

Primer reporte de aislamiento de *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* en perros con pioderma y otitis externa en Chile[#]

First report of isolation of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* from dogs with pyoderma and external otitis in Chile

L Muñoz^{a*}, M Molina^a, M Heresmann^a, F Abusleme^a, MT Ulloa^b, C Borie^c,
B San Martín^d, V Silva^b, S Anticevic^a

^aClínica de Animales Pequeños, Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^bICBM Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^cLaboratorio de Microbiología, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^dLaboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

SUMMARY

Staphylococcus schleiferi subsp. *coagulans* was identified and described for the first time in 1990 by Igimi *et al* (1990) in dogs with otitis. The objective of this report was to determine the frequency of isolation of *S. schleiferi* subsp. *coagulans* in samples from dogs with pyoderma and / or otitis externa in Chile and establish the resistance profiles to commonly used antimicrobials and molecularly characterize the quinolone resistance. Samples were obtained from 237 adult dogs diagnosed with otitis externa and/or pyoderma, at the Clinical Veterinary Hospital of the University of Chile. The identification of *S. schleiferi* subsp. *coagulans* was performed with BBL™ Crystal GP. The minimum inhibitory concentration was determined using the agar diffusion method. The antimicrobial panel contained oxacillin, amoxicillin, cefradine, mupirocyn, clindamycin, enrofloxacin, doxycycline, tetracycline, kanamycin and sulfamethoxazole / trimethoprim. 135 out of 237 total samples analyzed were isolated from pyoderma and 102 from otitis. *Staphylococcus* spp. was identified on 117 and 52 of the samples, respectively. *S. schleiferi* subsp. *coagulans* was identified on 8 strains isolated from pyoderma (6.8%) and on 11 strains from otitis (21.2%). All strains of *S. schleiferi* subsp. *coagulans* were from pyoderma and 54.5% of the otitis strains were susceptible to the antimicrobial agents. The susceptibility was 90.9% to mupirocyn, enrofloxacin and sulfamethoxazole/trimethoprim; 81.8% to amoxicillin and kanamycin and 72.3% to clindamycin. One strain isolated from otitis was multi-resistant. The strain of *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* that showed phenotypic resistance to quinolones reported mutations in genes *gyrA* and *grrA*.

Palabras clave: *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, resistencia antimicrobiana, pioderma, otitis.

Key words: *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, antimicrobial resistance, quinolones pyoderma, otitis.

INTRODUCCIÓN

El género *Staphylococcus* está compuesto por diversas especies, que varían en su prevalencia y relevancia clínica. *Staphylococcus schleiferi* subespecie *schleiferi* (coagulasa negativo) fue aislado por primera vez a partir de humanos en 1988 (Freney y col, 1988) y *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* (coagulasa positivo) fue identificado y descrito por primera vez en 1990 por Igimi y col, en perros con otitis.

Staphylococcus schleiferi subsp. *coagulans* se caracteriza por ser una bacteria coagulasa positiva, beta hemolítico y producir una nucleasa termoestable. Es

semejante a otros *Staphylococcus* coagulasa positivo, por lo tanto, es común identificarlo en forma errónea como *S. aureus* o *S. intermedius* (Igimi y col 1990, Zdovc y col 2004, Morris y col 2006).

S. schleiferi subsp. *coagulans* forma parte de la microbiota cutánea (Frank y col 2003); sin embargo, en determinadas circunstancias es capaz de comportarse como patógeno oportunista en lesiones dérmicas y óticas (Frank y col 2003, Morris y col 2006).

En la literatura existe información diversa con respecto a la frecuencia de aislamiento de este patógeno desde otitis y pioderma; sin embargo, todos coinciden en una mayor prevalencia de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* aislado en casos de otitis externa (May y col 2005, Rich y col 2007, Vanni y col 2009). Los antecedentes respecto a los patrones de resistencia de *S. schleiferi* subsp. *coagulans* a los distintos grupos de antimicrobianos son variados, pero se describe frecuentemente como sensible a los antibióticos utilizados comúnmente para su control (Zdovc y col 2004

Accepted: 19.07.2012.

Financiado por el Proyecto Multidisciplinario de Investigación en Temas de Interés Nacional DI MULT06/03-2 Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo Universidad de Chile.

* Casilla 2 Correo 15 La Granja, Santiago, Chile; lmunoz@uchile.cl

y Vanni y col 2009). Los β -lactámicos como la cloxacilina son antibióticos considerados de primera línea para el tratamiento de estos patógenos, no obstante, existen estudios publicados de meticilino resistencia en estas cepas (Kania y col 2004 y Jones y col 2007). El grupo de antimicrobianos en el que se describe resistencia con mayor frecuencia por parte de *S. schleiferi* subesp. *coagulans* son las quinolonas (enrofloxacino, marbofloxacino y levofloxacino) (Vanni y col 2004, May y col 2005, Morris y col 2006, Intorre y col 2007) mediante mutaciones de la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR *Quinolone Resistance Determining Region*), lo que finalmente lleva a un cambio en la composición aminoacídica de las topoisomerasas II y IV (Otero y col 2001, Intorre y col 2007).

El objetivo de este reporte fue determinar la frecuencia de aislamiento de *S. schleiferi* subesp. *coagulans* en muestras de perros con pioderma y/u otitis externa. Además de establecer los perfiles de resistencia frente a antimicrobianos de uso habitual y caracterización molecular de resistencia a quinolonas, siendo este el primer reporte de *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* en Chile.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo en 237 perros, 135 fueron pacientes con pioderma y 102 con otitis externa, todos atendidos en el Hospital Veterinario de la Universidad de Chile, de abril 2007 a agosto 2008.

Ingresaron al estudio perros de cualquier edad, sexo y raza que presentaron signos compatibles con pioderma y/o otitis externa y a los cuales se les realizó una citología rápida de la lesión, observando más de cinco bacterias con morfología de cocáceas, por campo microscópico de inmersión (Pin y col 2006).

Se excluyeron pacientes con tratamientos antimicrobianos sistémicos y/o tópicos por al menos 14 días previos, o que tenían tratamiento inmunosupresor con esteroides de depósito, orales o tópicos al menos durante cuatro semanas previas.

Las muestras fueron obtenidas con un hisopo estéril humedecido con suero fisiológico estéril, y depositado en medio de transporte Stuart. Las muestras fueron cultivadas en agar sangre cordero al 5% a 37 °C por 24 a 48 horas.

Se seleccionaron 3 a 5 colonias, sospechosas de ser *Staphylococcus* spp., para su posterior identificación. La identificación de *Staphylococcus* coagulasa positivo se realizó en base a la morfología de la colonia, tinción Gram, hemólisis, pruebas de catalasa y coagulasa (Becton Dickinson®).

La identificación de la especie *Staphylococcus schleiferi* subesp. *coagulans* se realizó mediante el kit de diagnóstico BBL™ Crystal GP (Becton Dickinson®), considerando niveles de confianza mayores a 95%.

La concentración mínima inhibitoria (CIM) se determinó mediante el método de dilución en agar estandarizado por el NCCLS (1999), para mupirocina y doxiciclina

se utilizó como referencia lo descrito en el CLSI 2007. Las concentraciones utilizadas fueron 0,25 a 128 $\mu\text{g/ml}$, exceptuando la mupirocina, donde se utilizaron concentraciones de 2,5 a 256 $\mu\text{g/ml}$, y sulfametoxazol-trimetoprim con concentraciones de trimetoprim de 1,125 a 32 $\mu\text{g/ml}$ y sulfametoxazol de 4,75 a 608 $\mu\text{g/ml}$. Se utilizó un panel de antimicrobianos comercial (Sigma® Sigma Chemical Co., St. Louis) y los puntos de corte fueron: para la oxacilina (≤ 2 ; ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$), amoxicilina ($\leq 0,25$; $\geq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$), cefradina (≤ 8 ; ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$), mupirocina (≤ 128 ; ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$), clindamicina ($\leq 0,5$; ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$), enrofloxacino ($\leq 0,5$; ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$), doxiciclina (≤ 4 ; ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$), tetraciclina (≤ 4 ; ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$), kanamicina (≤ 16 ; ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$) y sulfametoxazol-trimetoprim ($\leq 2/38$; $\geq 4/76$ $\mu\text{g/ml}$). Como cepa control se utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La CIM se expresó en valores absolutos ($\mu\text{g/ml}$).

Para realizar el estudio genético de resistencia a quinolonas se realizó una combinación de PCR-Secuenciación del QRDR. Primero se amplificaron los genes *gyrA* y *grrA* y los partidores utilizados fueron obtenidos del estudio de Intorre y col (2007). La mezcla utilizada fue 10 μl de *buffer* 5X, 6 μl de MgCl (25 mM), 1 μl de DNTP (1 mM), 1 μl de cada partidador (20 pmoles), 0,2 μl de Taq polimerasa (5 U/ μl), 3 μl de ADN (extraído con el kit Wizard Purification System®) y 27,8 μl de agua Mq. El programa de amplificación fue un ciclo de 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 30 seg., 56 °C (*gyrA*) y 51 °C (*grrA*) por 30 seg., y 72 °C por 30 seg. y un ciclo de 72 °C por 10 minutos. Los amplicones obtenidos se purificaron con el kit Wizard Clean Up® y se enviaron a secuenciar al laboratorio Biogenetics. Posteriormente, con el programa ClustalW, se alinearon los fragmentos frente a regiones parciales de los genes *gyrA* y *grrA* depositados en el GeneBank (EF189173 / EF189175, respectivamente).

RESULTADOS

De las 135 muestras de pioderma se aislaron 117 cepas de *Staphylococcus* spp, identificándose ocho cepas de *S. schleiferi* subesp. *coagulans* (6,8%). De las 102 muestras de otitis se aislaron 52 cepas de *Staphylococcus* spp., identificándose once cepas de *S. schleiferi* subesp. *coagulans* (21,2%). Las colonias de *S. schleiferi* subesp. *coagulans*, se observaron redondas, convexas, brillantes y lisas, todas con endopigmento blanco y un 72,7% presentaron hemólisis beta (agar sangre cordero al 5%).

De los ocho perros con pioderma por *S. schleiferi* subesp. *coagulans*, seis eran *indoor*, todos presentaban pioderma crónico (curso mayor a tres semanas) y en solo cinco de ellos el pioderma era localizado; las causas primarias fueron tres casos con dermatitis alérgica a la picada de la pulga, dos dermatitis atópica, un pioderma profundo del ovejero alemán y dos sin diagnóstico dermatológico.

De los once perros con otitis, ocho eran *indoor* y ocho presentaban dermatitis atópica como diagnóstico clínico, dos demodicosis y uno hiperadrenocorticismismo.

Cuadro 1. Sensibilidad a antimicrobianos de *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* aislados desde pioderma y otitis externa en perros.

Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* isolated from pyoderma and external otitis in dogs.

Patología	Nº cepas	Sensibilidad (Nº/%)									
		OXA	AMX	CEF	MUP	CLI	ENR	DOX	TET	KAN	SXT
Pioderma	8	8/100	8/100	8/100	8/100	8/100	8/100	8/100	8/100	8/100	8/100
Otitis	11	11/100	9/81,8	11/100	10/90,9	8/72,7	10/90,9	11/100	11/100	9/81,8	10/90,9

OXA, oxacilina; AMX, amoxicilina; CEF, cefradina; MUP, mupirocina; CLI, clindamicina; ENR, enrofloxacino; DOX, doxiciclina; TET, tetraciclina; KAN, kanamicina y SXT, sulfametoxazol/trimetoprim.

Cuadro 2. Perfiles de resistencia de las cepas de *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* obtenidos desde otitis externa de perros.

Resistance profiles of strain of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* obtained from external otitis in dogs.

Perfiles de resistencia	Nº de cepas
AMX	1
SXT	1
CLI	1
CLI + KAN	1
CLI + KAN + AMX + ENR + MUP	1
Total	5

AMX, amoxicilina; SXT, sulfametoxazol/trimetoprim; CLI, clindamicina; KAN, kanamicina; ENR, enrofloxacino y MUP, mupirocina.

El 100% de las cepas de *S. schleiferi* subesp. *coagulans* obtenidas a partir de pioderma y el 54,5% de las otitis, resultaron susceptibles a todos los antimicrobianos en estudio. De las cepas de otitis el 100% fueron susceptibles a oxacilina, cefradina, doxiciclina y tetraciclina; 90,9% fueron susceptibles a mupirocina, enrofloxacino y sulfametoxazol-trimetoprim; 81,8% fueron susceptibles a amoxicilina y kanamicina y el 72,7% fueron susceptibles a clindamicina. Solo una cepa aislada de otitis presentó multirresistencia (cuadros 1 y 2).

A la cepa con resistencia fenotípica a enrofloxacino se le realizó una PCR-Secuenciación para los genes *gyrA* y *glaA*, y se hizo el alineamiento de las cepas frente a *S. schleiferi* subesp. *coagulans*. Se observó mutación en la posición 84 del gen *gyrA* reemplazando una serina (TCG) por una leucina (TTG). El gen *glaA* también presentó mutación, donde se reemplazó en la posición 80 una serina (AGT) por una isoleucina (ATT) (cuadro 3 y figura 1).

Cuadro 3. Genotipo de resistencia a quinolonas en *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans*.

Genotype of resistance of quinolones in *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans*.

Cepa	Especie	Patología	Posición gen <i>gyrA</i>	Posición gen <i>glaA</i>
			84 [TCG (Ser)]	80 [AGT (Ser)]
60	<i>S. schleiferi</i> subesp. <i>coagulans</i>	Otitis	TTG (Leu)	ATT (Iso)

TCG, Serina; TTG, leucina; AGT, serina, y ATT, isoleucina.



Figura 1. Alineamiento de amplicones de QRDR de cepas de *S. schleiferi* subesp. *coagulans*. EF189173 región parcial del gen *gyrA* (ADN girasa); codón 84 TCG se reemplazó por TTG. EF189175 región parcial del gen *glaA* (topoisomerasa IV); codón 80 AGT se reemplazó por ATT.

Alignment of QRDR amplicons of strains of *S. schleiferi* subsp *coagulans*. EF189173 partial region of the gene *gyrA* (DNA gyrase), codon 84 TTG was replaced by TCG. EF189175 partial region of the gene *glaA* (topoisomerase IV), codon 80 AGT was replaced by ATT.

DISCUSIÓN

Este estudio permitió evidenciar por primera vez en Chile el aislamiento e identificación de *S. schleiferi* subesp. *coagulans* a partir de pioderma y otitis externa de perros en un 6,8% y un 21,2%, respectivamente; prevalencias menores comparadas con las indicadas en la literatura (Frank y col 2003, May y col 2005, Morris y col 2006, Jones y col 2007, Foster y Barley 2007, Rich y col 2007, Griffith y col 2008, Penna y col 2009). Al igual que en el estudio de Vanni y col (2009) el *S. schleiferi* subesp. *coagulans* se aisló en un menor porcentaje en piodermas que en otitis de perros. Actualmente ha aumentado la significancia clínica y la frecuencia de aislamientos de *S. schleiferi* subesp. *coagulans* desde otitis externas en perros, por lo que muchos autores sugieren un rol patógeno de la bacteria en este cuadro (Frank y col 2003, May y col 2005, Jones y col 2007), describiendo además un mayor aislamiento de esta bacteria en patologías de curso crónico (Frank y col 2003, Vanni y col 2009).

S. schleiferi subesp. *coagulans* es fenotípicamente muy similar a *S. intermedius*, que es la especie de *Staphylococcus* más comúnmente aislada desde pioderma y otitis en perros, por lo cual es difícil diferenciarlo por sus características macroscópicas y por las reacciones bioquímicas básicas (Frank y col 2003, Zdovc y col 2004), y es por esto que requiere de una batería bioquímica más amplia para una mejor identificación de esta bacteria a nivel de especie. Esto representa una complicación en el área veterinaria, ya que este tipo de pruebas son de un alto costo, por lo que rutinariamente no se realizan y, por lo tanto, se podría estar subestimando su real prevalencia.

En este estudio todas las cepas de *S. schleiferi* subesp. *coagulans* fueron sensibles a meticilina, incluso la cepa que presentó multiresistencia, lo que nos indica que los antimicrobianos de elección (cloxacilina) para el género *Staphylococcus* spp. aún demuestran ser eficaces *in vitro*. Cabe destacar que se encontró resistencia a kanamicina (18,2%) desde las cepas obtenidas de otitis, lo que difiere con otros estudios en que esta especie presenta un 100% de sensibilidad (Zdovc y col 2004, Vanni y col 2009). Este hallazgo es importante de considerar ya que para el tratamiento tópico de otitis existen variados productos comerciales que poseen aminoglucósidos en su formulación. La resistencia a clindamicina fue de un 27,3% del total de cepas aisladas desde otitis; este es un antimicrobiano de uso frecuente para el tratamiento de las infecciones por *Staphylococcus* spp., por lo que debieran monitorearse sus niveles de resistencia, considerando que otros estudios realizados (Vanni y col 2009) presentan un 100% de susceptibilidad frente a este fármaco.

La resistencia a quinolonas es la más descrita en la literatura (Vanni y col 2009), sin embargo, en este estudio se encontró en solo una cepa, aislada de otitis. Esta cepa de *S. schleiferi* subesp. *coagulans* presentó una mutación en ambos genes estudiados coincidiendo con el trabajo

realizado por Descloux y col en 2008. La importancia de este resultado radica en que estos antibióticos debieran utilizarse en casos de bacterias meticilino resistentes, aunque en este estudio estas bacterias aún demostraron ser sensibles a estos antimicrobianos, por lo tanto, en caso de presentarse resistencia a la meticilina, disminuirían las alternativas terapéuticas.

La aplicación de procedimientos diagnósticos es esencial para la correcta identificación de las especies de *Staphylococcus* spp. que afectan a los perros, de esta manera se puede realizar una adecuada vigilancia de la situación epizootiológica y de la resistencia antimicrobiana en cepas que afectan a las mascotas en Chile.

RESUMEN

Staphylococcus schleiferi subesp. *coagulans* fue identificado y descrito por primera vez por Igimi y col (1990) en perros con otitis. El objetivo de este reporte fue determinar la frecuencia de aislamiento de *S. schleiferi* subesp. *coagulans* en muestras de perros con pioderma y/u otitis externa en Chile y establecer los perfiles de resistencia frente a antimicrobianos de uso habitual y caracterizar molecularmente la resistencia a quinolonas. Se obtuvieron muestras de 237 caninos adultos diagnosticados con pioderma y/u otitis externa, en el Hospital Veterinario de la Universidad de Chile. La identificación de *Staphylococcus schleiferi* subesp. *coagulans* se realizó con BBL™ Crystal GP. La concentración mínima inhibitoria se determinó mediante el método de dilución en agar. El panel de antimicrobianos utilizado fue oxacilina, amoxicilina, cefradina, mupirocina, clindamicina, enrofloxacin, doxiciclina, tetraciclina, kanamicina y sulfametoxazol / trimetoprim. De 237 muestras analizadas, 135 fueron aisladas de pioderma y 102 de otitis. *Staphylococcus* spp. se identificó en 117 y 52 de las muestras respectivamente. *S. schleiferi* subesp. *coagulans* se identificó en 8 cepas aisladas desde pioderma (6,8%) y en 11 cepas de otitis (21,2%). Todas las cepas de *S. schleiferi* subesp. *coagulans* de pioderma y el 54,5% de otitis resultaron sensibles a todos los antimicrobianos. La susceptibilidad fue de un 90,9% mupirocina, enrofloxacin y sulfametoxazol/trimetoprim; 81,8% a amoxicilina y kanamicina y el 72,7% a clindamicina. Solo una cepa aislada de otitis presentó multiresistencia. La cepa de *Staphylococcus schleiferi* subesp. *coagulans* que evidenció resistencia fenotípica a quinolonas presentó mutación en los genes *gyrA* y *gla*.

REFERENCIAS

- CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute. 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Vol. 27 N° 1.
- Descloux S, A Rossano, V Perreten. 2008. Characterization of new of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) and topoisomerase genes in fluoroquinolone and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudointermedius*. *J Clin Microbiol* 4, 1818-1823.
- Foster G, J Barley. 2007. *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* in dogs. *Vet Rec* 6, 496.
- Frank LA, SA Kania, KA Hnilica, RP Wilkes, DA Bemis. 2003. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. *J Am Vet Med Assoc* 222, 451-454.
- Freney J, Y Brun, M Bes, H Meugnier, F Grimont, PAD Grimont, C Nervi, J Fleurette. 1988. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* 38, 168-172.
- Griffith GC, DO Morris, JL Abraham, FS Shofer, SC Rankin. 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.

- Igimi S, E Takahashi, T Mitsuoka. 1990. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *Int J Syst Bacteriol* 40, 409-411.
- Intorre L, M Vanni, D Di Bello, C Pretti, V Meucci, R Tognetti, G Soldani, G Cardini, O Jousson. 2007. Antimicrobial susceptibility and mechanism of resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi*. *J Vet Pharmacol Ther* 30, 464-469.
- Jones R, S Kania, B Rohrbach, L Frank, D Bemis. 2007. Prevalence of oxacilin and multi drug-resistant Staphylococci in clinical example from dog:1772 samples (2001-2005). *J Am Vet Med Assoc* 230, 221-227.
- Kania SA, NL Williamson, LA Frank, RP Wilkes, RD Jones, DA Bemis. 2004. Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. *Am J Vet Res* 65, 1265-1268.
- May ER, KA Hnilica, LA Frank, RD Jones, DA Bemis. 2005. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma, or both. *J Am Vet Med Assoc* 227, 928-931.
- Morris DO, KA Rook, FS Shofer, SC Rankin. 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). *Vet Dermatol* 17, 332-337.
- NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. Informational supplement. NCCLS Approved standard M31-A2, Wayne, PA, USA.
- Otero J, N Mestorino, J Errecalde. 2001. Enrofloxacin: una fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte I: Química, mecanismo de acción, actividad antimicrobiana y resistencia bacteriana. *Analecta Vet* 21, 31-41.
- Penna B, R Vargas, L Medeiros, G Martins, R Martins, W Lilenbaum. 2009. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Vet Dermatol* 21, 292- 296.
- Pin D, D Carlotti, P Jasmin, D Deboer, P Prelaud. 2006. Prospective study of bacterial overgrowth syndrome in eight dogs. *Vet Rec* 158, 437-441.
- Rich M, L Roberts, M Jones, V Young. 2007. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* in companion animals. *Vet Rec* 21,107.
- Vanni M, R Tognetti, C Pretti, F Crema, G Soldani, V Meucci, L Intorre. 2009. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolated from dogs. *Res Vet Sci* 2, 192- 195.
- Zdovc I, M Ocepek, T Pirs, B Krt, L Pinter. 2004. Microbiological features of *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, isolated from dogs and possible misidentification with other canine coagulase-positive Staphylococci. *J Vet Med B* 51, 449-454.