

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



**Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
Doctor en Ciencias Veterinarias**

**SEPSIS Y MUERTES NEONATALES ASOCIADAS A ESTREPTOCOCO β HEMOLÍTICO
EN CANINOS**

Autor: MV. Guerrero López Ana Elizabeth.

Director: MV. DCsV, Stornelli, María Alejandra.

Codirectores: MV. DCsV, Giacoboni, Gabriela.

MV. DCsV, Stornelli, María Cecilia

Lugares de trabajo: Laboratorio de Microbiología y Servicio de Reproducción Animal.

Facultad de Ciencias Veterinarias,

Universidad Nacional de La Plata.

Miembros Titulares del jurado:

MV. Dra, Wanke Magdalena

MV. Dra, Gentillini Elida

MV. DCsV, Ayala Miguel

La Plata, Buenos Aires, 14 de junio 2016

DEDICATORIA

*A mi hija Ross, a mi madre y hermanos. A los amigos que llevo en mi corazón.
Quienes fueron un gran apoyo emocional durante el tiempo en que realicé mi doctorado*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco con todo mi corazón a Dios por concederme la oportunidad de realizar este trabajo y por acompañarme todos los días de mi vida.

Agradezco de una manera muy especial a mi directora de tesis Dra. María Alejandra Stornelli y codirectoras Dra. Gabriela Giacoboni y Dra. María Cecilia Stornelli, por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección, por su gran apoyo y confianza en la realización de este trabajo, además por ayudarme a formar como investigadora.

Al Dr. Luzbel de la Sota Jefe de la cátedra de Reproducción por su colaboración en mi tesis y por permitirme ser parte del grupo de trabajo de reproducción.

Agradezco a los dueños de los diferentes criaderos que me permitieron acceder a sus establecimientos para la toma de muestras de las perras y seguimiento de las mismas, necesario para esta investigación.

A mis compañeras del Servicio de Reproducción Animal. A mis compañeros del laboratorio de Microbiología, por el apoyo y por ser parte de mi vida en estos años de trabajo. Al servicio de Microscopia Electrónica en especial a la Dra. Susana Jurado y a Roxana Peralta por su colaboración en el procesado y evaluación de las muestras. Al Dr. Hernán Sguazza por su gran colaboración en la parte molecular de este trabajo.

Un agradecimiento profundo a mi hija Rossana que decidió acompañarme en esta gran aventura, a mi madre y hermanos por su apoyo espiritual, familia que siempre está conmigo en mis momentos difíciles.

A mis grandes amigos veterinarios de La Plata: Juan, Sergio, Fabián, Liliana y Cristina porque han sido parte de mi vida e hicieron que mi estadía en este país fuese muy linda.

A todos los amigos y amigas que conocí en la facultad y en especial a mis compatriotas Eleonora y Cecilia, por su solidaridad y compañerismo.

Agradezco a la UNLP, FCV y a la secretaría de posgrado por permitir mi formación académica en la institución.

Agradezco al SENESCYT y al Gobierno del Ecuador por la oportunidad que me dieron de realizar el doctorado y por hacer realidad este sueño.

Agradezco a la Universidad Técnica de Machala por concederme el tiempo que necesité en mi formación académica y en el desarrollo de mi tesis.

A los miembros de jurado por sus aportes y correcciones.

ÍNDICE

	PÁGINA
.....	
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABLAS	XII
LISTA DE RESÚMENES EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES	XIII
RESUMEN	XV
SUMMARY	XVII
CAPÍTULOS	
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Periodo neonatal	2
Síndrome del cachorro débil	4
II. ESTUDIO DE LA MICROBIOTA VAGINAL ESTRAL Y PERINATAL EN HEMBRAS CANINAS MULTÍPARAS CON Y SIN ANTECEDENTES DE MUERTES NEONATALES.	
Introducción	14
Materiales y Métodos	18
Análisis estadístico	21
Marco bioético del uso de animales	21
Resultados	22

Discusión y conclusiones.....	28
III. IDENTIFICACIÓN DE <i>Streptococcus canis</i> y <i>Streptococcus dysgalactiae</i> POR PCR A PARTIR DE LOS ESTREPTOCOCOS β HEMOLÍTICOS AISLADOS EN VAGINAS DE HEMBRAS CANINAS.	
Introducción.....	34
Materiales y Métodos.....	36
Resultados.....	37
Discusión y conclusiones.....	39
IV. EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO PREPARTO SOBRE LA SUPERVIVENCIA NEONATAL EN HEMBRAS CON ESTREPTOCOCOS β HEMOLÍTICOS VAGINALES Y ANTECEDENTES DE MUERTES NEONATALES	
Introducción.....	41
Materiales y métodos.....	44
Marco bioético del uso de animales.....	44
Resultados.....	45
Discusión y conclusiones.....	45
CONCLUSIONES GENERALES.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

LANAE: Clasificación nacional de actividades económicas

PYME: Pequeñas y medianas empresas

SGB: Estreptococos del grupo B

SGG: Estreptococos del grupo G

SGC: Estreptococos del grupo C

UFC: Unidades formadoras de colonia

Ug: Microgramos

UI: Unidades internacionales

CAMP (Christie, Atkins, Munch, Petersen

LGT: Genes de transferencia lateral

SLO: Estreptolisina O

DNasa: Estreptodornasa

SPEC: Exotoxina pirogénica C

RFLP: polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

MLST: Tipificación de secuencias multilocus

PCR: Prueba de reacción en cadena de la polimerasa

ACOG: Sociedad Americana de Ginecología y obstetricia

TKT: Toxine, Kristal-violet, Tallium

EMB: Eosin Methylene Blue Agar

ATS: Agar Tripteina Soya

PYR: Pirrolidonil-beta-naftilamida

VP: Vogues Proskauer

UFC: Unidades formadoras de colonia

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

MET: Microscopía electrónica de transmisión

BGNMF: Bacilos Gram negativos no fermentadores

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Foto 1: estructura compatible con cápsula	28
Foto 2: estructura compatible con proteína M	28
Fig. 3. amplicones de <i>S. canis</i> . 1,2,3,4,5,6,7,8,10,11,12,13,14, cepas de <i>S canis</i> . 9. Marcador de peso molecular. 15. Control negativo. 16 control positivo (ATCC ® 43497™)	38
Fig. 4. amplicones de <i>S. dysgalactiae</i> . 1,2,3,4,5, cepas de <i>S. dysgalactiae</i> . 6 Marcador de peso molecular. 7 control positivo (ATCC ® 43078™). 8 control negativo	38

LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1: Estreptococos patógenos para los animales	9
2: Escala “ad hoc” de desarrollo para los estreptococos β hemolíticos	20
3: Bacterias aisladas en la vagina de perras sin antecedentes de muertes neonatales (G1)	23
4: Porcentaje de bacterias encontradas en la vagina de perras con antecedentes de muertes neonatales	24
5. Desarrollo bacteriano obtenido para los estreptococos β hemolíticos	24
6. Porcentaje de estreptococo β hemolítico, aislados de la vagina de perras sin antecedentes y con antecedentes de muertes neonatales	25
7: Prueba de sensibilidad antimicrobiana	27
8: Presencia de cápsula mediante observación al MET (Tinción negativa) a partir de primo- aislamientos	28

LISTA DE RESÚMENES EN CONGRESOS NACIONALES

1. Guerrero A E, Giacoboni G, Stornelli M C, Stornelli M A. Aislamiento de estreptococos β hemolíticos en muestras de fondo de vagina de hembras caninas. XV Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2014, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de Rosario. Casilda. Septiembre 2014.
2. Guerrero AE; Giacoboni G; Jurado S; Peralta R; Stornelli MA. Hallazgo de cápsula en *Streptococcus canis* aislados de vaginas de perras. Descripción ultramicroscópica VI Congreso de Ciencias Morfológicas y XII Jornadas de educación en Ciencias Veterinarias. La Plata. Septiembre 2014.

LISTA DE RESÚMENES EN CONGRESOS INTERNACIONALES

1. *Streptococcus canis* relacionados con muertes perinatales y neonatales en caninos. Guerrero Lopez, A E, Giacoboni G, Jurado S, Stornelli M C, Peralta R, Stornelli M A. II Congreso de la Sociedad Latino Americana de Reproducción Animal. Santiago de Chile. Noviembre 12-13-2014.
2. Implicancia de *Streptococcus canis* en muertes neonatales en caninos. Guerrero, A.E; Giacoboni G.; Stornelli, M.C.; Stornelli, M.A. I Congreso de la Sociedad Latino Americana de Reproducción Animal. Buenos Aires, Argentina. 25-28-Marzo /2015.
3. Estudio bacteriológico endometrial y vaginal en caninos. Praderio Romina, Guerrero Ana, Garcia Mitacek María, Stornelli María C, Stornelli María A. 9as. Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. 29 y 28 de agosto. Mar del Plata.
4. Beta-hemolytic Streptococcus isolated from cranial vagina in bitch with healthy litters and litters with neonatal deaths. Guerrero AE , Giacoboni G , Stornelli MC , Sguazza H , Jurado S , Stornelli MA.. 18th International Congress on Animal Reproduction. 26-30 June 2016. Francia. Aceptado para su publicación. <http://icar2016.org/>

SEPSIS Y MUERTES NEONATALES ASOCIADAS A ESTREPTOCOCO β HEMOLÍTICO EN CANINOS

PALABRAS CLAVES: Estreptococos, caninos, microbiota, muertes neonatales

RESUMEN

Los porcentajes de mortalidad neonatal en caninos oscilan entre el 5 y 35% siendo causales de importantes pérdidas económicas en los criaderos. Las enfermedades infecciosas bacterianas son la segunda causa de muertes neonatales caninas después de los problemas de manejo. Las bacterias implicadas pueden habitar en la vagina de la perra. El estreptococo β hemolítico es frecuentemente aislado de las vaginas de perras. En humanos, el estreptococo β hemolítico causa muertes neonatales infectándose el niño en el canal de parto. El objetivo fue estudiar la relación existente entre la presencia de estreptococo β hemolítico en la vagina de las perras y la ocurrencia de muertes neonatales. La hipótesis fue que los estreptococos β hemolíticos son bacterias implicadas en muertes neonatales tal como ocurre en humanos. Para estudiar la presencia de estreptococo β hemolítico en la vagina de perras y su relación con muertes neonatales caninas se diseñaron 3 experimentos. En el primero se estudió la microbiota vaginal estral y perinatal en perras con y sin antecedentes de muertes neonatales. En el segundo se confirmaron mediante PCR, las especies de estreptococo β hemolítico aislados en el experimento 1. En el tercero se estudió en perras con antecedentes de muertes neonatales y aislamiento de estreptococo β hemolítico vaginal, el efecto del tratamiento antimicrobiano preparto sobre la supervivencia neonatal. Nuestros resultados mostraron un porcentaje significativamente mayor de estreptococos β hemolíticos en las muestras vaginales provenientes de perras con antecedentes de muertes neonatales en comparación con las muestras provenientes de perras sin antecedentes. Los estreptococos aislados fueron *S. dysgalactiae* y *S. canis*. Todas las cepas aisladas fueron sensibles a penicilina. El tratamiento pre y posparto de las perras positivas pertenecientes al grupo de perras con antecedentes de muertes neonatales permitió obtener altos porcentajes de supervivencia neonatal.

SEPSIS AND NEWBORN DEATHS LINKED TO STREPTOCOCCUS β H EMOLITICO CANINE

KEY WORDS: Streptococcus, canine, microbiota, neonatal deaths

SUMMARY

SUMMARY

Neonatal mortality in dogs range 5 to 35% and produce significant economic losses in kennels. Bacterial infectious diseases are the second cause of canine neonatal deaths after management causes. Involved bacteria can live in the vagina. In this way β -hemolytic streptococci is often isolated from the vaginas of bitches. In humans, β hemolytic streptococcus causes neonatal deaths infecting the child in the birth canal. The aim was to study relationship between β -hemolytic streptococci in the bitch vagina and neonatal deaths. The hypothesis was that the β -hemolytic streptococci are bacteria involved in neonatal deaths in canine as in humans. To study the presence of β -hemolytic streptococci in the vagina of bitches and their relationship with canine neonatal deaths 3 experiments were designed. In the first the microbiota was studied in proestrus and at the end of gestation, in bitch with and without history of neonatal deaths. In the second species of streptococcus β -hemolytic isolated in experiment 1 were confirmed by PCR. The third experiment was carried out in bitch with history of neonatal deaths and isolation of streptococcus β vaginal haemolytic to study the effect of antibiotic therapy at the end of gestation on neonatal survival. Our results showed a significantly higher percentage of vaginal β hemolytic streptococci in bitch with history of neonatal deaths. Streptococcal isolates were *S. dysgalactiae* and *S. canis*. All strains were penicillin sensitive. Pre- and pospartum treatment allow improve neonatal survival rates.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La cría de perros ha mostrado un crecimiento exponencial. Desde hace ya varios años, el perro ocupa un lugar en la sociedad y ha ido dejando su condición de un animal que acompaña al hombre para convertirse en un miembro más de la familia, donde la relación del perro con sus miembros es cada vez más estrecha. Los dueños de estas mascotas invierten mucho esfuerzo, cariño y dinero en el cuidado de las mismas en alimentación, salud, belleza, adiestramiento y cuidados en guardería durante las vacaciones.

El creciente desarrollo de la cría canina la ha convertido en una actividad productiva, formándose a su alrededor pequeñas empresas que son el sustento de muchos hogares. La Clasificación Nacional de Actividades Económicas (CLANAE), considera a la cría de perros una actividad económica en Argentina, incluyéndola dentro de las PYME. Este creciente desarrollo entorno a la cría de perros, impulsa al desarrollo de la reproducción canina, siendo el período neonatal el que demanda atención especializada y eficiente para la madre y el neonato. Desde este punto de vista, la labor del médico veterinario, cumple un rol fundamental para mantener y mejorar las condiciones de los animales destinados a la reproducción. Uno de los retos que debe enfrentar el veterinario de pequeños animales durante el periodo neonatal, es de pérdidas de los cachorros en los primeros días de vida, ya que es en este periodo donde ocurre el mayor número de muertes y muchas veces por causas no claras (Jhonston y col., 2001). Debe tenerse en cuenta, que en la especie canina los cachorros nacen fisiológicamente inmaduros, siendo el riesgo de pérdidas neonatales mayor que en otras especies animales como por ejemplo bovinos, equinos y ovinos (Simpson y col.,

2004). Es así que las enfermedades y las muertes neonatales son un motivo de consulta frecuente en los criaderos caninos.

Se ha comunicado entre un 5 a 35% de morbilidad y mortalidad neonatal en criaderos caninos (Indrebo y col., 2007; Münnich y Küchenmeister, 2014). Las pérdidas dependen de factores tales como manejo inadecuado de la madre y los cachorros, defectos congénitos y agentes infecciosos, entre otros. Así mismo muchas de las causas no infecciosas predisponen a los cachorros a enfermedades infecciosas (Blunden, 2004). Este conjunto de factores predisponentes y condiciones propias del cachorro lo hacen más susceptible a las enfermedades y a la muerte (Münnich, 2008). Las principales pérdidas de cachorros suelen presentarse durante el parto, inmediatamente después del nacimiento y durante el periodo neonatal (Blunden; 2003; Gill, 2001; Blunden, 2004, Munich, 2008).

Periodo neonatal:

El periodo neonatal canino abarca los 10 primeros días después del nacimiento. Este periodo se caracteriza por una pobre función neurológica, hepática, renal e inmunitaria, con una total dependencia de la madre no solo para alimentarse sino para mantener el calor, tener confort así como para la defecación y la micción acto reflejo que se realiza por el lamido materno en el área anogenital del neonato (Blunden, 2004; Root, 2005).

El neonato posee un mecanismo termorregulador pobremente desarrollado al nacimiento, presenta una temperatura corporal de 35,5°C 24 horas posparto para alcanzar los 38°C a la semana de vida. Los neonatos se enfrían fácilmente si no tienen una fuente de calor que transmita el mismo por contacto ya sea la madre o una fuente de calor artificial (almohadilla térmica). Los cachorros son altamente susceptibles a la hipotermia debido al poco desarrollo de mecanismos termorreguladores, además poseen una amplia superficie dérmica con una piel

poco queratinizada con poca grasa subcutánea, tienen poco flujo sanguíneo en las extremidades y durante la primera semana de vida carecen del reflejo de temblor (Blunden, 2004; Indrebø y col., 2007).

El 82 % del cuerpo del neonato es agua, el riñón que es inmaduro aún no puede funcionar bien, la filtración glomerular se incrementa del 21% al nacimiento al 53% a las dos semanas de vida. La orina tiene una concentración baja, la pérdida de agua es dos veces más que en el adulto siendo el cachorro susceptible a la deshidratación rápida (Blunden, 1983; Indrebø y col., 2007). El requerimiento de agua del neonato es de 60 y 180 ml/ kilo de peso corporal por día. La glucosuria es normal hasta las dos semanas de vida, por eso es importante que el neonato se alimente regularmente (Blunden, 2004; Lawler, 2008).

El neonato nace con pocas reservas de glucógeno hepáticas y el requerimiento de energía es alto, el hígado inmaduro es ineficiente en la generación de energía (Indrebo y col., 2007). La gluconeogénesis comienza entre los 6-8 días, a partir de allí se regulariza lentamente. Este hecho hace que las reservas de glucógeno puedan agotarse y desarrollar hipoglucemia al segundo día de nacido (Blunden, 2004; Simpson y col., 2004).

EL sistema inmunológico está pobremente desarrollado, la ingesta de calostro las primeras 12 a 24 horas de vida es crucial ya que los anticuerpos recibidos de la madre a través de la placenta corresponde solamente el 5% del total y solo el aporte de los anticuerpos calostrales permitirá al cachorro adquirir la inmunidad pasiva que le permita sobrevivir al contacto con los diferentes agentes infecciosos (Blunden, 2004, Simpson y col., 2004).

Las particularidades fisiológicas del neonato canino lo predisponen a ser más susceptible a afecciones neonatales que comprometen su supervivencia. Los signos clínicos que presentan

son los mismos independientemente de la causa, dificultando la identificación de las mismas, dado lugar a lo que se conoce como del síndrome del cachorro débil (Roth, 1987; Gill, 2001).

Síndrome del cachorro débil

El síndrome del cachorro débil, síndrome de apagamiento o “fading puppy”, es la manifestación clínica de todo neonato enfermo independientemente de las causas que comprometan la salud del mismo. La identificación de la causa ha sido difícil y en consecuencia la resolución también ha sido complicada. Los cachorros nacen vitales y con un adecuado peso al nacimiento considerándose que existe una alta probabilidad de supervivencia. Generalmente estos cachorros nacen de madres sanas con una buena conformación corporal, la gestación ocurre sin contratiempos, las madres poseen un buen desarrollo mamario y buena producción láctea. Sin embargo dentro de las primeras 24 horas y primeros días posparto los cachorros comienzan a perder peso, muestran reflejo de succión débil, flacidez muscular y llanto, se deshidratan, presentan hipoglucemia, hipotermia, debilidad y luego mueren (Blunden, 1988; Hotston y Sturges, 2004).

Este síndrome asociado a la inmadurez fisiológica del neonato (Blunden, 1988), puede ser causado por problemas de manejo, infecciosos, metabólicos, nutricionales o malformaciones congénitas, siendo los responsables de las pérdidas y la muerte de los animales recién nacidos. Las afecciones relacionadas con el parto pueden ser una de las causas del síndrome del cachorro débil. Afecciones como la hipoxia que se presenta en las primeras horas de nacido, condición que está relacionada con el tiempo que transcurre entre el nacimiento y el desarrollo de una ventilación pulmonar adecuada. La hipoxia representa aproximadamente el 60% de muertes relacionadas con el parto (Münnich y Lübke-Becker, 2014).

Los problemas conductuales maternos representan el 6.8% de las pérdidas neonatales (Blunden, 1986). En los partos normales es la madre la encargada de liberar al cachorro de las membranas fetales, cortar el ombligo y estimular la respiración mediante el lamido del cachorro. Cuando la madre no atiende al recién nacido, puede producirse asfixia en estos (Indebro, 2007).

El síndrome del cachorro débil puede desencadenarse también por el nacimiento de cachorros con bajo peso. El 2,1% de las muertes neonatales se deben a este factor (Blunden, 1986). Las malformaciones congénitas también pueden causar pérdidas neonatales, representando el 2 % de las muertes (Blunden, 2004).

Agentes infecciosos también han sido involucrados en el síndrome del cachorro débil. Dentro de los problemas infecciosos se han implicado virus y bacterias entre otros. El herpes virus canino y parvovirus tipo 1 pueden transmitirse a través de la placenta, causando enfermedad neonatal (Johnston y col., 2001; Decaro y col., 2012; Larsen y col., 2015).

Otros microorganismos asociados a infecciones de los neonatos son los micoplasmas. Estos microorganismos también habitan en la vagina de la perra (Baba y col., 1993) y pueden convertirse en oportunistas, produciendo nacimiento de cachorros débiles, poco viables y muertes neonatales (Stornelli y col., 2000).

Las enfermedades infecciosas bacterianas han sido identificadas como la segunda causa de muertes neonatales después de los problemas de manejo (Munich, 2008). El medio ambiente materno en especial la vagina de la perra, podría ser la fuente de infección del neonato canino durante el proceso del parto (Sager y Remmers, 1990; Münnich y Lübke-Becker, 2014.). Otra forma de adquirir la infección podría ser a través de leche contaminada relacionada con ocurrencia de mastitis clínica o subclínica en la madre. Las mastitis junto con las metritis han

sido consideradas como causantes de sepsis en los cachorros (Sager y Remmers, 1990; Schäfer-Somi y col., 2003; Hotston y Sturges, 2004). Los microorganismos causantes de sepsis neonatal ingresan al neonato por el ombligo, por mucosas o por la piel, la cual es muy permeable a los microbios porque no está totalmente queratinizada (Indrebø y col., 2007).

Las bacterias involucradas en las enfermedades de los cachorros recién nacidos son *Staphylococcus* spp, *Echerichia coli*, *Pseudomonas* spp y *Streptococcus* spp entre otras. Estas bacterias se pueden encontrar en la piel, vaginas, en las descargas respiratorias y en la leche de la madre (Allen y Dagnall, 1982; Schäfer-Somi y col., 2003; Münnich y Lübke-Becker, 2004; Gropettia y col., 2012). Las sepsis neonatales pueden ser producidas por una o varias bacterias.

Se han presentado pruebas de infección neonatal por estreptococos, señalándolos como responsables de las muertes asociadas al síndrome del cachorro débil (Roth, 1987). El hallazgo de estreptococos en los órganos de cachorros que murieron entre las primeras 24 horas y primera semana de vida, sugiere que este microorganismo es una causa importante de muerte neonatal (Lamm y col., 2010; Münnich y Küchenmeister, 2014). Vela y col. comunicaron el hallazgo de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* en los órganos de algunos de los cachorros que murieron después del nacimiento. Los hallazgos histopatológicos, indicarían que el mencionado microorganismo fue responsable del episodio de mortalidad neonatal (Vela y col., 2006).

Los estreptococos β hemolíticos han sido aislados de la leche de las perras sin signología clínica de mastitis (Schäfer-Somi y col., 2003) y del tracto genital especialmente de la vagina (Allen y Dagnall, 1982; Watts y col., 1996; Lamm y col., 2010). Se cree que la infección del neonato sería transmitida de la madre al cachorro durante el parto, al pasar éste por la vagina

en el nacimiento o a través de la leche, siendo en muchos casos los estreptococos la causa de la muerte (Sager y Remmers, 1990). Se ha comunicado que *S. canis* y *S. zooepidermicus*; han sido los responsables en la mortalidad temprana de caninos (Derivese y col., 1986; Timoney, 2010) Así mismo, se ha aislado *Streptococcus canis* del tracto genital de la perra (Allen y Dagnall, 1982; Watts y col., 1996, Lamm y col., 2010; Milani y col., 2012).

La implicancia de *Streptococcus agalactiae* (β hemolítico del grupo B) en sepsis y muerte neonatal en humanos que se infectan en el canal del parto, es bien conocida, siendo este microorganismo uno de los de los agentes causales más importantes en la ocurrencia de sepsis neonatal en el hombre (Schuchat, 1998, Winn, 2007; ACOG, 2011). Aproximadamente el 40% de las mujeres embarazadas presentan colonización rectal o vaginal de *Streptococcus agalactiae*. La incidencia de infección neonatal es de 0.5 cada 100 nacimientos vivos y la transmisión de la bacteria de la madre al neonato es del 75% (Winn, 2007; Edwards y col., 2008; de- Paris y col., 2011). Este problema se encuentra controlado desde que se identificó a este microorganismo como causante de muertes de niños recién nacidos por sepsis adquirida en el parto. Con la implementación de medidas profilácticas administrando antimicrobianos, disminuyeron de forma importante las muertes de los infantes (Velaphi y col., 2003; ACOG, 2011). En la actualidad la incidencia de infección neonatal es aproximadamente de 0,5 cada 1000 nacimientos vivos (Verani y col., 2010).

Los estreptococos β hemolíticos podrían ser responsables de muertes neonatales caninas que se infectan en el canal del parto al igual que lo que ocurre en humanos. Es así que la administración de antimicrobianos pre parto podría prevenir muertes neonatales caninas.

Las bacterias pertenecientes al género *Streptococcus*, comparten aspectos generales en cuanto a las características de cultivo y desarrollo y particularidades que a través del tiempo se fueron actualizando especialmente en cuanto a su clasificación y nomenclatura.

Los estreptococos son patógenos oportunistas responsables de infecciones tanto en humanos como en los animales. Tienen una demanda nutricional compleja y su aislamiento requiere el empleo de medios enriquecidos con sangre o suero. También se pueden emplear medios selectivos que tengan sustancias inhibitorias o medios diferenciales (Winn y col., 2006).

Los estreptococos son oxidasa, catalasa negativos y fermentan los carbohidratos. Una de las características fenotípicas más utilizadas para clasificarlos es el tipo de hemólisis que producen (α , β γ ; Faklam, 2002). En 1930, Rebeca Lancefield divide a los estreptococos β hemolíticos en grupos serológicos que van desde la letra A hasta la H y de la K a la V, basándose en la composición de los antígenos de la pared celular (Lancefield, 1933).

En la tabla 1 se muestran las especies de estreptococos que producen enfermedades en animales, así como los grupos serológicos y principales factores de virulencia (Timoney, 2010).

Tabla 1. Estreptococos patógenos para los animales domésticos

Species	Lancefield group	Virulence(-associated) factors	Disease
<i>S. agalactiae</i>	B	Capsular polysaccharide; C, R, and X proteins; CAMP factor; hyaluronidase; lipoteichoic acid; proteases; CspA; collagenase; D-alanylated lipoteichoic acid; neuraminidase	Mastitis
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	C	Hyaluronidase; streptokinase; fibronectin binding proteins fnb A and B; protein G; plasminogen receptor; streptodornase; M-like proteins; alpha-2-macroglobulin receptor	Mastitis
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	A, C, G, L	As for subsp. <i>dysgalactiae</i> but also including streptolysin S and O	Porcine arthritis; pneumonia in kittens and puppies. lymphadenitis; metritis; placentitis in <i>Equidae</i>
<i>S. equi</i>	C	Capsular hyaluronic acid; antiphagocytic SeM, Se18.9 and IdeE; streptolysin S; pyrogenic exotoxins: streptokinase; peptidoglycan; fibronectin binding protein; proteases; tonsil binding SzPSe and Se51.9; streptokinase; equibactin	Equine strangles
<i>S. zooepidemicus</i>	C	Capsular hyaluronic acid; streptokinase; proteases; streptolysin S; peptidoglycan; tonsil binding SzP protein; fibronectin binding proteins; IgG binding protein	Opportunist pyogen; pneumonia; metritis; joint ill
<i>S. suis</i>		Capsule; MRP and EF proteins; suilysin; OFS, enolase, SAO, adhesins.	Meningoencephalitis; septicemia and arthritis in pigs
<i>S. porcinus</i>	E, P, U, V	M protein; streptokinase	Porcine cervical lymphadenitis
<i>S. canis</i>	G	M protein; streptolysin O	Canine and feline metritis and vaginitis; neonatal bacteremia of kittens; lymphadenitis of juvenile cats, guinea pigs, and rats
<i>S. iberis</i>		Secreted antiphagocytic factor(s); casein receptor; hyaluronidase; CAMP-like <i>iberis</i> factor; mammary cell adhesin; plasminogen activator PauA; Mr scavenger MTuA	
<i>S. pneumoniae</i>	-	Capsular polysaccharide; neuraminidases; pneumolysin; autolysin; IgA protease; fibronectin binding proteins; peptide permeases; ZmpB metalloproteinase; choline binding proteins PsPA, LytA and CppA	Broncheolitis and pneumonia in horses in training

Tabla tomada de Timoney JF. Streptococcus. In Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals (Timoney, 2010).

Dentro de los estreptococos que son patógenos para el hombre y los animales se encuentra *Streptococcus agalactiae*, que pertenece al grupo B de Lancefield (SGB). Este estreptococo es causal de mastitis crónica contagiosa de los bovinos y en ocasiones causa enfermedad en los perros y gatos. (Lancefield, 1933; Messier y col., 1995; Timoney, 2010). En los humanos es bien conocido que SGB produce enfermedad grave en los recién nacidos, los mismos se contagian en el canal del parto durante el nacimiento. Los niños infectados presentan meningitis, septicemia y muerte (Winn, 2007; de- Paris y col., 2011).

Los estreptococos patógenos oportunistas en los perros adultos y neonatos son: *S. canis*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* y *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. zooepidemicus* (Messier y col., 1995; Vela y col., 2006; Lamm y col., 2010; Timoney, 2010; Ackea y col., 2015). Algunas de las especies de estreptococos citadas, están estrechamente relacionadas en

su en su filogenia. Tal es el caso de las especies *S. canis*, *S. dysgalactiae* subsp *dysgalactiae* y *S. dysgalactiae* subsp *equisimilis* (Faklam, 2002).

S. canis es un patógeno oportunista que pertenece al grupo serológico G de Lancefield, creado como nuevo taxón en 1986 (Devriese y col., 1986). El grupo serológico G y el tipo de hemólisis β lo comparte con *S.dysgalactiae* subsp *equisimilis*. Tradicionalmente los han clasificado como estreptococos del grupo G (SGG) a *S. canis* para estreptococos de origen animal y *S.dysgalactiae* subsp. *equisimilis* para los de origen humano (Richards y col., 2012). *S. canis*, se encuentra integrando la microbiota residente de piel, mucosas y en el tracto reproductivo de las hembras, formando parte de la microbiota vaginal de perras y gatas (Allen y Dagnall, 1982; Clemetson y Ward, 1990; Watts y col., 1996). *S. canis* ha sido implicado en la septicemia neonatal de estas especies, lo que lleva a la mortalidad temprana de cachorros caninos y felinos (Derivese y col., 1986; Timoney, 2010; Lamm y col., 2010).

Dentro de los factores de virulencia de este microorganismo está la proteína M, la estreptolisina O (SLO) y el factor CAMP. La proteína M posibilita la ocurrencia de septicemia neonatal en gatos y fascitis necrotizante en perros (Timoney, 2010; De Winter y col., 1999). Recientemente, Richard y col. secuenciaron el primer *S. canis* y hallaron que las tres cuartas partes de los genes de virulencia involucrados en la invasión, evasión y colonización son homólogos a otras especies de estreptococos, así también como numerosos elementos genéticos móviles y los denominados genes de transferencia lateral (LGT) cuando los compararon con otras especies de estreptococos (*S. dysgalactiae* subsp *dysgalactiae* y *S.agalactiae*) que podrían contribuir a la adaptación de huésped.

La especie de *S. dysgalactiae* se encuentra como comensal de las mucosas de la mayoría de los mamíferos y aves, siendo patógenos oportunistas de los animales domésticos (Timoney

2010). En 1996 Vandame y col. dividieron a la especie *dysgalactiae* en dos subespecies; *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* de origen animal (α o β hemolíticos del grupo C y L de Lancefield) y *dysgalactiae equisimilis* de origen humano (β hemolíticos del grupo C y G de Lancefield; Vandame y col., 1996). Una clasificación basada en la caracterización fenotípica y genotípica, estableció que las cepas de la subsp. *dysgalactiae* son del grupo C solamente, α hemolítico, y se encuentran principalmente como una causa de mastitis aguda y mastitis subclínica en el ganado vacuno. Las cepas de subsp. *equisimilis* son β hemolíticos y pueden tener o bien el antígeno del grupo A, C, G, L y causan enfermedad en una variedad de especies animales incluyendo los seres humanos (Timoney, 2010). Los *S. dysgalactiae* aislados de los equinos y perros, se denominaron *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* y se los ubicó en el grupo C de Lancefield. A el *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* aislado de leche de vacas con mastitis se los ubicó en el grupo C de Lancefield (Faklam, 2002; Timoney, 2010; Ackea y col., 2015).

Los factores de virulencia de *S. dysgalactiae* se basan en la evasión de la respuesta inmune a través de proteínas secretadas y estructuras de la superficie de la pared que impiden la fagocitosis. Las proteínas estreptocócicas incluyen la proteínas M, la estreptoquinasa, exotoxina pirogénica C (*speC*), estreptolisina O o S, estreptodornasa (DNasa), exotoxina pirogénica G e hialuronidasa (Timoney, 2010). La cápsula ha sido observada y asociada a la virulencia de *S. dysgalactiae* (Brandt y Spellerberg, 2009).

La identificación de los estreptococos se puede realizar fenotípica y genotípicamente. Fenotípicamente evaluando las características microscópicas (coloración de Gram) y macroscópicas tales como forma y tamaño de las colonias y producción de hemólisis. Se usan pruebas bioquímicas y fisiológicas como la fermentación de azúcares, hidrólisis de la esculina, el test de CAMP (Christie, Atkins, Munch, Petersen) entre otros, aunque ninguna de

ellas es específica. Una identificación más precisa de *S. canis* requiere la demostración del antígeno específico del grupo serológico y técnicas de la biología molecular para su identificación (Daly y Seskin, 1988; Faklam, 2002; Winn y col. 2006).

Para la identificación genotípica de los estreptococos se han utilizado diferentes pruebas tales como la ribotipificación (Rudney y Larson, 1994), hibridación (Devriese y col., 1986; Bentley y. Leigh, 1995), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP; Abdulwahed, 2013), tipificación de secuencias multilocus (MLST; Pinho y col., 2013), electroforesis de campo pulsado (Bert y col., 1997) y la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Hassan y col., 2001; Raemy y col., 2013; Pinho y col., 2013; Preziuso y col., 2014). La PCR, es una técnica que se utiliza en los laboratorios como herramienta de diagnóstico definitivo, por la sencillez de su realización y bajo costo en comparación a otras técnicas moleculares más sofisticadas.

Por lo expuesto, aislar e identificar definitivamente las especies de estreptococos de origen animal es una tarea que requiere de diferentes prácticas de laboratorio que involucran métodos fenotípicos y pruebas moleculares.

Los estreptococos β hemolíticos podrían habitar frecuentemente la vagina de las perras formando parte de la microbiota y estar implicados en un porcentaje importante de muertes neonatales. Con el fin de estudiar la implicancia de los estreptococos β hemolíticos en la enfermedad y muerte neonatal así como la implementación de protocolos terapéuticos preventivos se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudiar la microbiota vaginal estral y perinatal en hembras caninas múltiparas normales y con antecedentes de muertes neonatales.

2. Identificar la especie de estreptococos β hemolíticos por métodos fenotípicos y genotípicos.
3. Estudiar el efecto del tratamiento antimicrobiano preparto sobre la supervivencia neonatal en hembras con aislamiento de estreptococos β hemolíticos vaginales y antecedentes de muertes neonatales.

CAPITULO II

EXPERIMENTO 1

ESTUDIO DE LA MICROBIOTA VAGINAL ESTRAL Y PERINATAL EN HEMBRAS CANINAS MULTÍPARAS CON Y SIN ANTECEDENTES DE MUERTES NEONATALES.

INTRODUCCIÓN

La microbiota del tracto reproductivo de la mujer juega un papel preponderante en las infecciones ginecológicas y obstétricas. Estudios realizados indican que en muchas infecciones del tracto reproductivo femenino, están implicadas bacterias residentes en la vagina. Esta microbiota vaginal está formada por diferentes especies bacterianas, incluyendo microorganismos aerobios y anaerobios. La misma puede variar en relación a cambios hormonales (Larsen y Galask, 1980). Al igual que lo que ocurre en la mujer, en la especie canina ocurren fluctuaciones hormonales relacionadas con los estadios del ciclo reproductivo. Durante el ciclo estral se producen una serie de variaciones conductuales, de la signología clínica, de la citología vaginal y morfología del tracto reproductivo. Lo mismo ocurre con la microbiota que reside en la vagina, la que puede variar en relación a las fases del ciclo estral (Bjurstörm y Linde-Forsberg, 1992; Feldman y Nelson, 1996; Watts y col., 1996). Es así que algunas especies de bacterias que forman parte de la microbiota vaginal predominan durante el proestro y el estro, probablemente en relación al aumento de secreciones útero-vaginales ocurridas en las mencionadas etapas del ciclo y que modifican el medio ambiente vaginal (Noguchi y col., 2003).

El tracto genital de la perra alberga una variada cantidad de microorganismos que tienen propiedades fisiológicas y genéticas que les permiten colonizar y multiplicarse si encuentran condiciones adecuadas para su desarrollo. Una bacteria comensal puede actuar como un patógeno oportunista en un huésped inmunocomprometido o cuando coloniza otro sitio del cuerpo que no es su hábitat (Hariharan y col., 2011). Bajo ciertas condiciones del huésped, microorganismos como *Escherichia coli* y *Streptococcus* spp, pueden causar enfermedades asociadas con abortos espontáneos o afectar a los neonatos (Laurusevičius y col., 2008).

Aproximadamente el 60 % de las perras normales albergan bacterias aeróbicas en la vagina craneal y el 90 % en la vagina caudal. Aunque la perra tiene ya una microbiota establecida, el tipo y prevalencia puede variar con la edad (Johnston y col., 2001). Algunos autores sostienen que estas bacterias son transferidas entre el macho y la hembra y viceversa durante la cópula, debido a que también han sido aisladas del prepucio y del semen de los machos adultos, (Bjurström,1993). Otros autores manifiestan que las mencionadas bacterias son residentes normales del prepucio y de la vagina canina pero no siempre se transmiten en el apareamiento (Allen y Dagnall, 1982).

Entre las especies bacterianas que forman parte de la microbiota vaginal se encuentran: *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Escherichia coli*, *Pasteurella* spp, *Proteus* spp, *Corynebacterium* spp, *Pseudomonas* spp, *Klebsiella* spp y *Mycoplasma* spp. (Feldman y Nelson, 1996; Waltt y col., 1996; Carneiro y col., 2005; Groppetti y col., 2012). Las bacterias que se encuentran en mayor porcentaje tanto en perras sanas como en perras con piómetra o descargas vaginales son *Staphylococcus* spp, *Escherichia coli* y *Streptococcus* spp. Estas bacterias se encontraron en mayor cantidad durante el proestro y el estro (Carneiro y col., 2005). En otros estudios los organismos más frecuentemente aislados son *E. coli* y estreptococos alfa y beta hemolíticos, los mismos persistieron durante el estro, la preñez y el

postparto (Allen y Dagnall, 1982). A diferencia de lo encontrado de lo encontrado por Allen y Dagnall, Laurusevičius y col. aislaron *E. coli* y *Staphylococcus* spp en todas las etapas del ciclo excepto durante la gestación (Laurusevičius y col., 2008). Otros autores encontraron *Staphylococcus intermedius* casi exclusivamente después del parto (Bjurstörm y Lindforsberg, 1992). Los estreptococos β hemolíticos fueron encontrados durante el estro y al inicio del metaestro (Findik y col., 2003). Groppetti y col. encontraron estreptococos β hemolíticos con mayor frecuencia durante el proestro en comparación con el estro, la gestación y el puerperio (Groppetti y col., 2012).

Las bacterias que forman parte de la microbiota vaginal pueden identificarse en el laboratorio fenotípicamente en base a sus características morfológicas y propiedades metabólicas. El cultivo continúa siendo el método diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación y el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos (Bou y col., 2011).

En los humanos las terapias antimicrobianas suministradas a las mujeres gestantes que están colonizadas por estreptococo del grupo B, están basadas en el suministro de antibióticos en las últimas semanas de gestación y durante el parto. La sociedad Americana de Ginecología y obstetricia ha recomendado para tratar las mujeres gestantes que presentan colonización vaginal con estreptococo β hemolítico, antibióticos usando como primera opción la penicilina G y como alternativa ampicilina (ACOG, 2011). La terapia antimicrobiana preparto ha logrado disminuir la sepsis y las muertes neonatales en humanos (Verani y col., 2010).

Numerosos factores han sido implicados en el síndrome del cachorro débil. Las bacterias han sido mencionadas como uno de los factores más significativos entre las causas de muerte neonatal, postulándose a los estreptococos β hemolíticos como un grupo bacteriano

potencialmente implicado (Roth, 1987). En la especie canina la identificación del estreptococo β hemolítico, en hembras con y sin antecedentes de muertes neonatales, permitiría estimar la implicancia de este grupo de bacterias en el síndrome del cachorro débil e implementar tratamientos preventivos a las madres en el parto para prevenir la ocurrencia de muertes neonatales por estos microorganismos.

Para realizar el estudio de la implicancia de los estreptococos β hemolíticos en las muertes neonatales caninas se han planteado los siguientes objetivos:

- Estudiar la microbiota vaginal estral y perinatal (último tercio de la gestación), en hembras caninas multíparas sin antecedentes y con antecedentes de muertes neonatales.
- Estudiar la prevalencia y sensibilidad antimicrobiana de los estreptococos β hemolíticos aislados de la microbiota vaginal estral y perinatal (último tercio de la gestación) en hembras caninas multíparas sin antecedentes y con antecedentes de muertes neonatales.

Se plantearon las siguientes hipótesis

- La microbiota de la vagina en el periodo estral y perinatal en hembras caninas multíparas con y sin antecedentes de muertes neonatales es diferente, encontrándose estreptococo β hemolítico dentro de las bacterias más aisladas en hembras con antecedentes de muertes neonatales.
- Dentro de los estreptococos β hemolíticos aislados las especies prevalentes son *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus canis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población animal y toma de muestra

Se utilizaron 51 perras de diferentes razas (Dogo Argentino, Dogo de Burdeos, Gran Danés, Ovejero Alemán, Schnawzer miniatura, Boyero de Berna, Labrador, Bulldog Inglés y francés) pertenecientes a diferentes criaderos de la ciudad de La Plata y Gran La Plata, de entre dos y seis años de edad, clínicamente sanas, y con un peso entre siete y 40 kg. Las hembras fueron divididas en dos grupos. Las perras asignadas al primer grupo (G1= 28) fueron perras multíparas que no poseían antecedentes de muertes neonatales y las perras del segundo grupo (G2= 23) fueron perras multíparas que poseían antecedentes de muertes neonatales.

Entre el tercer y séptimo día del proestro se obtuvo de cada hembra, una muestra del fondo de vagina mediante hisopo cubierto (M1; Stornelli y col, 2000), posteriormente se registró el primer día del diestro citológico. Entre 45 y 48 días mas tarde se tomó una segunda muestra para el cultivo bacteriano del fondo de vagina de las hembras gestantes (M2). Los hisopos obtenidos fueron colocados en medio de transporte de Stuart y remitidos al laboratorio para su procesamiento dentro de las 24 horas de su extracción.

Procesamiento de la muestra

Los hisopados vaginales fueron sembrados en los siguientes medios de cultivo: enriquecidos (agar sangre), medios selectivos para enterobacterias (agar EMB o MacConkey; Britania S.A, CABA, Argentina) y agar TKT (toxine, kristal-violet, tallium) para estreptococos. Las placas se incubaron entre 24 y 48 horas en aerobiosis a 37°C.

Para la identificación bacteriana se realizó el estudio macroscópico observándose la forma, tamaño y aspecto de las colonias así como la producción de hemólisis. Posteriormente se

realizó la coloración de Gram y la observación al microscópico de la bacteria. Los cocos Gram positivos se repicaron en agar sangre para obtener un cultivo puro, a partir del cual se les realizó la prueba de la catalasa para diferenciarlos del género *Staphylococcus*. Los estafilococos aislados se repicaron en agar tripticasa soya (ATS; Britania S.A., CABA, Argentina) y se les realizó pruebas bioquímicas convencionales (Winn y col., 2006). A los cocos catalasa negativos se les realizó la prueba rápida pirrolidonil-beta-naftilamida (PYR; Britania S.A., CABA, Argentina), para diferenciar los géneros *Streptococcus* de los *Enterococcus*.

Los bacilos Gram negativos que desarrollaron en los medios selectivos fueron repicados en ATS y se identificaron mediante pruebas bioquímicas convencionales (Winn y col., 2006).

Para la identificación fenotípica de las especies de estreptococos, se utilizó la siguiente batería de pruebas bioquímicas y fisiológicas: Fermentación de lactosa, maltosa, celobiosa, sorbitol, arabinosa, manitol y trehalosa, hidrólisis de la esculina y arginina, prueba de Vogues Proskauer (VP) y determinación del factor CAMP (Winn y col., 2006).

Dado que el material obtenido en la toma de muestra mediante hisopo cubierto es variable y se utiliza directamente para la siembra en placa (sin dilución en ningún medio líquido) no se realizó conteo de UFC. Por lo anteriormente explicado se decidió establecer una escala “ad hoc” según el desarrollo bacteriano obtenido para los estreptococos β hemolíticos (Tabla 2).

Tabla 2: escala “ad hoc” de desarrollo para los estreptococos β hemolíticos

Score	Número de colonias desarrolladas
1	5 a 10
2	11 a 50
3	51 a 100
4	>100

La serología se realizó de acuerdo a la clasificación de Lancefield (Lancefield, 1933). El grupo Lancefield A, B, C, D, F, y G se determinó a partir de cultivos frescos por una prueba de aglutinación de látex (kit Agrupación estreptocócica. Streptex, Clipper Boulevard West, Crossways Dartford, Kent, DA2 6PT UK; Daly and Seskin, 1988).

La determinación de la sensibilidad antimicrobiana se realizó por el método de difusión en disco. Los antimicrobianos probados fueron penicilina (10UI), vancomicina (30ug) y eritromicina (15ug; Britania S.A., CABA, Argentina). Los procedimientos del antibiograma así como la lectura e interpretación de los resultados fueron hechos según las normas del CLSI (CLSI, 2013; CLSI, 2016). Es así que se determinó para el grupo viridans que incluyen los estreptococos β hemolíticos C y G, todo halo de sensibilidad a la penicilina mayor 24 mm se registra como microorganismo sensible a la penicilina, y betalactámicos (amoxicilina y cefalexina; CLSI, 2016).

Para estudiar la presencia o ausencia de proteína M y cápsula (algunos de los factores de virulencia de los estreptococos), se realizó el estudio de 22 cepas de estreptococo β hemolítico. A las colonias obtenidas en el primoaislamiento se les realizó una suspensión con solución fisiológica estéril para la observación directa en fresco con el microscopio

electrónico de transmisión (MET) utilizando tinción negativa. Cuando la cantidad de colonias crecidas en primoaislamiento fue suficiente se procesó también para cortes ultrafinos (17 cepas) y posterior observación al MET.

Para realizar la tinción negativa se tomó una gota de la suspensión bacteriana, se colocó en una grilla de cobre (400 mesh) cubierta por colodión durante 5 minutos. Posteriormente, se quitó el excedente apoyando la grilla sobre un papel de filtro. Las bacterias adheridas a la rejilla fueron teñidas negativamente con ácido fosfotúngstico al 2% durante 40 segundos. Luego se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Tokio, Japón) del Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Las imágenes observadas se fotografiaron con una cámara Erlangshen ES1000W, Modelo 785 (Gatan Inc., Pleasanton, California, USA).

Los cortes ultra finos se procesaron centrifugando a 1500 rpm durante 10 minutos y se fijaron en glutaraldehído al 2% en buffer de fosfato (pH 7,2-7,4) con el agregado de 0,5% de alcian blue durante 2 horas a 4°C. La fijación secundaria se realizó con tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora a 4°C y posteriormente, las muestras se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes y se incluyeron en resina epoxi. Los cortes ultrafinos (90 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron con un MET.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza con el paquete estadístico SAS® 6.12 (SAS, 2003). La significancia fue definida como $P < 0,05$.

Marco bioético del uso de animales

Este experimento se realizó respetando las recomendaciones internacionales especificadas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio y utilizando las recomendaciones

de la Academia de Ciencias de EEUU referidas al uso de caninos como animales de laboratorio (National Research Council, 2002). Estas recomendaciones fueron tenidas en cuenta en lo referente a la atención veterinaria, medio ambiente, alimentación, sanidad, identificación, sujeción, administración de drogas, toma de muestras de sangre y procedimientos experimentales (National Research Council, 2002). Además contó con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la FCV-UNLP (14-10-12).

RESULTADOS

En las 51 perras muestreadas se aislaron e identificaron diferentes géneros bacterianos tanto en el proestro como en el último tercio de la gestación. Algunos géneros bacterianos se encontraron solo en el proestro más no al final de la gestación y viceversa. Las muestras estudiadas presentaron desarrollo bacteriano compuesto por dos o más géneros en la mayoría de los casos.

En las 28 perras que no presentaron antecedentes de muertes neonatales (G1) se aislaron bacterias durante las dos fases del ciclo. En este grupo de animales predominó el aislamiento de estreptococo β hemolítico, en el proestro en comparación con el final de la gestación (tabla 3). El género *Staphylococcus*, tuvo mayor porcentaje de aislamientos al final de la gestación. *E. coli* se encontró en porcentajes similares en las dos fases. También se aislaron bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) en igual porcentaje en el proestro y al final de la gestación. *Proteus* spp, *Citrobacter* spp y *Enterococcus* spp fueron aislados en menor porcentaje (Tabla 3).

Tabla 3: Porcentaje de bacterias aisladas en la vagina de perras sin antecedentes de muertes neonatales (G1).

Bacterias	M1*	M2**
Estreptococo β hemolítico	57,1%	35,7%
<i>Staphylococcus</i> spp	42,8 %	64,28 %
<i>Escherichia coli</i>	21.42%	28,57%
BGNMF	14,28%	14,28%
<i>Enterococcus</i> spp	3,6%	3,6%
<i>Proteus</i> spp	8,57%	5,71%
<i>Citrobacter</i> spp	0%	3.6%

M1*: Muestra del proestro

M2** Muestra final de la gestación

En las 23 perras pertenecientes al grupo G2 se registraron aislamientos bacterianos durante las dos fases. En estas perras el mayor número de bacterias aisladas correspondió a estreptococo β hemolítico, con porcentajes superiores en el proestro en comparación con el final de la gestación, seguido por el género *Staphylococcus* (aislado en mayor porcentaje en el proestro). *E. coli* fue aislada en porcentajes similares en las dos fases. Otras bacterias (BGNMF, *Proteus* spp, *Klebsiella* spp, *Enterococcus* spp) se encontraron en menor porcentaje que los anteriores (Tabla 4).

Tabla 4: Porcentaje de bacterias aisladas en la vagina de perras con antecedentes de muertes neonatales (G2).

Bacterias	M1*	M2**
Estreptococo β hemolítico	78,3%	69,6%
<i>Staphylococcus</i> spp	43,47%	34,8%
<i>Escherichia. coli</i>	21,7%	21,7%
BGNF	13,1%	4,3%
<i>Enterococcus</i> spp	13,1%	13,1%
<i>Klebsiella</i> spp	4,3%	8,7%
<i>Proteus</i> spp	8,7%	8,7%

M1*: Muestra del proestro, M2** Muestra al final de la gestación.

El desarrollo bacteriano obtenido para los estreptococos β hemolíticos según la escala ad hoc diseñada se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Desarrollo bacteriano obtenido para los estreptococos β hemolíticos

Grupo	S1	S2	S3	S4
G1M1	NP 2	NP 3	NP 6	NP 5
G2M1	NP 3	NP 3	NP 5	NP 10
G1M2	NP 1	NP 2	NP 5	NP 8
G2M2	NP 4	NP 4	NP 8	NP 5

NP: número de perras de las que se obtuvo un determinado grado de desarrollo.

S1: score 1. S2: score 2. S3: score 3. S4: score 4

G1: perras sin antecedentes. G2: perras con antecedentes

M1: muestra de proestro. M2: muestra del final de la gestación

Las pruebas bioquímicas, fisiológicas y serológicas realizadas a los estreptococos β hemolíticos permitieron identificarlos como *Streptococcus canis* y *Streptococcus dysgalactiae* (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de perras con y sin antecedentes de muertes neonatales en las que se aislaron estreptococos β hemolíticos de la vagina.

Perras	Estreptococos β hemolíticos	Serología G <i>S. canis</i>	Serología C <i>S. dysgalactiae</i>
G1=28	57,14% (n=16)	32,14% (n=9)	25% (n=7)
G2=23	91,3% (n=21)	69,56% (n=16)	21,73% 7(n=5)

G1= Perras sin antecedentes de muertes neonatales. G2= Perras con antecedentes de muertes neonatales

Los estreptococos β hemolíticos aislados en 16 perras del grupo G1 tuvieron pruebas bioquímicas compatibles con *Streptococcus canis* y *Streptococcus dysgalactiae*. En la prueba de CAMP siete aislamientos fueron positivos y nueve aislamientos CAMP negativos. Las pruebas serológicas permitieron identificar nueve cepas correspondientes al grupo G de Lancefield (*S. canis*) mientras que siete reaccionaron en la prueba de aglutinación con el grupo C de Lancefield (*S. dysgalactiae*).

Los estreptococos β hemolíticos aislados en 21 perras del grupo G2 tuvieron pruebas bioquímicas compatibles con *S. canis* y *S. dysgalactiae*. En la prueba de CAMP 15 aislamientos fueron positivos y seis aislamientos CAMP negativos. Las pruebas serológicas permitieron identificar 16 cepas correspondientes al grupo G de Lancefield (*S. canis*) mientras

que cinco reaccionaron en la prueba de aglutinación con el grupo C de Lancefield (*S. dysgalactiae*).

El análisis de los resultados obtenidos permitió observar diferencias en el desarrollo de estreptococo β hemolítico entre G1 y G2, siendo significativamente mayor el número de perras con aislamiento de estreptococo β hemolítico en el grupo G2 ($46,43 \pm 0,43$ vs $73,91$ $P < 0,05$). Cuando se comparó M1 y M2 se observó una tendencia a ser diferentes, siendo mayor numéricamente las perras con aislamiento de estreptococo β hemolítico en la muestra M1 (57 vs $45 \pm 0,4$ $P < 0,06$). Los otros géneros bacterianos no mostraron diferencias entre grupos (G1 y G2) ni entre muestras (M1 y M2).

Los resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana mostraron que no hubo resistencias a las drogas probadas en ambas especies de estreptococos. Sin embargo para eritromicina se registró sensibilidad intermedia en 6 cepas (una de *S. canis* y cinco de *S. dysgalactiae*). La distribución de la sensibilidad según las especies de estreptococos y los grupos de perras se observan en la tabla 7.

Tabla 7: Prueba de sensibilidad antimicrobiana

Antimicrobiano		<i>S. canis</i>						<i>S. dysgalactiae</i>					
		S		I		R		S		I		R	
		G1	G2	G1	G2	G1	G2	1	G2	G1	G2	G1	G2
Penicilina	10 UI	9	6	0	0	0	0	7	5	0	0	0	0
Vancomicina	30 ug	9	16	0	0	0	0	7	5	0	0	0	0
Eritromicina	15 ug	9	15	0	1	0	0	4	3	3	2	0	0

S= Sensible. I= Sensibilidad Intermedia. R= Resistente

G1= Perras sin antecedentes de muertes neonatales. G2= Perras con antecedentes de muertes neonatales.

El estudio de los primoaislamientos mediante MET, permitió observar en los estreptococos aislados, estructuras compatibles con cápsula en las observaciones en fresco (foto 1) y otra estructuras compatibles con proteína M en los cortes ultrafinos (foto 2). Las estructuras compatibles con cápsula pudieron observarse en 21 de los 22 de los aislamientos de *S. canis* y *S. dysgalactiae* estudiados al MET en fresco (Tabla 8). Los cortes ultrafinos de las 17 cepas de estreptococos β hemolíticos estudiadas al MET mostraron presencia de proteína M.

Se registraron medidas similares en las estructuras compatibles con cápsula de las cepas de los grupos serológicos G y C ($218,95 \pm 21,56$ vs $210,71 \pm 10,39$ nm.). Las cepas del grupo serológico G, provenientes de perras G2 mostraron cápsulas más gruesas que las del grupo de perras G1 ($234 \pm 24,2$ vs $151,23 \pm 28,93$ nm.). Las cepas del grupo serológico C provenientes de

perras G2, mostraron cápsulas de similares medidas que las observadas en las perras G1 ($210\pm 13,54$ vs $211,66\pm 19,67$ nm.).

Tabla 8: Presencia de cápsula mediante observación al MET (Tinción negativa) a partir de primo- aislamientos.

Grupo	<i>S. canis</i>	PC	AC	<i>S. dysgalactiae</i>	PC	AC
G1:	4	3	1	3	3	0
G2	11	11	0	4	4	0

G1 perras sin antecedentes, G2 perras con antecedentes de muertes neonatales.

PC: presencia de cápsula, AC: ausencia de cápsula

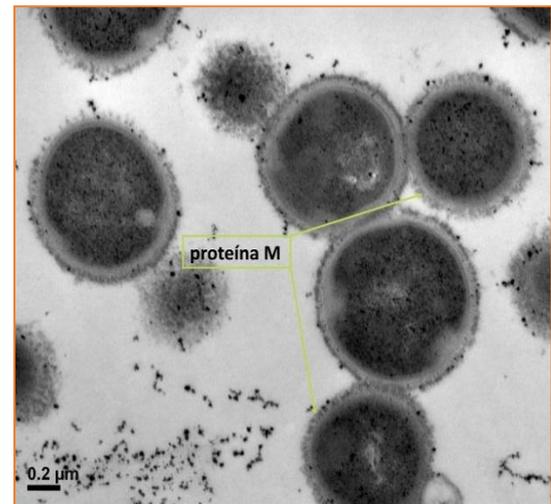
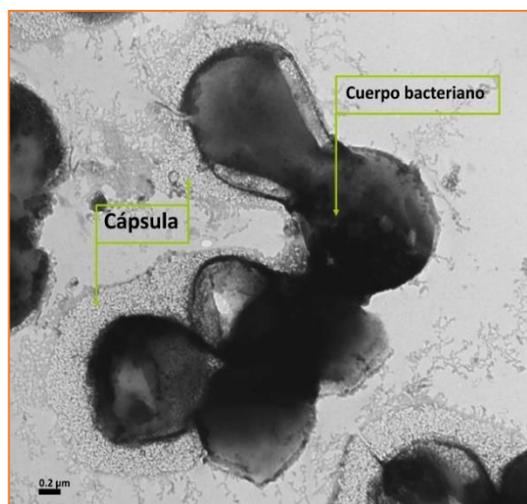


Foto 1: estructura compatible con cápsula.

Foto 2: estructura compatible con proteína M.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La microbiota vaginal observada fue semejante a la encontrada por otros autores los cuales aislaron *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Escherichia coli*, *Proteus* spp, y otras bacterias (Watts y col., 1996; Carneiro y col., 2005; Laurusevičius y col., 2008; Groppetti y col., 2012).

En este estudio se encontró *Staphylococcus* spp en perras sanas durante el proestro y al final de la gestación en un porcentaje menor al comunicado por otros autores que encontraron porcentajes de hasta 76,19% en perras sanas y 71,42% en perras con patologías reproductivas. *E. coli* también se encontró en nuestro estudio en un porcentaje menor al encontrado por este mismo autor en perras sanas (66,66%) y de perras con patologías reproductivas (23,8%; Carneiro y col., 2005). Groppetti y col. encontraron porcentajes mucho menores (2,9%) de *E. coli*, durante el proestro (Groppetti y col., 2012).

En perras con antecedentes de muertes neonatales, estreptococo β hemolítico fue la bacteria más frecuentemente encontrada en nuestro estudio durante las dos fases. Los porcentajes de estreptococos aislados en el presente estudio fueron similares a los comunicados por Carneiro y col, (57,14%) pero difieren de los hallados por Groppetti y col. quienes encontraron un porcentaje menor (20,6 %) en aislamientos de perras sanas durante el proestro (Carneiro y col., 2005; Groppetti y col. 2012). En el presente estudio el estreptococo β hemolítico ha sido el microorganismo aislado con mayor frecuencia en perras sanas y con antecedentes de muertes neonatales, así como durante el proestro y la gestación. Este dato concuerda con los hallazgos de Allen y Dagnall quienes encontraron a este microorganismo dentro los más frecuentes en perras sanas, no gestantes, gestantes, en perras infértiles y en perras con descarga vulvar (Allen y Dagnall, 1982).

Los estreptococos β hemolíticos más frecuentemente aislados en nuestro trabajo pertenecieron al grupo G de Lancefield (*S. canis*), microorganismo encontrado en la vagina de perras en proestro por otros autores (Allen y Dagnall, 1982; Watts y col., 1996). Otro grupo de estreptococos aislados coincidieron en sus pruebas bioquímicas y serológicas con *S. dysgalactiae*, que en otros estudios ha sido aislado de hisopados faríngeos de perros (Schrieber y col., 2014; Acke y col., 2015). Sin embargo según nuestro conocimiento no ha sido aislado del tracto reproductivo canino.

Streptococcus dysgalactiae es uno de los microorganismos que comparte más pruebas bioquímicas con el *S. canis*. Por otra parte, algunas pruebas pueden tener una reacción variable (fermentación de la lactosa, trehalosa, hidrólisis de la esculina; Vieira y Castro, 1994; Hassan y col., 2005; Lyskova y col., 2007). La prueba de CAMP fue identificada negativa para *S. dysgalactiae* y positiva para *S. canis* (Vieira y Castro, 1994; Facklam, 2002). Sin embargo *S. canis* no siempre expresa fenotípicamente el factor CAMP. Lyskova y col. encontraron una variabilidad del 58,1 % en la positividad de la prueba de CAMP (Lyskova y col., 2007). En nuestro estudio tres cepas de *S. canis* no expresaron el factor CAMP, pero serológicamente tuvieron reacción de aglutinación con el grupo G de Lancefield. Este hecho se podría comparar con estudios realizados en la especie *S. agalactiae* donde se han encontrado algunas cepas que fenotípicamente dan reacción negativa a la prueba de CAMP y mediante técnicas moleculares se identifican como *S. agalactiae*. Este hecho que podría deberse a una falta de expresión del factor (Hassan y col., 2002). Esto mismo podría ocurrir con las cepas de *S. canis* que no expresan el factor CAMP.

En la determinación de la sensibilidad antimicrobiana, los estreptococos evaluados por el método de difusión en disco, presentaron sensibilidad a la penicilina y a la vancomicina, concordando con algunos autores que tuvieron resultados semejantes en *S. canis* de

aislamientos de leche de vacas y de la vagina de perras (Hassan y col., 2005, Pinho y col., 2013) y en *S. dysgalactiae* aislado de hisopados faríngeos de humanos (Woo y col., 2001; Rantala, 2014). Sin embargo Lysková y col encontraron un 10,5% de resistencia a vancomicina en *S. canis*. Al estudiar la sensibilidad a la eritromicina, pudo observarse en las cepas identificadas como *S. canis* en nuestro estudio, que una de ellas así como siete de las 12 cepas del *S. dysgalactiae* presentaron sensibilidad intermedia a este antimicrobiano. A diferencia de los resultados obtenidos por otros autores, no se encontró resistencia de ninguna de las especies estudiadas a la eritromicina. Lysková y col encontraron un 3,5% de las cepas de *S. canis* resistentes a la eritromicina. Las mencionadas cepas fueron aisladas de oídos, vagina, recto y heridas de perros (Lysková y col. 2007). Giannechini y col. encontraron una resistencia del 1,1% a la eritromicina en cepas de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* aisladas de la leche de vacas con mastitis subclínica (Giannechini y col., 2014), y una resistencia del 3% en cepas de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, aisladas de la faringe y tracto genital de mujeres (Woo y col., 2001).

El aislamiento de estreptococo β hemolítico de la vagina de las perras muestreadas (G1 y G2), indica que el microorganismo está presente en ambos grupos de perras. El porcentaje de perras con antecedentes de muertes neonatales y presencia de estreptococos β hemolíticos es aproximadamente el doble del porcentaje de perras sin antecedentes de muertes neonatales que presentan el estreptococo en la vagina. Este hecho podría relacionarse con la transmisión de la bacteria al neonato durante el parto al pasar por la vagina tal como ocurre en humanos (Schuchat, 1998; Winn, 2007; de Paris, 2011). Sin embargo, los aislamientos de estreptococos β hemolíticos en hembras caninas sin antecedentes podrían indicar que aunque la bacteria esté presente no siempre ocurre la transmisión al neonato. Este hecho estaría sustentado por lo ocurrido en humanos, donde la transmisión vertical del microorganismo desde la madre

colonizada al recién nacido, ocurre en el 75% de los casos y no todos los neonatos nacidos de madres con colonización vaginal desarrollan la enfermedad (Winn, 2007; de-paris y col., 2011).

El 69,6% de las perras con antecedentes de muertes neonatales presentaron estreptococo β hemolítico en la vagina al final de la gestación, porcentaje mayor al 40% de mujeres gestantes con presencia de estreptococo β hemolítico vaginal en el último tercio de la gestación (Winn, 2007; de-Paris y col., 2011). Este hecho sugiere la posibilidad de que los cachorros sean infectados en el canal del parto como ocurre en humanos o a través de las descargas vulvares de la perra al lamerse ella la vulva y luego lamer al cachorro.

Los estudios ultramicroscópicos de los aislamientos de los estreptococos β hemolíticos, permitieron visualizar estructuras compatibles con proteína M en todos los cortes ultrafinos mientras que la cápsula solo pudo observarse en la mayoría de las observaciones en fresco. Nuestros hallazgos coinciden con la presencia de proteína M previamente descrita en *S. canis* y *S. dysgalactiae* (De Winter y col, 1999; Vasi y col., 2000; Brandt y Spellerberg, 2009). Si bien existen comunicaciones previas de presencia de cápsula en *S. dysgalactiae* (Brandt y Spellerberg, 2009), según nuestro conocimiento no existen comunicaciones previas de estructuras compatibles con cápsula en *S. canis*. Debido a que la cápsula puede perderse a través de sucesivos repiques (Barreto y Rodríguez, 2007) y que no todas las técnicas para observación bacteriana al MET son adecuadas para visualizar cápsula (Stukalov y col., 2008), hemos seleccionado para este trabajo el estudio de bacterias de primoaislamiento mediante observación en fresco con tinción negativa. Este hecho podría ser el responsable de la no observación de cápsula del *S. canis* ocurrida en algunos trabajos (De Winter y col., 1999), en los cuales se utilizaron cepas obtenidas de repiques y técnicas diferentes a la utilizada en nuestro trabajo para el estudio ultramicroscópico. Así mismo otros autores, mediante

observación en fresco utilizando tinción negativa han observado cápsula en algunas especies de estreptococos (*S. equi* y *S. pyogenes*; Fazio y Fischetti, 2004; Bustos y col., 2015).

La estructura capsular observada por nosotros es una estructura electrolúcida, más gruesa que la observada en *S. equi* (Bustos y col., 2015), pero más delgada que la observada en *S. pyogenes* (Fazio y Fischetti, 2004). Se ha comunicado que el grosor de la cápsula de *S. gallolyticus* se relaciona con la virulencia de la cepa estudiada, siendo las cepas más virulentas las que poseen cápsulas más gruesas (Vanrobaeys y col., 1999). Es así que las cápsulas de *S. canis* observadas en el grupo G2 en nuestro trabajo fueron más gruesas que de las cepas aisladas del G1. Este hecho podrían relacionarse con la mayor virulencia de estas cepas y la ocurrencia de enfermedad y muerte neonatal observada en G2. A diferencia de lo observado en *S. canis*, las cepas de *S. dysgalactiae* aisladas en G1 y G2 mostraron un grosor capsular similar. Son conocidos diversos factores de patogenicidad de *S. dysgalactiae*. Entre ellos podemos citar a proteínas M, la estreptoquinasa, pirógeno exotoxina C (*speC*), estreptolisina O o S, estreptodornasa (DNasa), exotoxina pirogénica G, e hialuronidasa y cápsula (Brandt y Spellerberg, 2009; Timoney, 2010). Tal vez en nuestro trabajo las cepas de los grupos G1 y G2 de *S. dysgalactiae* se diferencien no en el grosor de la cápsula sino en otros factores de virulencia no estudiados en esta tesis.

La proteína M y la cápsula observada en los estreptococos estudiados podrían ser algunos de los factores de virulencia implicados en la patogenicidad de *S. canis* y *S. dysgalactiae*.

Nuestros estudios muestran la presencia de estreptococos β hemolítico en un alto porcentaje de perras con antecedentes de muertes neonatales al final de la gestación. Este hallazgo podría relacionarse con el rol de los estreptococos en los neonatos que se infectan al pasar por el canal del parto o al estar en contacto con las descargas vulvares de la madre.

Coincidiendo con nuestra hipótesis se aisló *S. canis* de las vaginas de las perras estudiadas. A diferencia de lo planteado en nuestra hipótesis el *S. agalactiae* no fue aislado de vaginas de hembras caninas con y sin antecedentes de muertes neonatales, pero si se aisló *S. dysgalactiae*, el cual no fue considerado en las hipótesis iniciales de esta tesis.

CAPITULO III

EXPERIMENTO 2

IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus canis* y *Streptococcus dysgalactiae* POR PCR A PARTIR DE LOS ESTREPTOCOCOS β HEMOLÍTICOS AISLADOS EN VAGINAS DE HEMBRAS CANINAS.

INTRODUCCIÓN

En relación a los resultados obtenidos en el experimento 1, en este capítulo se identificaron mediante la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las cepas de *S. canis* y *S. dysgalactiae* aisladas de las vaginas de perras con y sin antecedentes de muertes neonatales.

Las pruebas fenotípicas poseen algunas limitaciones debido a que no todas las cepas de una misma especie reaccionan de una misma forma, sino que poseen propiedades bioquímicas y metabólicas que pueden dar reacciones variables. Para resolver los problemas presentados por la identificación fenotípica se implementan los métodos genotípicos de identificación bacteriana como procedimientos complementarios (Bou y col., 2011).

Para la identificación definitiva de los estreptococos se han utilizado pruebas de biología molecular, siendo la PCR una de las técnicas más utilizada en el laboratorio para el diagnóstico e investigación. Esta técnica ha sido aplicada para la identificación de algunos estreptococos como: *S. uberis*, *S. parauberis* (Hassan y col., 2001), seis especies de grupo *S. viridans* (Garnier y col., 1997), *S. agalactiae* (de parís y col., 2011; Raemy y col., 2013), *S. dysgalactiae* (kawata y col., 2004; Preziuso y col., 2010) y *S. canis* (Hassan y col., 2003).

S. canis ha sido identificado por PCR a partir de aislamientos de leche, orina y vagina de vacas; y de la nariz, útero y vagina de caninos (Hassan y col., 2005; Hassan y col., 2003). Los cebadores que se utilizan para su identificación, están diseñados para amplificar regiones específicas del gen 16S ARNr, de la región correspondiente al espacio intergénico entre los genes 16S y 23S del ADN, el gen *cfg* del factor CAMP específico para esta especie (Hassan y col., 2003) y también para amplificar y secuenciar un fragmento interno del gen *sodAint* de diversas cepas de estreptococos (Poyart y col., 1998, Hassan y col., 2005; Pinho y col., 2013).

S. dysgalactiae ha sido identificado por PCR a partir de aislamientos de exudados faríngeos, vaginales, de heridas y nasales de humanos, porcinos y equinos (Woo y col., 2001; Kawata y col., 2003; Preziuso y col., 2010) y de la leche de vacas con mastitis (Forsman y col., 1997, Raemy y col., 2013). Los cebadores que se utilizan para su identificación se han diseñado para amplificar regiones específicas de los genes 16S y 23S del ADNr (Kawata y col., 2003; Kawatay col., 2004), la región correspondiente al espacio intergénico entre los genes 16S–23S ADN ribosómico y para amplificar el gen 16S del ARNr (Forsman y col., 1997; Woo y col., 2001; Preziuso y col., 2010). Es así que para corroborar la identificación de las cepas aisladas en el experimento 1, fue necesario realizar PCR.

El objetivo de este experimento fue corroborar los aislamientos de los estreptococos β hemolíticos identificados por pruebas bioquímicas, fisiológicas y serológicas mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 37 aislamientos de estreptococos β -hemolíticos (25 de *S. canis* y 12 aislamientos de *S. dysgalactiae*) correspondientes al experimento 1. Las cepas de las dos especies de estreptococos aisladas en este mismo experimento, fueron congeladas en leche a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y almacenadas con el fin de ser estudiadas genotípicamente. Las mencionadas cepas se descongelaron, sembraron en agar sangre e incubaron a 37°C entre 24 a 48 hs.

Para obtener el ADN de los estreptococos se tomaron cuatro a cinco colonias de cada cultivo y se realizó una suspensión en un ml de solución fisiológica. La suspensión se llevó a ebullición en baño María (100°C) durante 10 minutos, para producir una lisis térmica de la pared celular y extraer el ADN bacteriano (Prezuiso y col., 2014)

Prueba de PCR

A las cepas identificadas por pruebas bioquímicas y serológicas como *S. canis* se les realizó la prueba de PCR para corroborarlo.

Los cebadores utilizados fueron los correspondientes para identificar el gen *cfr* que codifica para el factor CAMP específico de *S. canis*: Camp-I: 5'-CAA TTA ACT AAT AAG GTA GAA CAG-3' y camp-II 5'- CTC TCT CAA AAC GGG TG-3' (Hassan y col., 2003).

La mezcla y condiciones para la PCR fueron las siguientes:

12,5 μl de 2X PCR MasterMix (Promega; Fitchburg, Wisconsin, United State), 10 pmoles de cada uno de los cebadores (Fy R), 2,5 μl de ADN molde, y 8 μl de agua destilada. Los tubos fueron sometidos a 30 ciclos (Cycler; Bio-Rad). El programa utilizado fue $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5

min., 94 °C durante 1 min., y 58 °C durante 1,30 min., 72°C durante 1,30 min. El ciclo final fue seguido por una etapa de extensión a 72 °C durante 5 min.

La corrida electroforética, se realizó en un gel de agarosa al 2% (Biodynamics. CABA, Argentina) y teñida con bromuro de etidio, utilizando como referencia un marcador de 100 pb (Promega; Fitchburg, Wisconsin, United State). Se utilizó como control positivo una cepa de *S. canis* (ATCC[®] 43497[™]) y un control negativo.

A las cepas identificadas por pruebas bioquímicas y serológicas como *S. dysgalactiae* se les realizó la prueba de PCR para corroborarlo. Los procedimientos de obtención de ADN fueron los mismos que para *S. canis*, mientras que los cebadores específicos utilizados fueron dyCF 5'-AAG GAA ATG GAA CAC GTT AGG G-3' y adyR 5'-TCC TAC CAT GAC ACT AAT GTG TC-3 (Biodynamics. CABA, Argentina). Estos cebadores son comunes a las dos subespecies de *S. dysgalactiae* (identificación del gen 23 S de ADNr; Kawata y col, 2004). Se utilizó como control positivo una cepa de *S. dysgalactiae* (ATCC[®] 43078[™]) y un control negativo.

RESULTADOS

Las nueve cepas del G1 y las 16 cepas del G2, se identificaron por pruebas bioquímicas y serológicas con el grupo G de Lancefield (*S. canis*), aunque tres cepas no reaccionaron a la prueba de CAMP, se confirmaron por la prueba de PCR y produjeron amplicones con los tamaños esperados que permitieron su detección, con productos de 238 bp (foto 1).

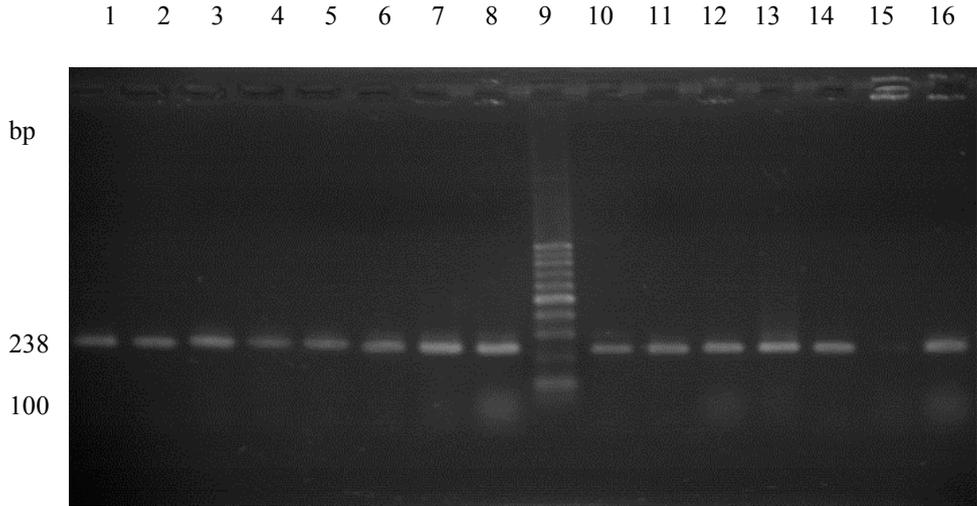


Fig. 1. amplicones de *S. canis*. 1,2,3,4,5,6,7,8,10,11,12,13,14, cepas de *S canis*. 9. Marcador de peso molecular. 15. Control negativo.16 control positivo (ATCC ® 43497™).

Las siete cepas del G1 y cinco cepas del G2 que se identificaron por pruebas bioquímicas y serológicas con el grupo C de Lancefield (*S. dysgalactiae*), dieron productos de 1508 bp compatibles con los de *S. dysgalactiae*.

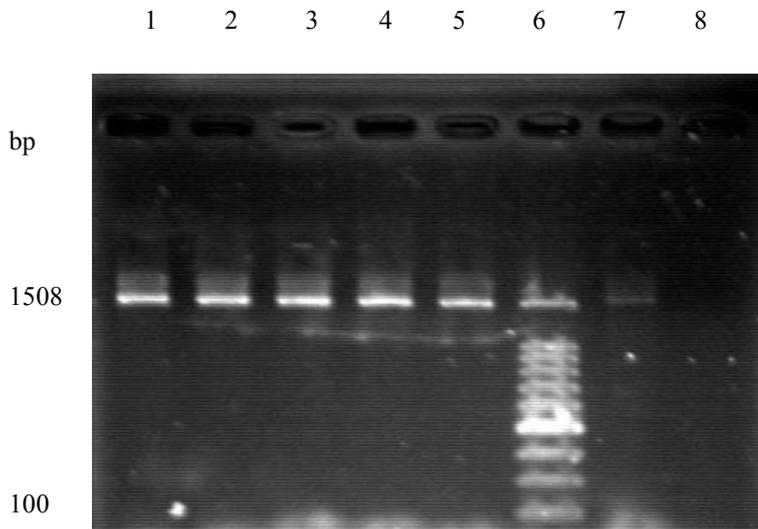


Fig. 2. amplicones de *S. dysgalactiae*.1,2,3,4,5, cepas de *S. dysgalactiae*. .6 Marcador de peso molecular. 7 control positivo (ATCC ® 43078™). 8 control negativo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

A pesar de haber utilizado en el experimento 1, una amplia batería de pruebas bioquímicas para la identificación fenotípica de los estreptococos aislados, la similitud de los resultados que diferencian a una y otra especie y la variabilidad de algunos resultados no fueron suficientes para caracterizar definitivamente los aislamientos por este tipo de pruebas. La serología permitió identificar los grupos G y C de Lancefield y con ella la identificación presuntiva como *S. canis* y *S. dysgalactiae*. La técnica de PCR fue con la que se obtuvieron las identificaciones definitivas.

Los estreptococos aislados e identificados fenotípicamente como *S. canis* en los grupos G1 y G2, se pudieron confirmar con la PCR utilizada en este trabajo y desarrollada por Hassan y col., quienes identificaron a este microorganismo mediante la amplificación del gen *cfg* que codifica para el factor CAMP con la misma secuencia de cebadores que la utilizada por nosotros (Hassan y col., 2003).

La identificación de *S. canis* aislado de vaginas de perras en nuestro trabajo coincide con hallazgos previos de este microorganismo en descargas vaginales de perras, los cuales fueron corroborados mediante la técnica de PCR por otros autores (Pihno y col., 2013).

La identificación de *S. dysgalactiae* identificados en este estudio por pruebas bioquímicas y serológicas, fueron corroborados por la técnica de PCR, con la amplificación del gen 23S del ADNr. Se usó esta secuencia de oligonucleótidos debido a que es común para las dos subespecies de *S. dysgalactiae* (Kawata y col., 2003; Kawuata y col., 2004). Kawata y col., identificaron a *S. dysgalactiae* aislados de cerdos, usando este gen y comprobaron que existe un alto nivel de relación del ADN (85% a 88%) entre las dos subespecies (Kawata y col., 2003). A diferencia del cebador usado en nuestro trabajo (23S del ADNr), otros estudios

utilizaron el gen 16S del ARNr para identificar subespecies de *S. dysgalactiae* (Woo y col., 2001; Preziuso y col., 2010). El método de PCR presentado en este estudio permitió una identificación rápida y confiable de las especies de estreptococos estudiadas.

Nuestros resultados permiten afirmar que *S. canis* y *S. dysgalactiae* se encuentran más frecuentemente en vaginas de perras con antecedentes de muertes neonatales que en aquellas que no poseen antecedentes. Estos resultados apoyan la hipótesis de la implicancia de estos microorganismos en las muertes neonatales caninas.

CAPITULO IV

EXPERIMENTO 3

EFEECTO DEL TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO PREPARTO SOBRE LA SUPERVIVENCIA NEONATAL EN HEMBRAS CON ESTREPTOCOCOS B HEMOLÍTICO VAGINAL Y ANTECEDENTES DE MUERTES NEONATALES.

INTRODUCCIÓN

Las muertes neonatales se han convertido en uno de los principales problemas de los criaderos caninos. Los rangos de morbilidad y mortalidad neonatal comunicados por la literatura se encuentran entre el 5 y el 35% (Simsomp y col., 2004; indrebo y col., 2007; Münnich y Küchenmeister, 2014). Las principales pérdidas de cachorros se presentan durante el parto, inmediatamente después del nacimiento y durante la primera semana de vida (Blunden, 2003; Gill, 2001; Simsomp y col., 2004; Münnich, 2008). Las enfermedades infecciosas sobre todo las bacterianas son la segunda causa de muertes neonatales (Múnich, 2008). Muchas bacterias han sido implicadas en la muerte de los cachorros. Estas mismas bacterias forman parte de la microbiota vaginal de las perras (Groppetti y col., 2012). Las bacterias pueden infectar al cachorro al propagarse de la madre al feto durante la preñez, en el parto y después del parto, a través de las secreciones maternas infectadas, como vaginal, oronasal, heces y leche (Münnich y Lübke-Becker, 2004, Schäfer-Somi y col., 2003). Dentro de las bacterias más frecuentemente aisladas de los órganos de los cachorros muertos están estreptococos β hemolíticos, *Staphylococcus* spp y *E. coli* (Sager y Remmers, 1990; Münnich, 2008; Lamm y col., 2010). Se ha postulado que las perras que poseen estreptococos β hemolítico en el canal vaginal durante la gestación, pueden infectar a sus crías en el momento del nacimiento (Sager

y Remmers, 1990). En algunos criaderos caninos, *S. canis* fue encontrado en el tracto vaginal y en la leche de la perra durante el parto y en los órganos de sus crías muertas (Milani, 2012; Münnich y Küchenmeister, 2014).

En los humanos, los niños nacidos de madres colonizadas con estreptococos β hemolítico, se infectan durante el nacimiento al contactar con las bacterias presentes en la vagina de la madre (de-Paris y col., 2011). En las últimas décadas la supervivencia neonatal de los niños infectados con estreptococos del grupo B, ha sido un desafío para la medicina. Se han implementado medidas profilácticas preparto para las madres que se encuentran colonizadas con esta bacteria. Un tratamiento antimicrobiano entre la semana 35 y 37 de gestación se administra a las madres, con el propósito de reducir los riesgos de infección de los niños al pasar por el canal del parto (Schrag y col., 2002; Winn, 2007; ACOG, 2011). Esta medida profiláctica permitió la disminución de las muertes neonatales. En la actualidad la incidencia de infección neonatal disminuyó de 0,5 de cada 100 nacimientos a 0,5 por cada 1000 nacimientos vivos aproximadamente, con la consiguiente disminución de las muertes neonatales (Verani y col., 2010).

Las perras sanas fértiles y que paren camadas normales, que no presentan enfermedad neonatal pueden poseer bacterias en la vagina (Groppetti, y col., 2012). Es así que sólo debería administrarse tratamiento antimicrobiano en aquellas perras en las cuales las muertes neonatales puedan relacionarse con bacterias de la microbiota vaginal (Okkens, 1994). Cuando es necesario administrar antibióticos deben tenerse en cuenta los cambios fisiológicos que modifican tanto la disponibilidad de las drogas así como la toxicidad de los fármacos para el cachorro. En la elección de los antibióticos, la terapia debe ser seleccionada a partir pruebas de sensibilidad antimicrobiana (CLSI, 2016). La asociación de amoxicilina y ácido clavulánico se puede utilizar de forma segura durante preñez y la lactancia (Münnich y

Küchenmeister, 2014). Los neonatos que presentan enfermedad bacteriana inmediatamente después del nacimiento, requieren un tratamiento terapéutico especial debido a sus particularidades fisiológicas. Estas particularidades funcionales y estructurales relacionadas con la madurez de los tejidos y órganos, alteran la absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad de los agentes antimicrobianos (Jones, 1987; Martí, 2005; Crespilho y col., 2006). Las penicilinas y cefalosporinas son antibacterianos de elección en los neonatos debido a su baja toxicidad (Jones, 1987). El aumento extracelular de agua en los recién nacidos se traduce en un aumento del volumen de distribución y por lo tanto requiere un aumento inicial de la dosis para conseguir concentraciones eficaces (Boothe y Tannert 1992).

El examen clínico de los cachorros recién nacidos permitirá arribar al diagnóstico presuntivo de infección bacteriana. Los hallazgos clínicos que se observan en las crías con sepsis son los asociados al el síndrome del cachorro débil para luego ocurrir la muerte (Blunden; 1983).

El cultivo bacteriano y las pruebas de sensibilidad antimicrobiana pueden salvar la vida de los compañeros de camada que aún no desarrollan la enfermedad. Sin embargo la evolución de la enfermedad en la camada suele ser tan rápida que muchas veces los cachorros mueren antes de tener los resultados del estudio bacteriológico.

Es así que la identificación de estreptococos β hemolíticos en la vagina de perras con antecedentes de muertes neonatales y el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos permitiría la implementación de una terapia antibiótica que prevengan la infección neonatal durante el parto y reduzca las muertes de los recién nacidos.

El objetivo de este trabajo fue:

Estudiar el efecto del tratamiento antimicrobiano preparto sobre la supervivencia neonatal en hembras con aislamiento de estreptococos β hemolíticos de la vagina y antecedentes de muertes neonatales.

La hipótesis fue que el tratamiento antimicrobiano preparto aumenta la supervivencia neonatal en hembras con estreptococos β hemolíticos vaginales y antecedentes de muertes neonatales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron hembras con antecedentes de muertes neonatales incluidas en el experimento 1, en las cuales se aislaron estreptococos β hemolíticos y se les realizó el antibiograma. Las hembras fueron divididas en dos grupos (GR). A las hembras del GRA (n=10) se les administró 5 días antes de la fecha probable de parto, obtenida mediante la identificación del primer día del diestro (Feldman y Nelson, 1996; Jhonston y col., 2001) y 5 días luego de ocurrido el parto antibióticos, según los resultados obtenidos en el experimento 1 (CLSI, 2013). A las hembras del GRB (n=11) se les administró solución fisiológica 5 días antes de la fecha probable de parto obtenida mediante la identificación del primer día del diestro y 5 días luego de ocurrido el parto. A los cachorros nacidos de perras del GRB se los trató con el antimicrobiano seleccionado en el experimento 1 al inicio de la aparición de síntomas de infección neonatal. Se evaluaron 21 camadas correspondientes a las perras GRA (n=10) y del GRB (n=11), con un total de 126 cachorros (57 nacidos de las perras del GRA y 69 de las perras GRB).

ATCC

Marco bioético del uso de animales

Los experimentos se realizaron respetando las mismas consideraciones bioéticas que en especificadas en el experimento 1 del capítulo II (National Research Council, 2002).

RESULTADOS

Las 10 perras del GRA que fueron tratadas con antibiótico (cefalexina 20mg/k cada 12 horas; o amoxicilina 10 mg/ k cada 12 horas) al final de la gestación y en el posparto inmediato, tuvieron camadas vitales durante el periodo neonatal con un 90 % de supervivencia (51 cachorros sobrevivieron).

Las perras del GRB no tratadas al final de la gestación y en el posparto inmediato tuvieron un alto porcentaje de muertes neonatales (75% 52 cachorros murieron). Los cachorros nacidos de perras del GRB fueron tratados con el antibiótico seleccionado (cefalexina 30mg/k cada 12 horas o amoxicilina 20 mg/ k cada 12 horas) cuando empezaron los signos de enfermedad, logrando una supervivencia del 25% (17 cachorros sobrevivieron).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que al suministrar el antibiótico una semana antes del parto, a las perras con antecedentes de muertes neonatales y estreptococo β hemolítico vaginal, se redujeron considerablemente las muertes neonatales. Estos datos estarían en concordancia con la disminución de infección neonatal registrada en humanos, al implementar tratamiento antimicrobiano preventivo en las mujeres embarazadas con colonización vaginal de estreptococo β hemolítico al final de la gestación (Verani y col., 2010).

Sin embargo nuestros resultados se contraponen con los de otros autores que manifiestan que la administración de antibióticos a las perras y a las crías para protegerlos de la enfermedad y la muerte en el período posterior al parto, no reduce la mortalidad neonatal, por el contrario, induce la multiresistencia en bacterias patógenas (Milani y col., 2012). Esta discordancia puede deberse a que los mencionados autores estudiaron la microbiota vaginal y sensibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas de la vagina de perras que habían sido tratadas con antibióticos previo al parto en forma rutinaria. Este hecho se relaciona con la ocurrencia de resistencia antimicrobiana y la no respuesta al tratamiento en recién nacidos observada por los mencionados autores. Las cepas de *S. canis* aislada en nuestro trabajo provenían de perras en las cuales no se administró antibióticos en forma rutinaria y mostraron en su totalidad sensibilidad a penicilina y vancomicina. Nuestros resultados concuerdan con datos obtenidos previamente para *S. canis* aislados de caninos por Pinho y col. quienes encontraron para esta bacteria, sensibilidad a penicilina y vancomicina en el 100% de las cepas estudiadas (Pinho y col., 2013). Si bien, no se cuenta con datos de otros autores sobre la sensibilidad antimicrobiana en *S. dysgalactiae* aislados de caninos, los mencionados microorganismos aislados de humanos mostraron sensibilidad a penicilina y vancomicina en el 100% de las cepas estudiadas (Woo y col., 2001). Los datos de sensibilidad antimicrobiana obtenida por otros autores y en nuestro trabajo, coinciden con la mayor supervivencia de los neonatos nacidos a partir perras del grupo G2 tratadas con antibióticos al final de la gestación y en el posparto inmediato.

En perras con antecedentes de muertes neonatales y aislamiento vaginal de estreptococo β hemolítico, la administración de antibióticos al final de la gestación aumentó las probabilidades de supervivencia de los recién nacidos, reduciéndose considerablemente las pérdidas de cachorros durante el periodo neonatal.

CONCLUSIONES GENERALES

La microbiota vaginal aislada de perras en proestro y al final de la gestación está representada predominantemente por *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp y *Escherichia coli*, encontrándose *Proteus* spp, BGNNF, *Enterococcus* spp, *Klebsiella* spp y *Citrobacter* spp en menor proporción.

Los estreptococos β hemolítico aislados de vaginas caninas están representados por *S. canis* y *S. dysgalactiae*, encontrándose estas bacterias en mayor proporción en hembras con antecedentes de muertes neonatales.

El método de PCR permite la confirmación de las especies de estreptococos aisladas e identificadas por pruebas bioquímicas, fisiológicas y serológicas.

La observación al MET de cápsula más gruesas en *Streptococcus canis* aislados de perras con antecedentes de muertes neonatales, sugiere que podría ser uno de los factores de virulencia que contribuye con la acción patógena de este microorganismo.

El aislamiento de estreptococos β hemolíticos, la identificación de su sensibilidad antimicrobiana y el tratamiento al final de la gestación y en el posparto inmediato en perras reproductoras permitiría disminuir la ocurrencia de muertes neonatales

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdulwahed Ahmed. Identification of Lancifield serogroup G *Streptococcus canis* by PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP) of 16S ribosomal RNA gene. *Bas.J.Vet.Res.* 2013; Vol.12, No.1.
2. Acke E, Midwinter AC, Lawrence K, Gordon SJ, Moore S, Rasiah I, Steward K, French N, Waller A. Prevalence of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and *S. equi* subsp. *zooepidemicus* in a sample of healthy dogs, cats and horses. *N Z Vet J.* 2015; 63(5):265-71.
3. Allen W. Edward and Dagnall G. J. R. Some observations on the aerobic bacterial flora of the genital tract of the dog and bitch *J. small Anim. Pract.* 1982; 23,325-335.
4. American College of Obstetricians and Gynecologists. Prevention of early-onset group B streptococcal disease in newborns. *Int J Gynaecol Obstet.* 2003; 81(1):115-22.
5. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Obstetric Practice. ACOG Committee Opinion No. 485: Prevention of early-onset group B streptococcal disease in newborns. *Obstet Gynecol.* 2011; 117(4):1019-27.
6. Askaa J, Jacobsen KB, Sørensen M. Neonatal infections in puppies caused by *Escherichia coli* serogroups 04 and 025. *Nord Vet Med.* 1978; 30(11):486-8.
7. Baba E, Hata H, Fukata T, Arakawa A. Vaginal and uterine microflora of adult dogs. *Am J Vet Res.* 1983; 44(4):606-9.
8. Barreto G y Rodríguez H. La cápsula bacteriana, algo más que una estructura no esencial. *Rev. prod. Anim.* 2007; 20 (1): 69-80.
9. Bentley RW., Leigh JA. Development of PCR-based hybridization protocol for identification of streptococcal species. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(5):1296-301.

10. Bert F1, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Pulsed-field gel electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing pyogenic streptococci. *Curr Microbiol.* 1997; 34(4):226-9.
11. Bjurström L. Aerobic bacteria occurring in the vagina of bitches with reproductive disorders. *Acta Vet Scand.* 1993; 34(1), 29-34.
12. Bjurström L, Linde-Forsberg C. Long-term study of aerobic bacteria of the genital tract in breeding bitches. *Am J Vet Res.* 1992; 53(5):665-9.
13. Boothe DM, Tannert K: Special considerations for drug and fluid therapy in the pediatric patient. *Comp Cont Educ.* 1992; 14, 313–329.
14. Blunden AS. Neonatal and perinatal mortality in the dog. Clinical, pathological and management studies. PhD thesis. London.1983.
15. Blunden AS. In Perinatal and late neonatal mortality in the dog. Gill MA. Thesis Doctor of Philosophy. University of Sydney.2001.
16. Blunden AS. Diagnosis and treatment of common disorders of newborn puppies. In practice. 1988; 10,175-184.
17. Blunden, A. S. The neonate: Congenital defects and fading puppies. In: *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*, Simpson, G. M., England, G. C. W. and Harvey, M. (Ed.). British Small Animal Veterinary Association. 2004; 143 - 152.
18. Bou Germán, Fernández-Olmos Ana, García Celia, Sáez-Nieto Juan Antonio y Valdezate Sylvia. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29(8):601–608.
19. Brandt CM, Spellerberg B. Human infections due to *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*. *Clin Infect Dis.* 2009; 49(5):766-72.

20. Carneiro. A, Toniollo G, Schocken-Iturrino. R. Avaliação microbiológica da flora vaginal e do corpo uterino de cadelas (*Canis familiaris*) submetidas a ovariossalpingohisterectomia. *Ars veterinaria, jaboticaba, sp.* 2005; vol. 21, nº3, 361-367.
21. Clemetson LL, Ward AC. Bacterial flora of the vagina and uterus of healthy cats. *J Am Vet Med Assoc.* 1990; 196(6):902-6.
22. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): M100-S 26th Edition Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2016.
23. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): M100-S3 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. Clinical Laboratory Standards Institute Wayne, PA. 2013.
24. CrespilhoAM, Melo Martins MI, Ferreira de Souza F, Lopes MD, Ozanam Papa F. Therapeutic approach of the canine and feline newborns: 1. Pharmacokinetics peculiarities. *Rev Bras Reprod Anim.* 2006; v.30, n.1/2, p.3-10.
25. Daly JA, Seskin KC. Evaluation of rapid, commercial latex techniques for serogrouping beta-hemolytic streptococci. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(11):2429-31.
26. Decaro N, Amorisco F, Lenoci D, Lovero A, Colaianni ML, Losurdo M, Desario C, Martella V, Buonavoglia C. Molecular characterization of Canine minute virus associated with neonatal mortality in a litter of Jack Russell terrier dogs. *J Vet Diagn Invest.* 2012; 24(4):755-8.
27. de-Paris F, Machado AB, Gheno TC, Ascoli BM, Oliveira KR, Barth AL. Group B Streptococcus detection: comparison of PCR assay and culture as a screening method for pregnant women. *Braz J Infect Dis.* 2011; 15(4):323-7.

28. Devriese LA, Homme J, Kilpper-Balz R, Schleifer K-H. *Streptococcus canis* sp.nov.: a Species of group G Streptococci from Animals. *Int.J. Syst. Bacteriol.* 1986; 36:422–425.
29. DeWinter LM, Low DE, Prescott JF. Virulence of *Streptococcus canis* from canine streptococcal toxic shock syndrome and necrotizing fasciitis. *Vet Microbiol.* 1999; 70(1-2):95-110.
30. Edwards RK, Novak-Weekley SM, Koty PP, Davis T, Leeds LJ, Jordan JA. Rapid group B streptococci screening using a real-time polymerase chain reaction assay. *Obstet Gynecol.* 2008; 111(6):1335-41.
31. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(4):613-30.
32. Fazio M and Fischetti VA. *Streptococcus pyogenes* -transmission electron micrograph. with permission. The Laboratory of Bacterial Pathogenesis and Immunology, Rockefeller University. New York. 2004.
[Online] <http://www.rockefeller.edu/vaf/capsule.php>
33. Feldman E, Nelson R. *Feline reproduction in canine and feline endocrinology and reproduction.* 2nd ed. WB Saunders, Philadelphia. 1996; p. 741-768.11.
34. Findik M., Maral N., Keskin O., Kalender H., Erdeger J., Aslan S., The relationship between the stages of the sexual cycle, the pregnancy and postpartum periods and vaginal flora in kangal breed bitches. *Turk J Vet Anim Sci.* 2003; Vol. 27. p. 761–765.
35. Forsman P, Tilsala-Timisjärvi A, Alatossava T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology.* 1997; 143 (Pt 11):3491-500.

36. Garnier F, Gerbaud G, Courvalin P, Galimand M. Identification of clinically relevant viridans group streptococci to the species level by PCR. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(9):2337-41.
37. Giannechini, R, Concha C, Delucci I, Gil J, Salvarrey L, Rivero R. Bovine mastitis, distribution of pathogens and antimicrobial resistance in the Southern Dairy Basin of Uruguay. *Veterinaria.* 2014; Vol. 50
38. Gill MA. Perinatal and late neonatal mortality in the dog. Thesis of Doctor of Philosophy. University of Sydney.2001.
39. Groppetti D, Pecile A, Barbero C, Martino PA. Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: role on fertility. *Theriogenology.* 2012; 77(8):1549-56.
40. Hariharan H, Matthew V, Fountain J, Snell A, Doherty D, King B, Shemer E, Oliveira S, Sharma RN. Aerobic bacteria from mucous membranes, ear canals, and skin wounds of feral cats in Grenada, and the antimicrobial drug susceptibility of major isolates. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2011; 34(2):129-34.
41. Hassan AA, Abdulmawjood A, Yildirim AO, Fink K, Lämmeler C, Schlenstedt R. Identification of streptococci isolated from various sources by determination of *cfb* gene and other CAMP-factor genes. *Can J Microbiol.* 2000; 46(10):946-51.
42. Hassan AA, Akineden O, Lämmeler C, Huber-Schlenstedt R. Molecular characterization of phenotypically CAMP-negative *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2002; 49(5):257-9.
43. Hassan AA, Khan IU, Abdulmawjood A, Lämmeler C. Development of PCR assays for detection of *Streptococcus canis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 219(2):209-14.

44. Hassan AA, Akineden O, Usleber E. Identification of *Streptococcus canis* isolated from milk of dairy cows with subclinical mastitis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(3):1234-8.
45. Hotston M P, Sturges K. Care of neonates and young animals. In *BSAVA Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*. Simpson G, England G, Harvey M, editors. Ed British Small Animal Veterinary Association. United Kingdom. 2004; p. 153-170.
46. Indrebø A., Trangerud C., and Moe L. Canine neonatal mortality in four large breeds. *Acta Vet Scand.* 2007; 49(Suppl 1):S2
47. Johnston DJ, Kuztritz MVR, Olson P. En: *Canine and feline Theriogenology*. WB Saunders. Philadelphia, 2001, p. 146-165.
48. Jones RL. Special considerations for appropriate antimicrobial therapy in neonates. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1987; 17(3):577-602.
49. Kawata K, Minakami T, Mori Y, Katsumi M, Kataoka Y, Ezawa A, Kikuchi N, Takahashi T. rDNA sequence analyses of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolates from pigs. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003; 53(Pt 6):1941-6.
50. Kawata K, Anzai T, Senna K, Kikuchi N, Ezawa A, Takahashi T. Simple and rapid PCR method for identification of streptococcal species relevant to animal infections based on 23S rDNA sequence. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 237(1):57-64.
51. Lamm CG, Ferguson AC, Lehenbauer TW, Love BC. Streptococcal infection in dogs: a retrospective study of 393 cases. *Vet Pathol.* 2010; 47(3):387-95.
52. Lancefield, R. C. A serological differentiation of human and other groups of streptococci. *J. Exp. Med.* 1933; **59**:441-158.

53. Larsen B, Galask RP. Vaginal microbial flora: practical and theoretic relevance. 1980; 55(5 Suppl):100S-113S.
54. Larsen RW, Kiupel M, Balzer HJ, Agerholm JS. Prevalence of canid herpesvirus-1 infection in stillborn and dead neonatal puppies in Denmark. *Acta Vet Scand.* 2015; 57:1.
55. Lawler DF. Neonatal and pediatric care of the puppy and kitten. *Theriogenology.* 2008; 70(3):384-92.
56. Laurusevičius Saulius Aidas, Jūratė Šiugždaitė, Henrikas Žilinskas. Correlation between different sexual cycle stages and vaginal bacterial flora in bitches of different breeds. *Lithuanian Veterinary Academy, Tilžės st.* 2008; 18, LT-47181.
57. Lysková, P, Vydržalová, M, Královcová, D, Mazurová, J. Prevalence and Characteristics of *Streptococcus canis* Strains Isolated from Dogs and Cats. Pardubice, Czech Republic. *Acta Vet. Brno.* 2007; 76: 619-625.
58. Martí S. Farmacologia e terapêutica veterinária. In: Prats A. (Ed.). *Neonatologia e pediatria canina e felina.* Madrid: Interbook. 2005; p.270-301.
59. Messier S, Daminet S, Lemarchand T. *Streptococcus agalactiae* endocarditis with embolization in a dog. *Can Vet J.* 1995; 36(11):703-4.
60. Milani C, Corrà M, Drigo M, Rota A. Antimicrobial resistance in bacteria from breeding dogs housed in kennels with differing neonatal mortality and use of antibiotics. *Theriogenology.* 2012; 78(6):1321-8.
61. Meloni T, Martino PA, Grieco V, Pisu MC, Banco B, Rota A, Veronesi MC. A survey on bacterial involvement in neonatal mortality in dogs. *Vet Ital.* 2014; 50(4):293-9.
62. Hotston M P, Sturges K. Care of neonates and young animals. In *BSAVA Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology.* Simpson G, England G, Harvey M,

- editors. Ed British Small Animal Veterinary Association. United Kingdom. 2004; p. 153-170.
63. Münnich A, Lübke-Becker A. Escherichia coli infections in newborn puppies--clinical and epidemiological investigations. *Theriogenology*. 2004; 62(3-4):562-75.
64. Münnich A. The pathological newborn in small animals: the neonate is not a small adult. *Vet Res Commun*. 2008; 32 Suppl 1:S81-5.
65. Münnich A, Küchenmeister U. Causes, diagnosis and therapy of common diseases in neonatal puppies in the first days of life: cornerstones of practical approach. *Reprod Domest Anim*. 2014; 49 Suppl 2:64-74.
66. National Research Council. Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. 2da. Edición. México. Ed Lomelí, C. Estampa de artes gráficas, 2002.
67. Noguchi K, Tsukumi K, Urano T. Qualitative and quantitative differences in normal vaginal flora of conventionally reared mice, rats, hamsters, rabbits, and dogs. *Comp Med*. 2003; 53(4):404-12.
68. Okkens AC. Infertility in the bitch. *Vet Q*. 1994; 16 (1): 17– 18.
69. Pesavento PA, Bannasch MJ, Bachmann R, Byrne BA, Hurley KF. Fatal *Streptococcus canis* infections in intensively housed shelter cats. *Vet Pathol*. 2007; 44(2):218-21.
70. Pinho MD, Matos SC, Pomba C, Lübke-Becker A, Wieler LH, Preziuso S, Melo-Cristino J, Ramirez M. Multilocus sequence analysis of *Streptococcus canis* confirms the zoonotic origin of human infections and reveals genetic exchange with *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(4):1099-109.

71. Poyart C, Quesne G, Coulon S, Berche P, Trieu-Cuot P. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(1):41-7.
72. Preziuso S, Pinho MD2, Attili AR, Melo-Cristino J, Acke E, Midwinter AC, Cuteri V, Ramirez M. PCR based differentiation between *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strains isolated from humans and horses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2014; 37(3):169-72.
73. Preziuso S, Laus F, Tejada AR, Valente C, Cuteri V. Detection of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in equine nasopharyngeal swabs by PCR. *J Vet Sci.* 2010; 11(1):67-72.
74. Raemy A, Meylan M, Casati S, Gaia V, Berchtold B, Boss R, Wyder A, Graber HU. Phenotypic and genotypic identification of streptococci and related bacteria isolated from bovine intramammary infections. *Acta Vet Scand.* 2013; 55:53.
75. Rantala S. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* bacteremia: an emerging infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33(8):1303-10.
76. Richards VP, Zadoks RN, Pavinski Bitar PD, Lefébure T, Lang P, Werner B, Tikofsky L, Moroni P, Stanhope MJ. Genome characterization and population genetic structure of the zoonotic pathogen, *Streptococcus canis*. *BMC Microbiol.* 2012; 12:293.
77. Roth JA. Possible association of thymus dysfunction with fading syndromes in puppies and kittens. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1987; 17(3):603-16.
78. Root Kustritz MV. Reproductive behavior of small animals. *Theriogenology.* 2005; 64(3):734-46.

79. Rudney JD, Larson CJ. Use of restriction fragment polymorphism analysis of rRNA genes to assign species to unknown clinical isolates of oral viridans streptococci. *J Clin Microbiol.* 1994; 32 (2):437-43.
80. Rýc M, Jelínková J, Motlová J, Wagner M. Immuno-electronmicroscopic demonstration of capsules on group-B streptococci of new serotypes and type candidates. *J Med Microbiol.* 1988; 25(2):147-9.
81. SAS®. SAS and STAT User's Guide, Release 9.1. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA, 2003.
82. Sager M, Remmers C. Perinatal mortality in dogs. Clinical, bacteriological and pathological studies.[Article in German]. *Tierarztl Prax.* 1990; 18(4):415-9.
83. Schäfer-Somi S, Spargser J, Breitenfellner J, Aurich JE. Bacteriological status of canine milk and septicaemia in neonatal puppies--a retrospective study. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003; 50(7):343-6.
84. Sajjonmaa-Koulumies LE, Lloyd DH. Colonization of neonatal puppies by *Staphylococcus intermedius*. *Vet Dermatol.* 2002; 13(3):123-30.
85. Schrieber L, Towers R, Muscatello G, Speare R. Transmission of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *Equisimilis* between child and dog in an Aboriginal Australian community. *Zoonoses Public Health.* 2014; 61(2):145-8.
86. Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11:497-513.
87. Simpson G, England G, Harvey M. BSAVA. Manual of small animal reproduction and neonatology. Ed British Small Animal Veterinary Association. United Kingdom, 2004

88. Stornelli, M.A.; Cerda, R.; Arauz, M.S.; Gobello, M.C.; Stanchi, N.O. Estudio de Mycoplasmas y Bacterias Aerobicas en la vagina craneal de hembras caninas clínicamente sanas. *Analecta Veterinaria*. 2000; 20, 1: 40-42.
89. Stukalov O, Korenevsky A, Beveridge TJ, Dutcher JR. Use of atomic force microscopy and transmission electron microscopy for correlative studies of bacterial capsules. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74(17):5457-65.
90. Timoney JF. Streptococcus. In *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Ed Giles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO, ed. 4th. Blackwell Publishing, Iowa, USA, 2010.
91. Vanrobaeys M, De Herdt P, Charlier G, Ducatelle R, Haesebrouck F. Ultrastructure of surface components of *Streptococcus gallolyticus* (*S. bovis*) strains of differing virulence isolated from pigeons. *Microbiology*. 1999; 145 (Pt 2):335-42.
92. Vandamme P, Pot B, Falsen E, Kersters K, Devriese LA. Taxonomic study of Lancefield streptococcal groups C, G, and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and proposal of *S.dysgalactiae* subsp. *Equisimilis* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1996; 46(3):774-81.
93. Vasi J, Frykberg L, Carlsson LE, Lindberg M, Guss B.M-like proteins of *Streptococcus dysgalactiae*. *Infect Immun*. 2000; 68(1):294-302.
94. Velaphi, S; Siegel J.D; Wendel G.D, Cushion N, Eid WM, Sanchez PJ. Early-Onset Group B Streptococcal Infection after a Combined Maternal and Neonatal Group B Streptococcal Chemoprophylaxis Strategy. *Pediatrics*. 2003; 111(3): 541-547.
95. Vela AI, Falsen E, Simarro I, Rollan E, Collins MD, Domínguez L, Fernandez-Garayzabal JF. Neonatal mortality in puppies due to bacteremia by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(2):666-8.

96. Verani JR, McGee L, Stephanie J. Schrag SJ. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease: Revised Guidelines from CDC. 2010.
[Online] <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5910a1.htm>
97. Vieira VV , Castro AC. Biochemical properties and whole-cell protein profiles of group G streptococci isolated from dogs. *J Appl Bacteriol.* 1994 Oct; 77(4):408-11.
98. Watts JR, Wright PJ, Whithear KC. Uterine, cervical and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle. *J Small Anim Pract.* 1996; 37(2):54-60.
99. Winn HN. Group B streptococcus infection in pregnancy. *Clin Perinatol.* 2007; 34(3):387-92.
100. Winn W., Allen S., Janda W., Koneman A., Procop G., Schreckenberger P., Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed, Lippincott Williams & Wilkin, USA, 2006, p. 652-676.
101. Woo PC , Fung AM, Lau SK, Wong SS, Yuen KY. Group G beta-hemolytic streptococcal bacteremia characterized by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(9):3147-55.