

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Identificación fenotípica y detección del gen *mecA* en cepas de *Staphylococcus sp.* resistentes a meticilina obtenidas de caninos.

por:

Camila CIUFFO DUQUE

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias.

Orientación: Higiene, Inspección, Control y Tecnología de los Alimentos de Origen Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO

URUGUAY

2019

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente:

Dra. Laureana de Brun

Segundo miembro (Tutor):

Lic. MSc. Leticia Diana

Tercer miembro:

Dr. Kevin Yaneselli

Fecha de aprobación:

4 de julio de 2019

Autor:

Camila Ciuffo Duque

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Leticia Diana, por su apoyo y disposición siempre, enseñándome y ayudándome en mi formación profesional, sos una excelente docente y persona.

A mi familia, por ser incondicionales siempre y por el apoyo brindado desde el comienzo de esta carrera.

A mi novio y su familia por impulsarme siempre a seguir.

A mis amigas de toda la vida, que estuvieron presentes en todos los momentos.

A la CSIC- CIDEC por financiar parte de este trabajo con la aprobación de un Proyecto (Análisis de la presencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) y *Staphylococcus pseudintermedius* meticilino resistente (MRSP) mediante identificación genotípica y detección del gen *mecA* en pacientes caninos de Montevideo)

A la Facultad de Veterinaria por abrirme las puertas a esta carrera y especialmente al departamento de Microbiología por permitirme realizar esta experiencia.

TABLA DE CONTENIDOS

1. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS:.....	6
Tablas:.....	6
Figuras:.....	6
2. RESUMEN:.....	8
3. SUMMARY:.....	9
4. INTRODUCCIÓN:.....	10
5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:.....	13
5.1. El género <i>Staphylococcus</i>	13
5.2. Resistencia antimicrobiana:.....	15
5.3. Tipos de antimicrobianos.....	17
5.4. Antimicrobianos en Medicina Veterinaria.....	18
5.5. Resistencia en el género <i>Staphylococcus</i>	19
5.6. Genética de la resistencia a la meticilina, gen <i>mecA</i>	20
5.7. Importancia de la resistencia a los antimicrobianos para la salud pública.....	20
5.8. Vigilancia a nivel global.....	21
5.9. Plan Nacional de contención de la Resistencia Antimicrobiana de Uruguay.....	21
6. HIPÓTESIS.....	22
7. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	22
7.1. Objetivo general.....	22
7.2. Objetivos específicos.....	22
8. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	23
8.1. Recolección de muestras:.....	23
8.2. Aislamiento bacteriano e identificación fenotípica de las cepas:.....	23
8.3. Test de susceptibilidad a antimicrobianos:.....	25
8.4. Extracción del ADN genómico:.....	26
8.5. Detección del gen <i>mecA</i> por PCR en aislamientos con fenotipo resistente:.....	26
8.6. Generación del cepario y conservación de las cepas:.....	27
9. RESULTADOS:.....	28
9.1. Muestreo:.....	28

9.2.	Aislamientos:.....	29
9.3.	Identificación de las cepas por pruebas bioquímicas:	31
9.4.	Aislamiento bacteriano en TSA:	32
9.5.	Tinción Gram y Catalasa:.....	32
9.6.	Coagulasa y Beta-galactosidasa:.....	33
9.7.	Antibiogramas:	34
9.8.	Identificación del gen de resistencia mediante PCR:	35
9.9.	Identificación de las cepas por secuenciación del ARNr 16S:.....	35
9.10.	Flujograma:.....	36
10.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:.....	37
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	40

1. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS:

Tablas:

Tabla 1. Tabla 1: Secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación del gen *mecA*. (Página 26)

Figuras:

Fig. 1. Distribucion del muestreo en cuanto a edad (Fig.1A), sexo (Fig.1B), tipo de patología (Fig.1C), contacto con los dueños (Fig.1D) y si recibió tratamiento antimicrobiano previo (Fig.1E). (Página 28)

Fig. 2. Distribución del muestreo por barrios. (Página 29)

Fig. 3. Porcentaje de cepas que crecieron en Tryptic Soy Broth (TSB) al 10% (Fig. 2A) y procedencia de las mismas (Fig. 2B). (Página 30)

Fig. 4. Crecimiento en Tryptic Soy Broth (TSB) con 10% de NaCl. Se observa el enturbiamiento homogéneo del medio. (Página 30)

Fig. 5. Porcentaje de cepas Manitol positivas y negativas. (Página 31)

Fig. 6. Aislamiento en Manitol Salt Agar (MSA). Manitol positiva: vira a amarillo (Fig. 5A y 5B). Placas de MSA con crecimiento de cepas controles manitol positiva, color amarillo (*Staphylococcus aureus*) y manitol negativa, se mantiene rojo (*Staphylococcus epidermidis*) (Fig. 5C) (Página 31)

Fig. 7. Colonias aisladas en medio Tryptic Soy Agar (TSA). (Página 32)

Fig. 8. Tinción Gram: cocos Gram positivos (Fig. 7A). Prueba de la catalasa positiva (Fig. 7B). (Página 32)

Fig. 9. Porcentaje de cepas Coagulasa positivas y negativas (Fig. 8A). Porcentaje de cepas positivas al test de la beta galactosidasa (algunos no

realizados) (Fig. 8B). (Página 33)

Fig. 10. Prueba de la Coagulasa positiva (Fig. 9A). Prueba de la β - galactosidasa en TSA con X-gal (Fig. 9B). (Página 33)

Fig. 11. Porcentaje de cepas resistentes a cada uno de los 10 antimicrobianos utilizados. (Página 34)

Fig. 12. Cepas que mostraron fenotipo de resistencia a la Oxacilina. Cepa 159 no presentó halo de inhibición (Fig. 11A). Cepa 175 con leve halo de inhibición (Fig. 11B). (Página 34)

Fig. 13. Electroforesis de los productos de PCR para detección del gen *mecA*
Carril 1: Marcador de Peso Molecular (la flecha marca la banda de 310 pb), Carril 2: Control positivo (cepa de MRSA), Carril 4: cepa 62 (*S.pseudintermedius*). (Página 35)

Fig. 14. Diagrama de flujo de los procedimientos realizados. (Página 36)

2. RESUMEN:

Los *Staphylococcus* son microorganismos residentes en la microbiota normal de las mucosas y piel tanto de humanos como de animales. Sin embargo, algunas especies son patógenos oportunistas, que pueden causar serias enfermedades cutáneas en tejidos o cavidades. *Staphylococcus aureus* es considerado parte de la microbiota normal de los humanos, mientras que *Staphylococcus pseudintermedius* es la bacteria comensal más frecuente en piel y mucosas de la especie canina. *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pseudintermedius*, constituyen un reto para la profesión veterinaria, ya que presentan alta morbilidad en animales, además de constituir un importante riesgo zoonótico, siendo la colonización en animales domésticos la que puede generar un riesgo sanitario para quienes tienen contacto directo con los animales. Por otra parte, no debemos perder de vista aquellas especies, también comensales, que no son potencialmente patógenas pero que tienen capacidad de actuar como reservorio de genes de virulencia y resistencia. El objetivo principal de este trabajo fue identificar cepas de *Staphylococcus sp.* resistentes a meticilina. Las cepas (n=188) fueron aisladas de muestras de hisopados de faringe, perianales, otitis y heridas en caninos (n=75) que ingresaron al Centro Hospitalario de la Facultad de Veterinaria de la UdelaR. Se aislaron e identificaron diferentes cepas, se determinó el perfil de resistencia a una serie de antimicrobianos (entre ellos la oxacilina) y por último se determinó la existencia del gen *mecA* (gen que evidencia la resistencia a meticilina). Finalmente, se puso en marcha en el laboratorio un cepario de *Staphylococcus sp.* para realizar trabajos futuros dentro del área. En conclusión, se determinó una alta prevalencia de cepas de *Staphylococcus sp.* en caninos que fueron muestreados en el Hospital. Se evidenció una alta resistencia a la penicilina (n=50), seguido por una alta resistencia también a la oxacilina (n=28). De las 28 cepas que demostraron resistencia fenotípica a la oxacilina en el antibiograma, 7 presentaron el gen *mecA*. Todos los antimicrobianos utilizados tuvieron una o más cepas que demostraron resistencia. Además, se obtuvieron 13 cepas consideradas resistentes a múltiples drogas (MDR).

3. SUMMARY:

Staphylococci are microorganisms which reside in the normal microbiota of the mucous membranes and skin of humans and animals. However, some species are opportunistic pathogens, which can cause serious skin diseases in tissues or cavities. *Staphylococcus aureus* is considered part of the normal microbiota of humans, while *Staphylococcus pseudintermedius* is the most common commensal bacterium in the skin and mucous membranes of the canine species. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*, constitute a challenge for the veterinary profession, since they present high morbidity in animals, besides being an important zoonotic risk, colonization in domestic animals being the one that can generate a sanitary risk for the veterinary professionals. On the other hand, we must not lose sight of those species, also commensals, that are not potentially pathogenic but that have the capacity to act as a reservoir of virulence and resistance genes. The main objective of this work was to identify strains of *Staphylococcus sp.* resistant to methicillin isolated in swab samples from pharynx, perianal, otitis and wounds in dogs admitted to the Hospital Center of the School of Veterinary Medicine of UdelaR, Uruguay. Different strains were isolated and identified, the resistance profile was determined to a series of antimicrobials (oxacillin among them) and finally the existence of the *mecA* gene (gene that shows resistance to methicillin) was determined. Finally, a strain of *Staphylococcus sp.* to carry out future work within the area. 188 isolates were obtained from 75 canines sampled and a high prevalence of strains of *Staphylococcus sp.* in canines of Montevideo was observed. In conclusion, the results showed a high resistance to penicillin (n=50), followed by a high resistance also to oxacillin (n=28). Of these isolates, 28 strains showed phenotypic resistance to oxacillin in the antibiogram. Of these 28 strains, 7 presented the *mecA* gene. All the antimicrobials used had one or more strains that showed resistance. In addition, we obtained 13 strains considered resistant to multiple drugs (MDR).

4. INTRODUCCIÓN:

Los estafilococos son bacterias anaerobias facultativas, presentes en el medio ambiente y en la flora normal de humanos y animales. El primero en describir a los estafilococos fue Robert Koch en el año 1878, quien aisló estas bacterias de pus proveniente de humanos. Más adelante en el año 1880, Luis Pasteur logró cultivarlos en medio líquido y luego fue evidenciada su patogenicidad en ratones por William Ogston en 1882. Rosenbach en el año 1884 intentó clasificarlos taxonómicamente y describió al *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), llamado así por el pigmento dorado de sus colonias y al *Staphylococcus albus*, formador de colonias de pigmento blanquecino. Luego en 1930, Julianelle los clasificó por las características antigénicas del género y en el año 1942, creó un método de tipificación por bacteriófagos (Kloos y Schleifer, 1975; Pulverer y Pillich, 1971).

Habitualmente se considera al *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Staphylococcus pseudintermedius* (*S. pseudintermedius*) como verdaderos patógenos ya que son capaces de producir coagulasa como uno de los factores de virulencia más importantes. Por otro lado, algunas especies que no producen la coagulasa como el *Staphylococcus epidermidis* y el *Staphylococcus haemolyticum* se consideran como residentes habituales de la flora, no siendo patógenos de primera línea. Hoy en día se ha comprobado que cualquier especie de *Staphylococcus* es capaz de expresar patrones de resistencia a antimicrobianos, así como también factores de virulencia (Huebner y Goldmann, 1999; Kloos y Bannerman, 1994).

El *S. pseudintermedius* es parte de la microbiota cutánea, el pelo y también de las uniones mucocutáneas como la nariz, boca y ano de perros y gatos clínicamente sanos (Bannoehr y Guardabassi, 2012). Está comprobado que *S. pseudintermedius* coloniza la piel de los cachorros al poco rato de nacer debido al gran contacto con la madre, transmitiéndole así estos microorganismos (Saijonmaa-Koulumies y Lloyd, 2002). Este microorganismo rara vez coloniza la piel de los humanos, pero se han descrito casos de transmisión entre perros y sus dueños con relación muy estrecha y también en veterinarios (Hanselman y col., 2009). Es un patógeno oportunista y no suele generar enfermedad, pero causas como dermatitis atópica, procedimientos quirúrgicos o enfermedades inmunosupresoras, hacen que la resistencia normal del hospedero o la barrera cutánea se vean alterados, provocando una infección. Similar con lo que sucede en la infección por *S. aureus* en humanos, los caninos suelen infectarse con cepas que ya habitaban su cuerpo (Bannoehr y Guardabassi, 2012).

Por otra parte, muchos *Staphylococcus* son importante causa de infecciones intrahospitalarias y pueden estar implicados en casos graves. El *Staphylococcus epidermidis*, es el más frecuente en estas infecciones y el de mayor importancia

porque es capaz de producir biofilm, lo que hace que sea fácil la propagación en catéteres intravenosos y otros instrumentos, pudiendo producir infecciones secundarias (Lozano y col., 2013).

En cuanto a la patogenicidad, los estafilococos pueden provocar infecciones superficiales por alteraciones en las barreras de la piel y membranas mucosas así como también infecciones profundas, ya sea porque ingresan por los tejidos, heridas penetrantes o por vía hematológica (Huebner y Goldmann, 1999).

A pesar de su gran cercanía filogenética, dentro del género existen diferencias entre el *S. pseudintermedius* y el *S. aureus* en relación a su colonización en el hospedero. *S. aureus* coloniza principalmente las fosas nasales, mientras que en el perro *S. pseudintermedius* coloniza principalmente la cavidad oral y la zona perianal. Por otro lado, el estado de portador de *S. pseudintermedius* en el perro es más frecuente y genéticamente más variable comparado con *S. aureus* en el hombre (Bannoehr y Guardabassi, 2012). En estudios realizados en perros y sus dueños, se determinó que hay casos de transmisión zoonótica de *S. pseudintermedius* ya que se encontraron genotipos idénticos en los aislamientos de este microorganismo en las parejas perro-propietario (Frank y col., 2009).

Clínicamente, en caninos cada vez son más usuales las infecciones bacterianas de la piel, que se definen como piodermas. Hay una flora bacteriana residente normal en la epidermis y en los folículos pilosos que suele ser beneficiosa, pero por causas ambientales como humedad y pH puede cambiar y generar patologías. (Matousek y Campbell, 2002; Scott, 2001). Además *S. pseudintermedius* se adhiere a las células de la epidermis en perros que no presentan patologías de piel, pero esta adherencia se ve aumentada en perros que si las presentan y es el principal patógeno aislado (90%) en las piodermas superficiales y profundas así como también en otitis, heridas e infecciones (Frank y Loeffler, 2012; Mc Ewan y col., 2006).

La invasión bacteriana (que puede ser primaria o secundaria) se da al dañarse las barreras de defensa de la piel. La capacidad de colonización de estas bacterias va a depender de algunas variables como los nutrientes que están disponibles en la piel, la competencia con otras bacterias, la capacidad para soportar fuerzas abrasivas del huésped y la adherencia a los corneocitos de la epidermis (Forsythe y col., 2002).

En perros los *Staphylococcus* se aíslan frecuentemente de zonas mucocutáneas como zona nasal, bucal y perianal de caninos clínicamente normales, y puede hallarse en proporciones variables en la superficie cutánea, particularmente en zonas húmedas como mentón o espacios interdigitales. La mayor parte de las infecciones de piel en caninos, suelen ser secundarias a una patología primaria, por lo que es de suma importancia diagnosticar bien la causa de origen, para

impedir futuras recaídas luego del tratamiento. En algunos casos de infecciones profundas o crónicas de la piel, también se pueden aislar cepas de microorganismos Gram negativos como *Proteus sp*, *Pseudomona sp* y *Escherichia coli* (Balazs Mayanz, 2012; Yotti Álvarez, 2010).

El interés de este trabajo radica en la importancia que tiene el género *Staphylococcus* en la salud humana y animal. El aumento de los microorganismos resistentes a antimicrobianos es uno de los mayores problemas a los que actualmente se enfrenta la medicina mundialmente. Además, este es el primer trabajo que se realiza en nuestro país con respecto al relevamiento de este género y su resistencia a antimicrobianos en caninos.

5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

5.1. El género *Staphylococcus*

5.1.1. Características estructurales y fisiológicas:

Son cocos Gram positivos que tienden a agruparse en racimos. Son de forma esférica y poseen un diámetro de aproximadamente 0,5 a 1,5 μm . Los estafilococos a nivel nutricional son poco exigentes, son anaerobios facultativos, mesófilos (crecen entre los 15°C y los 35°C) pero toleran otros rangos y también toleran alta concentración de cloruro de sodio (NaCl, 7,5% - 10%), condición que ha permitido el desarrollo de medios ricos en NaCl selectivos para el género. Su metabolismo es mayormente fermentativo, pero determinadas enzimas como la catalasa que desdobra peróxidos, hacen que crezca en presencia de oxígeno. En un medio anaerobio puede fermentar la glucosa, lo que es característico del género *Staphylococcus* y en el caso de algunas especies, el manitol y otros azúcares. Ante agentes físicos y químicos, resiste a las condiciones normales ambientales. A temperatura ambiente puede sobrevivir hasta por 3 meses, entre 35°C y 37°C hasta por un mes y en heladera por tiempo indefinido si se repican cada 2-3 meses. También son sensibles a muchos antisépticos comunes, que lo destruyen en minutos (Chans, 2002).

En cuanto a las características estructurales, la pared celular tiene varios componentes. Está formada por una capa gruesa de peptidoglicano, característico de los microorganismos Gram positivos. Este es un polímero que lo compone un esqueleto glucídico y cadenas tetrapeptídicas, que se unen formando una red. Esta se encarga de mantener la rigidez de la pared bacteriana y de su resistencia osmótica. Por otro lado, tenemos a la membrana celular, donde su capa más externa se encuentra parcialmente sustituida por ácidos lipoteicoicos que sobresalen de la pared y ayudan a la adherencia. Por último, algunas cepas de *Staphylococcus* presentan cápsula, que le da propiedades antifagocíticas y hacen que la bacteria sea más invasiva (Chans, 2002).

5.1.2. Factores de virulencia:

En cuanto a la virulencia de los estafilococos, son destacables algunos componentes de la envoltura celular y también la producción de toxinas y enzimas que afectan al huésped. La pared celular actúa como un factor de virulencia ya que los ácidos teicoicos y lipoteicoicos que presenta ayudarían a desencadenar la inflamación por activación del complemento y la adhesión a los tejidos. También unida al peptidoglicano sobresaliendo de la superficie bacteriana esta la proteína A, que es específica de *S. aureus*. Esta tiene la propiedad de unirse a la región Fc de la IgG de forma inespecífica, interfiriendo con la opsonización y la ingestión de los microorganismos por los PMN, activando el complemento y dando lugar a reacciones de hipersensibilidad. Otra proteína superficial es el *clumping factor*, que está antigénicamente relacionada

con la proteína A, pero con otra propiedad que es formar fibrina sobre la superficie bacteriana. En cuanto a las toxinas, *S. aureus* produce hemolisinas (alfa, beta y gamma) que lisan los glóbulos rojos y actúan sobre las membranas de varias células, causando destrucción tisular. Otra toxina es la Leucocidina de Pantón Valentine (PVL) que ataca a los polimorfonucleares destruyéndolos. También producen enterotoxinas termorresistentes que causan intoxicación alimentaria. Las exfoliatinas son exotoxinas producidas por algunas cepas de *Staphylococcus sp.* que lesionan la epidermis y, por último, pueden producir la toxina del shock tóxico, pudiendo causar un shock sin bacteriemia, por difusión desde un foco. Otro factor fundamental en la virulencia de los estafilococos son las enzimas. La enzima coagulasa nos permite diferenciar a los estafilococos en dos grupos, según la produzcan o no, estafilococos coagulasa positivos (CoPs) y estafilococos coagulasa negativos (CoNs). La coagulasa forma una barrera de fibrina y se cree que esto dificulta la llegada de los fagocitos, aumentando la virulencia. Otra enzima es la desoxirribonucleasa, específica del *S. aureus* que destruye el ADN de las células muertas, fluidificando el pus. Las lipasas también favorecen la diseminación de la infección por los planos adiposos. Por último, la hialuronidasa que es producida por algunas cepas, licua el ácido hialurónico que es una sustancia fundamental en los tejidos conjuntivos, por lo que favorece la difusión (Chans, 2002).

5.1.3. Dos grupos según su capacidad de producir la enzima coagulasa:

1) *Staphylococcus coagulasa positivos (CoPS):*

Comúnmente los CoPS son comensales de los animales y el hombre, considerados como patógenos oportunistas. Las infecciones por estas bacterias pueden ser de origen exógeno o endógeno. Dentro de las patologías más relevantes causadas en animales domésticos por estos microorganismos podemos destacar, en caninos y felinos, a las piodermas, otitis externas y otros cuadros supurativos, en cerdos la epidermitis supurativa, en equinos y suinos la botriomicosis y en ovinos la piemia por garrapatas, entre otras (Quinn, 2005).

Algunas de las especies más relevantes que pueden causar infecciones en caninos son: *S. intermedius*, *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. pseudintermedius*, *S. lutrae*, *S. delphini* y *S. hyicus*. Es sabido que el *S. aureus* está ampliamente distribuido en las infecciones intrahospitalarias y comunitarias en humanos, sin embargo, actualmente se lo reconoce como un patógeno cuya frecuencia de aparición ha ido en aumento en animales de compañía (Hanselman y col., 2009; Morris y col., 2006).

El *S. pseudintermedius*, es una nueva especie de CoPS identificada en el año 2005 y desde entonces ha sido reconocido como un patógeno oportunista de una gran variedad de animales, en especial caninos, siendo responsable de

enfermedades como pioderma, otitis externas, infecciones urinarias, infecciones de partes blandas y otros tipos de infecciones en mascotas (Bannoehr y Guardabassi, 2012).

Algunos trabajos recientes indican que esta especie ha logrado colonizar al hombre y producir infecciones de manera ocasional (Lozano y col., 2017; Somayaji y col., 2016; Van Duijkeren y col., 2011; Stegmann y col., 2010).

2) *Staphylococcus coagulasa negativos (CoNS):*

Dentro del grupo de los CoNS, hay un gran número de especies, muchas de las cuales son patógenos oportunistas de animales y no producen toxinas agresivas (Otto, 2009, 2004).

Los aislamientos de estos *Staphylococcus sp.* en casos clínicos han ido en aumento, detectándose un incremento en la resistencia a varios agentes antimicrobianos, con alto porcentaje de cepas multirresistentes. Por esto se cree que puede ser un importante reservorio de genes de resistencia a antimicrobianos (Kloos y Bannerman, 1994).

Este grupo está representado por más de 40 especies diferentes dentro de las que se encuentran: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. carnosus*, *S. xilosus* entre otros (Greene, 2008).

5.2. Resistencia antimicrobiana:

Los antimicrobianos son sustancias naturales, semisintéticas o sintéticas, que a bajas concentraciones logran inhibir el crecimiento o logran la muerte de algunos microorganismos. Son utilizados en el hombre y en los animales como tratamiento de infecciones o para su prevención y también son utilizados como promotor de crecimiento animal, práctica que cada vez es menos utilizada ya que contribuye a generar resistencia (OMS, 2017). La resistencia a los antimicrobianos (RAM), es un problema mundial que perjudica a la salud humana y a la salud animal. Es causada por el inadecuado uso de antimicrobianos tanto en medicina veterinaria como en medicina humana, así como también en el entorno ambiental (por ejemplo, con los efluentes). Por esto hay que prevenir o minimizar la presión selectiva y aumentar las medidas de prevención y control (OMS, 2016).

Agravando esta problemática existen también los microorganismos multirresistentes (MDR), que son aquellos que manifiestan resistencia a tres o más clases de antimicrobianos. La detección de estos microorganismos

multirresistentes ha ido en aumento. Por otro lado, bacterias con resistencia extrema son aquellas que resisten a la mayoría de los antimicrobianos y bacterias con panresistencia son aquellas que resisten a todos los antimicrobianos existentes (MGAP, 2017).

1) Historia de la resistencia a los antimicrobianos

Fleming descubrió la penicilina en el año 1928, y posteriormente comenzó su uso clínico en el año 1943. La resistencia a la penicilina se produjo a los pocos años luego de que comenzara su uso clínico y al principio no se le dio mucha importancia. El mecanismo por el que se generó esta resistencia fue por la producción de enzimas, denominadas betalactamasas (β -lactamasas), que actúan hidrolizando el anillo betalactámico. Luego en la década del 50, la resistencia a la penicilina demostró importancia clínica y se tomó más conciencia. En el año 1959 se creó la meticilina, una penicilina semisintética en la que se modificó la estructura química de las penicilinas naturales. La meticilina y la oxacilina pasaron a ser el tratamiento elegido para las infecciones por *S. aureus* (Turnidge y col., 2002). Pero ya en el año 1960 apareció en Europa la primera cepa de *S. aureus* con un nuevo mecanismo de resistencia a meticilina (*Staphylococcus aureus* meticilinorresistente, denominado MRSA). Luego se describió un primer brote epidémico de este microorganismo resistente a la meticilina en América (EEUU) en el año 1968 (Lyon y Skurray, 1987).

En la salud animal, en los años 50 se empezaron a utilizar antimicrobianos en animales enfermos o en ausencia de enfermedad pero que se encontraban con los enfermos. Además, se alimentaban a los suinos con desechos de tetraciclinas y de esta forma se descubrió que estos animales presentaban un mejor índice de conversión. A partir de este descubrimiento, se comenzaron a utilizar algunos antimicrobianos como promotores de crecimiento en la alimentación de animales de producción. Unos años más tarde, comenzaron a aislarse cepas resistentes a partir de animales de producción (Errecalde, 2004).

2) Tipos de resistencia

Se le denomina resistencia intrínseca a aquella resistencia que se relaciona con la estructura bacteriana. Por ejemplo, la diferencia de espesor de la capa de peptidoglicano entre las Gram positivas y negativas, hacen que las Gram negativas sean más resistentes a los β -lactámicos. Por otro lado, se denomina resistencia adquirida a aquella generada por la adquisición de genes de resistencia que son obtenidos por transferencia horizontal o mutación y se fijan en la población bacteriana gracias a la presión selectiva que se ejerce mediante el uso inadecuado de los antimicrobianos. Los mecanismos de transferencia horizontal son de gran importancia ya que puede generar también cepas

multirresistentes (Errecalde, 2004).

3) Mecanismos de resistencia antimicrobiana

1. Modificación enzimática del antimicrobiano: las bacterias liberan enzimas que pueden cambiar la estructura del antimicrobiano, volviéndolo menos efectivo. Por ejemplo, las β -lactamasas, que son las más comunes, pueden hidrolizar el anillo β -lactámico (Livermore, 1991).

2. Bombas de eflujo: las bacterias toman el antimicrobiano que se encuentra en el espacio periplásmico y lo expulsan al exterior, no permitiéndole llegar al sitio de acción (Vila y col., 2007).

3. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa: puede darse por variaciones en la permeabilidad de la bicapa lipídica o por cambios en las porinas, que regulan la entrada de algunos elementos a la bacteria, entre ellos los antimicrobianos (Vila y col., 2007).

4. Alteraciones del sitio de acción: las bacterias pueden variar el lugar donde se une el antimicrobiano en la bacteria. Es característico de algunos géneros de Gram positivas generando modificaciones de la estructura del sitio de acción de los β -lactámicos (Cavaco y col., 2008). Este es el mecanismo por el que se da la resistencia a la meticilina.

5.3. Tipos de antimicrobianos

Betalactámicos: Poseen en su estructura un anillo β -lactámico. Actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, en su última etapa denominada transpeptidación. Es la familia más grande de antimicrobianos y la que más se utiliza. Su espectro ha ido creciendo por la asociación con nuevas moléculas, pero se ha incrementado la resistencia adquirida a este grupo. Actúan contra Gram positivas, negativas y espiroquetas. Tenemos cuatro importantes grupos que son las penicilinas, las cefalosporinas, los monobactámicos y los carbapenemes. Dentro de las penicilinas podemos destacar la amoxicilina, oxacilina, meticilina, etc. En cuanto a las cefalosporinas, éstas las dividimos en cuatro generaciones. En el grupo de los monobactámicos el de uso clínico es el aztreonam. Por último, dentro de los carbapenemes tenemos el imipenem y ertapenem. Por otro lado, tenemos el grupo de los β -lactámicos asociados a inhibidores de las betalactamasas, estos son inhibidores que se unen a las penicilinas para potenciar su acción, de uso clínico existe el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Bado y col., 2008).

Glicopéptidos: Estos antimicrobianos actúan sobre la pared bacteriana, inhibiendo la etapa final de síntesis y ensamblado de peptidoglicano. También

altera la permeabilidad de la membrana citoplasmática y afectan la síntesis de RNA. En este grupo están la vancomicina y teicoplanina, donde la vancomicina es una opción importante contra MRSA (Bado y col., 2008).

Aminoglucósidos: Actúan por un mecanismo de adherencia a moléculas cargadas negativamente en la membrana, para luego ingresar al citoplasma. Los más conocidos son la estreptomina, amikacina y gentamicina. También suelen ser resistentes a este grupo los MRSA (Bado y col., 2008).

Macrólidos: Actúan bloqueando la transpeptidación y traslocación del ribosoma bacteriano. Se clasifican según el número de carbonos y dentro de este grupo son conocidos las eritromicina, claritromicina, azitromicina y espiramicina (I. Bado y col., 2008).

Quinolonas: Actúan interactuando con la DNA girasa y la topoisomerasa IV, lo que lleva a una inhibición de la síntesis de ADN. Se clasifican en generaciones. Son conocidos el ácido nalidíxico y el ácido pipemídico, la norfloxacin, ciprofloxacina, y la enrofloxacin de uso muy extenso en medicina veterinaria, etc (Bado y col., 2008).

Lincosaminas: Actúan inhibiendo la síntesis proteica bacteriana uniéndose a la subunidad 50S, lo que impide que se inicie la cadena peptídica. Dentro de este grupo son conocidas la lincomicina y la clindamicina. La clindamicina es activa frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*, entre otros, aunque la mayoría de los Gram negativos aerobios son resistentes a esta (Bado y col., 2008).

Sulfonamidas: Actúan alterando la síntesis de ácido fólico, afectando la síntesis nucleotídica, inhibiendo el crecimiento bacteriano. Se utiliza la combinación de las sulfonamidas con el trimetoprim que actúan de manera sinérgica. Dentro de las sulfonamidas son conocidas sulfacetamida, sulfadoxina, etc (Bado y col., 2008).

5.4. Antimicrobianos en Medicina Veterinaria

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) calcula que la demanda de proteína animal se duplicará en 2050, por lo que irá en aumento también el uso de antimicrobianos en la producción animal. Por otro lado, la relación entre seres humanos y sus mascotas se ha incrementado, así como también se ha intensificado el uso de estos fármacos en clínica de pequeños animales. También hay, por parte de los propietarios, un mayor contacto con las mascotas y un incremento de los gastos asociados a su atención (Lloyd, 2007). Un estudio estimó que en el año 2000 el 70% de los

antimicrobianos producidos en Estados Unidos se utilizaba en animales en ausencia de enfermedad (Mellon M, y col., 2001). Otro punto importante en cuanto al uso de antimicrobianos en la producción animal, es que han sido utilizados en dosis bajas como promotores de crecimiento y como tratamiento preventivo. En Estados Unidos la cantidad de antimicrobianos usados como promotores de crecimiento aumentó 50 veces entre 1951 y 1978, mientras que en ese mismo período el uso destinado al tratamiento de infecciones en humanos y animales se incrementó diez veces. Por otro lado, estos fármacos también son muy utilizados en la acuicultura (WHO, 2011).

De esta forma se fue ejerciendo a lo largo de los años, una presión selectiva hacia bacterias resistentes que pueden afectar al hombre directamente por contacto con animales, e indirectamente por contaminación del medio ambiente, como se ha visto con los efluentes de los establecimientos de producción animal, los desechos en la acuicultura, etc (Lloyd, 2007; Liebana y col., 2013).

Los antimicrobianos generan residuos en los alimentos de origen animal, por lo que es importante restringir su uso. Estos residuos además de generar un importante riesgo para el consumidor también afectan al comercio internacional, ya que los mercados son cada vez más exigentes (Landers y col., 2012). La Unión Europea prohibió el uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento en el año 2006 por la preocupante situación que se generó por la explosiva aparición de resistencia a antimicrobianos (Castanon, 2007). En Uruguay, en el año 2011, se creó un decreto que prohibió el uso de antimicrobianos en la alimentación de bovinos y ovinos. Más recientemente se crearon otras resoluciones para controlar y regular la mala utilización de antimicrobianos, haciendo responsable al profesional veterinario de la correcta prescripción (MGAP, 2017).

5.5. Resistencia en el género *Staphylococcus*

Las bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus* son capaces de adquirir elementos exógenos por transferencia horizontal que pueden ser de la misma especie o de otras. Esto les permite ser muy adaptables al medio y a los antimicrobianos, ya que adquieren genes de resistencia codificados en plásmidos, secuencias de inserción y transposones (Kuroda y col., 2001; Baba y col., 2002). El conocimiento del primer mecanismo de resistencia del género *Staphylococcus* fue en *S. aureus* luego que se comenzara a utilizar la penicilina como antimicrobiano. A pocos años de comenzado su uso se encontraron cepas resistentes productoras de penicilinasas que eran codificadas por un gen denominado *blaZ* (Nimmo y col., 2003). Luego, en la década del 50, se comenzaron a utilizar los primeros β -lactámicos que son estables ante las

penicilinasas, los que permitieron controlar las infecciones. Estos son las cefalosporinas de primera generación y la meticilina. La meticilina es una penicilina semisintética que resiste la acción de la β -lactamasa que degrada la penicilina. Pero ya en el año 1961, en Inglaterra, se encontraron las primeras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) (Nimmo y col., 2003; Aires de Sousa y col., 2004).

En la medicina veterinaria los primeros MRSA se encontraron en la década del 70, aislados de muestras de leche de vacas con mastitis (Cohn y Middleton, 2010). En cuanto al *S. pseudintermedius*, en el año 2006 se aislaron los primeros *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a la meticilina (MRSP) en pequeños animales con dermatopatías y actualmente este problema ha ido en aumento (Weese y col., 2010).

5.6. Genética de la resistencia a la meticilina, gen *mecA*

Genéticamente la resistencia a la meticilina está codificada por el gen *mecA* que está ubicado en un elemento genético móvil conocido como "*Staphylococcal cassette chromosome mec*" (SCCmec) que se transmite con facilidad a otras especies (Ito y col., 2014; Zhang y col., 2011). El gen *mecA* codifica para una proteína de unión a la penicilina (PBP), llamada PBP2a, la cual presenta baja atracción con la meticilina y todos los antimicrobianos β -lactámicos. La proteína PBP2a sigue sintetizando peptidoglicano para la pared celular aun cuando las PBP normales estén inhibidas por los antimicrobianos, por lo que no impide la transpeptidación (Foster, 2004; Hiramatsu y col., 2001; Dinges y col., 2000; Schmitt y col., 1999).

5.7. Importancia de la resistencia a los antimicrobianos para la salud pública

Antiguamente las enfermedades infecciosas eran la mayor causa de mortalidad en las personas, pero aún en la actualidad siguen siendo una causa importante de muertes. Esto es debido a las infecciones por microorganismos resistentes en las cuales no varía la forma clínica entre cepas sensibles y resistentes, lo que varía es la efectividad del tratamiento, ya que para las cepas resistentes hay menos opciones terapéuticas para controlarlas. Actualmente es considerada una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo, causando aproximadamente 700.000 muertes anuales (OMS, 2018).

5.8. Vigilancia a nivel global

Existe una colaboración tripartita conformada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), en conjunto con las organizaciones del sector público y privado. Estas comparten responsabilidades en la adopción de medidas mundiales contra la resistencia antimicrobiana (RAM) tanto en animales, personas, ecosistemas y las interacciones entre éstos (FAO, 2017). Actualmente es un tema que tiene un importante peso a nivel internacional. Esta colaboración tripartita sobre la Resistencia a los Antimicrobianos se estableció formalmente en el 2010, aunque trabajan juntas desde 1940. La OMS creó en el 2016 al Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos, llamado GLASS. En el 2015 se aprobó en la OMS un plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos, que cuenta con cinco objetivos estratégicos: mejorar la concientización y la comprensión con respecto a la resistencia a los antimicrobianos; reforzar los conocimientos a través de la vigilancia y la investigación; reducir la incidencia de las infecciones; utilizar de forma óptima los agentes antimicrobianos; y preparar argumentos económicos a favor de una inversión sostenible que tenga en cuenta las necesidades de todos los países, aumentar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones (OMS, 2016).

5.9. Plan Nacional de contención de la Resistencia Antimicrobiana de Uruguay

En nuestro país, la Dirección General de Servicios Ganaderos del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (DGSG/MGAP) es la autoridad sanitaria competente para el registro y control permanente de los productos veterinarios, incluyendo los antimicrobianos. Dentro de la estructura de la DGSG/MGAP, el Departamento de Registro y Control de Productos Veterinarios de la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) tiene a su cargo el registro y control de los productos veterinarios, desde que se elaboran o importan hasta que se comercializan, así como el registro y habilitación de empresas y locales elaboradores, depósitos y distribuidores. Desde el año 2015 se encuentran reguladas las condiciones de comercialización y uso de los antimicrobianos de acuerdo con las normas y recomendaciones de los organismos internacionales de referencia. Los antimicrobianos solo deberán ser comercializados bajo prescripción del médico veterinario tratante, estableciéndose responsabilidades para el profesional veterinario y para el responsable de la explotación y los comercios expendedores deben mantener las recetas en archivo por lo menos durante dos años (MGAP, 2017).

6. HIPÓTESIS

- Existen diferentes cepas de *Staphylococcus sp.* en las poblaciones de caninos residentes en Montevideo.
- Caninos sin sintomatología característica (pioderma y/u otitis) son portadores de cepas de *Staphylococcus sp.*
- Existen cepas de *Staphylococcus sp.* resistentes a la meticilina en las poblaciones de caninos residentes en Montevideo.

7. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

7.1. Objetivo general

Realizar un relevamiento y caracterización de cepas de *Staphylococcus sp.* resistentes a meticilina en perros sanos y perros con sintomatología característica (pioderma y/u otitis).

7.2. Objetivos específicos

- Realizar un muestreo (hisopados faríngeos, perianales y de heridas) que incluya 75 caninos.
- Identificar fenotípicamente cepas de *Staphylococcus sp.* mediante pruebas bioquímicas.
- Realizar el perfil de resistencias a todas las cepas muestreadas mediante antibiograma.
- Confirmar la resistencia a meticilina por la detección del gen *mecA*.
- Generar una colección de cepas de *Staphylococcus sp.* resistentes y sensibles.

8. MATERIALES Y MÉTODOS:

8.1. Recolección de muestras:

El muestreo se realizó durante el período entre mayo de 2016 y mayo de 2017 en el Centro Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República. Se consideraron dos grupos de perros, por un lado, se tomaron muestras de perros sanos siendo estos aquellos que al momento de ingresar al hospital presentaban un examen objetivo general libre de patologías de piel. A estos animales se les realizó un hisopado de la faringe y de la zona perianal. Por otro lado, se tomaron muestras de perros que ingresaron al hospital con afecciones de la piel (pioderma) y/u otitis, ya que son afecciones donde es posible encontrar especies de *Staphylococcus* patógenas. Se les realizó un hisopado de faringe y zona perianal, así como también de la lesión descrita por el médico veterinario tratante. Todas las muestras fueron tomadas por profesionales veterinarios que desempeñaban funciones en el Centro Hospitalario mencionado. Estos fueron los responsables de determinar características clínicas relevantes para definir el tipo de toma de muestra, es decir si el paciente pertenecía al grupo sano o afectado. Se utilizaron para tomar las muestras hisopos estériles, que luego fueron refrigerados hasta su llegada al laboratorio de microbiología. Una vez en el laboratorio cada hisopo fue identificado con un número y además estaba acompañado de una ficha con los datos del animal que se consideraron relevantes para los análisis posteriores. Estos datos incluían datos del propietario (barrio, nombre, dirección), del paciente (raza, sexo, edad), anamnesis sanitaria (vacunaciones), anamnesis ambiental (relacionamiento con los dueños y con otros animales), tratamiento con antimicrobianos y descripción de la lesión (si la hubiese).

8.2. Aislamiento bacteriano e identificación fenotípica de las cepas:

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

De cada uno de estos caldos se realizó un aislamiento en Manitol Sal Agar (MSA de OXOID) y se incubó durante 24 - 48 horas a 35 - 37°C. El medio Manitol Salt Agar (MSA) es un medio selectivo y diferencial para el género *Staphylococcus*. Es un medio que contiene alta concentración de sal (NaCl) lo que le brinda selectividad. Por otro lado, gracias a un indicador de pH, rojo fenol, podemos determinar si la cepa cultivada en el medio fermenta o no el manitol. La

fermentación del manitol se evidencia cuando el medio de cultivo con el crecimiento vira al color amarillo por el descenso de pH, resultando así una cepa manitol positiva (MSA+). Una cepa que no fermenta el manitol se observará sin cambio de color en el medio siendo manitol negativo (MSA-). Todas las cepas MSA+ que provenían de hisopado faríngeo, perianal y piel, así como las cepas MSA- que provenían de piel se aislaron en placas de Tripticasa Soy Agar (TSA de OXOID) con el objetivo de obtener un cultivo puro para las pruebas posteriores. En este medio, se ven colonias redondas, opacas, de bordes lisos, de superficie lisa y brillante, convexas, de 1-2 mm de diámetro, con "olor rancio", consistencia mantecosa y pigmento característico. Las cepas MSA- que provenían de hisopados faríngeos y perianales también se aislaron en TSA, pero solo con el objetivo de conservarlas a -80°C e incluirlas en el cepario del área. Este criterio de selección de cepas se basó en la mayor probabilidad de encontrar cepas de *Staphylococcus sp.* patógenos resistentes en lesiones de piel, sin importar si eran MSA+ o MSA-.

A todas las cepas se les realizó la tinción de Gram, para confirmar presencia de cocos Gram positivos, y la prueba de la catalasa. Esta prueba determina la presencia de la enzima catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno (producto de deshecho de la respiración y tóxico para la célula) en agua y oxígeno en forma de gas. Se realiza colocando una gota de agua oxigenada 10 volúmenes sobre una placa de Petri vacía o sobre un portaobjeto. Seguidamente se toma con el ansa una colonia a partir de un cultivo puro y se suspende la misma sobre la gota de peróxido. La aparición de burbujas indica un resultado positivo. Es una prueba que permite diferenciar de manera muy rápida entre un *Staphylococcus* (catalasa +) de un *Streptococcus* (catalasa -).

Solamente a las cepas seleccionadas según el criterio descrito anteriormente (MSA +) se les realizó las siguientes pruebas bioquímicas, coagulasa en tubo y test de β -galactosidasa (sembrando en medio TSA con X-Gal) (Tse y col., 2012). Coagulasa en tubo: algunas especies de *Staphylococcus* producen una enzima llamada coagulasa que une el fibrinógeno generando la coagulación del plasma. Esto lleva a la formación de una cubierta alrededor de la célula bacteriana que la protege del sistema inmune del huésped potenciando su capacidad patógena. Para la realizar esta prueba se utilizó BBL Coagulase Plasma, Rabbit con EDTA® y para el procedimiento se siguieron las indicaciones del fabricante. Test de β -galactosidasa: la detección de la enzima β - galactosidasa se realizó con el objetivo de hacer una primera aproximación fenotípica a las diferentes especies de *Staphylococcus* ya que existen variaciones para esta prueba en las diferentes especies. La enzima β -galactosidasa cataliza la hidrólisis de galactósidos a monosacáridos. Uno de los galactósidos más comunes utilizados como fuente de energía por las bacterias es la lactosa. Algunas especies de estafilococos son capaces de degradar la lactosa por la presencia de esta enzima y otras no, por carecer de ellas. Para la detección de esta enzima

comúnmente se utilizan discos de ONPG. Estos discos están impregnados en orto-nitrofenilgalactopiranosido el cual es degradado por la β -galactosidasa liberándose o-nitro-fenol, un compuesto de color amarillo dando una reacción positiva. Se ha reportado que algunas cepas de *Staphylococcus aureus* dan positivas a la prueba de ONPG cuando deberían dar negativas (Tse y col., 2012). Esto ocurre porque estas cepas producen un compuesto llamado 2-aminophenoxazin-3-one durante su metabolismo que genera una reacción con el disco de ONPG y cambia de color a amarillo. Por esta razón para este trabajo se realizó la detección de esta enzima sembrando las cepas en placas de TSA con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D galactopiranosido). Este compuesto es hidrolizado por la β -galactosidasa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxindol. Este último es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloroíndigo, un compuesto azul insoluble y por ende el crecimiento bacteriano se observa de color azul cuando crece.

8.3. Test de susceptibilidad a antimicrobianos:

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

Los antimicrobianos se seleccionaron teniendo en cuenta el uso que se les da en medicina veterinaria y también con el objetivo de buscar resistencias nuevas en las cepas aisladas. Los antimicrobianos seleccionados fueron los siguientes: oxacilina, penicilina, amoxicilina/clavulánico, ampicilina/sulbactam, cefalotina, enrofloxacin, gentamicina, vancomicina, eritromicina y kanamicina. En cuanto a la oxacilina, ésta no es utilizada en la clínica, pero era la indicada por la CLSI al momento de realizar esta tesis de grado para determinar resistencia a la meticilina.

Una vez realizados todos los antibiogramas se clasificaron como cepas resistentes a múltiples drogas: MDR (del inglés multidrug-resistant) a todas aquellas cepas que muestran resistencia a tres o más clases de antimicrobianos. (Magiorakos y col., 2012)

8.4. Extracción del ADN genómico:

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

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

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

8.5. Detección del gen *mecA* por PCR en aislamientos con fenotipo resistente:

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

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

TAMAÑO DEL AMPLICÓN	SECUENCIA	PRIMER
310 pb	5' GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA 3'	<i>mecA</i> F
	5' CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA 3'	<i>mecA</i> R

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

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

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

Para confirmar la presencia del fragmento amplificado, la mezcla de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer TAE usando 5 µL

de marcador de peso molecular GeneRuler 100pb de Thermo scientific. La corrida se realizó a 100V durante 45 minutos y los amplicones se visualizaron por tinción con SYBER® Safe DNA gel stain de Invitrogen y exposición a luz UV.

Los productos de PCR fueron secuenciados en Macrogen Korea para corroborar la presencia del gen *mecA*.

8.6. Generación del cepario y conservación de las cepas:

Todas las cepas tanto resistentes como sensibles se conservaron en una solución de Glicerol a una concentración de 15% a 25%. Se realizaron dos stocks de cepas, uno se conservó a -80°C y el otro se conservó a -20°C. Por otro lado, se repicaron cada tres meses las cepas en medio TSA en slant (medio inclinado) y se conservaron en heladera a 4°C para el uso diario.

9. RESULTADOS:

9.1. Muestreo:

En total se muestrearon 75 caninos cuya distribución por edad era de un 32% (n=24) cachorros, considerados cachorros caninos de menos de un año, un 31% (n=23) eran adultos, considerados adultos entre uno y siete años y un 37% (n=28) eran gerontes, considerados así a los mayores a ocho años. La distribución por sexo fue de un 59% (n=44) hembras y un 41% (n=31) machos. Por otro lado, al momento de tomar la muestra, un 44% (n=33) presentaban alguna patología de piel u oído, y un 56% (n=42) no presentaban. Cuando se les consultó a los dueños sobre si tenían contacto estrecho o no con sus mascotas, un 64% (n=48) si lo tenía, y un 36% (n=27) no. Por último, un 21% (n=16) estuvieron en tratamiento con algún antimicrobiano y un 79% (n=59) no habían recibido tratamiento anteriormente al muestreo. (Fig. 1)

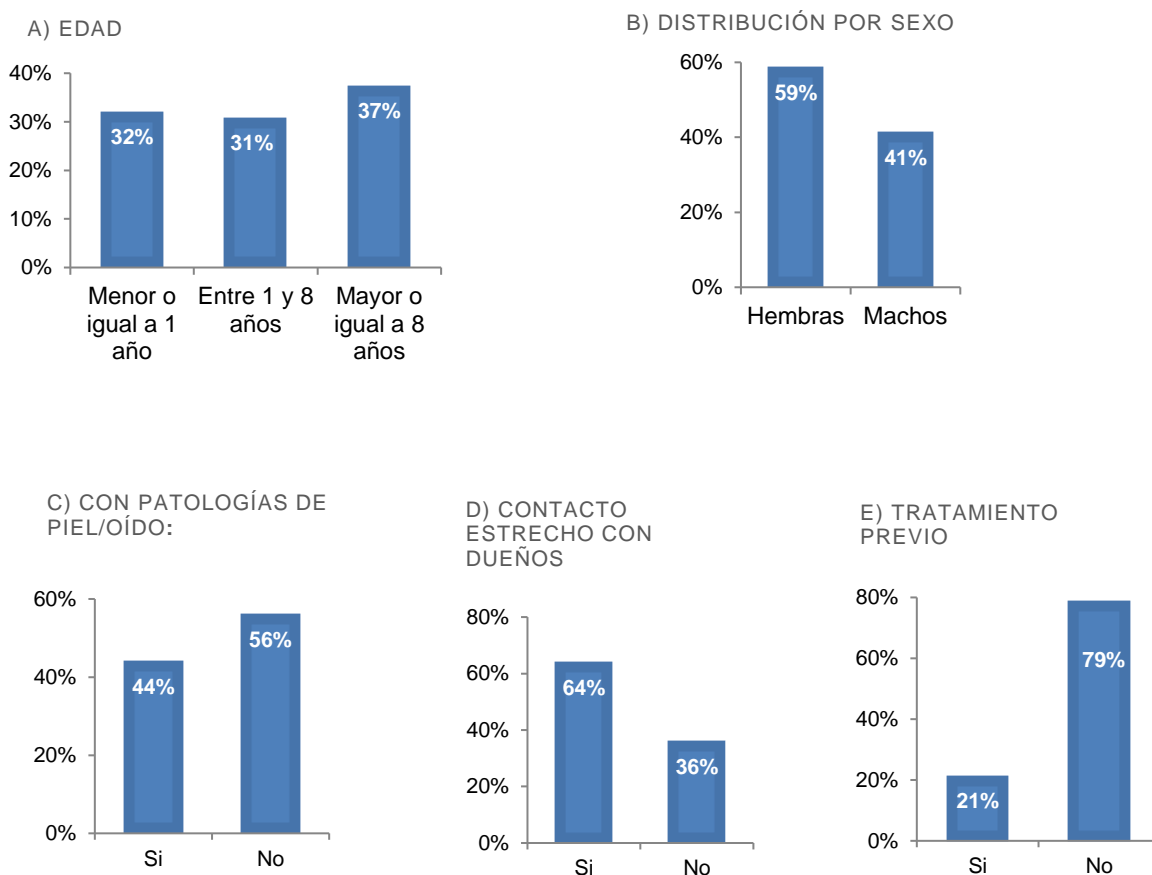


Fig. 1. Distribucion del muestreo. Edad (Fig.1A), sexo (Fig.1B), tipo de patología (Fig.1C), contacto con los dueños (Fig.1D) y si recibió tratamiento antimicrobiano previo (Fig.1E).

9.2. Distribución por barrios:

Del total de caninos muestreados (n=75), se registró de que barrio provenían un 62,7% (n=47). Estos provenían de más de 23 barrios diferentes, por lo que podemos decir que esta baja probabilidad de contacto entre estos apoya la variabilidad de este muestreo. (Fig. 2)

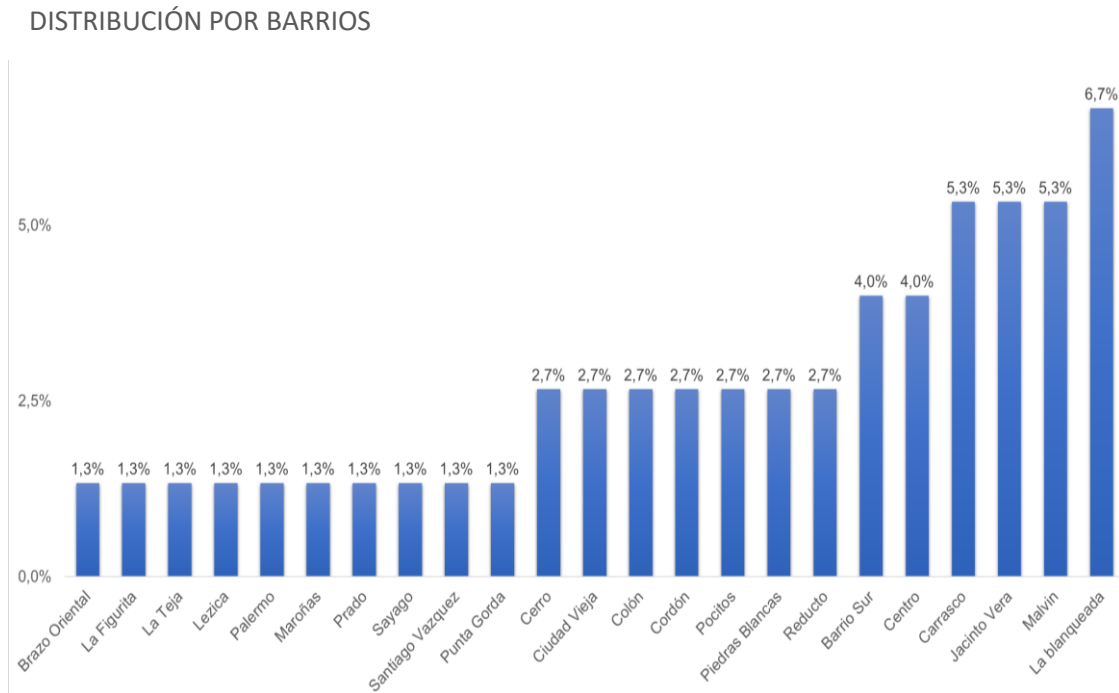


Fig.2. Distribución del muestreo por barrios.

9.3. Aislamientos:

Se obtuvieron 188 aislamientos de un total de 75 perros muestreados. Del total de aislamientos, 93% (n=174) fueron positivas a la prueba de Tryptic Soy Broth (TSB) con 10% de NaCl (crecimiento) y un 7% (n=14) no lo fueron (sin crecimiento). En cuanto a la procedencia de estas muestras, un 40% (n=30) se obtuvieron de hisopados de faringe y un 40% (n=30) se obtuvieron de hisopados de la región perianal. Por otro lado, un 6% (n=5) se obtuvieron de lesiones de piel y un 14% (n=11) de otros lugares como oído en caso de otitis y tumores ulcerados (Fig. 3 y Fig. 4).

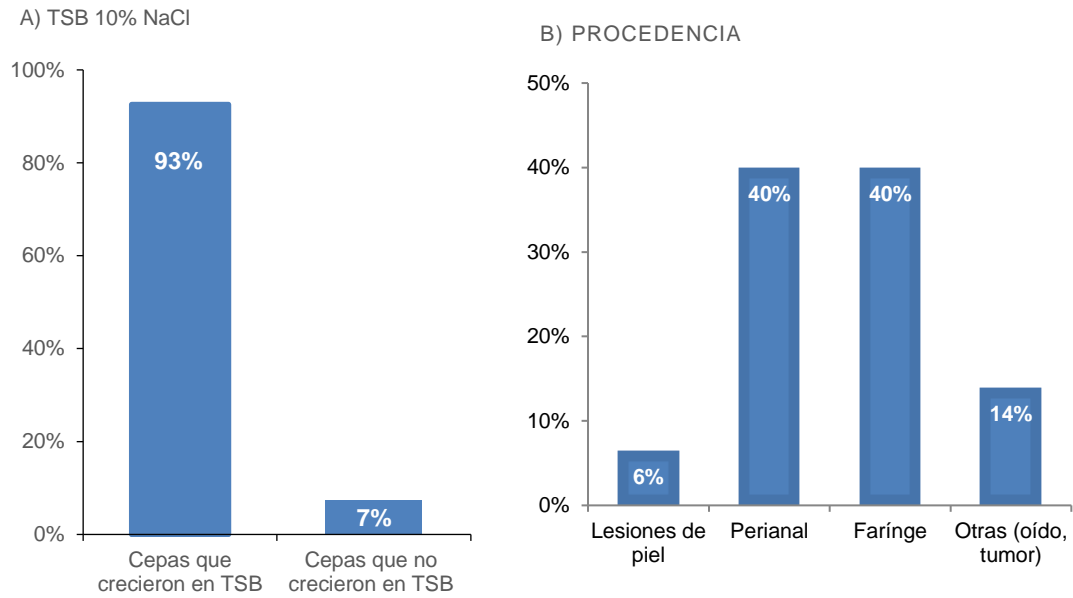


Fig. 3. Aislamientos. Porcentaje de cepas que crecieron en TSB al 10% (Fig. 2A) y procedencia de las mismas (Fig. 2B).

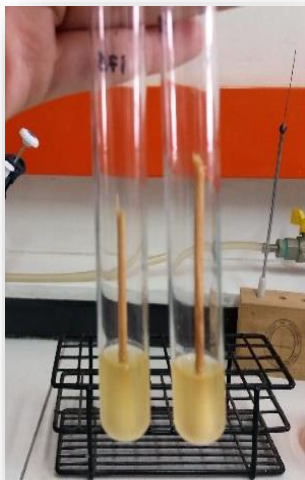


Fig. 4. Crecimiento en Tryptic Soy Broth (TSB) con 10% de NaCl. Se observa el enturbiamiento homogéneo del medio.

9.4. Identificación de las cepas por pruebas bioquímicas:

Las 174 cepas que crecieron en Tryptic Soy Broth (TSB), se aislaron en Manitol Salt Agar (MSA) resultando, un 43% (n=81) manitol positivas, por lo que eran estafilococos fermentadores del manitol, mientras que un 49% (n=93) fueron manitol negativas. (Fig. 5 y Fig. 6)

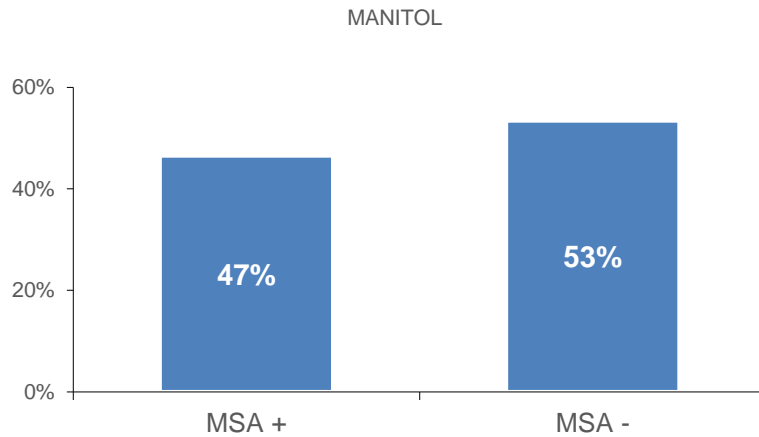


Fig. 5. Porcentaje de cepas Manitol positivas y negativas.

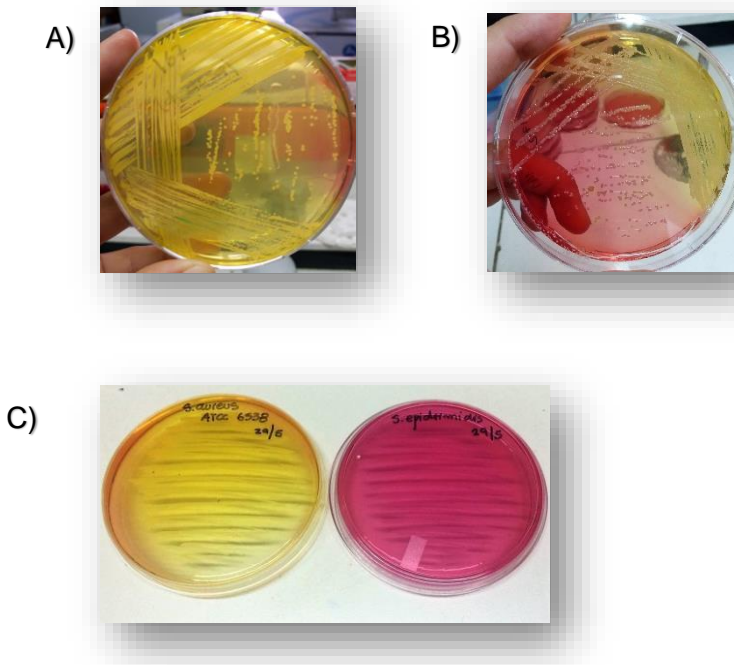


Fig. 6. Aislamiento en Manitol Salt Agar (MSA). Manitol positiva: vira a amarillo (Fig. 5A y 5B). Placas de MSA con crecimiento de cepas controles manitol positiva, color amarillo (*Staphylococcus aureus*) y manitol negativa, se mantiene rojo (*Staphylococcus epidermidis*) (Fig. 5C).

9.5. Aislamiento bacteriano en TSA:

Todas las cepas tanto MSA + y MSA – se aislaron en medio Tryptic Soy Agar (TSA). Morfológicamente fueron variadas, algunas cepas mostraban colonias pequeñas a medianas, algunas blancas y otras amarillentas, todas de forma redondeada y bordes lisos, con el característico olor rancio (Fig. 7).



Fig. 7. Colonias aisladas en medio Tryptic Soy Agar (TSA).

9.6. Tinción Gram y Catalasa:

El 100% (n=174) de las cepas que crecieron en Tryptic Soy Broth (TSB), fueron cocos Gram positivos y catalasa positivas (Fig. 8).

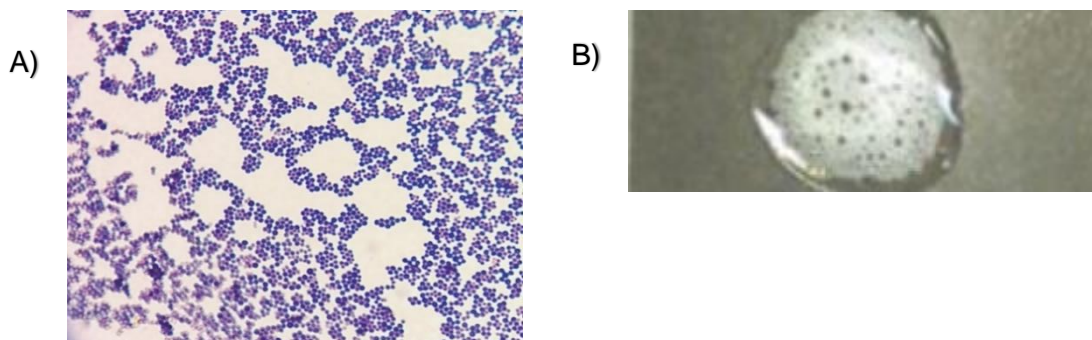


Fig. 8. Tinción Gram: cocos Gram positivos (Fig. 7A). Prueba de la catalasa positiva (Fig. 7B).

9.7. Coagulasa y Beta-galactosidasa:

La prueba de la coagulasa se les realizó a las cepas que fermentaron el manitol, resultando el 81% (n=66) coagulasa positivas y 19% (n=15) coagulasa negativas, determinando así el porcentaje de CoPs y CoNs. A estas mismas cepas se les realizó la prueba de la β - galactosidasa en TSA con X-gal., siendo positivas el 55% (n=45), negativas el 9% (n=7) y no se realizó en un 36% (n=29) de las muestras por falta de reactivo (Fig. 9 y Fig. 10).

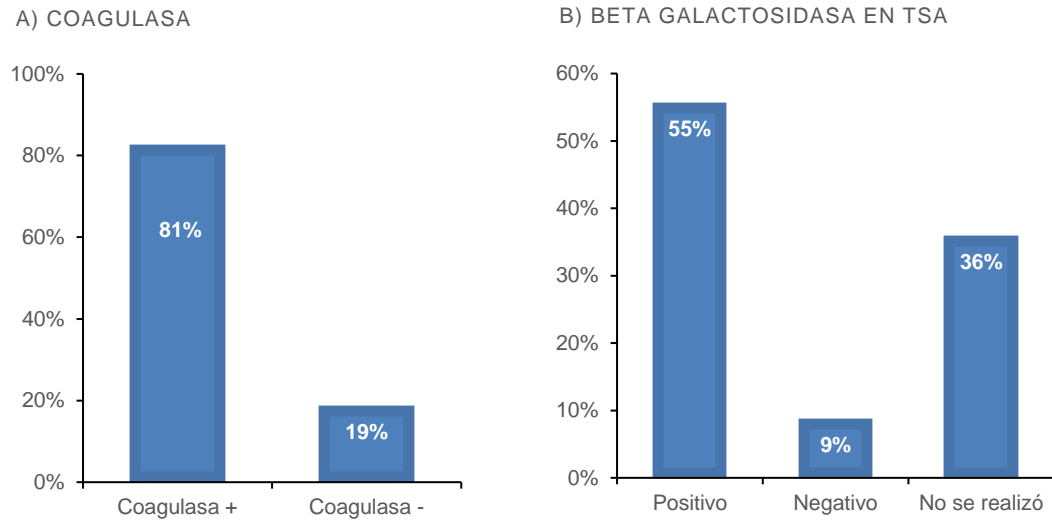


Fig. 9. Porcentaje de cepas Coagulasa positivas y negativas (Fig. 8A). Porcentaje de cepas positivas al test de la beta galactosidasa (algunos no realizados) (Fig. 8B).

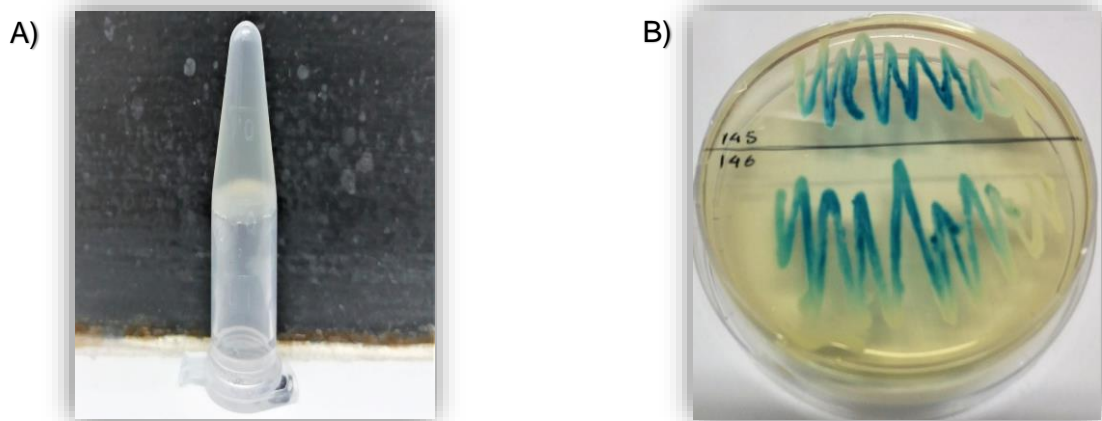


Fig. 10. Prueba de la Coagulasa positiva (Fig. 9A), se observa la coagulación del plasma. Prueba de la β - galactosidasa en TSA con X-gal (Fig. 9B), se observan las colonias crecidas que viran al color azul.

Todas las cepas (n=188) se conservaron a -80°C en el Laboratorio de Ciencias Microbiológicas de la Facultad de Veterinaria.

9.8. Antibiogramas:

Se le realizó el test de susceptibilidad a antimicrobianos a la mayoría de las cepas manitol positivas y algunas manitol negativas provenientes de piel (n=81). Los dos antimicrobianos que demostraron mayor resistencia fueron la penicilina con un 61,7% (n=50) de cepas resistentes y la oxacilina con un 34,6% (n=28) de cepas resistentes. Por otro lado, los antimicrobianos que demostraron menor resistencia fueron la cefalotina, vancomicina y gentamicina, en todos los casos se obtuvo un 1,2% (n=1) (Fig. 11 y Fig. 12).

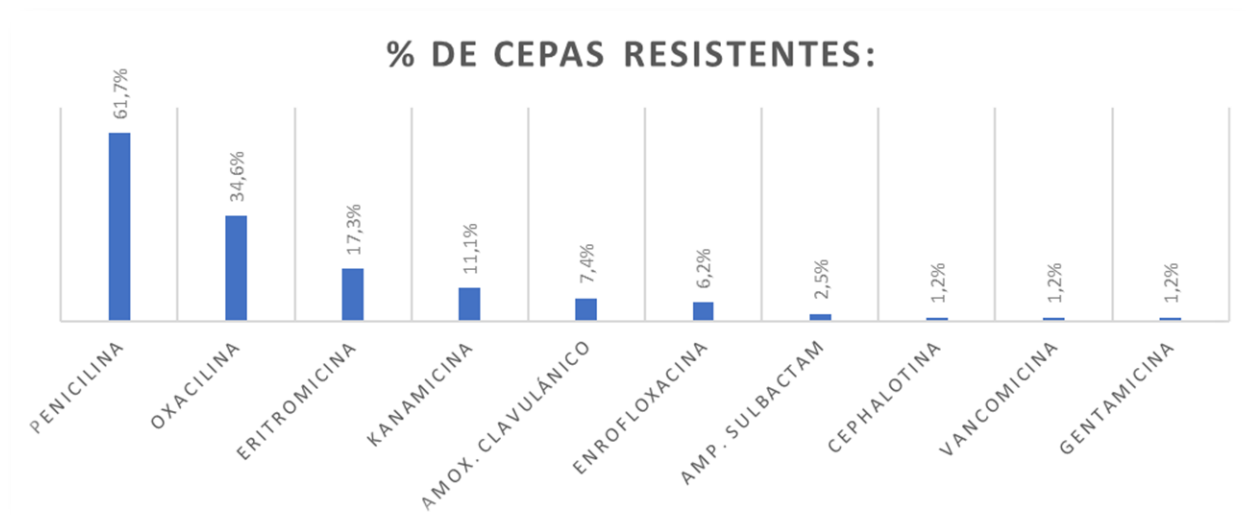


Fig. 11. Porcentaje de cepas resistentes a cada uno de los 10 antimicrobianos utilizados.

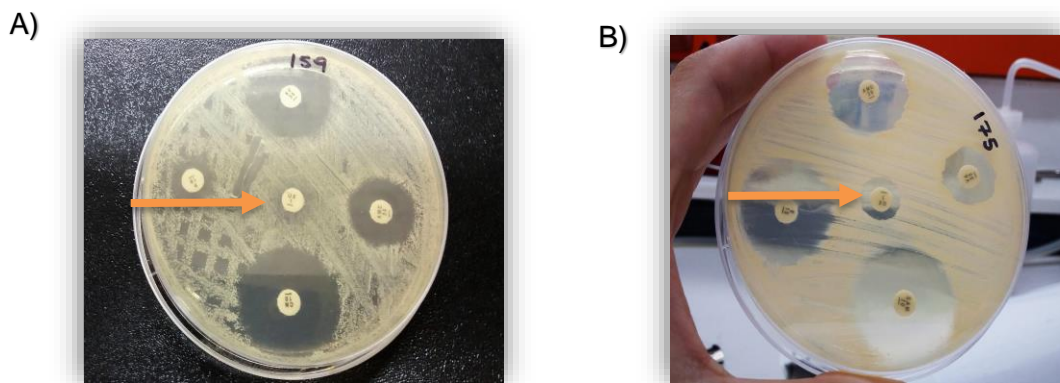


Fig. 12. Cepas que mostraron fenotipo de resistencia a la oxacilina. Cepa 159 no presentó halo de inhibición (Fig. 11A). Cepa 175 con leve halo de inhibición (Fig. 11B).

Un 16% (n=13) fenotípicamente se podían clasificar como MDR (resistentes a múltiples drogas).

9.9. Identificación del gen de resistencia mediante PCR:

Se realizó la prueba de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) en búsqueda del gen *mecA* a las cepas que demostraron fenotipo de resistencia a oxacilina en el test de susceptibilidad a antimicrobianos. Se encontraron 7 cepas que presentaron este gen. (Fig. 13)

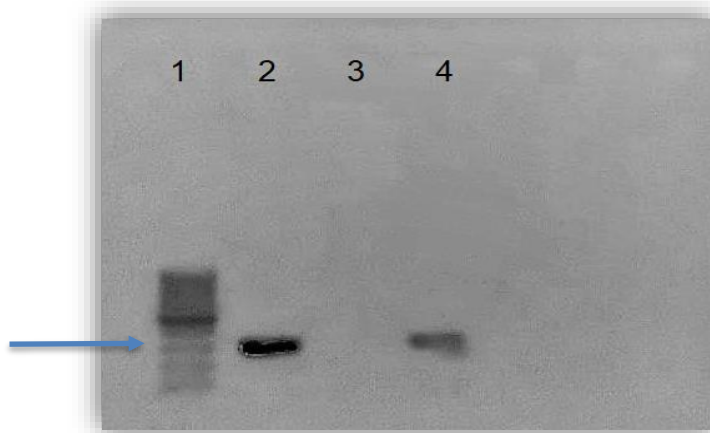


Fig. 13. Electroforesis de los productos de PCR para detección del gen *mecA*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular (la flecha marca la banda de 310 pb), Carril 2: Control positivo (cepa de MRSA), Carril 4: cepa 62 (*S.pseudintermedius*).

9.10. Identificación de las cepas por secuenciación del ARNr 16S:

En paralelo a este trabajo, mi tutora Leticia Diana realizó su tesis de Maestría identificando las cepas por secuenciación del ARNr 16S. Se identificaron un total de 67 cepas, las cepas identificadas fueron todas las aisladas como manitol positivo y las cepas manitol negativo provenientes de piel.

Dentro de las siete cepas que presentaron el gen *mecA*, la cepa n° 7 era un *S. pseudintermedius* proveniente de farínge; la cepa n° 17 era un *S. epidermidis* proveniente de piel; la cepa n° 30 era un *S. pseudintermedius* proveniente de piel; la cepa n° 62 era un *S. pseudintermedius* proveniente de farínge; la cepa n° 125 era un *S. cohnii sub. Urealiticus* proveniente de zona perianal; la cepa n° 136 era un *S. haemolyticus* proveniente de zona perianal; y la cepa n° 159 era un *S. haemolyticus* proveniente de farínge.

9.11. Flujoograma:

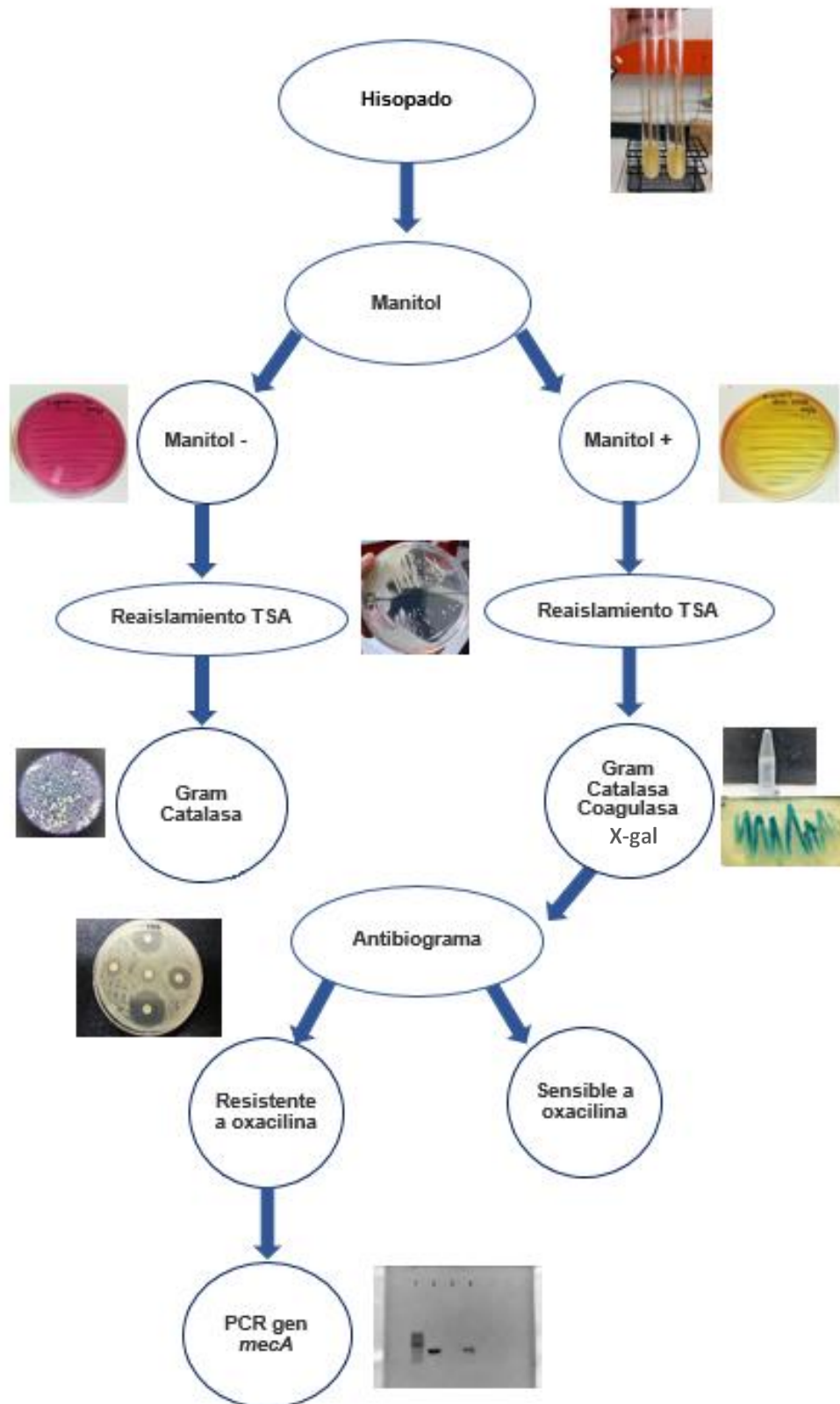


Fig. 14. Diagrama de flujo de los procedimientos realizados en este trabajo.

10. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

La resistencia a los antimicrobianos es un problema global, que se está acrecentando cada vez más con el paso del tiempo. Los microorganismos resistentes están presentes tanto en humanos como animales, alimentos y medio ambiente. En el año 2015 la OMS junto con la FAO y la OIE, elaboraron el Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos, con el enfoque “Una Salud”. El concepto “Una Salud” incluye al hombre y a los animales, el vínculo entre estos y también al medio ambiente. Los microorganismos resistentes que se encuentran en humanos, pueden propagarse a los animales y viceversa, así como también al medio ambiente. Las principales causas del aumento de la resistencia son el uso excesivo y la auto prescripción de antimicrobianos en la salud humana, el uso indiscriminado en la producción animal como tratamiento de animales sanos y promotores de crecimiento, también en la acuicultura y en los animales de compañía. Además, colabora la venta sin receta y la liberación de microorganismos con genes de resistencia en el ambiente por medio de desechos y efluentes. Varios hallazgos confirman la existencia de transferencia de genes de resistencia, mediados por plásmidos, en diferentes especies de microorganismos y en diferentes ecosistemas. El principal objetivo de este plan de acción es el asegurar que los antimicrobianos sigan siendo efectivos para tratar enfermedades tanto en los humanos como en los animales. También el concientizar sobre el uso responsable de los mismos y asegurar el acceso mundial a medicamentos de buena calidad (Ramon Pardo y col., 2018).

Este trabajo, se enfocó en la búsqueda de resistencia a antimicrobianos en aislamientos de *Staphylococcus sp.* en muestras tomadas de caninos. Pero la existencia de resistencia en estos microorganismos, es solo una pequeña parte que representa el gran problema al que nos enfrentamos mundialmente.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo determinaron, como era esperable, una alta resistencia a la penicilina (n=50). Además, se pudo confirmar una alta resistencia también a la oxacilina (n=28). Todos los antimicrobianos utilizados tuvieron una o más cepas que demostraron resistencia. En cuanto a la resistencia fenotípica y genotípica, de las 28 cepas que demostraron resistencia a la oxacilina en el antibiograma, solamente 7 cepas expresaron el gen *mecA*. Otro punto a destacar es que 13 cepas resultaron ser resistentes a múltiples drogas (MDR).

En el año 2015, se realizó en Lituania un relevamiento de los patrones de resistencia en *Staphylococcus sp.* aislados a partir de animales de compañía (Ruzauskas y col., 2015). En esa investigación se reportó que la resistencia a la meticilina estaba concentrada en mayor proporción en cepas de *S. pseudintermedius*. Esto también sucedió en nuestros aislamientos (de siete

cepas que expresaron el gen *mecA*, tres fueron *S. pseudintermedius*). Este género es la especie de *Staphylococcus sp.* que está más presente en caninos, por lo que es la que tiende a acumular mayor cantidad de genes de resistencia. Que esta especie presente mayor porcentaje de resistencia se explicaría por su mayor presencia y asociación histórica con el hospedero.

En este trabajo el antimicrobiano de elección para la detección fenotípica de la resistencia a la meticilina fue la oxacilina, ya que en ese momento era lo recomendado por la CLSI. Pero actualmente, la cefoxitina ha sido reportada por investigadores en pruebas de difusión en disco con mejor correlación con la presencia del gen *mecA* que la oxacilina (Horna y col., 2015). Por este motivo, actualmente la CLSI recomienda el uso de la cefoxitina para probar por la prueba de disco difusión, la resistencia a la meticilina (Jorgensen y Turnidge, 2015). Este puede ser uno de los motivos por los que hubo variación entre la detección fenotípica y genotípica de resistencia.

Actualmente el gen *mecA* no es el único que determina genéticamente la resistencia a la meticilina. En Inglaterra en el año 2007, se aisló una cepa de *S. aureus* a partir de vacas con mastitis, que en cuanto a su fenotipo demostró resistencia a la meticilina, pero genotípicamente no poseía el gen *mecA* ni la proteína PBP2a (García-Álvarez y col., 2011). En el análisis genético se encontró en esta cepa un nuevo gen, que tenía un 69% de homología con el gen *mecA* y codificaba una proteína con un 63% de homología de aminoácidos con la PBP2a. A este nuevo gen se lo denominó *mecC*. A diferencia de *mecA*, el *mecC* tiene menor afinidad por la oxacilina que por la cefoxitina, lo que podría explicar la dificultad para detectarlo con métodos fenotípicos. Sumado a esto, la proteína codificada por el gen *mecC* es menos estable a 37°C (Kim y col., 2012; Tsubakishita y col., 2010). También este nuevo gen ha sido detectado además de en rumiantes y el hombre, en animales de compañía (Walther y col., 2012). Por este motivo es interesante que se sigan realizando investigaciones sobre la presencia del *mecC*.

Si un *Staphylococcus* es resistente a la meticilina, implica que tiene resistencia a todos los betalactámicos, por lo que la importancia radica en las pocas alternativas que tenemos actualmente para tratar infecciones por estos microorganismos resistentes. También es importante destacar que el género *Staphylococcus* tiene facilidad para incorporar elementos exógenos por transferencia horizontal, lo que se da dentro de una misma especie como con otras especies. Esto le permite ser un patógeno exitoso y que se adapta con facilidad al medio y a los antimicrobianos, por la adquisición de factores de resistencia a antimicrobianos (Kuroda y col., 2001; Baba y col., 2002).

Además, es importante destacar que se han realizado estudios entre perros y

sus dueños y se confirmó la transmisión zoonótica del *S. pseudintermedius* ya que se encontraron genotipos idénticos en los aislamientos de este microorganismo en las parejas perro-propietario (Frank y col., 2009).

Estos *Staphylococcus* resistentes generan un riesgo ya que estos genes de resistencia pueden transferirse entre la misma y entre diferentes especies de microorganismos y estos microorganismos resistentes transmitirse entre los animales, el ambiente y el hombre.

Se concluye que existen cepas de *Staphylococcus sp.* meticilino resistentes circulando en la población de caninos de Montevideo. Además, luego de analizar los resultados podemos apreciar que las otras dos hipótesis también se cumplen. Es decir que existen diferentes cepas de *Staphylococcus sp.* en las poblaciones de caninos residentes en Montevideo y que animales sin sintomatología característica (pioderma y/u otitis) son portadores de cepas de *Staphylococcus sp.*

Es importante que se sigan realizando trabajos en esta temática tan importante como es la resistencia antimicrobiana. Actualmente se continúan realizando trabajos en el área. También sería de utilidad, desarrollar un estudio que incluya un muestreo paralelo de dueños y sus mascotas, para poder hacer un análisis de cepas y resistencias compartidas entre ambos.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aires de Sousa, M; Lencastre, H. (2004) Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 40(2):101–111.
2. Aklilu, E; Zunita, Z; Hassan, L; Chen, HC. (2010) Phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from dogs and cats at University Veterinary Hospital, Universiti Putra Malaysia. *Tropical biomedicine*, 27(3): 483–492.
3. Baba, T; Takeuchi, F; Kuroda, M; Yuzawa, H; Aoki, K; Oguchi, A; Nagai, Y; Iwama, N; Asano, K; Naimi, T; Kuroda, H; Cui, L; Yamamoto, K; Hiramatsu, K. (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *The Lancet*, 359(9320):1819–1827.
4. Bado, I; Cordeiro, N; García, V; Robino, L; Seija, V; Vignoli, R. (2008) Principales grupos de antibióticos. Instituto de Higiene. Disponible en: <http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Principales%20grupos%20de%20antibi%F3ticos.pdf> Fecha de Consulta: 27/8/2018.
5. Balazs Mayanz, V. (2012) Pioderma en el canino. *Disponible en:* <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030312/031201.pdf>. Fecha de consulta: 27/3/19
6. Bannoehr, J; Guardabassi, L. (2012) *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary Dermatology*, 23(4):253–66.
7. Castanon, J.I.R. (2007) History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science*, 86(11):2466–2471.
8. Cavaco, L. M; Frimodt-Møller, N; Hasman, H; Guardabassi, L; Nielsen, L; Aarestrup, F. M. (2008) Prevalence of Quinolone Resistance Mechanisms and Associations to Minimum Inhibitory Concentrations in Quinolone-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Humans and Swine in Denmark. *Microbial Drug Resistance*, 14(2):163–169.
9. Chans, G.R. (2002) Estafilococos. Departamento de Bacteriología y Virología, Facultad de Medicina, Instituto de Higiene. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2017.pdf> Fecha de consulta: 24/8/2018.

10. Cohn, L.A; Middleton, J.R. (2010) A veterinary perspective on methicillin-resistant staphylococci. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(1):31–45.
11. Dinges, M.M; Orwin, P.M; Schlievert, P.M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1):16–34.
12. Errecalde, J.O. (2004) Uso de antimicrobianos en animales de consumo: incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. Roma, FAO, 61 p.
13. FAO. (2017) El Plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos 2016-2020. Disponible en: <http://www.fao.org/3/b-i5996s.pdf>
Fecha de consulta: 23/8/2018.
14. Forsythe, P.J; Hill, P.B; Thoday, K.L; Brown, J. (2002) Use of computerized image analysis to quantify staphylococcal adhesion to canine corneocytes: does breed and body site have any relevance to the pathogenesis of pyoderma? *Veterinary Dermatology*, 13(1):29–37.
15. Foster, T.J. (2004) The *Staphylococcus aureus* “superbug.” *The Journal of Clinical Investigation*, 114(12):1693–1696.
16. Frank, L. A; Kania, S. A; Kirzeder, E. M; Eberlein, L. C; Bemis, D.A. (2009) Risk of colonization or gene transfer to owners of dogs with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Dermatology*, 20(5-6):496–501.
17. Frank, L.A; Loeffler, A. (2012) Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. *Veterinary Dermatology*, 23(4):283–91, e56.
18. García-Álvarez, L; Holden, M.T; Lindsay, H; Webb, C.R; Brown, D.F; Curran, M.D; Walpole, E; Brooks, K; Pickard, D.J; Teale, C; Parkhill, J; Bentley S.D; Edwards, G.F; Girvan, E.K; Kearns, A.M; Pichon, B; Hill, R.L; Larsen, A.R; Skov, R.L, Peacock, S.J; Maskell, D.J, Holmes, M.A. L. (2011) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(8):595–603.
19. Greene, C.E. (2008) Infecciones por estafilococos. En: Greene, C.E. *Enfermedades infecciosas del perro y el gato*. Buenos Aires, Editorial Intermédica, p 352-356.
20. Hanselman, B.A; Kruth, S.A; Rousseau, J; Weese, J.S. (2009) Coagulase

- positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *The Canadian Veterinary Journal*. 50(9):954–958.
21. Hiramatsu, K; Cui, L; Kuroda, M; Ito, T. (2001) The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 9(10):486–493.
22. Horna, G; Astocondor, L; Jacobs, J; García, C. (2015) Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. *Revista Española de Quimioterapia*, 28(2):98-100.
23. Huebner, J; Goldmann, D.A. (1999) Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annual Review of Medicine*, 50:223–236.
24. Ito, T; Kuwahara-Arai, K; Katayama, Y; Uehara, Y; Han, X; Kondo, Y; Hiramatsu K. (2014) Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) analysis of MRSA. *Methods in Molecular Biology*. 1085: 131-148.
25. Jonas, D; Speck, M; Daschner, FD; Grundmann, H. (2002) Rapid PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from screening swabs. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5):1821–1823.
26. Jorgensen, J. H., Turnidge, J. D. (2015) Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. En: Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Carroll, K.C., Funke, G, Landry, M.L., Richter, S.S., Warnock, D.W. *Manual of Clinical Microbiology*. 11^a ed. Washington, American Society of Microbiology, p 1253-1273
27. Kim, C; Milheiriço, C; Gardete, S; Holmes, M.A; Holden, M.T.G., de Lencastre, H; Tomasz, A. (2012) Properties of a Novel PBP2A Protein Homolog from *Staphylococcus aureus* Strain LGA251 and Its Contribution to the β -Lactam-resistant Phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 287(44):36854–36863.
28. Kloos, W.E; Bannerman, T.L. (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(1):117–140.
29. Kloos, W.E; Schleifer, K.H. (1975) Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin II. Descriptions of Four New Species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*¹. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 25(1):62–79.
30. Kuroda, M; Ohta, T; Uchiyama, I; Baba, T; Yuzawa, H; Kobayashi, I;

- Hiramatsu, K. (2001) Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 357(9264):1225–1240.
31. Landers, T. F; Cohen, B; Wittum, T. E; Larson, E.L. (2012) A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential. *Public Health Reports*, 127(1): 4–22.
32. Liebana, E; Carattoli, A; Coque, T.M; Hasman, H; Magiorakos, A.P; Mevius, D; Peixe, L; Poirel, L; Schuepbach-Regula, G; Torneke, K; Torren-Edo, J; Torres, C; Threlfall, J. (2013) Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum β -lactamases or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clinical infectious diseases*, 56(7):1030–1037.
33. Livermore, D.M. (1991) Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 78(Sup):7–16.
34. Lloyd, D.H. (2007) Reservoirs of Antimicrobial Resistance in Pet Animals. *Clinical Infectious Diseases*, 45(Sup_2): S148–S152.
35. Lozano, C; Aspiroz, C; Gómez-Sanz, E; Tirado, G; Fortuño, B; Zarazaga, M; Torres, C. (2013) Caracterización de cepas de *Staphylococcus epidermidis* y *S. haemolyticus* resistentes a meticilina y linezolid en un hospital español. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(3):136–141.
36. Lozano, C; Rezusta, A; Ferrer, I; Pérez-Laguna, V; Zarazaga, M; Ruiz-Ripa, L; Revillo, M.J; Torres, C. (2017) *Staphylococcus pseudintermedius* Human Infection Cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(4):268–270.
37. Lyon, B.R; Skurray, R. (1987) Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic basis. *Microbiological Reviews* 51: 88-134.
38. Magiorakos, A.P; Srinivasan, A; Carey, RB; Carmeli, Y; Falagas, M.E; Giske, C.G; Harbarth, S; Hindler, J.F; Kahlmeter, G; Olsson-Liljequist, B; Paterson, DL; Rice, L.B; Stelling, J; Struelens, M.J; Vatopoulos, A; Weber, J.T; Monnet D.L. (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3):268–281.
39. Matousek, J.L; Campbell, K.L. (2002) A comparative review of cutaneous pH. *Veterinary Dermatology*, 13(6):293–300.

40. McEwan, N.A; Mellor, D; Kalna, G. (2006) Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine corneocytes: a preliminary study comparing noninflamed and inflamed atopic canine skin. *Veterinary Dermatology*, 17(2):151–154.
41. Mellon, M; Benbrook, C; Lutz Benbrook, K. (2001) Hogging it: Estimates of antimicrobial abuse in livestock. Cambridge, MA, Union of Concerned Scientists. Disponible en: <http://s3.documentcloud.org/documents/330307/jan-2001-hogging-it.pdf> Fecha de consulta: 10/10/2018.
42. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2017) Plan Nacional de contención de la Resistencia Antimicrobiana de Uruguay. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/plan_nacional_de_contencion_de_la_resistencia_antimicrobiana_de_uruguay.pdf. Fecha de consulta: 27/03/2019.
43. Morris, D.O; Rook, K A; Shofer, F.S; Rankin, S.C. (2006) Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates. *Veterinary Dermatology*, 17(5): 332–337.
44. Nimmo, G.R; Bell, J.M; Mitchell, D; Gosbell, I.B; Pearman, J.W; Turnidge, J.D. (2003) Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* in Australian Teaching Hospitals, 1989-1999. *Microbial Drug Resistance*, 9(2):155–160.
45. Organización Mundial de la Salud. (2018) Importancia de la resistencia a los antimicrobianos para la salud pública. Disponible en: http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/es. Fecha de consulta: 12/11/2018.
46. Organización Mundial de la Salud. (2017) Directrices de la OMS sobre el uso de antimicrobianos de importancia médica de animales destinados a la producción de alimentos. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259246/WHO-NMH-FOS-FZD-17.4-spa.pdf?sequence=1>. Fecha de consulta: 12/11/2018.
47. Organización Mundial de la Salud. (2016) Plan de acción mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf?sequence=1>. Fecha de consulta: 12/11/2018.

48. Otto, M. (2009) *Staphylococcus epidermidis* — the “accidental” pathogen. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(8):555–567.
49. Otto, M. (2004) Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Frontiers in Bioscience*, 9:841–863.
50. Pulverer, G; Pillich, J. (1970) Pathogenic Significance of Coagulase-Negative Staphylococci. *Bayer-Symposium*, 3^o. Colonia, Alemania, p. 91–97.
51. Quinn, P.J. (2005) *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. Zaragoza, Acribia, 678 p.
52. Ramon Pardo, P; Sati, H; Galas, M. (2018) Enfoque de Una Salud en las acciones para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos desde una óptica latinoamericana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35:103-109.
53. Rubin, J.E; Ball, K.R; Chirino-Trejo, M. (2011) Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. *The Canadian Veterinary Journal. La revue veterinaire canadienne*, 52(2):153–157.
54. Ruzauskas, M; Couto, N; Kerziene, S; Siugzdiniene, R; Klimiene, I; Virgailis, M; Pomba, C. (2015) Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance patterns of methicillin-resistant staphylococci in Lithuanian pet animals. *Acta veterinaria Scandinavica*, 57:27.
55. Saijonmaa-Koulumies, L.E; Lloyd, D.H. (2002) Colonization of neonatal puppies by *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Dermatology*, 13(3):123–130.
56. Schmitt, C.K; Meysick, K.C; O'Brien, A.D. (1999) Bacterial toxins: friends or foes? *Emerging Infectious Diseases*, 5(2):224–234.
57. Scott, D. (2001) Bacterial Skin Diseases. En: Scott D.H., Miller Jr, W.H., Craigm, V.M.D. Griffin, E. Muller & Kirk's Small Animal Dermatology. 6^a ed. Philadelphia, Saunders, p. 274–335.
58. Somayaji, R; Priyantha, M.A.R; Rubin, J.E; Church, D. (2016) Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(4): 471–476.
59. Stegmann, R; Burnens, A; Maranta, C.A; Perreten, V. (2010) Human infection

associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(9): 2047–2048.

60. Tse, H; Chan, E; Lam, C. W; Leung, K. F; Chow, P; Lee, K. C; Sze, K. H; Cheung, S; Tse, M. K; Ho, P. L; Leung, S. P; Lau, S; C Y Woo, P; Yuen, K. Y. (2012) Production of 2-aminophenoxazin-3-one by *Staphylococcus aureus* causes false-positive results in β -galactosidase assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(11), 3780–3782.
61. Tsubakishita, S; Kuwahara-Arai, K; Sasaki, T; Hiramatsu, K. (2010) Origin and Molecular Evolution of the Determinant of Methicillin Resistance in *Staphylococci*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10):4352–4359.
62. Turnidge, J; Chang, FY; Fowler, VG; Rao, N. (2002) *Staphylococcus aureus*. En: Yu, VL; Webar, R; Raoult, D; editors. *Antimicrobial Therapy and Vaccines*. 2°ed. New York, Apple Trees Productions LLC. V.1, p. 631-58.
63. Van Duijkeren, E; Kamphuis, M; Van der Mije, I.C; Laarhoven, L.M; Duim, B; Wagenaar, J.A; Houwers, D.J. (2011) Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. *Veterinary Microbiology*, 150(3-4):338–343.
64. Vila, J; Martí, S; Sánchez-Céspedes, J. (2007) Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6):1210–1215.
65. Walther, B; Wieler, L.H; Vincze, S; Antão, E.M; Brandenburg, A; Stamm, I; Kopp, PA; Kohn, B; Semmler, T; Lübke-Becker, A. (2012) MRSA variant in companion animals. *Emerging Infectious Diseases*, 18(12):2017-20.
66. Weese, J.S; Scott Weese, J; Van Duijkeren, E. (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4):418–429.
67. WHO. World Health Organization. Regional Office for Europe. (2011) Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. Copenhagen. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s18396en/s18396en.pdf> Fecha de consulta: 10/10/2018.
68. Yotti Álvarez, C.L. (2010) Novedades en el diagnóstico y tratamiento de la Pioderma Canina. *Profesión veterinaria*, 16 (68):12-15. Disponible en: <http://www.colvema.org/pdf/1215pioderma.pdf>. Fecha de consulta:

27/03/2019.

69. Zhang, W; Hao, Z; Wang, Y; Cao, X; Logue, C. M; Wang, B; Wu, C; Yang, J; Shen, J. (2011) Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and veterinary staff in China. *The Veterinary Journal*, 190(2): e125–e129.