos (Fig. 17).

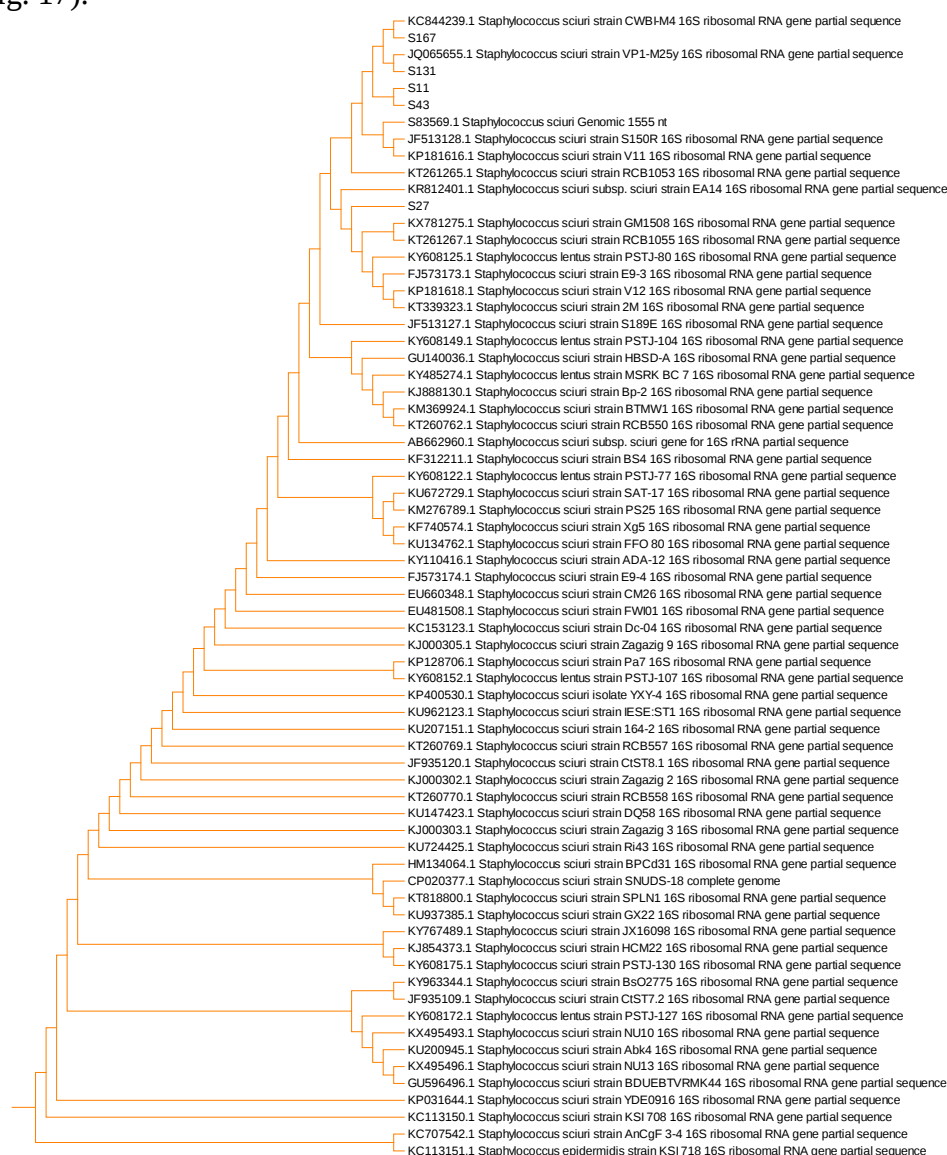


Figura 17: Árbol filogenético correspondiente al grupo de especies *Sciuri* según Lambers 2012 donde se agrupan todas las cepas de esta especie aisladas.

7.2.5 *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis forma parte de la flora normal de piel y mucosas tanto de humanos como de animales. Un número importante de estudios donde se comparaban las poblaciones de esta bacteria en humanos y animales han demostrado que las cepas pueden ser transmitidas entre ambos grupos (Moodley & Guardabassi 2009; Weiss et al. 2013). Los resultados sugieren que en los perros de Montevideo la frecuencia es baja. Solamente se aislaron dos cepas de esta especie (S17 y S41 ver anexo III), lo que no permite sacar conclusiones sobre la variación intraespecífica.

7.2.5.1 Resistencia a meticilina

En el año 2015, en Dublin, Irlanda, McManus y colaboradores aislaron 40 cepas de *S. epidermidis* de perros, siendo 33 resistentes a meticilina, esto representa un 82.5% de resistencia a este antibiótico (McManus et al. 2015). De las dos cepas que se aislaron en este trabajo una de ellas (S17) era resistente a meticilina. Varios estudios han demostrado que la resistencia a meticilina es más común en cepas de *S. epidermidis* y *S. haemolyticum* que en las cepas de *S. aureus* tanto en aislamientos de animales como en humanos (Garza-González et al. 2010; Busscher et al. 2006). Por lo que es posible que sea necesario aumentar el muestreo para aproximarnos al porcentaje real de resistencia en perros de Montevideo.

7.2.6 *Staphylococcus cohnii*

Esta especie es, como muchas otras, comensal y puede ser aislada tanto de piel como de mucosas en perros y humanos. En el 2016 se aisló y secuenció el genoma completo de la cepa SW120 de *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticus* aislada a partir de un hisopado de oído de un perro (Bean et al. 2017). Al igual que una de nuestras cepas, S125, SW120 presenta el fenotipo resistente a meticilina.

7.2.6.1 Variación intraespecífica

Las cepas aisladas en este estudio (S55, S115 y S125 ver anexo III) se ubican en dos linajes diferentes de *Staphylococcus cohnii*, por lo que es posible sugerir que están circulando al menos estos dos linajes. Dos de las tres cepas aparecen cercanamente relacionadas y la tercera en otro linaje relativamente más alejado.

7.2.6.2 Resistencia a meticilina

S. cohnii subsp. *urealyticus* se describió por primera vez en 1991 (Kloos & Wolfshohl 1991) y cepas resistentes a meticilina se han recuperado previamente de animales de compañía (Quitoco et al. 2013). El análisis de la secuencia del gen *mecA* de la cepa S125 muestra un 100% de identidad con la secuencia de otro gen *mecA* obtenido en este estudio, en un *S. epidermidis* (S17). Es interesante que el resultado del genotipificado indicó que ambos casetes son distintos, mientras que el casete de S125 pertenece al tipo III, el casete de S17 pertenece al tipo IV. Tomado en conjunto esto sugeriría eventos de transferencia horizontal recurrente entre los genomas y pueden incluir elementos específicos dentro del casete (Figs. 18 y 19).

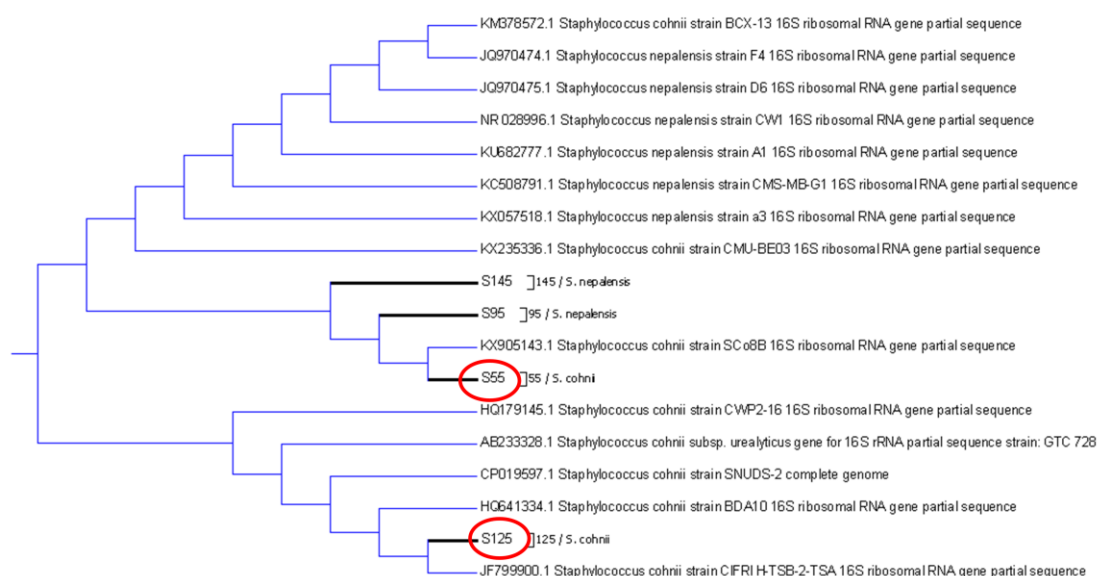


Figura 18: Árbol filogenético correspondiente al cluster Chonii-Nepalensis según Lambers (2012) donde se agrupan dos de todas las cepas de esta especie aisladas.

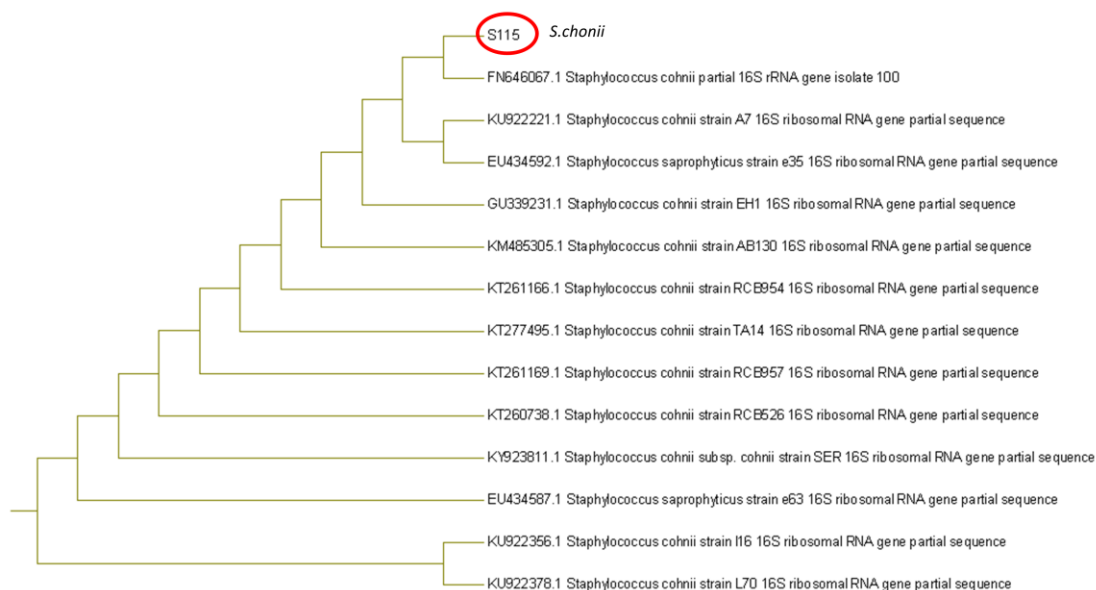


Figura 19: Árbol filogenético correspondiente al cluster Chonii según Lambers (2012) donde se agrupan dos de todas las cepas de esta especie aisladas.

7.2.7 *Staphylococcus haemolyticus*

El *S. haemolyticus* se encuentra frecuentemente como comensal en humanos y animales. Ya han sido documentados aislamientos tanto en humanos como en perros. No hay datos que sugieran una localización anatómica preferencial de *S. haemolyticus* en perros, aunque en humano esta especie parece colonizar preferentemente la zona de las axilas, periné e ingle (Kern & Perreten 2013).

7.2.7.1 Variación intraespecífica

Las cepas aisladas en este trabajo (S18, S19, S26, S57, S72, S136 y S159, ver anexo III) pertenecen a tres linajes distintos, formando parte de clusters que incluyen especies de *S. aureus* y *S. haemolyticus* (Figs. 15 y 20).

7.2.7.2 Resistencia a meticilina

Trabajos realizados en los Países Bajos en el año 2004 indicaron que un 36% de las cepas de *S. haemolyticus* aisladas de perros y gatos fueron resistentes a meticilina (van Duijkeren et al. 2004). Por otro lado, en Lituania en un trabajo realizado por Ruzauskas y colaboradores en el año 2014, se obtuvieron un 1,6% de resistencia en aislamientos de *S. haemolyticus* obtenidos de perros (Ruzauskas et al. 2014). Posteriormente, en otro trabajo realizado McManus y colaboradores obtuvieron un total de 20 cepas de *S. haemolyticus* resistentes en un total de 21 cepas de esta bacteria aislada de perros, estos valores representan una frecuencia de resistencia de 95,2% (McManus et al. 2015). Nuestro

muestreo permitió el aislamiento de dos cepas de *S. haemolyticus* resistentes a meticilina (S136 y S159) de un total de siete cepas identificadas en esta especie, representando un porcentaje menor (28% aproximadamente.). La primera conclusión de estos resultados es que en al menos dos de los linajes circulantes de *S. haemolyticum* en Montevideo existe el potencial para adquirir los genes de resistencia a meticilina, de hecho, varias de las cepas cercanamente relacionadas han sido descritas como resistentes. Segundo, existe una frecuencia de resistencia altamente variable en distintas regiones geográficas y seguramente esta frecuencia ha cambiado con el tiempo. Por otro lado el menor porcentaje obtenido en este estudio podría sugerir también que los genes de resistencia están, se han adquirido recientemente en estos linajes o que estamos frente a una estabilidad en cuanto a la resistencia, que sería disparada con el potencial uso excesivo de los b-lactámicos. Otra posibilidad es que el bajo valor de resistencia encontrado sea una subestimación, por lo que sería necesario un muestreo más grande para lograr observar cómo se comporta la resistencia en las cepas de esta especie.

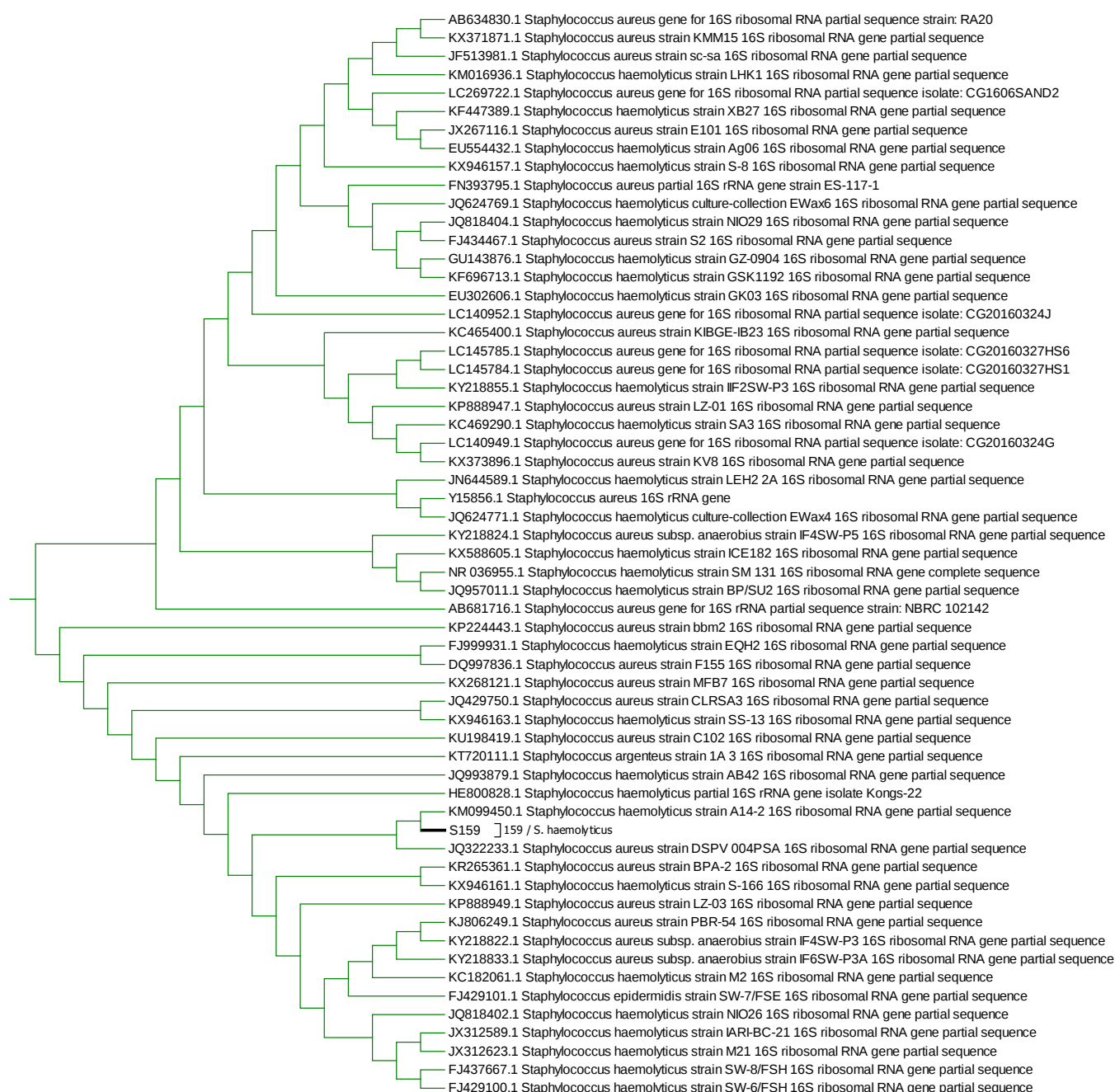


Figura 20: Árbol filogenético correspondiente al cluster Aureus según Lambers (2012) donde se agrupa una de las cepas de *S. haemolyticus* obtenida.

7.2.8 *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*

Los primeros aislamientos de esta especie de *Staphylococcus* en perros datan de 1990 en Japón y fueron obtenidos de casos de otitis y de piodermia, mientras que en Europa los primeros aislamientos se reportaron en el 2002 (Igimi et al. 1990; Bes et al. 2002). A partir de ese momento los aislamientos de esta especie han sido reportados muy frecuentemente en otros países, incluyendo a los Estados

Unidos donde *S. schleiferi* ha sido recurrente en casos de pioderma, otitis e incluso se ha aislado de perros sanos (May et al. 2005; Hariharan et al. 2014). En este trabajo se aisló una única cepa de *S. schleifer* (S76, ver anexo III). Esta cepa se ubicó filogenéticamente en el cluster donde se ubican las cepas de *S. pseudintermedius* lo que concuerda con los resultados previos en donde se muestra que ambas especies aparecen mezcladas en distintos linajes, incluso utilizando otros marcadores genéticos (Lamers et al. 2012) (Fig. 13).

7.2.9 *Staphylococcus nepalensis*

En el año 2003 Spergser y colaboradores en Viena, Austria, reportaron la presencia de una nueva especie de *Staphylococcus* aislada de cabras de la región del Himalaya que presentaban neumonía. Para esta nueva especie ellos propusieron el nombre de *Staphylococcus nepalensis* (Spergser et al. 2003).

Filogenéticamente esta especie está cercanamente relacionada con las especies de *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticum*, *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii*, *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, *Staphylococcus succinus* y *Staphylococcus xylosus* (Spergser et al. 2003). Posteriormente en el 2006 se reportó el aislamiento de cinco cepas de *S. nepalensis* que provenían de muestras de orina humana, tracto gastrointestinal de monos, piel de cerdos y muestras ambientales (Nováková et al. 2006). Finalmente en el año 2013, en Eslovaquia, reportaron el aislamiento de un gran número de cepas de esta especie aisladas a partir de materia fecal de murciélagos (Vandžurová et al. 2013). Al momento de realizar este trabajo no se ha encontrados reportes bibliográficos de aislamientos de *S. nepalensis* en perros, por lo que este trabajo representaría un aporte original en este sentido, aunque desde hace un tiempo es claro que la especie tiene capacidad de colonizar varias especies de hospederos mamíferos.

7.2.9.1 Variación intraespecífica

Las cuatro cepas de esta especie aisladas a partir de perros se ubican claramente en el cluster filogenético conformado por especies de *S. cohnii* y *S. nepalensis* (Fig 18). Esto podría sugerir que en este momento estaría circulando un único linaje o un linaje mayoritario de *S. nepalensis* en perros en Montevideo. No se observó una preferencia específica de la especie por una zona anatómica particular, ya que las cepas fueron aisladas a partir de muestra perianal, faringe y de lesión de piel. Esto a su vez soporta la idea de que la especie tiene la plasticidad para colonizar diferentes nichos.

7.2.10 *Staphylococcus arlettae*

Staphylococcus arlettae fue aislado por primera vez en el año 1984 por investigadores alemanes. Estos aislamientos provenían de muestras de piel y faringe de aves de corral y cabras (Schleifer et al. 1984). Posteriormente se determinó que esta especie tenía el potencial de degradar colorantes utilizados en la industria textil y del cuero (colorante azóicos), así como también algunas cepas tenían la capacidad de promover el crecimiento vegetal (Elisangela et al. 2009; Sagar et al. 2012). Los aislamientos son obtenidos de una gran variedad de muestras con orígenes bien distintos. Solamente uno de nuestros aislamientos (S114) fue una cepa de *S. arlettae*, éste provenía de hisopado de faringe. Filogenéticamente se ubicó formando un grupo monofilético con las otras cepas de *S. arlettae* disponibles en la base de datos. El aislamiento reportado en este trabajo representa el primero de la especie en perros. No es claro, por lo tanto, qué potencial patógeno podrían tener en perros u otros animales domésticos (Fig. 21).

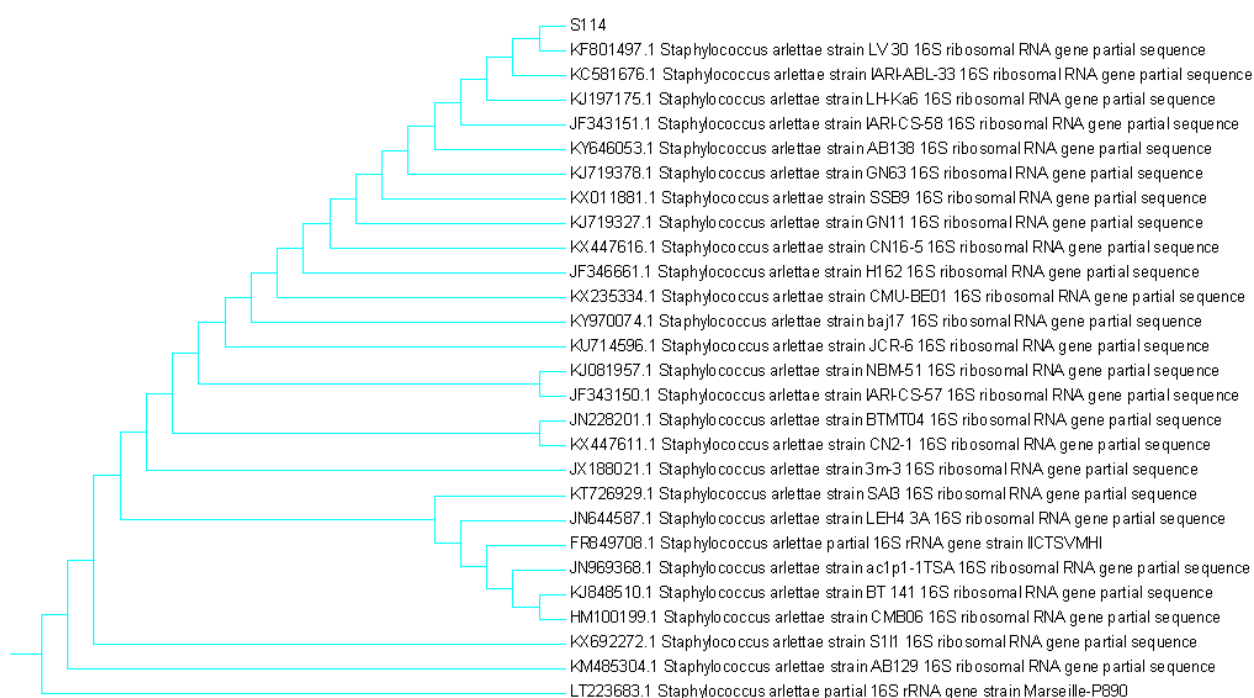


Figura 20: Árbol filogenético correspondiente al cluster Arlettae-Kloosi según Lambers (2012) donde se encuentra la única cepa de esta especie aislada

7.3 Resistencia a antibióticos en *Staphylococcus*

7.3.1 Fenotipo de la resistencia

En el año 2015 en Lituania un grupo de investigadores realizó un relevamiento de los patrones de resistencia en *Staphylococcus* aislados a partir de mascotas (Ruzauskas et al. 2015). En el trabajo los autores reportan que la resistencia a **metecilina** estaba mayormente concentrada en cepas de la especie de *S. pseudintermedius* al igual que ocurrió con nuestros aislamientos (de las siete resistentes tres eran *S. pseudintermedius*). Cabe pensar que al ser la especie mayoritaria en los perros dentro de los *Staphylococcus* tiende a acumular mayor cantidad de genes de resistencia en su genoma, por lo que la frecuencia de resistencia se vincularía mayormente a su mayor presencia y a su asociación histórica con el hospedero.

La resistencia a **vancomicina**, por otro lado, fue nula en las cepas aisladas de perros, lo que coincide con lo encontrado en trabajos de otros países como Lituania (Ruzauskas et al. 2015) y Turquía (Aslantas et al. 2013). La explicación más aceptada es que esto podría deberse a que las cepas circulantes en perros no están sometidas a la presión selectiva por parte de este antibiótico, dado su escaso uso, lo que a su vez mantiene a los linajes circulantes sensibles a este antibiótico.

La resistencia a **eritromicina** encontrada fue de un 23%, un valor pequeño si lo comparamos con los reportados en el trabajo de Ruzauskas en el 2015 que obtuvo un 87,5% de resistencia a eritromicina. En Brasil el porcentaje de resistencia a eritromicina detectada fue de un valor intermedio de 57% (Godoy et al. 2016) y en Korea fue de un 64% (Jang et al. 2014). El bajo porcentaje obtenido a partir de nuestros aislamientos podría indicar que la presión selectiva frente a este antibiótico es mucho mayor en los países nombrados que en el nuestro ya que el uso de eritromicina está menos extendido y no es de uso habitual en la clínica veterinaria.

La resistencia a **kanamicina** detectada también fue más baja en comparación con trabajos previamente reportados. En Portugal en el año 2016 se observó que en cepas aisladas de perros la resistencia a kanamicina era de un 19% (Couto et al. 2016). Solamente un 10% de nuestras cepas aisladas resultaron resistentes a este antibiótico.

Con respecto a la resistencia a **enrofloxacin**, el porcentaje de cepas obtenido fue de un 18%, también menor a lo reportado en Korea (42,3%) y similar a lo reportado en Portugal (Couto et al. 2016; Jang et al. 2014).

Es muy importante destacar que en nuestro país el uso de la enrofloxacin en medicina veterinaria está muy extendido, y va en aumento, para tratar cualquier tipo de lesión de piel, otitis, etc. No existen reportes publicados anteriormente sobre la prevalencia de la resistencia a este antibiótico en nuestro país en pequeños animales. Por conocimientos previos del laboratorio del área

en cuanto al procesamiento de las muestras se ha visto de un tiempo a esta parte que las cepas resistentes a enrofloxacin han aumentado. Por otro lado, es importante notar que este antibiótico es utilizado exclusivamente a nivel veterinario por lo que podemos deducir que la resistencia al mismo ha aparecido y se ha expandido en cepas exclusivamente de animales domésticos. Sería muy interesante en un futuro hacer nuevamente un relevamiento o hacer un estudio de seguimiento de las cepas resistentes a enrofloxacin para constatar nuestra hipótesis sobre la tendencia al aumento de la resistencia a este antibiótico.

Con respecto a la resistencia frente a un **antibiótico combinado con un inhibidor de β -lactamasa**, como por ejemplo amoxi/clavulánico, se obtuvo un 4% de resistencia. Este resultado es similar con el reportado en Turquía, Korea y Portugal (Aslantaş et al. 2013; Couto et al. 2016; Jang et al. 2014).

7.3.2 Origen de la resistencia a meticilina

A partir de la base de datos se recuperaron 368 secuencias del gen *mecA* perteneciente a diferentes especies de *Staphylococcus*. A estas se sumaron las 7 secuencias obtenidas en este trabajo. Se analizó la variabilidad a nivel de la secuencia nucleotídica en el alineamiento de las 250 bases, como resultado todas estas secuencias representaron un total de 22 haplotipos o variantes. La distribución de las especies del género en estos 22 haplotipos resultó ser altamente heterogénea, es decir no se observa un patrón de asociación claro entre los haplotipos y las especies. Esto tiene dos posibles explicaciones no mutuamente excluyentes, la primera es que la zona amplificada no es suficientemente variable como para mapear el origen de los haplotipos a las especies y la segunda es que existe una alta tasa de transferencia horizontal para este gen.

Se seleccionaron 22 secuencias de estos haplotipos, se alinearon y se realizó la filogenia. Las secuencias de nuestros siete genes de resistencia (pertenecientes a las siete cepas resistentes obtenidas), representaron 5 haplotipos que aparecen filogenéticamente agrupadas en tres linajes diferentes (independientes pero cercanos) dentro de un mismo grupo (Fig. 10). Esto representa una variabilidad de secuencia muy importante para la cantidad de cepas resistentes identificadas y para la magnitud del estudio realizado en esta tesis. El análisis de la distribución de los haplotipos sugiere que *S. aureus* podría ser el origen de los genes *mecA* en nuestras cepas, ya que en la totalidad de los casos los haplotipos cercanamente relacionados pertenecen a esta especie. Claro que la distribución de especies en la base de datos del GenBank, específicamente en relación a las secuencias del gen *mecA*, no es equivalente para todas las especies del género, por lo que no es posible descartar que lo que se observa es consecuencia de la sobrerrepresentación de secuencias de *S. aureus*.

Es interesante que no se haya observado una coincidencia de la filogenia de los haplotipos del gen *mecA* y el tipo de casete asignado a cada muestra resistente a meticilina. Ya que ambos elementos son utilizados como señal de origen de esta resistencia se esperaría, *a priori*, que los genes del mismo casete aparezcan más cercanos en la filogenia. Si bien no es posible descartar completamente los errores de secuenciación, esto es poco probable dado que tenemos doble secuenciación de cada base. Otra posibilidad, más factible, es que el marcador no sea suficientemente informativo para asignar origen, lo que apuntaría a que el casete es mejor marcador de origen y por lo tanto sería necesario secuenciar una parte más variable (más informativa) del gen. Finalmente otra posibilidad es que exista cierto grado de transferencia horizontal a nivel de este gen, que no incluya el casete.

7.3.3 Genotipificación, los CoNS como reservorios de SCC*mec*

La mayoría de los estudios con respecto a la resistencia a la meticilina y los casetes cromosomales (SCC*mec*) se han centrado en el *S. aureus* debido a su importancia como patógeno de humanos. Más recientemente varios trabajos se han concentrado en el estudio e investigación de los CoNS como grupo importante en la reserva de los SCC*mec* y por ende de genes de resistencia, así como también en los mecanismos involucrados en la transferencia horizontal de esos genes (Hanssen et al. 2004; Hanssen & Sollid 2007).

Se ha demostrado en humanos que en las cepas de CoNS la presencia de SCC*mec* que portan genes de resistencia a meticilina es mayor al 70%, mientras que la presencia de estos elementos móviles en *S. aureus* es solamente de un 34% (Diekema et al. 2001). En cepas de *S. aureus* los SCC*mec* de tipo I, II y III son mayoritariamente portados por cepas intrahospitalarias, mientras que los SCC*mec* tipo IV, V y VI son portados por cepas comunitarias (Eed et al. 2015). Esto es muy distinto en cepas de CoNS, en donde los SCC*mec* se distribuyen de manera más variada dependiendo del origen del aislamiento (Eed et al. 2015; Xu et al. 2015). En nuestro trabajo se pudo determinar que el SCC*mec* tipo V fue el más prevalente (57%), entre nuestros aislamientos de cepas resistentes a meticilina. Esto mismo reportaron Jang y colaboradores en el 2014, con una frecuencia de 47% de las cepas aisladas conteniendo el SCC*mec* tipo V (Jang et al. 2014). Una de las cepas que presentaban en SCC*mec* tipo V pertenece a la especie *S. haemolyticus*, siendo el segundo caso reportado. Ya que en un estudio relativamente reciente, realizando en Bélgica, se reportó una cepa de las mismas características aislada de perros que ingresaban al hospital veterinario (Vanderhaeghen et al. 2012). Se cree que algunas cepas o linajes de esta especie de *Staphylococcus* se transformaran a corto plazo en un patógeno importante de humanos a nivel intrahospitalario (Piette & Verschraegen 2009), por lo

que detectarlas en animales de compañía podría estar marcando el inicio de la aparición de cepas de *S. haemolyticus* resistentes a meticilina patógenas a nivel comunitario.

Varios trabajos han determinado que es frecuente encontrar el SCCmec tipo IV en cepas de *S. epidermidis* (Zhang et al. 2009; Jang et al. 2014) inclusive se ha sugerido que cepas de *S. epidermidis* SCCmec tipo IV pueden ser frecuentes responsables de la transformación de cepas comensales de *S. aureus* en MRSA (Hiramatsu et al. 2001). La presencia del SCCmec tipo IV se detectó en nuestra cepas de *S. epidermidis* por lo que podemos suponer que el potencial para la aparición de cepas MRSA está presente en los perros por más que en este trabajo no se han aislado cepas de *S. aureus*.

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A partir de las muestras tomadas de diferentes perros que ingresaron al Centro hospitalario de la Facultad de Veterinaria en el período de mayo 2016 a mayo de 2017 se lograron obtener 153 aislamientos. Se identificaron 65 de ellos, por análisis fenotípico y por secuenciación del ARNr 16S, determinando que las especies que se encuentran circulando en los perros son: *S. epidermidis*, *S. arlettae*, *S. pseudintermedius*, *S. xylosum*, *S. nepalensis*, *S. argenteus*, *S. cohnii*, *S. haemolyticus* y *S. schleiferi*. El análisis filogenético indicó que coexisten varios linajes dentro de las especies encontradas circulando en perros. Siete de estas 65 cepas resultaron ser resistentes a meticilina y 10 cepas resultaron ser cepas MDR (resistentes a multiple drogas). Las cepas resistentes a meticilina contenían el gen *mecA* y pudieron ser tipificadas mediante multipléx PCR detectándose cepas que portaban el casete SCCmec III, IV y V. Podemos concluir que las condiciones para la transferencia de genes de resistencia a meticilina en caninos están dadas ya sea por la existencia de dichos genes y los elementos genéticos móviles en los que ellos son transportados así como también, por la presencia de cepas bacterianas capaces de incorporarlos.

A futuro sería interesante continuar realizando trabajos de seguimientos para poder determinar la prevalencia o los cambios a nivel de resistencia a meticilina así como también, sumar estudios de resistencias a otros antibióticos muy utilizados en medicina veterinaria.

Otro aspecto importante sobre el cual se puede seguir trabajando son las características genómicas de las cepas aisladas con el objetivo de conocer las bases genéticas de las resistencias, presencia de factores de virulencia, entre otros aspectos. La secuenciación de los genomas permitiría además definir completamente el estatus taxonómicos de algunas de las cepas aisladas en especial de aquellas de las que no hay muchos datos de aislamientos en perros, como por ejemplo *S. argenteus* y *S. nepalensis*.

Por otro lado, sería un gran aporte al área incorporar al muestreo otras mascotas como los gatos, que también son considerados un gran reservorio de cepas bacterianas que portan resistencia.

Por último consideramos importante desarrollar un estudio que incluya un muestreo paralelo de dueños y sus mascotas, para poder hacer un análisis de cepas y resistencias compartidas entre ambos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aklilu, E. et al., 2010. Phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from dogs and cats at University Veterinary Hospital, Universiti Putra Malaysia. *Tropical biomedicine*, 27(3), pp.483–492.
- Akobi, B. et al., 2012. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from faecal samples of the Straw-Coloured Fruit Bat (*Eidolon helvum*) in Obafemi Awolowo University (OAU), Nigeria. *BMC microbiology*, 12(1), p.279.
- Anon, 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(5), pp.1613–1617.
- Archer, G.L. & Niemeyer, D.M., 1994. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends in microbiology*, 2(10), pp.343–347.
- Aslantas, Ö. et al., 2013. Prevalence of Methicillin Resistant Staphylococci in Dogs. *Kafkas Universitesi veteriner fakultesi dergisi*. Available at: <http://dx.doi.org/10.9775/kvfd.2012.7073>.
- Ayliffe, G.A., 1997. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 24 Suppl 1, pp.S74–9.
- Ball, K.R. et al., 2008. Antimicrobial resistance and prevalence of canine uropathogens at the Western College of Veterinary Medicine Veterinary Teaching Hospital, 2002-2007. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*, 49(10), pp.985–990.
- Bannoehr, J. & Guardabassi, L., 2012. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary dermatology*, 23(4), pp.253–66, e51–2.
- Barros, E.M. et al., 2012. *Staphylococcus haemolyticus* as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. *Journal of clinical microbiology*, 50(1), pp.166–168.
- Bean, D.C., Wigmore, S.M. & Wareham, D.W., 2017. Draft Genome Sequence of *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticus* Isolated from a Healthy Dog. *Genome announcements*, 5(7). Available at: <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.01628-16>.

- Becker, K., Heilmann, C. & Peters, G., 2014. Coagulase-negative staphylococci. *Clinical microbiology reviews*, 27(4), pp.870–926.
- Berger-Bächi, B., 1994. Expression of resistance to methicillin. *Trends in microbiology*, 2(10), pp.389–393.
- Bergeron, M. et al., 2011. Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 30(3), pp.343–354.
- Bes, M. et al., 2002. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* from two cases of canine pyoderma. *The Veterinary record*, 150(15), pp.487–488.
- van den Bogaard, A.E. & Stobberingh, E.E., 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International journal of antimicrobial agents*, 14(4), pp.327–335.
- Boye, K. et al., 2007a. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I–V. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13(7), pp.725–727.
- Boye, K. et al., 2007b. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I–V. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13(7), pp.725–727.
- Busscher, J.F., van Duijkeren, E. & Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M., 2006. The prevalence of methicillin-resistant staphylococci in healthy horses in the Netherlands. *Veterinary microbiology*, 113(1-2), pp.131–136.
- Bywater, R.J., 2004. Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 51(8-9), pp.361–363.
- Chambers, H.F. & Deleo, F.R., 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature reviews. Microbiology*, 7(9), pp.629–641.
- Couto, N. et al., 2016. Trends and molecular mechanisms of antimicrobial resistance in clinical

- staphylococci isolated from companion animals over a 16 year period. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 71(6), pp.1479–1487.
- Czekaj, T., Ciszewski, M. & Szewczyk, E.M., 2015. Staphylococcus haemolyticus - an emerging threat in the twilight of the antibiotics age. *Microbiology*, 161(11), pp.2061–2068.
- Devriese, L.A. et al., 2005. Staphylococcus pseudintermedius sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(Pt 4), pp.1569–1573.
- Devriese, L.A., Van Damme, L.R. & Fameree, L., 1972. Methicillin (cloxacillin)-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralblatt für Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*, 19(7), pp.598–605.
- Diekema, D.J. et al., 2001. Survey of Infections Due to Staphylococcus Species: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(s2), pp.S114–S132.
- Dordet-Frisoni, E. et al., 2007. Genomic diversity in Staphylococcus xylosus. *Applied and environmental microbiology*, 73(22), pp.7199–7209.
- van Duijkeren, E. et al., 2004. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Veterinary microbiology*, 103(1-2), pp.91–97.
- van Duijkeren, E., Catry, B., et al., 2011. Review on methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(12), pp.2705–2714.
- van Duijkeren, E., Kamphuis, M., et al., 2011. Transmission of methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. *Veterinary microbiology*, 150(3-4), pp.338–343.
- Duquette, R.A. & Nuttall, T.J., 2004. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in dogs and cats: an emerging problem? *The Journal of small animal practice*, 45(12), pp.591–597.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), pp.1792–1797.

- Eed, E.M. et al., 2015. Phenotypic and molecular characterization of HA-MRSA in Taif hospitals, Saudi Arabia. *Journal of infection in developing countries*, 9(3), pp.298–303.
- Elisangela, F. et al., 2009. Biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Staphylococcus arlettae* strain VN-11 using a sequential microaerophilic/aerobic process. *International biodeterioration & biodegradation*, 63(3), pp.280–288.
- Enright, M.C. et al., 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 38(3), pp.1008–1015.
- Eriksen, K.R., 1961. [“Celbenin”-resistant staphylococci]. *Ugeskrift for laeger*, 123, pp.384–386.
- Garza-González, E. et al., 2010. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. *Epidemiology and infection*, 138(5), pp.645–654.
- Godoy, I. de et al., 2016. Antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus* spp. from domestic and wild animals. *Ciência Rural*, 46(12), pp.2148–2151.
- Goering, R.V., 2010. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 10(7), pp.866–875.
- Gradelski, E. et al., 2001. Correlation between genotype and phenotypic categorization of staphylococci based on methicillin susceptibility and resistance. *Journal of clinical microbiology*, 39(8), pp.2961–2963.
- Greene, C.E., 1993. *Enfermedades infecciosas: perros y gatos*,
- Grönthal, T. et al., 2017. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and the molecular epidemiology of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in small animals in Finland. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkx086>.
- Guindon, S. et al., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*, 59(3), pp.307–321.
- Hanselman, B.A. et al., 2009. Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*, 50(9),

pp.954–958.

- Hanssen, A.-M. & Ericson Sollid, J.U., 2006. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS immunology and medical microbiology*, 46(1), pp.8–20.
- Hanssen, A.-M., Kjeldsen, G. & Sollid, J.U.E., 2004. Local variants of Staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(1), pp.285–296.
- Hanssen, A.-M. & Sollid, J.U.E., 2007. Multiple staphylococcal cassette chromosomes and allelic variants of cassette chromosome recombinases in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from Norway. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(5), pp.1671–1677.
- Hariharan, H. et al., 2014. *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* Subspecies *coagulans* from Canine Pyoderma Cases in Grenada, West Indies, and Their Susceptibility to Beta-Lactam Drugs. *Veterinary medicine international*, 2014, p.850126.
- Hauschild, T. & Schwarz, S., 2003. Differentiation of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from free-living rodents and insectivores. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 50(5), pp.241–246.
- Hiramatsu, K. et al., 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*, 9(10), pp.486–493.
- Holden, M.T.G. et al., 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), pp.9786–9791.
- Holt, D.C. et al., 2011. A very early-branching *Staphylococcus aureus* lineage lacking the carotenoid pigment staphyloxanthin. *Genome biology and evolution*, 3, pp.881–895.
- Igimi, S., Takahashi, E. & Mitsuoka, T., 1990. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *International journal of systematic bacteriology*, 40(4), pp.409–411.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC), 2009. Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec): Guidelines for Reporting Novel SCCmec Elements. *Antimicrobial agents and*

chemotherapy, 53(12), pp.4961–4967.

- Ito, T. et al., 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(5), pp.1323–1336.
- Ito, T., Katayama, Y. & Hiramatsu, K., 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(6), pp.1449–1458.
- Jang, Y. et al., 2014. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from dogs in Korea. *The Japanese journal of veterinary research*, 62(4), pp.163–170.
- Jenney, A. et al., 2014. The clinical and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections in Fiji. *BMC infectious diseases*, 14(1). Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-14-160>.
- Jonas, D. et al., 2002. Rapid PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from screening swabs. *Journal of clinical microbiology*, 40(5), pp.1821–1823.
- Katayama, Y., Ito, T. & Hiramatsu, K., 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(6), pp.1549–1555.
- Katayama, Y., Ito, T. & Hiramatsu, K., 2001. Genetic organization of the chromosome region surrounding mecA in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated mecI deletion in expression of resistance in mecA-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(7), pp.1955–1963.
- Kaur, G. et al., 2016. Genome sequencing, assembly, annotation and analysis of *Staphylococcus xylosus* strain DMB3-Bh1 reveals genes responsible for pathogenicity. *Gut pathogens*, 8, p.55.
- Kern, A. & Perreten, V., 2013. Clinical and molecular features of methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococci of pets and horses. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(6), pp.1256–1266.
- Kloos, W.E., 1980. Natural Populations of the Genus *Staphylococcus*. *Annual review of microbiology*, 34(1), pp.559–592.

- Kloos, W.E. & Wolfshohl, J.F., 1991. *Staphylococcus cohnii* Subspecies: *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* subsp. nov. and *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticum* subsp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 41(2), pp.284–289.
- Lamers, R.P. et al., 2012. Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. *BMC evolutionary biology*, 12, p.171.
- Leonard, F.C. & Markey, B.K., 2008. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Veterinary journal*, 175(1), pp.27–36.
- Li, W. & Godzik, A., 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22(13), pp.1658–1659.
- Lozano, C. et al., 2017. *Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. *Vector borne and zoonotic diseases*, 17(4), pp.268–270.
- Magiorakos, A.-P. et al., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), pp.268–281.
- Mann, P.H., 1959. Antibiotic sensitivity testing and bacteriophage typing of staphylococci found in the nostrils of dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 134(10), pp.469–470.
- Martínez-Rosales, C., Cecilia, M.-R. & Susana, C.-S., 2011. Antarctic bacterial isolates that produce cold-active extracellular proteases at low temperature but are active and stable at high temperature. *Polar research*, 30(0). Available at: <http://dx.doi.org/10.3402/polar.v30i0.7123>.
- May, E.R. et al., 2005. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma, or both. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(6), pp.928–931.
- McDonald, M. et al., 2006. Use of a single-nucleotide polymorphism genotyping system to demonstrate the unique epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in remote aboriginal communities. *Journal of clinical microbiology*, 44(10), pp.3720–3727.
- McManus, B.A. et al., 2015. Comparative Genotypes, Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Genes and Antimicrobial Resistance amongst *Staphylococcus epidermidis* and

- Staphylococcus haemolyticus Isolates from Infections in Humans and Companion Animals. *PloS one*, 10(9), p.e0138079.
- Monecke, S. et al., 2014. Population structure of Staphylococcus aureus from Trinidad & Tobago. *PloS one*, 9(2), p.e89120.
- Moodley, A., Damborg, P. & Nielsen, S.S., 2014. Antimicrobial resistance in methicillin susceptible and methicillin resistant Staphylococcus pseudintermedius of canine origin: literature review from 1980 to 2013. *Veterinary microbiology*, 171(3-4), pp.337–341.
- Moodley, A. & Guardabassi, L., 2009. Clonal spread of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci among horses, personnel and environmental sites at equine facilities. *Veterinary microbiology*, 137(3-4), pp.397–401.
- Morris, D.O. et al., 2006. Screening of Staphylococcus aureus, Staphylococcus intermedius, and Staphylococcus schleiferi isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003?04). *Veterinary dermatology*, 17(5), pp.332–337.
- Nawrocki, E.P., Kolbe, D.L. & Eddy, S.R., 2009. Infernal 1.0: inference of RNA alignments. *Bioinformatics*, 25(10), pp.1335–1337.
- Nováková, D. et al., 2006. Occurance of Staphylococcus nepalensis strains in different sources including human clinical material. *FEMS microbiology letters*, 263(2), pp.163–168.
- Okuma, K. et al., 2002. Dissemination of new methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones in the community. *Journal of clinical microbiology*, 40(11), pp.4289–4294.
- Oliveira, D.C. & de Lencastre, H., 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(7), pp.2155–2161.
- Otto, M., 2013. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection: Staphylococcal commensal species such as Staphylococcus epidermidis are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 35(1), pp.4–11.
- Otto, M., 2009. Staphylococcus epidermidis--the “accidental” pathogen. *Nature reviews. Microbiology*, 7(8), pp.555–567.

- Otto, M., 2004. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 9(1-3), p.841.
- Perreten, V. et al., 2010. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(6), pp.1145–1154.
- Piette, A. & Verschraegen, G., 2009. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Veterinary microbiology*, 134(1-2), pp.45–54.
- Priyantha, R., Gaunt, M.C. & Rubin, J.E., 2016. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* colonizing healthy dogs in Saskatoon, Canada. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*, 57(1), pp.65–69.
- Quinn, P.J., 2005. *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*,
- Quitoco, I.M.Z. et al., 2013. First report in South America of companion animal colonization by the USA1100 clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST30) and by the European clone of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (ST71). *BMC research notes*, 6, p.336.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), pp.1572–1574.
- Rubin, J.E., Ball, K.R. & Chirino-Trejo, M., 2011. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*, 52(2), pp.153–157.
- Ruppé, E. et al., 2009. Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(2), pp.442–449.
- Ruzauskas, M. et al., 2014. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in companion animals: a cross-sectional study. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 13, p.56.
- Ruzauskas, M. et al., 2015. Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance patterns of methicillin-resistant staphylococci in Lithuanian pet animals. *Acta veterinaria Scandinavica*, 57,

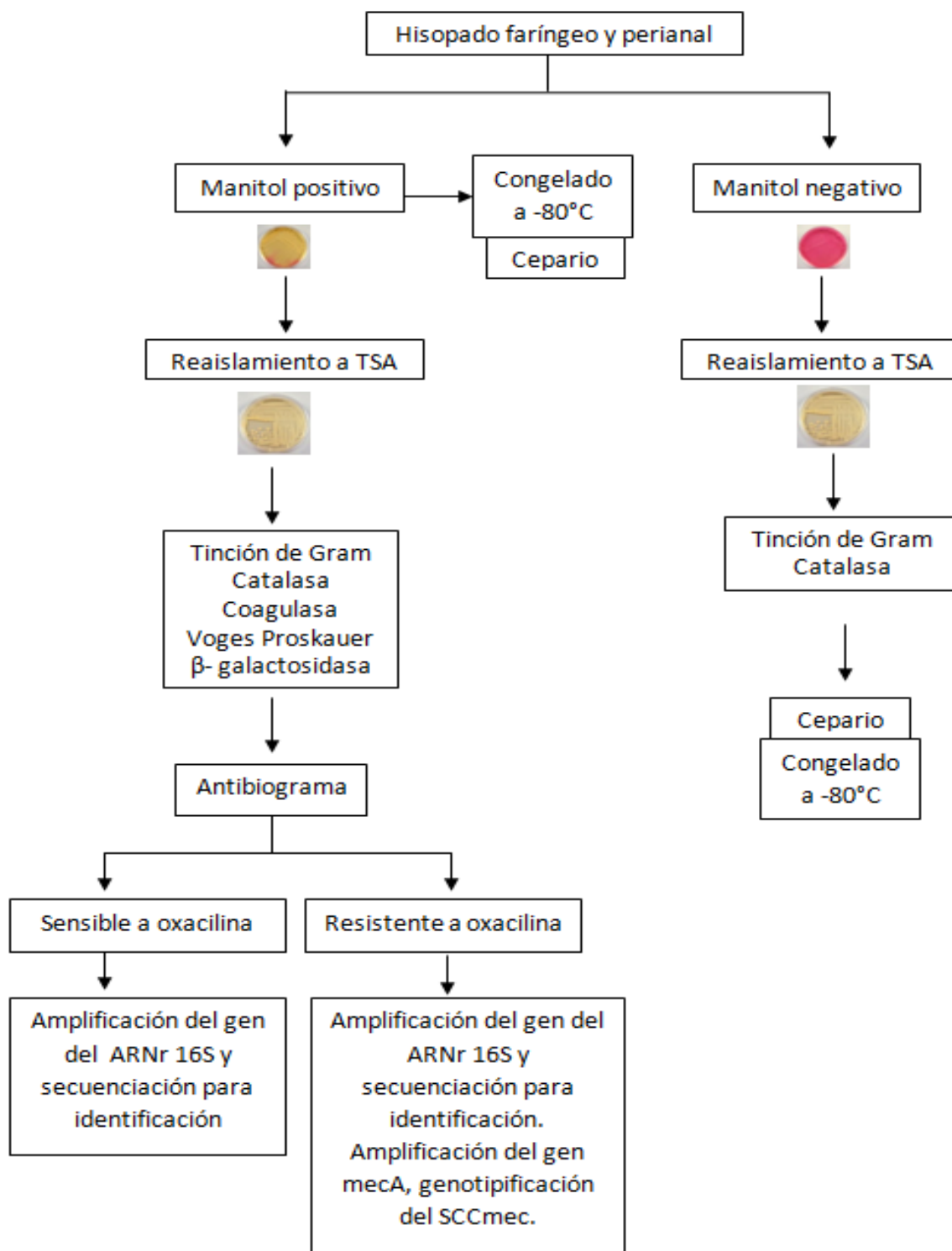
- Sagar, S. et al., 2012. Hexavalent chromium reduction and plant growth promotion by *Staphylococcus arlettae* Strain Cr11. *Chemosphere*, 86(8), pp.847–852.
- Schleifer, K.H., Kilpper-Bälz, R. & Devriese, L.A., 1984. *Staphylococcus arlettae* sp. nov., *S. equorum* sp. nov. and *S. kloosii* sp. nov.: Three New Coagulase-Negative, Novobiocin-Resistant Species from Animals. *Systematic and applied microbiology*, 5(4), pp.501–509.
- Somayaji, R. et al., 2016. Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 85(4), pp.471–476.
- Spergser, J. et al., 2003. *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(Pt 6), pp.2007–2011.
- Stegmann, R. et al., 2010. Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(9), pp.2047–2048.
- Tamura, K. et al., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), pp.2725–2729.
- Tong, S.Y.C. et al., 2015. Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(Pt 1), pp.15–22.
- Tong, S.Y.C. et al., 2013. Virulence of Endemic Nonpigmented Northern Australian *Staphylococcus aureus* Clone (Clonal Complex 75, *S. argenteus*) Is Not Augmented by Staphyloxanthin. *The Journal of infectious diseases*, 208(3), pp.520–527.
- Tse, H. et al., 2012. Production of 2-aminophenoxazin-3-one by *Staphylococcus aureus* causes false-positive results in β -galactosidase assays. *Journal of clinical microbiology*, 50(11), pp.3780–3782.
- Vanderhaeghen, W. et al., 2012. Screening for methicillin-resistant staphylococci in dogs admitted to a veterinary teaching hospital. *Research in veterinary science*, 93(1), pp.133–136.

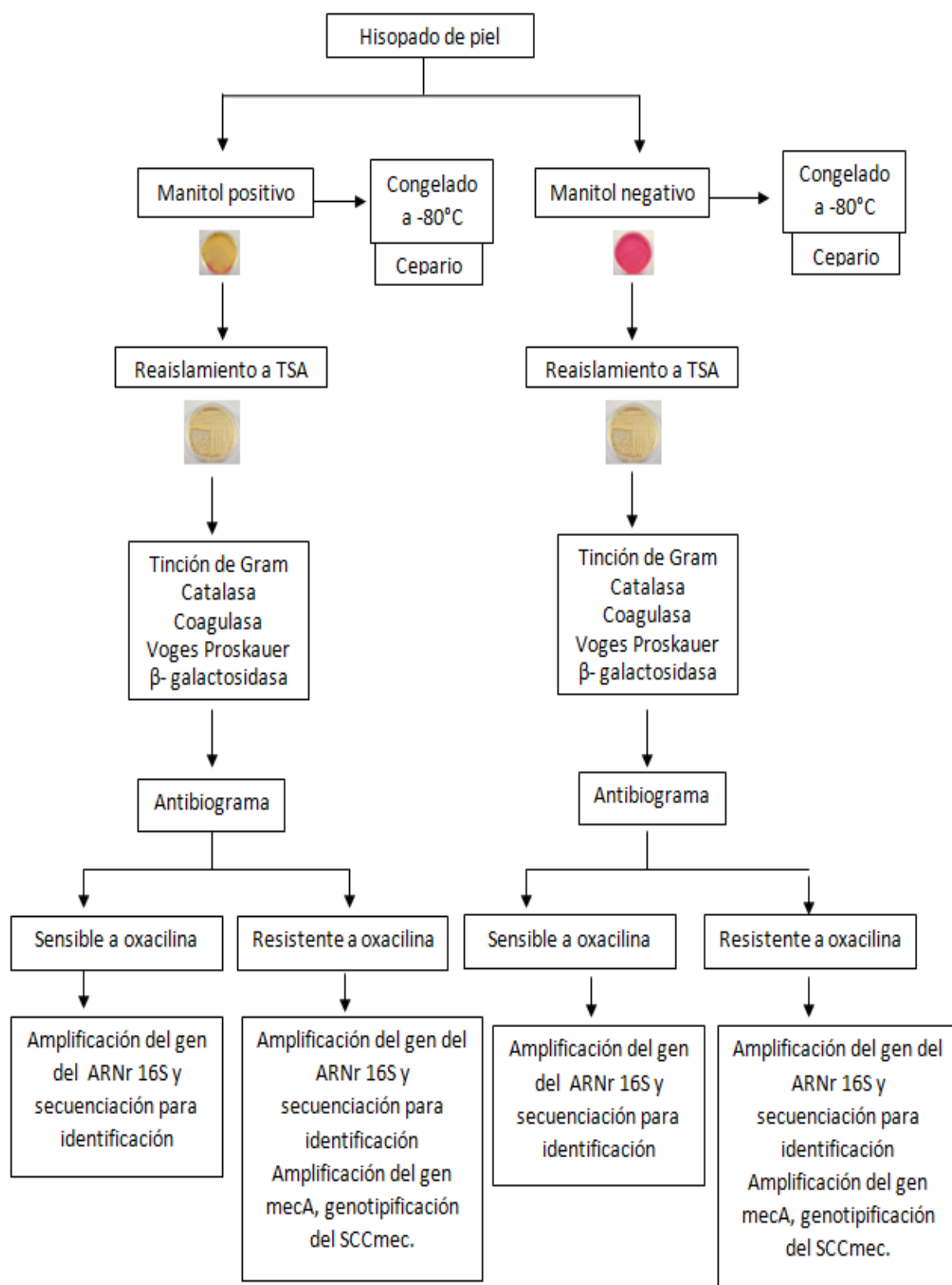
- Vandžurová, A. et al., 2013. *Staphylococcus nepalensis* in the guano of bats (Mammalia). *Veterinary microbiology*, 164(1-2), pp.116–121.
- Van Hoovels, L. et al., 2006. First Case of *Staphylococcus pseudintermedius* Infection in a Human. *Journal of clinical microbiology*, 44(12), pp.4609–4612.
- Weiss, S. et al., 2013. Identification and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus pettenkoferi* from a small animal clinic. *Veterinary microbiology*, 167(3-4), pp.680–685.
- Xu, Z., Mkrtchyan, H.V. & Cutler, R.R., 2015. Antibiotic resistance and *mecA* characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from three hotels in London, UK. *Frontiers in microbiology*, 6, p.947.
- Zhang, K. et al., 2005. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 43(10), pp.5026–5033.
- Zhang, Y., Agidi, S. & LeJeune, J.T., 2009. Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. *Journal of applied microbiology*, 107(4), pp.1375–1383.
- Zong, Z., Peng, C. & Lü, X., 2011. Diversity of SCC*mec* elements in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci clinical isolates. *PloS one*, 6(5), p.e20191.

10. ANEXOS

10.1 Anexo I

Flujogramas de materiales y métodos dependiendo de la procedencia de la muestra.





10.2 Anexo II

Tabla de resultados de pruebas bioquímica realizadas a las cepas seleccionadas según el criterio explicado anteriormente en materiales y métodos (N: negativo, P: positivo, n/c: no corresponde)

Nº de cepa	Procedencia	Fermentación del manitol en MSA	Tinción de Gram	Catalasa	Coagulasa	Voges Proskauer	Detección de β -galactosidasa
1	Lesión de piel	N	CG+	+	+	-	+
2	Faringe	P	CG+	+	+	+	-
3	Perianal	P	CG+	+/-	-	n/c	n/c
4	Lesión de piel	P	CG+	+	+	-	+
5	Faringe	P	CG+	+	-	+/-	+
6	Perianal	N	CG+	+			
7	Faringe	P	CG+	+	+	-	+
8	Perianal	P	CG+	+	+	-	+
9	Faringe	P	CG+	+	-	+/-	+
10	Perianal	N	CG+	+			
11	Faringe	P	CG+	+	-		
12	Perianal	N	CG+	+			
13	Faringe	P	CG+	+	-	+/-	+
14	Perianal	N	CG+	+			
15	Faringe	P	CG+	+	-	+/-	+
17	Lesión de piel	N	CG+	+	-		
18	Faringe	P	CG+	+	-	+/-	+
19	Perianal	P	CG+	+	-		
20	Lesión de piel	P	CG+	+	-		
21	Faringe	P	CG+	+	+	-	+
22	Perianal	P	CG+	+	-	+/-	+
23	Lesión de piel	P	CG+	+	+	-	+
24	Faringe	P	CG+	+	+	-	+
25	Perianal	N	CG+	+			
26	Faringe	P	CG+	+	-		
27	Perianal	P	CG+	+	-		
28	Faringe	N	CG+	+			
29	Perianal	N	CG+	+			
30	Lesión de piel	N	CG+	+	+	-	+
31	Faringe	N	CG+	+			
32	Perianal	N	CG+	+			
33	Faringe	P	CG+	+	-	+/-	+
34	Perianal	P	CG+	+	+	-	+
41	Faringe	N	CG+	+	-		
43	Lesión de piel	P	CG+	+	-		
46	Faringe	P	CG+	+	-	+/-	+
51	Faringe	P	CG+	+	-	+/-	+
53	Faringe	P	CG+	+	+	-	+
54	Perianal	N	CG+	+			
55	Faringe	P	CG+	+	-		
56	Perianal	N	CG+	+			
57	Faringe	P	CG+	+	-		
58	Perianal	P	CG+	+	+	-	+
59	Lesión de piel	P	CG+	+	+	+	-
60	Faringe	N	CG+	+			
61	Perianal	N	CG+	+			
62	Faringe	P	CG+	+	+	-	+
63	Perianal	N	CG+	+			

Nº de cepa	Procedencia	Fermentación del manitol en MSA	Tinción de Gram	Catalasa	Coagulasa	Voges Proskauer	Detección de β -galactosidasa
64	Lesión de piel	N	CG+	+	+	-	+
65	Faringe	N	CG+	+			
66	Perianal	N	CG+	+			
67	Lesión de piel	N	CG+	+	+	-	+
68	Perianal	N	CG+	+			
69	Faringe	N	CG+	+			
70	Perianal	N	CG+	+			
72	Lesión de piel	P	CG+	+	-		
73	Lesión de piel	N	CG+	+			
74	Faringe	N	CG+	+			
75	Perianal	P	CG+	+	+	-	+
76	Faringe	P	CG+	+	+	+	+
77	Perianal	N	CG+	+			
78	Faringe	N	CG+	+			
79	Faringe	P	CG+	+			
80	Perianal	N	CG+	+			
81	Faringe	N	CG+	+			
84	Perianal	N	CG+	+			
85	Faringe	P	CG+	+	-	+/-	+
86	Perianal	P	CG+	+	+	+	-
87	Faringe	P	CG+	+	+	-	+
88	Faringe	N	CG+	+			
89	Perianal	N	CG+	+			
92	Faringe	N	CG+	+			
93	Perianal	N	CG+	+			
94	Faringe	N	CG+	+			
95	Perianal	P	CG+	+	-		
98	Faringe	N	CG+	+			
99	Perianal	N	CG+	+			
107	Faringe	N	CG+	+			
108	Perianal	N	CG+	+			
109	Faringe	N	CG+	+			
111	Faringe	N	CG+	+			
112	Perianal	N	CG+	+			
113	Lesión de piel	N	CG+	+			
114	Faringe	P	CG+	+	-		
115	Perianal	P	CG+	+	-		
116	Faringe	N	CG+	+			
117	Perianal	N	CG+	+			
118	Lesión de piel	N	CG+	+	+	-	+
119	Perianal	N	CG+	+			
120	Faringe	N	CG+	+			
122	Faringe	N	CG+	+			
123	Perianal	N	CG+	+			
124	Faringe	N	CG+	+			
125	Perianal	P	CG+	+	-		
126	Faringe	P	CG+	+			
129	Lesión de piel	N	CG+	+	+	-	+
130	Lesión de piel	P	CG+	+	+	-	+
131	Lesión de piel	P	CG+	+	-		
132	Lesión de piel	N	CG+	+			
133	Perianal	N	CG+	+			
135	Lesión de piel	N	CG+	+	+	-	+

Nº de cepa	Procedencia	Fermentación del manitol en MSA	Tinción de Gram	Catalasa	Coagulasa	Voges Proskauer	Detección de β-galactosidasa
136	Perianal	P	CG+	+	-		
137	Faringe	P	CG+	+	+	-	+
138	Lesión de piel	N	CG+	+	+	-	+
139	Perianal	N	CG+	+			
140	Faringe	N	CG+	+			
141	Faringe	N	CG+	+			
142	Perianal	N	CG+	+			
143	Lesión de piel	N	CG+	+			
144	Faringe	N	CG+	+			
145	Faringe	P	CG+	+	-		
146	Perianal	P	CG+	+	-		
147	Lesión de piel	P	CG+	+			
148	Lesión de piel	N	CG+	+	+	-	+
149	Faringe	P	CG+	+	+	-	+
150	Perianal	N	CG+	+			
151	Lesión de piel	N	CG+	+		-	+
152	Perianal	N	CG+	+	+		
153	Faringe	P	CG+	+	-	+/-	+
154	Faringe	N	CG+	+			
155	Perianal	P	BG+	+			
156	Faringe	P	BG+	+			
158	Lesión de piel	P	CG+	+			
159	Faringe	P	CG+	+	-		
160	Perianal	N	CG+	+			
161	Lesión de piel	N	CG+	+	+	-	+
162	Faringe	N	CG+	+			
163	Perianal	N	CG+	+			
164	Lesión de piel	N	CG+	+	+	-	+
165	Faringe	N	CG+	+			
166	Perianal	N	CG+	+			
167	Faringe	P	CG+	+	-		
168	Perianal	N	CG+	+			
169	Lesión de piel	N	CG+	+	+	-	+
170	Perianal	N	CG+	+			
171	Faringe	N	CG+	+			
172	Faringe	P	CG+	+	+	-	+
173	Perianal	N	CG+	+			
174	Faringe	N	CG+	+			
175	Faringe	P	CG+	+			
176	Perianal	N	CG+	+			
177	Perianal	N	CG+	+			
178	Faringe	P	CG+	+			
179	Perianal	N	CG+	+			
180	Faringe	P	CG+	+			
181	Perianal	N	CG+	+			
182	Faringe	P	CG+	+			
183	Perianal	P	CG+	+			
184	Perianal	P	CG+	+			
185	Perianal	P	CG+	+			
186	Perianal	N	CG+	+			
187	Faringe	P	CG+	+			
188	Lesión de piel	N	CG+	+			

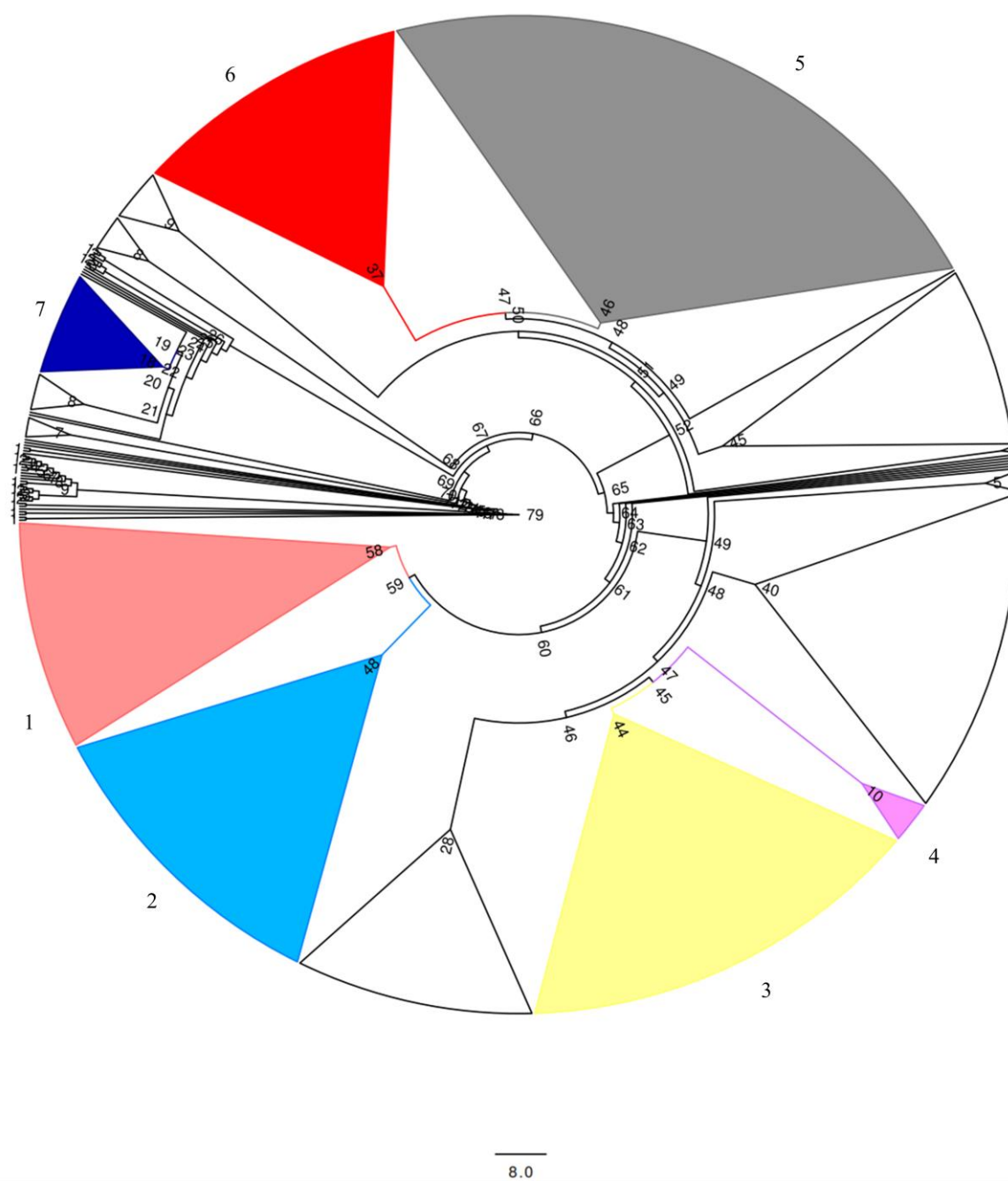
10.3 Anexo III

Tabla de los aislamientos identificados con sus porcentajes de similitudes correspondientes.

N°de cepa	Procedencia	Identificación por ARNr 16S	Porcentaje de similitud
1	Lesión de piel	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.3%
2	Faringe	<i>Staphylococcus argenteus</i>	99.7%
3	Perianal	<i>Enterococcus faecalis</i>	99.5%
4	Lesión de piel	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.3%
5	Faringe	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99.5%
7	Faringe	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.5%
8	Perianal	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.5%
9	Faringe	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99.5%
11	Faringe	<i>Staphylococcus sciuri</i>	99.5%
13	Faringe	<i>Staphylococcus xylosus</i>	100%
15	Faringe	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99.5%
17	Lesión de piel	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.5%
18	Faringe	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99.7%
19	Perianal	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99.3%
20	Lesión de piel	<i>Enterococcus faecalis</i>	99.5%
21	Faringe	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.8%
22	Perianal	<i>Staphylococcus xylosus</i>	98.8%
23	Lesión de piel	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.3%
24	Faringe	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.5%
26	Faringe	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99.5%
27	Perianal	<i>Staphylococcus sciuri</i>	99.8%
30	Lesión de piel	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.7%
33	Faringe	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99.9%
34	Perianal	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.5%
41	Faringe	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.3%
43	Lesión de piel	<i>Staphylococcus sciuri</i>	100%
46	Faringe	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99.9%
51	Faringe	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99.7%
53	Faringe	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.3%
55	Faringe	<i>Staphylococcus cohnii</i>	99.7%
57	Faringe	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99.3%
58	Perianal	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	98.7%
59	Lesión de piel	<i>Staphylococcus argenteus</i>	100%
62	Faringe	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.3%
64	Lesión de piel	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.5%
67	Lesión de piel	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.5%
72	Lesión de piel	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99.3%
75	Perianal	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.6%
76	Faringe	<i>Staphylococcus schleiferi subsp. Coagulans</i>	99.1%
85	Faringe	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99%
86	Perianal	<i>Staphylococcus argenteus</i>	100%
87	Faringe	<i>Staphylococcus argenteus</i>	100%
95	Perianal	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	99.3%
114	Faringe	<i>Staphylococcus arlettae</i>	99%
115	Perianal	<i>Staphylococcus cohnii subsp. Cohnii</i>	99.3%
118	Lesión de piel	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.5%
125	Perianal	<i>Staphylococcus cohnii subsp. Urealyticus</i>	99.3%
129	Lesión de piel	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.3%
130	Lesión de piel	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.5%
131	Lesión de piel	<i>Staphylococcus sciuri</i>	99.3%
135	Lesión de piel	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.8%

→	136	Perianal	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99.3%
	137	Faringe	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.5%
	138	Lesión de piel	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.7%
	145	Faringe	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	99.6%
	146	Perianal	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	99.9%
	147	Lesión de piel	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	99.6%
	148	Lesión de piel	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.8%
	149	Faringe	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.2%
	151	Lesión de piel	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99%
	153	Faringe	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99.2%
→	159	Faringe	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99.7%
	161	Lesión de piel	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.3%
	164	Lesión de piel	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.2%
	167	Faringe	<i>Staphylococcus sciuri</i>	99.5%
	169	Lesión de piel	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.2%
	172	Faringe	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99.3%

10.4 Anexo IV



Árbol filogenético de las cepas aisladas en el trabajo en relación a las secuencias disponibles en el GenBank

- 1: Grupo de especie:-Epidermidis-Aureus, Cepas: 136, 159, 26 (*S. haemolyticus*)
- 2: Cluster Aureus, Cepas: 2, 59, 86 (*S. argenteus*), 18, 19, 57, 62 (*S. haemolyticus*)
- 3: Grupo de especie Saprophylicus, Cepas: 5, 9, 46, 51, 85 (*S. xylosus*)
- 4: Cluster Cohnii-Nepalensis, Cepas: 95, 145, 146, 147 (*S. nepalensis*), 125 (*S. cohnii*)
- 5: Cluster Epidermidis, Cepas 17 y 41 (*S. epidermidis*)
- 6 : Cluster Sciuri, Cepas: 11, 27, 43, 121, 136 (*S. sciuri*)
- 7: Grupo de especie: Hyicus-Intermedius, Cepas 1, 4, 7, 8, 21, 23, 24, 30, 34, 53, 58, 62, 64, 67, 75, 118, 129, 130, 135, 137, 138, 148, 149, 151, 161, 164, 169 y 172 (*Staphylococcus psudintermedius*)