



M. V. Valeria Inés Amable

Staphylococcus Coagulasa Positivos aislados de caninos

Caracterización fenotípica y perfiles de
resistencia a antimicrobianos.

**Carrera de
Especialización en
Bacteriología Clínica**

Facultad de Medicina- Universidad Nacional del Nordeste

**Corrientes- Argentina
2014**

Directora: Mgter. Graciela Patricia Esquivel



I. DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Esta tesis la dedico a mis hijos Octavio y Salvador, cuyo sacrificio fue parejo al mío, quienes me comprendieron, apoyaron y acompañaron siempre.

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, a mis compañeros de trabajo, quienes compartieron conmigo las experiencias en el laboratorio, ayudándome a entender el trabajo como un gozo y no una carga, que me brindaron el tiempo y el espacio para realizar este proyecto.

A mi familia, que siempre estuvo presente, en todos mis proyectos y todos mis anhelos, en especial a mi hermana.

Inmensamente agradecida a todos los seres que caminaron conmigo en esta especialización: a mis compañeros, colegas y profesores.

Por último no puedo dejar de agradecer a mis amigos, los presentes y los pasados, a quienes compartieron conmigo un pedacito de mi vida, por haberme hecho quien soy hoy.

2. INTRODUCCIÓN

Los *Staphylococcus* están ampliamente difundidos en la naturaleza. Su hábitat natural es la piel y las membranas mucosas de mamíferos y aves. No obstante, la difusión de cepas de *Staphylococcus sp.* entre diferentes especies animales es limitada(1).

La piel actúa como una barrera protectora, esta defensa tiene tres componentes: físico, químico y microbiano, este último contribuye a la inmunidad cutánea, las bacterias se localizan en la epidermis superficial y en el infundíbulo de los folículos pilosos. Las bacterias recuperadas de la piel se denominan habitantes normales y se clasifican como residentes o transitorias, los estafilococos coagulasa negativo (ECN) son en su mayoría organismos residentes (*S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. simulans*). Existe controversia respecto a *Staphylococcus intermedius*, un estafilococo coagulasa positivo (ECP), ya que es aislado tanto de perros sanos como enfermos(2).

Los problemas de piel figuran como una de las patologías más comunes en clínica de pequeños animales, siendo consideradas las otitis como una enfermedad dermatológica(3). Numerosos estudios refieren el aislamiento del género estafilococo de piel de perros sanos y clínicamente enfermos, la especie más frecuentemente hallada es *S. intermedius* como habitante normal y principal agente causal de piodermias, sin embargo otras especies como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. saprophyticus* y *S. schleiferi* pueden ser encontradas(4).

La otitis externa es una inflamación de la piel del canal auditivo externo, que está entre el pabellón y la membrana timpánica, la clasificación mas relevante divide a las causas en predisponentes, primarias y perpetuantes(2). En las otitis externas los ECP se consideran agentes perpetuantes, es de destacar la asociación entre *S. intermedius* que produce un factor que estimula la proliferación de la levadura *Malassezia pachydermatis* (5) ambos aislados frecuentemente asociados en esta patología.

El género *Staphylococcus* está constituido por células esféricas de 0,5 a 1,5 µm de diámetro pueden encontrarse solas, en pares, tétradas, cadenas cortas y agrupadas de forma irregular o en racimos. Se tiñen como Gram positivos, son inmóviles, anaerobios facultativos, catalasa positivo y oxidasa negativo. Tienen metabolismo respiratorio y fermentativo, utilizan carbohidratos y aminoácidos como fuente de carbono. El contenido de ADN % G-C 27- 41% (6). Se reconocen 37 especies y varias subespecies(6), si bien solo algunas de ellas tienen importancia desde el punto de vista clínico. Los *Staphylococcus* se dividen en dos grandes grupos, según su capacidad para coagular el plasma: Estafilococos Coagulasa Positivos (**ECP**) y Estafilococos Coagulasa Negativos (**ECN**).

Los estafilococos producen un número de sustancias relevantes para el desarrollo de un proceso patológico infeccioso en la piel que podemos dividir en tres categorías: Componentes de la Pared Celular, Enzimas y Toxinas(1,(7).

Son gérmenes nutricionalmente poco exigentes, crecen bien en medios comunes, aunque lo hacen mejor en los medios enriquecidos. Crecen rápidamente a temperatura de 35°C, pero desarrollan mejor el pigmento a 25°C(8). Una particularidad de los miembros de este género es su capacidad para crecer en medios con 10% de NaCl que no soportan el resto de los microorganismos (son bacterias halotolerantes). Esto permite la creación de medios de cultivo casi específicos para los estafilococos. En agar sangre pueden producir zonas de hemólisis(9).

Tres especies de ECP han sido documentadas como patógenos primarios en medicina veterinaria: *Staphylococcus intermedius*, *S. aureus* y *S. schleiferi* sp *coagulans* y una última especie coagulasa variable el *S. hyicus*. Los ECN son considerados patógenos oportunistas(10). Debido a la dificultad para diferenciar *Staphylococcus pseudintermedius*, *intermedius* y *delphini* fenotípicamente, se ha decidido incluirlos en el *Staphylococcus Intermedius Group* (SIG) (11). Una característica de *S. intermedius* es su capacidad para permanecer viable dentro de fagocitos en donde los

antimicrobianos usados no alcanzan concentraciones adecuadas (12). En el presente trabajo seguiremos refiriéndonos a *S. intermedius* como representante del grupo. Se aísla de infecciones, principalmente en perros pero puede ser hallada en otros animales y humanos (13). *Staphylococcus schleiferi* sp *coagulans* ha sido asociado a otitis externas en perros (14) y lesiones en humanos(10). Es la segunda especie más frecuentemente aislada de caninos después de *S. intermedius*.

Los ECP presentan resistencia a varias familias de antimicrobianos y varios mecanismos están implicados en ello. Así, la resistencia a β -lactámicos puede deberse a producción de β -lactamasa o su hiperproducción, producción de PBP_{2a} o modificación de las PBP_s(15).

La resistencia a macrólidos y lincosamidas puede presentar diferentes fenotipos: resistencia a Eritromicina y Clindamicina (fenotipo cMLS_B), resistencia a Eritromicina y sensibilidad a Clindamicina con achatamiento del halo, D-test positivo (fenotipo iMLS_B) y resistencia a Eritromicina y sensibilidad a Clindamicina sin achatamiento D- test negativo (fenotipo MS_B) (15).

La resistencia a aminoglucósidos puede ser consecuencia de una mutación cromosómica, transporte inefectivo o producción de enzimas modificadoras. Mientras que la resistencia a glicopéptidos puede ser de bajo nivel, caracterizada por un engrosamiento anormal de la pared celular (cepas VISA) o resistencia de alto nivel mediada por el operón vanA, que disminuye su afinidad por el antibiótico(13).

3. JUSTIFICACIÓN

Los ECP forman parte de la microbiota de perros y gatos pudiendo causar piodermias, otitis externas, abscesos, etc.(12). La caracterización fenotípica de los ECP aisladas de canino es difícil y requiere de numerosas pruebas complementarias, algunos laboratorios no identifican las especies de estafilococos y los cultivos aislados se consideran como ECP(16). Los antibióticos betalactámicos usualmente se utilizan en la práctica de la medicina veterinaria(17) sin embargo los estafilococos presentan altos niveles de resistencia a penicilina(18), la aparición de estafilococos multirresistentes y la posible transmisión de tales microorganismos (o sus genes de resistencia) de los humanos a sus animales de compañía, o viceversa, hace indispensable lograr la identificación de las especies implicadas en estas patologías(2). Esta resistencia ha emergido como una de las mayores preocupaciones en salud pública tanto para la OMS (Organización Mundial de la Salud) como para la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) la vigilancia del perfil de resistencia frente a antimicrobianos y el conocimiento de los mecanismos de resistencia actualizados se ha vuelto un tema prioritario (19)(20). Vigilar estas resistencias y reunir una base de datos nos permitirá preservar la efectividad de los antimicrobianos en el tratamiento de infecciones.

4. HIPÓTESIS

Las diferentes especies de ECP aislados de caninos poseen distintos perfiles de sensibilidad a antimicrobianos de uso frecuente en medicina veterinaria.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar fenotípicamente los aislamientos de ECP de muestras clínicas de origen canino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Aislar y tipificar a las distintas especies de *Staphylococcus* a través de pruebas bioquímicas.
- Describir los patrones de susceptibilidad antimicrobiana en cepas locales de las especies encontradas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios fueron realizados en el **Laboratorio de Análisis Bacteriológico y Micológico** perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste (FCV-UNNE) de la Ciudad de Corrientes.

Las muestras correspondieron a lesiones de piel, canal auditivo externo y cavidad nasal de perros clínicamente enfermos, colectadas en un período de seis meses.

Se trabajó con los ECP identificados por su morfología y pruebas bioquímicas clásicas.

Aislándose un total de 30 cepas que se conservan en medio agar cepa y que pasaron a formar parte del cepario de la Institución.

Para clasificar los microorganismos hasta nivel de especie se seleccionaron algunas de las pruebas sugeridas en el Bergey's manual of determinative bacteriology(21) (**Tabla 1**).

PRUEBAS	<i>S. aureus</i>	<i>S. Intermedius</i>	<i>S. schleiferi spcoagulans</i>	<i>S. hyicus</i>
COAGULASA	+	+	+	variable
OXIDASA	-	-	-	-
CATALASA	+	+	+	+
V.P.	+	-	+	-
β-GALACT.	-	+	ND	-
UREASA	+débil	+	+	variable
PIGMENTO	Crema/ amarillo/ rosa	Blancas crema	no pigmentados	Blancas crema
COLONIA	Lisas. 1-3mm	Lisas. 5-6mm	Opacas lisas circulares	Opacas lisas 4-7 mm
R-TELURITO	+	-	ND	ND
MANITOL	+	variable	d	-
RIBOSA	+	+	+	+
TREALOSA	+	+	-	+

Las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos se realizaron por el método de difusión en agar según las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2014(22) en Agar Mueller- Hinton Britania®. Todas las cepas fueron confrontadas con discos de Penicilina 10UI (PEN), Eritromicina 15µg (ERY),

Clindamicina 2µg (CLIN), Cefoxitina 30µg (FOX) y Gentamicina 10µg (GEN) de laboratorio Britania®. La interpretación de los halos se realizó tomando en cuenta los puntos de corte de la CLSI 2014(22).

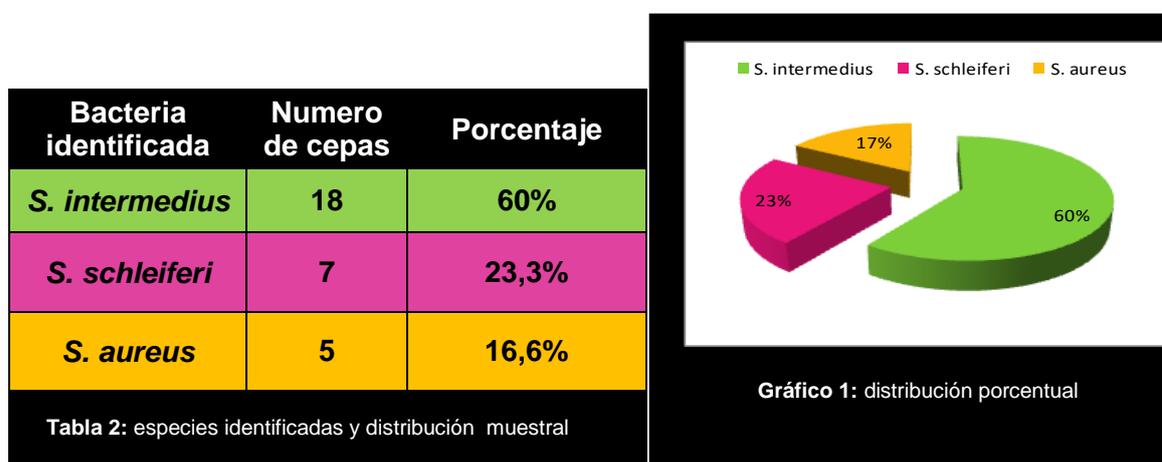
Como control de calidad interno se utilizaron *Staphylococcus aureus* American Type Culture Collection (ATCC) 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

El análisis estadístico de este estudio observacional prospectivo se realizó con el programa informático InfoStat® versión libre.

7. RESULTADOS y DISCUSIÓN

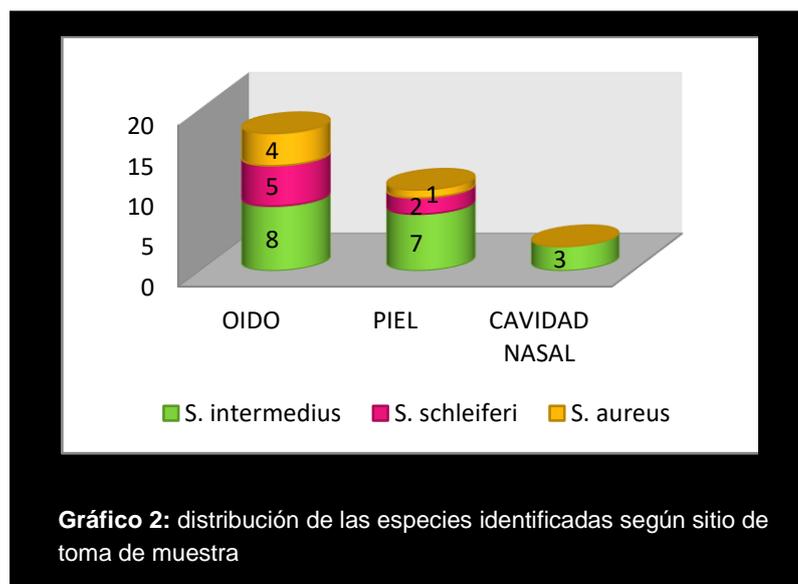
Las pruebas que se utilizaron para alcanzar la tipificación hasta el nivel de especie fueron extraídas del Bergey's manual of determinative bacteriology(21).

De las 30 cepas aisladas 18 (60%) fueron identificadas fenotípicamente como *S. intermedius*, 7 (23%) como *S. schleiferi sp coagulans* y 5 (17%) como *S. aureus* tal como se muestra en la **Tabla 2** y cuya distribución porcentual se representa en **Gráfico 1**.



La distribución de las especies en función del sitio de obtención de las muestras se muestra en la **Tabla 3** y el **Gráfico 2**.

Sitio de toma de muestra	<i>S. intermedius</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. aureus</i>	TOTAL
Oído	8 (47%)	5 (29,4%)	4 (23,5%)	17
Piel	7 (70%)	2 (20%)	1 (10%)	10
Cavida nasal	3 (100%)	0	0	3



Si bien la microbiota de piel varía enormemente en diferentes localidades geográficas, diversos autores (10, 22) reportan porcentajes de aislamiento de *S. intermedius* en lesiones de piel y oído coincidentes con los datos obtenidos en este estudio (60% – 80%). El hallazgo de *S. schleiferi*, un patógeno emergente en medicina veterinaria, varía entre 10 a 20% (14, 23) lo cual es algo menor a lo encontrado en nuestra serie.

S. aureus, un microorganismo frecuente en medicina humana, se aísla en porcentajes de 5- 20% en afecciones de piel en caninos(3). Se han reportado asilamientos más frecuente de *S. aureus* por sobre *S. schleiferi* (4), no coincidentes con los datos que obtuvimos en la región.

Perfiles de resistencia a antimicrobianos

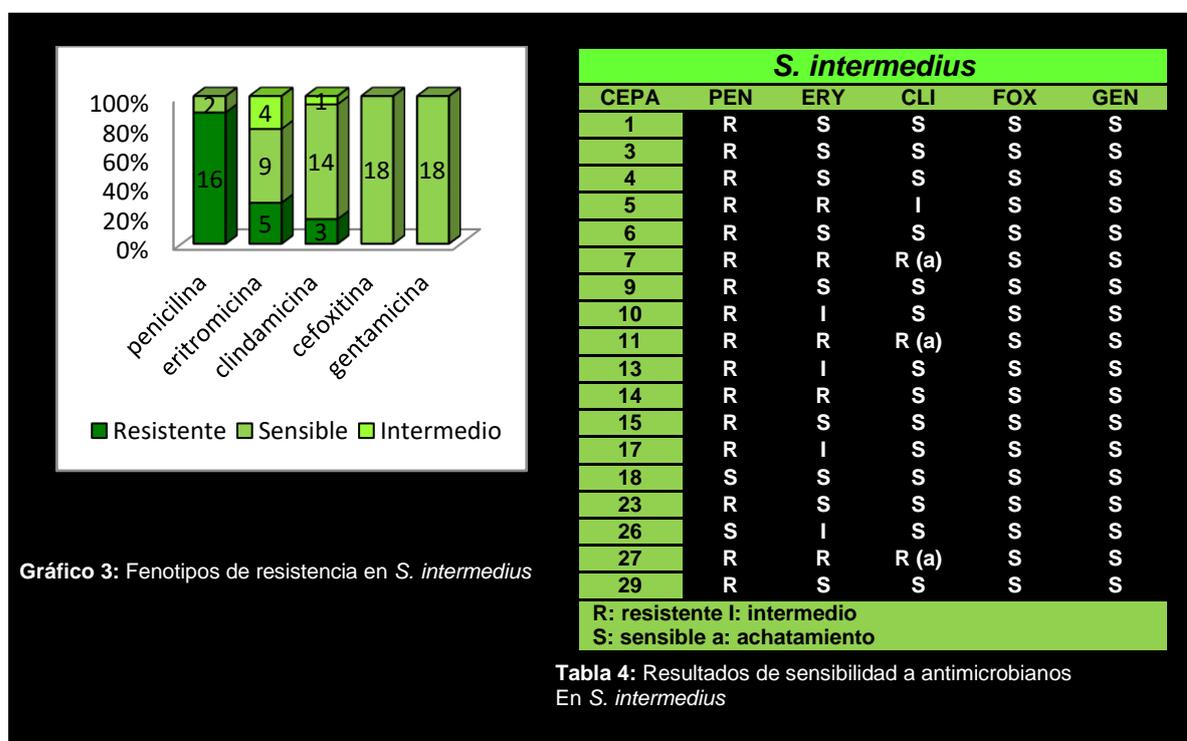
Los antimicrobianos ensayados fueron seleccionados según criterios sugeridos por la CLSI, por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)(25) y disponibilidad en el laboratorio. De los antimicrobianos de uso habitual en medicina veterinaria no se probó trimetoprima –sulfametoxazol (TMS) por la imposibilidad de conseguirlo en el mercado al momento de realizar las pruebas.

Analizando las pruebas de sensibilidad para cada especie identificada, obtenemos los siguientes gráficos que muestran el perfil de comportamiento frente a los antimicrobianos ensayados.

En este estudio 89% de los *S. intermedius* mostraron resistencia (R) a PEN, porcentaje elevado comparado con otros autores que notifican 60 a 75% de resistencia en esta especie (24,13), mientras que el 100% resultó sensible a FOX y GEN.

ERY resultó R en 28% de las cepas, intermedio (I) en 22% y sensible (S) en 50% de los casos. Con respecto a Clin, se observó R en un 17% de los casos, I en un 5% y el 78% de las cepas fueron S a esta droga. **Gráfico 3 - Tabla 4.**

En los últimos años se han identificado cepas del grupo SIG, aislados de infecciones, que presentaron metilicilino resistencia asociada a otros antibióticos aprobados para uso veterinario (26). En la serie estudiada para este trabajo no se hallaron casos de multiresistencia en esta especie.



Analizando las cepas de *S. schleiferi sp coagulans* observamos que PEN presentó una sensibilidad de 72%, mientras que solo dos cepas fueron R (28%). Las 7 cepas fueron S a FOX y GEN (100%), una sola cepa fué R a CLIN (14%) mientras que 6 fueron S a este antimicrobiano (86%). La S a ERY fue de 72% y 2 cepas fueron I (28%). **Gráfico 4- Tabla 5.**

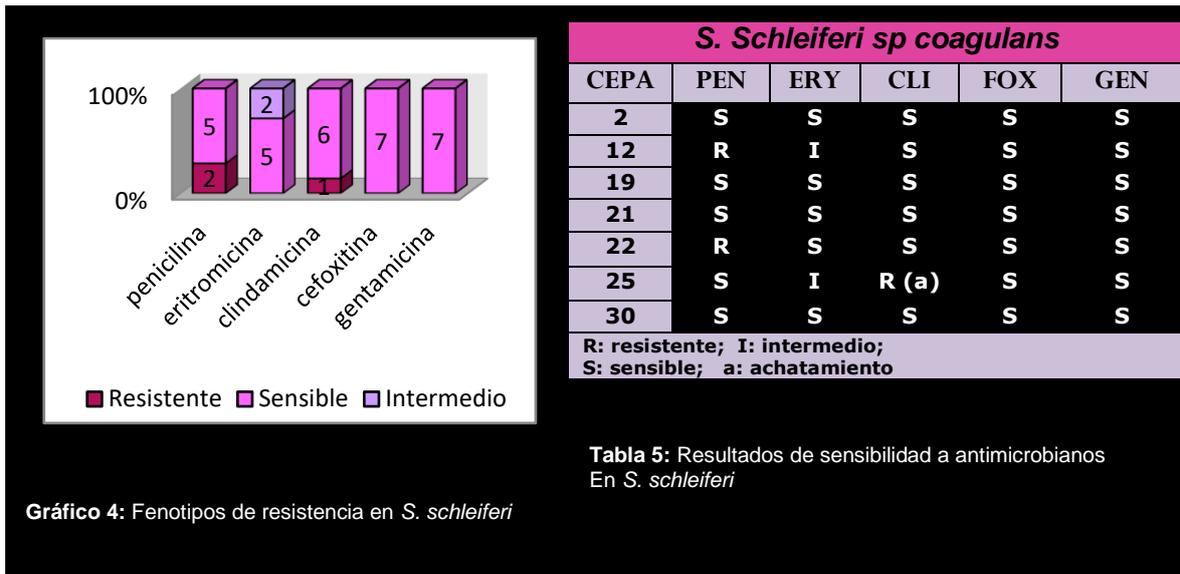


Gráfico 4: Fenotipos de resistencia en *S. schleiferi*

Analizando los hallazgos referidos a *Staphylococcus aureus* vemos que 3 (60%) cepas fueron sensibles a todos los antimicrobianos ensayados, una cepa (20%) fue R a PEN, ERY y CLI pero S a FOX y GEN.

Una sola cepa (20%) presentó resistencia a todos los antimicrobianos probados. Este hallazgo es poco frecuente en medicina veterinaria pero puede darse en caninos con piodermias profundas o historia de tratamientos repetidos a antibióticos(26).

Lamentablemente el número de *S. aureus* aislado es bajo y no nos permite hacer mayores inferencias sobre su perfil de resistencia en animales. **Gráfico5- Tabla 6.**

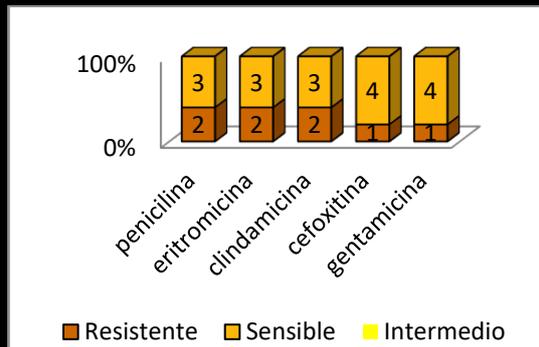


Gráfico 5: Fenotipos de resistencia en *S. aureus*

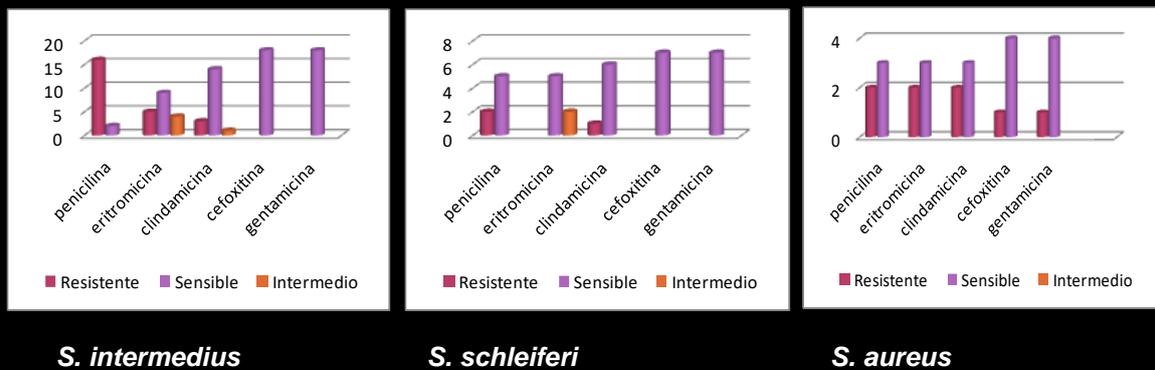
<i>Staphylococcus aureus</i>					
CEPA	PEN	ERY	CLI	FOX	GEN
8	S	S	S	S	S
16	R	R	R (a)	R	R
20	S	S	S	S	S
24	S	S	S	S	S
28	R	R	R (a)	S	S

R: resistente I: intermedio S: sensible a:achatamiento

Tabla 6: Resultados de sensibilidad a antimicrobianos en *S. aureus*

El **Gráfico 6** resume los datos obtenidos en referencia a los perfiles de resistencia presentados para las 3 especies estudiadas. Se hace evidente el alto nivel de resistencia a PEN presentado por *S. intermedius*, así como *S. aureus*, pero menor en *S. schleiferi*.

Gráfico 6: comparación de los perfiles de resistencia

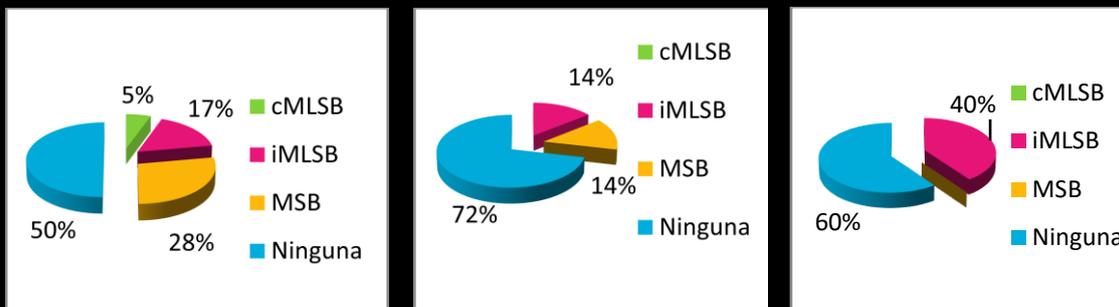


En relación a la resistencia combinada frente a CLI y ERY (**Gráfico 7**) se encontró que el fenotipo cMLSB (resistencia constitutiva) se presentó en una sola cepa que correspondía a *S. intermedius*.

El fenotipo iMLSB (resistencia inducida) se observó en cepas de las tres especies (*S. intermedius* 17%; *S. schleiferi* 14%; *S. aureus* 40%).

El fenotipo MSB no se observó en *S. aureus* pero sí en *S.intermedius* (28%) y en *S.schleiferi* (14%).

Gráfico 7: Perfiles fenotípicos de resistencia combinada a eritromicina y clindamicina



S. intermedius

S. schleiferi

S. aureus

8. CONCLUSIONES

Los datos aportados por este estudio orientan sobre el predominio local de las diferentes especies de estafilococos relacionados a infecciones en perros y su perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos de uso más frecuente en la clínica veterinaria.

La experiencia adquirida en este trabajo demuestra la posibilidad de implementar pruebas sencillas, económicas y rápidas en el laboratorio de microbiología de la FCV, para la tipificación hasta el nivel de especie de las cepas del género *Staphylococcus*.

La importancia clínica de la correcta identificación de la especie queda demostrada por los perfiles de resistencia hallados. Un hecho notable es la escasa resistencia a la gentamicina, teniendo en cuenta que es uno de los productos de aplicaciones tópicas y parenterales más utilizados por el médico clínico cuando instaura un tratamiento empírico en medicina veterinaria.

Cuando la cepa resulta sensible a penicilina, o a penicilina combinada con un inhibidor de beta- lactamasas, estos antibióticos deberían ser de primera elección, por el costo, la disponibilidad, facilidad de aplicación, eficacia y baja toxicidad.

La validez de los resultados obtenidos podría incrementarse aumentando el número de cepas analizadas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stanchi NO, Martino PE. Microbiología veterinaria. Argentina: Inter-Médica; 2007. p190-194.
2. Scott DW, Miller WH, Griffin, Giovanniello, Jure A. Muller and Kirk's: dermatología en pequeños animales. Buenos Aires: Intermédica; 2002. p246-247, 323-325, 1094-1100.
3. Mason IS, Mason KV, Lloyd DH. A review of the biology of canine skin with respect to the commensals *Staphylococcus intermedius*, *Demodex canis* and *Malassezia pachydermatis*. *Vet Dermatol.* 1996;7(3):119-32.
4. Penna B, Vargas R, Lilenbaum W. In vitro antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine pyoderma in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2009;40:490-4.
5. Kiss G, Radványi S, Szigeti G. Characteristics of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from canine otitis externa. *Mycoses.* 1996;39:313-21.
6. Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* New York: Springer; 2001.
7. Hurtado M, De la Parte M, Brito A. *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Rev Soc Venez Microbiol -.* 22(2):112-8.
8. Brooks GF, Blengio Pinto JR. Jawetz, Melnick y Adelberg: *Microbiología médica.* México: McGraw Hill; 2011. p1094-1098.
9. Koneman EW, Winn. *Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color.* Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2008. p593-626
10. Castellanos I, Rodriguez G, Santos R. Aislamiento e identificación bioquímica de microorganismos bacterianos a partir de infecciones de piel en caninos. *Rev Med Vet* [Internet]. 2011;22. Recuperado a partir de: <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/mv/article/view/556>
11. Devriese LA. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1 de julio de 2005;55(4):1569-73.
12. Bond R, Loeffler A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? taxonomic revision emergence of multi drug resistance. *NCBI. J Small Anim Pract.* 2012;53:147-54.
13. Kadlec K, Schwarz S. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudointermedius*. *Vet Dermatol.* 2012;23:276-82.
14. Igimi S, Takahashi E, Mitsuoka T. *Staphylococcus Schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov. isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *Int J Syst Bacteriol.* 1990;40(4):409-11.

15. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ardanuy C, Cercenado E, Morosini MI, Torres C. Detección Fenotípica de Mecanismos de Resistencia en Grampositivos.; 2011.
16. Weese JS, van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):418-29.
17. Denamiel G, Puigdevall T, Más J, Albarellos G, Gentilini E. Prevalencia y perfil de resistencia a betalactámicos en estafilococos de perros y gatos. *InVet* [Internet]. [citado 27 de agosto de 2014]. Recuperado a partir de: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-34982009000200006
18. Rubio MR, Boggio JC. *Farmacología veterinaria. segunda.* Córdoba, Argentina: EDUCC; 2009. p 518-520.
19. Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(1):36-45.
20. Conferencia Mundial de la OIE sobre el uso responsable y prudente de los agentes antimicrobianos en los animales. París, Francia: Organización Mundial de Sanidad Animal; Organización Mundial de la Salud; Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; 2013 mar.
21. Bergey DH, Holt JG. *Bergey's manual of determinative bacteriology.* Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-Fourth informational supplement Cockerill F. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
23. Devriese LA. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1 de julio de 2005;55(4):1569-73.
24. *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* Subspecies *coagulans* from Canine Pyoderma Cases in Grenada, West Indies, and Their Susceptibility to Beta-Lactam Drugs [Internet]. [citado 22 de agosto de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.hindawi.com/journals/vmi/2014/850126/>
25. OIE. *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres 2012.* 7ª ed. World Organization for Animal; 2012.
26. Greene CE, Addie DD. *Enfermedades infecciosas del perro y el gato.* Buenos Aires: Inter-Médica; 2008. p885-902