

Diferenciación de cepas de *Staphylococcus intermedius* aisladas de perros con otitis externa.

Se ha empleado la electroforesis en campo pulsado (PFGE), para diferenciar cepas de *Staphylococcus intermedius* aisladas de perros con otitis externa. De las 36 cepas analizadas se han obtenido 32 perfiles distintos. Estos resultados nos indican que la PFGE puede emplearse para diferenciar cepas de una misma especie.

Palabras clave: Otitis externa; *Staphylococcus intermedius*; Electroforesis en campo pulsado.
Rev. AVEPA, 22 (4): 000-000, 2002

M. Tello*, M. Soler*, M. Saco**,
N. Gaju,*** E. Torre*.

* Departament de Sanitat i Anatomia
Animals.

Facultat de Veterinària.
Universitat Autònoma de Barcelona.

** Departament de Microbiologia.
Laboratori de Sanitat Animal.
Barcelona.

*** Departament de Genètica i
Microbiologia.
Facultat de Ciències.
Universitat Autònoma de Barcelona.

Introducción

La otitis externa y las piodermas caninas son dos patologías muy frecuentes en veterinaria. Ambas están causadas principalmente por *Staphylococcus intermedius*. Esta bacteria, aunque se encuentra de forma habitual en piel y mucosas¹, puede ser la causante de infecciones graves si el animal presenta cierta predisposición o se dan determinados factores². Uno de los principales problemas que presentan estas patologías es que pueden convertirse en infecciones crónicas como consecuencia de un tratamiento inadecuado. Si el antibiótico administrado no es el más indicado, o si el tratamiento no se aplica correctamente, las cepas pueden sufrir pequeñas modificaciones en su genoma y convertirse en resistentes. Estas resistencias conducen a la cronificación del proceso y dificultan la curación del animal. Para resolver los casos especialmente complicados es importante poder diferenciar entre cepas de una misma especie y saber si la infección está causada por la misma cepa, por una cepa similar, o si por el contrario la cepa que la produce es completamente distinta a la que causó la infección en un principio.

Sin embargo, la diferenciación entre cepas de una misma especie no puede llevarse a cabo con los métodos de identificación bacteriana que se emplean de forma habitual en el laboratorio, sino que para ello deben utilizarse técnicas de biología molecular que, mediante el estudio del genoma de la bacteria, permiten diferenciar incluso dos cepas muy parecidas. De entre estos métodos destaca la electroforesis en campo pulsado (PFGE) que, si bien es una técnica poco empleada en veterinaria, presenta diversas ventajas. Quizás la más destacable sea que el ADN de la bacteria se extrae de un modo muy poco agresivo, y posteriormente se divide (mediante enzimas de restricción) en pocos fragmentos cuyo tamaño es lo suficientemente grande como para que la lectura e interpretación de los resultados sea mucho más sencilla y fiable. Además, el porcentaje de genoma que se analiza es muy elevado^{3, 4, 5}, lo cual también garantiza una mejor diferenciación entre cepas.

En el presente trabajo mostramos la capacidad de la técnica de PFGE para diferenciar cepas de *Staphylococcus intermedius* aisladas de perros con otitis externa.

Material y métodos

Se analizaron un total de 36 cepas procedentes de 33 perros con otitis externa aguda o crónica. Las muestras se tomaron con hisopos en medio de transporte y se sembraron en placas de agar sangre. Se tomaron varias muestras de cada animal para valorar la evolución de la infección tras la terapia antimicrobiana. Los cocos Gram positivos, oxidasa negativos, catalasa positivos y coagulasa positivos se identificaron con el sistema VITEK⁽¹⁾. En algunos casos se realizaron las pruebas de producción de acetoína y β -galactosidasa.

⁽¹⁾ BioMérieux, Francia.

La extracción del ADN se realizó según el método descrito por otros autores⁶. Con este método el ADN de la bacteria se incluye dentro de pequeños bloques de agarosa, y sobre estos bloques se realiza la digestión enzimática. En nuestro estudio se empleó la endonucleasa *Sma*I⁽¹⁾ que reconoce una secuencia de nucleótidos que se repite muy poco en el genoma de *S. intermedius*⁷, de forma que el ADN se corta muy pocas veces y los fragmentos que se obtienen son de un tamaño considerable. La electroforesis se llevó a cabo utilizando un electrodo en disposición hexagonal (CHEF, Gene Navigator)⁽²⁾ y geles de agarosa⁽¹⁾ al 1% (Boehringer Mannheim, Alemania). Se aplicó un voltaje constante de 225 v durante 22 horas con pulsos cada 6 segundos a 14°C. Tras la electroforesis los geles se tiñeron en bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta.

Los patrones de macrorrestricción genómica se compararon aplicando el coeficiente de similitud de Dice⁸ y para la elaboración de los dendrogramas se empleó el método UPGMA.

Resultados

Tras la electroforesis en campo pulsado de las 36 cepas analizadas se obtuvieron 32 perfiles distintos, cada uno de ellos compuesto por 12 a 23 fragmentos, cuyos pesos oscilaron entre las 20 y las 150 Kb (Fig. 1).

Veintiocho de las cepas presentaron perfiles distintos, mientras que los otros cuatro perfiles fueron compartidos dos a dos del siguiente modo: cepas 1 y 2, cepas 3 y 5 y cepas 30 y 33, todas ellas aisladas de distintos animales, y cepas 11 y 12, aisladas del mismo animal en distintos períodos de tiempo. En cambio las cepas 5 y 6, también procedentes de un mismo animal en distintos períodos de tiempo, presentaron perfiles distintos.

Discusión

La otitis externa y las pioderma son dos patologías muy frecuentes en el perro. En ambos casos, el clínico suele obtener una buena respuesta al tratamiento antibiótico, pero en ocasiones el animal no mejora y la infección se convierte en crónica. Si el antibiótico no es el más adecuado, o si se ha administrado de forma reiterada, las bacterias pueden sufrir pequeños cambios a nivel genómico y convertirse en resistentes. Para detectar estos cambios, y valorar si la bacteria que se aísla tras el tratamiento es la misma que causó la infección inicialmente, deben aplicarse técnicas de biología molecular que permiten analizar el genoma bacteriano. Una de estas técnicas es la electroforesis en campo pulsado, que en veterinaria se ha utilizado para la diferenciación de cepas de *S. intermedius*^{5, 9}, *S. aureus*^{10, 11}, *S. hyicus* y *S. chromogenes*¹², aisladas de distintas especies animales con diversas historias clínicas. Aplicando

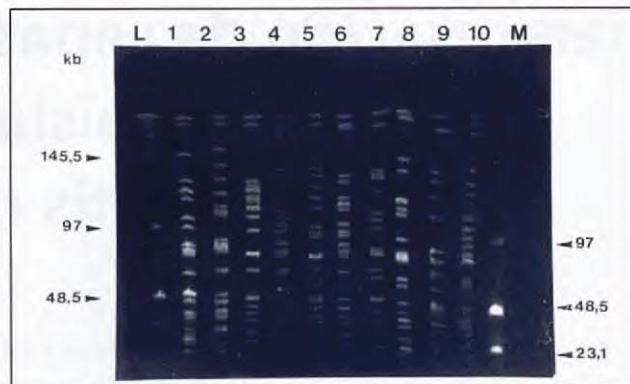


Fig. 1. Perfil genómico de cepas de *S. intermedius* aisladas de perros con otitis externa. Líneas 1-10: cepas 1, 8, 15, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27. L y M: marcadores de peso molecular.

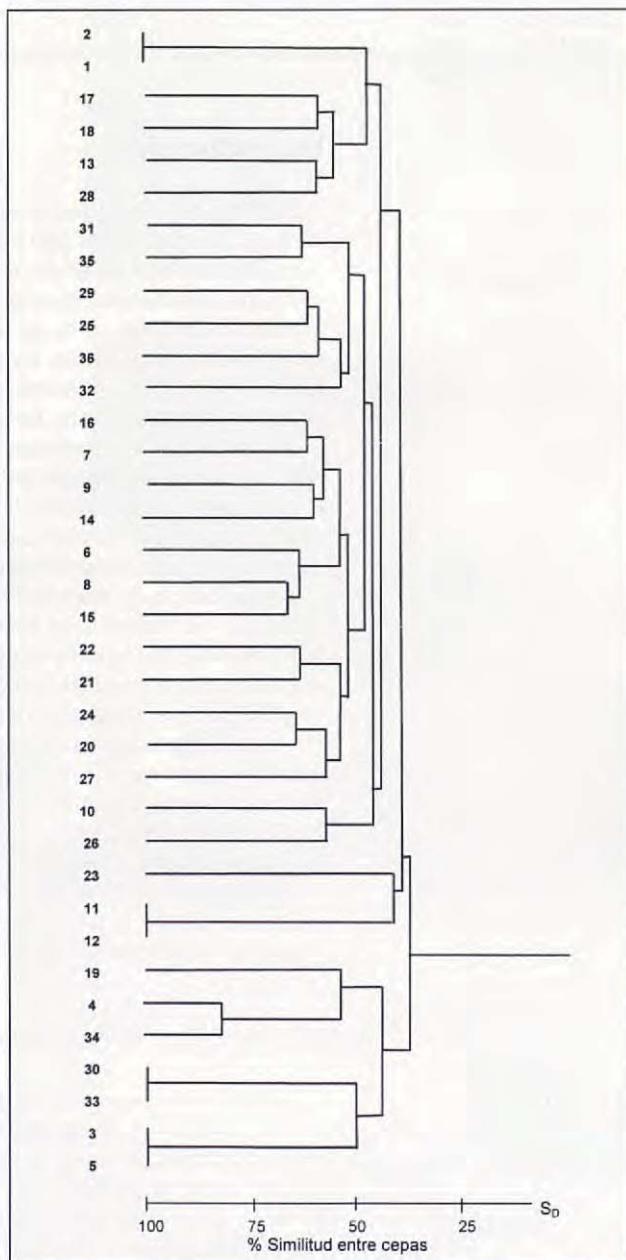


Fig. 2. Dendrograma elaborado tras la comparación de los perfiles de las cepas de *S. intermedius* aisladas de perros con otitis externa.

⁽¹⁾ Boehringer Mannheim, Alemania.

⁽²⁾ Pharmacia-LKB Biotechnology, Suecia.

cando esta técnica para el estudio de cepas de *S. intermedius* aisladas de perros con otitis externa, el porcentaje de genoma de que hemos podido analizar ha sido muy alto (un 65%), de forma que las semejanzas y diferencias observadas entre cepas son mucho más fiables (Fig. 2).

Al igual que han descrito otros autores^{5,9}, prácticamente todas las cepas aisladas fueron muy distintas entre sí. Teniendo en cuenta que las muestras se aislaron de animales de distintos propietarios y que la técnica detecta diferencias muy pequeñas entre cepas, este hecho es normal. Sin embargo, a pesar de la gran variabilidad observada, ocho de las cepas estudiadas presentaron patrones genómicos comunes. Las cepas 1 y 2, cepas 3 y 5 y cepas 30 y 33, se aislaron de distintos animales entre los que no fue posible establecer ninguna relación. En cambio, las cepas 11 y 12 se aislaron de un mismo animal en distintos períodos de tiempo, lo cual parece indicar que el tratamiento antibiótico no fue el más adecuado o no se aplicó correctamente. Por otro lado cabe mencionar que las cepas 5 y 6 aisladas de un mismo animal en distintos momentos presentaron perfiles muy distintos, lo que sugiere que no se trata de una mutación de la cepa inicial sino de dos cepas totalmen-

te distintas. Es posible que el animal estuviera infectado por las dos cepas inicialmente, aunque sólo se hubiera aislado una de ellas, que el antibiótico sólo fuera efectivo frente a una de las dos cepas, o que tras el tratamiento el animal volviera a infectarse con una cepa distinta a la que causó la otitis en un principio.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir que la electroforesis en campo pulsado es una técnica que permite diferenciar con gran precisión cepas de una misma especie. Si bien esta técnica no se aplica de forma rutinaria en los laboratorios de diagnóstico, debería considerarse en aquellos casos especialmente complicados, con el fin de conocer la causa de la ineficacia del tratamiento antibiótico y de este modo establecer el tratamiento más adecuado para cada caso.

Agradecimientos

Agradecemos al Sr. José M^a Moreso su colaboración en el aislamiento e identificación de las cepas. A la Dra. Victoria Pavón por su colaboración en la estandarización de la técnica PFGE.

Summary

A pulsed field gel electrophoresis (PFGE) technique has been used to differentiate strains of *Staphylococcus intermedius* isolated from dogs suffering otitis externa. 32 different profiles have been obtained from 36 analyzed strains. PFGE is a useful technique to differentiate strains of a particular species

Key words: Otitis externa; *Staphylococcus intermedius*; Pulsed field gel electrophoresis.

Bibliografía

1. Cox HU. Staphylococcal infections. En: Greene CE (ed): Infectious diseases of the dog and cat (II), Philadelphia, WB Saunders, 1998; pp. 214-217.
2. Noble WC. *Staphylococci* on the skin. En: Noble, W.C. (ed): The skin microflora and microbial skin disease, England, Cambridge University Press, 1993; pp.135-152.
3. Grothues D, Tümmeler B. New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis: application to the analysis of *Pseudomonas* species. *Mol Microbiol* 1991; 5: 2763-2776.
4. Poddar SK, McClelland M. Restriction fragment fingerprint and genome sizes of *Staphylococcus* species using pulsed field gel electrophoresis and infrequent cleaving enzymes. *DNA Cell Biol* 1991; 10: 663-669.
5. Shimizu A, Berkhoff HA, Kloos WE, George CG, Ballard DN. Genomic DNA fingerprinting, using pulsed-field gel electrophoresis, of *Staphylococcus intermedius* isolated from dogs. *Am J Vet Res* 1996; 57: 1458-1462.
6. Smith CL, Kico SR, Cantor CR. Pulsed-field gel electrophoresis and the technology of large DNA molecules. En: Davis K. Genome analysis: a practical approach. Oxford, IRL Press, 1988, pp. 41-72.
7. McClelland M, Jones R, Patel Y, Nelson M. Restriction endonucleases for pulsed-field mapping of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 5985-6005.
8. Sneath PH, Sokal R.R. Numerical taxonomy. San Francisco, WH Freeman and Company, 1973.
9. Hesselbarth J, Witte W, Cuny C, Rohde R, Amtsberg G. Characterization of *Staphylococcus intermedius* from healthy dogs and cases of superficial pyoderma by DNA restriction endonuclease patterns. *Vet Microbiol* 1992; 41: 259-266.
10. Rodgers JD, McCullagh JJ, McNamee PT, Smyth JA, Ball HJ. Comparison of *Staphylococcus aureus* recovered from personnel in a poultry hatchery and in broiler parent farms with those isolated from skeletal disease in broilers. *Vet Microbiol* 1999; 69: 189-198.
11. Shimizu A, Kawano J, Yamamoto C, Kakutani O, Fujita M. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and phage typing for discriminating poultry strains of *Staphylococcus aureus*. *Am J Vet Res* 1997; 58: 1412-1416.
12. Shimizu A, Kloos WE, Berkhoff HA, George CG, Ballard DN. Pulsed-field gel electrophoresis of *Staphylococcus hyicus* and *Staphylococcus chromogenes* genomic DNA, and its taxonomic, epidemiologic and ecologic applications in veterinary medicine. *J Vet Med Sci* 1997; 59: 443-450.