



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



**DETECCIÓN DE TRES GENES DE RESISTENCIA A
ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *Staphylococcus*
COAGULASA POSITIVAS AISLADAS DESDE GATOS**

NICOLÁS ELÍAS GALARCE GÁLVEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA
MARÍA ANTONIETA JARA OSORIO

FINANCIAMIENTO
Proyecto FIV N° 12101401.9102.008
UNIVERSIDAD DE CHILE

SANTIAGO - CHILE
2011

I. ÍNDICE DE CONTENIDOS

I	ÍNDICE DE CONTENIDOS	1
II	ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS	3
III	RESUMEN	4
IV	SUMMARY	5
1	INTRODUCCIÓN	6
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1	Género <i>Staphylococcus</i>	7
2.2	Antimicrobianos	12
a)	Tetraciclinas	12
b)	Betalactámicos	14
2.3	Resistencia a Antimicrobianos	16
a)	Resistencia a Tetraciclinas	21
b)	Resistencia a Betalactámicos	24
b.1)	Resistencia a meticilina no mediada por el gen <i>mecA</i>	26
b.2)	Aparición y evolución de <i>S. aureus</i> resistente a meticilina	27
2.4	Reacción en Cadena de la Polimerasa	28
2.5	Secuenciación	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo General	32
3.2	Objetivos Específicos	32
4	MATERIALES Y MÉTODOS	33
4.1	Muestras	33
4.2	Detección parcial de tres genes de resistencia a antimicrobianos en cepas de <i>Staphylococcus coagulasa</i> positiva mediante PCR	34
a)	Obtención de ADN bacteriano	34
b)	Mezcla de la reacción de PCR	34
c)	Amplificación del ADN	34
d)	Visualización de productos del PCR	35
e)	Medidas de bioseguridad	35
4.3	Determinación del porcentaje de identidad nucleotídica respecto del GenBank®	35
a)	Secuenciación	35
b)	Análisis	36

5	RESULTADOS	37
5.1	Detección del gen <i>mecA</i> en cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivas aisladas desde gatos	37
5.2	Detección del gen <i>tet(M)</i> en cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivas aisladas desde gatos	38
5.2.a	Secuenciación de los amplificadores del gen <i>tet(M)</i> detectado en cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivas aisladas desde gatos.	39
5.3	Detección del gen <i>tet(O)</i> en cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivas aisladas desde gatos	40
6	DISCUSIÓN	41
7	CONCLUSIONES	46
8	ANEXOS	47
9	BIBLIOGRAFÍA	54

II. ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

CUADROS		Pág.
1	Mecanismos de resistencia caracterizados para los genes <i>tet</i> y <i>otr</i> .	24
2	Muestras de SCP aisladas desde gatos sin dermatopatías	33
3	Muestras de SCP aisladas desde gatos con dermatopatías	33
4	Protocolo de PCR para genes de resistencia antimicrobiana	34
5	Partidores utilizados en el protocolo de PCR según genes de resistencia antimicrobiana	35
6	Sensibilidad de cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivas aisladas desde gatos sin dermatopatías y positivas al gen <i>mecA</i>	37
7	Sensibilidad de cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivas aisladas desde gatos con dermatopatías y positivas al gen <i>mecA</i>	37
8	Sensibilidad de cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivas aisladas desde gatos sin dermatopatías y positivas al gen <i>tet(M)</i>	38
9	Sensibilidad de cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivas aisladas desde gatos con dermatopatías y positivas al gen <i>tet(M)</i>	39
FIGURAS		
1	Microfotografía electrónica de barrido bacterias del género <i>Staphylococcus</i> (9560X).	7
2	Mecanismos de transferencia horizontal de resistencia a antimicrobianos.	20
3	Esquema de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	29
4	Detección parcial del gen <i>mecA</i> en cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivas aisladas desde gatos.	38
5	Detección parcial del gen <i>tet(M)</i> en cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivas aisladas desde gatos.	39
6	Detección parcial del gen <i>tet(O)</i> en cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivas aisladas desde gatos.	40

III. RESUMEN

En la sociedad moderna, la tenencia de animales de compañía constituye una práctica cada vez más frecuente, extendiéndose a nivel mundial y a través de todas las clases socioeconómicas. Así, dentro de muchas otras áreas, la participación del médico veterinario ha aumentado en el ámbito clínico de mascotas, logrando grandes avances en técnicas diagnósticas, quirúrgicas y terapéuticas.

Al igual que los humanos, las mascotas pueden sufrir diversas enfermedades, pudiendo tener algunas un componente infeccioso. Frente a las infecciosas de origen bacteriano, la principal herramienta con que cuentan los profesionales, son los antimicrobianos.

Desde su descubrimiento, los antimicrobianos han constituido la primera línea de acción frente a enfermedades bacterianas, ayudando a disminuir su impacto -tanto en las personas como en distintas poblaciones animales- encontrándose disponible una variada gama de sustancias, con diferentes mecanismos de acción e indicaciones terapéuticas. Sin embargo, desde hace ya varios años se ha observado la presencia y aumento de la resistencia bacteriana a diversos antimicrobianos, constituyendo un tema de gran preocupación mundial tanto en medicina humana como veterinaria.

Entre los antimicrobianos que han visto reducida su efectividad debido a la resistencia bacteriana se encuentran los betalactámicos, como meticilina y oxacilina, y las tetraciclinas, como doxiciclina y oxitetraciclina.

El objetivo de este trabajo fue la detección, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), del gen *mecA* involucrado en la resistencia a meticilina y de los genes *tet(M)* y *tet(O)*, involucrados en la resistencia a tetraciclinas mediante la generación de proteínas de protección ribosomal, en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas aisladas desde gatos.

La aplicación de esta técnica de biología molecular permitió detectar dos de los tres genes mencionados, en cepas caracterizadas como sensibles, resistentes o de sensibilidad intermedia de acuerdo a antibiogramas por difusión en agar.

Los resultados de este trabajo señalan que la detección de genes de resistencia a antimicrobianos complementaría la técnica del antibiograma de la Microbiología clásica en el estudio de la resistencia bacteriana.

Finalmente, la secuenciación y posterior determinación del porcentaje de identidad nucleotídica respecto del GenBank® de uno de los genes detectados otorgó al laboratorio de Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, un control positivo para continuar con los estudios moleculares de resistencia bacteriana.

IV. SUMMARY

In modern society pet ownership is an increasingly common practice, spreading worldwide and in all socioeconomic classes. Like humans, pets can suffer endless variety of diseases, which may or may not have an infectious component. Facing those of infectious origin, specifically bacterial, the practitioner has a wide range of tools which use, especially antibiotics.

Since their discovery, antimicrobials have been the first line of action against bacterial diseases by helping reducing their impact, both people and animals in different populations, being available a wide range of drugs with different mechanisms of action and therapeutic indications. However, since several years the presence and increased frequency of bacterial resistance to a variety of antimicrobials has been observed, becoming a subject of great global concern, to both human and veterinary medicine.

Among the antimicrobial agents that have seen their effectiveness diminished due to bacterial resistance are beta-lactams, such as methicillin and oxacillin, and tetracyclines, such as doxycycline and oxytetracycline.

The aim of this study was the detection by Polymerase Chain Reaction (PCR) of the *mecA* gene, involved in resistance to beta-lactams, and the *tet(M)* and *tet(O)* genes, involved in the resistance to tetracyclines by generating ribosomal protection proteins, in coagulase positive *Staphylococcus* strains isolated from cats.

The application of this molecular biology technique allowed the detection of two of the three target genes in strains characterized as sensitive, resistant or intermediate sensitivity by agar diffusion antibiogram.

The results of this study indicate that the detection of antimicrobial resistance genes would complement the antibiogram classical microbiology technique in the study of bacterial resistance.

Finally, the sequencing of two of the identified genes gave to the Microbiology Laboratory, Department of Animal Preventive Medicine, School of Veterinary and Animal Sciences, University of Chile, a positive control for further molecular studies of antimicrobial bacterial resistance.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente a nivel mundial existen numerosos estudios en medicina humana que dan cuenta de la preocupación existente respecto de las altas tasas de resistencia exhibida por numerosas cepas bacterianas, provocando que un número considerable de patologías sean cada vez más difíciles de solucionar.

Esta misma situación ha sido observada en medicina veterinaria, pues 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 ha aumentado siendo uno de los motivos de consulta más frecuente las enfermedades dermatológicas, como: pioderma, foliculitis y otitis externa. El género bacteriano más frecuentemente asociado a este tipo de patologías es *Staphylococcus*, dentro del cual se destaca *S. intermedius*, especie que forma parte de la microflora normal de piel y superficies mucosas, que en determinadas ocasiones se comporta como agente etiológico de las patologías mencionadas.

En su mayoría, los tratamientos antimicrobianos destinados a tratar estos cuadros infecciosos son empíricos y prolongados. Así, en muchas ocasiones, al no escogerse el antimicrobiano y/o dosis adecuada o por incorrecta administración por parte de los propietarios, la terapia no resulta efectiva, provocando –además– resistencia de la bacteria a los fármacos por presión selectiva.

Actualmente, la tenencia de mascotas en la sociedad y el aumento de consultas al médico veterinario por dermatopatías de origen bacteriano, especialmente debidas a *S.intermedius*, es una realidad. Así, resultó interesante que considerando el aumento de resistencia antimicrobiana a nivel nacional y mundial, junto al potencial riesgo de transmisión de bacterias y genes de resistencia en los humanos en contacto con estos animales (y viceversa) en este estudio se haya contemplado detectar la presencia de 3 genes en bacterias que se presentan como habitantes normales del gato, una de las mascotas más frecuentes de encontrar en los hogares, para contribuir al conocimiento nacional sobre resistencia a antimicrobianos y así orientar para paliar este grave problema.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Género *Staphylococcus*

Los estudios de taxonomía molecular actuales permiten clasificar al género *Staphylococcus* en la familia *Staphylococcaceae*, incluido tradicionalmente en la familia *Micrococcaceae* (Ludwig *et al.*, 2009). Las características mínimas para asignar a un microorganismo en este género bacteriano, consideran criterios genotípicos y fenotípicos describiéndose más de 50 especies y subespecies, aceptándose nuevos taxones y nombres (Freney *et al.*, 1999).

Los miembros de este género son bacterias Gram positivas esféricas de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, que se organizan de diversas maneras formando agregados similares a racimos (Figura 1). En exudados forman racimos, pares, o cortas cadenas. No poseen flagelos ni forman esporas, y la encapsulación es variable (Biberstein y Hirsh, 1999).

La ultraestructura y composición química de la pared celular de los *Staphylococcus* es la típica de las bacterias Gram positivas (Beveridge, 2000), compuesta de peptidoglicanos, ácido teicoico y proteínas (Schleifer *et al.*, 1976). Todas las especies de *Staphylococcus* producen catalasa, excepto *Staphylococcus aureus* subespecie *anaerobicus* y *S. sacharolyticus*, que son estrictamente anaeróbicos.

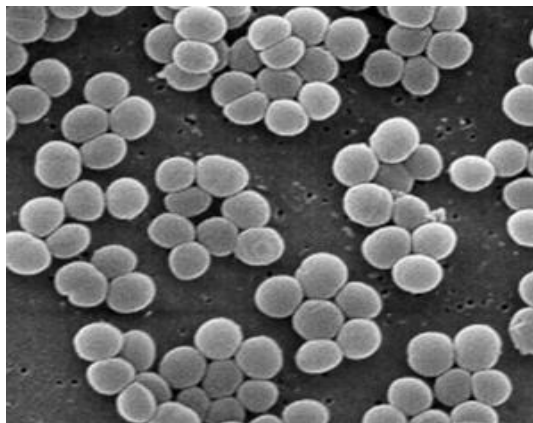


Figura 1: Microfotografía electrónica de barrido bacterias del género *Staphylococcus* (9560X).

En el hombre, los estafilococos son la causa más común de infecciones bacterianas, correspondiendo a *S.aureus* la especie patógena más importante. En medicina veterinaria, se mencionan tres especies de *Staphylococcus* como las de mayor importancia patógena: *S.aureus*, *S. hyicus* y *S. intermedius* (Devriese, 1990). Sin embargo, recientemente, la especie *S. intermedius* ha sido reclasificada por lo que todas las cepas caninas y algunas equinas previamente

clasificadas como *S. intermedius* son ahora consideradas como *S. pseudointermedius* (Devriese *et al.*, 2005; Bannoehr *et al.*, 2007). Otras cepas clasificadas previamente como *S. intermedius* pertenecen a la nueva especie *S. delphini*. Actualmente se considera que las cepas de *S. intermedius* habitan sólo en palomas salvajes (Sasaki *et al.*, 2007). Las pruebas fenotípicas ayudan muy poco en la diferenciación de *S. intermedius*, *S. pseudointermedius* y *S. delphini* (Sasaki *et al.*, 2007), por lo que los aislados pertenecientes a *S. intermedius* son ahora denominados como cepas pertenecientes al “grupo de *S. intermedius*” o SIG (Takahashi *et al.*, 1999).

En base a la producción de la enzima coagulasa, el género *Staphylococcus* fue originalmente dividido en estafilococos coagulasa positivos y en estafilococos coagulasa negativos. *S. aureus* y SIG son coagulasa positivos, mientras que la producción de coagulasa en *S. hyicus* es variable, siendo mayoritariamente negativa o positiva débil (Kloos y Schleifer, 1986). Otras dos especies de *Staphylococcus* tienen la capacidad de producir coagulasa: *Staphylococcus lutrae*, aislada desde nutrias (Foster *et al.*, 1997) y *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, aislada desde otitis externa en perros (Igimi *et al.*, 1990). Todas estas especies, excepto *S. aureus*, pertenecen al grupo filogenéticamente cercano de las especies *S. intermedius* – *S. hyicus*.

Las bacterias del género *Staphylococcus* son microorganismos constituyentes de la microflora normal de las mucosas y piel de humanos y animales. Sin embargo, algunas especies son patógenos oportunistas que pueden causar serias enfermedades cutáneas en tejidos o cavidades (Scott *et al.*, 2001). La transmisión de estas bacterias puede ser por contacto directo de piel con piel, por aerosoles de estornudos y tos, y también a través de la saliva (Malik *et al.*, 2007).

En humanos, *S. aureus*, es un patógeno oportunista, pudiendo causar infecciones cutáneas, así como también enterotoxemias e infecciones septicémicas, y es la causa más importante de síndrome de shock tóxico. Las infecciones por *S. aureus* pueden ser adquiridas en la comunidad, o bien, en los recintos hospitalarios constituyendo una importante fuente de infecciones nosocomiales (Hermans *et al.*, 2010).

Las cepas de *S. aureus* aisladas de animales son importantes patógenos en medicina veterinaria, causando enfermedades en diversas especies (Devriese, 1990), siendo *S. pseudointermedius* el *Staphylococcus* coagulasa positivo predominante en infecciones cutáneas en perros (Bannoehr *et al.*, 2007).

Estudios epidemiológicos han demostrado diferentes fuentes y sitios anatómicos de ubicación de estas bacterias de acuerdo a la especie animal. Los estafilococos están íntimamente relacionados con los animales y no pueden ser considerados bacterias ambientales (Hermans *et al.*, 2010).

La mayoría de los estudios a nivel de infraespecies, se han realizado con cepas de *S. aureus*. La fagotipificación ha sido extraordinariamente útil en caracterizaciones epidemiológicas de cepas humanas, suplementado con métodos moleculares. La fagotipificación ha sido utilizada en cepas animales de *S. aureus* y con otras especies estafilocócicas, pero los métodos son complicados y las fuentes de fagos son difíciles de estandarizar. Por lo tanto, los métodos moleculares son probablemente los más indicados para las cepas veterinarias. Hasta el momento, la electroforesis en gel de campo pulsado se mantiene como el procedimiento estándar de estos métodos moleculares (Hermans *et al.*, 2010).

Otras especies, principalmente las coagulasa negativas, por mucho tiempo han sido consideradas como no patógenas, pero en los últimos años se ha demostrado su importante rol como patógenos con creciente incidencia en infecciones humanas (Huebner y Goldmann, 1999). Se encuentran distribuidas en la superficie corporal de humanos y animales, constituyendo el mayor componente de la flora normal de piel y mucosas. Sus factores de virulencia no están tan claramente establecidos como en *S. aureus*. La especie más común descrita en humanos es *S. epidermidis* (Frebourg *et al.*, 2000).

En medicina veterinaria, estas especies han sido principalmente estudiadas en relación a la mastitis bovina. Dentro de este grupo de *Staphylococcus* se mencionan a *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S.*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. sciuri*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. caprae*, entre otros (Hermans *et al.*, 2010).

Los perros y los gatos pueden portar de manera comensal *S. pseudointermedius* (Bannoehr *et al.*, 2007) en su nariz, en orofaringe y en la zona anal (Harvey y Noble, 1998), también en labios, conjuntiva ocular, pabellón auricular, vagina y prepucio (Lilenbaum *et al.*, 1998). Las mismas cepas pueden ser encontradas en la nariz de sus dueños (Harvey *et al.*, 1994). Otros *Staphylococcus* coagulasa positivos como *S. hyicus* y varios coagulasa negativos como *S. felis* han sido aislados de piel y mucosas de gatos sanos (Baptiste *et al.*, 2005).

Se han descrito distintos factores de virulencia de importancia en las infecciones estafilocócicas. La mayoría de ellos, como la enterotoxina y la toxina del Síndrome de Shock Tóxico, han sido estudiadas en *S. aureus*, pero también han sido encontrados en otras especies del género. Estos factores de virulencia pueden ser divididos en componentes asociados a componentes celulares, exoenzimas y exotoxinas (Hermans *et al.*, 2010).

En respuesta a cambios medioambientales *S. aureus*, puede expresar determinados genes para aumentar sus oportunidades de sobrevivencia; de esta manera la regulación de la producción de factores de virulencia en respuesta a densidad celular, disponibilidad energética y señales

ambientales es lograda mediante un complejo sistema de regulación. Así, el más importante y estudiado sistema de dos componentes (o receptor de señales) es codificado por el gen accesorio regulador (*agr*). Este último juega también un rol en “quorum sensing” (habilidad de la bacteria de comunicarse con otras mediante señales moleculares difusibles y de regular sus genes de acuerdo con la densidad de la población celular) (Hermans *et al.*, 2010).

Dentro de estos factores se encuentran:

- Asociados a componentes celulares:
Proteína A, polisacárido capsular, peptidoglicano, ácido lipoteicoico y adhesinas.

- Exotoxinas:
Enterotoxinas, toxina del Síndrome de Shock Tóxico (SST), toxinas epidermolíticas, hemolisinas ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) y leucocidina

- Exoenzimas:
 - Coagulasa: proteína extracelular que se une a la protrombina en el hospedero, formando un complejo llamado estafilotrombina. La actividad proteasa es activada en el complejo, llevando a la transformación del fibrinógeno en fibrina. Probablemente, la bacteria se protege de la fagocitosis y otras defensas inmunes causando coagulación localizada (Projan y Novick, 1997).
 - Lipasa
 - Hialuronidatoasa e hialuronidasa
 - Proteasas

En *S. aureus*, la expresión de proteínas extracelulares y proteínas de la pared celular necesarias para la colonización y fases de invasión en la infección, son regulados a través de varios *loci* reguladores. Estos *loci* modulan de una manera compleja y eficiente la respuesta altamente coordinada de las bacterias a los cambios ambientales durante el proceso infeccioso. Este programa regulatorio está presumiblemente ajustado a sitios particulares en el organismo hospedero (Novick, 2003).

S. pseudointermedius tiene la capacidad de producir varios factores de virulencia, incluidos algunos funcionalmente similares a los de *S. aureus*. Por ejemplo, *S. pseudointermedius* produce enzimas como coagulasa, proteasas y termonucleasa, y toxinas como hemolisinas, toxinas exfoliativas y enterotoxinas. *S. pseudointermedius* también tiene la capacidad de unirse al fibrinógeno, fibronectina y citoqueratina, indicando la presencia de adhesinas de superficie. Junto a esto, una proteína que une inmunoglobulinas similar a la proteína A de *S. aureus* ha sido

secuenciada y parcialmente caracterizada (Moodley *et al.*, 2009). También ha demostrado la formación de biofilms, al igual que otras especies estafilocócicas patógenas, como *S. aureus* y *S. epidermidis* (Fitzgerald *et al.*, 2009). *S. pseudointermedius* causa hemólisis en eritrocitos de conejo y hemólisis caliente-fría en sangre de oveja, indicando la producción de toxinas con actividad similar a las toxinas α y β de *S. aureus*. Al igual que *S. aureus*, *S. pseudointermedius* produce una leucotoxina bicompuesta que posee actividad leucotóxica en células polimorfonucleares.

S. pseudointermedius debería ser considerado la causa del pioderma en perros (Bannoehr *et al.*, 2007). La exposición de proteínas de la matriz extracelular debido a condiciones subyacentes favorece la colonización y adhesión de ciertas cepas de *Staphylococcus*, capaces de adherirse específicamente a proteínas individuales de la matriz (Cree y Noble, 1995). La frecuente producción de toxinas leucocíticas y enterotoxina estafilocócica canina por cepas aisladas desde lesiones cutáneas, sugiere que estas toxinas son importantes para la sobrevivencia de estas bacterias y su patogénesis. Generalmente, los estudios de las características de las cepas aisladas desde lesiones y sitios portadores fallan en demostrar consistentemente diferencias entre cepas de estos dos orígenes. Probablemente, factores desconocidos del hospedero son decisivos en la patogénesis de varias enfermedades estafilocócicas en perros. La mayoría de las cepas de *S. pseudointermedius* están asociadas a estas condiciones (Hermans *et al.*, 2010).

Otras especies, incluyendo las cepas altamente virulentas de *S. aureus*, usualmente sólo colonizan en forma transiente dichas lesiones. *S. pseudointermedius* raramente causa enfermedades sistémicas en perros u otros animales. El pioderma frecuentemente es una condición que comienza con erupciones papulares que progresan a pústulas y pequeños abscesos intraepidermales. Las pápulas se mantienen como pequeñas y rojizas lesiones en el caso de las foliculitis bacterianas. En otros casos, se pueden desarrollar furúnculos. Estas lesiones cutáneas profundas comienzan como foliculitis. Cuando las lesiones se rompen, se hacen evidentes tractos fistulosos con formación de pus. En perros, el desarrollo de problemas dermatológicos asociados con *S. pseudointermedius* está relacionado con causas anatómicas, como pliegues de piel, predisposiciones físicas y presentaciones clínicas. Predisposición o defectos inmunológicos son probablemente importantes, pero las condiciones subyacentes siguen siendo desconocidas (Hermans *et al.*, 2010).

Por otro lado, se ha evidenciado el estado de portador nasal de *S. aureus* en gatos sanos (Abraham *et al.*, 2007) y en lesiones en piel (Lilenbaum *et al.*, 1998). Los estafilococos generalmente no son causantes de patologías específicas en piel en gatos. A pesar de esto, se ha descrito su participación como agente contaminante y perpetuante de las dermatitis superficiales,

foliculitis bacteriana y pioderma superficial, siendo posible encontrarlo también como agente causal de las patologías mencionadas (Malik *et al.*, 2007).

En alguna etapa de su vida, perros y gatos pueden sufrir enfermedades cutáneas e infecciones por bacterias de este género, las que son tratadas con antimicrobianos, pudiendo así facilitar el desarrollo de resistencia bacteriana. Los estudios de sensibilidad antimicrobiana en pequeños animales, han revelado que cepas bacterianas de este género aisladas desde gatos y perros, exhiben patrones de resistencia similares a los descritos en bacterias aisladas desde humanos y que su desarrollo está influido por la alta frecuencia de uso de algunos antimicrobianos (Malik *et al.*, 2007).

En medicina veterinaria, el uso de cultivos y antibiogramas no es considerada una práctica habitual cuando se sospecha que el pioderma u otitis externa tienen como posible agente al género *Staphylococcus*, utilizándose drogas antimicrobianas de efectividad conocida, siendo sólo los casos refractarios a la terapia empírica sometidos a estudios de sensibilidad (Morris *et al.*, 2006). Así, dentro de la amplia gama de sustancias utilizadas en la terapia de las dermatopatías causadas por *Staphylococcus* se encuentran penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas potenciadas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Watson y Rosin, 2000).

2.2 Antimicrobianos

a) Tetraciclinas:

Las tetraciclinas -familia de antibióticos descubierta en 1948- inhiben en forma reversible la síntesis proteica, impidiendo la unión del aminoacil-ARNt al sitio A del ribosoma bacteriano. Son agentes de amplio espectro, exhibiendo actividad contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, clamidias, micoplasmas, rickettsias y algunos protozoos. Sus propiedades antimicrobianas favorables y la ausencia de efectos adversos importantes han llevado a su uso extensivo tanto en animales como en humanos (Chopra y Roberts, 2001).

La clortetraciclina y la oxitetraciclina fueron las primeras drogas del grupo en ser descritas, siendo ambas productos de *Streptomyces aureofaciens* y *S. rimosus*, respectivamente. Tiempo después otras tetraciclinas fueron descritas: moléculas naturales como tetraciclina, semisintéticas como metaciclina, doxiciclina y minociclina, y las más recientemente descritas glicilciclinas (Anexo 1). Todas estas moléculas mencionadas se consideran como la primera clase de tetraciclinas o también denominadas “tetraciclinas típicas”, que exhiben actividad bacteriostática al interactuar con el ribosoma bacteriano y bloquear su síntesis proteica. Las moléculas de tetraciclinas comprenden

un núcleo lineal tetracíclico fusionado, al cual se le agregan una amplia variedad de grupos funcionales. Es este núcleo el que le otorga la capacidad bacteriostática a esta familia de antimicrobianos. Las tetraciclinas son fuertes agentes quelantes, y tanto sus propiedades farmacocinéticas como antimicrobianas están influenciadas por la captación de iones metálicos. (Chopra y Roberts, 2001).

Actualmente, diversos estudios han descrito una amplia resistencia bacteriana a tetraciclinas de primera y segunda generación mediada por bombas de eflujo y protección ribosomal. Debido a esto, durante la década de los noventa se ha llevado a cabo la búsqueda de nuevos análogos que pudiesen poseer actividad contra microorganismos resistentes a miembros más antiguos de la familia. Esta investigación logró la obtención de las glicilglicinas, moléculas que escapan a los mecanismos de resistencia bacterianos (Chopra y Roberts, 2001).

El mecanismo de acción de las tetraciclinas está bien establecido y consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas impidiendo la unión del aminoacil ARNt con el ribosoma bacteriano. Para ésto, las moléculas deben atravesar una o más membranas dependiendo de si el microorganismo susceptible es Gram positivo o Gram negativo: en el caso de las Gram negativas, las tetraciclinas atraviesan la membrana externa mediante las porinas OmpF y OmpC en forma de complejos catión-tetraciclina. Este complejo es atraído por el potencial de Donnan a través de la membrana externa, acumulándose en el espacio periplásmico, donde el complejo ion metálico-tetraciclina probablemente se disocia liberando una molécula de tetraciclina sin carga, molécula débilmente lipofílica capaz de difundir a través de la membrana plasmática hacia el citoplasma. Se asume que el traspaso de la membrana citoplasmática en bacterias Gram positivas ocurre de manera similar mediante esta molécula electroneutra y lipofílica. La captación de tetraciclinas a través de la membrana citoplasmática es energía dependiente y conducida mediante el gradiente de pH de la fuerza protón motriz. Una vez en el citoplasma, es probable que las moléculas de tetraciclina sean queladas debido a que las concentraciones de iones metálicos y pH son mayores que las externas a la célula. El efecto bacteriostático se debe a una única y altamente específica unión en la subunidad ribosomal 30S. La ausencia de una mayor actividad antieucariótica explica las propiedades selectivas de las tetraciclinas. A nivel molecular, ésto se debe a una inhibición relativamente débil de la síntesis proteica mediada por ribosomas 80S y pobre acumulación de estos antimicrobianos en células mamíferas. Sin embargo, las tetraciclinas inhiben la síntesis proteica en las mitocondrias debido la presencia de ribosomas 70S en estos organelos. Ha sido reconocido por algún tiempo que el espectro de actividad de las tetraciclinas incluye varios parásitos protozoarios como *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Leishmania major*, *Trichomonas vaginalis* y *Toxoplasma gondii*. La actividad antiparasitaria está explicada en algunos casos en el hecho de que ciertos organismos, como *P. falciparum*, contienen mitocondrias. No obstante, un número de protozoos sin presencia de mitocondrias se mantienen

sensibles a las tetraciclinas. Hasta la fecha no hay explicación molecular satisfactoria para estos hallazgos (Chopra y Roberts, 2001).

b) Betalactámicos:

Por su parte, los betalactámicos son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana, induciendo su autólisis siendo los antimicrobianos más prescritos en la práctica clínica. Este grupo de antimicrobianos, incluye a penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenemes e inhibidores de betalactamasas (Anexo 2). Las penicilinas son un grupo de antibióticos definido químicamente por la presencia de un anillo betalactámico y un anillo tiazolidínico, además de una cadena lateral, que varía de unas penicilinas a otras en la posición 6 del anillo betalactámico y que es la que define sus propiedades (Marín y Gudiol, 2003).

Las cefalosporinas son fármacos estructuralmente similares a las penicilinas, cuya estructura básica está constituida por el núcleo cefem, que consiste en la fusión de un anillo dihidrothiacínico (en lugar del anillo tiazolidínico característico de las penicilinas) y un anillo betalactámico. La introducción de cambios en las cadenas laterales origina las diversas variedades de cefalosporinas (Marín y Gudiol, 2003).

Actualmente, se utilizan inhibidores de las betalactamasas de estructura química betalactámica como el ácido clavulánico, que mediante modificaciones en su estructura posee una mayor reactividad y una mayor afinidad por las betalactamasas. Los betalactámicos son antimicrobianos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática alcanzada, siempre que ésta exceda la concentración mínima inhibitoria (CIM) del agente causal. La actividad bactericida y probablemente la eficacia clínica se relaciona mejor con el tiempo durante el cual dicha concentración excede la CIM.

Los antimicrobianos betalactámicos son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana. La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglicano. En las bacterias Gram positivas, la pared celular es gruesa y su componente principal es este aminoazúcar. Las bacterias Gram negativas tienen una pared más fina y compleja que consta de una membrana externa formada por lípidos y proteínas y de una delgada capa interna de peptidoglicano. Las bacterias ácido-alcohol resistentes tienen una pared similar a la de los microorganismos Gram positivos, pero con una capa de peptidoglicano fina y, por fuera, una capa muy rica en lípidos (Marín y Gudiol, 2003).

El peptidoglicano está constituido por largas cadenas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetil murámico y N-acetil glicosamínico. El ácido murámico fija cadenas

de tetrapéptidos que se unen entre sí para formar una malla, directamente como en los Gram negativos o mediante un pentapéptido de glicina en las bacterias Gram positivas. Los betalactámicos inhiben precisamente esta unión (transpeptidación), última etapa en la síntesis de pared celular. De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular. Para que actúen los betalactámicos es necesario que la bacteria se encuentre en fase de multiplicación, ya que ahí es cuando se sintetiza la pared celular (Marín y Gudiol, 2003).

Los componentes del peptidoglicano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplasmática. A este nivel existen unas proteínas con actividad enzimática de transpeptidasas y carboxipeptidasas, encargadas de formar los tetrapéptidos unidos. Estas enzimas fijan a las penicilinas y otros betalactámicos, por lo que también se denominan Proteínas Fijadoras de Penicilinas (PBP), cuya función es alargar, dar forma y dividir a la bacteria. Los anillos de los betalactámicos poseen una estructura similar a los dos últimos aminoácidos del pentapéptido (D-alanina D-alanina) y eso permite una unión covalente en el lugar activo de la transpeptidasa. También pueden inhibir a las carboxipeptidasas y algunas endopeptidasas (Marín y Gudiol, 2003).

Los betalactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano. La lisis se produce con concentraciones que superan entre cuatro y diez veces la CIM de un determinado microorganismo. Las bacterias que carecen de autolisina son inhibidas, pero no destruidas por lo que se dice son tolerantes. Se define el fenómeno de tolerancia como la necesidad de una concentración al menos 32 veces mayor a la CIM para que un antimicrobiano destruya una cepa bacteriana (Marín y Gudiol, 2003).

El espectro de los betalactámicos incluye bacterias Gram positivas, Gram negativas y espiroquetas. No son efectivos contra *Mycoplasma*, porque carecen de pared celular, ni contra bacterias intracelulares como *Chlamydia* y *Rickettsia*. La resistencia natural de *Mycobacterium* spp. se debe a la producción de betalactamasas probablemente unido a la lenta penetración por las características de la pared. La acción de la penicilina G abarca cocos Gram positivos y Gram negativos, bacilos Gram positivos tanto facultativos como anaerobios, así como espiroquetas y algunos bacilos Gram negativos anaerobios. La producción de derivados semisintéticos permitió disponer de preparados activos por vía oral, con mayor resistencia a las betalactamasas y mayor capacidad de penetración en bacterias Gram negativas, como las aminopenicilinas, las penicilinas antiestafilocócicas y las penicilinas anti-*Pseudomonas* (Marín y Gudiol, 2003).

Los inhibidores de las betalactamasas son moléculas con una elevada afinidad frente a las betalactamasas (mayor que la de los antimicrobianos a los que se asocian) a las que se unen irreversiblemente protegiendo de su acción a los betalactámicos. Todos poseen una baja actividad

antibacteriana, con la excepción del sulbactam frente a *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores. Su aporte fundamental es que restauran al betalactámico con el que se asocian, su actividad inicial sobre organismos que se han hecho resistentes por producción de betalactamasas (*S.aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides* spp.) y amplían el espectro a bacterias que no eran sensibles intrínsecamente por producción natural de enzimas (*Klebsiella pneumoniae*) (Marín y Gudiol, 2003).

Dentro del grupo de las penicilinas se encuentra la meticilina, un betalactámico semisintético sintetizado por primera vez en 1959 que tiene la propiedad de evadir la acción de betalactamasas. Con su síntesis se logró obtener un grupo de drogas que se convirtieron en el agente de elección para el tratamiento de infecciones por bacterias productoras de betalactamasas. La meticilina (o dimetoxibenzil penicilina) presenta, sin embargo, el inconveniente de que es inestable a pH gástrico y requiere administración parenteral, por lo que posteriormente se fueron sintetizando nuevos compuestos ácido-estables como la oxacilina, cloxacilina y flucloxacilina (Borraz, 2006). Desde entonces, la meticilina y otras penicilinas semisintéticas como oxacilina han sido los antimicrobianos de elección en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* y otros miembros del género *Staphylococcus* (Echeverría e Iglesias, 2003).

2.3 Resistencia a Antimicrobianos:

Desde hace varios años se ha observado resistencia bacteriana a los antimicrobianos, teniendo como consecuencia fracasos terapéuticos y perpetuación del estado de enfermo en los pacientes. La resistencia bacteriana constituye actualmente un tema de gran preocupación mundial en medicina humana y veterinaria.

Actualmente, una bacteria se considera resistente cuando las concentraciones de un antimicrobiano necesarias para inhibir su crecimiento *in vitro*, son mayores que las concentraciones alcanzadas en suero o en tejidos, medidos por la concentración mínima inhibitoria (Sussmann *et al.*, 2004). Esta definición claramente señala que la resistencia a antimicrobianos no es solamente un problema microbiológico, sino que también incluye aspectos farmacológicos, farmacocinéticos y clínicos (Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001).

La resistencia a antimicrobianos es un fenómeno biológico, pero se transforma en un problema significativo de salud pública cuando se amplifica muchas veces debido al mal uso y abuso de las drogas antimicrobianas. La resistencia es la principal evidencia de falla en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Esto sugiere que se ha manejado mal el arsenal de drogas, por la sobreutilización en países desarrollados y, paradójicamente, por mala utilización y subutilización en

países en desarrollo. En todos los casos, el uso de poderosos antimicrobianos ahora resultará en la menor efectividad de las drogas en el futuro (Organización Mundial de la Salud, 2000).

Si bien muchas investigaciones están actualmente en marcha, no hay garantía de que llevarán a la obtención de nuevas drogas o vacunas en el futuro cercano. Desde 1970 no se han desarrollado nuevas clases de antimicrobianos para combatir las enfermedades infecciosas. En promedio, la investigación y desarrollo de drogas contra infecciones lleva de diez a veinte años y en la actualidad, no hay nuevas drogas o vacunas listas para emerger desde las investigaciones y líneas de producción. Un pequeño porcentaje de la investigación en salud global y desarrollo de estos hallazgos es actualmente dedicado a encontrar nuevas drogas o vacunas para detener las principales enfermedades infecciosas: el SIDA, las infecciones respiratorias agudas, enfermedades diarreicas, malaria y tuberculosis (Organización Mundial de la Salud, 2000).

Desde el primer caso de *Staphylococcus* resistente a antimicrobianos, el problema de la resistencia a antimicrobianos se ha transformado en un serio problema de salud pública, con implicancias económicas, sociales y políticas, que involucra a todos los ámbitos y cruza todos los límites ambientales y étnicos. Por ejemplo, la tuberculosis multirresistente ya no está confinada a un solo país o a aquellos coinfectados con VIH, sino que ha aparecido en lugares tan diversos como Europa del Este, África y Asia entre trabajadores de salud y en la población general, o el caso del *Pneumococcus* resistente a penicilina, que también está expandiéndose rápidamente, mientras que la malaria resistente está en aumento, invalidando y matando a millones de niños y adultos cada año (Organización Mundial de la Salud, 2000).

En el mundo industrializado, casi el 60% de las infecciones adquiridas en hospitales (nosocomiales) son causadas por microorganismos resistentes a antimicrobianos. Estas infecciones (encontrando dentro de las más recientes a *Enterococcus* resistente a vancomicina y *S. aureus* resistente a meticilina), ya no están confinados a pabellones, sino que se han distribuido en la población general (Organización Mundial de la Salud, 2000).

Aunque la mayoría de las drogas sigue siendo activa, la sombra de la resistencia nos hace pensar que muchas de ellas no lo serán por mucho tiempo. En el caso de la tuberculosis, la emergencia de bacterias multirresistentes ha hecho que la medicación que una vez costó US\$20 ahora deba ser reemplazada con drogas mil veces más costosas. Entre los microorganismos resistentes que proliferan en todo el mundo, los que poseen mayor potencial de destruir y amenazar las intervenciones médicas son aquellos capaces de producir “súper infecciones” adquiridas en el hospital. Sólo en los Estados Unidos, cerca de 14.000 personas son infectadas y mueren cada año producto de microorganismos resistentes a antimicrobianos adquiridos en recintos hospitalarios. *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* están dentro de las bacterias que

manifiestan altos niveles de resistencia, más notablemente en países desarrollados. En algunos hospitales, particularmente en Estados Unidos, la mayoría de las infecciones estafilocócicas y por enterococos son cada vez más intratables. Hasta el momento, la única droga disponible para tratar las infecciones por *S. aureus* resistentes a meticilina (SAMR) es la vancomicina, lo que está peligrando por la emergencia del *S. aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina. Este patógeno emergente ya está mostrando niveles de resistencia que, mientras sigue manejable, lo catapultarán a las grandes ligas de la resistencia antimicrobiana (Organización Mundial de la Salud, 2000).

Otra fuente de resistencia muy importante reside en la alimentación. Desde el descubrimiento de la capacidad de los antimicrobianos como promotores del crecimiento y de combatir enfermedades, los productores agrícolas, pecuarios y acuícolas han usado estas sustancias en sus sistemas productivos. Actualmente, sólo la mitad de todos los antimicrobianos producidos son destinados al consumo humano. El otro 50% es utilizado en la clínica veterinaria, como promotores del crecimiento en ganado y para eliminar de los cultivos, organismos destructivos. Esta dosificación continua y a veces de bajo nivel utilizada para el crecimiento y profilaxis, resulta inevitablemente en el desarrollo de resistencia en bacterias del ganado o cercanas, y también aumenta el temor de nuevas cepas resistentes que se traspasen entre especies. *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina es un ejemplo particularmente ominoso de una bacteria resistente que apareció en animales y se traspasó a la población humana (Organización Mundial de la Salud, 2000). En relación a este tema, en Europa se han hecho esfuerzos para reducir la aparición y propagación de las bacterias resistentes como el Informe Swann. En este informe se hizo notar una alta preocupación por el uso de antibióticos como agentes terapéuticos y como promotores de crecimiento, que podrían llevar a un aumento de la resistencia en bacterias de origen humano y animal. De esta forma, se implementaron programas de vigilancia de resistencia bacteriana en aislados humanos y animales; y ya en el año 2006, las sustancias antimicrobianas para propósitos no terapéuticos en la cría de animales fueron retiradas (Butaye *et al.*, 2003; Perreten *et al.*, 2005; Hunter *et al.*, 2010).

En pequeños animales, específicamente en gatos, los primeros estudios se enfocaron en reportar e identificar la susceptibilidad antimicrobiana en estafilococos, con lo que se pudo evidenciar que, a través de los años, los patrones de resistencia a antimicrobianos se han modificado.

En el año 1988, Medleau y Blue encontraron que el 100% de las cepas de *S. aureus* (n=16) presentaban sensibilidad a cloxacilina, cloranfenicol, gentamicina y eritromicina, mientras que un 50% resultó sensible a penicilina G y ampicilina. Años más tarde, Lilenbaum *et al.* (1998)

analizando 148 muestras, encontraron mayores porcentajes de resistencia a gentamicina (5,1%) y a cloxacilina (22,5%). Morris *et al.* (2006) encontraron una diferencia significativa en la resistencia antimicrobiana, en donde todas las cepas de SAMR (n=39) presentaron resistencia a fluoroquinolonas y macrólidos; en cambio las cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina mantuvieron altas frecuencias de susceptibilidad.

La presencia de diferentes especies bacterianas en la flora normal de pequeños animales, determina que perros y gatos sean considerados como reservorios de estas bacterias y de genes de resistencia que tienen importancia clínica en la medicina humana (Guardabassi *et al.*, 2004) Además, varios son los estudios que han demostrado que cada vez son menos las barreras para el paso de genes de resistencia entre diferentes poblaciones bacterianas, incluida la transferencia desde bacterias comensales a patógenas y no patógenas de los animales al hombre y al medio ambiente (Davison *et al.*, 2000).

Actualmente en muchos países existe un mayor número de gatos que de perros (Salem y Rowan, 2003); sin embargo, en Santiago de Chile, Ibarra *et al.* (2003) documentaron la existencia de 1.117.192 perros y 518.613 gatos. Esta creciente tenencia de animales de compañía puede constituir un riesgo para sus propietarios, especialmente si éstos son inmunocomprometidos, debido al hecho de que estas mascotas pueden ser potenciales portadores de bacterias con determinantes genéticos de resistencia. Por esto es de vital importancia conocer la situación local respecto al rol de las mascotas como vectores de estos potenciales riesgos para la salud pública humana y además para la clínica veterinaria.

La resistencia a los antibióticos puede ser clasificada como intrínseca o adquirida. La primera es propia de algunas especies bacterianas resistentes a un antimicrobiano en forma natural, ya sea porque carecen de sitios blancos específicos sobre los que actúa ese fármaco, una baja afinidad a éstos, presencia de mecanismos de eflujo o impermeabilidad celular (Hoffman, 2001; Guardabassi y Courvalin, 2006). La resistencia adquirida puede originarse por cambios puntuales en el material genético (mutaciones) o por adquisición de genes de resistencia mediante tres mecanismos que permiten la transferencia de material genético entre bacterias: transformación, transducción y conjugación, siendo este último el más importante (Hoffman, 2001; Tenover *et al.*, 2006).

En general, se han descrito cuatro mecanismos de resistencia a antimicrobianos, los que se encuentran ampliamente distribuidos en una variedad de géneros bacterianos. Estos mecanismos son: 1) producción de enzimas, como las betalactamasas, que degradan el agente antimicrobiano antes de que pueda realizar su efecto; 2) presencia de bombas de eflujo que expulsan la droga desde la célula antes de que pueda alcanzar su sitio de acción y realizar su

efecto; 3) alteración de un producto metabólico que, por ejemplo, producirá una pared celular alterada que ya no poseerá los sitios de unión para el agente antimicrobiano o 4) barreras al acceso de los agentes antimicrobianos a su sitio diana intracelular mediante supresión de los genes de porinas (Tenover *et al.*, 2006).

Las bacterias también desarrollan resistencia a través de la adquisición de material genético nuevo desde otros microorganismos resistentes, lo que es conocido como “evolución horizontal”, y puede ocurrir entre cepas de la misma especie o entre diferentes especies o géneros bacterianos. Los mecanismos de intercambio genético, como se mencionó anteriormente, incluyen conjugación, traducción y transformación (McManus, 1997) (Figura 2). Para cada uno de estos procesos, los transposones pueden facilitar la transferencia e incorporación de los genes de resistencia adquiridos dentro del genoma del hospedador o dentro de plásmidos. Durante la conjugación, una bacteria transfiere un plásmido que puede contener genes de resistencia a una bacteria adyacente. Durante la traducción, los genes de resistencia son transferidos desde una bacteria a otra mediante bacteriófagos, considerándose actualmente como un evento relativamente raro. Finalmente, la transformación es el proceso mediante el cual una bacteria incorpora fragmentos de ADN de otra bacteria que ha liberado su ADN al medio después de sufrir lisis celular (Tenover *et al.*, 2006).

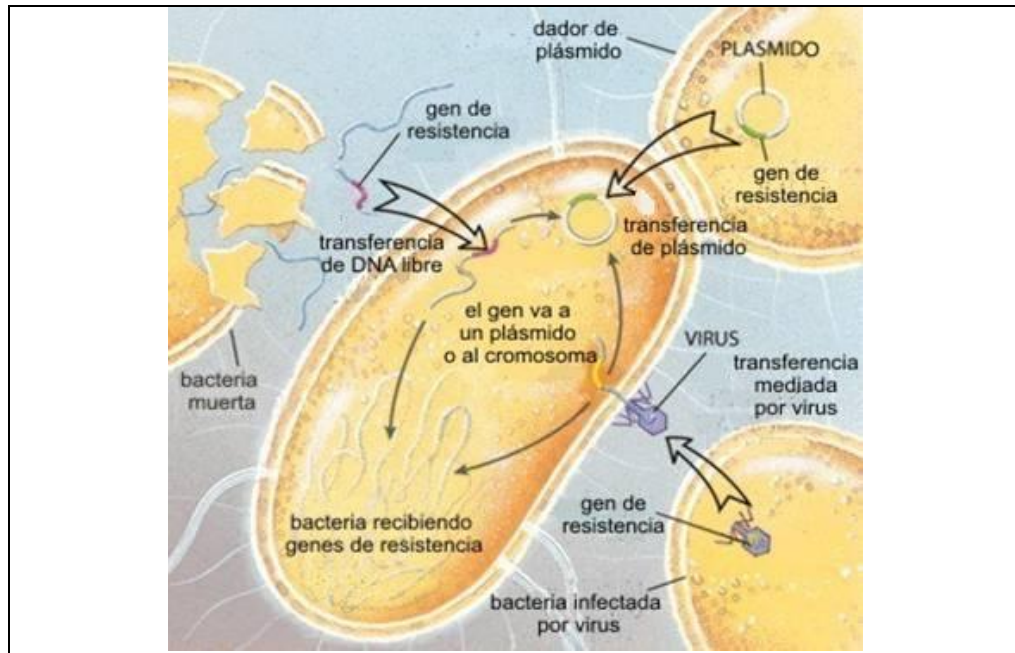


Figura 2: Mecanismos de transferencia horizontal de resistencia a antimicrobianos.

A través de los mecanismos de intercambio genético, muchas bacterias se han vuelto resistentes a múltiples clases de antimicrobianos, y estas bacterias con multirresistencia (definida

como resistencia a tres o más clases de antimicrobianos) se han transformado en una seria preocupación, particularmente en hospitales y otras instituciones de atención de salud donde tienden a aparecer más comúnmente (Tenover *et al.*, 2006).

La mutación y selección, junto con los mecanismos de intercambio genético, permiten a muchas especies bacterianas adaptarse rápidamente a la introducción de agentes antimicrobianos en su medio ambiente. Aunque una única mutación en un gen bacteriano clave puede sólo reducir levemente la susceptibilidad, puede ser suficiente para permitir su sobrevivencia hasta que adquiera mutaciones adicionales o información genética adicional resultando en una resistencia completa al agente antimicrobiano (McManus, 1997). Sin embargo, en raras ocasiones, una única mutación puede ser suficiente para otorgar una resistencia de alto nivel y clínicamente significativa a un organismo (ej.: resistencia de alto nivel a rifampicina en *S. aureus* o resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas en *Campylobacter jejuni*).

a) Resistencia a Tetraciclinas:

Hasta mediados de la década del 50, la mayoría de las bacterias comensales y patógenas eran susceptibles a tetraciclinas, como se demostró en un estudio realizado con 433 enterobacterias recolectadas entre 1917 y 1954, en que sólo el 2% fue resistente a tetraciclinas (Hughes y Datta, 1983).

Estudios de bacterias ambientales también respaldan el hecho de que la emergencia de resistencia es un evento relativamente moderno, posterior a la introducción de estos antimicrobianos en el uso clínico, veterinario y agrícola. De hecho, la resistencia a tetraciclinas ha emergido en muchas bacterias comensales y patógenas debido a la adquisición de genes *tet*. Actualmente se encuentran descritos a lo menos 40 genes *tet* y 3 *otr*. Entre los genes *tet* se encuentran 26 genes codificantes de proteínas de eflujo activo, 11 genes que codifican proteínas de protección ribosomal, tres genes que codifican una enzima de inactivación y un gen con actividad desconocida (Roberts, 2008) (Cuadro 1). Los genes de resistencia a oxitetraciclina fueron identificados por primera vez en especies de *Streptomyces* productores de oxitetraciclina, pero recientemente se han encontrado también en *Mycobacterium* spp. y puede tener una mayor distribución entre bacterias ambientales (Chopra y Roberts, 2001).

Así, se describen cuatro mecanismos de resistencia a tetraciclinas:

1. Proteínas de eflujo activo: corresponden a las proteínas mejor estudiadas de las proteínas Tet. Estas proteínas funcionan como un sistema de contratransporte, donde la proteína capta un protón desde el extracelular mientras evacua un complejo formado por la droga y un catión, utilizando como fuente de energía la fuerza protón motriz entregada por la gradiente electroquímica a través de la membrana citoplasmática (Roberts, 2008). El eflujo de droga

reduce la concentración intracelular de éstas, protegiendo así a los ribosomas del citoplasma. Los genes de eflujo se encuentran tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. Las proteínas de eflujo de tetraciclina tienen similitud aminoacídica y de estructura proteica con otras proteínas de eflujo involucradas en multirresistencia, resistencia a amonio cuaternario, y resistencia a cloranfenicol y quinolonas.

Los genes de eflujo en Gram negativas están ampliamente distribuidos y normalmente asociados con grandes plásmidos, la mayoría de los cuales son conjugativos. Estos plásmidos a menudo contienen otros genes de resistencia a antimicrobianos, genes de resistencia a metales pesados y/o factores de virulencia como toxinas.

Este grupo incluye a Tet(K) y Tet(L), ambas proteínas encontradas principalmente en especies Gram positivas. Estos genes codifican proteínas que confieren resistencia a tetraciclinas y clortetraciclina. Los genes *tet(K)* y *tet(L)* se encuentran generalmente en pequeños plásmidos transmisibles, que en ocasiones se integran al cromosoma de *Staphylococcus* spp. o en el de *Bacillus subtilis* o en grandes plásmidos estafilocócicos. El gen *tet(K)* es comúnmente encontrado en *S. aureus* pero está presente en otras especies de *Staphylococcus*. La mayoría de las especies de *Staphylococcus* tienden a poseer el gen *tet(K)*, con la excepción de *Staphylococcus intermedius*, que preferentemente posee *tet(M)* (Chopra y Roberts, 2001).

2. Proteínas de protección ribosomal (PPRs): es el mecanismo de resistencia más frecuentemente utilizado. Corresponde a proteínas plasmáticas solubles que protegen a los ribosomas de la acción de las tetraciclinas y confieren resistencia a doxiciclina y minociclina (Chopra y Roberts, 2001). Las PPRs más estudiadas corresponden a Tet(M) y Tet(O), y sus genes codificantes [*tet(M)* y *tet(O)* respectivamente] son los genes codificantes de PPRs más frecuentes de hallar en bacterias Gram positivas (Roberts, 2008). El mecanismo de protección ribosomal funciona *in vivo* e *in vitro*, a diferencia de las proteínas de eflujo, que requieren de membranas intactas para funcionar.

Las proteínas Tet(M) y Tet(O) son las más caracterizadas del grupo de PPRs y se ha visto que poseen actividad GTPasa dependiente del ribosoma. Tet(M) permite la unión del aminoacil ARNt al sitio aceptor del ribosoma en presencia de concentraciones de tetraciclina que normalmente impedirían la traducción.

Aunque sólo dos proteínas de este grupo han sido extensamente examinadas, se ha asumido que las otras PPRs [Tet(S), Tet(T), Tet(Q), Tet(P), Tet(W) y Otr(A)] tienen actividad GTPasa e interactúan con tetraciclina y los ribosomas de manera similar a lo descrito para

Tet(M) y Tet(O), debido a sus similitudes aminoacídicas. Basadas en esta secuencia, las PPRs pueden ser divididas en grupos.

La información que se tiene sugiere que las PPRs se unen al ribosoma, causando una alteración conformacional que previene la unión de tetraciclina al ribosoma, sin alterar o detener la síntesis proteica. La hidrólisis de GTP puede proveer la energía necesaria para este cambio conformacional (Chopra y Roberts, 2001).

La expresión de los genes *tet(M)* y *tet(O)* parece estar regulada. Wang y Taylor (1991) sugirieron que la región de 400 pb directamente corriente arriba de la región codificante de *tet(O)* era necesaria para la expresión completa del gen; sin embargo, la función de esa región no es conocida. Nesin *et al.* (1990) encontró que la preexposición a concentraciones subinhibitorias de tetraciclina en cepas de *S. aureus* portadoras del gen *tet(M)* resultaba en un aumento de la resistencia a tetraciclina y en un incremento en el nivel de ARNm transcritos para *tet(M)*. Hallazgos de zonas de poca variabilidad corriente arriba y mayor variabilidad en las zonas corriente abajo son consistentes con la hipótesis de que las regiones corriente arriba son importantes para la regulación, mientras que no se ha descrito un rol para las secuencias directamente corriente abajo del gen estructural.

3. Inactivación enzimática de tetraciclina: el único ejemplo de resistencia debido a alteración enzimática de la droga es codificado por el gen *tet(X)*. El producto del gen *tet(X)* es una proteína citoplasmática de 44 kDa que modifica químicamente tetraciclina en presencia de oxígeno y NADPH (Chopra y Roberts, 2001).
4. Mecanismo desconocido de resistencia: confiere un bajo nivel de resistencia a tetraciclina. Entre los genes responsables se encuentra el gen *tet(U)*, que codifica una proteína menor que las proteínas de eflujo activo y que las PPRs. El mecanismo de resistencia codificado por el gen *otr(C)* tampoco ha sido identificado, debido a que aún no ha sido secuenciado, pero se ha especulado que no codifica ni para proteínas de eflujo ni para PPRs; si codifica para inactivación enzimática o para un mecanismo desconocido, aún no se ha determinado (Chopra y Roberts, 2001).

Los mecanismos más comunes de resistencia a tetraciclina corresponden a los mediados por proteínas de eflujo activo y por proteínas de protección ribosomal.

La mayoría de los genes de resistencia a tetraciclinas residen en transposones, transposones conjugativos, plásmidos y/o integrones, los cuales pueden transmitirse por conjugación de una especie a otra y entre géneros no relacionados. Estos elementos móviles son los responsables de

la alta diseminación de estos genes de resistencia que han ayudado a las bacterias a sobrevivir bajo la presión selectiva de los antibióticos (Roberts, 2008).

En 1980, Mendez *et al.* examinaron por primera vez la heterogeneidad genética de determinantes de resistencia a tetraciclinas desde plásmidos de *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*, usando enzimas de restricción, hibridación ADN-ADN, y expresión de la resistencia a tetraciclina y varios análogos para caracterizar los plásmidos resistentes a tetraciclina (Tc^r). Actualmente, dos genes son considerados de la misma clase y se les da la misma clasificación si poseen un 80% o más de su secuencia aminoacídica en común. Dos genes son considerados diferentes si tienen un 79% de identidad aminoacídica o menos. Esta comparación puede hacerse usando la información de secuencias del GenBank, ya que exceptuando los genes *tet(I)* y *otr(C)*, todos los genes *tet* y *otr* han sido secuenciados y están disponibles (Chopra y Roberts, 2001).

Cuadro 1: Mecanismos de resistencia caracterizados para los genes <i>tet</i> y <i>otr</i> .			
Eflujo Activo	Protección Ribosomal	Inactivación Enzimática	Mecanismo Desconocido
<i>tet(A)</i> ; <i>tet(B)</i> ; <i>tet(C)</i> ; <i>tet(D)</i> <i>tet(E)</i> ; <i>tet(G)</i> ; <i>tet(H)</i> ; <i>tet(J)</i> <i>tet(V)</i> ; <i>tet(Y)</i> ; <i>tet(Z)</i> ; <i>tet(30)</i> ; <i>tet(31)</i> ; <i>tet(33)</i> ; <i>tet(35)</i> ; <i>tet(39)</i> <i>tet(41)</i> ; <i>tet(K)</i> ; <i>tet(L)</i> ; <i>tet(38)</i> ; <i>tetA(P)</i> ; <i>tet(40)</i> ; <i>otr(B)</i> ; <i>otr(C)</i> ; <i>tcr</i> ; <i>tet(42)</i> ; <i>tet(43)</i>	<i>tet(M)</i> ; <i>tet(O)</i> <i>tet(S)</i> ; <i>tet(W)</i> ; <i>tet(32)</i> ; <i>tet(Q)</i> <i>tet(T)</i> ; <i>tet(36)</i> <i>otr(A)</i> ; <i>tetB(P)</i> <i>tet</i> ; <i>tet(44)</i>	<i>tet(X)</i> <i>tet(37)</i> <i>tet(34)</i>	<i>tet(U)</i>

b) Resistencia a Betalactámicos:

Se han descrito diferentes tipos de mecanismos de resistencia a los betalactámicos, muchas veces relacionados entre sí. Entre estos se encuentran:

1. Resistencia mediada por betalactamasas: esta resistencia se debe a la producción de una penicilinas plasmídica inducible, que inactiva la penicilina G y las carboxipenicilinas, entre otras. El mecanismo de inducción consiste en que la penicilina y sus análogos favorecen la producción de una proteína antirrepresora que, al inhibir el gen represor de la betalactamasa (gen *blaI*), aumenta la síntesis de penicilinas (Imsade, 1978). Esta

penicilinas es inactivada por los inhibidores de betalactamasas, como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

2. Fenómeno de tolerancia: afecta a todos los betalactámicos. Implica que para la lisis y muerte del microorganismo se requieren concentraciones de antimicrobiano mucho más elevadas que para la inhibición de su crecimiento. Significa una disminución de la actividad autolítica por exceso de inhibidor de autolisinas, lo que se traduce en un efecto bactericida más lento (Sabath *et al.*, 1977). Se desconoce su base genética.
3. Resistencia a meticilina: la meticilina es una penicilina semisintética que resiste la acción de las betalactamasas. La resistencia a meticilina implica resistencia intrínseca a todos los betalactámicos, incluidas cefalosporinas y carbapenemes. Puede ser debida a varios mecanismos, en función de que contengan o no el gen *mecA* (Borraz, 2006).
4. Modificación del sitio diana: el mecanismo de resistencia a meticilina fue descubierto en 1981 con la identificación de alteraciones en la afinidad de las proteínas que se unen a las penicilinas o PBPs (Hayes *et al.*, 1981; Hartman y Tomasz, 1981). Las PBPs son enzimas localizadas en la membrana bacteriana que catalizan las reacciones de transpeptidación del peptidoglicano durante la síntesis de la pared celular. Las cepas de estafilococos se caracterizan por producir al menos cuatro PBPs (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4) (Chambers *et al.*, 1994) que son inhibidas por los betalactámicos, incluida la meticilina. En el caso específico de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR), además de sintetizar estas cuatro proteínas, sintetiza una PBP de baja afinidad por los antimicrobianos betalactámicos, denominada PBP2 α o PBP2', permitiendo que la reacción de transpeptidación continúe su proceso en forma normal (Lim y Strynadka, 2002). Las cepas de *S. aureus* que son resistentes a meticilina por este mecanismo, lo son también a todos los betalactámicos, incluyendo penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactámicos

El determinante genético de resistencia a meticilina es el gen *mecA*, de localización cromosómica, que codifica la síntesis de la PBP2 α (Chambers, 1987). Esta secuencia cuenta con dos genes reguladores: el gen *mecR1* o gen regulador de la señal de transducción del gen *mecA* y el gen *mecl*, que codifica la proteína represora de la transcripción del gen *mecA* (De Lencastre *et al.*, 1994). La transcripción del gen *mecA* se produce cuando el betalactámico llega a la célula y se une al dominio receptor de unión a penicilina de la membrana citoplasmática codificado por el gen *mecR1*, desencadenando una señal que induce a la proteasa autocatalítica a unirse a *mecl*, el cual está bloqueando la región operadora de *mecA*. De esta manera queda libre el operador de *mecA*, siendo posible la expresión de PBP2 α (Zhang *et al.*, 2001).

Se han descrito otros genes de naturaleza cromosómica que no están comprendidos en el gen “*mec*” y que son esenciales para la expresión fenotípica de resistencia. Éstos son los denominados genes “*fem*” A-F (factores esenciales para la expresión de resistencia a meticilina), encontrándose tanto en cepas de *S. aureus* sensibles como resistentes (De Lencastre *et al.*, 1994), y los genes *chr*. Estos últimos son genes cromosómicos cuyas mutaciones conllevan a una resistencia de alto nivel a meticilina en presencia de PBP2 α y que difieren del operón *femAB*. Hasta el momento se desconoce su posición dentro del cromosoma (Stranden *et al.*, 1996). Se han realizado algunos estudios en los que se describe que la resistencia de alto nivel a los betalactámicos es más elevada cuanto mayor es el número de mutaciones que se producen en el gen *mecA* y en su secuencia reguladora, mientras que las mutaciones cromosómicas, en una zona ajena a estos genes, juegan un papel mucho menor (Katayama *et al.*, 2004).

El gen *mecA* se encuentra distribuido, de forma amplia, tanto en estafilococos coagulasa positivos como en especies de coagulasa negativos resistentes a meticilina. El gen *mecA* forma parte de una estructura de cassette en el cromosoma estafilocócico, denominado SCCmec (Staphylococcal Cassette Chromosome Mec) (Katayama, 2000). El SCCmec es un elemento genético móvil, insertado en el cromosoma de SAMR en el extremo 3' del fragmento de lectura abierta (ORF) orfX, cuya función es desconocida por el momento (Baba *et al.*, 2002). Su movilidad se debe a la presencia de dos genes específicos únicos: *ccrA* y *ccrB*, que codifican las denominadas recombinasas del cassette cromosómico A y B. Éstas son recombinasas polipeptídicas, homólogas con las recombinasas de la familia invertasa/resolvasa, y son las responsables de la integración y escisión cromosómica del SCCmec (Ito *et al.*, 2001).

b.1) Resistencia a meticilina no mediada por el gen *mecA*

Se han descrito otros mecanismos de resistencia a meticilina en cepas que no son portadoras del gen *mecA* y que se asocian a CIMs de meticilina entre 8 y 16 g/mL. Estos mecanismos son los siguientes:

- Hiperproducción de penicilinasa: son las denominadas cepas BORSA (“borderline” *S. aureus*). Sintetizan una cantidad importante de betalactamasa y no tienen ni el gen *mecA* ni la PBP2 α . En estas cepas la sensibilidad a la oxacilina puede recuperarse cuando se asocia con un inhibidor de betalactamasas, siendo éste el mejor método para su detección fenotípica. No suelen presentar resistencia asociada a otros grupos antimicrobianos (McDougal y Thomsberry, 1986)
- Determinadas cepas parecen producir una meticilinasas capaz de hidrolizar la meticilina en ausencia del gen *mecA*, pero su relevancia y el gen responsable no están claramente establecidos (Massidda *et al.*, 1996).

-Modificación de las PBPs habituales en *S.aureus*: son las cepas MODSA (modified *S. aureus*), cepas resistentes de bajo nivel a oxacilina y no productoras de betalactamasas. Estas cepas presentan una modificación en la afinidad de sus PBPs normales frente a los betalactámicos, ello puede ser debido a la hiperexpresión de algunas de estas PBPs o la consecuencia de mutaciones genéticas que alteren la afinidad de la proteína final por el antimicrobiano (Tomasz *et al.*, 1989).

Aunque aún está por determinarse la frecuencia relativa de cada uno de los tipos de resistencia, se puede dar la posibilidad de que en una misma cepa de SAMR coexistan distintos mecanismos (Chambers, 1987).

b.2) Aparición y evolución de *S. aureus* resistente a meticilina

La meticilina comenzó a comercializarse en Europa durante el bienio 1959-1960. Un año después en Inglaterra se detectan las primeras cepas SAMR (Jevons, 1961) y en 1963 se describe el primer brote epidémico de infección nosocomial en el Reino Unido (Stewart y Holt, 1963). Desde entonces se ha observado la diseminación de cepas SAMR en muchos hospitales de diversos países, pudiendo documentarse varias ondas de diseminación global de diversos clones epidémicos.

Estudios internacionales de vigilancia epidemiológica, indican que la prevalencia de SAMR varía en función de los hospitales y de las regiones dentro de un país. Los datos del sistema de vigilancia SENTRY recogidos durante 1997-1999 informan que la prevalencia de SAMR en Estados Unidos fue del 34,2%, en Canadá del 5,7%, en América Latina del 34,9%, en Europa del 26,3% y en el Pacífico oriental del 46% (Diekema *et al.*, 2001).

En nuestro país, Lendermann *et al.* (1974), detectaron las primeras cepas resistentes en 1967, reportando una frecuencia de 6,6% en 1973. Otros investigadores como Lynch *et al.* (1973), García *et al.* (1981) y Silva *et al.* (1981) han encontrado una incidencia que fluctúa entre 0,8 y 4,8%. A pesar de existir referencias de estas cepas desde el año 1967 en Chile, recién en la década del 80 comenzó a adquirir relevancia, causando entre 13,9 y 32% de las infecciones intrahospitalarias. Datos de 1993 muestran que 23,6% de ellas eran producidas por *S. aureus* y de éstos, 55% correspondían a SAMR.

Desde la descripción original del MRSA en animales (Devriese y Hommez, 1975) hasta el final del siglo XX, sólo fueron aisladas cepas de MRSA mostrando características comúnmente vistas en cepas epidémicas de humanos. Los animales aparentemente fueron infectados por sus asistentes humanos. Más recientemente, una cepa llamada "MRSA asociada a animales" ha emergido en diferentes especies animales. Esta cepa fue por primera vez aislada en planteles

porcinos (Voss *et al.*, 2005), pero también se ha detectado en plantales avícolas (Nemati *et al.*, 2008) y equinos (Van den Eede *et al.*, 2009) y parece estar presente en toda Europa. Este clon es a menudo transmitido desde animales a humanos y tiene un importante rol zoonótico.

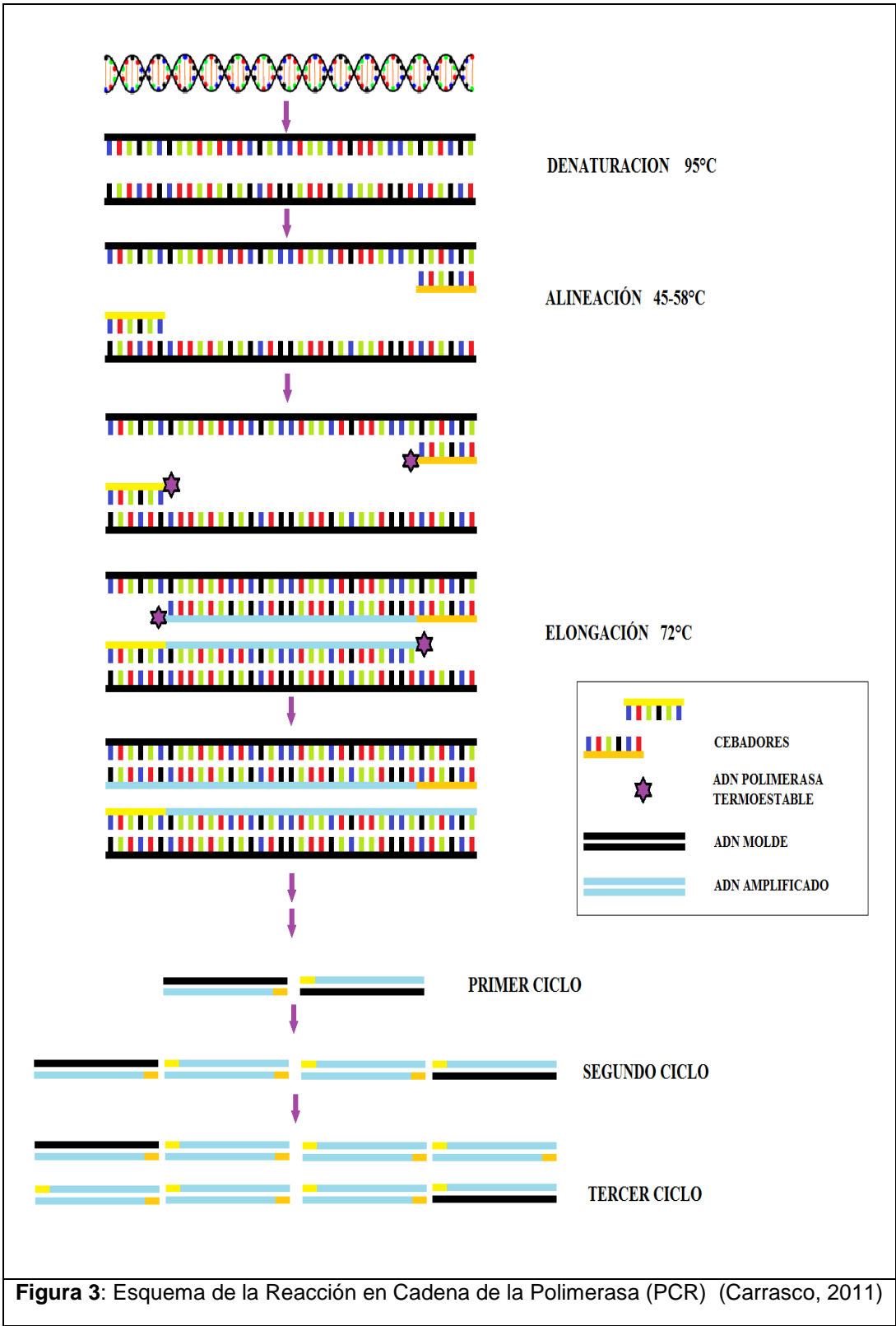
Existe menos información referente a *S. pseudointermedius* meticilino resistente (SPMR) y *S. schleiferi* meticilino resistente (SSMR). En el último tiempo un número creciente de aislados de SPMR ha sido identificado. En un estudio reciente, Morris *et al.* (2006) ha descrito que un 17% (n=336) de los aislados de *S. intermedius* en los que se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana resultaron ser meticilino resistentes. De manera similar a *S. aureus*, la resistencia a meticilina en *S. pseudointermedius* es codificada por el gen *mecA*. Las infecciones con SPMR han sido asociadas con brotes epidémicos en clínicas veterinarias y a menudo son resistentes a la mayoría de los antimicrobianos orales usados en la medicina de animales menores. El gen *mecA* ha sido adquirido por varios genotipos diferentes de *S. intermedius* en diferentes continentes, indicando adquisición múltiple por transferencia horizontal. Un único genotipo común ha sido encontrado en Europa del norte y central, indicando la existencia de un clon ampliamente distribuido y exitoso, siendo los aislados europeos de SPMR genéticamente diferentes a los aislados de Norteamérica, reflejando probablemente la reciente aparición de las cepas resistentes a meticilina (Fitzgerald, 2009).

Debido a la importancia global que posee el fenómeno de la resistencia a antimicrobianos, a la cada vez mayor diseminación y el alto número de determinantes genéticos involucrados en este fenómeno, se hace necesario contar con metodologías que permitan su adecuado diagnóstico. Dentro de éstas se encuentran las herramientas diagnósticas de la biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa.

2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR es un método para amplificar ácidos nucleicos generando múltiples copias de un segmento específico de ADN. Se asemeja al proceso natural de replicación de ADN donde el número de moléculas se duplica después de la repetición de tres pasos sucesivos (denaturación, alineación y elongación) que en conjunto forman un ciclo. Esto se realiza de manera automatizada y bajo condiciones controladas de temperatura por el termociclador mediante el uso de partidores o “primers” (secuencias de oligonucleótidos altamente específicas y complementarias) que reconocen secuencias que flanquean el segmento de ADN a amplificar.

Etapas del PCR (Figura 3):



(1) Denaturación: La molécula de ADN de cadena doble usada como molde, se separa al ser incubada a alta temperatura (95°C). Las hebras ya disociadas permanecerán libres hasta que

la temperatura descienda lo suficiente para permitir la alineación de los oligonucleótidos usados como cebadores.

(2) Alineación: La mezcla es enfriada (45-58°C) y los oligonucleótidos sintéticos (cebadores o partidores) se unen o alinean a sitios cercanos a la región que será amplificada. Cada cebador se alinea sólo a una de las hebras de ADN, ya que poseen secuencias diferentes que no los hacen complementarios el uno del otro; cuando se alinean los cebadores lo hacen enfrentando sus extremos 3'.

(3) Elongación: se realiza a temperatura intermedia (72°C). Los oligonucleótidos de la mezcla son incorporados al producto de extensión por la ADN polimerasa termoestable (Figura 5). El empleo de una enzima termoestable, purificada a partir del microorganismo termófilo *Thermophilus aquaticus*, simplifica el procedimiento, al no requerir la adición de enzima fresca después de cada paso de denaturación.

Estos tres pasos constituyen un ciclo y se repiten 30 o más veces con el fin de obtener millones de copias del segmento de ADN de interés, lo que le otorga a la técnica una gran sensibilidad y especificidad (Mullis y Faloona, 1987).

En el ámbito de la microbiología clínica, la PCR se ha aplicado en dos grandes campos:

1. Diagnóstico etiológico: en especial en ausencia de métodos de diagnóstico alternativos o cuando éstos son muy complejos. Además para mejorar la eficacia diagnóstica, complementando métodos convencionales o para obtener un diagnóstico rápido y precoz a fin de iniciar rápidamente el tratamiento específico.
2. Caracterización genética de agentes infecciosos: genotipificación; identificación de mutaciones determinantes de resistencias a fármacos o de virulencia; epidemiología molecular; etc.

2.5 Secuenciación nucleotídica

Esta técnica permite establecer el orden de las bases nucleotídicas (A, C, G y T) en un ácido nucleico determinado (secuencia nucleotídica). Con esta herramienta molecular se puede determinar la posición de cada base dentro del genoma bacteriano. Esta técnica permite comparar con posterioridad la similitud u homología con las bases de datos nucleotídicas que existen, como por ejemplo, con el GenBank®, que corresponde a una base de datos de secuencias genéticas de ADN del NIH (National Institutes of Health), una colección de acceso público que es actualizada periódicamente. Es parte de International Nucleotide Sequence Database Collaboration, que está formada por la base de datos de ADN de Japón (DDBJ), el Laboratorio Europeo de Biología

Molecular (EMBL) y la base de datos en el National Center for Biotechnology Information (NCBI); estas tres organizaciones intercambian datos de forma diaria. A su vez reciben secuencias genéticas producidas en laboratorios de todo el mundo (NCBI, 2003).

Según lo expuesto anteriormente, la realización de estudios de detección de genes de resistencia en bacterias aisladas de mascotas constituye una creciente necesidad con la finalidad de complementar la información existente y brindar herramientas para aportar tanto a la práctica clínica veterinaria como para la salud pública nacional.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar genes de resistencia a tetraciclinas y meticilina en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas aisladas desde gatos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar los genes *tet(M)* y *tet(O)* en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas.
- b) Identificar el gen *mecA* en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Esta Memoria de Título se realizó en el marco del proyecto FIV “Estudio preliminar de resistencia antimicrobiana en *Staphylococcus intermedius* aislados desde gatos sanos y con lesiones dermatológicas”, en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria, perteneciente al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

4.1.- Muestras: Se utilizó un número de 72 cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivas (SCP) aisladas previamente de gatos. Para la obtención de estas cepas se recolectaron 134 muestras de estos animales, incluyendo gatos con dermatologías y gatos sin patologías dermatológicas, las que fueron procesadas según metodología de microbiología clásica: cultivo y aislamiento bacteriano, estudio morfológico y microscópico de colonias, determinación de la producción de coagulasa en tubo, identificación mediante kit comercial (BBL Crystal Gram-Positive®) y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana por método de difusión de Kirby Bauer, frente a un panel de 12 antimicrobianos que incluyó oxacilina, tetraciclina y doxiciclina (Cuadros 2 y 3; Anexos 3 y 4).

Cuadro 2

Muestras de SCP aisladas desde gatos sin dermatopatías

Especie SCP	Nº de cepas aisladas
<i>S. aureus</i>	11
<i>S. intermedius</i>	32
<i>S. schleiferi</i>	5
Total	48

Cuadro 3

Muestras de SCP aisladas desde gatos con dermatopatías

Especie SCP	Nº de cepas aisladas
<i>S. aureus</i>	8
<i>S. intermedius</i>	16
<i>S. schleiferi</i>	0
Total	24

4.2.- Detección parcial de tres genes de resistencia a antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positiva mediante PCR.

- a) Obtención de ADN bacteriano:** Para la extracción del ADN bacteriano se utilizó un kit comercial de extracción y purificación (Genomic DNA Purification Kit, Fermentas®). Así, a 200 µL de un cultivo bacteriano de 10⁶ UFC/mL se agregaron 400 µL de solución de lisis, incubando a 65° C por cinco minutos. Luego, se adicionaron 600 µL de cloroformo (Merk®), y se centrifugó a 10.000 rpm por dos minutos (Heraus Sepatech Biofuge®). Enseguida, se colectó la fase superior en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se agregaron 800 µL de solución de precipitación provista por el kit, mezclando suavemente y centrifugando a 10.000 rpm por dos minutos. El pellet obtenido fue disuelto en 100 µL de NaCl (1.2 M). A esta mezcla se adicionaron 300 µL de etanol frío y se mantuvo a -20° C por 10 minutos para precipitar el ADN. Posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm por cuatro minutos, se eliminó el etanol y el pellet obtenido se disolvió en 100 µL de agua libre de nucleasas.
- b) Mezcla de reacción de PCR:** Para la mezcla de amplificación del ADN purificado se utilizó un kit comercial (2X PCR Master Mix Fermentas®), que incluye la polimerasa termoestable, los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), buffer de reacción y MgCl₂. 15 µL de este Master Mix se depositaron en un tubo Eppendorf de 0,2 mL, junto a 5 µL de cada uno de los partidores, y 5 µL de la muestra de ADN templado, obteniendo un volumen total de 30 µL.
- c) Amplificación del ADN:** Se utilizó un termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 pocillos de 0,2 mL y el protocolo de amplificación se realizó de acuerdo a lo descrito para cada gen a detectar (cuadros 4 y 5) (Trzcinski *et al.*, 2000; Wichelhaus *et al.*, 1999). Brevemente, denaturación inicial de alta temperatura por un tiempo determinado, con la que se busca una separación inicial de las hebras dobles de ADN, seguida por ciclos que involucran: (1) denaturación que busca la separación total de todas las hebras dobles a simples, (2) hibridación a una temperatura menor con lo que los partidores se unirán a los extremos de las hebras blanco y, (3) extensión a una temperatura algo mayor, con lo cual se formarán las nuevas hebras con la ayuda de la ADN polimerasa termoestable, sometiéndose luego a una extensión adicional para terminar de formar hebras que pudiesen haber quedado incompletas.

Cuadro 4: Protocolo de PCR para genes de resistencia antimicrobiana

Gen	Ciclos	Denaturación inicial	Hibridación	Elongación	Elongación final	Tamaño banda
<i>tet(M)</i>	35	95° C; 60s	50° C; 60s	72° C; 90s	72° C; 300s	1862 pb
<i>tet(O)</i>	35	95° C; 60s	55° C; 60s	72° C; 90s	72° C; 300s	1723 pb
<i>mecA</i>	30	94° C; 60s	57° C; 60s	72° C; 120s	72° C; 300s	533 pb

Cuadro 5: Partidores utilizados en el protocolo de PCR según genes de resistencia antimicrobiana

Gen	Partidores	
<i>tet(M)</i>	5' -AGTTTTAGCTCATGTTGATG- 3'	5' -TCCGACTATTTAGACGACGG- 3'
<i>tet(O)</i>	5'-AGCGTCAAAGGGGAATCACTATCC-3'	5'-CGGCGGGGTTGGCAAATA-3'
<i>mecA</i>	5' -AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC- 3'	5' -AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC- 3'

d) Visualización de los productos del PCR: Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Winkler®) al 2%, en buffer Tris acetato EDTA (TAE) (Fermentas®). 5 µL de producto de PCR se mezclaron con 1 µL de un producto comercial de carga (6X Mass Ruler Loading Dye Solution; Fermentas®). La mezcla se depositó en el pocillo respectivo del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V por 90 minutos. Se utilizó Hiperladder II (Bioscan) como marcador de peso molecular, que contiene fragmentos de ADN de entre 100 y 2.000 pb. Luego, el gel se incubó en bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Posteriormente, las bandas obtenidas fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminador UVP®) y fotografiado digitalmente.

Como controles positivos y negativos para el gen *mecA* se empleó una cepa *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SAMR) local (donada por la Profesora María Teresa Ulloa, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) y la cepa ATCC *S.aureus* 29.213 (sensible a oxacilina). Al no contar con controles positivos para los genes *tet(M)* y *tet(O)*, los productos del PCR se enviaron a secuenciar para compararlos posteriormente con lo descrito en la base de datos del GenBank®.

e) Medidas de bioseguridad: Como medidas de bioseguridad se utilizó delantal manga larga y guantes de látex en el trabajo práctico. El proceso de visualización del producto amplificado involucra el uso de bromuro de etidio y un transiluminador de luz UV, por lo cual, al momento de visualizar el gel se utilizó una placa de acrílico y gafas con filtro UV. Posteriormente la eliminación del gel incubado en bromuro de etidio fue incinerado, pues el compuesto químico tiene, entre otras, propiedades mutagénicas.

4.3.- Determinación del porcentaje de identidad nucleotídica respecto del GenBank®

a) Secuenciación. El fragmento de ADN amplificado de 1.862 pb se envió al centro de secuenciación de la empresa Genytec cumpliendo sus requerimientos (Anexo 5). Las secuencias se obtuvieron utilizando el kit Big Dye Terminator, de Applied Biosystems. Para la lectura de estos fragmentos se utilizó el equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (normativa de Genytec; Anexo 3). Antes de realizar la secuenciación fue necesario efectuar un proceso de purificación al amplicón, usando el kit comercial "HiYield PCR DNA fragments extraxtion kit" (Bioscience®). Este proceso consistió en transferir 100 µl de la mezcla de reacción a un tubo de microcentrífuga, al que se agregaron cinco volúmenes de Buffer DF, y se homogenizó en vórtex. En seguida, se aplicó la

mezcla a una columna DF ensamblada en un tubo de plástico de 2 ml. Se centrifugó a 10.000 rpm durante un minuto a temperatura ambiente y se eliminó el líquido residual.

Luego se agregaron 600 µl del buffer de lavado diluido en etanol absoluto y se centrifugó a 10.000 rpm durante un minuto a temperatura ambiente. Se eliminó el líquido residual y se volvió a colocar la columna en el tubo. Luego se centrifugó la columna vacía durante dos minutos a temperatura ambiente. Se colocó en un tubo plástico de 1,5 ml y se agregaron 30 µl de agua libre de nucleasas. Se incubó durante dos minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm durante dos minutos para eluir el ADN. Este eluido se guardó a -20°C.

Finalmente el amplicón purificado se visualizó mediante un gel de agarosa al 2% y al utilizar un marcador de peso molecular se determinó que la concentración aproximada era alrededor de 50 ng/µl.

b) Análisis. Las secuencias obtenidas se alinearon usando el programa Clustal W 2.0.12 de libre acceso (Thompson *et al.*; 1994) junto al gen *tet(M)* de *Staphylococcus pseudintermedius* HKU10-03 (GenBank accession number CP002439.1; Tse *et al.*, 2011) y se estableció el porcentaje de identidad nucleotídica. Adicionalmente la secuencia obtenida se alineó con otras dos secuencias del gen *tet(M)* (GenBank accession number BA000017.4; Kuroda *et al.*, 2001, y GenBank accession number AP009324.1, Neoh *et al.*, 2008) utilizando el mismo software mencionado. Este programa permite la creación de una secuencia de consenso, entre diversas secuencias de un mismo gen, y también permite comparar esta secuencia con otras oficiales registradas en bancos de datos, entregando el porcentaje de identidad nucleotídica entre ellas.

5. RESULTADOS

5.1.- Detección del gen *mecA* en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas aisladas desde gatos.

El gen *mecA* fue detectado en once (15%) de las 72 muestras procesadas. De estas once muestras, cinco (45%) provienen de cepas de gatos sin dermatopatías, y seis (55%) de gatos con lesiones dermatológicas (Cuadros 6 y 7). Las bandas obtenidas se ubicaron entre los 500 y 600 pb, observándose nítidas y de grosor considerable (Figura 4). Se obtuvo una sola banda por carril, lo que señala que no hubo amplificación inespecífica.

Cuadro 6

Sensibilidad de las cepas SCP aisladas desde gatos sin dermatopatías y positivas al gen *mecA*

#	Cepa	Ox	A	Amc	Cef	Enr	Cip	T	D	Eri	Cli	SxT	Van	<i>mecA</i>
A019	<i>S. schleiferi</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	+
A023	<i>S. intermedius</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	+
A024	<i>S. schleiferi</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	+
A025	<i>S. intermedius</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	+
A026	<i>S. intermedius</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	+

Ox: Oxacilina; **A:** ampicilina; **Amc:** amoxicilina+ácido clavulánico; **Cef:** cefadroxilo; **Enr:** enrofloxacino; **Cip:** ciprofloxacino; **T:** tetraciclina; **D:** doxiciclina; **Eri:** eritromicina; **Cli:** clindamicina; **Sxt:** sulfa+trimetoprin; **Van:** vancomicina.

R: resistente; **SI:** sensibilidad intermedia; **S:** sensible

Cuadro 7

Sensibilidad de las cepas SCP aisladas desde gatos con dermatopatías y positivas al gen *mecA*

#	Cepa	Ox	A	Amc	Cef	Enr	Cip	T	D	Eri	Cli	SxT	Van	<i>mecA</i>
P006	<i>S. intermedius</i>	R	R	R	R	SI	R	R	R	R	R	R	S	+
P017	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	SI	S	S	S	+
P033	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+
P042	<i>S. intermedius</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	+
P043	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	+
P045	<i>S. aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+

Ox: Oxacilina; **A:** ampicilina; **Amc:** amoxicilina+ácido clavulánico; **Cef:** cefadroxilo; **Enr:** enrofloxacino; **Cip:** ciprofloxacino; **T:** tetraciclina; **D:** doxiciclina; **Eri:** eritromicina; **Cli:** clindamicina; **Sxt:** sulfa+trimetoprin; **Van:** vancomicina.

R: resistente; **SI:** sensibilidad intermedia; **S:** sensible

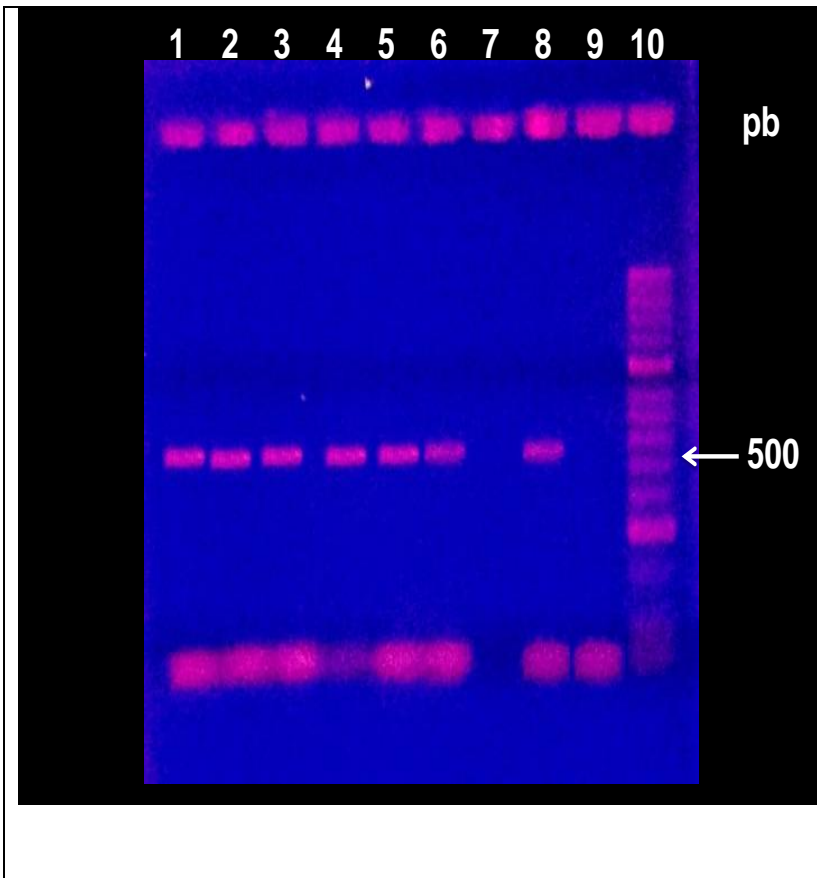


Figura 4: Detección parcial del gen *mecA* en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas aisladas desde gatos.

Carril 1: muestra A019
 Carril 2: muestra A023
 Carril 3: muestra P026
 Carril 4: muestra P006
 Carril 5: muestra P033
 Carril 6: muestra P045
 Carril 7: muestra P057
 Carril 8: control positivo
 Carril 9: control negativo
 Carril 10: MTM.
 Control negativo: cepa ATCC *S. aureus* 29.213
 Contro positivo: SAMR
 MTM: Marcador de tamaño molecular (100-2.000 pb).

5.2.- Detección del gen *tet(M)* en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas aisladas desde gatos.

Al realizar la técnica de PCR convencional se logró amplificar el fragmento buscado del gen *tet(M)* en siete de las 72 muestras procesadas (9,7%), siendo tres de ellas (43%) provenientes de gatos sin dermatopatías y cuatro (57%) en cepas provenientes de gatos con lesiones dermatológicas (Cuadros 8 y 9). Las bandas obtenidas se ubicaron entre los 1.800 y 1.900 pb, observándose gruesas y nítidas (Figura 5). Se obtuvo una sola banda por carril, lo que indica que no hubo amplificación inespecífica.

Cuadro 8

Sensibilidad de las cepas SCP aisladas desde gatos sin dermatopatías y positivas al gen *tet(M)*

#	Cepa	Ox	A	Amc	Cef	Enr	Cip	T	D	Eri	Cli	SxT	Van	<i>tet(M)</i>
A024	<i>S. schleiferi</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	+
A026	<i>S. intermedius</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	+
A092	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	+

Cuadro 9

Sensibilidad de las cepas SCP aisladas desde gatos con dermatopatías y positivas al gen *tet(M)*

#	Cepa	Ox	A	Amc	Cef	Enr	Cip	T	D	Eri	Cli	SxT	Van	tet(M)
P004	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	R	SI	S	R	S	S	+
P006	<i>S. intermedius</i>	R	R	R	R	SI	R	R	R	R	R	R	S	+
P011	<i>S. aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	SI	S	S	+
P033	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+

Ox: Oxacilina; **A:** ampicilina; **Amc:** amoxicilina+ácido clavulánico; **Cef:** cefadroxilo; **Enr:** enrofloxacino; **Cip:** ciprofloxacino; **T:** tetraciclina; **D:** doxiciclina; **Eri:** eritromicina; **Cli:** clindamicina; **SxT:** sulfa+trimetoprin; **Van:** vancomicina.

R: resistente; **SI:** sensibilidad intermedia; **S:** sensible

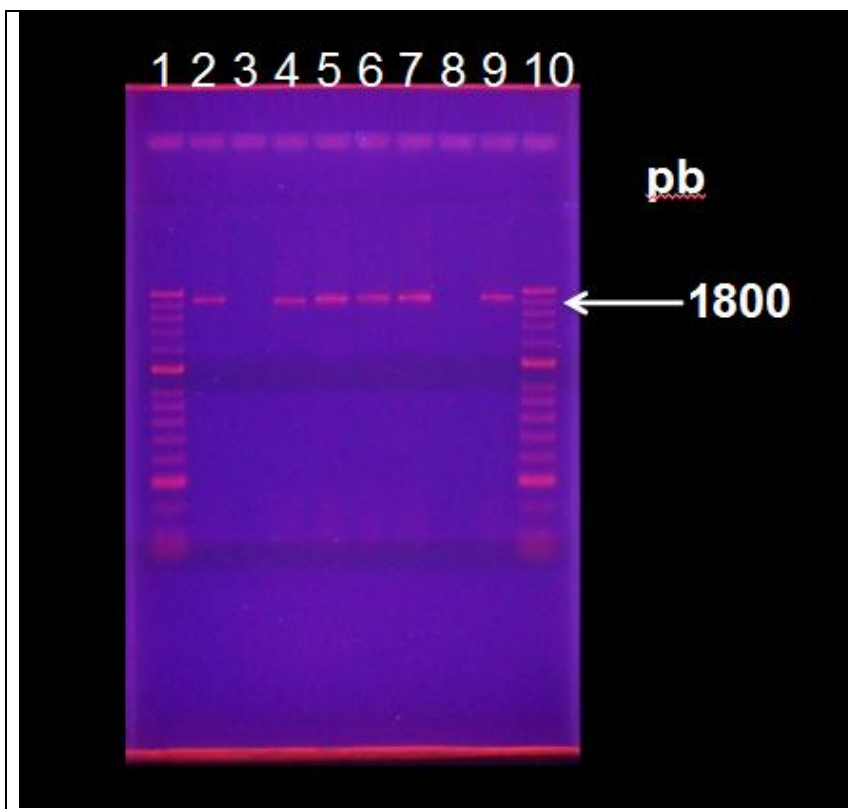


Figura 5: Detección parcial del gen *tet(M)* en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas aisladas desde gatos.

Carril 1: MTM.

Carril 2: muestra A024

Carril 3: muestra P024

Carril 4: muestra A026

Carril 5: muestra A092

Carril 6: muestra P006

Carril 7: muestra P033

Carril 8: muestra P042

Carril 9: muestra P045

Carril 10: MTM.

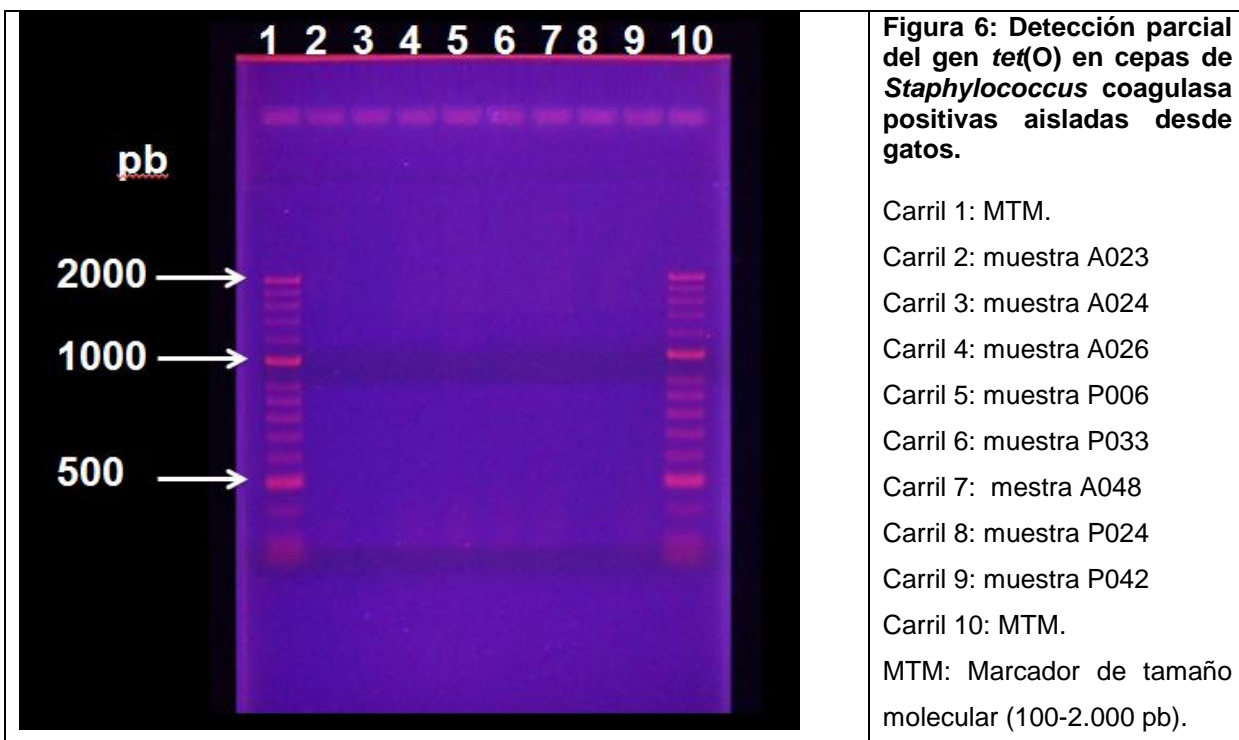
MTM: Marcador de tamaño molecular (100-2.000 pb).

5.2.a.- Secuenciación de los amplificadores del gen *tet(M)* detectado en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas aisladas desde gatos.

Los fragmentos amplificados, analizados y secuenciados fueron alineados mediante el programa computacional Clustal W2 para obtener una secuencia de consenso (NGM), y comparados con tres secuencias oficiales registradas en GenBank®, obteniendo en todas ellas un 89% de identidad nucleotídica (Anexo 6).

5.3.- Detección del gen *tet(O)* en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas aisladas desde gatos.

Utilizando el protocolo de Trzcinski *et al.* (2000) y mediante la técnica de PCR convencional no se logró amplificar el fragmento buscado del gen *tet(O)* en las 72 muestras procesadas.



6. DISCUSIÓN

La resistencia a antimicrobianos constituye un importante fenómeno biológico que se ha transformado en un problema de salud pública a nivel mundial, con implicancias económicas y sociales. Aunque la mayoría de las drogas siguen siendo eficientes, este fenómeno creciente genera serias dudas sobre la efectividad futura de las drogas utilizadas en la actualidad.

A lo largo de los años se han realizado estudios de susceptibilidad a antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas aisladas desde animales de compañía que han evidenciado el aumento en la resistencia antimicrobiana, tanto en frecuencia como en variedad de sustancias involucradas (Medleau y Blue, 1988; Lilenbaum *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 2006). La presencia de diferentes especies bacterianas en la flora normal de pequeños animales, determina que perros y gatos sean considerados como reservorios de bacterias y genes de resistencia (Guardabassi *et al.*, 2004). Además, varios son los estudios que han demostrado que cada vez son menos las barreras para el traspaso de genes de resistencia entre diferentes poblaciones bacterianas (Davison *et al.*, 2000, Guardabassi *et al.*, 2004, Baptiste *et al.*, 2005)

Desafortunadamente, este rápido aumento de resistencia antimicrobiana observado en la investigación en medicina humana no ha sido documentado con la misma rapidez en medicina veterinaria (Hoekstra y Paulton, 2002). Esta falta de información a nivel mundial también se observa en Chile, pues no existirían informes que indiquen el perfil de resistencia y mecanismos moleculares de resistencia a antimicrobianos en las principales especies de *Staphylococcus* que afectan a pequeños animales. Esta falta de vigilancia del fenómeno de resistencia a nivel nacional dificulta realizar estudios y mantener un conocimiento epidemiológico, vital para el control de la diseminación de resistencia bacteriana.

Existen numerosos estudios que señalan el aislamiento de *Staphylococcus coagulasa* positivos y coagulasa negativos desde gatos enfermos y sanos, como el de Lilenbaum *et al.* (1998) que a partir de 98 gatos clínicamente sanos aislaron un 26,5% de *S. intermedius* y un 14,3% de *S. aureus*. Los mismos autores en el año 1999 estudiaron la flora bacteriana aeróbica residente en la saliva de 104 gatos clínicamente sanos y aislaron 30 cepas (28,8%) de *S. intermedius*, como la segunda especie más frecuente y la única coagulasa positiva. Patel *et al.* (1999) obtuvieron muestras de felinos domésticos, tanto sanos como con lesiones y de felinos silvestres, obteniendo 187 aislados de *Staphylococcus*, de los cuales el 21,4% correspondió a especies coagulasa positivas, siendo *S. intermedius* la aislada con mayor frecuencia (90%) y el resto de los aislados a *S. aureus* (10%). Por último, Abraham *et al.* (2007) estudiaron la presencia de *S. aureus*, *S. intermedius* y *S. schleiferi* en piel y mucosas de gatos sanos y con enfermedad inflamatoria de piel, obteniendo aislamientos positivos en el 50% de los animales enfermos y en el 34% de los animales

sanos. *S. aureus* se aisló en 59% y 58% en gatos sanos y enfermos, respectivamente. *S. intermedius* fue aislado en el 65% y 46% de gatos sanos y enfermos, respectivamente.

En relación al fenómeno de resistencia, dentro de los pocos estudios realizados en cepas de *Staphylococcus* de gatos se encuentra el de Morris *et al.* (2006) donde -de en un total de 11 gatos- aislaron como agente primario a *S. aureus* meticilino resistente (SAMR) en gatos con obstrucción uretral, neoplasia y colangiohepatitis. En cambio, se aisló como agente secundario *S. aureus* meticilino sensible (SAMS) en 27 gatos que cursaban con enfermedades cutáneas y de oído, del tracto genitourinario, neoplasia y enfermedades cardiovasculares. Además, los mismos autores aislaron SAMS como agente primario en linfadenitis múltiples. Por último, Abraham *et al.* (2007) estudió la presencia de *S. aureus*, *S. intermedius* y *S. schleiferi* en piel y mucosas de gatos sanos y con enfermedad inflamatoria de piel, obteniendo aislamientos positivos en el 50% de los animales enfermos y en el 34% de los animales sanos.

En consideración a lo anterior, en esta Memoria de Título se detectó la presencia de genes involucrados en la resistencia antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas. En particular, la detección de dos genes, uno involucrado en la resistencia a tetraciclinas y otro involucrado en la resistencia a betalactámicos. Ésto constituye un gran avance para la Microbiología Veterinaria nacional, ya que estudios de este tipo son pioneros en el área, y la información obtenida es de vital importancia, tanto clínica como epidemiológica.

Un primer punto a considerar en relación a los resultados de este estudio lo constituye la presencia de al menos un gen de resistencia en 16/72 (22%) de las cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas. De éstas, la mayoría son cepas de *S. intermedius*, 12/16 (75%), 2/16 *S. schleiferi* (12,5%) y 2/16 de *S. aureus* (12,5%) (Cuadros 6, 7, 8 y 9). Estos resultados concuerdan con los estudios de diversos autores, debido a que las especies mayoritarias presentes en gatos y otros animales de compañía son *S. intermedius* y en segundo lugar *S. schleiferi*, mientras que *S. aureus* es un patógeno oportunista que se encuentra más frecuentemente en humanos (Lilenbaum *et al.*, 1998; Rachal *et al.*; 2009, Kadlec *et al.*, 2010).

En segundo lugar y en relación a las características de las muestras utilizadas en este estudio, llama la atención la marcada multirresistencia expresada por siete de las cepas en las que se detectó el gen *mecA*. Éstas, aparte de ser resistentes a oxacilina, lo fueron también al menos a ocho antimicrobianos del panel. Esta multirresistencia está bien documentada en la literatura, teniendo como origen la posición del gen *mecA* en el cassette cromosómico estafilocócico, el que puede insertarse en integrones, lo que generalmente portan variados genes de resistencia a otras sustancias como eritromicina, clindamicina y enrofloxacino, e incluso desinfectantes como amonio cuaternario (Ito *et al.*, 2004; Diederer y Kluytmans, 2006). Por otra parte, cuatro de las once cepas

mecA positivas resultaron sensibles a oxacilina en el antibiograma por difusión en agar, lo que podría explicarse por el estudio de Tomasz *et al.* (1991), donde definieron cuatro clases de expresión fenotípica de resistencia a meticilina en *S. aureus*: una clase con resistencia homogénea de alto nivel a meticilina y tres clases con resistencia heterogénea y de menor nivel. Esta denominación de “heterogénea” está dada por el siguiente hecho diferencial: en placas con concentraciones elevadas y progresivas de antimicrobiano, el número de colonias va decreciendo inversamente a la concentración, sugiriendo que sólo una pequeña fracción de la población expresa fenotípicamente la resistencia. Los cambios en la expresión de resistencia son transitorios y enteramente fenotípicos. El pasaje de cepas heterogéneas en medio de cultivo con antibióticos produce proliferación de cepas altamente resistentes, resultando en una población homogénea. Subcultivos posteriores en medios libres de antibióticos vuelven al patrón heterogéneo original. También existen otros factores que podrían afectar la expresión de resistencia mediada por el gen *mecA*, como el plasmidio de β -lactamasa estafilocócica (podría impedir la delección espontánea del *mec* cromosomal o podría inducir un patrón heterogéneo de resistencia si se inserta en receptores homogéneamente resistentes), el factor *fem* o factor *aux* (factor esencial para la resistencia a meticilina y factor auxiliar, respectivamente. Son genes cromosomales distintos al *mec*, necesarios para la completa expresión de resistencia, presentes en cepas sensibles y resistentes), entre otros (Gil, 2000). Todos estos factores estudiados en *S. aureus* podrían también estar involucrados en la resistencia a meticilina mediada por el gen *mecA* en otras especies de *Staphylococcus*.

Estos resultados se suman a diversos otros estudios, que señalan el aumento en la frecuencia de detección del gen *mecA* en bacterias de mascotas, tanto en cepas de *S. aureus* como en otras típicamente veterinarias como *S. intermedius*. Estos estudios destacan el importante rol que juegan las personas en las infecciones con SAMR en mascotas, donde las primeras presumiblemente son la fuente original de la infección y las segundas actúan como reservorio para posibles reinfecciones de sus propietarios. La transmisión tanto SAMR de personas a mascotas como de mascotas a sus propietarios o personal veterinario ha sido bien reportada; y en algunos casos este personal veterinario colonizado con SAMR lo ha transmitido subsecuentemente a otros animales, aumentando la diseminación de estas importantes cepas bacterianas (Scott, 2005). Sin embargo, el aumento en la detección de *S. intermedius* meticilino resistente y su potencial zoonótico son un elemento de creciente preocupación en pequeños animales y en salud pública (O'Rourke, 2003).

En relación a las tetraciclinas, tres de las siete cepas (43%) que mostraron ser resistentes fenotípicamente a través del método de Kirby-Bauer amplificaron el gen *tet(M)*, al igual que otras cuatro cepas sensibles al antibiograma. Ésto coincide con lo descrito en la literatura, ya que este gen es el principal involucrado en la resistencia a tetraciclinas de *Staphylococcus intermedius* aislados desde gatos y perros (Kim *et al.*, 2005).

De las cepas que amplificaron el fragmento de *tet(M)*, 4/7 (57%) fueron sensibles a tetraciclinas. Ésto podría ser explicado por la no expresión del gen aunque sea constitutivo del genoma bacteriano, o bien, simplemente confieren un nivel de resistencia intermedio o bajo (Bryan *et al.*, 2004). Ives y Bott (1989) demostraron que la resistencia a tetraciclinas puede variar de acuerdo al número de copias de la región cromosomal que contiene al gen en cuestión, siendo resistentes las que poseían numerosas copias, mientras que las cepas que poseían sólo una copia eran fenotípicamente sensibles. En cuanto a las cepas que fueron fenotípicamente resistentes al antibiograma y no amplificaron el gen *tet(M)* (2/5), esto puede deberse a la presencia de otro gen de resistencia a tetraciclinas, siendo más probable la presencia de los genes *tet(K)* y/o *tet(L)* (Chopra y Roberts, 2001).

En las 72 muestras procesadas no se detectó el gen *tet(O)*, lo que concuerda con resultados de diversos autores (Trzcinski *et al.*, 2000; Schwarz *et al.*, 1998). El gen *tet(O)* también otorga resistencia a través de la protección ribosomal, pero a diferencia del gen *tet(M)* se encuentra principalmente en bacterias del género *Streptococcus* (Kim *et al.*, 2005).

El fragmento obtenido, analizado y secuenciado en esta Memoria fue alineado mediante el programa computacional Clustal W2, que permitió comparar la secuencia nucleotídica con tres secuencias oficiales registradas en GenBank® (GenBank accession number CP002439.1, GenBank accession number BA000017.4 y GenBank accession number AP009324.1,) y el amplificado de consenso NGM, obteniendo un 89% de identidad nucleotídica. Este resultado permitire confirmar que el amplificado nacional NGM corresponde a un fragmento del gen *tet(M)* y otorga al laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile un control positivo para continuar con estudios moleculares de detección de resistencia a antimicrobianos, validando así los resultados de futuras investigaciones.

La detección de estos dos genes de resistencia en gatos de compañía apoya la idea sustentada por diversos autores en relación a que los animales de compañía representan un riesgo de transferencia de bacterias resistentes y/o genes de resistencia desde éstas a personas (Guardabassi *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005), incluyendo especies y genotipos de interés clínico. Estudios realizados en diversos países, incluyendo la presente memoria de título, indican que bacterias de mascotas muestran una tendencia creciente de resistencia a un amplio rango de antimicrobianos. La ubicación de muchos genes de resistencia en elementos genéticos móviles favorece su dispersión entre diferentes poblaciones bacterias y de hospederos. La transmisión de resistencia a antimicrobianos es favorecida por el contacto estrecho entre propietarios de mascotas y otras personas, así como por el hecho que virtualmente en medicina humana y en la práctica clínica de pequeños animales son utilizadas las mismas clases agentes antimicrobianos. Sin

embargo, la cuantificación de este riesgo es altamente problemática debido a que la información referente al uso de antimicrobianos en pequeños animales y su susceptibilidad antimicrobiana, prevalencia y movilidad de los genes de resistencia entre bacterias patógenas de mascotas no está actualmente disponible.

Finalmente, este trabajo es parte de una línea de investigación pionera y emergente en Chile en relación a la detección de genes de resistencia a antimicrobianos en cepas provenientes de animales de compañía. La información que puedan aportar siguientes estudios serán una consecuencia del mismo, contribuyendo así al estudio de la epidemiología molecular de la resistencia a antimicrobianos, fenómeno tan relevante en la salud pública mundial actualmente.

7. CONCLUSIONES.

1.- La metodología empleada permitió detectar el gen *mecA* y uno de los dos genes de resistencia a tetraciclinas, el gen *tet(M)*, en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positiva aisladas desde gatos.

2.- Se obtuvo un control positivo para la detección del gen *tet(M)*.

3.- No siempre existe una relación directa entre el resultado de un antibiograma y la detección de los genes de resistencia más frecuentes.

4.- La técnica de Biología molecular (PCR) es complementaria a la técnica de Microbiología Clásica (Kirby-Bauer) en la determinación de resistencia en una cepa bacteriana.

8. ANEXOS

Anexo 1:

Principales miembros de la clase Tetraciclinas y vía de administración (Chopra y Roberts, 2001).

Clortetraciclina	Oral
Oxitetraciclina	Oral y parenteral
Tetraciclina	Oral
Demetilclortetraciclina	Oral
Rolitetraciclina	Oral
Limeciclina	Oral y parenteral
Clomociclina	Oral
Metaciclina	Oral
Doxiciclina	Oral y parenteral
Minociclina	Oral y parenteral
Tigilciclina	En fase tres de pruebas clínicas

ANEXO 2:

Clasificación de los antimicrobianos betalactámicos y vía de administración (Marín y Gudiol, 2003).

Grupo	Vía de administración	
	Parenteral	Oral
Penicilinas		
Sensibles a betalactamasas		
Espectro reducido	Bencilpenicilina	Fenoxibencilpenicilina
Activas frente a enterobacterias	Ampicilina	Amoxicilina, ampicilina
Activas frente a enterobacterias y <i>Pseudomonas</i>	Carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, azlocilina, piperacilina	Indanil-carbenicilina
Resistentes a las betalactamasas		
Antiestafilocócicas	Meticilina, oxacilina, nafcilina	Cloxacilina, dicloxacilina
Combinadas con inhibidores de las betalactamasas	Ticarcilina-ácido clavulánico, ampicilina- sulbactam, piperacilina-tazobactam, amoxicilina-ácido clavulánico	Amoxicilina-ácido clavulánico
Cefalosporinas		
Primera generación	Cefazolina, cefalotina, cefradina	Cefalexina, cefradina,

Segunda generación		cefadroxilo
Activas frente a <i>Haemophilus</i>	Cefamandol, cefuroxima, cefonicida, ceforanida	Cefaclor, axetil cefuroxima, cefprozilo
Activas frente a <i>Bacteroides</i>	Cefoxitina, cefotetán, cefmetazol	
Tercera generación		
Espectro ampliado	Ceftriaxona, cefotaxima, ceftizoxima	Ceftibuteno, cefdinir, cefixima, Cefpodoxima
Espectro ampliado y anti- <i>Pseudomonas</i>	Ceftacidima, cefoperazona, cefepima	
Carbapenémicos	Imipenem-cilastatina, meropenem, ertapenem	
Monobactámicos	Aztreonam	

ANEXO 3:

Cepas SCP procesadas aisladas desde gatos sin dermatopatías

#	Cepa	Ox	A	Amc	Cef	Enr	Cip	T	D	Eri	Cli	SxT	Van
A002	<i>S. intermedius</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A006	<i>S.aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A007	<i>S.schleiferi</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A008	<i>S.aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A013	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A019	<i>S. schleiferi</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
A020	<i>S.aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A021	<i>S. intermedius</i>	S	S	S	S	S	S	S	SI	S	S	S	S
A022	<i>S.aureus</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
A023	<i>S. intermedius</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
A024	<i>S. schleiferi</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
A025	<i>S. intermedius</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
A026	<i>S. intermedius</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
A027	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Ox: Oxacilina; **A:** ampicilina; **Amc:** amoxicilina+ácido clavulánico; **Cef:** cefadroxilo; **Enr:** enrofloxacin; **Cip:** ciprofloxacino; **T:** tetraciclina; **D:** doxiciclina; **Eri:** eritromicina; **Cli:** clindamicina; **SxT:** sulfa+trimetoprin; **Van:** vancomicina. **R:** resistente; **SI:** sensibilidad intermedia; **S:** sensible

ANEXO 3. Continuación

Cepas SCP procesadas y aisladas desde gatos sin dermatopatías

#	Cepa	Ox	A	Amc	Cef	Enr	Cip	T	D	Eri	Cli	SxT	Van
A031	<i>S. schleiferi</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A032	<i>S.aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A033	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
A034	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	SI	S	R	S
A036	<i>S. intermedius</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A038	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A039	<i>S.aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A043	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A044	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A047	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A048	<i>S.aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A049	<i>S.aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A057	<i>S. schleiferi</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A061	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A062	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	SI	S	S	S	SI	S	S	S
A063	<i>S. intermedius</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A065	<i>S.aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A066	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A068	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	SI	S
A069	<i>S.aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A072	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A074	<i>S. intermedius</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A076	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A077	<i>S.aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A085	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A086	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	SI	S	S	S
A087	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	SI	S	S	S
A091	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A092	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
A093	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	SI	S	S	S
A094	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	SI	S	S	S
A095	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	SI	S	S	S
A096	<i>S. intermedius</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	SI	S	S	S
A097	<i>S. intermedius</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Ox: Oxacilina; **A:** ampicilina; **Amc:** amoxicilina+ácido clavulánico; **Cef:** cefadroxilo; **Enr:** enrofloxacin; **Cip:** ciprofloxacino; **T:** tetraciclina; **D:** doxiciclina; **Eri:** eritromicina; **Cli:** clindamicina; **Sxt:** sulfa+trimetoprin; **Van:** vancomicina. **R:** resistente; **SI:** sensibilidad intermedia; **S:** sensible

ANEXO 4:

Cepas SCP procesadas y aisladas desde gatos con dermatopatías

#	Cepa	Ox	A	Amc	Cef	Enr	Cip	T	D	Eri	Cli	SxT	Van
P002	<i>S.aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P004	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	R	SI	S	R	S	S
P005	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	SI	S	SI	S
P006	<i>S. intermedius</i>	R	R	R	R	SI	R	R	R	R	R	R	S
P010	<i>S.aureus</i>	S	R	S	S	S	SI	S	S	S	S	S	S
P011	<i>S.aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	SI	S	S
P013	<i>S. intermedius</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	SI	S	S	S
P017	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	SI	S	S	S
P021	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	SI	S
P024	<i>S.aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P025	<i>S. intermedius</i>	S	S	S	SI	S	S	S	S	S	S	S	S
P027	<i>S.aureus</i>	S	R	S	S	SI	S	S	S	S	S	S	S
P031	<i>S.aureus</i>	S	R	S	S	S	SI	S	S	S	S	S	S
P033	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P034	<i>S.aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P037	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P040	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P042	<i>S. intermedius</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S
P043	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S
P045	<i>S.aureus</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P046	<i>S. intermedius</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
P049	<i>S. intermedius</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
P052	<i>S. intermedius</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
P057	<i>S. intermedius</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Ox: Oxacilina; **A:** ampicilina; **Amc:** amoxicilina+ácido clavulánico; **Cef:** cefadroxilo; **Enr:** enrofloxacin; **Cip:** ciprofloxacino; **T:** tetraciclina; **D:** doxiciclina; **Eri:** eritromicina; **Cli:** clindamicina; **Sxt:** sulfa+trimetoprin; **Van:** vancomicina. **R:** resistente; **SI:** sensibilidad intermedia; **S:** sensible

ANEXO 5:

Protocolo del Laboratorio Genytec para el envío de amplicones para secuenciación

El protocolo a seguir para determinar la cantidad de ADN a enviar es el siguiente:

Para productos de PCR: Tamaño del fragmento x 0.1 = ng de ADN para una reacción de secuencia. (Ej: un amplicón de 500 pb calcular 500 x 0.1 = 50 ng por reacción necesarios. El volumen máximo de reacción de secuencia es de 10 ul por lo cual la mínima concentración de este producto es de 5 ng/uL. Se enviaron 5 uL de amplificado purificado con una concentración de 50 ng/uL. Adicionalmente se enviaron 10 uL del cebador a una concentración 10 uM (Fuente Genytec).

Características de la Muestra Enviada a Secuenciar (Protocolo Laboratorio Genytec)				
Código	Tamaño (pb)	Concentración (ng/ul)	Volumen (ul)	Partidor a usar
T1	1862	50	4	P1-P2
T2	1862	50	4	P1-P2
T3	1862	50	4	P1-P2

ANEXO 6:

Resultados del software ClustalW2

```
>gi|329312723|gb|CP002643.1| Staphylococcus aureus subsp. aureus T0131, complete genome; Length=2913900

Features in this part of subject sequence:  Tetracycline resistance protein tetM

Score = 145 bits (160);  Identities = 102/114 (89%), Gaps = 2/114 (2%)

Query  84      TCGGATAATCTTGAATACCTCTAGCAGGAAGGG-TCCAATAATAATGACGGGATTATTTT 142
|||||
Sbjct  427182    TCGGATAATCTTGAATACATCGAGCAGGAATTTCTCCAATAATAATGACCTCATTATTTT 427241

Query  143      TCAGTTGAGAATTTACGATATTTGCAC-ATATTTGGGAGCATCGTGATATGCC 195
|||||
Sbjct  427242    TCAGTTGAGTATTTACGATATTTGCACAATATTTGGGAGCATCGTTATATGCC 427295
```

>gi|323463200|gb|CP002478.1| Staphylococcus pseudintermedius ED99, complete genome; Length=2572216

Features in this part of subject sequence: tetracycline resistance protein tetM

Score = 145 bits (160); Identities = 102/114 (89%), Gaps = 2/114 (2%)

```
Query 84      TCGGATAATCTTGAATACCTCTAGCAGGAAGGG-TCCAATAATAATGACGGGATTATTTT 142
              |||
Sbjct 2507481 TCGGATAATCTTGAATACATCGAGCAGGAATTTCTCCAATAATAATGACCTCATTATTTT
2507422
```

```
Query 143     TCAGTTGAGAATTTACGATATTTGCAC-ATATTTGGGAGCATCGTGATATGCC 195
              |||
Sbjct 2507421 TCAGTTGAGTATTTACGATATTTGCACAATATTTGGGAGCATCGTTATATGCC 2507368
```

>gi|269939526|emb|FN433596.1| Staphylococcus aureus subsp. aureus TW20, complete genome; Length=3043210

Features in this part of subject sequence: tetracycline resistance protein TetM

Score = 145 bits (160), Identities = 102/114 (89%), Gaps = 2/114 (2%)

```
Query 84      TCGGATAATCTTGAATACCTCTAGCAGGAAGGG-TCCAATAATAATGACGGGATTATTTT 142
              |||
Sbjct 490751   TCGGATAATCTTGAATACATCGAGCAGGAATTTCTCCAATAATAATGACCTCATTATTTT 490810
```

```
Query 143     TCAGTTGAGAATTTACGATATTTGCAC-ATATTTGGGAGCATCGTGATATGCC 195
              |||
Sbjct 490811   TCAGTTGAGTATTTACGATATTTGCACAATATTTGGGAGCATCGTTATATGCC 490864
```

>gi|220898661|gb|EU918655.2| Staphylococcus aureus strain 1680 transposon Tn5801-like tetracycline resistance protein (tetM) gene, complete cds; Length=5520

Score = 145 bits (160), Identities = 102/114 (89%), Gaps = 2/114 (2%)

```
Query 84      TCGGATAATCTTGAATACCTCTAGCAGGAAGGG-TCCAATAATAATGACGGGATTATTTT 142
              |||
Sbjct 1771     TCGGATAATCTTGAATACATCGAGCAGGAATTTCTCCAATAATAATGACCTCATTATTTT 1712
```

```
Query 143     TCAGTTGAGAATTTACGATATTTGCAC-ATATTTGGGAGCATCGTGATATGCC 195
              |||
Sbjct 1711     TCAGTTGAGTATTTACGATATTTGCACAATATTTGGGAGCATCGTTATATGCC 1658
```

>gi|156720466|dbj|AP009324.1| Staphylococcus aureus subsp. aureus Mu3 DNA, complete genome Length=2880168

Features in this part of subject sequence: tetracycline resistance protein

Score = 145 bits (160), Identities = 102/114 (89%), Gaps = 2/114 (2%)

```
Query 84      TCGGATAATCTTGAATACCTCTAGCAGGAAGGG-TCCAATAATAATGACGGGATTATTTT 142
              |||
Sbjct 440017   TCGGATAATCTTGAATACATCGAGCAGGAATTTCTCCAATAATAATGACCTCATTATTTT 440076
```


9. BIBLIOGRAFÍA

- ABRAHAM, J.; MORRIS, D.; GRIFFETH, G.; SHOFER, F.; 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*. *Vet. Dermatol.* 18: 252-259.
- BABA, T.; TAKEUCHI, F.; KURODA, M.; YUZAWA, H.; AOKI, K.; NAGAI, Y.; IWAMA, N.; ASANO, K.; NAIMI, T.; KURODA, H.; CUI, L.; YAMAMOTO, K.; HIRAMATSU, K.** 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet.* 359: 1819-1827.
- BANNOEHR, J.; BEN ZAKOUR, N.L.; WALLER, A.S.; GUARDABASSI, L.; THODAY, K.L.; VAN DEN BROEK, A.H.M.** 2007. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* Group: insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin - resistant strains . *J. Bacteriol.* 189: 8685–8692.
- BAPTISTE, K.E.; WILLIAMS, K.; WILLIAMS, A.; WATTRET, A.; CLEGG, P.D.; DAWSON, S.; CORKILL, J.E.; O'NEILL, T.; HART, C.A.** 2005. Methicillin-resistant staphylococci in companion animals. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1942–1944.
- BEVERIDGE, T.J.** 2000 . The gram - positive cell wall. En: Gram- positive pathogens. Fischetti V.A; Novick, R.P; Ferretti, J.J.; Portnoy, D.A; Rood, J.I. (eds.). Washington, D.C : American Society for Microbiology. 3–10.
- BIBERSTEIN, E.; HIRSH, D.** 1999. Staphylococci. En: Veterinary Microbiology. Hirsh, E.; Chung, Y. eds. Blackwell Science, Inc.
- BORRAZ C.** 2006. Epidemiología de la Resistencia a metilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales españoles. Tesis Doctoral. Programa de Microbiología Médica. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona.
- BRYAN, A.; SHAPIR, N.; SADOWSKY, M.** 2004. Frequency and distribution of Tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse humans and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2503 -2507.
- BUTAYE, P.; DEVRIESE, L.; HAESBROUCK, F.** 2003. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on Gram-positive bacteria. *Cli. Microbiol. Rev.* 16: 175-188.
- CARRASCO, L.** 2011. Detección del gen de la glicoproteína b del virus herpes canino a través de la reacción de la polimerasa en cadena. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 67 p.
- CHAMBERS, H.F.** 1987. Coagulase-negative staphylococci resistant to beta-lactam antibiotics in vivo produce penicillin-binding protein 2a. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1919-1924.
- CHAMBERS, H.F.; SACHDEVA, M.J.; HACKBARTH, C.J.** 1994. Kinetics of penicillin binding protein to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* 301: 139-144.
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M.C.** 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 232-260.
- CREE, R.G.A.; NOBLE, W.C.** 1995. In vitro indices of tissue adherence in *Staphylococcus intermedius*. *Lett. Appl. Microbiol.* 20: 168–170.

- DAVISON, H.; LOW, J.; WOOLHOUSE, M.** 2000. What is antibiotic resistance and how can we measure it?. *Trends in Microbiology*. 8: 554-559.
- DE LENCASTRE, H.; DE JONGE, B.L.M.; MATTHEWS, P.R.; TOMAZS, A.** 1994. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 33: 7-24.
- DEVRIESE, L.A.; HOMMEZ, J.** 1975. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Research in Veterinary Science*. 19: 23-27.
- DEVRIESE, L.A.** 1990. Staphylococci in healthy and diseased animals. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 19: 71-80.
- DEVRIESE, L.A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT.** 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase - positive species from animals. *J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1569-1573.
- DIEDEREN, B.M.; KLUYTMANS, J.** 2006. The emergence of infections with community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect.* 52: 157-168.
- DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; SCHMITZ, F.J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R.N.; BEACH, M.** 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin. Infect. Dis.* 32: 114-132.
- ECHEVERRÍA, J.; IGLESIAS, J.** 2003. Estafilococo metilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los gram positivos. *Rev. Med. Hered.* 14: 195- 203.
- FITZGERLAD, J.R.** 2009. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of methicillin resistance. *Vet. Dermatol.* 20: 490-495.
- FITZGERALD, R.H.; MILLS, J.L.; JOSEPH, W.; ARMSTRONG, D.G.** 2009. The Diabetic Rapid Response Acute Foot Team: 7 Essential Skills for Targeted Limb Salvage. *Eplasty* <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2680239/>> [consulta: 15-03-2011]
- FOSTER, G.; ROOS, H.M.; HUTSON, R.A.; COLLINS, M.D.** 1997. *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase positive species isolated from otters. *J. Syst. Bacteriol.* 47: 724-726.
- FREBOURG, N.B; LEFEBVRE, S.; BAERT, S.; LEMELAND, J.F.** 2000. PCR - based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 38: 877-880.
- FRENEY, J.; KLOOS, W.E.; HAJEK, V.; WEBSTER, J.A.** 1999. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. *J. Syst. Bacteriol.* 49. 489-502.
- GARCIA, J.; MALDONADO, A.; ROMERO, H.** 1981. Sensibilidad de 60 cepas de *Staphylococcus aureus* frente a 10 antibióticos. *Bol. Inst. Salud Pública Chile.* 22. 60.
- GIL, M.** 2000. *Staphylococcus aureus*: microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a metilina. *Rev. Chil. Infect.* 17.: 145-152.
- GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D.H.** 2004. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 54: 321-332.

GUARDABASSI, L.; COURVALIN, P. 2006. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. En: AARESTRUP, F. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington, United States of America. Asm Press. 1-18.

HARTMAN, A.; TOMASZ, B. 1981. Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 19: 726-735.

HARVEY, R.G.; MARPLES, R.R.; NOBLE, W.C. 1994. Nasal carriage of *Staphylococcus intermedius* in humans in contact with dogs. Microb. Ecol. Health. Dis. 7: 225-227.

HARVEY, R.G.; NOBLE, W.C. 1998. Aspects of nasal, oropharyngeal and anal carriage of *Staphylococcus intermedius* in normal dogs and dogs with pyoderma. Vet. Dermatol. 9: 99-104.

HAYES, M.V.; CURTIS, N.A.C.; WYKE, A.; WARD, J.B. 1981. Decreased affinity of a penicillin binding protein for β -lactam antibiotics in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. FEMS Microbiol. Lett. 10: 119-122.

HERMANS, K.; DEVRIESE, L.A.; HAESBROUCK, F. 2010. *Staphylococcus*. En: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4^o Edición. Edited by Carlton L. Gyles, John F. Prescott, J. Glenn Songer, and Charles O. Thoen. Blackwell Publishing.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S.; FUKUCHI, Y.; KOBAYASHI, I. 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet. 350: 1670-1673.

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.

HOFFMAN, S. 2001. Mechanisms of antibiotic resistance. Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. 23: 464-472.

HUEBNER, J.; GOLDMANN, D.A. 1999. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. Annu. Rev. Med. 50: 223-236.

HUGHES, V.M.; DATTA, N. 1983. Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. Nature. 302: 725-726.

HUNTER, P.; DAWSON, S.; FRENCH, G.; GOOSSEN, H.; HAWKEYS, P.; KUIJPER, J.; NATHWANI, D.; TAYLOR, D.; TEALE, C.; WARREN, R.; WILCOX, M.; WOODFORD, N.; WULF, M.; PIDDOCK, L. 2010. Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. *J. Antimicrob. Chemother.* 65: 13-17.

IBARRA, L.; MORALES, M.A.; ACUÑA, P. 2003. Aspectos demográficos de la población de perros y gatos en la ciudad de Santiago, Chile. Avances en Ciencias Veterinarias. 18: 13-20.

IGIMI, S.; TAKAHASHI, E.; MITSUOKA, T. 1990. *Staphylococcus schleiferi* subsp *coagulans* subsp - nov, isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. J. Syst. Bacteriol. 40: 409-411.

IMSADE, J. 1978. Genetic regulation of penicillinase synthesis in gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. 4: 67-83.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; HIRAMATSU, K. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mecA* of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1449-1458.

- ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, K.; MORI, N.; TSUTSUMINOTO, K.; TIENSASITOM, C.H.; HIRAMATSU, K.** 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1323-1336.
- ITO, T.; MA, X.X.; TAKEHUCHI, F.; OKUMA, K.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K.** 2004. Novel type staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2637-2651.
- IVES, C. L.; BOTT, K. F.** 1989. Cloned *Bacillus subtilis* chromosomal DNA mediates tetracycline resistance when present in multiple copies. *J. Bacteriol.* 171:1801-1810.
- JEVONS, M.P.** 1961. "Celbenin"-resistant staphylococci. *Br. Med.* 1: 124-125.
- KADLEC, K.; SCHWARZ, S.; PERRETEEN, V.; GRONLUND ANDERSSON, U.; FINN, M.; GREKO, C.; MOODLEY, A.; KANIA, S.; FRANK, L.; BEMIS, D.; FRANCO, A.; IURESCIA, M.; BATTISTI, A.; DUIM, B.; WAGENAAR, J.; VAN DUIJKEREN, E.; SCOTT WEESE, J.; FITZGERALD, R.; ROSSANO, A.; GUARDABASSI, L.** 2010. Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudointermedius* of feline origin from different European countries and North America. *J. Antimicrob. Chemother.* 65. 1826-1837.
- KATAYAMA, Y.** 2000. A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *S.aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44. 2680-2685.
- KATAYAMA, Y.; ZHANG, H.Z.; CHAMBERS, H.F.** 2004. PBP2a mutations producing very-high-level resistance to beta-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:453-459.
- KIM, T.; NA, R. y LEE, J.** 2005. Investigations into the basis of chloramphenicol and tetracycline resistance in *Staphylococcus intermedius* isolates from cases of pododermatitis in dogs. *Journal Veterinary Medicine.* 52: 119-124.
- KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H.** 1986. Genus IV: *Staphylococcus*. En *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E.; Holt, J.G. (eds.). Baltimore: Williams and Wilkins. 1013-1035.
- KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYASHI, I.; CUI, L.; OGUCHI, A.; AOKI, K.; NAGAI, Y.; LIAN, J.; ITO, T.; KANAMORI, M.; MATSUMARU, H.; MARUYAMA, A.; MURAKAMI, H.; HOSOYAMA, A.; MIZUTANI-UI, Y.; TAKAHASHI, N.K.; SAWANO, T.; INOUE, R.; KAITO, C.; SEKIMIZU, K.; HIRAKAWA, H.; KUHARA, S.; GOTO, S.; YABUZAKI, J.; KANEHISA, M.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; FURUYA, K.; YOSHINO, C.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; OGASAWARA, N.; HAYASHI, H.; HIRAMATSU, K.** 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 357: 1225-1240.
- LENDERMAN, G.W.; JACOB, M.; GONZALEZ, A.** 1974. Evolución de la sensibilidad del *Staphylococcus aureus* a distintas penicilinas en los últimos trece años. *Bol. Inst. Bact. Chile.* 16: 37-39.
- LILENBAUM, W.; NUNES, E.; AZEREDO, M.** 1998. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from skin surface of clinically normal cats. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 224-228.
- LIM, D.; STRYNADKA, N.C.** 2002. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Struct. Biol.* 9: 870-876.
- LUDWIG, W. ; SCHLEIFER, K.H.; WHITMAN, W.B.** 2009 . Revised road map to the phylum *Firmicutes* . In *Bergey ' s manual of systematic bacteriology* , 2nd ed. , vol. 3 . P. De Vos , G. Garrity , D. Jones , N. R. Krieg , W. Ludwig , F. A. Rainey , K. H. Schleifer , and W. B. Whitman (eds.). New York : Springer - Verlag. 1–14.

- LYNCH, M.B.; MIMICA, I.; VALENZUELA, M.C.; ABARCA, S.** 1973. Sensibilidad de *Staphylococcus* a 8 agentes antimicrobianos. Rev. Méd. Chile. 101: 953.
- MALIK, S., CHRISTENSEN, H.; PENG, H.; BARTON, M.** 2007. Presence and diversity of the β -lactamase gene in cat and dog staphylococci. Vet. Microbiol. 123: 162-168.
- MARÍN, M.; GUDIOL, F.** 2003. Antibióticos betalactámicos. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 21: 42-55.
- MASSIDA, O.; MONTANARI, M.P.; MINGOIA, M.; VARALDO, P.E.** 1996. Borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strain have more in common that reduced susceptibility to penicillinase-resistant penicillins. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2769-2774.
- MCDUGAL, L.K.; THOMSBERRY, C.** 1986. The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. J. Clin. Microbiol. 23: 832-839.
- MCMANUS, M.C.** 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. Am. J. Health Syst. Pharm. 54: 1420-1433.
- MEDLEAU, L.; BLUE, L.** 1998. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. Isolated from feline skin lesions. JAVMA. 9: 1080-1081.
- MENDEZ, B.; TACHIBANA, C.; LEVY, S.B.** 1980. Heterogeneity of tetracycline resistance determinants. Plasmid. 3: 99-108.
- MOODLEY, A.; STEGGER, M.; ZAKOUR, N.L.B, FITZGERALD, J.R.; GUARDABASSI, L.** 2009. Tandem repeat sequence analysis of staphylococcal protein A (*spa*) gene in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. Vet. Microbiol. 135: 320-326.
- MORRIS, D.; ROOK, K.; SHOFER, F.; 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 (2003-2004). Vet. Dermat. 17: 332-337.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. Meth. Enzymol. 155: 335-350.
- NEMATI, M.; HERMANS, K.; LIPINSKA, U.; DENIS, O.; DEPLANO, A.; STRUELENS, M.; DEVRIESE, L.A.; PASMANS, F.; HAESBROUCK, F.** 2008. Antimicrobial Resistance of Old and Recent *Staphylococcus aureus* isolates from Poultry: First Detection of Livestock-Associated Methicillin-Resistant Strain ST398. Antimicrob. Agents Chemother. 52: 3817-3819.
- NEOH,H.M.; CUI,L.; YUZAWA,H.; TAKEUCHI,F.; MATSUO,M.; HIRAMATSU,K.** 2008. Mutated response regulator *grar* is responsible for phenotypic conversion of staphylococcus aureus from heterogeneous vancomycin-intermediate resistance to vancomycin-intermediate resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 52: 45-53.
- NESIN, M.; SVEE, P.; LUPSKI, J.R.; GODSON, G.N.; KREISWIRTH, B.; KORUBLUM, J.; PROJAN, S.J.** 1990. Cloning and nucleotide sequence of a chromosomally encoded tetracycline resistance determinant, *tet4(M)*, from a pathogenic, methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 2273-2276.
- NOVICK, R.P.** 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol. Microbiol. 48: 1429-1449.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2000. Overcoming antimicrobial resistance. World Health Organization (Report on Infectious Diseases). Ginebra, Suiza. 67.

- O'ROURKE, K.** 2003. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging problem in horses? *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223: 1399-1400.
- PATEL, A.; LLOYD, D.; LAMPORT, A.** 1999. Antimicrobial resistance of feline staphylococci in south-eastern England. *Vet. Dermatol.* 10: 257-261.
- PERRETEEN, V.; VORLET-FAWER, L.; SLICKERS, P.; EHRLICH, R.; KUHNERT, P.; FREY, J.** 2005. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of Gram-positive bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 43: 2291-2302.
- PROJAN, S.J.; NOVICK, R.P.** 1997. The molecular basis of pathogenicity. En: *The staphylococci in human disease.* Crossley, K.B.; Archer, G.L. (eds.). New York : Churchill Livingstone Inc. 55 – 81.
- RACHAL, T.; LEONARD, K.; MARTINEZ, L.; GONZALEZ-BREAUX, J.; CORBI, A.; NATHANIEL, R.** 2009. Prevalence of SCC*mec* types in methicillin resistant *Staphylococcus intermedius* in healthy pets from Southeastern United States. *J. Infect. Dis. Immun.* 1: 6-10.
- ROBERTS, M.C.** 2008. Tetracycline genes. [En línea] <<http://faculty.washington.edu.marilynr/tetweb4.pdf>> [consulta: 20-12-2009].
- SABATH, L.D.; WHEELER, N.; LAVARDIERE, M.; BLAZEVIC, D.; WILKINSON, B.J.** 1977. A new type of penicillin resistance of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 1.433.
- SALEM, D.; ROWAN, A.** 2003. Companion animals demographics in the United States: a historical perspective. En: *The state of the animals II. Human society Press.* Washington DC, EEUU. 10.
- SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K.** 2007. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2770-2778.
- SCHLEIFER, K.H.; HAMMES, W.P.; KANDLER, O.** 1976. Effect of endogenous and exogenous factors on the primary structures of bacterial peptidoglycan. *Adv. Microb. Physiol.* 13: 245-292.
- SCHWARZ, S.; ROBERTS, M.; WERCKENTHIN, C.; PANG, Y. y LANGE, C.** 1998. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. *Vet. Microbiol.* 63: 217-227.
- SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E.** 2001. Use of antimicrobial in veterinary medicine and mechanism of resistance. *Veterinary Research.* 32: 201-225.
- SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E.** 2001. Bacterial skin diseases. En: *Muller and Kirk's small animal dermatology.* 6: 274-335.
- SCOTT, J.** 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen in small animals. *J. Am. Anim. Hops. Assoc.* 41: 150-157.
- SILVA, J.; URDANIVIA, R.; HERRERA, N.** 1981. *Staphylococcus aureus* en infecciones intrahospitalarias: fagotipia y susceptibilidad a los antibióticos. *Rev. Chile Tecnol. Méd.* 5. 129.
- STEWART, G.T.; HOLT, R.J.** 1963. Evolution of natural resistance to the newer penicillin. *BMJ.* 1. 308-311.
- STRANDEN, A.M.; ROOS, M.; BERGER-BÄCHI, B.** 1996. Glutamine synthetase and heteroresistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug Resist.* 2. 201-207.
- SUSSMANN, O.; MATTOS, L.; RESTREPO, A.** 2004. Resistencia bacteriana. Unidad de infectología, Hospital Universitario San Ignacio. Bogotá, Colombia. 12p.

- TAKAHASHI, T.; SATOH, I.; KIKUCHI, N.** 1999. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *J. Syst. Bacteriol.* 49: 725-728.
- TENOVER, F.; MCDOUGAL, L.; GOERING, R.; KILLGORE, G.; PROJAN, S.; PATEL, J.B.; DUNMAN, P.M.** 2006. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 44: 108-118.
- THE NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.** 2003. GenBank Overview [en línea]. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>> [consulta: 25-08-2010]
- THOMPSON, J.; HIGGINSS, D.; GIBSON, T.** 1994. Clustal W: Improving the sensitivity progressive multiple sequence alignments through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.* 22(22): 4673-4680.
- TOMASZ, A.; DRUGEON, H.B.; DE LENCASTRE, H.; JABES, D.; McDOUGALL, L.; BILLIE, J.** 1989. New mechanisms for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1869-1874.
- TOMASZ, A.; NACHMAN, S.; LEAF, H.** 1991. Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of *Staphylococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 124-129.
- TRZCINSKI, K.; COOPER, B.; HRYNIEWICZ, V.; DOWSON, C.** 2000. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 45: 763-770.
- TSE, H.; TSOI, H.W.; LEUNG, S.P.; URQUHART, I.J.; LAU, S.K.; WOO, P.C.; YUEN, K.Y.** 2011. Complete genome sequence of the veterinary pathogen *Staphylococcus pseudointermedius* strain HKU10-03, isolated in a case of canine pyoderma. *J. Bacteriol.* 193: 1783-1784.
- VAN DEN EEDE, A.; MARTENS, A.; LIPINSKA, U.; STRUELENS, M.; DEPLANO, A.; DENIS, O.; HAESBROUCK, F.; GASTHUYS, F.; HERMANS, K.** 2009. High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. *Veterinary Microbiology.* 133: 138-144.
- VOSS, A.; LOEFFEN, F.; BAKKER, J.; KLAASSEN, C; WULF, M.** 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1965-1966.
- WANG, Y.; TAYLOR, D.E.** 1991. A DNA sequence upstream of the *tet(O)* gene is required for full expression of tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 2020-2025.
- WATSON, A.; ROSIN, E.** 2000. Antimicrobial drug use in dog and cats. En: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine.* 3. Prescott, J.F.; Baggot, J.D. and Walker, R.D. 537-575. USA: Iowa State University Press.
- WICHELHAUS, T., KERN, S., SCHAFER, V., BRADE, V.** 1999. Rapid detection of epidemic strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 37: 690-693.
- ZHANG, H.Z.; HACKBARTH, C.J.; CHANSKY, K.M.; CHAMBERS, H.F.** 2001. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to β -lactams in staphylococci. *Science.* 291: 1962-1965.