



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE SUSCEPTIBILIDAD
ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* Y
Staphylococcus intermedius DE PERROS CON OTITIS
EXTERNA.”

FRANCISCO JAVIER ABUSLEME GARAY

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

PROFESORA GUÍA: DRA. SONIA ANTICEVIC CÁCERES

Financiamiento: Proyecto MULT-O6/03-2

SANTIAGO, CHILE
2009



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE SUSCEPTIBILIDAD
ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* Y
Staphylococcus intermedius DE PERROS CON OTITIS
EXTERNA.”

FRANCISCO JAVIER ABUSLEME GARAY

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : Dra. Sonia Anticevic
PROFESOR CONSEJERO: Dra. Betty San Martin
PROFESOR CONSEJERO: Dra. María Luisa Sanchez

SANTIAGO, CHILE
2009

INDICE

RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
OTITIS EXTERNA.....	2
Factores predisponentes.....	3
Factores primarios.....	3
Factores perpetuantes.....	4
GÉNERO <i>Staphylococcus</i>	5
<i>Staphylococcus intermedius</i>	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	7
RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.....	8
PRINCIPALES MECANISMOS DE RESISTENCIA.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
MATERIAL Y MÉTODO.....	16
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS.....	17
PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	18
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN.....	27
FRECUENCIAS DE AISLAMIENTO.....	27
SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	29
AMOXICILINA.....	29
KANAMICINA.....	30

CLINDAMICINA.....	30
ENROFLOXACINO.....	31
DOXICICLINA.....	32
TETRACICLINA.....	32
OXACILINA.....	32
CEFRADINA.....	33
MUPIROCINA.....	33
SULFAMETOXAZOL/TRIMETOPRIM.....	34
CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36

RESUMEN

La otitis externa es una patología frecuente en la clínica diaria, originada por una asociación de factores que llevan a la inflamación del conducto auditivo externo y a la infección secundaria, la que frecuentemente es ocasionada por bacterias del género *Staphylococcus* dentro del cual se encuentran las especies *intermedius* y *aureus*.

El objetivo del presente estudio era determinar la frecuencia de aislamiento de las diferentes especies de *Staphylococcus* coagulasa positivas (SCP) presentes en casos clínicos de otitis externa y determinar su susceptibilidad antimicrobiana determinando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

De un total de 103 muestras de otitis externa canina, se aisló 53 (51,5%) cepas de SCP. De estas cepas se identificaron tres especies: *S. intermedius* (73,6%), *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (22,6%) y *S. aureus* (3,8%).

Se aisló por primera vez en el país *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* como patógeno presente en casos clínicos de otitis externa.

De las cepas SCP, 58,5% fueron resistentes al menos a un antibiótico y el 30,2% fueron multiresistentes a tres o más antibióticos, no encontrándose ninguna cepa resistente a todos los fármacos en estudio. El antimicrobiano menos efectivo en este estudio fue la amoxicilina, encontrándose resistencia en el 47,2% de las cepas. Los más eficientes fueron mupirocina, con una resistencia del 2,3% y oxacilina frente a la cual no se encontraron cepas resistentes.

De las 39 cepas de *S. intermedius* aisladas, 61,5% mostraron resistencia al menos a un antimicrobiano, siendo la amoxicilina el menos efectivo (53,9% resistencia) y la oxacilina el más eficaz (0% resistencia). Con respecto a *S. schleiferi* subsp. *coagulans* 33,3% de las cepas mostraron resistencia al menos a un antimicrobiano, siendo clindamicina el antibiótico menos efectivo (25% resistencia) y doxiciclina, tetraciclina y oxacilina los más eficaces puesto que no hubo cepas resistentes a estos antibióticos. De las dos cepas de *S. aureus* aisladas ambas fueron multiresistentes, pero sensibles a oxacilina.

Frente a *S. intermedius* y *S. schleiferi* subsp. *coagulans* oxacilina aparece como el antimicrobiano más seguro, mientras que kanamicina presenta valores muy disímiles de CIM 50 y 90, evidenciando menor seguridad frente a estas especies.

ABSTRACT

Otitis externa is a common pathology in everyday clinical practice, caused by a combination of factors that lead to inflammation of the ear canal and secondary infection, which is often caused by *Staphylococcus* bacteria especially *intermedius* and *aureus* species.

The aim of this study was to determine the frequency of isolation of different species of coagulase positive *Staphylococcus* (CPS) present in clinical cases of otitis externa and determine their antimicrobial susceptibility by determining the minimum inhibitory concentration (MIC).

53 strains of CPS were isolated from 103 samples from canine with otitis externa (51,5%). Of these isolates three species were identified: *S. intermedius* (73.6%), *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (22.6%) and *S. aureus* (3,8%).

This is the first report in the country of *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* as a pathogen present in clinical cases of otitis externa.

Of the SCP strains, 58.5% were resistant to at least one antibiotic and 30.2% were multiresistant to three or more antibiotics, we found no strain resistant to all drugs under study. The least effective antimicrobial agent in this study was amoxicillin (47.2% resistance). The most efficient were mupirocin, with a resistance of 2.3% and oxacillin against which there were no resistant strains.

Of the 39 strains of *S. intermedius* isolated, 61.5% showed resistance to at least one antibiotic, amoxicillin being the least effective (53.9% resistance) and the most effective oxacillin (0% resistance). With respect to *S. schleiferi* subsp. *coagulans* 33.3% of strains showed resistance to at least one antibiotic, the antibiotic clindamycin being less effective (25% resistance) and doxycycline, tetracycline and oxacillin the most effective since no strains resistant to these antibiotics. Of the two strains of *S. aureus* isolated both were multi-resistant, but sensitive to oxacillin.

Against *S. intermedius* and *S. schleiferi* subsp. *Coagulans*, oxacillin appears as the safest antimicrobial, while kanamycin has very different values of MIC 50 and 90, showing less security against these species.

INTRODUCCIÓN

La otitis externa es un motivo frecuente de consulta Médico Veterinaria que por lo general se manifiesta con prurito y dolor, y puede llegar a ser motivo de frustración para el veterinario y el propietario, ya que si el diagnóstico y tratamiento no son los adecuados puede transformarse en una enfermedad crónica, la que con el tiempo puede generar hiperplasia del conducto auditivo y ulceración permanente, incluso complicándose con otitis media o interna.

La otitis externa es la enfermedad más común del oído del perro, con una prevalencia del 20% o mayor en climas tropicales. Puede afectar animales de todas las razas, encontrándose en algunas con mayor frecuencia como Cocker Spaniel, Poodle o Labrador, no existiendo predisposición por edad ni sexo.

Con respecto a la etiología de las otitis externas se puede establecer que se originarían de una asociación de factores entre los que destacan la estructura del pabellón, enfermedades de base alérgica, metabólicas, autoinmunes, etc., que llevan a cambios del microambiente del oído. Estos cambios pueden autoperpetuarse con la invasión de hongos, levaduras, parásitos y bacterias; siendo estas últimas la causa más frecuente y corresponden en su mayoría al género *Staphylococcus*, principalmente las especies *S. aureus* y *S. intermedius*. Actualmente, ambas bacterias se han caracterizado como multiresistentes frente a antimicrobianos de uso habitual en la clínica de animales pequeños, situación que obliga a vigilar este fenómeno permanentemente en el ámbito veterinario y humano. La terapia frente a estas especies bacterianas suele ser empírica, y por esto es que el presente estudio pretende ser un aporte en esta materia, entregando información respecto a la etiología y al comportamiento de los *Staphylococcus* involucrados en la otitis externa.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Otitis externa canina

Otitis externa se define como un proceso inflamatorio, agudo o crónico, del epitelio del conducto auditivo externo (Radlinsky y Mason, 2007), y se caracteriza clínicamente por diversos signos, siendo los más frecuentes el prurito de la oreja, que se visualiza como sacudidas de cabeza, eritema, costras, secreción, olor rancio, dolor alrededor de la zona, cambios de comportamiento como depresión o irritabilidad, o incluso hiperplasia de los conductos en casos crónicos (Rosychuk y Luttgen, 2002). El conducto auditivo externo frente a la inflamación crónica de la dermis y la epidermis responde con hiperplasia epitelial e hiperqueratosis, hiperplasia de las glándulas sebáceas e hiperplasia y dilatación de las glándulas ceruminosas (Rosychuk y Luttgen, 2002).

La otitis externa es la enfermedad más común del conducto auditivo en perros; afecta entre 5 y 20% de la población canina, e incluso más en climas tropicales (Rosychuk y Luttgen, 2002; Tonelli, 2004). En el origen de la patología interactúan diversos factores que llevan a cambios en la fisiología y microbiología del oído externo, dando como resultado la inflamación del conducto auditivo (Thibaut *et al.*, 1994). El canal auditivo de los caninos es un ambiente vulnerable a cualquier cambio; alteraciones anatómicas y fisiológicas pueden generar el desarrollo de un microclima que favorece la proliferación de microorganismos (Fernandez *et al.*, 2006). Existe una etiología multifactorial en la otitis externa canina que incluye hongos, levaduras, parásitos y bacterias, la mayoría del género *Staphylococcus* (Lilenbaum *et al.*, 2000). No se informa de diferencias estadísticas en la presentación de esta enfermedad según sexo (Rosychuk y Luttgen, 2002).

El esquema de clasificación más aceptado divide las causas de otitis externa en factores predisponentes, primarios y perpetuantes.

Factores predisponentes

Los factores de predisposición hacen que la otitis sea más probable al alterarse el ambiente del conducto auditivo externo y, en consecuencia, que el oído sea más vulnerable a la inflamación e infección secundaria (Radlinsky y Mason, 2007). Estos factores pueden no ocasionar otitis externa (Tonelli, 2004), pero en conjunto con factores primarios y perpetuantes causan la enfermedad clínica. (Scott *et al.*, 1995). Según Scott *et al.* (1995); Tonelli (2004) y Radlinsky y Mason (2007) estos son:

Conformación del canal y oído: canales estenóticos (Shar-Pei); pelos en el canal (Poodle, Bichón Frisé); orejas pendulosas (Cocker Spaniel, Labrador).

Excesiva humedad: oído de nadador, climas con alta humedad.

Excesiva producción de cerumen: hipersensibilidades, defectos primarios de la queratinización (idiopática).

Defectos terapéuticos: traumatismos por hisopados, tratamientos tópicos irritantes, superinfección por alteración de la microflora normal debido a tratamientos tópicos.

Enfermedad obstructiva del oído: neoplasias, pólipos.

Factores primarios

Son los productores directos de la otitis externa. Pueden presentarse solos o junto a factores predisponentes y/o perpetuantes (Tonelli, 2004). Desafortunadamente muchos casos de otitis externa son debidos a alteraciones del metabolismo, adquiridas o congénitas, que persisten por toda la vida del paciente, como son las hipersensibilidades o los desórdenes de la queratinización (Radlinsky y Mason, 2007). Según Scott *et al.* (1995); Tonelli (2004) y Radlinsky y Mason (2007) estos son:

Parásitos externos: *Otodectes cynotis*, *Demodex canis*, *Sarcoptes scabiei*.

Hipersensibilidades: atopia, hipersensibilidad alimentaria, dermatitis por contacto, reacciones a medicamentos.

Desórdenes de la queratinización: seborrea idiopática primaria, hipotiroidismo, hiperadrenocorticismo, desequilibrios de hormonas sexuales, etc.

Cuerpos extraños: espigas, arena, exudado mezclado con pelos, conglomerados de medicamentos óticos secos.

Enfermedades autoinmunes: pénfigo foliáceo, pénfigo eritematoso, lupus eritematoso discoide.

Trastornos glandulares: hiperplasia de glándulas ceruminolíticas, hiperplasia o hipoplasia de glándulas sebáceas, etc.

Factores perpetuantes

Una vez que el ambiente del canal auditivo ha sido alterado por una combinación de factores predisponentes y/o primarios, infecciones oportunistas y cambios patológicos agravan el proceso inflamatorio y pueden mantener la enfermedad, incluso habiendo eliminado el factor primario (Radlinsky y Mason, 2007). Según Scott *et al.* (1995); Tonelli (2004) y Radlinsky y Mason (2007) estos son:

Cambios anatómicos crónicos: inflamación crónica, aumento de volumen de tejidos blandos (estenosis del conducto), etc.

Otitis Media: si no se trata sirve de fuente de persistencia de la otitis externa.

Levaduras: *Malassezia pachydermatis*.

Bacterias: Raramente causan otitis de forma primaria, las más implicadas son *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*, *E. coli* y *Klebsiella spp.*

En la determinación de la etiología y epidemiología de las otitis externas por *Staphylococcus spp.* en perros, es un factor importante el conocimiento de la composición de la flora estafilocócica normal del conducto auditivo externo. Sin embargo, la ecología de los *Staphylococcus* habitantes del conducto auditivo externo de perros sanos esta aún en estudio (Yamashita *et al.*, 2005).

Género *Staphylococcus*

El nombre proviene del griego *staphyle* (racimo de uvas), que fue utilizado por Sir Alexander Ogston para describir la forma de crecimiento aglomerado similar a las uvas.

Son bacterias Gram-positivas, cocáceas, que miden al rededor de 1 micrómetro de diámetro, inmóviles, anaerobias facultativas y fermentadoras de glucosa. El género tiene más de 30 especies diferentes y muchas de estas son habitantes normales de la piel y las membranas mucosas del hombre y animales; no tienen otros hábitats importantes, excepto cuando están involucrados en infecciones (Kloos, 1997).

Son parte de la microflora normal de la piel, que se adquieren desde la madre luego del nacimiento probablemente a través de los queratinocitos; el hospedador los tolera a cambio de varios beneficios que incluyen la exclusión de otros patógenos potenciales por la ocupación de nichos ecológicos (Mason *et al.*, 1996). Además, representan parte de la flora bacteriana normal de superficies mucosas de los tractos respiratorio, alimentario superior y urogenital de mamíferos y aves. Aparte de su rol como comensales, las cepas de *Staphylococcus* spp. pueden verse comprometidas en una amplia variedad de enfermedades en los animales (Werckenthin *et al.*, 2001); de hecho, son comúnmente aisladas en perros enfermos produciendo una variedad de infecciones como bacteremia, neumonía, furunculosis, abscesos, pioderma, conjuntivitis y otitis externa (Lilenbaum *et al.*, 2000). Las manifestaciones clínicas más frecuentes en perros son el pioderma y la otitis externa (Morris *et al.*, 2006), siendo en estas últimas responsables de hasta el 48,3% de los casos (Yamashita *et al.*, 2005).

A pesar de que los *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) son los más frecuentes en la microflora normal de humanos y perros, y son además considerados patógenos oportunistas importantes en estas especies (Lilenbaum *et al.*, 2000), los más agresivos en términos de patogenicidad se relacionan con la mayor producción de las enzimas catalasa y coagulasa, ambas presentes en las especies *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Staphylococcus intermedius* (*S. intermedius*) (Morris *et al.*, 2006); de

hecho, se considera que la prueba de la coagulasa es la más importante y significativa para la identificación de cepas de *Staphylococcus* spp. desde muestras clínicas (Igimi *et al.*, 1990).

Staphylococcus intermedius

Descrito por primera vez en 1976, se le llamo *S. intermedius* por presentar algunas propiedades de *S. aureus* y algunas de *Staphylococcus epidermidis* (Hájek, 1976). Se asocia frecuentemente con animales y raramente se ha encontrado como parte de la flora normal en humanos, incluso en aquellos con estrecho contacto con animales (Tanner *et al.*, 2000). Varios estudios evidencian a *S. intermedius* como una bacteria que forma parte de la flora cutánea del canino (Werckenthin *et al.*, 2001; Junco y Barrasa 2002; Yamashita *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2006). De hecho, se ha demostrado que más del 90% de los aislados de SCP corresponden a esta especie, siendo el residente más común encontrado en la piel de los caninos (Mason *et al.*, 1996; Griffeth *et al.*, 2008). El porcentaje de aislamiento de esta bacteria en perros sanos varía dependiendo de las técnicas de recolección y de las zonas anatómicas, siendo siempre mayor su aislamiento desde las mucosas. En un estudio de Simou *et al.* (2005), se describen frecuencias de aislamiento de 46% desde orofaringe, 64% desde nariz y 60% desde la mucosa anal. A su vez *S. intermedius* fue el organismo más comúnmente aislado desde el conducto auditivo en perros sanos (Cole *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 2002; Yamashita *et al.*, 2005).

Es considerado la causa primaria de pioderma canino y también se ha descrito en otras enfermedades como piometra e infecciones purulentas de articulaciones, párpados y conjuntiva. (Werckenthin *et al.*, 2001).

Con respecto a las otitis externas, existen diversos estudios que evidencian a *S. intermedius* como la bacteria aislada con mayor frecuencia (Hoekstra y Paulton, 2002; Junco y Barrasa, 2002; Petersen *et al.*, 2002); sin embargo otros autores reportan que las bacterias más frecuentes son SCN, pero siendo *S. intermedius* la especie de SCP más

frecuente (Yamashita *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2006). A su vez, esta especie es la más aislada desde casos clínicos de otitis media (Cole *et al.*, 1998; Colombini *et al.*, 2000).

Staphylococcus aureus

La elevada virulencia de *S. aureus* fue notificada por primera vez en un estudio publicado en 1941, en la ciudad de Boston, en donde se identificó un 82% de mortalidad asociada a pacientes humanos con bacteremias ocasionadas por este microorganismo (Velásquez-Meza, 2005).

El hospedero natural de *S. aureus* es el ser humano en el que coloniza las fosas nasales de más del 40% de los adultos sanos, y raramente se ubica en otras zonas del cuerpo salvo en casos de dermatosis (Simou *et al.* 2005). Además, puede ser aislado desde perros, pero no es la especie de *Staphylococcus* más frecuente; de hecho, se señalan frecuencias de aislamiento menores al 10% de *S. aureus* en esta especie (Duquette y Nuttall, 2004). Existe evidencia de que esta bacteria presenta mayor afinidad por los queratinocitos humanos en comparación con los queratinocitos caninos (Simou *et al.* 2005).

En trabajos internacionales este agente es frecuentemente descrito en otitis externas caninas; pero los porcentajes de aislamiento difieren según los autores, encontrándose variaciones de 5 a 25%, y en la mayoría de las ocasiones, junto a aislamientos de otras especies de *Staphylococcus* en mayor frecuencia. En un estudio chileno Sánchez *et al.* (2006) desde 218 casos de otitis externa encontraron como causal a esta especie en un 52,8% de las muestras.

Resistencia Antimicrobiana

La mayoría de los antimicrobianos disponibles en medicina humana y veterinaria se originan desde sustancias producidas por bacterias y hongos, y se cree que la resistencia a estos fármacos ha evolucionado desde la era pre-antibiótica (Schwarz y Noble, 1999). Sin embargo, desde la introducción de los antimicrobianos en la medicina humana, los *Staphylococcus* que infectan a humanos y animales domésticos han mostrado un rápido desarrollo y diseminación de resistencia antimicrobiana; desafortunadamente, este desarrollo no ha sido completamente documentado en el campo de la Medicina Veterinaria (Werckenthin *et al.*, 2001). El fenómeno de resistencia en cepas de *Staphylococcus* spp. de humanos se ve acentuado, particularmente, en aquellas cepas obtenidas desde infecciones nosocomiales, mostrando resistencia a la mayoría de las clases de antibióticos existentes (Malik *et al.*, 2005).

El primer reporte sobre estudios de susceptibilidad frente a antibióticos de cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas desde caninos data de finales de los años sesenta en Japón (Shimizu y Shihata 1967). Posteriormente, Robrich *et al.*, en 1983, informaron que *S. aureus* y *S. intermedius* aislados desde infecciones del tracto urinario de perros en Estados Unidos eran altamente sensibles a ampicilina, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprim, nitrofurantoína, cefalexina, kanamicina y gentamicina; en tanto que encontraron resistencia intermedia frente a oxitetraciclina y ácido nalidíxico. Estudios posteriores, también en los Estados Unidos, sobre caninos afectados por pioderma, demostraban que *S. intermedius* era más resistente a ampicilina, penicilina y tetraciclina, que en los estudios previos (Medleau *et al.* 1986).

Un estudio canadiense de datos recogidos durante un periodo de 15 años de aislados de *S. aureus* y *S. intermedius* desde caninos, muestran una imagen de aumento de resistencia a través del tiempo a algunos antimicrobianos como cefalexina, enrofloxacino y gentamicina; y disminución a otros como penicilina y ampicilina, mientras clindamicina y eritromicina mantuvieron patrones de resistencia estables, o al menos sin diferencia significativa. Esta situación de resistencia estaría asociada al uso

de determinados patrones de antibióticos en los hospitales veterinarios (Prescott *et al.*, 2002). Lo anterior concuerda con lo dicho por Malik *et al.*, el 2005 quienes postularon que los patrones de resistencia a antibióticos observados en perros se correlacionan con la cantidad y frecuencia del uso de ciertos antimicrobianos. En otro estudio canadiense realizado por Hoekstra y Paulton el 2002, se observó que la resistencia a antibióticos en las cepas de perros son dependientes dentro de otros factores, del lugar de aislamiento. Así es como cepas de *S. aureus* y *S. intermedius* aislados desde secreción ótica, fueron más resistentes a cefalexina en relación a cepas aisladas desde otros sitios del cuerpo.

La determinación de la susceptibilidad de cepas de *Staphylococcus* spp. a los agentes antimicrobianos, actualizada de forma continua, es de gran importancia para el uso selectivo de diferentes drogas y el desarrollo de nuevos antibióticos; sin embargo, existe relativamente poca información en la literatura acerca de los patrones de susceptibilidad de cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas desde pacientes cursando con otitis externa, tal como señalan Lilenbaum *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005 y Sánchez *et al.*, 2006.

En un estudio brasileño de Lilenbaum *et al.* (2000), se encontró que el 90,9% de los *Staphylococcus* aislados desde otitis externa, considerando tanto especies coagulasa negativas como positivas, mostraron resistencia al menos a un antimicrobiano; 36,4% de estos *Staphylococcus* fueron multiresistentes a tres o más drogas. Estos altos valores de resistencia se repiten en otro estudio brasileño en el que Oliveira *et al.* (2005), encontraron que más del 90% de los SCP fueron resistentes a penicilina. Resulta preocupante comparar los resultados de sensibilidad de estos dos estudios ya que frente a todos los antibióticos testeados se registró un aumento de la resistencia antimicrobiana de las cepas aisladas, incluso aumentos tan dramáticos como en el caso de la ampicilina frente a la cual se reportó una resistencia del 29,6% en el 2000, frente al 79,6% encontrado en el 2005. Este fenómeno se repite frente a gentamicina, oxacilina y tetraciclina.

Lo anterior se reitera en diferentes cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas en otros estudios; por ejemplo, en el caso de gentamicina frente a la que se observa una

disminución de la sensibilidad de 96,3% en 1998 a 84,1% en el 2000 (Cole *et al.*, 1998; Lilenbaum *et al.*, 2000), situación que se repite al comparar los resultados obtenidos por ambos autores para sulfametoxazol-trimetoprim. Cabe destacar que ambos estudios fueron realizados en países distintos.

Por otra parte, en un estudio retrospectivo, realizado en los Estados Unidos, se concluyó que durante un periodo de 6 años (1992-1997) no existieron diferencias significativas en la susceptibilidad de cepas de *S. intermedius* aisladas desde oídos de perros frente a cefalotina, eritromicina, gentamicina, oxacilina, sulfametoxazol-trimetoprim, clindamicina y ciprofloxacino; es más, encontraron un aumento en la sensibilidad frente a ampicilina, penicilina y tetraciclina, lo que justifican por la inexistencia de preparaciones óticas locales con estos productos y lo poco frecuente del tratamiento de otitis con estos mismos antibióticos de forma sistémica (Petersen *et al.*, 2002).

Aún así con respecto a *S. intermedius* y su comportamiento frente a los antimicrobianos, Werckenthin *et al.* (2001) concluyen que es frecuente la resistencia a penicilina y tetraciclina, situación que va en aumento en las cepas aisladas de caninos de diferentes orígenes geográficos, mientras que la resistencia a otros antibióticos, particularmente a agentes más recientes como las fluoroquinolonas, es aun baja. Incluso en literatura más actual se describe una cierta “estabilidad” de los perfiles de resistencia, al punto de no indicarse el empleo regular del antibiograma (Petersen *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 2006). Lo anterior concuerda con lo publicado por dos estudios italianos en los que se describe una alta sensibilidad de cepas de *S. intermedius* frente a fluoroquinolonas; en ambos estudios se reporta sensibilidades de sobre el 98% frente a enrofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, marbofloxacino y norfloxacino entre otras fluoroquinolonas (Intorre *et al.*, 2007; Vanni *et al.*, 2009). En todo caso, cabe destacar que la resistencia es un fenómeno geográfico por lo que es esperable encontrar diferencias en las susceptibilidades de cepas de diferentes países (van Duijkeren *et al.*, 2004; Loeffler *et al.*, 2007).

En Chile, en un estudio de servicios microbiológicos, realizado a 218 casos de otitis canina, un 52,8% de las muestras fueron identificadas como *S. aureus*, los que fueron resistentes a ampicilina (56,5%), a cloxacilina (2,7%) y a enrofloxacino (0,9%). Por otra parte el 11% de las muestras fueron identificados como *Staphylococcus* spp., de los cuales 29,4% mostraron resistencia a ampicilina y todos fueron sensibles a cloxacilina, cefradina y enrofloxacino. Se concluye en dicho estudio que los principales microorganismos causales de otitis en perros son bacterias Gram-positivas con alta sensibilidad frente a cloxacilina (Sánchez *et al.*, 2006).

Principales Mecanismos de Resistencia

La resistencia a los antibióticos del grupo de los beta-lactámicos está principalmente mediada por enzimas del tipo beta-lactamasas, codificadas por el gen *blaZ*, que hidrolizan estos antibióticos (Malik *et al.*, 2007). Otros mecanismos involucran mutación de las proteínas *penicillin binding proteins* (PBP), adquisición de genes que codifican PBPs de afinidad reducida a beta-lactámicos y baja internación del antibiótico por alteración de la membrana en bacterias Gram-negativas (Schwarz y Noble, 1999). La resistencia intrínseca a penicilinas causada por la producción de beta-lactamasas, esta ampliamente diseminada entre los *Staphylococcus* aislados desde caninos (Malik *et al.*, 2005).

Una gran variedad de genes que codifican factores de resistencia frente a aminoglucósidos han sido descritos en *Staphylococcus* (Malik *et al.*, 2005). La resistencia frente a aminoglucósidos, como la kanamicina, esta basada principalmente en la disminución de la absorción así como en la inactivación enzimática de estos antibióticos por enzimas modificadoras de aminoglucósidos. También ha sido descrita una mutación cromosomal que confiere altos niveles de resistencia frente a estreptomycin (Schwarz y Noble, 1999).

Los mecanismos de resistencia de bacterias Gram-positivas contra lincosamidas, grupo dentro del cual se incluye a la clindamicina, incluyen inactivación enzimática,

bombas de eflujo activo y modificación de diana (*target modification*); dentro de este último mecanismo se describe una clase de genes, denominados *ermA*, exclusivamente detectados en bacterias del género *Staphylococcus* (Schwarz y Noble, 1999).

La resistencia a fluoroquinolonas, como enrofloxacino, en bacterias Gram-positivas se debe a cambios en la composición aminoacídica particularmente en la región determinante de resistencia a quinolonas (*quinolone-resistance-determining region* QRDR) que incluye los genes *GyrA* y *ParC* (Intorre *et al.*, 2007). Debido a estas mutaciones, se genera una DNA girasa y una DNA topoisomerasa IV menos susceptibles a las fluoroquinolonas (Lloyd *et al.*, 1999; Intorre *et al.*, 2007). Aunque la resistencia a fluoroquinolonas ha sido bien estudiada en medicina humana, existe poca investigación en aislados de animales de compañía (Malik *et al.*, 2005).

Existen tres mecanismos específicos a través de los cuales las tetraciclinas, grupo dentro del cual se considera a la doxiciclina y la tetraciclina, adquieren resistencia: bombas de eflujo, protección enzimática e inactivación enzimática del antibiótico (Schwarz y Noble, 1999). En *Staphylococcus* de origen animal se han detectado cuatro diferentes genes de resistencia a tetraciclinas llamados genes *tet*; asignados a las clases K, L, M y O (Malik *et al.*, 2005).

La mupirocina es un tipo de penicilina denominada anti-estafilocócica, frente a la cual existe resistencia de las bacterias Gram-negativas y la mayoría de las otras bacterias aerobias y anaerobias (Schwarz y Noble, 1999). Actúa inhibiendo la isoleucil-tRNA sintetasa, lo que finalmente se traduce en alteración en la producción proteica de la bacteria (Malik *et al.*, 2005).

Las Sulfonamidas y el trimetoprim bloquean diferentes pasos enzimáticos en la biosíntesis de tetrahidrofolato de los ácidos nucleicos. Las sulfonamidas son análogos estructurales del ácido *p*-aminobenzoico e inhiben competitivamente la enzima ácido dihidropterico sintetasa, mientras el trimetoprim inhibe competitivamente la enzima dihidrofolato reductasa (Schwarz y Noble, 1999). La resistencia a sulfonamidas se cree que emana de la sobre producción de ácido *p*-aminobenzoico, probablemente debido a

una mutación cromosomal del DNA (Werckenthin *et al.*, 2001). La resistencia al trimetoprim se debe a dihidrofolato reductasas que tienen baja afinidad por el trimetoprim. (Malik *et al.*, 2005). Los mecanismos de resistencia de sulfonamidas y trimetoprim no han sido específicamente estudiados en aislados de perros, pero en humanos han sido identificados genes que codifican para dihidrofolato reductasa (Malik *et al.*, 2005).

Uno de los fenómenos de resistencia más graves y documentados en cepas de *Staphylococcus* spp., es la resistencia a meticilina. Esta condición, representada generalmente a través de la resistencia a oxacilina (CLSI, 2006), esta relacionada con la producción de una *Penicillin Binding Protein* modificada (PBP2A) que es codificada por el gen *mecA* (Malik *et al.*, 2005). Esta proteína le confiere resistencia a todos los betalactámicos, las cefalosporinas, las carbapenemas y los monobactámicos (Schwartz y Noble, 1999; Griffeth *et al.*, 2008). En medicina humana existe una prevalencia cada vez mayor de resistencia a meticilina, especialmente en *S. aureus* (Duquette y Nutall, 2004; Malik *et al.*, 2005). También existen reportes de resistencia a meticilina en cepas aisladas desde caninos y felinos, tanto de *S. aureus* como *S. intermedius* (van Duijkeren *et al.*, 2004; Bemis *et al.*, 2006; Loeffler *et al.*, 2007; Griffeth *et al.*, 2008), incluso se informan reportes de portadores caninos asintomáticos de *S. aureus* meticilino resistentes (Manian, 2003).

El desarrollo de resistencia antimicrobiana en gérmenes que afectan a animales de compañía adquiere mayor relevancia al considerar estudios que proponen el contagio de bacterias entre perros y seres humanos por simple contacto. Es así como en un estudio de Tanner *et al.* (2000) concluyeron que *S. intermedius* puede ser un patógeno zoonótico importante en humanos que se encuentran en estrecho contacto con sus mascotas al aislar una cepa de esta especie desde una otitis externa en una persona y luego aislando la misma cepa desde el oído de su perro. Otra publicación realizada por Manian (2003), señala el aislamiento de cepas de *S. aureus* desde heridas de dos personas y desde su mascota, en esta última, como portadora asintomática de la bacteria en su nariz, demostrando que se trataba de la misma bacteria a través del uso de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE). A su vez en un estudio de Weese *et*

al. (2006) se sospechó del traspaso de *S. aureus* meticilino resistentes, a pesar de no estar claro si ello ocurre desde perros a seres humanos o viceversa.

Por lo expuesto, es que parece indispensable profundizar los estudios nacionales existentes sobre el comportamiento de diferentes cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas desde pacientes caninos, en este caso sobre pacientes que cursen con otitis externas, con el fin de tomar adecuadas decisiones terapéuticas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Cuantificar la resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivos aislados de perros con otitis externa.

Objetivos Específicos

1.- Realizar una búsqueda activa de *Staphylococcus* coagulasa positivos desde perros que presenten otitis externa.

2.- Cuantificar la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas aisladas frente a un panel de antimicrobianos.

3.- Establecer los perfiles de resistencia de las cepas aisladas frente a los antimicrobianos en estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal con pacientes caninos atendidos en los centros de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile: Hospitales Clínicos Veterinarios (sedes Facultad y Bilbao) y Centro de Atención Primaria Veterinaria El Roble, La Pintana.

Se ingresaron 103 muestras que fueron obtenidas desde pacientes con otitis externa y que se procesaron desde Abril del 2007 hasta Abril del 2009.

Para ingresar al estudio los pacientes no debían haber recibido terapia con antibióticos sistémicos y/o tópicos por al menos 14 días previos. Tampoco debieron estar bajo tratamiento con corticoides tópicos ni orales por al menos 4 semanas previas a la toma de muestras.

A su vez, para ingresar al estudio, los pacientes caninos de cualquier edad, sexo y raza debieron presentar signos compatibles con otitis externa tales como inflamación del pabellón auricular externo, prurito de las orejas, eritema, costras, secreción y olor rancio. Para ser incluidos, los pacientes debieron mostrar al menos 3 de los signos anteriormente mencionados en uno o ambos oídos. A todos los pacientes que presentaron la signología anteriormente señalada se les realizó un examen citológico con el fin de confirmar la presencia de bacterias tipo cocáceas y así ingresar al estudio. Se comenzó por una limpieza del pabellón externo con apósitos y solución salina estéril, para luego realizar un hisopado del conducto. Con este hisopado se realizó una impronta en portaobjeto, el cual fue teñido mediante una tinción Diff-Quick[®] (metanol, eosina y azul de metileno). Todo paciente que mostró más de 5 bacterias por campo microscópico (1000X) con morfología sospechosa de *Staphylococcus* (cocáceas) fue ingresado al estudio. Posterior a su observación, todas las muestras fueron desechadas en una mezcla sulfocrómica y luego autoclavadas.

Para tomar las muestras que fueron enviadas al Laboratorio de Microbiología Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile,

se introdujo al conducto auditivo una tórula estéril seca, que se mantuvo en medio de transporte Stuart y a temperatura de refrigeración por un máximo de 24 horas antes de su procesamiento en dicho laboratorio.

Aislamiento e identificación de las cepas

Las tórulas fueron sembradas en placas de agar sangre por diseminación o agotamiento, mediante el método del reloj. Se incubaron a 37° C por 24 a 48 hrs. De las colonias desarrolladas se realizó el estudio de la forma, tamaño, presencia de endopigmentos y hemólisis. Se seleccionaron aquellas colonias sospechosas de ser estafilococos y se procedió a realizar la tinción de Gram. Se replicaron las cepas en otra placa de agar sangre para obtener, a las 24 hrs., las cepas en estado de pureza para posteriormente realizar las pruebas de la catalasa y coagulasa. Las cepas positivas a estas pruebas se mantuvieron en un cepario en agar semitendido para realizar, posteriormente, la identificación de especie utilizando un kit diagnóstico comercial (BBLCrystal™ Gram Positiv Identification Systems) siguiendo las indicaciones del proveedor y los estudios de sensibilidad antimicrobiana.

Prueba de la catalasa: Se vierte 1 ml. de agua oxigenada de 10 volúmenes diluida en 3 volúmenes de agua destilada sobre un cultivo de la cepa en agar común de 24 horas de incubación a 37° C. La prueba se considera positiva cuando se observan burbujas en el tubo por desprendimiento de oxígeno libre demostrando la producción de la enzima.

Prueba de la coagulasa: En un tubo pequeño se mezclaron cantidades iguales (0,5 ml) de cultivo fresco en caldo común del estafilococo a identificar y plasma diluido de conejo (1:5 vol/vol). Se incubó a 37° C y se observó cada 30 minutos hasta un máximo de 24 horas. La coagulación del plasma indica la producción de la enzima coagulasa. Se dejó un tubo sin cultivo como control de la prueba, el que contenía plasma más caldo común estéril.

Identificación con sistema comercial: BBLCrystal™ Gram Positiv Identification Systems es una placa que contiene 29 pocillos con sustratos deshidratados y un pocillo con un control positivo de fluorescencia. Los pocillos se rehidrataron con un medio líquido con la bacteria en estado puro y luego se incubaron a 37°C. por un período de 18 a 24 hrs. Posteriormente se revisaron en cada pocillo cambios de color o presencia de fluorescencia. El patrón resultante de las 29 reacciones se convierte en un número de diez dígitos que es usado como la base para la identificación al ingresarlos a la base de datos del sistema (BBLCrystal GP ID data base). La identificación es derivada de un análisis comparativo de los patrones de reacción insertos en la base de datos. Se seleccionaron cepas con más de un 95% de certeza en su identificación.

Luego de la identificación, todos los elementos utilizados fueron autoclavados para ser posteriormente eliminados.

Pruebas de Susceptibilidad antimicrobiana

A todas las cepas bacterianas seleccionadas se les determinó su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mediante el método estandarizado por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006), el que considera como CMI la concentración más baja de un agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento de un microorganismo.

Los antimicrobianos utilizados fueron los siguientes: oxacilina (representa resistencia a meticilina), enrofloxacino, amoxicilina, mupirocina, clindamicina, cefradina, doxiciclina, kanamicina, tetraciclina y sulfametoxazol-trimetoprim. Todos estos productos fueron de marca Sigma® (Sigma Chemical Co., St. Louis).

En resumen la prueba consistió en cultivar cada cepa aislada en un caldo común, a 37°C por 24 hrs. El caldo se ajustó a una turbidez de 0,5 McFarland, para luego suspenderse 1:9 en solución salina (lo que resulta en una solución con una

concentración de aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^7$ UFC/ml.); esta se llevó al replicador de Steer que inoculó la cepa bacteriana en las placas con agar Muller-Hinton que contenían los antibióticos en las diversas concentraciones deseadas, desde 0,25 a 128 $\mu\text{g/ml}$ para la mayoría de los antibióticos con la excepción de mupirocina y sulfametoxazol-trimetoprim, para los que se utilizaron 0,5 a 256 $\mu\text{g/ml}$ y 2,37/0,25 a 304/16 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. La determinación de resistencia o sensibilidad se realizó comparando la mínima concentración que detuvo el crecimiento con tablas del CLSI. La cepa control empleada fue *S. aureus* ATCC 29213.

Los resultados se expresaron como porcentaje de cepas sensibles y resistentes, considerando a las de sensibilidad intermedia dentro del grupo de cepas resistentes, con el fin de elaborar los perfiles de resistencia de las cepas aisladas.

Para cada especie bacteriana, con los valores de sensibilidad obtenidos para cada antibiótico, se calculó los valores de CIM 50 y CIM 90 que corresponden a las concentraciones mínimas inhibitorias capaz de inhibir el crecimiento del 50 y 90% de los aislamientos, respectivamente, con el fin de establecer un *ranking* de los antimicrobianos estudiados.

RESULTADOS

De 103 muestras de pacientes caninos con signología clínica de otitis externa se aislaron 53 cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivo lo que representa una frecuencia de aislamiento de 51,5%.

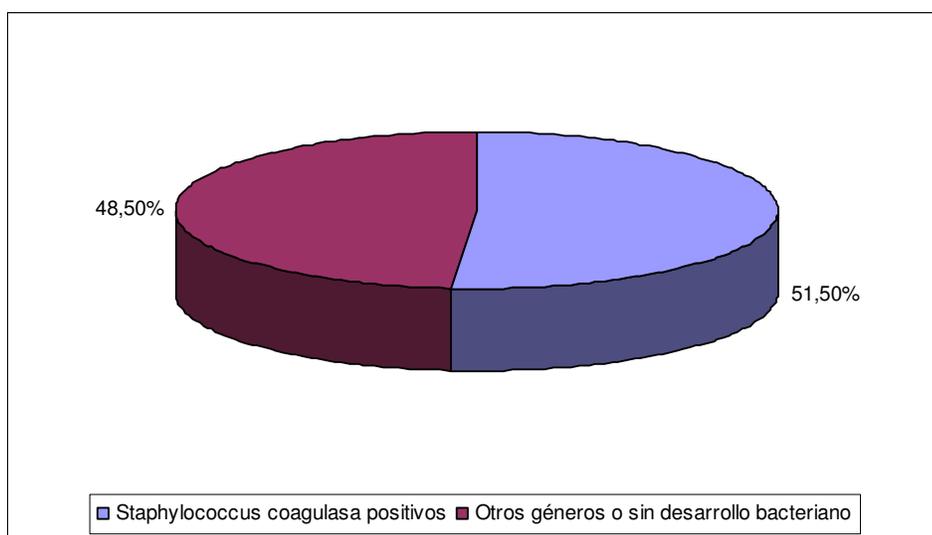


Figura 1: Frecuencia de aislamiento de cepas de SCP de perros con otitis externa.

De las 53 cepas, 39 correspondieron a la especie *Staphylococcus intermedius*, lo que representa un 73,6% de las cepas aisladas. Doce cepas fueron identificadas como *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, representando un 22,6% de las cepas. Dos cepas correspondieron a la especie *Staphylococcus aureus*, lo que significó un 3,8% de las cepas.

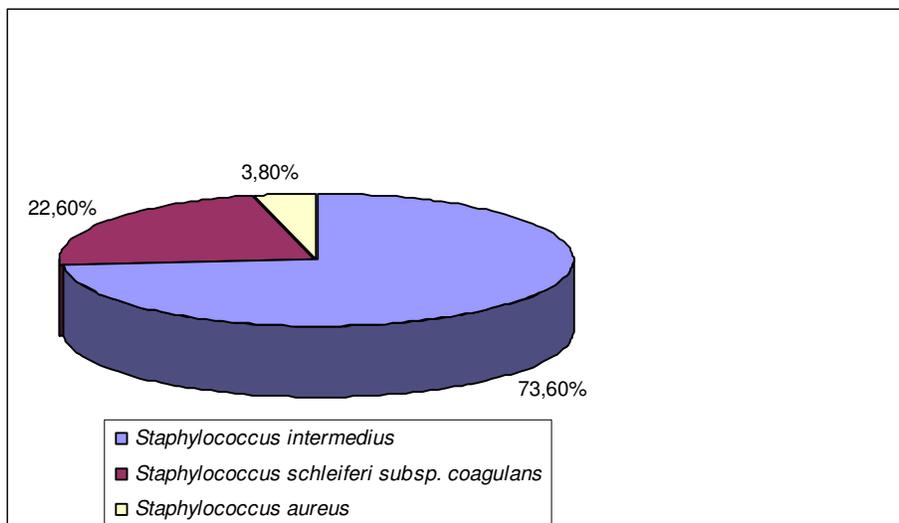


Figura 2: Porcentajes de cepas de SCP perros con otitis externa.

Los resultados de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias se presentan en la Tabla 1. La resistencia fue un fenómeno común, encontrándose 31 cepas que fueron resistentes al menos a un antibiótico (58,5%). El fenómeno de multiresistencia (resistencia a tres o más antimicrobianos) se presentó en 16 cepas (30,2%), no encontrándose ninguna cepa resistente a todos los antibióticos en estudio.

Antibiótico	Especie	Resistencia (%)	Distribución (%) de las CMI (ug/ml)										
			≤0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥256
Kanamicina	<i>S. intermedius</i>	30,8			28,2	41						2,6	28,2
	<i>S. schleiferi</i>	16,7		25	16,7	41,7					8,3	8,3	
	<i>S. aureus</i>	100											100
Doxiciclina	<i>S. intermedius</i>	15,4	25,6	59					15,4				
	<i>S. schleiferi</i>	0	58,3	25	8,3		8,3						
	<i>S. aureus</i>	50		50					50				
Clindamicina	<i>S. intermedius</i>	28,2	71,8				7,7	2,6			2,6	15,4	
	<i>S. schleiferi</i>	25	75		8,3		8,3					8,3	
	<i>S. aureus</i>	100									50	50	
Amoxicilina	<i>S. intermedius</i>	53,8	46,2	23,1	12,8	7,7	2,6		2,6	2,6	2,6		
	<i>S. schleiferi</i>	16,7	83,3	8,3								8,3	
	<i>S. aureus</i>	100									50	50	
Enrofloxacino	<i>S. intermedius</i>	18	48,7	20,5	12,8			2,6	2,6	12,8			
	<i>S. schleiferi</i>	8,3	83,3	8,3						8,3			
	<i>S. aureus</i>	100								100			
Tetraciclina	<i>S. intermedius</i>	12,8	35,9	48,7			2,6				5,1	7,7	
	<i>S. schleiferi</i>	0	25	75									
	<i>S. aureus</i>	50		50								50	
Oxacilina	<i>S. intermedius</i>	0	69,2	25,6	2,6	2,6							
	<i>S. schleiferi</i>	0	50	50									
	<i>S. aureus</i>	0			100								
Cefradina	<i>S. intermedius</i>	2,8		2,8	38,9	50	5,5			2,8			
	<i>S. schleiferi</i>	0			33,3	66,7							
	<i>S. aureus</i>	100							50		50		
Mupirocina	<i>S. intermedius</i>	0		100									
	<i>S. schleiferi</i>	16,7		83,3									16,7
	<i>S. aureus</i>	0		100									
Sulfa/Trim ^a	<i>S. intermedius</i>	11,1	86,2			2,8		8,3	2,8				
	<i>S. schleiferi</i>	16,7	83,3					16,7					
	<i>S. aureus</i>	50				50		50					

Tabla 1: Porcentajes de resistencia y distribución de las CMI según especie bacteriana y antimicrobiano estudiado en cepas de SCP aisladas de perros con otitis externa.

^a Concentración de Trimetoprim, que se evaluó en una concentración de 1/20 (Trimetoprim/Sulfametoxazol).

El antimicrobiano menos efectivo en este estudio fue la amoxicilina, encontrándose 25 cepas resistentes lo que representa el 47,2% de las cepas en estudio. A su vez se encontró altos niveles de resistencia a kanamicina y clindamicina frente a las que se observó 16 cepas resistentes lo que significa un 30,2% de resistencia. Frente a enrofloxacino se encontró una resistencia del 18,9%, frente a sulfametoxazol con trimetoprim 13,6%, frente a doxiciclina 13,2%, frente a tetraciclina 11,3% y frente a

cefradina 6,8%. Los antimicrobianos más eficientes frente a las cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas fueron mupirocina, con un porcentaje de resistencia de 2,3% y la oxacilina frente a la que no se encontró cepas resistentes. Los porcentajes de resistencia de todas las cepas y según especie bacteriana se presentan en la Figura 3 A y B.

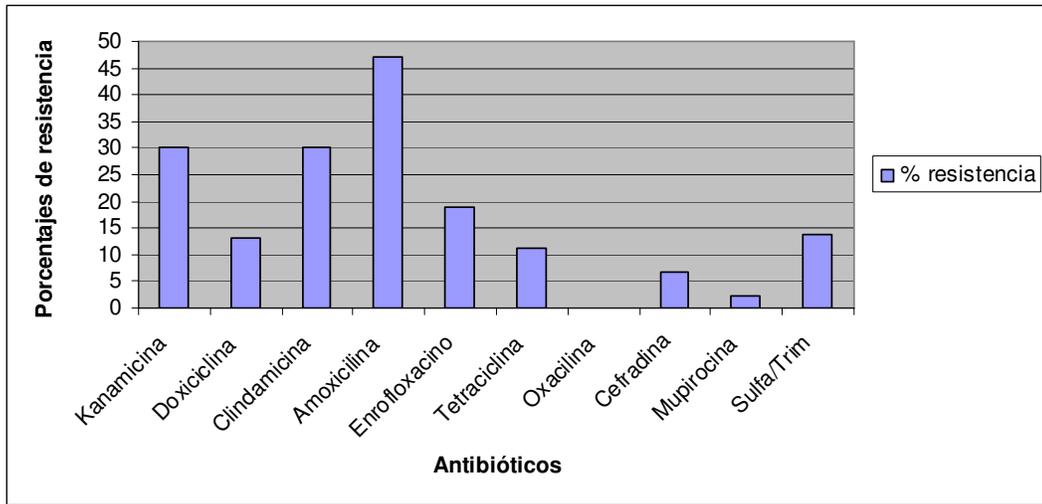


Figura 3 A: Porcentajes de resistencia en cepas aisladas de perros con otitis externa.

3 A:

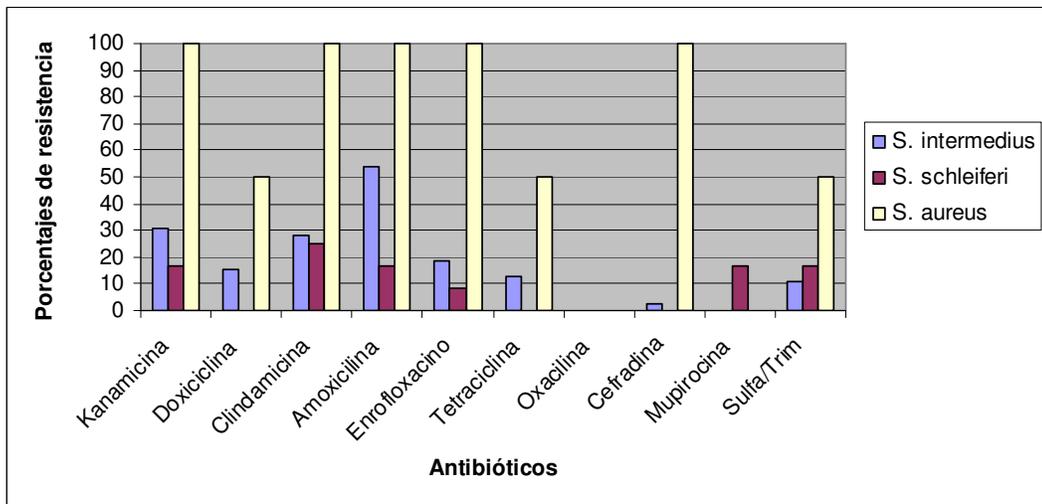


Figura 3 B: Porcentajes de resistencia en cepas aisladas de perros con otitis externa según especie bacteriana.

3 B:

De las 39 cepas de *S. intermedius* aisladas, 24 mostraron resistencia al menos a un antimicrobiano en estudio (61,5%), siendo la amoxicilina el menos efectivo (53,9% resistencia) y la mupirocina y oxacilina los más eficaces (0% resistencia). A su vez, fue frecuente la resistencia frente a kanamicina, clindamicina, enrofloxacino, doxiciclina, tetraciclina y sulfa-trimetoprim (30,8%, 28,2%, 18%, 15,4%, 12,8% y 11,1% respectivamente). Frente a cefradina se encontró un 2,8% de resistencia. Trece cepas fueron resistentes a tres o más antimicrobianos (33,3%). Los valores de CMI 50 y 90 se presentan en la Tabla 2.

Antibiótico	CIM 50	CIM 90
	ug/ml	ug/ml
Kanamicina	2	128
Doxiciclina	0,5	8
Clindamicina	0,25	128
Amoxicilina	0,5	2
Enrofloxacino	0,5	32
Tetraciclina	0,5	64
Oxacilina	0,25	0,5
Cefradina	2	2
Mupirocina	0,5	0,5
Sulfa/Trim	2,37/0,125	38/2

Tabla 2: CMI 50 y 90 de *S. intermedius* aislados de perros con otitis externa.

La resistencia fue un fenómeno menos frecuente de encontrar en las 12 cepas de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* aisladas en este estudio. Cinco cepas mostraron resistencia al menos a 1 antimicrobiano (41,7%), siendo clindamicina el antibiótico menos efectivo (25% resistencia) y doxiciclina, tetraciclina, cefradina y oxacilina los más eficaces puesto que no hubo cepas resistentes a estos antibióticos. Frente a kanamicina, amoxicilina, mupirocina y sulfametoxazol-trimetropim 16,6% de las cepas fueron resistentes, mientras que 8,3% de las cepas fueron resistentes a enrofloxacino. Los valores de CMI 50 y 90 se muestran en la Tabla 3.

Antibiótico	CIM 50	CIM 90
	ug/ml	ug/ml
Kanamicina	2	32
Doxiciclina	0,25	1
Clindamicina	0,25	4
Amoxicilina	0,25	0,5
Enrofloxacino	0,25	0,5
Tetraciclina	0,5	0,5
Oxacilina	0,25	0,5
Cefradina	2	2
Mupirocina	0,5	0,5
Sulfa/Trim	2,37/0,125	2,37/0,125

Tabla 3: CMI 50 y 90 de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* aislados desde perros con otitis externa.

De las dos cepas de *S. aureus* aisladas, ambas fueron multiresistentes, pero sensibles a oxacilina y mupirocina. Una mostró resistencia a amoxicilina, kanamicina, clindamicina, enrofloxacino, cefradina y sulfa-trimetoprim y la otra presentó resistencia a las mismas drogas, excepto sulfa-trimetoprim, y adicionalmente presentó resistencia a doxiciclina y tetraciclina. Dado el pequeño número de cepas aisladas no fue posible determinar la CMI 50 y 90 de las cepas de *S. aureus*.

En el presente estudio se encontró 20 perfiles de resistencia en las 53 cepas aisladas. Los perfiles de resistencia de todas las cepas aisladas en este estudio se presentan en la Tabla 4.

Número de cepas	Porcentaje	Perfil de Resistencia	<i>S. intermedius</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. aureus</i>
22	41,51	Sensibles a todos los antibióticos	15	7	
10	18,87	Am	9	1	
1	1,89	En	1		
1	1,89	S/T		1	
1	1,89	Cl		1	
2	3,77	Ka+Cl	1	1	
1	1,89	Am+Ka+En	1		
2	3,77	Am+Ka+Cl	2		
1	1,89	Am+Do+Te+S/T	1		
1	1,89	Ka+Do+Cl+Te	1		
1	1,89	Am+Do+Cl+Te	1		
1	1,89	Am+Ka+Do+Te	1		
2	3,77	Am+Ka+Cl+En	2		
1	1,89	Am+Ka+Cl+En+Mu		1	
1	1,89	Am+Ka+Cl+En+Ce	1		
1	1,89	Am+Ka+Cl+En+S/T	1		
1	1,89	Am+Ka+Cl+En+S/T+Ce			1
1	1,89	Am+Ka+Do+Cl+Te+S/T	1		
1	1,89	Am+Ka+Do+Cl+En+Te+S/T	1		
1	1,89	Am+Ka+Do+Cl+En+Te+Ce			1

Tabla 4: Perfiles de resistencia de todas las cepas aisladas de perros con otitis externa. Am: Amoxicilina; Ka: Kanamicina; Do: Doxiciclina; Cl: Clindamicina; En: Enrofloxacino; Te: Tetraciclina; S/T: Sulfametoxazol/Trimetoprim; Ce: Cefradina; Mu: Mupirocina.

DISCUSION

Frecuencias de aislamiento

Este estudio evidencia la presencia de cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivos (SCP) en perros con otitis externa debido al aislamiento de 53 cepas desde 103 muestras de secreción ótica. Históricamente los *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) han sido considerados como de baja patogenicidad, sin embargo, estudios recientes han demostrado el potencial patógeno de estas especies en humanos y perros (Griffeth *et al.*, 2008), por lo que son necesarios estudios que comprueben este fenómeno tanto en medicina humana como veterinaria. En la literatura se reportan diferentes frecuencias de aislamiento de *Staphylococcus* spp. desde casos de otitis externas caninas, es así como Colombini *et al.*, en el 2000 encontraron que un 54,2% de los aislados correspondieron a *Staphylococcus* (41,1% SCP); Yamashita *et al.*, (2005) reportaron una frecuencia de aislamiento de 48,3%; Oliveira *et al.* (2005) 53% (40,9% SCP) y Fernández *et al.*, también en el 2005 demostraron un 31,9% de positividad para este género. En el presente estudio el porcentaje de aislamiento fue de un 51,4%. Estas diferencias se pueden deber a diferentes factores como el número de casos analizados, los criterios de inclusión de los pacientes, las diferentes zonas geográficas, etc.

La especie aislada con mayor frecuencia en el presente trabajo fue *Staphylococcus intermedius* (73,6%) lo que concuerda con diversos estudios realizados anteriormente como el de Colombini *et al.* en el 2000 quienes encontraron que el 75,9% de los SCP correspondían a esta especie, Hoekstra y Paulton (2002) lo encontraron en un 60,9% y Yamashita *et al.*, (2005) lo encontraron en un 57,4%. Estos resultados difieren con lo descrito por Lilenbaum *et al.* (2000), quienes señalaron que la especie de SCP más frecuente en casos clínicos de otitis externa correspondieron a *S. aureus* (64,7%).

Un pequeño porcentaje de las cepas del presente estudio correspondió a *Staphylococcus aureus* (3,8%), que generalmente se aísla en bajo porcentaje (Yamashita *et al.*, 2004; Duquette y Nuttall, 2004; Morris *et al.*, 2006), a pesar que existen estudios

que lo reportan en mayor frecuencia (Lilenbaum *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2006). Esto se puede deber a diferencias en la identificación de las especies, ya que *S. aureus* es frecuentemente confundido con otros SCP (Medleau *et al.*, 1986; Frank *et al.*, 2003; Zdovc *et al.*, 2004), de hecho en la revisión de Sánchez *et al.* (2006) de 218 aislamientos de casos de otitis durante el periodo de 1995 y 2002 es la única especie de SCP identificada.

El resto de las cepas del presente estudio (22,6%) correspondió a la especie *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, convirtiéndose este en el primer estudio que lo reporta como patógeno presente en casos clínicos de otitis externa a nivel nacional, lo que no significa que no existiera con anterioridad, sino que probablemente ha sido mal identificado por su parecido fenotípico con *S. aureus* y *S. intermedius* tal como lo señalan Yamashita *et al.* (2005). De hecho es una especie relativamente nueva, descrita en 1990 por Igimi *et al.* y su identificación esta supeditada a métodos que no son convencionales, ya que no se diferencia de otras especies de SCP por sus características físicas y pruebas bioquímicas tradicionales de catalasa y coagulasa (Frank *et al.*, 2003). Puede ser distinguido de otros SCP por su producción de acetoina, producción de beta hemolisina, negativa actividad hialuronidasa y ausencia de producción de ácido desde tetralosa o maltosa (Igimi *et al.*, 1990). Así también, Zdovic *et al.* (2004) la describen como una bacteria que se reporta con baja frecuencia en casos de otitis, sugiriendo que se puede deber a que fenotípicamente es parecido a otras especies de SCP. La importancia clínica del reconocimiento de esta especie tanto en medicina humana como veterinaria está creciendo (Yamashita *et al.*, 2005).

Con los antecedentes de las fichas clínicas de los pacientes en estudio desde los cuales se aisló *S. schleiferi* subsp. *coagulans* se logró determinar que todos ellos presentaban otitis crónica, por lo que presumiblemente habían sido tratados con antibióticos en alguna oportunidad. Al respecto, Frank *et al.* (2003) determinaron que existe mayor probabilidad de aislar esta especie en pacientes que presentan pioderma de forma recurrente y que han sido tratados con antibióticos anteriormente.

Si bien la siembra para aislamiento de *Staphylococcus* spp. fue efectiva para lograr el desarrollo específico; en algunas muestras, los aislamientos se dificultaron por presencia de otras especies microbianas. Se sugiere, por tanto, para evitar dichas dificultades, utilizar medios de cultivo selectivos para *Staphylococcus*, como son el agar sal, agar Chapman, etc.

Susceptibilidad antimicrobiana

En el presente estudio se determinó que un 58,5% de las cepas (31) fueron resistentes al menos a un antimicrobiano, lo que es comparable con el 64,2% reportado por Junco y Barrasa (2002) y con el 59,4% descrito por Yamashita *et al.*, en el 2005, pero difiere del 90,9% reportado por Lilenbaum *et al.*, (2000), con la diferencia que los dos últimos grupos de investigadores consideran también cepas de SCN, confirmando la importancia de vigilar el fenómeno de resistencia también en estas especies. Estos porcentajes de resistencia son bastantes altos considerando estudios de años anteriores que reportaban sensibilidades sobre el 80%, con excepción de ampicilina/amoxicilina que eran de 50% (Werckenthin *et al.*, 2001).

De las 53 cepas aisladas, 16 (30,2%) mostraron resistencia a tres o más antibióticos, porcentaje menor al 37,3% descrito por Tejedor y Barrasa (2000), y superior al 25% y 21,9% descrito por Lilenbaum *et al.* el 2000 y Yamashita *et al.* el 2005, respectivamente.

Amoxicilina

Amoxicilina fue el antimicrobiano frente al cual se presentaron los mayores niveles de resistencia en el presente estudio (47,2%). Esto concuerda con lo publicado en la literatura donde se observa que los niveles más altos de resistencia se dan frente a penicilinas, principalmente ampicilina con valores que van desde 44,8% hasta 79,6% (Cole *et al.*, 1998; Junco y Barrasa, 2002; Petersen *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2005;

Hariharan *et al.*, 2006). En un estudio canadiense realizado por Prescott *et al.* (2002) se logró determinar que durante un periodo de 15 años (1984-1998) había una disminución significativa en la proporción de cepas de *S. aureus* y *S. intermedius* resistentes a penicilina G y a ampicilina, lo que refleja el no uso de esta clase de fármacos frente a estas especies bacterianas en el último tiempo. Este fenómeno se repite al comparar el 56,5% de resistencia a ampicilina en el estudio retrospectivo chileno de Sánchez *et al.* (2006), con el 47,2% obtenido en el presente estudio.

Kanamicina

La resistencia obtenida por el presente estudio frente a kanamicina fue de 30,2%, superando al 26% descrito por Colombini *et al.* (2000) y siendo similar al 29,4% (considerando sólo cepas de SCP) reportado por Yamashita *et al.* (2005). En general el aminoglucósido más utilizado en la literatura para las pruebas de susceptibilidad es gentamicina, que generalmente muestra menores niveles de resistencia que kanamicina, al menos frente a cepas de SCP (Colombini *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 2005), por lo que sería más efectiva frente a casos de otitis externas; de hecho, existen varios preparados comerciales que la contienen. Frente a gentamicina se reportan niveles de resistencia que van desde un 1% a un 4,6% (Werckentin *et al.*, 2001; Junco y Barrasa, 2002; Petersen *et al.*, 2002; Hariharan *et al.*, 2006). En Chile, Sanchez *et al.* (2006), encontraron un 4,6% de cepas de *S. aureus* resistentes a gentamicina. Prescott *et al.* (2002) determinaron, luego de una revisión de 15 años, que la resistencia a gentamicina a través del tiempo, al menos en Canadá, se ha incrementado reflejando el aumento del uso de esta droga en ese país.

Clindamicina

Frente a clindamicina las bacterias aisladas en el presente estudio mostraron una resistencia del 30,2%, lo que es bastante más alto que lo descrito en la literatura en la que se reportan resistencias de 19% (Colombini *et al.*, 2000), 12% (Petersen *et al.*,

2002), 4% (Hariharan *et al.*, 2006) y 20,8% (Griffeth *et al.*, 2008). Por otra parte, Morris *et al.* (2006) reportaron una resistencia del 51%, pero este estudio sólo consideró *Staphylococcus* meticilino resistentes (SMR). Considerando sólo cepas de SMR en el estudio de Griffeth *et al.* (2008) la resistencia es del 60% para clindamicina, por lo que parece ser un fenómeno frecuente la resistencia a esta droga en cepas de SMR. En el estudio retrospectivo de 15 años (1984-1998) de Prescott *et al.* (2002) se reporta que la proporción de *S. aureus* y *S. intermedius* resistentes a clindamicina se ha mantenido estable y no ha cambiado significativamente por lo que concluye el correcto uso de esta droga en dicho período en Canadá.

Enrofloxacino

En el presente estudio se obtuvo una resistencia de 18,9%, lo que concuerda con el 19,4% descrito por Junco y Barrasa (2002), pero en general, al igual que lo ocurrido frente a clindamicina, es bastante más alto que otros reportes existentes en la literatura. En 1998, Cole *et al.* informaron un 3,7% de resistencia, Colombini *et al.* (2000) un 8%, Oliveira *et al.* (2005) reporta un 12,9% de resistencia y Hariharan *et al.* (2006) sólo un 1% de resistencia. En el estudio de Morris *et al.* (2006) encontraron un 64,1% de resistencia frente a enrofloxacino, pero sólo considerando cepas de SMR, por lo que podría existir un fenómeno similar a lo que ocurre con la clindamicina. En el estudio chileno de Sánchez *et al.* (2006) se obtuvo un 0,9% de resistencia en cepas de *S. aureus* aisladas desde casos de otitis en un periodo de 8 años (1995-2002). Resulta preocupante el aumento del porcentaje de resistencia en este estudio, lo que podría indicar un uso incorrecto de este fármaco. Este fenómeno de aumento de resistencia se repite en Canadá, según lo publicado por Prescott *et al.* (2002) quienes demuestran que durante el periodo de 1984 a 1998 la resistencia de *S. intermedius* ha mostrado un marcado incremento.

Doxiciclina

En general en la literatura existe poca información sobre la resistencia frente a doxiciclina de especies de *Staphylococcus spp.* aisladas desde otitis, puesto que no se suele utilizar para el tratamiento de esta patología. En este estudio, se encontró una resistencia de un 13,2% (7 cepas resistentes), poco mayor al 7% encontrado por Hariharan *et al.* (2006), pero menor a lo descrito por Sánchez *et al.* (2006) que reporta un 17,8% de resistencia en cepas de *S. aureus* durante el periodo entre 1995 y 2002. Esta tendencia de declive refleja una aparente disminución en el uso de esta droga.

Tetraciclina

En este trabajo se detectó un 11,3% de resistencia frente a tetraciclina, lo que en general es más bajo que lo reportado en la literatura, salvo por lo publicado por Lilenbaum *et al.* el 2000 (6,8% de resistencia) y por Yamashita *et al.* el 2005 (3,1% de resistencia). Existe publicaciones de resistencias tan altas como 26% (Petersen *et al.*, 2002), 65,5% (Oliveira *et al.*, 2005), 37,2% (Morris *et al.*, 2006) y 31,8% (Griffeth *et al.*, 2008). El estudio local de Sánchez *et al.* (2006) comunica una resistencia de 31,4% frente a tetraciclina de cepas de *S. aureus* por lo que, al igual que con doxiciclina, existe una aparente disminución en el uso de esta droga.

Oxacilina

En este estudio no se encontraron cepas resistentes a oxacilina. En la literatura en general se reportan bajos porcentajes de resistencia como lo descrito por Colombini *et al.* (2000) que encontraron resistencia a oxacilina en el 5% de las cepas aisladas y Griffeth *et al.* (2008) que reportan un 4,2% de SMR. Petersen *et al.* (2002) reportaron sólo un 1% de resistencia a oxacilina. Cabe destacar que en general las cepas que se logran identificar como meticilino resistentes, presentan resistencia a todos los betalactámicos y también a otros antibióticos, lo que concuerda con los altos niveles de

resistencia obtenidos por Morris *et al.* (2006) que determinaron los perfiles de susceptibilidad de 145 cepas de SMR, encontrando sobre un 70% de resistencia frente a clindamicina, eritromicina, enrofloxacino y marbofloxacino.

Cefradina

De las bacterias aisladas en este estudio un 6,8% mostró resistencia frente a cefradina. Existe muy pocos reportes sobre la efectividad de este fármaco frente a *Staphylococcus* spp. aislados desde otitis. Si se compara con reportes de otras cefalosporinas de primera generación el nivel de resistencia encontrado en este trabajo es alto. Así por ejemplo, Colombini *et al.* (2000) y Petersen *et al.* (2002) encontraron resistencias de 2% y 1%, respectivamente frente a cefalotina. Hariharan *et al.* (2006) reportaron un 1% de resistencia frente a cefalexina y Griffeth *et al.* (2008) un 4,2% de resistencia frente a cefazolina. Por otra parte, en Brasil, Oliveira *et al.* (2005) determinaron que un 25,4% de las cepas aisladas fueron resistentes a cefalexina, no encontrando resistencia de las cepas frente a cefalosporinas de segunda y tercera generación (cefotaxima y cefoxitina). Según lo publicado por Prescott *et al.* (2002) durante el período de 1984 a 1998 la resistencia de *S. intermedius* frente a cefalotina ha mostrado un leve incremento, concluyendo un amplio uso de esta droga contra bacterias del género *Staphylococcus*. Esta situación podría ser comparable con el presente estudio que demuestra un 6,8% de resistencia frente a cefradina versus el 2% de resistencia que señalaron Sánchez *et al.* el año 2006.

Mupirocina

En general en la literatura existe poca información sobre el comportamiento de cepas de *Staphylococcus spp.* frente a mupirocina, Loeffler *et al.* en el 2007 no encontraron resistencia frente a este antibiótico al estudiar 12 cepas de SMR, lo que habla de lo escaso que es aún el fenómeno de resistencia frente a este fármaco. Aún así en el presente estudio se encontró una cepa resistente a mupirocina (2,3%).

Sulfametoxazol/Trimetoprim

En el presente estudio se encontró que un 13,6% de las cepas fueron resistentes a sulfametoxazol/trimetoprim, lo que concuerda con el 13% descrito por Colombini *et al.* en 1999 y con el 11,1% publicado por Oliveira *et al.* el 2006. A su vez es menor que el 18 y 17% descrito por Werckenthin *et al.* (2001) y Hariharan *et al.* (2006) respectivamente. En el estudio chileno de Sanchez *et al.* (2006) se describió una resistencia en cepas de *S. aureus* de un 25,3% frente a sulfametoxazol/trimetoprim, bastante más alto al 13,6% obtenido en este estudio. Esta disminución de resistencia se repite en el estudio de Prescott *et al.* el 2002, realizado en el período 1984-1998 en Canadá, aún cuando no fue estadísticamente significativo.

CONCLUSIONES

- Un alto porcentaje de las infecciones bacterianas del conducto auditivo externo de los caninos son producidas por bacterias del género *Staphylococcus* spp., siendo el mayor porcentaje *S. intermedius*.
- El presente trabajo describe por primera vez a nivel nacional la presencia de *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* en casos clínicos de otitis externa en caninos.
- Los altos porcentajes de resistencia encontrados en cepas SCP obliga a basar la selección de antibióticos para estas especies en el estudio de susceptibilidad antimicrobiana.
- Las cepas fueron altamente sensibles a mupirocina y oxacilina, pudiendo ser alternativas para formulaciones para el tratamiento de otitis externas caninas producidas por *Staphylococcus* spp.

BIBLIOGRFÍA

BEMIS, D.; JONES, R.; HIATT, L; OFORI, E.; ROHRBACH, B.; FRANK, L. y KANIA, S. 2006. Comparison of test to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi* and *Staphylococcus aureus* isolates from canine hosts. J. Clin. Microbiol. 44: 3374-3376.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. CLSI, Pennsylvania.

COLE, L.; KWOCKHA, K.; KOWALSKY, J. y HILLIER A. 1998. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media. J. Am. Vet. Med. Assoc. 212: 534-538.

COLOMBINI, S.; MERCHANT, S. y HOSGOOD, G. 2000. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns from dogs with otitis media. Vet Dermatol 11: 235-239.

DUQUETTE, R. y NUTTALL, T. 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? J. Small Anim. Pract. 45: 591-597.

FERNÁNDEZ, G.; BARBOZA, G.; VILLALOBOS, A.; PARRA, O.; FINOL, G. y RAMÍREZ, R. 2006. Isolation and identification of microorganisms present in 53 dogs suffering otitis externa. Rev Cient FCV-LUZ 1: 23-30.

FRANK, L.; KANIA, S.; HNILICA, K.; WILKES, R. y BEMIS, D. 2003. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. J. Am. Vet. Med. Assoc. 222: 451-454.

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

HÁJEK, V. 1976. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. Int. J. Syst. Bact. 26: 401-408.

HARIHARAN, H.; COLES, M.; POOLE, D.; LUND, L. y PAGE, R. 2006. Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. *Can. Vet. J.* 47: 253-255.

HOEKSTRA, K. y PAULTON, R. 2002. Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* in dogs. *J. App. Microbiol.* 93: 406-413.

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

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

JUNCO, T. y BARRASA, M. 2002. Identification and antimicrobial susceptibility of coagulasa positive staphylococci isolated from healthy dogs and dogs suffering from otitis externa. *J. Vet. Med.* 49: 419-423.

KLOOS, W. 1997. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. Citado en: VELÁZQUES-MEZA M. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. *S. Pub. Mex.* 47: 381-387.

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

LOEFFLER, A.; LINEK, M.; MOODLEY, A.; GUARDABASSI, L.; SUNG, J.; WINKLER, M.; WEISS, R. y LLOYD, D. 2007. First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Vet. Dermatol.* 18: 412-421.

LLOYD, D; LAMPORT, A.; NOBLE, W. y HOWELL, S. 1999. Fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus intermedius*. *Vet. Dermatol.* 10: 249-251.

MALIK, S.; PENG, H. y BARTON, M. 2005. Antibiotic resistance in staphylococci associated with cats and dogs. *J. App. Microbiol.* 99: 1283-1293.

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

MANIAN, F. 2003. Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. *Clin Infect. Dis.* 36: 26-28.

MASON, I.; MASON, K. y LLOYD, D. 1996. A review of the biology of canine skin with respect to the commensals *Staphylococcus intermedius*, *Demodex canis* and *Malassezia pachydermatis*. *Vet. Dermatol.* 7: 119-132.

MEDLEAU, L.; LONG, R.; BROWN, J. y MILLER, W. 1986. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from canine pyodermas. *Am. J. Vet. Res.* 47: 229-231.

MORRIS, D.; ROOK, K.; SHOFER, F. y RANKIN S. 2006. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). *Europ. Soc. Vet. Dermatol.* 17: 332-337.

OLIVEIRA, L.; MEDEIROS, C.; SILVA, I.; MONTEIRO, A.; LEITE, C. y CARVALHO, C. 2005. Susceptibilidade e antimicrobianos de bacterias isoladas de otite externa em caes. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57: 405-408.

PETERSEN, A.; WALKER, R.; BOWMAN, M.; SCHOTT, H. y ROSSER, E. 2002. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992-1997). *J. Am Anim Hosp Assoc* 38: 407-413.

PRESCOTT, J.; HANNA, B.; REID-SMITH, R. y DROST, K. 2002. Antimicrobial drug use and resistance in dogs. *Can. Vet. J.* 43: 107-116.

RADLINSKY, M. y MASON, D. 2007. Enfermedades del oído. *In: ETTINGER, S y FELDMAN, E. Tratado de Medicina Interna Veterinaria.* 6° ed. California. Inter-Médica. Pp. 1168-1186.

ROBRICH, P.; LING, G.; RUBY, A.; JANG, S. y JOHNSON, D. 1983. In vitro susceptibilities of canine urinary bacteria to selected antimicrobial agents. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183: 863-867.

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

SÁNCHEZ, M.L.; FELIÚ, C.; BORIE, C. y MORALES, M.A. 2006. Otitis canina e infección urinaria en perros y gatos: microorganismos y sus sensibilidades antimicrobianas. 20º Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Santiago, Chile.

SCOTT, D.; MILLER, W. y GRIFFIN, C. 1995. Diseases of eyelids, claws, anal sacs and ear canals. *In:* Muller y Kirks Small animal dermatology. 5ª ed. Philadelphia. Saunders Company. pp. 970-989.

SHIMIZU, T. y SHIHATA, S 1967. Antibiotic resistance of staphylococci isolated from various animals. Citado en: MALIK, S.; PENG, H. y BARTON, M. 2005. Antibiotic resistance in staphylococci associated with cats and dogs. *J. App. Microbiol.* 99: 1283-1293.

SCHWARTZ, S. y NOBLE, W. 1999. Aspects of bacterial resistance to antimicrobials used in veterinary dermatological practice. *Vet. Dermatol.* 10: 163-176.

SIMOU, C.; HILL, P.; FORSYTHE, P. y THODAY, K. 2005. Species specificity in the adherence of staphylococci to canine and human corneocytes: a preliminary study. *Vet. Dermatol.* 16: 156-161.

TANNER, M.; EVERETT, C. y YOUVAN, D. 2000. Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1628-1631.

THIBAUT, J.; SANTIS, J.; ZAROR, L. y MARTIN, R. 1994. Contribución al estudio de la otitis externa del perro. *Arch. Med. Vet.* 26: 85-95.

TONELLI, E. 2004. Otitis externa. *In:* MUCHA, C.; SORRIBAS, C. y PELLEGRINO, F. Consulta rápida en la clínica diaria. 1º ed. Buenos Aires. Inter-Médica. Pp.188-192.

VAN DUIJKEREN, E.; BOX, A.; HECK, M.; WANNET, W. y FLUIT, A. 2004. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Vet. Microbiol.* 103: 91-97.

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

VELÁZQUEZ-MEZA, M.E. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. S. Pub. Mex. 47: 381-387.

WEESE, J.; DICK, H.; WILLEY, B.; MCGEER, A.; KREISWIRTH, B.; INNIS, B. y LOW, D. 2006. Suspected transmission of meticilin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. Vet. Microbiol. 115: 148-155.

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

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

ZDOVC, I.; OCEPEK, M.; PIRS, T.; KRT, B y PINTER, L. 2004. Microbiological features of *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, isolated from dogs and possible misidentification with other canine coagulase-positive staphylococci. J. Vet. Med. 51: 449-454.