



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE RESISTENCIA A
ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *Staphylococcus spp.*
AISLADAS DE PIODERMA Y OTITIS EN CANINOS”**

MARCELA ALEJANDRA MOLINA MENDOZA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESORA GUÍA: T.M. MARÍA TERESA ULLOA FLORES

Financiamiento: Proyecto MULT-O6/03-2

SANTIAGO, CHILE
2011



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE RESISTENCIA A
ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *Staphylococcus spp.*
AISLADAS DE PIODERMA Y OTITIS EN CANINOS”

MARCELA ALEJANDRA MOLINA MENDOZA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA : T.M. Maria Teresa Ulloa
PROFESORA CONSEJERA : Dra. Loreto Muñoz
PROFESORA CONSEJERA : Dra. Consuelo Borie

SANTIAGO, CHILE
2011

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
Antimicrobianos	6
Resistencia antimicrobiana	6
Mecanismos de transferencia	8
Mecanismos de transferencia de genes	9
<i>Staphylococcus coagulasa</i> positivo	10
Antimicrobianos de uso habitual en medicina veterinaria	12
β-lactámicos	12
Tetraciclinas	13
Macrólidos y Lincosamidas	14
Quinolonas	16
OBJETIVOS	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Cepas	20
Detección de genes de resistencia a β lactámicos (<i>mecA</i>), tetraciclinas (<i>tetM</i>), macrólidos y lincosamidas (<i>ermB</i>)	21
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	21
Detección de la base genética de resistencia a Enrofloxacino	24
PCR - Secuenciación del QRDR del gen <i>gyr(A)</i> y <i>grr(A)</i>	24
Relación de fenotipo y genotipo de resistencia	27
Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) a eritromicina por E-test	27
Determinación de la relación de los niveles de resistencia fenotípicas determinadas por CIM y el genotipo de resistencia	28
Método D-test	28
Análisis Estadístico	28
RESULTADOS	29
Detección genes de resistencia a β lactámicos (<i>mecA</i>), tetraciclinas (<i>tetM</i>), macrólidos y lincosamidas (<i>ermB</i>)	29
Determinantes genéticos de resistencia a β-lactámicos	29
Determinantes genéticos de resistencia a tetraciclinas	29
Determinantes genéticos de resistencia a macrólidos y lincosamidas	30
Determinación de resistencia a quinolonas mediante detección de mutaciones de los genes <i>gyr(A)</i> y <i>grr(A)</i> del QRDR	31
Relación de fenotipo y genotipo de resistencia a los antibióticos antes descritos	33
Relación entre los niveles de resistencia fenotípicas (CIM) y el genotipo	35
Método D-test.	36
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47

RESUMEN

Staphylococcus spp., forman parte de la microbiota de piel y mucosas de caninos, pero son además patógenos oportunistas principalmente las especies *S. intermedius* y en menor medida *S. schleiferi* subesp. *coagulans* y *S. aureus*, produciendo pioderma y otitis externa. La terapia de este tipo de patologías por lo general es empírica y prolongada, pudiendo provocar resistencia antimicrobiana.

El objetivo de este estudio fue caracterizar, a través de la detección de genes, las bases moleculares de resistencia a antimicrobianos como macrólidos (*ermB*), tetraciclinas (*tetM*), β -lactámicos (*mecA*) y detectar la mutación de los genes *gyrA* y *griA* que determinan la resistencia a quinolonas.

De un total de 170 cepas aisladas desde otitis externa (53) y pioderma (117), 1 cepa presentó resistencia fenotípica a oxacilina, 16 a tetraciclinas, 18 a macrólidos y 15 a quinolonas. La detección del gen *mecA* fue de un 100%, *tetM* un 81,25% (13) y *ermB* 94% (17). La mutación responsable de la resistencia en los genes *gyrA* y *griA* fue detectada en el 100% de las cepas que se enviaron a secuenciar, encontrándose en la posición 84 en el caso de *gyrA* reemplazando el aminoácido serina por una leucina y en la posición 80 para *griA* sustituyendo una serina por una isoleucina.

Si bien la prevalencia de resistencia en Chile es aun menor en comparación a otros países, este es el primer estudio a nivel nacional que ayuda a conocer los mecanismos de resistencia en las bacterias de las mascotas, destacando además por primera vez en país, la presencia del gen *mecA* en *Staphylococcus intermedius* aislado de un canino.

ABSTRACT

Staphylococcus spp, are part of the microbiota of dog skin and mucous membranes, but are also opportunistic pathogens mainly species *S. intermedius* and to a lesser extent *S. schleiferi* subsp. *coagulans* and *S. aureus*, causing pyoderma and otitis externa. The therapy of such diseases is usually empirical and prolonged and may cause antibiotic resistance.

The aim of this study was to characterize, through the detection of genes, the molecular basis of resistance to antimicrobial β -lactams (*mecA*), tetracycline (*tetM*), macrolides (*ermB*) and the mutation of the genes *gyrA* and *griA* determining quinolone resistance.

Of a total of 170 strains isolated from external otitis (53) and pyoderma (117), one strain showed phenotypic resistance to oxacillin, 16 to tetracycline, 1, 15 to macrolides and 18 to quinolones. Detection of *mecA* gene was 100%, *tetM* 81.25% (13) and 94% *ermB* (17). The mutation responsible for resistance in *gyrA* and *griA* genes was detected in 100% of the strains that were sent to sequencing, was found at position 84 in *gyrA* for replacing the serine by a leucine and at position 80 for *griA* replacing a serine by isoleucine.

Although the prevalence of resistance in Chile is even lower compared to other countries, this is the first national study to help understand the mechanisms of resistance in bacteria from pets, while stressing the first time in the country, presence of *mecA* in *Staphylococcus intermedius* isolated from canine.

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios en medicina humana dan cuenta a nivel mundial de la preocupación que existe actualmente acerca de las altas tasas de resistencia a las distintas terapias antimicrobianas, provocando que un número considerable de patologías sean cada vez más difíciles de solucionar. En medicina veterinaria el panorama internacional no difiere de esta situación, aunque en menor escala.

Los animales de compañía han incrementado considerablemente su población y debido a la mayor preocupación por éstos, el número de visitas al médico veterinario también han aumentado y uno de los motivos de consulta más frecuente corresponde a las enfermedades dermatológicas, como por ejemplo pioderma y otitis externa. El género bacteriano más frecuentemente asociado a este tipo de patologías es *Staphylococcus*, dentro del cual se destaca *S. intermedius*. Esta especie forma parte de la microbiota normal de piel y superficies mucosas, pero en determinadas ocasiones se comporta como agente etiológico de los cuadros patológicos mencionados.

Los tratamientos antimicrobianos destinados a tratar estos cuadros infecciosos en su mayoría son empíricos y prolongados, los cuales en muchas ocasiones al no escogerse el antimicrobiano y/o dosis adecuada o por incorrecta administración por parte de los propietarios, resultan en terapias no indicadas, provocando además resistencia de la bacteria a los fármacos por presión selectiva.

Finalmente, es conocida la importancia que representan las mascotas en la sociedad, y el aumento de consultas al médico veterinario por cuadros dermatológicos producidos por bacterias especialmente *S. intermedius*, y lo complicado del tratamiento por su largo período de administración. Por otro lado, considerando el aumento de resistencia antimicrobiana a nivel mundial y nacional, y el potencial riesgo de transmisión de bacterias patógenas que representa para humanos en contacto con estos animales (y viceversa), es que se realizó este estudio para determinar las bases moleculares de bacterias que presentan resistencia fenotípica a determinados antimicrobianos, para un mejor entendimiento del riesgo que representan y para un uso prudente y racional de estos fármacos en la actualidad.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Antimicrobianos

La terapia antimicrobiana es un término amplio usado para los compuestos químicos utilizados como tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos (Koletar, 2000).

Los agentes antimicrobianos pueden clasificarse de diferentes maneras, una de ellas es de acuerdo a su efecto antibacteriano, es así como pueden ser bactericidas, los cuales tienen un efecto letal sobre el organismo o bacteriostáticos, los cuales inhiben el crecimiento microbiano. Cada grupo de antibióticos actúa preferentemente de una u otra forma, aunque un mismo antibiótico puede comportarse como bactericida o bacteriostático, dependiendo de la concentración que alcance en su sitio blanco, o de su afinidad por el sitio blanco de un determinado microorganismo (Calvo y Martínez, 2009). Sin embargo, la forma más común de categorizar estos agentes es de acuerdo a su mecanismo de acción, los cuales corresponden a:

- Inhibición de la síntesis de pared bacteriana
- Inhibición de la síntesis de proteínas
- Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos
- Inhibición de metabolitos esenciales (Murray *et al.*, 2005)

Resistencia antimicrobiana

De acuerdo a lo descrito por el *Clinical and Laboratory Clinical Institute* (CLSI), (2010) la categoría de resistencia bacteriana implica que los aislados no son inhibidos por un agente antibacteriano en las concentraciones y en el ritmo horario adecuado y generalmente utilizado, y/o cuando se demuestra que la concentración inhibitoria mínima (CIM) o zona de diámetro de inhibición, caen en el rango donde es probable que se presenten los mecanismos específicos de resistencia microbiana (por ejemplo β -lactamasa), y la eficacia clínica del agente es poco confiable en los estudios de resistencia. A mediados del siglo XX, importantes avances en el desarrollo de fármacos antibacterianos ayudaron a cambiar la evolución de los cuadros infecciosos a favor de los seres humanos. Sin embargo, la euforia sobre la potencial conquista de enfermedades infecciosas fue de corta duración. Casi tan pronto como los fármacos

antibacterianos se desarrollaron, las bacterias manifestaron variados mecanismos de resistencia, y así como el uso de antimicrobianos se expandía, también aumentaba el nivel y la complejidad de los mecanismos de resistencia exhibidos por los patógenos bacterianos (Tenover, 2006). La importancia de la resistencia antimicrobiana es que se relaciona con el incremento de la morbilidad, mortalidad y los costos asociados a los tratamientos de las enfermedades infecciosas. La amenaza de la resistencia antimicrobiana nunca ha sido tan grande como lo es actualmente y uno de los factores claves que explican en gran medida este aumento, es el incremento en el uso de los antibióticos, tanto en medicina humana y veterinaria (Hawkey y Jones, 2009).

Las bacterias pueden ser intrínsecamente resistentes a más de una clase de agente antimicrobiano o adquieren resistencia a través de mutaciones o vía adquisición de genes de resistencia desde otros organismos. La resistencia intrínseca describe la propiedad de un género o especie específica basada en la carencia o inaccesibilidad de sitios blancos para antimicrobianos, un ejemplo de ello es la resistencia a β -lactámicos en células deficientes de pared, tales como *Mycoplasma* spp. (Schwarz y Noble, 1999 y Umber y Bender, 2009).

La resistencia adquirida representa la propiedad de una cepa específica basada en la mutación de genes cromosomales o la presencia de elementos genéticos móviles que poseen información para resistencia de diferentes antimicrobianos. Esta resistencia es a menudo debido a la expresión de genes de resistencia (Schwarz y Chaslus Dancla, 2001, Umber y Bender, 2009). Este tipo de resistencia es de mayor preocupación, ya que, inicialmente fueron poblaciones susceptibles y que comenzaron a ser resistentes a un agente antimicrobiano, proliferaron y se extendieron bajo el marco de presión selectiva del uso de ese agente (Tenover, 2006).

Los principales mecanismos por los cuales las bacterias son resistentes a los antimicrobianos son los siguientes:

- Inactivación enzimática del antimicrobiano; basado en la hidrólisis o en la modificación por transferencia de grupos acetil-, adenil-, o fosfatos en sitios específicos de los antibióticos. Los genes que codifican para estas enzimas están a menudo localizados en elementos genéticos móviles (Schwarz y Noble, 1999).

- Alteración del sitio blanco de acción; puede ser por modificación enzimática haciendo al sitio blanco inaccesible al antibiótico. También se describe que esta alteración del sitio blanco puede ser por proteínas que protegen la unión a ribosomas, que son el sitio blanco de algunos antibióticos como las tetraciclinas, estas proteínas se han detectado en plásmidos o en transposones conjugativos (Schwarz y Noble, 1999).
- Disminución de la acumulación intracelular; puede deberse a una menor captación del antibiótico o a un incremento en la eliminación de la droga a través de sistemas de transporte dependientes de energía, como las bombas de eflujo. La disminución en la captación puede deberse a una reducción en la expresión, alteración o incluso en la pérdida de porinas que permiten el ingreso a los antibióticos en la célula bacteriana. Los genes para las bombas de eflujo específicas han sido detectados en plásmidos, transposones y cassettes génicos (Schwarz y Noble, 1999; Schwarz y Chaslus Dancla, 2001).

Mecanismos de transferencia

La rápida diseminación de resistencia antimicrobiana entre bacterias de igual o distintas especies y géneros es el resultado, principalmente de la transferencia horizontal de elementos genéticos móviles que transportan uno o mas genes de resistencia (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001). Entre ellos se encuentran los plásmidos, transposones e integrones. Estos tres tipos de elementos están compuestos por ADN de doble hebra, pero difieren en su tamaño, estructura, propiedades biológicas y forma de propagación.

Plásmidos:

Son elementos de ADN extracromosomal que se han detectado en la mayoría de los géneros bacterianos de importancia en medicina veterinaria, pero también en bacterias que constituyen parte de la microbiota normal de la piel y superficies mucosas en humanos y animales. Los plásmidos codifican una amplia variedad de propiedades accesorias que pueden resultar beneficiosas para la bacteria, ellas incluyen la resistencia a antimicrobianos, desinfectantes, metales pesados o bacteriocinas, pero

además pueden otorgarle a la bacteria propiedades metabólicas o factores de virulencia entre otros. Los plásmidos pueden contener uno o más genes que codifican para estas características. Pueden integrarse parcial o completamente en el ADN cromosomal o pueden actuar como vectores para transposones e integrones (Schwarz y Noble, 1999; Schwarz y Chaslus Dancla, 2001).

Transposones:

Son elementos genéticos que no poseen sistemas de replicación, por lo que deben integrarse para su mantención estable en el ADN cromosomal o en plásmidos y pueden desplazarse a diferentes sitios de éstos mediante secuencias de inserción (González *et al*, 2004). Los transposones más pequeños solo transportan una transposasa, que es la enzima responsable del movimiento del elemento, aquellos de mayor tamaño, usualmente contienen y movilizan uno o más genes que codifican para distintas propiedades como por ejemplo: resistencia antimicrobiana.

Integrones:

Son elementos genéticos móviles y funcionan como estructuras que integran genes, constituyendo una fuente importante de transmisión y diseminación de genes de resistencia (González *et al*, 2004). Están compuestos por una integrasa (intI) un lugar con actividad de recombinación sitio específica (attI) y un promotor de los genes integrados (Carattoli, 2001; Guzmán y Alonso, 2008). Difieren de los plásmidos en que no poseen sistemas de replicación y de los transposones en que no realizan autotransposición (Schwarz y Noble, 1999; Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001). Los plásmidos y transposones sirven como vehículo para la transmisión de integrones inter e intraespecie (González *et al.*, 2004).

Mecanismos de transferencia de genes

Los plásmidos, transposones e integrones se diseminan verticalmente durante la división celular de la célula hospedera, pero también pueden transferirse horizontalmente entre bacterias de igual o diferente especie o género bacteriano vía transducción, conjugación o transformación (Murray *et al*, 2005).

Transducción:

La transferencia genética por transducción esta mediada por virus bacterianos (bacteriófagos) que captan fragmentos de ADN y los almacenan en el interior de partículas del bacteriófago. EL ADN inyectado a las células infectadas por el fago es luego incorporado al genoma bacteriano (Murray *et al*, 2005). La diseminación de genes de resistencia a través de este mecanismo es limitada (Schwarz y Noble 1999; Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001).

Conjugación:

Consiste en el apareamiento o intercambio “cuasisexual” de información genética entre una bacteria donante y una receptora. La conjugación es el proceso por el cual el ADN pasa directamente por contacto intercelular durante el acoplamiento de las bacterias, se produce una transferencia unidireccional de ADN desde la célula donante a la receptora a través del Pili sexual (Murray *et al*, 2005). La conjugación es el mecanismo mas importante en la diseminación de genes de resistencia entre poblaciones bacterianas (Schwarz y Noble, 1999 y Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001)

Transformación:

Es el proceso mediante el cual las bacterias captan fragmentos de ADN desnudo y los incorporan a sus genomas. Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas son capaces de captar y conservar de forma estable ADN exógeno. Ciertas especies presentan una capacidad natural de captación de ADN exógeno por lo que se definen como “competentes” (Murray *et al*, 2005). La transformación juega un rol limitado en la diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos (Schwarz y Noble, 1999 y Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001).

Staphylococcus coagulasa positivo.

Los *Staphylococcus spp.* son bacterias cocáceas, Gram-positivas organizadas en racimo. Son anaerobios facultativos y catalasa positivos. Según su actividad coagulasa (factor de agregación) pueden diferenciarse en *Staphylococcus spp.* coagulasa positivo o negativo (Murray *et al.*, 2005).

Staphylococcus intermedius (*S. intermedius*), *S. schleiferi* subespecie *coagulans* y *S. aureus*, son especies coagulasa positivo que forman parte de la microbiota de piel y

superficie mucosas de humanos y otros animales (Jousson *et al.*, 2007). *S. intermedius* fue descrito por primera vez en caninos en 1976 (Hajek, 1976), mientras que *S. schleiferi* subesp. *coagulans* se describió por primera vez en caninos en 1990 (Igimi *et al.*, 1990).

En un estudio publicado por Devriese *et al.*, (2005), basado en técnicas moleculares, diferenciaron la especie *S. intermedius* de *S. pseudintermedius*, esta última especie sería la que forma parte de la microbiota normal de caninos. Sin embargo, la diferenciación de estas especies no se encuentra disponible basándose en técnicas fenotípicas o kit comerciales de identificación, debiendo recurrirse a estudios moleculares para poder realizar una correcta identificación de especie de este género bacteriano (Devriese *et al.*, 2005; Fitzgerald, 2009; Bannoehr *et al.*, 2009).

Por lo anterior, y considerando que los *kit* comerciales de identificación fenotípica discriminan actualmente solo en *S. intermedius* y *S. schleiferi* (Sasaki *et al.*, 2007), es que ambas especies, son las que se siguen asociando a los cuadros clínicos de caninos. Como se ha mencionado anteriormente estas especies bacterianas son parte de la microbiota normal de caninos, sin embargo, ambos *Staphylococcus spp.* bajo ciertas condiciones del hospedero como ectoparasitismo, atopia, desbalances hormonales, dermatitis inmunomediadas entre otros, se comportan como patógenos oportunistas, siendo a menudo, responsables del desarrollo de enfermedades infecciosas como pioderma y/o otitis externa en caninos (Yamashita *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2006; Vanni *et al.*, 2009).

Pioderma se describe como la infección bacteriana de la piel, puede ser superficial afectando la epidermis y el folículo piloso o puede ser profunda si involucra la dermis y el tejido subcutáneo (Scott *et al.*, 1997). Otitis externa se define como la inflamación del canal auditivo y puede comprometer la porción más proximal del pabellón auricular (Rosychuk y Luttgen, 2002), es la enfermedad más común del canal auditivo y su etiología es variada incluyendo hongos, parásitos y bacterias (Lilenbaum *et al.*, 2000). La otitis externa afecta entre el 5 -20% de la población canina (Rosychuk y Luttgen, 2002).

Antimicrobianos de uso habitual en medicina veterinaria

β -lactámicos

Este grupo de agentes representa una proporción importante de los antimicrobianos disponibles y comprenden a las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas y monobactámicos. Su actividad antibacteriana se basa en la estructura química básica que todos ellos comparten, el anillo β -lactámico (Koletar, 2000).

El principal componente estructural de la pared celular bacteriana es la capa de peptidoglucano, el cual está formado básicamente por moléculas de N-acetilglucosamina alternadas con moléculas de ácido N-acetilmurámico, las cuales se entrelazan entre sí mediante puentes peptídicos que le confieren a la bacteria una cubierta rígida. Enzimas denominadas proteínas de unión a la penicilina (PBP *Penicillin Binding Protein*), debido a su capacidad de unirse a los antibióticos β -lactámicos, catalizan la formación de las cadenas y los puentes peptídicos. Cuando las bacterias en proliferación se exponen a estos antibióticos, el fármaco se une a algunas PBP específicas de la pared celular bacteriana e inhibe la formación de puentes entre las cadenas de peptidoglucano. A su vez, este proceso activa ciertas autolisinas que degradan la pared celular y origina la destrucción celular. Por tanto, los antibióticos β -lactámicos generalmente actúan como fármacos bactericidas (Chambers, 2002; Murray *et al.*, 2005).

Las penicilinas representan una de las primeras clases de sustancias antimicrobianas, produjeron un gran impacto en las enfermedades infecciosas en humanos y permanecen siendo un grupo de agentes muy significativo tanto en medicina humana como veterinaria (Harvey y Hunter, 1999). Una gama de modificaciones en las cadenas laterales de las penicilinas ha llevado a una variación en las propiedades de estos agentes, los que incluyen estabilidad a β -lactamasas (enzimas que degradan el anillo β -lactámico), aumento en la absorción oral y al aumento del espectro de acción (Harvey y Hunter, 1999).

Según estas características se pueden clasificar en 3 grupos:

- 1.- **Penicilinas:** Actúan contra Gram-positivos, Gram-negativos y anaerobios no productores de β lactamasa. Ejemplo la penicilina

2. **Penicilinas de amplio espectro.** Tienen el mismo espectro antibacteriano que las penicilinas y poseen una actividad mejorada contra Gram-negativos. Como la ampicilina y amoxicilina.
3. **Penicilinas Antiestafilocólicas:** Son resistentes a β lactamasas estafilocólicas. Son activas frente *Streptococcus* y *Staphylococcus*. Ejemplo Cloxacilina, en la práctica clínica, ésta es la mayormente administrada (Chambers, 2002).

Estos antibióticos han sido ampliamente utilizados para el tratamiento de infecciones estafilocólicas en humanos y animales y es por este motivo, que se ha reportado resistencia a las penicilinas en felinos y caninos domésticos (Malik *et al.*, 2007). La resistencia a los β -lactámicos se produce por tres mecanismos; 1) evitando la interacción entre el antibiótico y el sitio blanco de PBP, 2) Enzimas que hidrolizan el antibiótico y 3) modificando la unión del antibiótico a la PBP (Chambers, 2002).

El primer mecanismo de resistencia está presente sólo en bacterias Gram-negativas, ya que disponen de una membrana externa que recubre la capa de peptidoglucano (Murray *et al.*, 2005). El segundo mecanismo es a través de la producción de β -lactamasas y este es el principal mecanismo de resistencia en *Staphylococcus spp.*. La producción de estas enzimas está codificada por el gen *BlaZ*, y en *Staphylococcus aureus* se han descrito cuatro variantes para este gen (A, B, C y D). Los tipos A, B y D se encuentran localizados en plásmidos, mientras que el tipo C se encuentra ubicado en el cromosoma bacteriano (Malik *et al.*, 2007). En *Staphylococcus intermedius* Malik *et al.*, (2007) evidenció la presencia de β -lactamasa tipos A, B y C. El tercer mecanismo es por la producción alterada de las PBP la cual se codifica en el gen *mecA* (Malik *et al.*, 2007). Este gen es el que le confiere a la bacteria la capacidad de ser resistente a la meticilina (penicilina antiestafilocólica) (Chambers, 2002); además de todos los otros β -lactámicos (Loeffler *et al.*, 2007).

Tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos, tienen un variado espectro de acción e inhiben la síntesis proteica de la bacteria al unirse de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Las tetraciclinas (es decir, tetraciclina, doxiciclina y minociclina) son útiles en el tratamiento de las infecciones causadas por especies pertenecientes a los géneros *Chlamydia*, *Mycoplasma*, y *Rickettsia*, así como

por algunas otras bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Chambers, 2002; Murray *et al.*, 2005).

Las tetraciclinas han sido usadas para la terapia y prevención de infecciones bacterianas en humanos, animales y plantas (Schwarz *et al.*, 1998). Como consecuencia del extenso uso de este fármaco la ocurrencia de resistencia a tetraciclinas se observa en una amplia variedad de géneros bacterianos. Se han descrito tres mecanismos de resistencia a las tetraciclinas: 1) acumulación intracelular disminuida, tanto por el ingreso impedido como al egreso aumentado por una bomba de eflujo, 2) protección ribosomal debido a la producción de proteínas que interfieren con la unión de tetraciclinas a ribosomas e 3) inactivación enzimática de las tetraciclinas (Chambers, 2002).

Cuatro genes de resistencia *tet* (K, L, M y O) han sido detectados en *Staphylococcus spp.* de origen animal (Werckenthin *et al.*, 2001). Los genes *tet*(K) y *tet*(L) codifican resistencia a través de bombas de eflujo y a menudo estos se localizan en plásmidos (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001). Los genes *tet*(M) y *tet*(O) otorgan resistencia por medio de la protección ribosomal. El gen *tet*(M) es el más frecuentemente encontrado en *Staphylococcus intermedius*, independiente de la especie animal desde donde se aísla. Este se localiza en transposones conjugativos y generalmente se localiza en el ADN cromosomal (Speer *et al.*, 1992). El gen *tet*(O) también otorga resistencia a través de la protección ribosomal, pero a diferencia del gen *tet*(M) este se encuentra principalmente en *Streptococcus* (Kim *et al.*, 2005).

Macrólidos y Lincosamidas

En la familia de los macrólidos el fármaco prototipo es la eritromicina y es producido por *Streptomyces erythreus*, modificaciones en la estructura de este fármaco han dado origen a otras moléculas como la azitromicina y claritromicina, en las lincosamidas la clindamicina es el antibiótico utilizado principalmente y deriva de la lincomicina que es aislado desde *Streptomyces lincolnensis* (Chambers, 2002; Murray *et al.*, 2005).

Ambas familias son bacteriostáticos e inhiben la elongación de las proteínas al unirse de forma irreversible a la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos

(Chambers, 2002; Murray *et al*, 2005). Los macrólidos y las lincosamidas presentan una acción bacteriostática, aunque pueden comportarse de forma bactericida según las características del microorganismo, las concentraciones del antimicrobiano y el tiempo de exposición (Prieto y Cervera, 2001).

En animales de compañía, los macrólidos han sido utilizados en el tratamiento de infecciones por *Campylobacter*, infecciones por anaerobios o cocos Gram-positivos resistentes a penicilinas y en pacientes alérgicos a β -lactámicos. Gracias a su buena absorción oral, distribución en tejidos como la piel y altas concentraciones intracelulares, los macrólidos y lincosamidas son considerados como una alternativa de antibiótico para el tratamiento de pioderma canino causados por *Staphylococcus spp.* (Ganière *et al.*, 2005).

La resistencia a estos agentes se debe a tres mecanismos; 1) modificación del sitio blanco, 2) bombas de eflujo e 3) inactivación enzimática de la droga (Werckenthin *et al*, 2001). En *Staphylococcus spp.* el principal mecanismo de resistencia es a través de la acción de metilasas ribosomales, que actúan disminuyendo la unión de macrólidos y lincosamidas al sitio de acción. Los genes *erm* (*erythromycin ribosome methylation*) son los responsables de este tipo de resistencia (Prieto y Cervera, 2001).

En *Staphylococcus spp.* de origen animal, han sido descritos cuatro genes que codifican metilasas *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C) y *erm*(F). El gen *erm*(C) se localiza en pequeños plásmidos y se ha encontrado principalmente en *Staphylococcus hyicus* de origen porcino. El gen *erm*(F) se localiza en transposones conjugativos y se ha detectado en muy pocas ocasiones en *Staphylococcus intermedius* aislados desde palomas. Los genes *erm*(A) y *erm*(B) son comúnmente localizados en pequeños transposones no conjugativos, sin embargo, en raras ocasiones han sido detectados en plásmidos. El gen *erm*(A) se ha descrito en *S. intermedius* en caninos, pero se ha encontrado principalmente en *Staphylococcus spp.* de origen aviar. El gen *erm*(B) es el principal gen detectado en *Staphylococcus intermedius* de origen canino (Werckenthin *et al.*, 2001).

En un estudio reciente, además de la presencia del gen *erm*(B) en *S. intermedius* aislados desde caninos, se describe la presencia de proteínas que disminuyen la

concentración del fármaco mediante bombas de eflujo, estas proteínas están codificadas por el gen *msr(A)* (Lüthje y Schwarz., 2007).

Un factor importante a considerar en la resistencia fenotípica que presentan algunas bacterias a esta familia de antimicrobianos es la resistencia descrita al grupo MLS (Macrólidos-Lincosamidas-Estreptogramina), la cual presenta dos variables, la resistencia constitutiva (MLS_c) y la inducible (MLS_i) (Schreckenberger *et al.*, 2004). Los genes *erm* se relacionan principalmente con la resistencia de tipo constitutiva, sin embargo, se ha detectado la presencia de estos genes en cepas que expresan resistencia fenotípica de tipo inducible (Lüthje y Schwarz., 2007). La variable constitutiva presenta elevado nivel de resistencia a cualquier antimicrobiano del grupo MLS, a diferencia de la resistencia inducida que presenta únicamente resistencia a los macrólidos de 14 átomos (eritromicina) y 15 átomos (azitromicina) y sensibilidad *in vitro* a macrólidos de 16 átomos, lincosamidas y estreptograminas. En las cepas MLS_i la expresión del gen *erm* es inducida por algunos compuestos, como la eritromicina, un potente inductor para la resistencia MLS_i, mientras que la clindamicina es un inductor débil que actúa lentamente (Fielbelkorn *et al.*, 2003; Steward *et al.*, 2005). Como consecuencia de lo anterior, las cepas con resistencia MLS_i aparentan susceptibilidad *in vitro* a clindamicina, pero al ser usado clínicamente, ocurre la inducción de la resistencia *in vivo* con el consiguiente fracaso terapéutico (Schreckenberger *et al.*, 2004). Ello se explica porque la clindamicina al ser un inductor débil, provoca que a largo plazo (durante el tratamiento), induzca resistencia a sí misma. Por otra parte, la eritromicina, al ser un potente inductor de resistencia permite utilizarla en pruebas *in vitro* para la detección de cepas MLS_i (Schreckenberger *et al.*, 2004; Tamariz *et al.*, 2009). Esto constituye la base de la prueba de D-test la que permite evidenciar el fenotipo que presenta la cepa en estudio.

Quinolonas

Las quinolonas derivan del ácido nalidíxico y mediante la adición de un grupo flúor se da origen a las fluoroquinolonas, con lo cual se mejoró la unión a su enzima diana y aumentó la penetración celular hasta 70 veces con respecto a las quinolonas. Además, con esta sustitución se aumentó la eficacia contra patógenos Gram-negativos y se amplió el espectro de actividad al actuar contra patógenos Gram-positivos (Otero *et al.*, 2001).

El enrofloxacino es una fluoroquinolona desarrollada en la década de los ochenta para el uso exclusivo en medicina veterinaria para animales de compañía y animales de producción (Ganière *et al.*, 2001; Otero *et al.*, 2001). El enrofloxacino demuestra una buena eficacia clínica en pacientes que cursan con piodermas producido por *Staphylococcus spp.* (Ganière *et al.*, 2001), por lo que se convierte en una buena alternativa terapéutica, sin embargo, su uso debiera considerarse sólo en pacientes que presenten cuadros producidos por bacterias resistentes a los antibióticos de primera línea como la Cloxacilina (Otero *et al.*, 2001).

El mecanismo de acción de las quinolonas es la inhibición de la ADN girasa, una enzima bacteriana involucrada en la mayoría de los procesos biológicos que comprometen al ADN, tales como la transcripción, recombinación, replicación y reparación del mismo (Wolfson y Hooper, 1985; Valdez y Castagneto, 1988; Lewis *et al.*, 1996; Otero *et al.*, 2001). La ADN girasa es una topoisomerasa II que tiene un rol clave en la mantención de la densidad genómica, produciendo el superenrollamiento helicoidal negativo de la molécula de ADN. Las quinolonas inhiben, además, a la topoisomerasa IV, la cual es esencial en la segregación cromosómica de las células procariontas. Ambas enzimas están compuestas por 2 subunidades, las cuales están codificadas en la topoisomera II por los genes *gyrA* y *gyrB*, y en la topoisomerasa IV por los genes *parC* (*grlA*) y *parE* (*grlB*). Mutaciones de estos genes que codifican las enzimas topoisomerasas son las que le confieren a la bacteria la resistencia a quinolonas. Se describen además otras formas de resistencia como la alteración en la permeabilidad de la membrana celular y bombas de eflujo (Otero *et al.*, 2001).

El principal mecanismo de resistencia a fluoroquinolonas en bacterias Gram-positivas ocurre por cambios en la composición aminoacídica de las subunidades de las topoisomerasas, denominada Región Determinante de Resistencia a Quinolonas (QRDR *Quinolone Resistance Determining Region*) entre *grlA* y *gyr(A)* (Intorre *et al.*, 2007).

En el año 2007 un estudio realizado por Intorre *et al.*, encontró que las cepas de *Staphylococcus intermedius* que presentaron resistencia fenotípica a quinolonas presentaron además mutación en las regiones QRDR de ambas topoisomerasas, reemplazando en la posición 84 del gen *gyrA* una serina por una leucina, y en la posición 80 del gen *grlA* el reemplazo de serina por una arginina. En el caso de

Staphylococcus schleiferi, en este estudio, solo se evidenció la mutación en la posición 88 del gen *gyrA* reemplazando el glutamato por una glicina.

Mientras que en un estudio desarrollado por Descloux *et al.*, (2008) encontró en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* y *Staphylococcus schleiferi* mutaciones en el gen *gyrA* en las posiciones 84 (reemplazo de una serina por leucina) y 88 (sustitución de glutamato por glicina); y en el gen *griA* en las posiciones 80 (reemplazo de una serina por una isoleucina) y 84 (ácido aspártico por una asparagina).

Los patrones de resistencia antimicrobiana en *S. intermedius* aislados desde caninos y felinos aparentemente varían dependiendo del origen geográfico. Estudios realizados en Europa y Japón muestran que la resistencia de *S. intermedius* aislado desde pioderma e infecciones óticas en caninos se ha mantenido relativamente estable en los pasados 25 años, y que la mayoría de los antibióticos sistémicos utilizados en estas patologías aun son efectivos. En contraste, reportes provenientes de Estados Unidos de América muestran un incremento en la resistencia a antimicrobianos en *Staphylococcus* aislados desde infecciones en caninos. Esta resistencia incluye resistencia a meticilina, fluoroquinolonas entre otros agentes antibacterianos, utilizados comúnmente en la práctica clínica (Kania *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2006 y Jonas *et al.*, 2007).

La prevalencia de *S. intermedius* y *S. schleiferi* subesp. *coagulans* como agentes patógenos de pioderma y otitis, y el uso generalizado de antimicrobianos para el tratamiento de estas infecciones permiten plantear las bases para la realización de este estudio, en el cual, se espera encontrar los genes de resistencia a antimicrobianos similares a los descritos en la literatura, los cuales constituyen las bases moleculares de esta resistencia frente a los quimioterapéuticos utilizados para su control.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar las bases genéticas de resistencia a antibióticos de uso habitual en cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivo aislados desde pioderma y otitis externa en caninos y que presentan resistencia fenotípica.

Objetivos Específicos

1. Detectar genes de resistencia a β lactámicos (*mecA*), tetraciclinas (*tetM*), macrólidos y lincosamidas (*ermB*), desde aquellas cepas que presenten resistencia fenotípica al antibiótico.
2. Detectar la base genética de resistencia a Enrofloxacino desde aquellas cepas que presenten resistencia fenotípica al antibiótico.
3. Relacionar fenotipo y genotipo en cepas que presenten resistencia a los antibióticos antes descritos.
4. Relacionar los niveles de resistencia fenotípicas determinadas por Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y el genotipo en cepas que presenten resistencia a los antibióticos antes descritos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

Se estudiaron 29 cepas *Staphylococcus* coagulasa positivo, aisladas desde pacientes caninos (*Canis domesticus*) que cursaban con otitis externa y/o pioderma. Estas cepas provienen de un estudio previo (Abusleme, 2009 y Heresmann, 2010) el cual contó con un total de 170 *Staphylococcus* spp., los cuales fueron identificados a nivel de especie por el *Kit* comercial BBLCrystal™. El criterio de selección para este estudio fue: todas las cepas que presentaron resistencia fenotípica a enrofloxacino y/o clindamicina y/o tetraciclina y/u oxacilina, determinada, a través, de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) mediante dilución en placas y todas aquellas cepas que evidenciaron resistencia a eritromicina por el método de difusión en disco (Kirby Bauer). La CIM y el Kirby Bauer se realizaron según las normas descritas por el CLSI 2006.

De las 29 cepas seleccionadas, 13 se aislaron desde pioderma y 16 desde otitis externa y el perfil fenotípico de resistencia se indica en la Tabla N° 1.

Tabla N° 1. Perfil de resistencia fenotípica en cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas de pioderma y otitis en canino

Perfil de resistencia a antimicrobianos *	N° Total de cepas	Pioderma	Otitis
T	9	7	2
E	2	1	1
En	2	0	2
T + E	3	0	3
E + En	8	2	6
T + E + En	4	2	2
E + En + O	1	1	0
Total	29	13	16

* **T:** tetraciclina, **E:** eritromicina, **En:** Enrofloxacino, **O:** oxacilina

Detección de genes de resistencia a β lactámicos (mecA), tetraciclinas (tetM), macrólidos y lincosamidas (ermB)

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

1. Siembra

Las cepas fueron sembradas en una placa Petri que contenía agar tripticasa soya (Oxoid®) más un 5% de sangre de cordero y se incubaron a 37° C por 18 horas. Las cepas se cosecharon y se preparó una suspensión bacteriana en 1 ml de caldo *Brain Heart infusión* (Oxoid®) mas 15 % de glicerol v/v, en la cual se congelaron a -20° C hasta su posterior estudio y caracterización molecular.

2. Extracción del ADN blanco desde una suspensión bacteriana

El ADN bacteriano se obtuvo a través del kit comercial WIZARD® SV, según el protocolo que se describe a continuación:

1. Centrifugar la suspensión de 500 μ l a 13.000 r.p.m. por 1 minuto.
2. Eliminar el sobrenadante. Agregar PBS y mezclar en Vortex.
3. Centrifugar nuevamente a 13.000 r.p.m. por 1 minuto.
4. Agregar 100 μ l de *buffer* de lisis WIZARD® SV.
5. Transferir la muestra lisada a una minicolumna WIZARD® SV.
6. Centrifugar a 7.800 r.p.m por 3 minutos.
7. Remover la minicolumna del tubo y descartar el filtrado. Colocar la columna en otro tubo.
8. Agregar 650 μ l de solución de lavado WIZARD® SV (con etanol 95% agregado) al concentrado. Centrifugar a 7.800 r.p.m por 1 minuto. Descartar el líquido del tubo colector. Repetir este paso 4 veces.
9. Descartar el líquido del tubo colector y reensamblar la minicolumna. Centrifugar a 7.800 r.p.m por 2 minutos para lavar la matriz.
10. Transferir la minicolumna a un tubo nuevo de 1,5 ml. Añadir 20 μ l de agua libre de nucleasa (conservada a T° ambiente). Incubar a T° ambiente por 2 minutos.
11. Centrifugar la minicolumna con el tubo y el fluido a 7.800 r. p .m por 1 minuto.
12. Remover la minicolumna y guardar el ADN purificado entre -20° C y - 70° C.

3. Detección de genes de resistencia

La detección de los genes de resistencia a β lactámicos, tetraciclinas, macrólidos y lincosamidas se realizó mediante PCR a partir de las cepas en estudio.

Partidores

- Detección del gen *mecA*: Se utilizó un par de partidores que detectó un fragmento del gen *mecA*, sus principales características se observan en la Tabla N° 2. Se utilizó como cepa control la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 43300 que tiene la característica de ser meticilino resistente por la presencia del gen *mecA*.
- Detección del gen *tet(M)*: Para su estudio se utilizó un par de partidores cuyas principales características se muestran en la Tabla N° 2.
- Detección de resistencia a macrólidos y lincosamidas *erm(B)*: Para este estudio se utilizó un par de partidores y sus principales características se observan en la Tabla N° 2.

Tabla N° 2. Partidores y tamaño esperado del amplicón para el gen *mecA*, *tet(M)*, *erm(B)* *gyrA* y *grlA*.

Gen	Partidor 5' - 3'	Tamaño	Referencia
<i>mecA</i>	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	533 pb	Ryffel <i>et al.</i> , 1990
<i>tet(M)</i>	GGA GCG ATT ACA GAA TTA GG GGT CAT CGT TTC CCT CTA TTA CC *	472 pb	Hal Jones <i>et al.</i> , 2006
<i>erm(B)</i>	CAT TTA ACG ACG AAA CTG GC GGA ACA TCT GTG GTA TGG CG	425 pb	Jensen <i>et al.</i> , 1999
<i>gyrA</i>	ATG AGY GTT ATC GTK CWC GTG C CCA TWG ARC CAA AGT TAC CTT G	260 pb	Intorre <i>et al.</i> , 2007
<i>grlA</i>	AAT ACR YAY GAT AAR AAT TTC CG GTY GTR TCA TCA TAG TTT GG	289 pb	Intorre <i>et al.</i> , 2007

* Partidor diseñado por el PhD. Víctor Silva, 2008, Departamento de Microbiología y Micología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

4. Preparación de la mezcla para PCR

La mezcla para realización del PCR para los genes *mecA*, *tet(M)* y *erm(B)* fue la siguiente:

Reactivo	Cantidad
<i>Buffer</i> 10 X	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	3 µl
dNTP 1 mM	1 µl
Partidor <i>Forward</i> 20 pmoles	1 µl
Partidor <i>Reverse</i> 20 pmoles	1 µl
Taq DNA Polimerasa 5U/µl	0,2 µl
DNA blanco	3 µl
H ₂ O destilada	35,8 µl
Volumen Final	50 µl

5. Amplificación

La amplificación se realizó en el termociclador (Thermo Electron Corporation), utilizando uno de los siguientes programas según el fragmento a amplificar:

Gen <i>mecA</i>	Gen <i>tet(M)</i>	Gen <i>erm(B)</i>
1 ciclo 94 ° x 5 min.	1 ciclo 95° x 5 min.	1 ciclo 94° x 5 min.
94° x 20 seg.	95° x 30 seg.	94° x 30 seg.
25 ciclos 55° x 20 seg.	30 ciclos 55° x 30 seg.	30 ciclos 52° x 30 seg.
72° x 50 seg.	72° x 30 seg.	72° x 30 seg.
1 ciclo 72° x 10 min.	1 ciclo 72° x 7 min.	1 ciclo 72° x 5 min.

6. Electroforesis

Los amplicones se visualizaron en un gel de agarosa (Promega) al 1% p/v teñidos con bromuro de etidio:

- 1gr de agarosa
- 100 ml de *buffer* TAE 1 X
- 5 µl de bromuro de etidio de 10 µg/ml

Buffer TAE 1X es una dilución del *buffer* TAE 50 X

- TAE 50% (1 lt):
 - a) 242 grs Tris Base

- b) 57,1 ml Ácido Acético Glacial
 - c) 100 ml EDTA 0,5 M (pH 8.0)
 - d) Completar a 1 lt con agua destilada.
- TAE 0,5X (1 lt):
 - a) 10 ml TAE 50X
 - b) 90 ml H₂O destilada

Se realizó la electroforesis en una cámara (Minigel Migration Tank, Gel X Labnet) a 50 volts durante 1 hora.

Como indicador de tamaño del amplicón se utilizó un marcador de 100 bp (Bioaxis).

7. Visualización

La observación de los fragmentos amplificados se efectuó a través de un transiluminador de luz ultravioleta (Espectroline, Mod TUC-312R.). Los resultados obtenidos se registraron en fotografías (Kodak, Sistema EDAS 290, Software Kodak 1D3-6) para su análisis.

Detección de la base genética de resistencia a Enrofloxacino

PCR - Secuenciación del QRDR del gen *gyr(A)* y *grl(A)*

1. Siembra

La siembra de las cepas para la PCR - Secuenciación se realizó tal como se describió para la detección de los genes de resistencia antes mencionados.

2. Extracción del ADN blanco desde una suspensión bacteriana

La extracción del ADN de las cepas para la PCR-Secuenciación se realizó tal como se describió para la detección de los genes de resistencia antes mencionados.

3. Detección de genes de resistencia a quinolonas

Partidores

La detección de resistencia a quinolonas se realizó mediante la localización de mutaciones específicas en fragmentos de los genes *gyrA* y *griA*. Para esto, se realizó primero una PCR para amplificar los genes utilizando 2 pares de partidores descritos en la Tabla N° 2 y posteriormente una secuenciación de los amplicones.

4. Preparación de la mezcla para PCR

La mezcla para realización del PCR para los genes *gyrA* y *griA* fue la siguiente:

Reactivo	Cantidad
<i>Buffer</i> 10 X	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	3 µl
dNTP 1 mM	1 µl
Partidor <i>Forward</i> 20 pmoles	1 µl
Partidor <i>Reverse</i> 20 pmoles	1 µl
Taq DNA Polimerasa 5U/µl	0,2 µl
DNA blanco	3 µl
H ₂ O destilada	35,8 µl
Volumen Final	50 µl

5. Amplificación

La amplificación se realizó en el termociclador (Thermo Electron Corporation), utilizando uno de los siguientes programas según el fragmento a amplificar:

Gen <i>gyr A</i>		Gen <i>griA</i>	
1 ciclo	94° x 5 min	1 ciclo	94° x 5 min.
	94° x 30 seg.		94° x 30 seg.
30 ciclos	56° x 30 seg. 72° x 30 seg.	30 ciclos	51° x 30 seg. 72° x 30 seg.
1 ciclo	72° x 5 min.	1 ciclo	72° x 5 min.

6. Electroforesis

La electroforesis de los amplicones para la PCR - Secuenciación se realizó tal como se describe para la detección de los genes de resistencia antes mencionados.

7. Visualización

La visualización de los amplicones para la PCR - Secuenciación se realizó tal como se describe para la detección de los genes de resistencia antes mencionados.

8. Secuenciación de los genes *gyrA* y *griA*

Luego de la PCR y previo a la secuenciación de la región QRDR de los genes *gyrA* y *griA*, los fragmentos obtenidos (amplicones) se purificaron de acuerdo al protocolo establecido por el kit WIZARD[®] Clean Up:

1. Tomar 20 µl del amplicón de cepas con amplicón de 507 bp
2. Agregar 20 µl de solución de *binding membrane*
3. Depositar 40 µl en la columna Wizard e incubar por 2 minutos a T° ambiente
4. Centrifugar 1 minuto a 13 r.p.m.
5. Agregar 700 µl de solución de lavado a cada columna
6. Centrifugar 1 minuto a 13.000 r.p.m.
7. Transferir inmediatamente la minicolumna a un tubo Ependorff de 1,5 µl
8. Agregar 25 µl de agua sin nucleasa, calentada previamente a 60° C a cada minicolumna
9. Incubar 2 minutos a T° ambiente
10. Centrifugar a 13.000 r.p.m. por 2 minutos
11. Descartar las minicolumnas, la solución que queda en el Ependorff es la que contiene el ADN el cual se envió a secuenciar.

La secuenciación de los fragmentos de los genes *gyrA* y *griA* se realizó en el laboratorio Biogenetics con un secuenciador automático (ABI 310; Applied Biosystems). Luego con el programa ClustalW se realizó el alineamiento de los fragmentos secuenciados frente a una región parcial de los genes *gyrA* y *griA* de *Staphylococcus intermedius* y *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans*, los cuales se encuentran en la base de datos de GeneBank (EF189168 al EF189175).

Relación de fenotipo y genotipo de resistencia

Para contar con la información de CIM de todas las cepas en estudio y poder relacionar el fenotipo con el genotipo obtenido a través de la técnica de PCR, se realizó CIM a eritromicina mediante el método de E-test, solo a las cepas que presentaron resistencia determinada por medio de la técnica de difusión en agar (Kirby Bauer) en el estudio anterior .

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) a eritromicina por E-test

Para realizar la CIM las cepas se sembraron en agar tripticasa soya (Oxoid ®) más un 5% de sangre de cordero y se incubaron a 37°C por 18 horas. Luego se realizaron suspensiones bacterianas con suero fisiológico y se ajustaron al tubo 0,5 del nefelómetro de Mc Farland. Posteriormente se sembraron en una placa con agar Mueller Hinton (Oxoid ®) con tórula y en 3 sentidos (Figura N° 1).

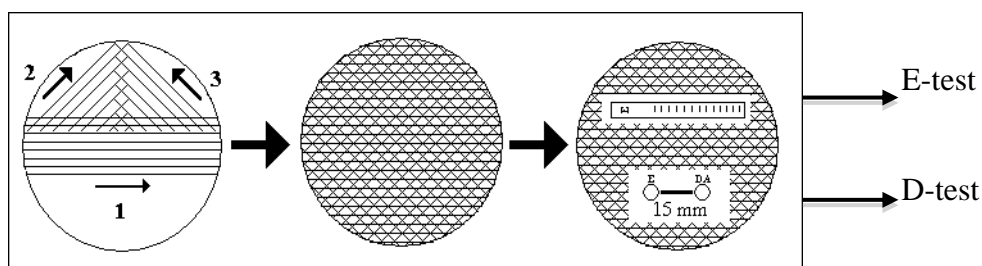


Figura N° 1: Siembra en placa de agar Müller Hinton. Se observa la siembra en 3 sentidos y la manera como depositar la tira de E-test y los sensibilizadores

Posterior a esto se depositó la tira de E-test que consiste en una tira de material sintético que contiene concentraciones crecientes de un determinado antibiótico, en el caso de eritromicina va desde 0,016 µg/ml hasta 256 µg/ml. Luego se colocó sobre la placa sembrada y se incubó por 18 a 24 horas. Pasado este tiempo se interpretó la CIM directamente y de acuerdo al CLSI, 2009, según el área de inhibición que se produce (Figura N° 2).

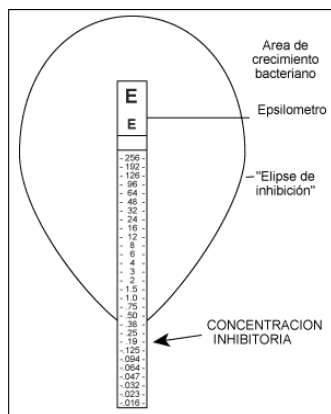


Figura N° 2: Método de epsilometría E-test: Este es un diagrama de la concentración inhibitoria minima que corresponde al valor donde comienza el área de inhibición (0,38 ug/ml).

Determinación de la relación de los niveles de resistencia fenotípicas determinadas por CIM y el genotipo de resistencia

Para complementar el estudio fenotípico de resistencia a macrólidos y lincosamidas de las cepas seleccionadas del estudio anterior, se realizó la técnica de susceptibilidad por el método D-test.

Método D-test

Para esta técnica se utilizó la misma placa en la que se realizó la CIM mediante E-test. Al costado de la tira de E-test se depositaron los sensidiscos de eritromicina (15µg) y clindamicina (2 µg) (Oxoid®) separados uno del otro por 15 mm (Figura N° 1). Se incubaron a 37 °C por 18 a 24 horas y luego se realizó la lectura e interpretación según CLSI, 2009.

Análisis Estadístico

Se realizó un estudio descriptivo y las variables se expresaron como presencia o ausencia de el(los) gen(es) de resistencia de acuerdo a la caracterización fenotípica de resistencia antimicrobiana de la cepa analizada y serán descritas como proporciones.

Además, se realizó un análisis de asociación, utilizando correlación entre la variable resultado (genotipo) con los niveles de resistencia (CIM). Para los análisis se utilizó el Programa STATA 7.0.

RESULTADOS

Detección genes de resistencia a β lactámicos (mecA), tetraciclinas (tetM), macrólidos y lincosamidas (ermB).

Determinantes genéticos de resistencia a β -lactámicos

Solo una cepa de *Staphylococcus intermedius* presentó resistencia fenotípica a oxacilina, a ésta se le realizó una PCR para detectar la presencia del gen *mecA* que determina la resistencia a todos los β -lactámicos.

La PCR evidenció que la cepa aislada de pioderma al igual que la cepa ATCC *Staphylococcus aureus* 43300 fueron positivas para la presencia del gen *mecA*, debido a que ambas amplificaron un fragmento de aproximadamente 533 pb lo que concuerda con el tamaño esperado. (Figura N° 3)

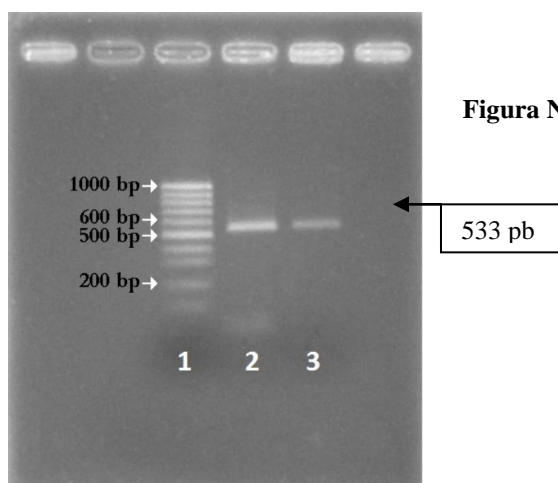


Figura N° 3: Gel de agarosa al 1% de Amplicones *mecA*.

- 1; Ladder 100 pb
- 2; *Staphylococcus aureus* ATCC 43300,
- 3; Cepa 121, *Staphylococcus intermedius* aislado desde pioderma

Determinantes genéticos de resistencia a tetraciclinas

De un total de 16 cepas aisladas de pioderma y otitis, 13 presentaron resistencia fenotípica a tetraciclinas (81,25%) y amplificaron un fragmento de aproximadamente 472 pb, lo que concuerda con el tamaño esperado para el gen *tetM* (Figura N°4). Tres cepas no amplificaron el fragmento del gen con este par de partidores utilizados.

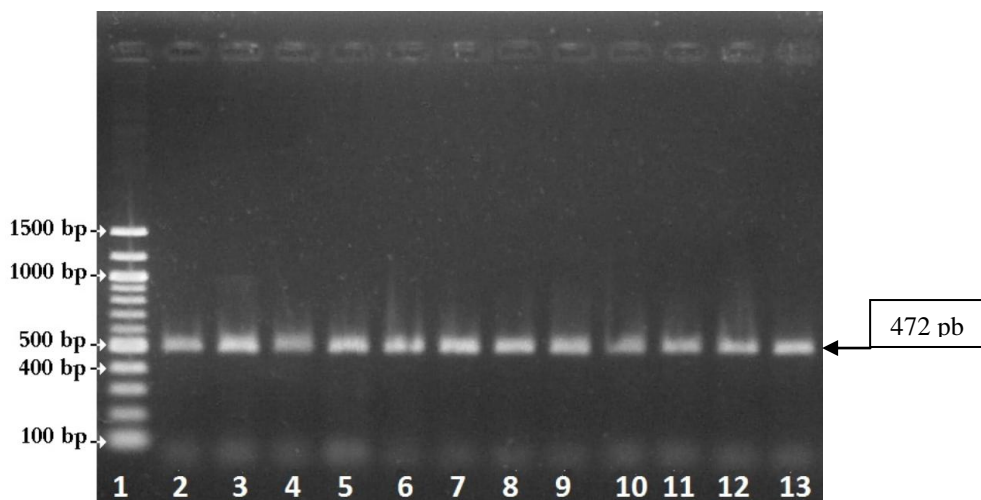


Figura N° 4: Gel de agarosa al 1%. Amplicones gen *tet(M)*. 1; Ladder 100 pb Cepas; 2;56p, 3; 74p, 5; 75p, 5; 83p, 6; 93p, 7; 99p, 8; 20o, 9; 23o, 10; 44o, 11; 72o, 12; 73o, 13; 77. p: pioderma, o:otitis.

Determinantes genéticos de resistencia a macrólidos y lincosamidas

La resistencia a macrólidos (eritromicina) se determinó en 18 cepas, de las cuales 17 (94,4%) amplificaron un fragmento de aproximadamente 425 pb, lo que coincide con el tamaño esperado para el gen *ermB* (Figura N° 5). Solo cepa no amplificó el fragmento del gen con este par de partidores.

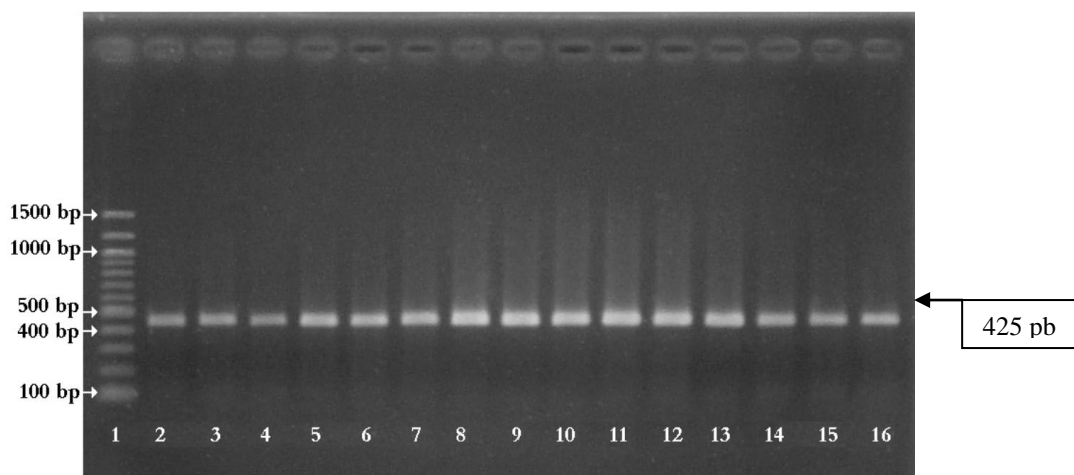


Figura N° 5: Gel de agarosa al 1%. Amplicones gen *erm(B)*. 1; Ladder 100 pb, 2; *Streptococcus agalactiae*, Cepas ; 3; 87p, 4; 103p, 5; 116p, 7; 121p, 8; 2o, 9; 14o, 10; 23o, 11; 44o, 12; 56o, 13; 60o, 14; 67o, 15; 72o, y 16; 77o p: pioderma, o: otitis.

Determinación de resistencia a quinolonas mediante detección de mutaciones de los genes gyr(A) y grl(A) del QRDR

Las 15 cepas que presentaron resistencia fenotípica a quinolonas (enrofloxacino) amplificaron fragmentos de 260 pb y 289 pb coincidiendo con los tamaños esperados para los genes *gyrA* (Figura N° 6) y *grlA* respectivamente.

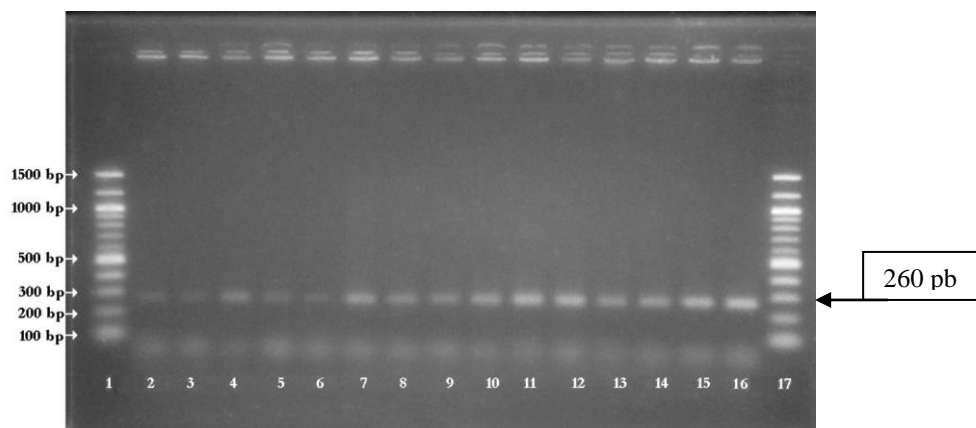


Figura N° 6: Gel de agarosa al 1%, Amplicones del gen *gyrA*. **1;** Ladder 100 pb, Cepas; **2;** 12p, **3;** 87p, **4;** 103p, **5;** 116p, **6;** 121p, **7;** 2o, **8;** 28o, **9;** 56o, **10;** 60o, **11;** 67o, **12;** 77o, **13;** 79o, **14;** 89o, **15;** 97o, **16;** 98o. **17;** ladder 100 pb. **p:** pioderma, **o:** otitis.

Una vez realizada la PCR y obtenidos los fragmentos amplificados, éstos se purificaron y se enviaron a secuenciar. Se secuenciaron un total de 5 cepas para verificar la mutación del gen *gyrA* y 3 para el gen *grlA* (Tabla N° 3). Las cepas seleccionadas para secuenciación fueron aquellas que presentaron una mejor calidad de banda de amplificación en el PCR y además se incluyó el estudio de la resistencia para ambos genes de la única cepa de *Staphylococcus schleiferi* subesp. *coagulans* que presentó resistencia fenotípica a enrofloxacino. Los resultados obtenidos se alinearon con el programa ClustalW frente a las secuencias EF189168-EF189175 depositadas en GenBank (Figura N° 7 y N° 8). Al realizar el alineamiento de las cepas se observó que las 6 cepas secuenciadas para el gen *gyrA* presentaban la mutación en la posición 84 del gen, reemplazando al aminoácido serina (TCG) por una leucina (TTG) (Figura N° 7). Para el gen *grlA* también se observó una mutación en la región QRDR, pero esta vez en la posición 80 del gen, donde se reemplazó el aminoácido serina (AGT) por una isoleucina (ATT) (Figura N° 8) (Tabla N° 3).

Tabla N° 3. Genotipo de resistencia a quinolonas en *Staphylococcus* spp.

Cepa	Especie	Patología	Posición <i>gyrA</i>	Posición <i>grlA</i>
			84 [TCG (Ser)]	80 [AGT (Ser)]
12	<i>S. intermedius</i>	Pioderma	TTG (Leu)	
87	<i>S. intermedius</i>	Pioderma	TTG (Leu)	ATT (Iso)
116	<i>S. intermedius</i>	Pioderma	TTG (Leu)	
121	<i>S. intermedius</i>	Pioderma	TTG (Leu)	
56	<i>S. intermedius</i>	Pioderma	TTG (Leu)	
60	<i>S. schleiferi</i>	Otitis	TTG (Leu)	ATT (Iso)
77	<i>S. intermedius</i>	Otitis		ATT (Iso)
79	<i>S. intermedius</i>	Otitis		ATT (Iso)

Ser; serina, Leu; leucina, Iso; Isoleucina

Alineamiento EF189169 y cepas de *Staphylococcus intermedius*

```
EF189169 CGTATCGTAGGGGATGTCATGGGGAAATACCATCCACATGGTGACTTCGTC AATTTATGAA
121p      CGTATCKTAGGGGATGTCATGGGGAAATACCATCCACATGGTGACTTTGTCAATTTATGAA
116p      CKTATCKWAGGGGATGTCATGGGGAAATACCATCCACATGGTGACTTTGTCAATTTATGAA
12p       CGTATMKTAGGGGATGTYATGGGGAAATACCATCCACATGGTGACTTTGTCAATTTATGAA
87p       CKTMTCKTAGGGGATGTCATGGGGAAATACCATCCACATGGTGACTTTGTCAATTTATGAA
56o       CKTMTMKTAGGGGATGTTTTGGGGAAATACCGTCCACATGGTGACTTTGGCAATTTATGAA
* * *           * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

Alineamiento de EF189173 y *Staphylococcus schleiferi*

```
EF189173 TAGGGGATGTCATGGGGAAATACCATCCACATGGTGACTTCGTC AATTTATGAAGCAATGG
60o       TAGGGGATGTCATGGGGAAATACCATCCGCATGGTGACTTTGTGAATTTATGAAGCAATGG
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

Figura N° 7: Alineamiento de amplicones de QRDR de cepas de *Staphylococcus* spp con gen *gyrA* con el programa Clustal W. EF189169 Región parcial del gen ADN girasa de *Staphylococcus intermedius*; EF189173 Región parcial del gen ADN girasa de *Staphylococcus schleiferi* subsp *coagulans*; TCG Codón 84 serina; TTG Codón 84 leucina

Alineamiento de EF189171 y cepas de *Staphylococcus intermedius*

```
EF189171 TAGTTC TGTGTATGATGCAATGGTCCGTTTGAGTCAAGACTGGAAATTACGTCACGTGC
77o       TATTTCTGTGTATGATGCAMTGGTCCGTTTGAGTCARGACTGGAAATTACKTCACGTGC
87p       TATTTCTGTGTATGATGCAATGGTCCGTTTGAGTCAAGACTGGAAATTACGTCACGTGC
79o       TATTTCTGTGTATGATGCAMTGGTCCGTTTG-GTCR-GACTGGTAATTACKTCACGTGC
* * *           * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

Alineamiento de EF189175 y *Staphylococcus schleiferi*

```
EF189175 -----ATTGGTCAGTTGCATCCGCACGGGGATAGTT
60o       WGCATTTTTTGMGTGCGTMMGRGACGTGATTGGTM-GTTGCATCCGCACKGGGTTATTT
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

Figura N° 8: Alineamiento de amplicones de QRDR de cepas de *Staphylococcus* spp con gen *grlA* con el programa Clustal W. EF189171 Región parcial del gen de topoisomerasa IV de *Staphylococcus intermedius*; EF189175 Región parcial del gen de topoisomerasa IV de *Staphylococcus schleiferi* subsp *coagulans*; AGT codón 80 serina; ATT codón 80 isoleucina.

Relación de fenotipo y genotipo de resistencia a los antibióticos antes descritos

El resultado de la CIM de 18 cepas que presentaron resistencia a eritromicina con el método Kirby Bauer evidenció que un 96,5% presentó altos niveles de resistencia (≥ 256 ug/ml) y solo una cepa mostró un nivel de resistencia de 8 ug/ml (Tabla N° 4).

Tabla N° 4. CIM de las cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes a eritromicina

Pioderma			Otitis		
N° cepa	Especie	CIM eritromicina	N° cepa	Especie	CIM eritromicina
9	<i>S. intermedius</i>	≥ 256 ug/ml	2	<i>S. intermedius</i>	≥ 256 ug/ml
12	<i>S. intermedius</i>	≥ 256 ug/ml	14	<i>S. intermedius</i>	≥ 256 ug/ml
87	<i>S. intermedius</i>	≥ 256 ug/ml	23	<i>S. intermedius</i>	≥ 256 ug/ml
103	<i>S. intermedius</i>	≥ 256 ug/ml	56	<i>S. intermedius</i>	≥ 256 ug/ml
116	<i>S. intermedius</i>	≥ 256 ug/ml	60	<i>S. schleiferi</i>	≥ 256 ug/ml
121	<i>S. intermedius</i>	≥ 256 ug/ml	67	<i>S. intermedius</i>	8 ug/ml
			72	<i>S. intermedius</i>	≥ 256 ug/ml
			73	<i>S. intermedius</i>	≥ 256 ug/ml
			77	<i>S. intermedius</i>	≥ 256 ug/ml
			79	<i>S. intermedius</i>	≥ 256 ug/ml
			97	<i>S. intermedius</i>	≥ 256 ug/ml
			98	<i>S. intermedius</i>	≥ 256 ug/ml

Puntos de corte CIM eritromicina

Sensible $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$, intermedio 1-4 $\mu\text{g/ml}$, resistente ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ (CLSI, 2009).

Al relacionar el fenotipo con el genotipo de las cepas estudiadas se observa que en el caso de la oxacilina solo una cepa del total de cepas estudiadas (29) presentó resistencia fenotípica a este antibiótico y esta cepa evidenció la presencia del gen *mecA* (Tabla N° 5). En el caso de la tetraciclina 6/9 (66,7%) de las cepas aisladas de pioderma que presentaron resistencia fenotípica resultaron ser positivas para el gen *tetM*, en cambio en otitis externa el 100% de las cepas resistentes 7/7 a través de CIM evidenciaron la presencia del gen (Gráfico N° 1)(Tabla N° 5). Respecto de la eritromicina 6/6 (100%) de las cepas aisladas de pioderma y que fueron resistentes fenotípicamente al fármaco resultaron ser positivas a la presencia del gen *ermB* y 11/12 (92,4%) cepas aisladas desde otitis externa evidenció el gen (Gráfico N° 2) (Tabla N° 5).

Tabla N° 5. Relación fenotipo versus genotipo expresado en proporciones de cepas de *Staphylococcus* spp.

Patología	N° Cepas	Oxacilina			Tetraciclina			Eritromicina		
		Fenotipo resistente	Gen <i>mecA</i>	%	Fenotipo resistente	Gen <i>tetM</i>	%	Fenotipo resistente	Gen <i>ermB</i>	%
Pioderma	13	1	1	100	9	6	67	6	6	100
Otitis externa	16	0	0	0	7	7	100	12	11	92
Total	29	1	1	100	16	13	81,25	18	17	94,4

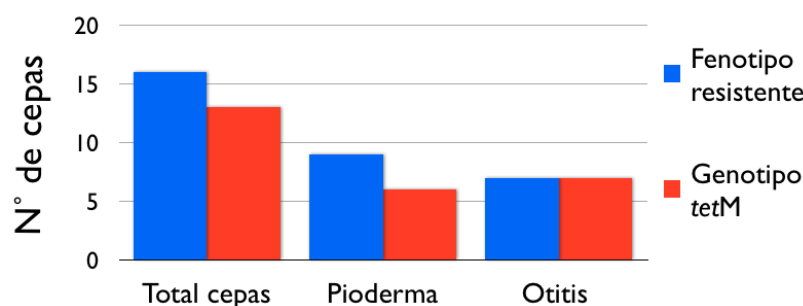


Gráfico N° 1: Perfil fenotípico y genotípico de resistencia a tetraciclinas en 16 cepas de *Staphylococcus* spp.

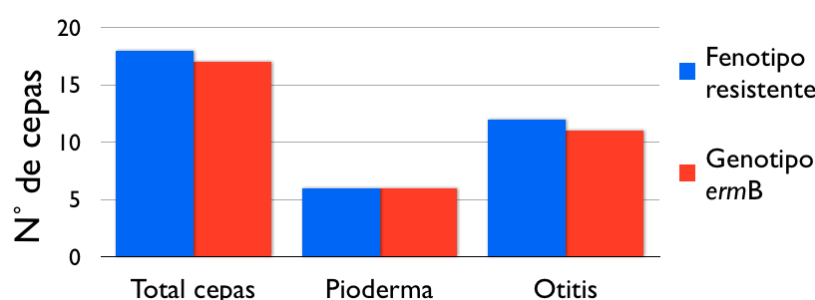


Gráfico N° 2: Perfil fenotípico y genotípico de resistencia a eritromicina en 18 cepas de *Staphylococcus* spp.

De las 15 cepas que amplificaron los fragmentos de los genes *gyrA* y *griA* se enviaron a secuenciación 6/15 (40%) amplicones del gen *gyrA* y 4/15 (27%) amplicones del gen *griA*. Los resultados de la secuenciación mostraron que el 100% de las cepas presentaron una mutación en la región QRDR que varía dependiendo del gen estudiado (Tabla N° 6).

Tabla N° 6. Relación fenotipo versus genotipo en quinolonas expresado en proporciones

Patología	N° cepas resistentes	Secuenciaciones realizadas		Cepas positivas a mutación			
		<i>gyrA</i>	<i>griA</i>	<i>gyrA</i> (TCG→TTG)	<i>griA</i> (AGT→ATT)		
Pioderma	5	4	1	4	100 %	1	100%
Otitis externa	10	2	3	2	100%	3	100%
Total	15	6	4	6	100%	4	100%

Relación entre los niveles de resistencia fenotípicas (CIM) y el genotipo

El análisis de los fenotipos y genotipos reveló que 13/29 (44,8%) cepas presentaron resistencia a un solo antimicrobiano, un 37, 9% y un 17,3% evidenció resistencia a 2 y 3 antibióticos respectivamente. La mayoría de las cepas demostró la presencia de el/los genes de resistencia correspondientes (Tabla N° 7).

Tabla N° 7. Relación entre el nivel de resistencia (CIM) y el genotipo en 29 cepas de *Staphylococcus* spp.

N° Cepa	Especie	Oxacilina		Tetraciclina		Eritromicina		Enrofloxacino	
		CIM (µg/ml)	Gen	CIM (µg/ml)	Gen	CIM (µg/ml)	Gen	CIM (µg/ml)	Mutación
Pioderma									
2	<i>S. intermedius</i>	S	0,5	R	16			S	0,25
9	<i>S. intermedius</i>	S	0,5	S	0,25	R	>256 <i>ermB</i>	S	1
12	<i>S. aureus</i>	S	0,5	S	0,25	R	>256 <i>ermB</i>	R*	4 TTG
56	<i>S. intermedius</i>	S	0,5	R	8 <i>tetM</i>			S	0,25
74	<i>S. intermedius</i>	S	0,5	R	64 <i>tetM</i>			S	0,25
75	<i>S. intermedius</i>	S	0,5	R	64 <i>tetM</i>			S	1
83	<i>S. intermedius</i>	S	0,5	R	64 <i>tetM</i>			S	0,25
87	<i>S. intermedius</i>	S	0,5	R	64	R	>256 <i>ermB</i>	R*	32 TTG/ATT
93	<i>S. intermedius</i>	S	0,5	R	64 <i>tetM</i>			S	0,25
99	<i>S. intermedius</i>	S	0,5	R	64 <i>tetM</i>			S	0,25
102	<i>S. intermedius</i>	S	0,5	S	0,25	R	>256 <i>ermB</i>	R	16
116	<i>S. intermedius</i>	S	0,5	R	8	R	>256 <i>ermB</i>	R*	1 TTG
121	<i>S. intermedius</i>	R	128 <i>mecA</i>	S	0,5	R	>256 <i>ermB</i>	R*	32 TTG
Otitis externa									
2	<i>S. intermedius</i>	S	1	S	0,5	R	>256 <i>ermB</i>	R	32
14	<i>S. intermedius</i>	S	0,25	S	0,5	R	>256 <i>ermB</i>	S	1
20	<i>S. intermedius</i>	S	0,25	R	128 <i>tetM</i>			S	0,25
23	<i>S. intermedius</i>	S	0,25	R	64 <i>tetM</i>	R	>256 <i>ermB</i>	S	0,25
28	<i>S. intermedius</i>	S	0,5	S	0,5			R	16
44	<i>S. intermedius</i>	S	0,25	R	128 <i>tetM</i>			S	1
56	<i>S. aureus</i>	S	1	S	0,5	R	>256 <i>ermB</i>	R*	32 TTG
60	<i>S. schleiferi</i>	S	0,25	S	0,5	R	>256 <i>ermB</i>	R*	32 TTG/ATT
67	<i>S. intermedius</i>	S	2	S	0,5	R	8 <i>ermB</i>	R	32
72	<i>S. intermedius</i>	S	0,5	R	32 <i>tetM</i>	R	>256 <i>ermB</i>	S	1
73	<i>S. intermedius</i>	S	0,25	R	64 <i>tetM</i>	R	>256	S	1
77	<i>S. intermedius</i>	S	0,25	R	128 <i>tetM</i>	R	>256 <i>ermB</i>	R*	32 ATT
79	<i>S. intermedius</i>	S	0,25	S	0,25	R	>256 <i>ermB</i>	R*	8 ATT
89	<i>S. intermedius</i>	S	0,5	S	0,25			R	32
97	<i>S. aureus</i>	S	1	R	128 <i>tetM</i>	R	>256 <i>ermB</i>	R	32
98	<i>S. intermedius</i>	S	0,5	S	0,25	R	>256 <i>ermB</i>	R	32

Las CIM de los antibióticos oxacilina, tetraciclina y enrofloxacino fueron entregados por el estudio realizado por Abusleme, 2009 y Heresmann, 2010, en cambio, la CIM a eritromicina se llevó a cabo en el presente estudio y solo a las cepas que presentaron resistencia con el método de Kirby Bauer en aquellos estudios. En el caso de enrofloxacino, todas las cepas amplificaron los fragmentos de los genes *gyrA* y *grlA*, sin embargo, la mutación fue observada solo en las cepas que se enviaron a secuenciar **TTG**: Leucina (gen *gyrA*); **ATT**: Isoleucina (gen *grlA*). * Cepas secuenciadas.

Puntos de corte oxacilina; sensible ≤ 2µg/ml; resistente ≥ 4 µg/ml. Tetraciclina; sensible ≤ 4 µg/ml, sensibilidad intermedia 8 µg/ml, resistente ≥ 16 µg/ml. Eritromicina; sensible ≤ 0,5 µg/ml, sensibilidad intermedia 1 – 4 µg/ml, resistente ≥ 8 µg/ml. Enrofloxacino; sensible ≤ 0,5 µg/ml, sensibilidad intermedia 1 – 4 µg/ml, resistente ≥ 8 µg/ml (CLSI, 2006 y CLSI 2009). **S**: Sensible; **R**: Resistente.

Respecto del antimicrobiano oxacilina, dado que se evidenció resistencia en una única cepa no se pudo establecer alguna asociación entre la CIM y el genotipo observado, sin embargo, cabe destacar que la cepa de *Staphylococcus intermedius*, aislada de pioderma, resistente a oxacilina presentó una CIM elevada de 128 µg/ml (Tabla N° 7).

En el caso de la tetraciclina el análisis del fenotipo versus el genotipo, se puede relacionar con el alto nivel de CIM en las cepas que presentaron el gen *tetM*, 11/13 (84,6%) evidenciaron una CIM de > a 64 µg/ml y solo 2 cepas presentaron una CIM menor de 8 µg/ml y 32 µg/ml. Las CIM de las cepas que no amplificaron también es menor (8 µg/ml y 16 µg/ml) excepto una que mostró una CIM de 64 µg/ml (Tabla N° 7).

Respecto de los macrólidos y lincosamidas, una cepa presentó una CIM baja a eritromicina, pero aun así es resistente, de 8 µg/ml, el resto de las 17 cepas mostró una CIM de \geq 256 µg/ml (Tabla N° 7). La presencia del gen *ermB* se detectó en un 94,4 % de las cepas, incluyendo la cepa N° 67 aislada de otitis que presentó una CIM de 8 µg/ml, y cabe destacar que la cepa que no fue positiva a la presencia del gen presentaba una alta CIM de 256 ug/ml.

Los niveles de resistencia de quinolonas varían según la patología, en pioderma 5 cepas son resistentes y la CIM varía de 1 a 32 µg/ml, en cambio en otitis externa las CIM de las 10 cepas resistentes fenotípicamente es uniforme, 8 cepas presentaron niveles de 32 µg/ml, 1 cepa de 16 µg/ml y una de 8 µg/ml. Los amplicones de QRDR secuenciados corresponden a cepas con CIM que van desde 1 a 32 µg/ml y todas presentaron mutaciones (Tabla N° 7). La cepa de *Staphylococcus schleiferi* subesp *coagulans*, presentó mutación en ambos genes *gyrA* y *griA*, al igual que la cepa N° 87 aislada desde pioderma.

Método D-test.

Respecto al fenotipo de resistencia a macrólidos la mitad de las cepas estudiadas (9/18) presentaron el fenotipo Mácrólidos-Lincosamidas-Streptogramina constitutivo

(MLSc), el cual se refiere a que la cepa es resistente a los dos antibióticos enfrentados (eritromicina y clindamicina) (Tabla N° 8) (Figura N° 10). Las 9 cepas restantes mostraron el fenotipo MLS inducible (MLSi) (Tabla N° 9), en el cual, la cepa es resistente a eritromicina y sensible a clindamicina, sin embargo, cuando la clindamicina toma contacto con la eritromicina la cepa expresa resistencia inducible de la clindamicina (Tabla N° 8 y N° 9).

Tabla N° 8. CIM a macrólidos y fenotipo de resistencia

N° Cepa	Especie	Etest E (µg/ml)	CIM DA (µg/ml)	Fenotipo
9	<i>S. intermedius</i>	R >256	R 64	MLSc
12	<i>S. aureus</i>	R >256	R 1	MLSi
87	<i>S. intermedius</i>	R >256	R 1	MLSc
103	<i>S. intermedius</i>	R >256	R 128	MLSc
116	<i>S. intermedius</i>	R >256	R 2	MLSi
121	<i>S. intermedius</i>	R >256	R 1	MLSi
2	<i>S. intermedius</i>	R >256	R 64	MLSi
14	<i>S. intermedius</i>	R >256	R 8	MLSi
23	<i>S. intermedius</i>	R >256	R 128	MLSc
56	<i>S. aureus</i>	R >256	R 64	MLSi
60	<i>S. schleiferi</i>	R >256	R 4	MLSi
67	<i>S. intermedius</i>	R 8	R 128	MLSi
72	<i>S. intermedius</i>	R >256	R 128	MLSi
73	<i>S. intermedius</i>	R >256	R 4	MLSc
77	<i>S. intermedius</i>	R >256	R 128	MLSc
79	<i>S. intermedius</i>	R >256	R 128	MLSc
97	<i>S. aureus</i>	R >256	R 128	MLSc
98	<i>S. intermedius</i>	R >256	R 128	MLSc

Puntos de corte eritromicina (E) sensible $\leq 0,5$ µg/ml, intermedia 1 – 4 µg/ml, resistente ≥ 8 µg/ml (CLSI, 2009). Clindamicina (DA) sensible $\leq 0,5$ µg/ml, intermedia 1 – 2 µg/ml, resistente ≥ 4 µg/ml (CLSI, 2006).



Figura N° 10: CIM por método de Etest y sensibilidad por disco de difusión. Se observa que no existe halo de inhibición alrededor de los discos antibióticos y tampoco en la tira de Etest, lo que nos demuestra un fenotipo de MLSc y que la CIM es > 256 µg/ml respectivamente.

Tabla

N° 9. Correlación entre fenotipo de

resistencia y nivel de resistencia medida en CIM a eritromicina

CIM Fenotipo	CIM E resistente CIM DA \leq 64 $\mu\text{g/ml}$	CIM E resistente CIM DA $>$ 64 $\mu\text{g/ml}$	Total
MLSc	3	6	9
MLSi	7	2	9
Total	10	8	18

CIM (Concentración inhibitoria mínima), MLSc/i; Macrólido-Lincosamida-Estreptogramina constitutiva/inducible, E; eritromicina; DA; clindamicina.

Al analizar el fenotipo con el nivel de resistencia a clindamicina determinada a través de CIM se estableció que, a pesar que no existe una asociación estadísticamente significativa $p \leq 0,058$, se observa una tendencia que relaciona las cepas con CIM a clindamicina $>$ 64 $\mu\text{g/ml}$ con un fenotipo MLSc (Macrólido-lincosamida-estreptogramina constitutivo), en cambio aquellas cepas con CIM \leq 64 $\mu\text{g/ml}$ expresan un fenotipo MLSi (inducible), siendo la resistencia a clindamicina inducible, en este caso por eritromicina.

DISCUSIÓN

La resistencia antimicrobiana está a la vanguardia mundial de los problemas de salud pública en medicina humana y medicina veterinaria. Esta resistencia está intrínsecamente asociada al uso de agentes antimicrobianos y principalmente al abuso de éstos en la práctica clínica de pacientes y en la producción de animales de abasto.

La prevalencia y el grado de resistencia antimicrobiana en infecciones supurativas dermatológicas en medicina veterinaria se ha incrementado en el mundo (Werckentin *et al.*, 2001). Bacterias del género *Staphylococcus* spp. son las principales involucradas en patologías de este tipo como por ejemplo, pioderma y otitis en caninos, y es importante considerar que estos agentes muestran con frecuencia un rápido desarrollo y diseminación de resistencia antimicrobiana. Desafortunadamente este desarrollo no es documentado continuamente en medicina veterinaria (Hoekstra y Paulton, 2002). Esta falta de información que se presenta a nivel mundial también se observa en el país en el que no hay reportes que indiquen el perfil de resistencia y mecanismos moleculares de resistencia a antimicrobianos en las principales especies de *Staphylococcus* (*S. intermedius* y *S. schleiferi*) aislados de caninos. Esta falta de vigilancia del fenómeno de resistencia a nivel nacional dificulta realizar un análisis de un posible descenso, mantención o aumento de la resistencia antimicrobiana de estos agentes bacterianos en Chile.

Sin embargo, a nivel mundial es reconocido el aumento en los niveles de resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus intermedius*, y están descritos en la literatura los mecanismos moleculares por lo cuales ésta se lleva a cabo. Los resultados de este estudio coinciden con estos antecedentes internacionales referidos a los mecanismos moleculares de resistencia que poseen las bacterias *Staphylococcus* coagulasa positivo, que afectan a caninos en el país.

En relación a las tetraciclinas, un 81,25% de las cepas que mostraron ser resistentes fenotípicamente a través de CIM amplificaron el gen *tetM*, esto coincide con lo descrito en la literatura, ya que este gen es el principal involucrado en la resistencia de *Staphylococcus intermedius* aislados desde caninos (Kim *et al.*, 2005).

Las cepas que resultaron ser fenotípicamente resistentes a tetraciclinas y que no amplificaron el fragmento de este gen (*tetM*), podría explicarse por una de estas dos situaciones; una de ellas podría ser por una baja afinidad de las cepas a los partidores utilizados en este estudio para evidenciar la presencia de este gen y la otra podría ser que si bien el gen *tetM* es el principal mecanismo detectado en cepas de *Staphylococcus intermedius* y que otorga resistencia mediante la protección ribosomal (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001), impidiendo que el antibiótico ejerza su efecto sobre la célula bacteriana, las cepas que no amplificaron el fragmento para este gen presenten otro mecanismo de resistencia como por ejemplo bombas de eflujo.

Los genes *tetK* y *tetL*, también han sido descritos en *Staphylococcus intermedius* pero en menor medida, ambos genes confieren resistencia por el mecanismo de bombas de eflujo (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001). En el estudio de Kim *et al.*, (2005), encontraron el gen *tetM* en un 97% (29 de 30 cepas) de las cepas, en un 24% (7/30) el gen *tetL* y en un 14% (4/30) el gen *tetK*; 6 cepas presentaron los genes *tetM* y *tetL* simultáneamente y 4 presentaron los genes *tetM* y *tetK*. Esto es muy importante a considerar en un estudio posterior porque cabe la posibilidad de que las cepas estudiadas posean más de un gen en su genotipo.

Es importante destacar además el elevado nivel de resistencia (CIM) en las cepas estudiadas, con la excepción de una, aislada de pioderma, las cepas que amplificaron el gen *tetM* presentan una resistencia en la CIM ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$, lo cual podría sustentar la idea de la presencia de más de un gen y que de esta manera potenciaría el nivel de resistencia a tetraciclinas por parte de la cepa, con el consiguiente aumento de la CIM.

Los mácrolidos (eritromicina) y lincosamidas (clindamicina) son una buena alternativa terapéutica para enfermedades dermatológicas principalmente pioderma, aunque generalmente son utilizadas solo en casos de hipersensibilidad o resistencia antimicrobiana a β -láctamicos (Ganiere *et al.*, 2005). Sin embargo, considerando los resultados de este estudio donde se observó un alto nivel de resistencia en las cepas resistentes mediante Kirby Bauer, las cuales mostraron en 17/18 (94,4%) cepas una

resistencia ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$, sería importante realizar un antibiograma previo y evitar utilizarlos en terapias empíricas.

El estudio molecular realizado a las cepas que presentaron resistencia a macrólidos y lincosamidas, evidenció que 17 de las cepas estudiadas presentaron el gen *ermB*, coincidiendo con lo que se describe en la literatura, siendo este gen el principal involucrado en la resistencia de *Staphylococcus intermedius* aislados desde caninos (Lüthje y Schwarz, 2007). Este gen confiere resistencia a las cepas mediante codificación de metilasas ribosomales que disminuyen la unión de los macrólidos y lincosamidas a su sitio de acción. La cepa que no amplificó el fragmento del gen *ermB* puede deberse a que el mecanismo por el cual esta cepa presenta resistencia a esta familia de antimicrobianos sea diferente, como se describe en el estudio de Lüthje y Schwarz (2007) donde se detectó la presencia del gen *msrA* en *Staphylococcus intermedius*. O puede explicarse porque los “partidores” utilizados en este estudio poseen una baja afinidad por el gen a estudiar en esta cepa, por lo tanto, no se amplificó durante la realización de la PCR.

En algunas ocasiones el genotipo de resistencia se relaciona con el fenotipo que expresa la bacteria en relación a su nivel de resistencia determinado por CIM, es así como se describe que la resistencia a través de metilasas ribosomales se expresa con elevados niveles de resistencia, en cambio, otros mecanismos como bombas de eflujo presentan un nivel de resistencia menor (Torres, 2002).

En relación al estudio para detectar el fenotipo de resistencia de estas cepas, cabe mencionar que el 50% de ellas presentó el fenotipo MLSi, lo cual proporciona una importante información referido a que si en el diagnóstico de rutina no se realiza esta detección en la que se caracteriza el fenotipo de resistencia, las cepas podrían informarse como sensible a un fármaco que finalmente al ser utilizado en la práctica clínica resulte en una terapia fracasada. En medicina humana la realización del D-test durante el antibiograma es de rutina para las especies del género *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp., según las normas que dicta el CLSI, 2009, en cambio, en medicina veterinaria este procedimiento no es realizado en los laboratorios de forma rutinaria, lo cual puede subestimar la real resistencia al antimicrobiano por parte de la cepa en

estudio, perjudicando directamente al paciente, durante el tratamiento (Schreckenberger *et al.*, 2004; Tamariz *et al.*, 2009).

Los mecanismos moleculares de resistencia a fluoroquinolonas en *Staphylococcus intermedius* y *Staphylococcus schleiferi* subsp *coagulans*, a nivel mundial está comenzando a ser estudiada. Uno de los primeros estudios publicados fue el año 2007, por Intorre *et al.*, donde se describe como mecanismo de resistencia la mutación de los genes que codifican a las subunidades de la ADN girasa y de la topoisomerasa IV, en la región QRDR. Por lo tanto, luego de amplificar los genes se deben secuenciar para evidenciar la mutación que le confiere a la bacteria la capacidad de ser resistente a las quinolonas.

Un 8,8% de las cepas (15/170), presentaron resistencia fenotípica a enrofloxacino y el 100% de las cepas que se enviaron a secuenciar evidenciaron una mutación en los fragmentos QRDR. Los fragmentos amplificados del gen *gyrA* de *Staphylococcus intermedius* y *Staphylococcus schleiferi* subesp. *coagulans* presentaron la misma mutación descrita por Intorre *et al.*, (2007) y Descloux *et al.*, (2008), en el cual en la posición 84 se reemplazó el aminoácido serina (TCG) por una leucina (TTG), Mientras que la mutación observada en el gen *gla* de *S. intermedius* y *S. schleiferi* coincide con el estudio realizado por Descloux *et al.*, (2008), en que la región QRDR mutó en la posición 80 reemplazando al aminoácido serina (AGT) por una isoleucina (ATT).

La importancia de los resultados encontrados en este estudio radica en que esta familia de antibióticos, si bien tienen una buena efectividad frente a los agentes bacterianos estudiados y además tienen una buena biodisponibilidad en tejidos como la piel, estos sólo debieran ocuparse en casos de *Staphylococcus* meticilino-resistente (Otero *et al.*, 2001). Al analizar los resultados, el problema está en que en este estudio solo se encontró una cepa de *Staphylococcus intermedius* meticilino-resistente, lo que señala que esta bacteria aún demuestra ser sensible frente a los antibióticos de “primera línea”, sin embargo, la resistencia frente a quinolonas es mucho mayor, lo que sugiere un abuso en la utilización de este fármaco. La farmacocinética de las quinolonas permite que sea una buena alternativa en patologías dermatológicas, ya que tiene una buena biodisponibilidad en tejidos periféricos como piel y oído (Ihrke *et al* 1999;

Zurich, 2001), sin embargo, también es ampliamente utilizado en infecciones respiratorias, infecciones del tracto urinario y prostatitis . Las quinolonas tienen además la ventaja de poder administrarse una vez al día (Ihrke, 1999) y con buenos resultados, lo que significa comodidad para los propietarios y por consiguiente una terapia con mayor probabilidad de éxito para el paciente. Si bien las quinolonas no son utilizadas solo en este tipo de patologías, de todas maneras, su uso debiera restringirse o controlarse mejor, ya que esta es una buena opción de terapia en medicina veterinaria para patologías producidas por *Staphylococcus spp.* meticilino resistente y este es tema relevante, ya que, las alternativas terapéuticas en estos casos son escasas o de elevados costos, lo cual resulta poco viable de utilizar en medicina veterinaria.

A nivel mundial, existen numerosos reportes de la problemática actual que existe en relación a la aparición de cepas de *S. intermedius* y *S. schleiferi* que han demostrado ser meticilino-resistente. En este estudio de un total de 170 cepas estudiadas solo una de ellas presentó resistencia fenotípica a la oxacilina, lo que corresponde a un 0,5%. Se infiere resistencia a la meticilina cuando se presenta este tipo de resistencia pero debe corroborarse con la realización de la PCR para detectar el gen *mecA* (van Duijkeren *et al.*, 2004; Loeffler *et al.*, 2007; Griffeth *et al.*, 2008). Esta única cepa resultó ser positiva frente a la pesquisa del gen *mecA*, por lo tanto, se confirma la presencia de la primera cepa de *Staphylococcus intermedius* meticilino resistente aislado de pioderma desde un canino en el país.

La presencia de una cepa aislada de un canino que tiene la característica de ser meticilino resistente es un importante antecedente se debiera considerar por diversos motivos. Uno de ellos, es que las alternativas terapéuticas disminuyen en estas cepas, ya que la presencia y expresión de este gen no solo determina la resistencia por parte de la bacteria a penicilinas sino que además a cefalosporinas y carbapenemas (Loeffler *et al.*, 2007), aunque esta última familia de antibióticos realmente no se usa en la práctica clínica veterinaria. La disminución de alternativas, es un punto relevante, ya que estos son los antimicrobianos de “primera línea” utilizados en medicina veterinaria para el tratamiento de enfermedades dermatológicas. Estos antibióticos se convierten en una buena elección por sus características: bajo costo, buena absorción oral y biodisponibilidad en tejidos (Harvey y Hunter, 1999). Además en el caso de las cefalosporinas el ritmo horario es apropiado (generalmente cada 12 horas) (Kahn,

2008), lo cual en el área veterinaria es un factor importante ya que resulta en un administración mas cómoda para el propietario lo que finalmente determinara que se lleve a cabo una terapia exitosa.

En medicina humana la presencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR) se describe desde 1961 y actualmente en algunos hospitales de Estados Unidos de América los aislados de SAMR puede alcanzar incluso un 55% (Umber y Bender, 2009). Por otro lado, *Staphylococcus* meticilino resistente aislados desde infecciones en tejidos blando en animales domésticos ha sido bien documentados desde 1970 (Abraham *et al.*, 2007). Diversos estudios describen la presencia de mascotas que son portadores asintomáticos de SAMR, y esto ha significado que para el tratamiento de pacientes humanos con infecciones recurrentes de SAMR es necesario la identificación y posterior tratamiento de sus mascotas cuando han resultado ser positivas a SAMR. (van Duijkeren *et al.*, 2004 y Sing *et al.*, 2008). Un estudio preliminar Umber y Bender (2009) sugieren que perros y gatos son colonizados transitoriamente por SAMR, esto indicaría que no sería necesario realizarles tratamiento a menos que se presenten infecciones recurrentes en sus propietarios.

En una revisión realizada en la Universidad de Minnessota en un centro médico veterinario, animales que presentaron lesiones dérmicas que no mejoraban, demostraron tener SAMR y resultaron tener un genotipo idéntico a los SAMR aislados desde humanos asintomáticos que mantenían un contacto estrecho con ellos. Se entrevistó a los propietarios y todos aquellos que tenían mascotas portadoras de SAMR resultaron haber estado hospitalizados recientemente, tener enfermedades con sistema inmune deprimido o estar con tratamiento quimioterapéutico. Esto sugiere que lo más probable es que las mascotas adquirieron la infección desde sus dueños (Umber y Bender, 2009). Por otra parte, existe evidencia de aislamiento de *S. intermedius* en humanos que son propietarios de mascotas que poseen patologías como por ejemplo dermatitis atópica, o pioderma profundo. Esto indicaría una posible transmisión de *S. intermedius* entre mascotas-propietario (Goodacre *et al.*, 1997, Harvey *et al.*, 1994., Tanner *et al.*, 200 y Guardabassi *et al.*, 2004).

Por lo tanto, como se ha observado la transferencia de *S. intermedius* entre los perros y sus dueños y *S. aureus* entre los dueños y sus mascotas, podría implicar la

posibilidad de que genes de resistencia pudieran ser transmitidos entre las diferentes especies de bacterias (es decir, la transferencia de elementos de la resistencia entre *S. intermedius* y *S. aureus*). Y este es un punto importante, ya que, esto significa que las mascotas que cada vez tienen un contacto mas estrecho con sus propietarios podrían actuar como reservorio de resistencia convirtiéndose en un potencial riesgo zoonótico.

Los resultados de esta investigación justifican la necesidad de realizar programas dirigidos a informar a profesionales del área acerca del actual comportamiento frente a antimicrobianos en bacterias que afectan habitualmente a mascotas en el país. Además, efectuar controles destinados a prevenir el uso excesivo de estos antibióticos en los animales domésticos por el alto riesgo de resistencia antimicrobiana lo cual conlleva a una disminución en las alternativas de terapia y a una potencial transferencia de microorganismos resistentes a sus propietarios.

Finalmente, cabe destacar que este estudio es pionero a nivel nacional, en el cual se realiza la caracterización molecular de resistencia en *Staphylococcus* coagulasa positivo, principalmente *Staphylococcus intermedius*, aislados desde pioderma y otitis en caninos. Y los resultados en este estudio coinciden con los publicados a nivel mundial.

CONCLUSIONES

- Por primera vez en el país se detecta la presencia de una cepa de *Staphylococcus intermedius* meticilino resistente aislada desde pioderma en un canino en la cual se detectó la presencia y expresión del gen *mecA*.
- La detección de genes que codifican resistencia a macrólidos, lincosamidas (*ermB*) y tetraciclinas (*tetM*) se evidenció en altos porcentajes, concordando con los resultados fenotípicos de estas cepas.
- Se observó un elevado porcentaje de cepas resistentes a fluoroquinolonas originadas por mutaciones, estas se observaron en cepas que aun demuestran ser sensibles a β -láctamicos.
- Se observó concordancia entre el genotipo y el fenotipo de resistencia.
- Los niveles de resistencia determinados por CIM en las cepas, se relacionan con el tipo de genes evidenciados y que codifican resistencia a los antibióticos macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas y fluoroquinolonas. Sin embargo, dado que solo una cepa presentó resistencia a oxacilina no se pudo establecer algun tipo de asociación para este antimicrobiano.

BIBLIOGRAFÍA

- **ABRAHAM, J.; MORRIS, D.; GRIFFETH, G.; SHOFER, F. y RANKIN, S.** 2007. Surveillance of healthy cats and cats with inflammatory skin disease for colonization of the skin by methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* ssp. *schleiferi*. *Veterinary Dermatology*. 18: 252-259.
- **ABUSLEME** Garay, Francisco. Aislamiento y análisis de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus intermedius* de perros con otitis externa. Tesis (Obtención de título de Médico Veterinario). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 2009. 50 h.
- **BANNOEHR, J; FRANCO, A; IURESCIA, M; BATTISTI, A y FITZGERALD, R.** 2009. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*. 47: 469-471.
- **CALVO, J. y MARTÍNEZ, L.** 2009. Mecanismo de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 1: 44-52.
- **CARATTOLI, A.** 2001. Importance of integrons in the difusión of resistance. *Veterinary Research*. 32: 243-259.
- **CHAMBERS, H.** 2002. Quimioterapéuticos. En: KATZUNG, B. *Farmacología básica y clínica*. 8ª ed. México. Manual Moderno. pp. 849-902.
- **CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE.** 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. CLSI, Pennsylvania
- **CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE.** 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. CLSI, Pennsylvania.

- **DESCLOUX, S., ROSSANO, A. y PERRETEN, V.** 2008. Characterization of new of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) and topoisomerase genes in fluoroquinolone and methicillin- resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. Journal of Clinical Microbiology. 4: 1818-1823.

- **DEVRIESE, L; VANCANNEYT, M; BAELE, M; VANEECHOUTTE, M; De GRAEF, E; SNAUWAERT, C; DAWYNDT, P; SWINGS, J; DECOSTERE, A y HAESEBROUCK.** 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55: 1569–1573

- **FIEBELKORN, K.; CRAWFORD, S.; MCELMEEL, M. y JORGENSEN, J.** 2003. Practical disk diffusion methods for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci*. Journal of Clinical Microbiology. 10: 4740-4744.

- **FITZGERALD, S.** 2009. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of methicillin resistance. Veterinary Dermatology. 20: 490-495.

- **GANIÈRE, JP.; MÉDAILLE, C.; LIMET, A.; RUVOEN, N. y ANDRÉ-FONTAINE, G.** 2001. Antimicrobial activity of enrofloxacin against *Staphylococcus intermedius* isolated from canine pyodermas. Veterinary Dermatology. 12: 171-175

- **GANIÈRE, J.; MÉDAILLE, C. y MANGION, C.** 2005. Antimicrobial Drug Susceptibility of *Staphylococcus intermedius* Clinical Isolates from Canine Pyoderma. Journal Veterinary Medicine Series B. 52: 25-31.

- **GONZÁLEZ, G.; MELLA, S.; ZEMELMAN, R., BELLO, H. y DOMÍNGUEZ, M.** 2004. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. Revista Médica Chilena. 132: 619-626.

- **GOODACRE, R.; HARVEY, R. y HOWELL, S.** 1997. An epidemiological study of *Staphylococcus intermedius* strains isolated from dogs, their owners and veterinary surgeons. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 44: 49–64.

- **GRIFFETH, G.; MORRIS, D.; ABRAHAM, J.; SHOFER, F y RANKIN, S.** 2008. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Journal Compilation*. 19: 142-149.

- **GUARDABASSI, L, SCHWARZ, S. y LLOYD, D.** 2004. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54: 321-332

- **GUZMÁN., M y ALONSO, G.** 2008. Integrones clase 1 asociados a plásmidos en cepas de *Klebsiella pneumoniae*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 28: 105-109

- **HÁJEK, V.** 1976. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 26: 401-408.

- **HARVEY, R. y HUNTER, P.** 1999. The properties and use of penicillins in the veterinary field, with special referente to skin infections in dogs and cats. *Veterinary Dermatology*. 10: 177-186.

- **HAWKEY, P y JONES, A.** 2009. The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antmicrobial Chemotherapy*. 64 Suppl 1: i3-i10.

- **HERESMANN Meyer, Marysol.** Aislamiento y análisis de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus intermedius* de perros con pioderma. Tesis (Obtención de título de Médico Veterinario). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 2010. 50 h.

- **HOEKSTRA, K y PAULTON R.** 2002. Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* in dogs. *Journal of Applied Microbiology*. 93; 406-413.

- **IGIMI, S.; TAKAHASHI, E. y MITSOUKA, T.** 1990. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. Nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 40: 409-411.

- **IHRKE, P.; PAPICH, M. y DEMAUELLE, T.** 1999. The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology. *Veterinary Dermatology*. 10: 193-204

- **INTORRE, L.; VANNI, M.; DI BELLO, D.; PRETTI, C.; MEUCCI, V.; TOGNETTI, R.; SOLDANI, G.; CARDINI, G. y JOUSSON, O.** 2007. Antimicrobial susceptibility and mechanism of resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi*. *Journal veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 30: 464-469.

- **JONES, R.; KANIA, S.; ROHRBACH, B.; FRANK, B. y BEMIS, D.** 2007. Prevalence of oxacillin and multidrug-resistant staphylococci in clinical samples from dogs. *Journal American Veterinary Medical Association*. 230. 221-227

- **JOUSSON, O.; DI BELLO, D.; VANNI, M.; CARDINI, G.; SOLDANI, G.; PRETTI, C. e INTORRE, L.** 2007. Genotypic versus phenotypic identification of staphylococcal species of canine origin with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*. *Veterinary Microbiology*. 123: 238-44.

- **JENSEN, L.; FRIMODT-MÖLLER, N. y AARESTRUP F.** 1999. Presence of erm gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiology Letters*. 170: 151-158

- **KANIA, S.; WILLIAMSON, N.; FRANK, L.; WILKES, R.; JONES, R.; y BEMIS, D.** 2004. Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. *American Journal of Veterinary Research*. 9: 1265-1268.

- **KAHN, C.** 2008. Pharmacology, Antibacterial Agent. *The Merck Veterinary Manual*. Ninth Edition. Merck & Co., Inc. NJ. Usa.

- **KIM, T.; NA, R. y LEE, J.** 2005. Investigations into the Basis of Chloramphenicol and Tetracycline Resistance in *Staphylococcus intermedius* Isolates from Cases of Pioderma in Dogs. *Journal Veterinary Medicine*. 52: 119-124.

- **KOLETAR, S.** 2000. Antimicrobial mechanism of action EN: MAHON, C y MANUSELIS, G. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 2^{da} Edición. W.B. Saunders company. pp. 52-104

- **LEWIS, R.; TSAI, F. y WIGLEY, D.** 1996. Molecular mechanisms of drug inhibition on DNA gyrase. *BioEssays*, 18 (8): 661-671.

- **LILENBAUM, W.; VERAS, M.; BLUM, E. y SOUZA, G.** 2000. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Applied Microbiology*. 31: 42-45.

- **LLOYD, D.; LAMPORT, I. y FEENEY, C.** 1996: Sensitivity to antibiotics amongst cutaneous and mucosal isolates of canine pathogenic staphylococci in the UK 1980–96. *Veterinary Dermatology*. 7: 171–175.

- **LOEFFLER, A.; LINEK, M.; MODDLEY, A.; GUARDABASSI, L.; SUNG, J.; WINKLER, M.; WEISS, R. y LLOYD, D.** 2007. First of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Journal Compilation*. 18:421-421.

- **LÜTHJE, P. y SCHWARZ, S.** 2007. Molecular basis of resistance to macrolides and lincosamides among staphylococci and streptococci from various animal sources collected in the resistance monitoring program Bft-GermVet. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 29: 528-535.

- **MALIK, S.; CHRISTENSEN, H.; PENG, H. y BARTON, M.** 2007. Presence and diversity of the β -lactamase gene in cat and dog staphylococci. *Veterinary Microbiology* 123: 162-168.

- **MEDLEAU, L., LONG, R.; BROWN, J. y MILLER, H.** 1986: Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from canine pyodermas. *American Journal of Veterinary Research*. 47: 229–231.

- **MORRIS, D.; ROOK, K.; SHOFER, F. y RANKIN S.** 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 (2003-04). *Veterinary Dermatology*. 17: 332-337.

- **MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. y PFAÜER, M.** 2005. Antibióticos. *Microbiología Médica*. 5^{ta} ed. España. Elsevier. pp. 203-213.

- **NOBLE, W. y KENT, L.** 1992: Antibiotic resistance in *Staphylococcus intermedius* isolated from cases of pyoderma in the dog. *Veterinary Dermatology*. 3: 71–74.

- **NOLI, CH. y BOOTHE, D.** 1999. Macrólidos and lincosamidas. *Veterinary Dermatology*. 10: 217-223.

- **OTERO, J.; MESTORINO, N. y ERRECALDE, J.** 2001. Enrofloxacin: una fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte I: Química, mecanismo de acción, actividad antimicrobiana y resistencia bacteriana. *Analecta Veterinaria*. 21: 31-41.

- **PRIETO, J. y CERVERA, L.** 2001. Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas. *Medicine*. 8: 3707-3714.

- **RYFFEL, C.; TESCH, W.; BIRCH-MACHIN, I.; et al.** 1990. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Gene*. 94: 137-138

- **ROSYCHUK, R. y LUTTGEN, P.** 2002. Enfermedades del oído. En: ETTINGER, S. y FELDMAN, E. *Tratado de Medicina Interna Veterinaria*. 5^a ed. California. Inter-Médica. pp. 1097-1115.

- **SASAKI, T.; KIKUCHI, T.; TANAKA , Y.; TAKAHASHI, N.;KAMATA, S; y HIRAMATSU, K.** 2007. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 2770-2778.

- **SCHRECKENBERGER, P.; ILENDI, E. y RISTOW, K.** 2004. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococci in a community and a tertiary care hospital. *Journal of Clinical Microbiology*. 6: 2777-2779.

- **SCHWARZ, S.; ROBERTS, M.; WERCKENTHIN, C.; PANG, Y. y LANGE, C.** 1998. Tetracycline resistance in *Staphylococcus spp.* from domestic animals. *Veterinary Microbiology*. 63: 217-227.

- **SCHWARZ, S. y NOBLE, W.** 1999. Aspects of bacterial resistance to antimicrobial used in veterinary dermatological practice. *Veterinary Dermatology*. 10: 163.176

- **SCHWARZ, S y CHASLUS-DANCLA, E.** 2001. Use of antimicrobial in veterinary medicine and mechanism of resistance. *Veterinary Research*. 32: 201-225

- **SCOTT, D.; MILLER, W. y GRIFFIN, E.** 2001. Muller y Kirk´s Small Animal Dermatology. 6^{ta} Ed. Philadelphia. WB Saunders Company. pp. 274-335.

- **SING, A.; TUSCHAK, C. y HORMANSDORFER, S.** 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a family and its pet cat. *The New England Journal of Medicine*. 358: 1200-1201.

- **SPEER, B. SHOEMAKER, B y SALYERS, A.** 1992. Bacterial resistance to tetracycline: mechanism, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiological Reviews*. 5: 387-399.

- **STEWART, C.; RANEY, P.; MORRELL, A.; WILLIAMS, P.; MCDOUGAL, L.; JEVITT, L.; MCGOWAN, J. y TENOVER, F.** 2005. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 4: 1716-1721.

- **TAMARIZ, J.; CRUZ, J.; ATENCIA, A.; FIGUEROA, J.; HORNA, G. y GUERRA, H.** 2009. Resistencia a clindamicina inducida por eritromicina en *Staphylococcus aureus* aislados de tres hospitales de Lima, Perú. *Acta Médica Peruana*. 1: 12-16.

- **TANNER, M.; EVERETT, C. y YOUVAN, D.** 2000. Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. *Journal of Clinical Microbiology* .38: 1628–31.

- **TENOVER, F.** 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*. 6A: S3–S10.

- **TORRES, C.** 2002. Lectura interpretada del antibiograma en cocos grampositivos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 20: 354-364.

- **UMBER, J. y BENDER, J.** 2009. Pets and antimicrobial resistance. *Veterinary Clinical Small Animal*. 39: 279-292.

- **VALDÉZ, E. y CASTAGNETO H.** 1988. Farmacología clínica de las quinolonas de 3^{ra} generación. *Revista Argentina de Infectología* 1988; 3: 4-10.

- **vAN DUIJKEREN, E.; WOLFHAGEN, M.; BOX, A.; HECK, M.; WANNET, W. y FLUIT, C.** 2004. Human-to-dog transmisión of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*. 10: 2235-2237.

- **VANNI, M.; TOGNETTI, R.; PRETTI, C.; CREMA, F.; SOLDANI, G.; MEUCCI, V. y INTORRE, L.** 2009. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolated from dogs. *Research in Veterinary Science*. 87: 192-195.

- **WERCKENTHIN, C. CARDOSO, M. MARTEL, J. y SCHWARZ, S.** 2001. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Research*. 32: 341-362.

- **WOLFSON, J. y HOOPER, D.** 1985. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 28: 581-586.

- **YAMASHITA, K.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; UCHIDA, E.; HARUNA, A. y IGIMI, S.** 2005. Isolation and characterization of staphylococci from external auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates. *Journal of Veterinary Medical Science*. 67: 263-268.

- **ZURICH, L.** 2001. Antimicrobianos de uso en equinos bases farmacológicas. *Monografías de Medicina Veterinaria*. Universidad de Chile. Vol 21 (2).