UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCO B-HEMOLÍTICO EN HISOPADOS NASOFARÍNGEOS DE PERROS CON PATOLOGÍAS RESPIRATORIAS EN DIFERENTES CLÍNICAS EN LA CIUDAD DE MACHALA

PINEDA FLORES JENIFFER VIRGINIA
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

MACHALA
2017

UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCO B-HEMOLÍTICO EN HISOPADOS NASOFARÍNGEOS DE PERROS CON PATOLOGÍAS RESPIRATORIAS EN DIFERENTES CLÍNICAS EN LA CIUDAD DE MACHALA

PINEDA FLORES JENIFFER VIRGINIA
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

MACHALA
2017

UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCO B-HEMOLÍTICO EN HISOPADOS NASOFARÍNGEOS DE PERROS CON PATOLOGÍAS RESPIRATORIAS EN DIFERENTES CLÍNICAS EN LA CIUDAD DE MACHALA

PINEDA FLORES JENIFFER VIRGINIA
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

GUERRERO LOPÉZ ANA ELIZABETH

MACHALA, 11 DE SEPTIEMBRE DE 2017

MACHALA
2017

Nota de aceptación:

Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCO B-HEMOLÍTICO EN HISOPADOS NASOFARÍNGEOS DE PERROS CON PATOLOGÍAS RESPIRATORIAS EN DIFERENTES CLÍNICAS EN LA CIUDAD DE MACHALA, hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente.

GUERRERO LOPEZ ANA ELIZABETH
0702509050
TUTOR - ESPECIALISTA 1

AGUILAR GALVEZ FERNANDO LENIN
0704217348
ESPECIALISTA 2

ZAPATA SAAVEDRA MATILDE LORENA
0703436147
ESPECIALISTA 3

Machala, 11 de septiembre de 2017

URKUND

Urkund Analysis Result

Analysed Document: tesis de jeniffer pineda (1).docx (D30226240)
Submitted: 2017-08-24 01:07:00
Submitted By: aguerrero@utmachala.edu.ec
Significance: 9 %

Sources included in the report:

Tesis Sonia Guaman 17Nov14.pdf (D12239184)
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1851-300X2014000100010
http://people.upei.ca/lopez/tecamac/Notas_respiratorio_tecamac.pdf
http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2846/1/T-UTC-00370.pdf
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-77122007000100012
http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/4175/1/T-SENESCYT-01458.pdf
http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401014000990?via%253Dihub
http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196439914000725
http://www.medicinainfantil.org.ar/images/stories/volumen/2014/xxi_1_037.pdf
http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/963
http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914008000490
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC85574/
http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213049175004
http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/v14n1a12audisio.pdf
http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231242734012
http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213050075015
http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf

Instances where selected sources appear:

33

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

La que suscribe, PINEDA FLORES JENIFFER VIRGINIA, en calidad de autora del siguiente trabajo escrito titulado IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCO B-HEMOLÍTICO EN HISOPADOS NASOFARÍNGEOS DE PERROS CON PATOLOGÍAS RESPIRATORIAS EN DIFERENTES CLÍNICAS EN LA CIUDAD DE MACHALA, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

La autora declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las dispociones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

La autora como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 11 de septiembre de 2017

PINEDA FLORES JENIFFER VIRGINIA
0706464393

DEDICATORIA

Este trabajo investigativo quiero dedicarle primero a Dios que me guió en cada momento en forma espiritual y que me da un día más de vida para terminar este trabajo, a mis padres que fueron el apoyo fundamental y mis fuerzas necesarias para seguir adelante en mi carrera, a mis docentes que me impartieron todos estos tiempos sus conocimientos que fueron muy importante para mi formación profesional y a todos quienes fueron parte de este sueño realizado.

Jeniffer Pineda.

AGRADECIMIENTO

Este agradecimiento quiero darle a esta Institución de Educación Superior como es la Universidad Técnica de Machala como formadora de profesionales ya que me brindaron todas las enseñanzas, y a todos los docentes que forman parte de esta misma que nos impartieron las diferentes cátedras con todos sus conocimientos y con mucho optimismo y a todos los que conforman esta institución ya que gracias a ellos nos permitieron a seguir adelante y cumplir la meta de ser un profesional.

Gracias

IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCO β- HEMOLÍTICO EN HISOPADOS NASOFARÍNGEOS DE PERROS CON PATOLOGÍAS RESPIRATORIAS EN DIFERENTES CLÍNICAS EN LA CIUDAD DE MACHALA

Jeniffer Virginia Pineda Flores, Autora
Dra. Ana Guerrero López PhD, Tutora

RESUMEN:

Las patologías respiratorias en caninos han sido una de las principales enfermedades que se presentan en la clínica diaria. En la época fría se tiene las visitas de los propietarios de las mascotas con la presencia de tos, dificultad al respirar por la congestión de las mucosas respiratorias, lagrimeos, humedad excesiva y presencia de secreción en las fosas nasales. Todo este conjunto de signos clínicos lleva a la presencia de enfermedades respiratorias, complicando el estado de salud del animal principalmente en cachorros y perros geriátricos. Dentro de las enfermedades infecciosas se encuentran las de origen vírico, fúngicas, micoplasmas y bacterias. Dentro de las enfermedades bacterianas se han identificado los estreptococos β-hemolíticos como uno de los causantes, los mismos que se los pueden encontrar como habitante natural en el tracto respiratorio alto como es la nasofaringe. Estos tipos de bacterias son clasificados por Lancefield en los grupos serológicos A, B, C, D, F, G por el grado de hemólisis que provocan en el momento de cultivarlas en los medios como el agar sangre de cordero. Dentro de los β-hemolíticos identificados en los perros se encuentra el *Streptococcus canis* del grupo G, aislado de microbiota oral y vaginal en caninos, el mismo que puede convertirse en patógeno oportunista de acuerdo a la condición de salud del animal. El *Streptococcus equi* con su subespecie el *Streptococcus zoopidemicus* así como el *Streptococcus dysgalactiae* con sus dos subespecies: *equisimilis* y *dysgalactiae* pertenecientes al grupo serológico C de Lancefield. El objetivo general de este trabajo fue identificar la presencia del estreptococo β-hemolítico en las descargas nasofaríngeas de perros y estudiar la sensibilidad a los antimicrobianos relacionados los hallazgos con la ocurrencia de enfermedades respiratorias. Se utilizaron 25 perros (Mestizos, Gran Danés,

Frensh Poodle, Pequines, Chihuahua, Labrador, Doberman Miniatura, Pitbull, Shitzut), de entre un mes y medio hasta los 16 años, de diferentes razas y con signos clínicos de patologías respiratorias, en tres diferentes clínicas de la Ciudad de Machala. La muestra fue tomada Con un hisopo a nivel de la entrada faríngeo y en las fosas nasales. Para la identificación bacteriana se realizó el estudio macroscópico observándose la forma, tamaño y aspectos de las colonias así como a la producción de hemólisis. Posteriormente se realizó la coloración de Gram y el estudio microscópico de la bacteria. De los 25 perros que fueron examinados en las tres clínicas de Machala, predominó al aislamiento fue las bacterias *Staphylococcus* spp que fueron identificados como cocos positivos y catalasa positivo, los estreptococo β hemolítico, ocuparon el segundo lugar. Los géneros *Escherichia, Proteus, Enterococcus* y *Klebsiella* se encontraron en menor porcentaje, así también se aislaron en menor porcentaje a los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF). Se realizó la prueba serológica de aglutinación en Látex (Streptex) dando como resultado tres muestras positivas al grupo serológico G de Lancefield al que pertenece a *Streptococcus canis* y un positivo del grupo serológico D de Lancefield al que pertenece *Enterococos*. En la prueba de la sensibilidad antimicrobiana se observó que el *Streptococcus canis* es sensible a la penicilina y a la eritromicina y presentó sensibilidad intermedia a la tetraciclina. Como conclusión se puede decir que los estreptococos β hemolíticos se encuentran en el nasofaringe de los perros y podrían ser los responsables directos e indirectos de las enfermedades respiratorias de los caninos. Se recomienda realizar más aislamientos bacterianos en perros con patologías respiratorias así como la sensibilidad a los antimicrobianos para llevar un tratamiento adecuado y evitar la resistencia bacteriana.

Palabras claves: Estreptococo β- hemolítico, hisopados, cultivos, nasofaringe, patologías respiratorias.

ABSTRACT

Respiratory pathologies in canines have been one of the main diseases presented in the daily clinic. In the cold season we have the visits of the owners of the pets with the presence of cough, difficulty in breathing by the congestion of the respiratory mucous membranes, tearing, excessive humidity and presence of secretion in the nostrils. All this set of clinical signs leads to the presence of respiratory diseases, complicating the health status of the animal mainly in puppies and geriatric dogs. Infectious diseases include viruses, fungi, mycoplasmas and bacteria. Among the bacterial diseases, β-hemolytic streptococci have been identified as one of the causative agents, which can be found as a natural inhabitant of the upper respiratory tract, such as the nasopharynx. These types of bacteria are classified by Lancefield in serological groups A, B, C, D, F, and G by the degree of haemolysis they cause at the time of culture in media such as lamb's blood agar. Within the β-hemolytic identified in the dogs is the group G *Streptococcus canis*, isolated from oral and vaginal microbiota in canines, which can become opportunistic pathogens according to the health condition of the animal. Streptococcus equi with its subspecies *Streptococcus zoopidemicus* as well as *Streptococcus dysgalactiae* with its two subspecies: *equisimilis* and *dysgalactiae* belonging to the C group of Lancefield. The general objective of this work was to identify the presence of β-hemolytic streptococcus in nasopharyngeal discharges from dogs and to study antimicrobial susceptibility-related findings with the occurrence of respiratory diseases. Twenty-five dogs (Mestizos, Great Danes, French Poodle, Pequines, Chihuahua, Labrador, Miniature Doberman, Pitbull, and Shitzut) were used, from one month and a half to 16 years old, of different breeds and with clinical signs of respiratory diseases, in three different clinics of the City of Machala. The sample was taken with a swab at the level of the pharyngeal entrance and in the nostrils. For the bacterial identification, the macroscopic study was carried out observing the shape, size and aspects of the colonies as well as the production of hemolysis. Subsequently, the staining of Gram and the microscopic study of the bacterium were performed. Of the 25 dogs that were examined at the three Machala clinics, the predominant isolation was the *Staphylococcus* spp bacteria that were identified as positive cocci and catalase positive, β-hemolytic streptococci, occupying the second place. The genera

Escherichia, Proteus, Enterococcus and *Klebsiella* were found in a lower percentage and were also isolated in a lower percentage of non-fermenting Gram negative bacilli (BGNNF). Serological agglutination test in Latex (Streptex) was performed resulting in three positive samples from the Lancefield G serological group to which belongs to *Streptococcus canis* and one positive from the Lancefield serotype D to which *Enterococcus* belongs. In the antimicrobial susceptibility test it was observed that *Streptococcus canis* is sensitive to penicillin and erythromycin and presented intermediate sensitivity to tetracycline. In conclusion, it can be said that β-hemolytic streptococci are found in the pharynx of dogs and could be the direct and indirect cause of respiratory diseases of canines. It is recommended to carry out more bacterial isolates in dogs with respiratory diseases as well as antimicrobial susceptibility in order to carry out adequate treatment and to avoid bacterial resistance.

Keywords: β-hemolytic streptococcus, swabs, cultures, nasopharynx, respiratory pathologies.

ÍNDICE

DEDICATORIA 4
AGRADECIMIENTO 5
I. INTRODUCCIÓN 14
II. REVISIÓN LITERARIA 16
2.1. PATOLOGÍAS RESPIRATORIAS EN PERROS 16
2.2. MICROBIOTA DE LA CAVIDAD ORAL Y RESPIRATORIO DEL PERRO 16
2.2.1. Los estreptococos 17
2.2.1.1. Estreptococos β hemolíticos 18
2.3. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA 20
2.3.1. MEDIOS DE CULTIVOS BACTERIANO 20
2.3.1.1. Medios no selectivos 20
2.3.1.2. Medios básicos 20
2.3.1.3. Medios selectivos 20
2.3.1.4. Medios de enriquecimiento 21
2.3.1.5. Medios para prueba de sensibilidad antimicrobiana 21
2.3.1.5.1. Agar Mueller Hinton 21
2.3.2. TINCIÓN DE GRAM 21
2.3.3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS 22
2.3.3.1. Prueba de la catalasa 23
2.3.3.2. Prueba de oxidasa 23
2.3.3.3. Prueba del PYR 23
2.3.3.4. Bilis Esculina 24
2.3.3.5. Fermentación de azúcares 24
2.3.4. PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN LÁTEX (STREPTEX GROUPING) 25
2.3.5. SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA 25
2.3.5.1 PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO 25
2.3.5.2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) 26

III. MATERIALES Y MÉTODOS 27
3.1. MATERIALES 27
3.1.1. Materiales Biológicos 27
3.1.2. Materiales de vidrio 27
3.1.3. Materiales de protección 27
3.1.4. Test microbiológicos 27
3.1.5. Equipos de laboratorio 27
3.1.6. Otros 28
3.2. MÉTODOS 28
3.2.1. Procesamiento de la muestra 29
IV. RESULTADOS 31
V. DISCUSIÓN 34
VI. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES 35
VII. BIBLIOGRAFÍA 36
VIII. ANEXOS 45

ÍNDICE DE LAS TABLAS

Tabla 1: Distribución de los diferentes grupos de estreptococos patógenos……..…… 18

Tabla 2: Sensibilidad antimicrobiana por difusión en disco……. .20

Tabla 3: Porcentaje de bacterias encontradas en los hisopados de la nasofaringe de perras con patologías respiratorias……..…….…… 27

Tabla 4. Estreptococo β hemolítico aislados de la nasofaringe de perros con patologías respiratorias……..……...…28

Tabla 5. Análisis de porcentaje de las diferentes clínicas veterinarias donde se obtuvieron las muestras……...…… 28

Tabla 6. Sensibilidad antimicrobiana realizada por difusión en disco ……..…….28

ÍNDICE DE ANEXOS

FIGURA 1 Preparación de los materiales y esterilización……..42

FIGURA 2 Preparación de los medios de cultivos agar sangre para las bacterias.. 43

FIGURA 3 Recolección de las muestras en perros……43

FIGURA 4 siembras de las muestras obtenidas en la Clínica……43

FIGURA 5 Placas sembrados en el agar de sangre……..44

FIGURA 6 Tinciones de Gram para observación al microscopio……44

FIGURA 7 Kits para prueba de serología……..45

FIGURA 8 Kits para serología……45

I. INTRODUCCIÓN

Las patologías respiratorias en caninos han sido una de las principales enfermedades que se presentan en la clínica diaria. En la época fría se tiene las visitas de los propietarios de las mascotas con la presencia de tos, dificultad al respirar por la congestión de las mucosas respiratorias, lagrimeos, humedad excesiva y presencia de mucosidad en las fosas nasales. Todo este conjunto de signos clínicos conlleva a la presencia de enfermedades respiratorias, complicando el estado de salud del animal principalmente en cachorros y perros geriátricos [1] .

La presencia de este tipo de patologías, es causa de preocupación dentro de la familia, ya que el estrecho contacto que se presenta entre perro y dueño lo expone a un posible contagio de enfermedades que pueden ser transmisibles de los animales a las personas pudiendo provocar problemas en la salud humana [1].

La microbiota de la cavidad bucal y nasal está compuesta por un sinnúmero de microorganismos que viven de forma saprofita favorecidos en sus condiciones fisiológicas y nutricionales [2]. Estos microorganismos viven sin causar daño a los perros, pero en condiciones donde la inmunidad del animal baja pueden convertirse en patógenos. Es así que en la cavidad bucal y nasal existen bacterias comensales que se benefician del medio que le proporciona el organismo del perro, pero si este mismo hospedador no le proporciona el medio adecuado estos microorganismos se vuelven patógenos ocasionando un desequilibrando en la homeostasis del animal [3, 4].

Dentro de los microorganismos presentes, se encuentran bacterias aerobias y anaerobias facultativas como los cocos Gram positivos, también habitan levaduras, ciertos hongos, micoplasmas, protozoarios y virus [3,4]. Dentro de los cocos se han aislado de la cavidad nasal y bucal estafilococos y estreptococos β hemolíticos [3].

En la actualidad la tecnología ha desarrollado nuevas técnicas para identificar los diversos microorganismos que se encuentra dentro el animal, como en la cavidad bucal y nasal ya que aquí se pueden albergar muchas bacterias cuya entrada principal es la misma cavidad [4].

El aislamiento y el estudio microbiológico es por excelencia el principal método de identificación bacteriana de los microorganismos que existen en las diferentes especies animales. La identificación bacteriana les permite a los profesionales veterinarias tomar medidas de prevención y control así como la solución de las posibles enfermedades zoonóticas que se presente en los animales [5].

Este trabajo investigativo se ha realizado con la finalidad de demostrar que los problemas respiratorios en los caninos pueden ser provocados por la presencia de estreptococos que ocasionan daños en la salud del animal y probablemente la salud a los miembros de la familia por el estrecho vínculo afectivo que los unen con sus mascotas.

Los estreptococos β hemolíticos podrían habitar frecuentemente la cavidad oral y nasal de los perros, involucrándose como uno de los responsables de las patologías respiratorias de origen bacteriano. Con el fin de estudiar la implicancia de los estreptococos β hemolíticos en las enfermedades respiratorias se planteó el siguiente objetivo.

OBJETIVO GENERAL

Identificar la presencia del estreptococo β hemolítico en las descargas nasofaríngeas de los perros y estudiar la sensibilidad a los antimicrobianos, relacionando los hallazgos con la ocurrencia de enfermedades respiratorias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar al Estreptococo β hemolítico de la nasofaringe de los perros que se presentan a la clínica con patologías respiratorias
2. Identificar el grupo serológico al que pertenece el estreptococo β hemolíticos presente en la nasofaringe de perros con patologías respiratorias.
3. Estudiar la sensibilidad antimicrobiana de los Estreptococos β hemolíticos aislados de la nasofaringe de los perros que presentan enfermedades respiratorias.

II. REVISIÓN LITERARIA

2.1. PATOLOGÍAS RESPIRATORIAS EN PERROS

Las enfermedades respiratorias en los perros son uno de los principales problemas causantes de muerte en los animales, principalmente los más susceptibles a estas patologías los perros jóvenes y perros gerontes, siendo una de las causas de inicio la presencia de infecciones. Dentro de las enfermedades infecciosas se encuentran las de origen vírico, fúngicas, micoplasmas y bacterias [4,6].

Muchos de estos microorganismos que existen en el aparato respiratorio son parte de la microbiota, entre las que se encuentran bacterias aerobias, anaerobias estrictas y facultativas tales como los estreptococos, también se han encontrado ciertos hongos y virus los cuales se desarrolla según el tipo de ambiente en el que se encuentre el perro. Esta microbiota vive con él animal sin causar daño pero encuentra condiciones adecuadas y el animal está inmunodeprimido pueden proliferar causando infecciones en las vías respiratorios bajas y altas [4,7].

Las bacterias también son causantes de problemas respiratorios, entre ellas *Pasteurella multocida* causante de las neumonías, y los estreptococos β hemolítico causantes de faringitis, específicamente los del grupo C y G de Lancefield [4]. En los equinos los estreptococos del grupo C además de producir faringitis son causantes de adenitis, paperas y en las yeguas son causantes de aborto .En los perros el grupo serológico G al que pertenece al *Streptococcus canis* ha sido aislado de la faringe y el tracto genital en los perros, y han sido señalados como causantes de muertes neonatales que ocurren durante las primeras semanas de vida [10]. Este mismo grupo de bacteria ha sido aislado de la leche de las vacas con presencia de mastitis. En los seres humanos es muy escasa la presencia pero cuando ocurre pueden provocar meningitis y peritonitis [10, 19,20].

2.2. MICROBIOTA DE LA CAVIDAD ORAL Y RESPIRATORIO DEL PERRO

La microbiota oral de los caninos es muy compleja ya que en ellas se desarrollan diversos microorganismos que se encuentran distribuidos en la saliva, lengua, mucosa oral y superficie dental [3, 6]. La mayor parte de estos microorganismos son responsables de la placa

dental, de enfermedad periodontal y de gingivitis, tales microorganismo son: *Eikenella corrodens, Porfiromonas, Fusobacterias, Prevotelas, Pasteurella* spp*, Capnocytophaga* spp*, Campylobacter rectus* y *enterobacterias*, en menor medida *Actinomyces* spp, diversos *Bacteroides, Staphylococcus* spp; además microorganismos que son propios de la cavidad bucal tales como *Streptococcus viridans, Staphylococcus aureus* y *fusobacterium* [3, 4,]

La cavidad nasal del canino está formado por órganos que cumplen con la función de percibir los diferentes olores, así como también realiza el mecanismo de defensa a través una carpeta mucociliar formada por el epitelio pseudoestratificado ciliar y las secreciones de las células caliciformes que cumplen con la función de impedir que las partículas de polvos y de gases entre al interior de la cavidad y estas los convierte en mucus que son el producto de desechos de estas partículas [30].

En la microbiota de la cavidad nasal se encuentran una población de microorganismo que forman parte de ella, entre ellos los *Staphylococcus* coagulasa negativa, bacterias patógenas que causan daños leves así como crónicos debido a su gran potencial de toxinas que estas producen causando las infecciones siendo como entrada principal la cavidad nasal [32].

El aparato respiratorio se encuentra poblado por microorganismo que van a formar la microbiota nasal, aunque algunos pueden convertirse en patógenos y causar enfermedad. Dentro de las enfermedades infecciosas se encuentran el origen bacteriano y entre ellas se han señalado a los estreptococos como causantes de infecciones respiratorias [9].

2.1.1. Los estreptococos

Los estreptococos son bacterias anaerobias facultativas, Gram positivas, que presentan unas formas esféricas con un tamaño que oscila de 0.5 a 2 mm, son inmóviles no esporulados, ciertas de estas pueden presentar cápsula y en el cual se los observa en cadenas o en pares cuando están en un medio de cultivo líquidos [8,9]. Unas de las características de estos microorganismo es la incapacidad de producir la catalasa, que es una enzima que cataliza en la destrucción del peróxido de hidrógeno en el cual se las puede diferenciar de los estafilococos. Los Estreptococos también son oxidasas negativos y la mayoría de estos son hemolíticas [8, 16,17]. También se puede mencionar que estas bacterias son patógenos oportunistas en tanto en humanos como en los animales. Para su aislamiento necesitan de un

medio rico de nutrientes en el cual su medio de preferencia es la sangre o el suero y se pueden emplear medios selectivos con sangre que uno de sus principales requerimiento y que contengan sustancias inhibitorias [10,14]

2.1.1.1. Estreptococos β hemolíticos

Los estreptococos β-hemolíticos son cocos Gram positivos, que se los pueden encontrar en su hábitat natural en el tracto respiratorio principalmente en las vías respiratorias altas como es en la nasofaringe [13].

Estos tipos de bacterias son clasificados por Lancefield por el grado de hemólisis que provocan en el momento de cultivar en los medios de crecimiento como el agar de sangre de cordero [11, 17,18]. Dentro de las clasificaciones de los estreptococos β hemolítico se encuentran los siguientes grupos como son A, B, C, G y L, algunos presentan varias subespecies. Dentro del grupo A se encuentra el *Streptococcus. pyogenes* y del grupo B el *Streptococcus Agalactiae* que es un β hemolítico que se presenta tanto en animales como en humanos [19, 22, 38,39]. Dentro de los β hemolíticos del grupo G de los animales se encuentra el *Streptococcus canis* que está presente en la microbiota oral y vaginal de los caninos, y es un patógeno oportunista que ha sido señalado como causante de muertes neonatales de los cachorros [10, 38].

Dentro de los estreptococos del grupo C se encuentran: S. *equi* con su subespecie que es el *S. zooepidemicus* y el *S. dysgalactiae* con dos subespecies: *equisimilis* y *dysgalactiae* [12,13]. La especie *S. dysgalactiae* con su subespecie *dysgalactiae* solo se ha aislados de los animales, y fueron clasificados dentro del grupo C y L[34]. La subsp. *equisimilis* ha sido aislada de los humanos y de la nasofaringe de equinos y de los perros [26].

Tabla 1**: Distribución de los diferentes grupos de estreptococos patógenos para los animales domésticos.**

Species	Lancefield group	Virulence(-associated) factors	Disease
S. agalactiae	B	Capsular polysaccharide; C, R, and X proteins; CAMP factor; hyaluronidase; lipoteichoic acid; proteases; CspA; collagenase; D-alanylated lipoteichoic acid; neuraminidase	Mastitis
S. dysgalactiae subsp. *dysgalactiae*	C	Hyaluronidase; streptokinase; fibronectin binding proteins fnb A and B; protein G; plasminogen receptor; streptodornase; M-like proteins; alpha-2-macroglobulin receptor	Mastitis
S. dysgalactiae subsp. *equisimilis*	A, C, G, L	As for subsp. *dysgalactiae* but also including streptolysin S and O	Porcine arthritis; pneumonia in kittens and puppies. lymphadenitis; metritis; placentitis in *Equidae*
S. equi	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
S. zooepidemicus	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
S. suis		Capsule; MRP and EF proteins; sulysin; OFS, enolase, SAO, adhesins.	Meningoencephalitis; septicemia and arthritis in pigs
S. porcinus	E, P, U, V	M protein; streptokinase	Porcine cervical lymphadenitis
S. canis	G	M protein; streptolysin O	Canine and feline metritis and vaginitis; neonatal bacteremia of kittens; lymphadenitis of juvenile cats, guinea pigs, and rats
S. uberis		Secreted antiphagocytic factor(s); casein receptor; hyaluronidase; CAMP-like *uberis* factor; mammary cell adhesin; plasminogen activator PauA; Mr scavenger MTuA	
S. pneumoniae	–	Capsular polysaccharide; neuraminidases; pneumolysin; autolysin; IgA protease; fibronectin binding proteins; peptide permeases; ZmpB metalloproteinase; choline binding proteins PsPA, LytA and CppA	Bronchiolitis and pneumonia in horses in training

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

La especie *Streptococcus dysgalactiae.* sub *equisimilis* se los ha encontrado en las vías respiratorias altas de los equinos, también en perros y gatos. En el equino se los ha identificado como causantes de diferentes patologías de la piel, aparato respiratorio, urogenital, y como causante de adenitis y paperas. También han sido señalados como causantes de aborto en la yegua debido a una fuerte infección uterina, de igual manera han ocasionado la presencia de abscesos de nódulos linfáticos [11, 12, 15].

Streptococcus equi con la subespecie *S. zooepidemicus* son bacterias patógenas oportunistas, de los equinos que aparecen después de una enfermedad debido a las bajas defensas del organismo animal. En el caso de los perros las investigaciones han demostrado que estos microorganismos han sido encontrados en una muestra de canino que presentaban problemas respiratorios y que convivían con caballos de establo con presencia de problemas respiratorios. Estas especies de bacterias encontradas en los animales han sido descritas que son zoonóticas, provocando un riesgo para la salud humana en la que pueden producir meningitis, y otras infecciones, las mismas que podrían ser transmitidas por las mascotas [12, 15,25].

2.1. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Las bacterias que forman parte de la microbiota nasofaríngea 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 [5, 18].

En la especie canina la identificación de la microbiota nasofaríngea y específicamente del estreptococo β hemolítico, permitirá estimar la implicancia de este microorganismo en patologías respiratorias e implementar tratamientos para prevenir la ocurrencia de dichas patología que comprometan la vida de los perros [17].

2.1.1. MEDIOS DE CULTIVOS BACTERIANO

Los medios de cultivo microbiológicos es muy valioso para aislar e identificar a las bacterias. Los medios de cultivos sólidos se clasifican en:

2.1.1.1. **Medios no selectivos**: Estos posibilitan el crecimiento de muchas especies diferentes de bacterias, pero no permiten el aislamiento de una sola especie bacteriana a partir de muestras propensas a la contaminación con un gran número de microorganismo comensales. Entre estos medios se encuentran el agar sangre y agar de chocolate [20, 28,29].

2.1.1.2. **Medios básicos:** Son medios ricos en nutrientes que permiten el crecimiento de la gran mayoría de las bacterias. Se utilizan en la siembra primaria de muestras clínicas como es más conocido es el agar sangre [8, 20, 28,29].

2.1.1.3. **Medios selectivos:** Ayudan en el aislamiento de las especies de importancia médica en presencia de especies comensales, mediante la adición de sustancias inhibidoras, sistemas indicadores y tampones que ayudan a la detección diferencial el más conocido es el agar MacConkey en que se usa para sembrar diferentes tipos de muestras

contaminadas como heces, orina y exudados genitourinarios. Las bacterias que crecen en este medio son los bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de la lactosa [8, 20, 28,29].

2.1.1.4. Medios de enriquecimiento: Están desarrollados para recuperar bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales. Se utilizan para bacterias que no crecen en medios básicos. Los más utilizados suelen ser medios líquidos como es el caldo de tioglicolato o el caldo cerebro corazón (BHI) [8, 20, 28,29].

2.1.1.5. Medios para prueba de sensibilidad antimicrobiana: Es un medio específico que se emplea para la susceptibilidad a los antibióticos que se puede probar. Esta línea de medios de cultivo se ha desarrollado de acuerdo con las directrices CLSI, para una precisión óptima en las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.

2.1.1.5.1. Agar Mueller Hinton

Este es un medio de cultivo recomendado para realizar la prueba de sensibilidad antimicrobiana, es muy utilizado en antibiograma en medio sólido debido a que presentan buena reproductividad en las pruebas de sensibilidad por su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente [42] .

Cuando se suplementa con sangre de cordero al 5% permite realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especie de estreptococos. También con el agregado de sangre puede utilizarse para el cultivo y aislamiento de microorganismo nutricionalmente exigente [42].

2.1.1. TINCIÓN DE GRAM

La tinción de Gram se la define como una técnica diferencial de gran ayuda en los estudios microbiológicos su fundamento principal que contiene dos colorantes principales que permite clasificar las bacterias en dos grupos: las Gram positivas y Gram negativas. Para realizar esta técnica se requiere de cuatros soluciones como primer colorante, seguido de solución mordiente, agente decolorante y por último un segundo colorante [21,23].

Uno de sus fundamentos de esta técnica se basan en las características de las paredes celulares de las bacterias que van a determinar las propiedades de los microorganismo. Las bacterias Gram positivas presentan una pared celular gruesa constituido por peptidoglicano en los que representa el 90% pero esta carece de membrana celular, en comparación de las bacterias Gram negativas que presentan una capa fina de peptidoglicano que presentan el 10% y si contiene una membrana celular externa. Es así que se define en la composición tintoriales de las bacterias en base de los peptidoglicano de las paredes celulares y a su composición química [23, 24].

Los pasos para realizar la tinción de Gram son:

1. Se toma una pequeña muestra del medio aislado y se diluye en agua destilada y colocarlo en un portaobjetos.
2. Después secamos la muestra al ambiente, se fija con el mechero
3. Colocar el colorante primario que es el cristal violeta que da la afinidad de la pared celular como es el peptidoglicano con un tiempo de 1 minuto
4. Seguidamente adicionamos el lugol que es elaborado a tintura de yodo esto nos sirve como un fijador al cristal violeta y esto se deja 1 minuto.
5. A continuación añadimos el alcohol –acetona en el cual lo que provocará es la deshidratación de la pared celular de las bacterias, es decir que las bacterias Gram positivas por contener una pared celular gruesa de peptidoglicano está resisten más y se pueden fijar en comparación de las Gram negativas que contiene una pared celular muy fina y esta se pierden y se le agrega enseguida agua para eliminar este mismo.
6. Después se coloca safranina es un colorante secundario que permite teñir de las bacterias que no pudieron retener el cristal violeta [20].

Esta técnica sirve para muestras como son los líquidos estériles, abscesos, hisopados, biopsias y los crecimientos de las colonias aisladas en los medios de cultivos. Para identificar los Gram positivos de los Gram negativos se da por la coloración en que los positivos se dan una coloración de azul oscuro o morado y los negativos se torna de color rosa o roja [20].

2.1.2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias de objeto de identificación. Algunas son rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48 horas [20].

2.1.2.1. Prueba de la catalasa

La prueba de la catalasa consiste en identificar a las bacterias por la producción o no de una enzima compuesta químicamente por hemoproteina muy particular a la hemoglobina. En que las mayorías de las bacterias aerobias y anaerobias pueden tener actividad facultativa a la catalasa. Este método se emplea cuando existe la presencia de esta enzima que es la que realiza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua [15, 23,24]. Para realizar el método se toma una pequeña muestra del medio de cultivo aislado y se coloca en una caja Petri sobre la muestra se coloca dos gotas de agua oxigenada. Es positiva si hay aparición de burbujas de gas, debido a que algunas bacterias presentan la enzima. En cambio que si no hay burbujeos o es muy escasa es negativo a la catalasa [23,28].Entre las bacterias catalasa negativo se encuentra los *Streptococcus* y los *Enterococcus* y los cocos catalasa positivos son los *Micrococcaceae* [29].

2.1.2.2. Prueba de oxidasa

El método de oxidasa es una técnica microbiológica que se caracteriza para realizar la presencia de esta misma enzima que es la oxidasa que algunas bacterias aeróbicos facultativos pueden contener como son los microaerófilas como el *Vibrio fetus*, en cambio de las bacterias anaeróbicas carecen de esta enzima [29].

La producción de la oxidasa se debe a la reacción del sistema de citocromooxidasa que es activado en la oxidación del citocromo que es provocado por la reducción del oxígeno molecular que se convierte en agua o peróxido de hidrógeno que es según la especie bacteriana específica [29].

2.1.2.3. Prueba del PYR

La prueba del PYR es una de las más rápidas y de fácil uso en el que se basan en la identificación de la enzima llamada l- pirrolidonil arilamidasa (PYRasa) en que ciertas bacterias poseen estas enzimas y a la vez para la identificación de *S. pyogenes* y de los Enterococcus. Cuando se realiza esta prueba a los microorganismos hidrolizan al sustrato que están en el disco en forma rápida provocando la liberación del grupo pirrólico en conjunto con el reactivo cinamaldehido tonándose un color de rosado-rojizo [36].

Se utiliza esta prueba en el momento de haberse realizado ya el aislamiento bacteriano en un medio puro y que estos seas cocos Gram positivos y con catalasas negativas. Para poder interpretar el resultado de que si es positivo es porque si hay la presencia o hubo la actividad enzimática de la pirrolidona arilamidasa en el que el color del disco se tornara de color rosado o rojo. En cambio sí es negativo es porque no hubo la actividad enzimática y por lo tanto la ausencia de esta actividad el color del disco se tornara de color amarillo o incoloro [36, 37].

2.1.2.4. Bilis Esculina

Es un medio selectivo y diferencial se usa preferentemente para diferenciar entre *Enterococcus* y *Streptococcus* del grupo D. Las sales biliares son el ingrediente selectivo, mientras que la esculina es el componente diferencial. Los *Enterococcus* hidrolizan la esculina en unos subproductos que reaccionan con el citrato férrico que contiene el medio, produciendo sales insolubles de hierro que resultan en un ennegrecimiento del medio. En algunos casos, ciertas bacterias son capaces de hidrolizar la esculina. Una placa que contenga esculina aparecerá fluorescente bajo luz ultravioleta. Algunas bacterias pueden hidrolizar, produciendo colonias oscuras bajo luz ultravioleta, al contrario que las claras. Los resultados del test deben ser interpretados junto a una morfología de tinción de Gram [36, 38].

2.1.2.5. Fermentación de azúcares

Es una prueba que indica del tipo de metabolismo energético: respiratorio (O) o fermentador (F). Se suele utilizar glucosa como sustrato. Se detecta la acumulación de ácidos con un indicador ácido-base (azul de bromotimol). La bacteria se inocula con el hilo recto (por

picadura) y se incuba en condiciones de aerobiosis (sin parafina) y de anaerobiosis (con parafina, tubo cerrado), simultáneamente [43].

Las bacterias que respiran aeróbicamente crecen en la superficie del medio del tubo abierto. Transforman la glucosa en CO_2, la superficie del medio se verá ligeramente amarilla (por la formación de ácido carbónico originado al reaccionar el CO_2 con el agua del medio). En el tubo cerrado el cultivo se mantiene azul-verdoso. Las bacterias fermentadoras producen ácidos a partir de la glucosa. Viran el cultivo del tubo cerrado a amarillo; en el tubo abierto se inicia el viraje en el fondo, pero transcurridas 24 horas los ácidos pueden difundir por todo el medio virándolo a amarillo [43].

2.1.3. PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN LÁTEX (STREPTEX GROUPING)

Esta es una prueba de aglutinación en látex que proporciona un método rápido de identificación serológica de los estreptococos pertenecientes al grupo de Lancefield A, B, C, D, F y G a partir de placas de cultivos primarios. Los materiales suministrado son para uso diagnóstico in vitro y facilita un grupaje rápido de los estreptococos [26].

Los reactivos que se usan para esta prueba están diseñados para producir una aglutinación positivas con una o cuatro colonias de un cultivo de 18 a 24 horas en la mayoría de las colonias de aislados de estreptococo β-hemolíticos [28].

2.1.4. SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Es una de las pruebas fundamentales que se realiza para la identificación de los microorganismos mediante la sensibilidad antimicrobiana tanto en bacterias, como en hongos, que permite identificar qué antibiótico es el adecuado para ciertos microorganismo de acuerdo a las normas bajos y en la estandarización de los laboratorios [23].

Para reconocer la sensibilidad antimicrobiana se trata de colocar unos discos de papel en el medio de la placa de agar sembrado previamente con el microorganismo que desea analizar, si el microorganismo es sensible a esta prueba lo que provocaría es una inhibición de crecimiento alrededor de los discos y dejando actuar en 18 horas de incubación en el cual según de la extensión de la susceptibilidad que haya sufrido el microorganismo determina si haya sufrido la a dicha actividad mencionada anteriormente [23].

2.3.5.1 PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO

Esta es una prueba que consiste en la sensibilidad antimicrobiana de las bacterias que tienen un rápido crecimiento patológico, sobre una placa consiste en colocar varios antibióticos para determinar el ideal para dicho proceso infeccioso. Es muy importante en microbiología porque se trata de realizar esta prueba en casos de reportes epidemiológicos de resistencia y de en los estudios de los agentes antimicrobianos. Estos discos se han desarrollado para una interpretación adecuada de los resultados que sirve de apoyo para los laboratorios clínicos [40].

Tabla 2: Sensibilidad antimicrobiana por difusión en disco

Antibióticos	S	I	R
Penicilina	>28	20-22	≤ 19
Eritromicina	>21	16-20	≤ 15
Tetraciclina	>23	19-22	≤ 18

Tabla tomada CLSI. S= sensible; I= intermedio; R= resistente

2.3.5.2.CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

El CMI es la dilución más baja de los antimicrobianos esto inhibe el crecimiento del microorganismo después de su incubación, es importante para poder confirmar la resistencia de los microorganismo a un agente antimicrobiano. Estos se determinan mediante métodos de microdilución en caldo siguiendo las directrices de centro de referencias tales como el CLSI (Clinical Laboratory Institute Standards). Esta técnica es sencilla y eficaz es por medio el E-test y se basa en una gradiente decreciente de concentración de droga en una matriz de plástico. Al igual que en cualquiera de los otros métodos, la cepa debe encontrarse en una concentración estandarizada, se coloca en forma confluente sobre un medio de cultivo (agar sangre o agar chocolate con una base de Mueller Hinton) y luego asépticamente se coloca una tira de Etest que contiene un antibiótico determinado y luego de un periodo de incubación de 24 horas máximo, se lee la CMI y será aquella que se encuentra sobre el punto de inserción de la elipse formada por la difusión del antibiótico, desde la tira plástica [41].

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Materiales Biológicos

- Medios de Stuart
- Agar de sangre
- Agar de tripticasa de soya
- Medio selectivo de EMB
- Caldo Nutritivo
- Medios de Mueller Hinton
- Medios selectivo de estreptococo

3.1.2. Materiales de vidrio

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Cajas de Petri
- Vaso de precipitación
- Tubos de ensayos
- Erlenmeyer

3.1.3. Materiales de protección

- Guantes
- Mascarillas
- Mandil

3.1.4. Test microbiológicos

- Test de oxidasa
- Test de catalasa
- Disco de antibiograma
- Kits de estreptococos

3.1.5. Equipos de laboratorio

- Autoclave

- Estufa
- Mechero de Bunsen
- Asas de Drigalski.
- Balanza
- Microscopio
- Baño María

3.1.6. Otros

- Alcohol
- Agua oxigenada
- Agua destilada
- Papel de aluminio
- Rollo de papel desechable
- Cajas de fósforos
- Fundas plásticas desechables
- Cajas plásticas
- Etiquetas
- Lápiz de marcación de vidrios
- Algodón
- Tubos de eppendorf

3.2. MÉTODOS

Se utilizaron 25 perros (Mestizos, Gran Danés, Frensh Poodle, Pequines, Chihuahua, Labrador, Doberman Miniatura, Pitbull, Shitzut) de las 3 diferentes clínicas de la Ciudad de Machala, de entre de un mes y medio hasta los 16 años, con signos clínicos de patologías respiratorias.

Con un hisopo se tomó la muestra a nivel de la entrada nasofaríngea y en las fosas nasales. Los hisopos obtenidos fueron colocados en medios de transporte de Stuart los mismos se conservaron a 4ºC y remitidos al laboratorio para su procesamiento.

3.2.1. Procesamiento de la muestra

Los hisopados nasofaríngeos fueron sembrados en los siguientes medios de cultivos: enriquecidos (agar de sangre) y simple agar Tripticasa de Soya. Las placas se incubaron entre 24 y 48 horas en aerobiosis de 37ºC.

Para la identificación bacteriana se realizó estudio macroscópico observándose la forma, tamaño y aspectos de las colonias así como a la producción de hemólisis. Posteriormente se realizó la coloración de Gram y el estudio microscópico de la bacteria.

Los cocos Gram positivos se replicaron en agar de sangre para obtener un cultivo puro, a partir de la cual se realizó la prueba de la catalasa. Para realizar esta prueba se tomaron 5 colonias, se depositaron en portaobjetos, seguidamente se colocó sobre las colonias una gota de peróxido de hidrógeno.

Con los cocos catalasa negativos se procedió a determinar el grupo serológico Lancefield (A, B, C, D, F y G) con la prueba de aglutinación de látex Streptex® Grouping (Oxoid)

Para la identificación del grupo serológico Lancefield (A, B, C, D, F y G) se determinó a partir de los medios frescos por una prueba de aglutinación de látex de la siguiente manera: en una cámara de flujo laminar se disolvió la enzima en agua destilada, posteriormente se tomaron 400 um de la solución y fueron puestos en cada tubo eppendorf, en los que se agregaron 5 colonias de cultivo puro. Los tubos eppendorf se llevaron a incubación a baño María a 37ºC durante 10 min, después de 5 min de incubación se procedió agitar la muestra. Posteriormente en las tarjetas de las pruebas serológicas se agregó un micropipeta una gota de esta solución sobre la cual se puso una gota de streptex látex, posteriormente con un palillo de madera se distribuyó la mezcla en el centro del disco de cada círculo de la tarjeta. Para observar la reacción de aglutinación se esperó 30 a 60 segundos

La sensibilidad antimicrobiana se la realizó mediante la prueba de difusión en disco según las normas del CLSI, de la siguiente manera:

Del cultivo puro se tomaron 10 colonias y se suspendieron en 2ml de solución fisiológica en un tubo de ensayo. Para la turbidez de la suspensión se ajustó hasta 0,5 de la escala McFarland, la que fue observada en una línea que se trazó en la pared, 15 minutos después de

haber ajustado la turbidez de la suspensión del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en el tubo. Este fue presionado contra la pared del tubo para eliminar el exceso de suspensión el mismo que fue frotado sobre la superficie de una placa de agar Mueller –Hinton sangre. Este procedimiento es rayado por dos o más del hisopo sobre toda la superficie, se fue rotando la placa aproximadamente 60º C cada vez para asegurar una distribución constante del inóculo. Se colocó sobre la placa disco con los siguientes antibiótico que fue penicilina, tetraciclina, eritromicina.

Las bacterias Gram negativos se les realizó la prueba de la oxidasa. Se tomó una porción de cinta de oxidasa y se puso sobre ella 5 colonias de bacterias y se les agregó solución fisiológica. A las bacterias oxidasa negativa se las sembró en medios selectivos EMB (Eosin Methylene Blue Agar) y MAC CONKEY para Enterobacterias. Posteriormente fueron identificados los géneros por la forma y tamaño de las colonias de acuerdo al medio selectivo.

IV. RESULTADOS

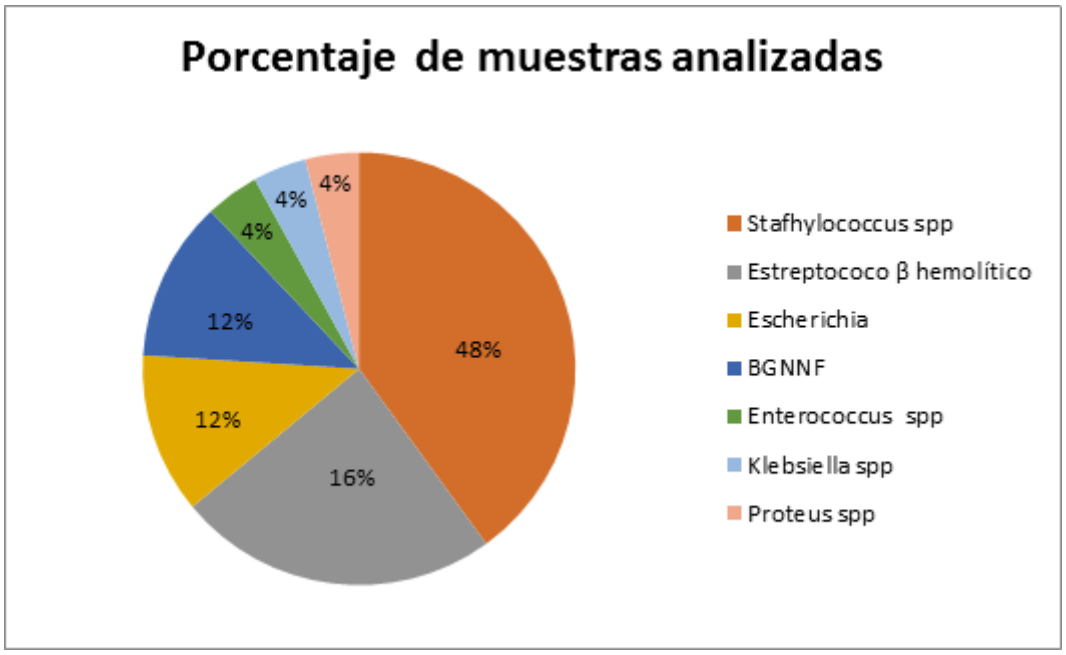
De 25 perros que fueron examinados en las tres clínicas de Machala se obtuvo los siguientes resultados:

De las bacterias aisladas se pudieron identificar: cocos positivos y catalasa positivos; a este grupo pertenecen los Estafilococos; en segundo lugar se encontraron los estreptococo β hemolítico.

Los géneros *Escherichia, Proteus* spp*, Enterococcus* spp y *Klebsiella* spp se encontraron en menor porcentaje y finalmente se aislaron bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) con porcentajes similares.

Tabla 3**: Porcentaje de bacterias encontradas en los hisopados de la nasofaringe de perros con patologías respiratorias.**

Bacterias	**Número de muestras analizadas**	**Porcentaje**
Staphylococcus spp	12	48 %
Estreptococo β hemolítico	4	16 %
Escherichia	3	12%
BGNNF	3	12 %
Enterococcus spp	1	4 %
Klebsiella spp	1	4 %
Proteus spp	1	4 %
TOTAL	**25**	**100 %**



Las 4 muestras de la que se aislaron los estreptococo β hemolítico tuvieron la prueba serológica de aglutinación y dieron 3 positivo al grupo G de Lancefield al que pertenece al *Streptococcus canis*, mientras que no hubo reacción de la prueba de aglutinación de látex de grupo serológico C de Lancefield que corresponde al *S. dysgalactiae* y en la prueba de aglutinación de látex del grupo serológico D de Lancefield dio 1 positivo que corresponde a Enterococos.

Tabla 4. Estreptococcus β hemolítico aislados de la nasofaringe de perros con patologías respiratorias.

Resultados obtenidos de las 4 muestras positivas a estreptococos β hemolítico realizados por la prueba serológica de aglutinación de látex (Streptex Grouping)		
Grupo serológico	**Estreptococos β hemolítico**	**Resultados**
Grupo G	*Streptococcus canis*	3
Grupo D	*Enterococcus*	1
Grupo C	*Streptococcus dysgalactiae*	0
TOTAL		**4**

Los porcentajes representados a continuación pertenecen a las clínicas Veterinarias donde se obtuvieron las muestras. En la clínica Veterinaria "Animal Happy" se obtuvo 48%, en comparación con UTMachala donde se obtuvo un 16%; presentando menor cantidad de muestras recolectadas.

En relación con los resultados positivos se obtuvo un 16% del total de las muestras recolectadas. Mientras en los casos negativos se obtuvo un 84%.

A continuación, si el valor de $P < 0,05$ en el análisis estadístico representaría una diferencia significativa; sin embargo en la presente investigación el Chi cuadrado fue superior de 0,817 indicativo que en donde se haya recogido la muestra no presenta diferencia significativa, por lo cual el Estreptococos β –hemolítico se puede presentar en cualquier de las clínicas estudiadas.

Clínicas Veterinarias					
		Frecuencia	**Porcentaje**	**Porcentaje válido**	**Porcentaje acumulado**
Válido	Pets_Salud	9	36,0	36,0	36,0
	Animal_Happy	12	48,0	48,0	84,0
	UTMachala	4	16,0	16,0	100,0
	Total	25	100,0	100,0	

Resultados					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Negativo	21	84,0	84,0	84,0
	positivo	4	16,0	16,0	100,0
	Total	25	100,0	100,0	

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	,405[a]	2	,817
Razón de verosimilitud	,392	2	,822
Asociación lineal por lineal	,381	1	,537
N de casos válidos	25		
a. 4 casillas (66,7%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,64.			

En este cuadro indica la sensibilidad antimicrobiana realizada en difusión en disco, que el *Streptococcus canis* es sensible a la penicilina según la norma del CLSI tuvo una medición del diámetro de 35mm, así como la eritromicina con un diámetro de 30mm y con una sensibilidad intermedia a la tetraciclina con un diámetro de 20mm.

Tabla 6. Sensibilidad antimicrobiana realizada por difusión en disco en *Streptococcus canis*.

Antibióticos	**Sensible**	**Sensibilidad Intermedia**	**Resistente**
Penicilina	35 mm	--	--
Eritromicina	30 mm	--	--
Tetraciclina	--	20 mm	--

V. DISCUSIÓN

En este trabajo investigativo se encontraron estreptococos β hemolíticos en las vías respiratorias altas de los perros, concordando con algunos autores que aislaron estos microorganismos en hisopados nasofaríngeo [4, 12, 13, 19].

Los estreptococos β hemolíticos que se encontraron en este trabajo, reaccionaron a la prueba de aglutinación (Streptex), al grupo serológico G de Lancefield que pertenece al *Streptococcus canis,* concordando con Lopardo, Ruvinsky y Bologna [19] que también aislaron a estos estreptococos en hisopados nasofaríngeo y tracto reproductivo en perros. A diferencia de Guerrero [10] que aisló este microorganismo solamente en el tracto reproductivo.

Con la prueba de aglutinación látex Streptex realizado en este trabajo no se identificó grupo serológico C de Lancefield al que pertenece *Streptococcus dysgalactiae*, a diferencia de lo encontrado por otros autores que aislaron a este microorganismo en los hisopados faríngeos de los perros, humanos y en caballos [22, 19].

En la prueba de la sensibilidad antimicrobiana, por el método de difusión en disco el *Streptococcus canis* presentó sensibilidad a la penicilina y a la eritromicina y una sensibilidad intermedia a la tetraciclina, concordando con otros autores que realizaron este dicho método en estos microorganismos [10,19, 28, 29,31]

VI. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

Los estreptococos β hemolíticos, especialmente el *Streptococcus canis* se encuentra en la microbiota oronasal de los perros

Los estreptococos β hemolíticos pueden ser los responsables directos e indirectos de las enfermedades respiratorias.

Los betalactámicos y macrólidos son ideales para el tratamiento de problemas respiratorios causados por los estreptococos β hemolíticos.

Se recomendaría realizar pruebas serológicas en los que pacientes con patologías respiratorias, para llevar un tratamiento adecuado.

Se recomienda realizar reconocimiento del estreptococo β hemolíticos con muestras de piel, orina, conjuntiva entre otros.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aldunate A. Revisión Bibliográfica del Complejo Respiratorio en Especies Menores [Internet]. Santiago; 2015. [actualizado Julio 2015; citado el 26 de Julio 2017].

Disponible en:
https://www.researchgate.net/profile/Andres_Aldunate/publication/279935848_Revision_Bibliografica_del_Complejo_Respiratorio_en_Especies_Menores/links/559eaa0b08ae99dba5990e71/Revision-Bibliografica-del-Complejo-Respiratorio-en-Especies-Menores.pdf

2. López Mayagoitia, A. Patologias del Sistema Respiratorio *Notas Respiratorias*. [Internet]. 2006 citado [26 de Julio de 2017].
Disponible en:http://people.upei.ca/lópez/tecamac/Notas Respiratorio Tecamac.pdf

3. Cerro Reyes, J. E. Susceptibilidad antimicrobiana de la microbiota bacteriana de la cavidad oral en el perro doméstico. *Bitstream* [Internet]. 2012[citado 27 de Julio 2017].

Disponible en:
http://152.74.96.159:8080/jspui/bitstream/123456789/70/1/cerro_j_2012_portada.pdf

4. Riquelme Sanhueza, D. V. Microflora bacteriana de la cavidad oral de perros y su potencial riesgo en la salud pública. *Bitstream* [Internet]. *2012* [citado 27 de Julio 2017]

Disponible en: http://152.74.96.159:8080/jspui/handle/123456789/92

5. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. ScienceDirect [Internet]. 2011[citado 27 de Julio 2017]; 29(8):601–8.

Disponible en:
http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-metodos-identificacion-bacteriana-el-laboratorio-S0213005X11001571

6. Azogue D. Evaluación de Eugenol (Extracto de clavo de olor) como limpiador bucal natural en caninos en la Clínica Veterinaria Patitas Traviesas en la Parroquia de Machachi Cantón Mejía.*Bitstream*. [Internet]. *2012* [citado 27 de Julio 2017]
Disponible: http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2846/1/T-UTC-00370.pdf

7. Muñoz, L., Fredes, F., Faundez, P., Sanz, L., & González, C. Tos crónica en un perro asociada a Filaroides osleri. *Scielo* [Internet].*2007* [citado 28 de Julio 2017]. *62*(1-2).
Disponible en:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-77122007000100012

8. Stanchi, N. O. (P. E. Martino, E. Gentilini, E. H. Reinoso, M. G. Echeverría , N. A. Leardini, & J. A. Copes , Edits.) *Microbiología Veterinaria.* Buenos Aires, Argentina: Inter-médica; 2007.

9. Vadillo Machota, S., Píriz Durán, S., & Mateos Yanes, E. *Manual de microbiología Veterinaria* (Primera ed.). Madrid, España: McGRAW-HILL/ INTERAMERICANA;2003.

10. Guerrero A. Sepsis y muertes neonatales asociadas a Estreptococos B- hemolítico en caninos.Bitstream. [Internet]. 2016 [citado 26 de Julio 2017].

Disponible en:
http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/4175/1/T-SENESCYT-01458.pdf

11. Preziuso S, Laus F, Tejeda AR, Valente C, Cuteri V. Detection of Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis in equine nasopharyngeal swabs by PCR. ScienceDirect [Internet]. 2010[citado 29 de Julio 2017]; 11(1):67–72.

Disponible en:

https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=798e86ed-793f-4c1f-4d20-f99da08b138e&documentId=62449c39-c498-3317-9fef-41691091cfe2

12. Acke E, Midwinter A, Lawrence K, Gordon S, Moore S, Rasiah I, et al. Prevalence of Estreptococos dysgalactiae subsp. equisimilis and S. equi subsp. zooepidemicus in a sample of healthy dogs, cats and horses. Pubmed [Internet]. 2015 [citado 26 de Julio 2017]; 169: 1–19.

Disponible en: http://www.tandfonline.com/loi/tnzv20

13. Akineden Ö, Hassan AA, Alber J, El-Sayed A, EstoepangestieATS, Lämmler C, et al. Phenotypic and genotypic properties of Streptococcus equi subsp. zooepidemicus isolated from harbor seals (Phocavitulina) from the German North Sea during the phocine distemper outbreak in 2002. Vet Microbiol [Internet]. 2005 [citado 26 de Julio 2017]; 110(1):47–52.

Disponible en:
https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=58f0aa4e-c3f8-1029-4f65-3855cde738d6&documentId=9ffa4ed0-86fb-3e5b-8f1f-aca9ef5318f1

14. Culqui U, Van Der Sluis L, Anton A, Comas B. Revista de Saúde Pública. Redalyc. 2014; 48(2):322–5.

Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67237024015

15. Eason MM, Fan X. The role and regulation of catalase in respiratory tract opportunistic bacterial pathogens The Role and Regulation of Catalase in Respiratory Tract Opportunistic Bacterial Pathogens Keywords: Respiratory Opportunistic Pathogen Catalase Reactive Oxygen Species. ScienceDirect [Internet]. 2014; [citado 27 de Julio 2017].

Disponible en:

http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401014000990?via%3Dihub

16. Gobbetti M, Calasso M. Statistical Evaluation of Microbiological Results see Sampling Plans on Microbiological Criteria. ScienceDirect [Internet]. 2014 [citado 27 de Julio 2017]; 3:(21)17–27.

Disponible en:
https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=09806fd8-af7f-55e9-789b-2cbe3c5876b6&documentId=07ef0c70-2ff9-3173-b8ae-6e267330cbf5

17. Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals: Fourth Edition [Internet]. Fourth. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals: Fourth Edition. USA: WILEY-BLACKWELL; 2010. 51-67 p.

Disponible en:
https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=55def274-aba0-bb27-6561-ae4b244c3ade&documentId=87d5b895-7b91-3441-899b-379c1f2b4ff4

18. Janda WM. The Genus Streptococcus - Part II: New Species and Pathogens in the " Miscellaneous " Streptococci and " Viridans " Streptococci Groups. ScienceDirect [Internet]. 2014[citado 28 de Julio 2017]; 36(21).

Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196439914000725

19. Lopardo DH, Ruvinsky S, Bologna R. FARINGITIS POR ESTREPTOCOCOS DE LOS GRUPOS C Y G: SE TRATAN O NO SE TRATAN. Med Infant. 2014; 21(1).

Disponible en:
http://www.medicinainfantil.org.ar/images/stories/volumen/2014/xxi_1_037.pdf

20. López-Jácome L, Hernández M, Colín- Castro A, Ortega S, Cerón G, Franco R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Medigraphic [Internet]. 2014[citado 28 de Julio 2017]; 3(1):8-10.

Disponible en: http://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2014/ir141b.pdf

21. Margareta Muhlhauser Dra P, Lina Rivas Tm J. Laboratorio de microbiología: conocimientos básicos para un clínico. ScienceDirect [Internet]. 2014[citado 29 de Julio 2017];25(3):569-579

Disponible en: https://www.clinicalascondes.cl/Dev_CLC/media/Imagenes/PDF revista médica/2014/3 abril/19-Dra.Mulhauser.pdf

22. Rantala S. Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis bacteremia: An emerging infection. Pubmed [Internet]. 2014[citado 29 de Julio 2017]; 33(8):1303–1310.

Disponible en:
https://sci-hub.cc/https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10096-014-2092-0

23. Moreno V, Albarracín J H. Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. Reduca (Biología) Ser Microbiol Reduca (Biología) Ser Microbiol [Internet]. 2012. [citado 29 de Julio 2017]; 5(55):79–93.

Disponible en: http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/963

24. Serra B, Zhang J, Morales MD, de Prada AGV, Reviejo AJ, Pingarrón JM. A rapid method for detection of catalase-positive and catalase-negative bacteria based on monitoring of hydrogen peroxide evolution at a composite peroxidase biosensor. ScienceDirect [Internet]. 2008; citado 29 de Julio 2017.

Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914008000490

25. Zaoutis T, Schneider B, Moore LS, Klein JD. Antibiotic susceptibilities of group C and group G streptococci isolated from patients with invasive infections: Evidence of vancomycin tolerance among group G serotypes. Pubmed [Internet]. 1999[citado 29 de Julio 2017]; 37(10):3380–3383.

Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC85574/

26. Nieto S, Antonio J, Collaborative N, Bacteria R. Molecular characterization of invasive Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis. Multicenter study : Redalyc [Internet]. 2016 [citado 05 de Agosto 2017]; 48(4):279–289.

Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213049175004

27. Rodrigo V, Reyes V, Gilberto M, Ávila F, Gómez A, Balandrano P. Tratamiento de heridas por mordeduras de perro en región cráneo facial Treatment of craniofacial región wounds caused by dog bite. Medigraphic [Internet]. 2013[citado 05 de Agosto 2017]; 17(4):247–55.
Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/S1870-199X(13)72044-5

28. Zendejas-Manzo GS, Avalos-Flores H, Soto-Padilla MY. Microbiología general de Staphylococcus Aureus : Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Medigraphic [Internet]. 2014[citado 05 de Agosto 2017]; 25(3):129–143.
Disponible en: http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf

29. Antonio J, Nieto S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Carcenado ECR, editor. Madrid; 2010. 5-6 p.
Disponible en:
https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/38982382/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1502735050&Si

gnature=4sa8uuzmm8GZ9G9CVck75%2BmBYj0%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DSeimc-procedimientomicrobiologia37.pdf

30. Audisio S.A; Vaquero P.G. Reparación de un defecto nasal amplio en un canino mediante empleo del pabellón auricular Nasal canine defect resolution by means of a flapobtained from the patient's ear. Revet. 2012[citado 05 de Agosto 2017]; 14(1):142–147.
Disponible en: http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/v14n1a12audisio.pdf

31. Barrientos Sánchez S, Serna Varona FS, Díez H, Rodriguez Ciodaro A. Resistencia a la amoxicilina de cepas de Streptococcus mutans aisladas de individuos con antibioticoterapia previa y sin esta / Amoxicillin Resistance of Streptococcus mutans Isolated from Individuals with and without Antibiotic Therapy. Redalyc [Internet]. 2015 [citado 12 de Agosto 2017]; 34(72):101–106.
Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231242734012

32. Mengarelli R.H, Cevallos MV. Heridas agudas y crónicas causadas por picaduras y mordeduras de animales. Scielo [Internet]. 2014 [citado 10 de Agosto 2017]; 95(1):1–3.
Disponible en:
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1851300X2014000100010&script=sci_arttext&tlng=en

33. Velásquez Reyes V. R; Flores Ávila M. G; Gómez A; Pedroso B. Tratamiento de heridas por mordeduras de perro en región craneofacial. ScienceDirect. [Internet]. 2013 [citado 10 de Agosto 2017]; 17(4):247-255
Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1870199X13720445

34. Traverso F, Blanco A, Villalón P, Beratz N, Sáez Nieto JA, Lopardo H. Molecular characterization of invasive Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis. Multicenter study: Argentina 2011- 2012. Redalyc. [Internet].2016[citado 12 de Agosto 2017];48(4): 279-289.

Disponible en:http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213049175004

35. Bustos C P, Muñoz A J, Guida N. Capsule expression in isolates of Streptococcus equi subsp. Equi. Redalyc. [Internet].2015 [citado 12 de Agosto 2017]; 47(4): 380-381
Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213050075015

36. Medell M, Hart M, Batista M. Sensibilidad antimicrobiana in vitro en aislamientos de Enterococcus faecalis y Enterococcus faecium obtenidos de pacientes hospitalizados. Scielo. [Internet].2014 [citado 15 de Agosto 2017];34 (1): 50-70
Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v34s1/v34s1a07.pdf

37. Amaiz García AM, Venero SC, Negueruela García B. Infecciones por estreptococo. ScienceDirect. [Internet].2014 [citado 15 de Agosto 2017]; 11(59): 3463-3476.
Disponible en:http://www.sciencedirect.com.sci-hub.io/science/article/pii/S0304541214708029

38. Salazar L C. Bacterias anaerobias. Redalyc[Internet].2013 [citado 15 de Agosto 2017]; 4(1): 56-60
Disponible en:
https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/hm/article/view/20104/16977

39. Kerdsin A, Hatrongjit R, Hamada S, Akeda Y. Development of a multiplex PCR for identi fi cation of b -hemolytic streptococci relevant to human infections and serotype distribution of invasive Streptococcus agalactiae in Thailand. ScienceDirect [Internet]. 2017; 5–9.
Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2017.06.007

40. Pratt M, Soledad. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN EN AGAR. ISP [Internet].2004[citado 17 de Agosto 2017]; 12-18
Disponible en: http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf

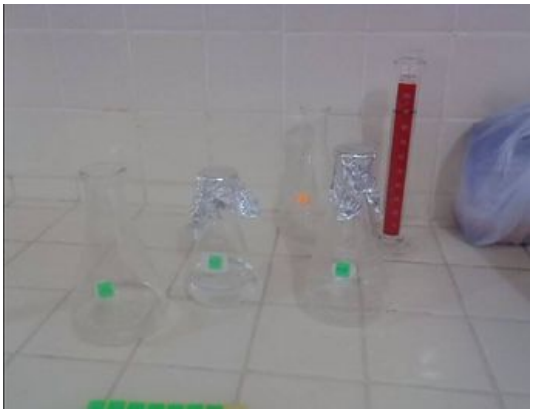
41. Herrera H, MC. Interpretación de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Scielo [Internet]. 2004 [citado 20 de Agosto 2017] 39(1): 2-6
Disponible en:
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462004000100007

42. Britania [Internet].Argentina: Britania; 2015 [actualizado en Febrero 2015; citado 19 de Agosto 2017].
Disponible en:
http://www.britanialab.com/productos/B23137%20REV%2001-MUELLER%20HINTON%20AGAR.pdf

43. Rivas N. Prueba Oxidación- fermentación (OF).Microbiologia para bioanalisis. [Internet]. 2012 [citado 20 de Agosto 2017] 2-4
Disponible en:
http://microbiologiabioanalisis.blogspot.com/2012/07/prueba-oxidacion-fermentacion-of.html

VIII. ANEXOS

ANEXO1. Preparación de los materiales y esterilización



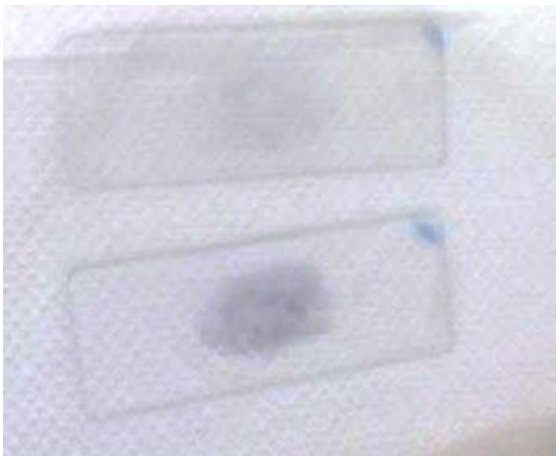
ANEXO 2: Preparación de los medios de cultivos para las siembras de bacterias

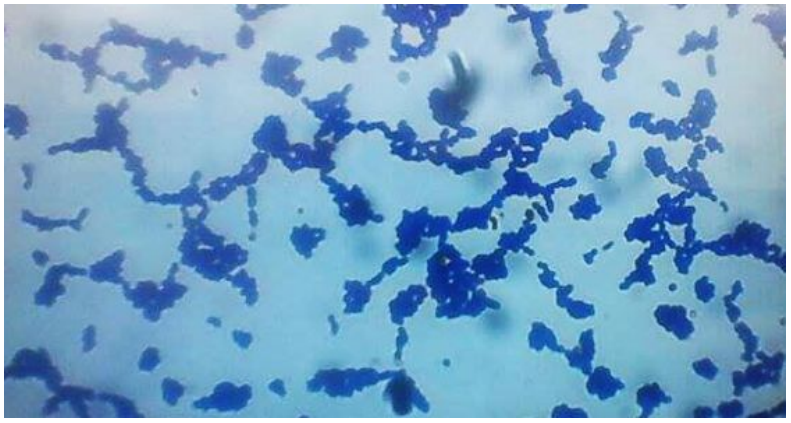
ANEXO 3: Recolección de las muestras por hisopados en perros

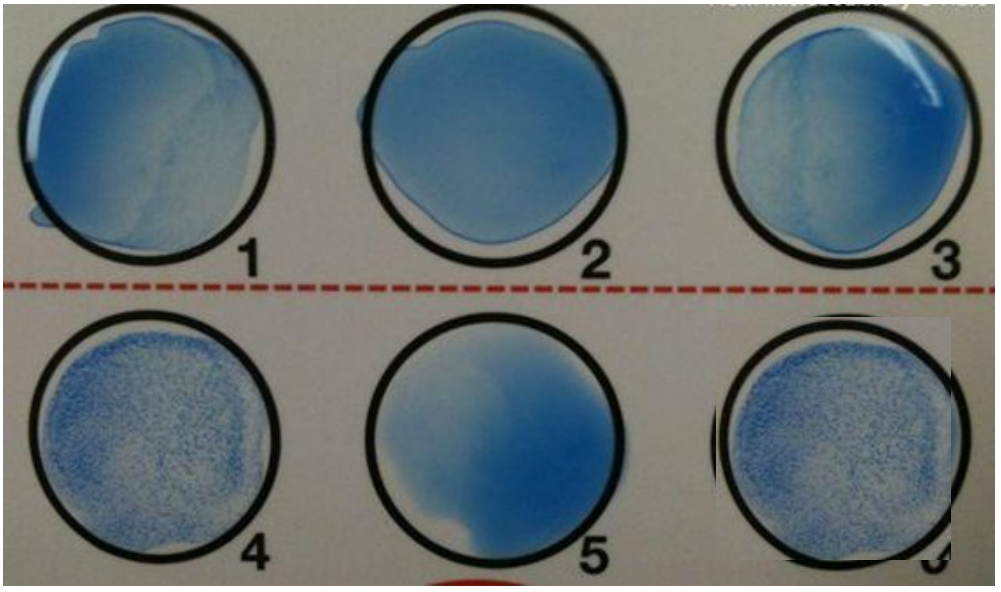
ANEXO 4 Siembras de las muestras obtenidas en la Clínica

ANEXO 5 Placas sembrados en el agar de sangre

Anexo 6 Tinciones de Gram para observación al microscopio





ANEXO 7 Kits para prueba de serología

Anexo 8 Kits para serología