

Detección molecular de *Staphylococcus pseudintermedius* en piodermas caninas

Molecular detection of *Staphylococcus pseudintermedius* in canine pyoderma

Luis Alvarez V.¹, Juan Siuce M.¹, Joel Palomino F.¹, Sofía Gonzales M.¹,
André Sedano S.¹, Sonia Calle E.^{1,2}

RESUMEN

La pioderma es una de las enfermedades de la piel más diagnosticada en caninos. Entre los agentes más involucrados se encontraba *Staphylococcus intermedius*; sin embargo, en 2005 fue reclasificado en tres especies fenotípicamente similares: *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. delphini*, por lo cual no pueden ser identificadas por bioquímica convencional. Diversos estudios reportan *S. pseudintermedius* como el agente bacteriano más frecuentemente aislado en piodermas. Por ello, este estudio evaluó la presencia *S. pseudintermedius* mediante PCR-RFLP en 141 aislados de *Staphylococcus* sp en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, provenientes de casos de pioderma canina en el periodo 2016-2018, encontrando que 87.9% de los aislados de *Staphylococcus* sp han sido identificados como *S. pseudintermedius* y 12.1% como *Staphylococcus* sp.

Palabras clave: pioderma, caninos, *Staphylococcus pseudintermedius*, PCR-RFLP

ABSTRACT

Pyoderma is one of the most diagnosed skin diseases in canines. Among the agents most involved were *Staphylococcus intermedius*; however, in 2005 it was reclassified into three phenotypically similar species: *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* and *S. delphini*, which cannot be identified by conventional biochemistry. Various studies report

¹ Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² E-mail: scallee@unmsm.edu.pe

Recibido: 13 de enero de 2020

Aceptado para publicación: 24 de julio de 2020

Publicado: 29 de septiembre de 2020

S. pseudintermedius as the most frequently isolated bacterial agent in pyoderma. Therefore, this study evaluated the presence of *S. pseudintermedius* using PCR-RFLP in 141 *Staphylococcus* sp isolates in the Laboratory of Bacteriology of the Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú from cases of canine pyoderma in the period 2016-2018, finding that 87.9% of *Staphylococcus* sp isolates have been identified as *S. pseudintermedius* and 12.1% as *Staphylococcus* sp.

Key words: pyoderma, dogs, *Staphylococcus pseudintermedius*, PCR-RFLP

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la pioderma es una de las enfermedades de la piel más diagnosticada en caninos debido a que su piel posee ciertas características que la hacen propensa a padecer diversos problemas (Ihrke, 1996; Gortel, 2013). Una gran variedad de agentes bacterianos puede aislarse de piodermas en caninos, entre ellos *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp y *Escherichia coli* (Senturk *et al.*, 2005; Fogel y Manzuc, 2009). Sin embargo, diversos estudios en América Latina demuestran que son mayormente causadas por *Staphylococcus* spp (Antúnez *et al.*, 2009; Castellanos *et al.*, 2011; Romero, 2014).

Por mucho tiempo se reconoció que dentro de las especies del género *Staphylococcus* más frecuentes en piodermas caninas se encontraban *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. epidermidis* y *S. schleiferi* (May *et al.*, 2006; Frank *et al.*, 2009). Sin embargo, en 2005, *Staphylococcus intermedius*, reconocido como el agente involucrado en la mayoría de las piodermas caninas, fue reclasificado en tres especies fenotípicamente similares y agrupados dentro del Grupo de los *Staphylococcus intermedius* (SIG): *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. delphini* (Devriese *et al.*, 2005; Bannoehr *et al.*, 2007). Posteriormente, Fitzgerald (2009) reportó una mayor frecuencia de *S. pseudintermedius* involucrado en piodermas caninas y no el *S.*

intermedius, como se solía creer. Asimismo, Wang *et al.* (2012) determinó una frecuencia de 92% de *S. pseudintermedius* de los casos clínicos de pioderma canina por estafilococos en China, mientras que Onuma *et al.* (2011) halló una frecuencia de 76% de *S. pseudintermedius* en caninos de Japón.

Bioquímicamente, Sasaki *et al.* (2007) intentó diferenciar al *S. pseudintermedius* de las otras especies del SIG, no logrando identificar marcadores fenotípicos. La identificación precisa de *S. pseudintermedius* se basaba en la secuenciación genética (Bannoehr *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2007). Sin embargo, Bannoehr *et al.* (2009) elaboró un método basado en la reacción en cadena de la polimerasa con análisis del polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) amplificando el gen *pta*, logrando así, diferenciar *S. pseudintermedius* y *S. aureus* de otras especies del género.

En muchos laboratorios, los hallazgos de *Staphylococcus* no son identificadas a nivel de especie y los cultivos aislados se consideran solo como *Staphylococcus* sp. Sin embargo, frente al aumento de las cepas resistentes a meticilina y del papel de reservorio que pueden cumplir los caninos domésticos para infecciones en humanos, la identificación de *S. pseudintermedius* a partir de muestras de animales resulta cada vez más importante (Ralf y Guaguere, 2008; Harrison *et al.*, 2014; Bierowiec *et al.*, 2016). Por ello, el propósito del presente estudio fue detectar *S. pseudintermedius* en piodermas caninas de muestras aisladas en 2016-2018 en el La-

Cuadro 1. Secuencia de cebadores para el gen *pta*

Cebador	Secuencia 5' → 3'	Producto	Referencia
<i>Pta forward</i>	AAA GAC AAA CTT TCA GGT AA	320 pb	Bannoehr <i>et al.</i> (2009)
<i>Pta reverse</i>	GCA TAA ACA AGC ATT GTA CCG		

boratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Experimental

Se tomaron todos los aislados criopreservados de *Staphylococcus* sp (n=141) provenientes de hisopados de lesiones compatibles con piodermas en perros durante los años 2016 al 2018 que fueron remitidos al Laboratorio de Bacteriología de la FMV-UNMSM, Lima, Perú. Estos aislados criopreservados habían sido identificados como *Staphylococcus* sp con base a las características fenotípicas de las colonias aisladas y a pruebas bioquímicas convencionales.

Reactivación de Aislados y Extracción de ADN

Los aislados se reactivaron en caldo Trypticase de soya (TSB) y posteriormente fueron sembrados en agar sangre. La extracción de ADN genómico se realizó con el kit de extracción de ADN GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el ADN, se cuantificó y preservó a -20 °C.

Identificación Molecular por PCR-RFLP

Para la estandarización del procedimiento se tomó como referencia el protocolo y los cebadores empleados por Bannoehr *et al.* (2009) (Cuadro 1).

Se amplificó todas las muestras con las siguientes condiciones: en un volumen de 30 µl con una concentración de 0.2 µM de cada cebador y 15 µl de 2X PCR HotStart MasterMix ABM® y 2 µl ADN (30-70 ng/µl). Las condiciones del termociclado incluyeron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguido por 30 ciclos de 95 °C de desnaturalización durante 1 min, 53 °C de hibridación durante 1 min y 72 °C para la elongación durante 1 min, con una elongación final de 72 °C durante 7 min. Por último, 5 µl de cada producto de PCR fue sometido a la digestión con la enzima MboI (5U) en su respectivo buffer 10X y se incubó durante 2 h a 37 °C. Para la corrida electroforética, se preparó el gel de agarosa al 2% con buffer TBE al 0.5X durante 90 min a 80 v. Los productos fueron analizados en el transiluminador SafeVIEW de luz azul.

Validación de los Productos

Se enviaron dos productos para su secuenciamiento a Macrogen Inc (Corea del Sur) para la validación de los productos. Estos productos fueron muestras que amplificaron el gen *pta*, y además a la digestión con la enzima MboI dando como resultado un producto de 213 bp y 107 bp.

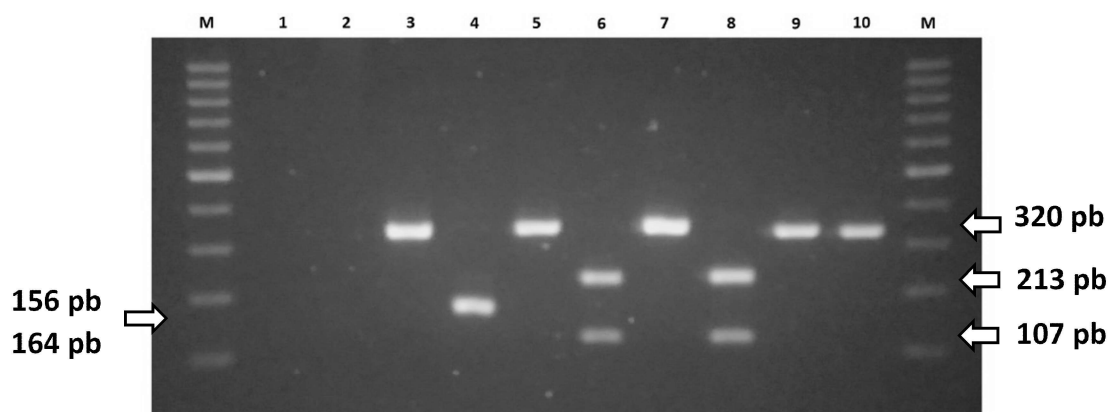


Figura 1. Gel de electroforesis de los productos de *pta* digeridos con la enzima MboI. M: Marcador molecular 100 bp. Línea 1: Blanco de reacción. Línea 2: Control Negativo *E. coli* ATCC 8739. Línea 3: Control Positivo *Staphylococcus aureus* ST 18. Línea 4: Control Positivo *Staphylococcus aureus* ST18 con digestión MboI. Línea 5: *Staphylococcus pseudintermedius* S29. Línea 6: *Staphylococcus pseudintermedius* S29, con digestión MboI. Línea 7: *Staphylococcus pseudintermedius* S60. Línea 8: *Staphylococcus pseudintermedius* S60, con digestión MboI. Línea 9: *Staphylococcus* sp. ST 19. Línea 10: *Staphylococcus* sp. ST19 con digestión MboI

RESULTADOS

Todos los aislados ($n=141$) amplificaron la secuencia del gen *pta* de 320 pb, lo cual los identifica como perteneciente al género *Staphylococcus*. Posterior a la digestión con la enzima de restricción MboI (PCR-RFLP) al total de aislados de *Staphylococcus* sp se encontró que 87.9% (124/141) de los aislados poseen el sitio de restricción MboI, dando como resultado un producto de 213 pb y otro 107 pb, que los identifica como *S. pseudintermedius* (Figura 1).

Por otro lado, no se encontraron aislados que amplifiquen el gen *pta* y que, al ser sometidos a la digestión con la enzima MboI, corten la secuencia en un lugar diferente, resultando en bandas de 156 pb y otra de 164 pb, lo cual los identificaría como *Staphylococcus aureus*. Por último, 12.1% (17/141) de los aislados solo amplificó el gen *pta* sin ser digeridos de allí que no hubo frag-

mentación de la secuencia, manteniéndose como una sola banda de 320 pb, por lo cual se les consideró como pertenecientes a otras especies dentro del género *Staphylococcus* (Figura 1, Cuadro 2).

El amplicón del gen *pta* de los aislados S29 y S60, fueron remitidos a MacroGen Inc. para su secuenciamiento. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con los programas ChromasPro, BLASTN 2.9.0 y MegAlign Pro. Luego del alineamiento con otras secuencias del mismo gen disponibles en el banco de genes del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), mostraron 99.7% de identidad con el gen *pta* de la cepa *S. pseudintermedius* HKU10-03 (NC_014925.1) (Figura 2) y con otras cepas obtuvo 99% de identidad (KJ14608.1 y AM945758.1). Las secuencias amplificadas del gen *pta* de los aislados S29 y S60 fueron ingresadas al banco de genes del NCBI con números de acceso MN480439 y MN480440.

Cuadro 2. Resultados de la identificación por PCR-RFLP de los 141 aislados según año de aislamiento

	2016	2017	2018	Total	
				n	%
<i>S. pseudintermedius</i>	41	47	36	124	87.9
<i>Staphylococcus</i> sp.	9	3	5	17	12.1
Total	50	50	41	141	100

Alignment Workspace of Untitled ClustalW (Slow/Accurate, IUB)
domingo, 20 de Octubre de 2019 13:44

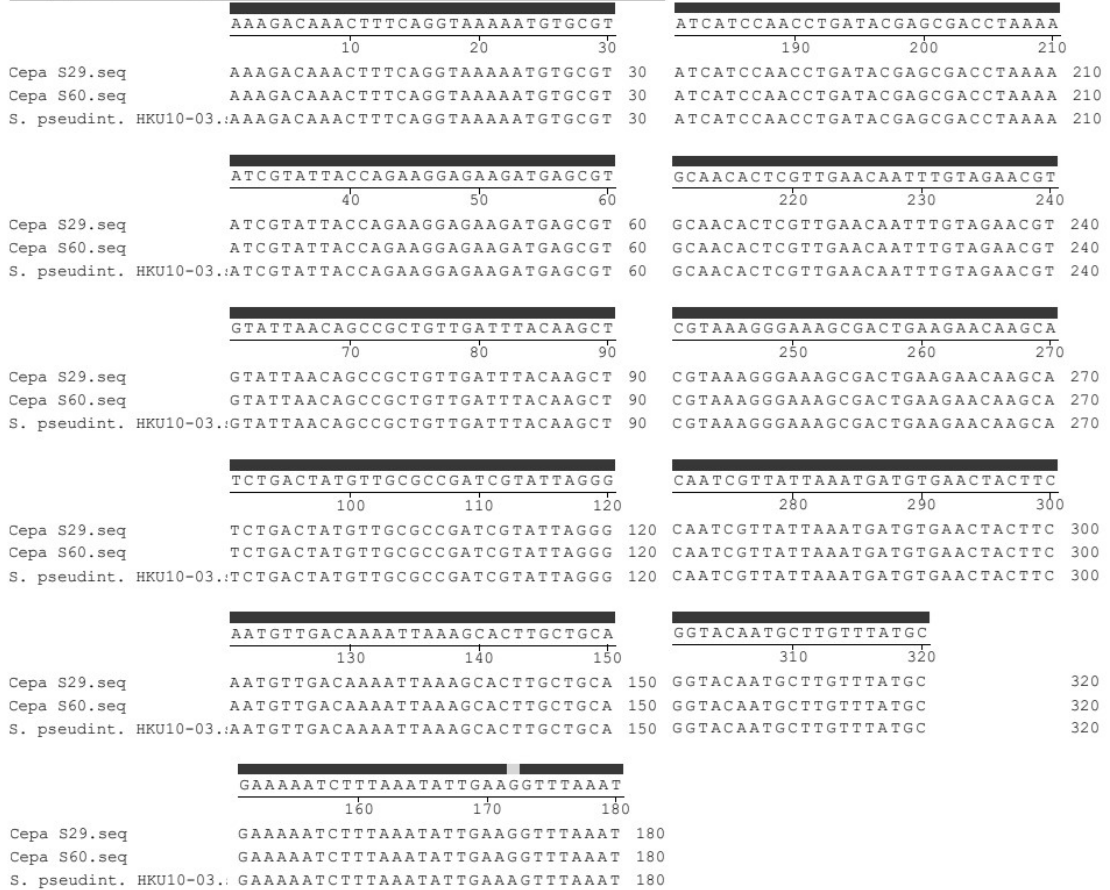


Figura 2. Alineamiento de las secuencias del gen *pta* de los aislados S29 y S60 con la cepa HKU10-03 (NC_014925.1)

DISCUSIÓN

Los resultados utilizando el protocolo de detección genética de especies de *Staphylococcus* mediante PCR-RFLP usado por Bannoehr *et al.* (2009) son reproducibles, los cuales se corroboran con los controles utilizados y el análisis de secuencias del gen *pta* números de accesión MN480439 y MN480440, de aislados representativos.

Se determinó que el 87.9% de los aislados pertenecen a *S. pseudintermedius* y 12.1% se identificó como otra especie de *Staphylococcus*. En cuanto a *S. pseudintermedius*, los resultados muestran ser similares a otros estudios. Así, Wang *et al.* (2012) en China registra una frecuencia de 92% de *S. pseudintermedius* de los casos clínicos de pioderma canina por estafilococos, Bourguignon *et al.* (2016) en Brasil reportó 93.3% de *S. pseudintermedius* en piodermas caninas estafilocócicas y Onuma *et al.* (2011) halló una frecuencia de 76% de *S. pseudintermedius* en caninos de Japón, este último valor moderadamente inferior a los obtenidos en el presente estudio.

En general, incluyendo el presente estudio, se reportan altas frecuencias de aislamiento de *S. pseudintermedius* a partir de hisopados de piodermas en caninos. Estos resultados se explican debido a que *S. pseudintermedius*, al ser el mayor colonizador de la piel de los caninos, es más probable que actúe y esté involucrado como patógeno oportunista ante la alteración de la microbiota de la piel (Rubin y Chirino-Trejo, 2011). Esta situación puede ser más frecuente aun en perros con dermatitis atópica, en quienes se ha reportado tener una mayor frecuencia de *S. pseudintermedius* como parte de su microbiota (Fazakerley *et al.*, 2009).

Por otro lado, a pesar de que el protocolo de PCR-RFLP, con los cebadores usados poseen la capacidad de identificar a *S. aureus*, no se obtuvo ningún aislado positivo a partir de piodermas caninas. Sin embargo,

no se debe descartar a *S. aureus* como patógeno en caninos y su potencial rol como reservorio para reinfecciones en humanos (Harrison *et al.*, 2014; Bierowiec *et al.*, 2016).

Finalmente, este estudio constituye el primer reporte de detección molecular de *S. pseudintermedius* a partir de piodermas caninas en Perú. Estos resultados permitirán realizar estudios de sensibilidad antimicrobiana *in vitro* o detección de genes involucrados en resistencia antibióticos en estos microorganismos de importancia clínica (Bond y Loeffler, 2012).

CONCLUSIONES

Staphylococcus pseudintermedius está presente en 89.7% de las piodermas caninas y es el patógeno más frecuentemente aislado.

LITERATURA CITADA

1. **Antúnez O, Calle S, Morales S, Falcón N, Pinto C. 2009.** Frecuencia de patógenos aislados en casos clínicos de dermatitis bacteriana canina y su susceptibilidad antibiótica. *Rev Inv Vet Perú* 20: 332-338. doi: 10.15381/rivep.v20i2.635
2. **Bannoehr J, Ben Zakour N, Waller A, Guardabassi L, Van Den Broek L, Thoday K, Fitzgerald J. 2007.** Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into Agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J Bacteriol* 189: 8685-8692. doi: 10.1128/JB.01150-07
3. **Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR. 2009.** Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol* 47: 469-471. doi: 10.1128/JCM.01915-08

4. **Bierowiec K, Ploneczka-Janeczko K, Rypula K. 2016.** Is the colonization of *Staphylococcus aureus* in pets associated with their close contact with owners? Plos One 11: e0156052. doi: 10.1371/journal.pone.0156052
5. **Bond R, Loeffler A. 2012.** What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi drug resistance. J Small Anim Pract 53: 147-154. doi: 10.1371/journal.pone.0156052.
6. **Bourguignon E, Viçosa GN, Corsini CMM, Moreira AS, Nero LA, Conceição LG. 2016.** Description of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from canine pyoderma in Minas Gerais state, Brazil. Arq Bras Med Vet Zoo 68: 299-306. doi: 10.1590/1678-4162-8150
7. **Castellanos I, Rodríguez G, Santos R. 2011.** Aislamiento e identificación bioquímica de microorganismos bacterianos a partir de infecciones de piel en caninos. Rev Med Vet 22: 21-30. doi: 10.19052/mv.556
8. **Devriese L, Vancanneyt M, Baele M, Vaneechoutte M, De Graef E, Snauwaert C, Cleenwerck I, et al. 2005.** *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. Int J Syst Evol Micr 55: 1569-1573. doi: 10.1099/ijs.0.63413-0
9. **Fazakerley J, Nuttall T, Sales D, Schmidt V, Carter SD, Hart CA, McEwan NA. 2009.** Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. Vet Dermatol 20: 179-184. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00745.x
10. **Fitzgerald JR. 2009.** The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of methicillin resistance. Vet Dermatol 20: 490-495. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00828.x
11. **Fogel F, Manzuc P. 2009.** Dermatología canina para la práctica clínica diaria. InterMédica, Argentina. 576 p.
12. **Frank LA, Kania SA, Kirzeder EM, Eberlein LC, Bemis DA. 2009.** Risk of colonization or gene transfer to owners of dogs with meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. Vet Dermatol 20: 496-501. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00826.x
13. **Gortel K. 2013.** Recognizing pyoderm, more difficult than it may seem. Vet Clin N Am-Small 43: 1-18. doi: 10.1016/j.cvsm.2012.09.004
14. **Harrison EM, Weinert LA, Holden MT, Welch JJ, Wilson K, Morgan FJ, Harris SR, et al.** A shared population of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 15 circulates in humans and companion animals. mBio 5: e00985-13. doi: 10.1128/mBio.00985-13
15. **Ihrke P. 1996.** Bacterial skin disease in the dog. A guide to canine pyoderma. Leverkusen, Germany: Bayer AG. 97 p.
16. **May ER. 2006.** Bacterial skin diseases: current thoughts on pathogenesis and management. Vet Clin N Am-Small 36: 185-202. doi: 10.1016/j.cvsm.2005.09.014
17. **Onuma K, Tanabe T, Sato H. 2011.** Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pioderma in Japan. Vet Dermatol 23:17-22. doi: 10.1111/j.1365-3164.2011.00995.x
18. **Ralf S, Guaguere E. 2008.** Infecciones cutáneas en perros. Argos Bol Inf 101: 50-54.
19. **Romero MF. 2014.** Determinación preliminar de los patrones de resistencia antimicrobiana de las bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus* spp causantes de pioderma en pacientes caninos atendidos en clínicas veterinarias del Área Metropolitana. Tesis de Médico Veterinario. Costa Rica: Univ. Nacional de Costa Rica. 64 p.

20. **Rubin JE, Chirino-Trejo M. 2011.** Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. *J Vet Diagn Invest* 23: 351-354. doi: 10.1177/104063871102300227
21. **Sasaki T, Kikuchi, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. 2007.** Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J Clin Microbiol* 45: 2770-2778. doi: 10.1128/JCM.00360-07
22. **Senturk S, Özel E, Sen A. 2005.** Clinical efficacy of rifampicin for treatment of canine pyoderma. *Acta Vet Brno* 74:117-122. doi: 10.2754/avb200574010117
23. **Wang Y, Yang J, Logue CM, Liu K, Cao X, Zhang W, Shen J, Wu C. 2012.** Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine pyoderma in North China. *J Appl Microbiol* 112: 623-630. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05233.x