

Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Veterinaria

Corrientes - Argentina

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

MODULO DE INTENSIFICACIÓN PRÁCTICA

OPCIÓN: CLÍNICA DE PEQUEÑOS ANIMALES

TEMA: Resistencia a Antimicrobianos en *Staphylococcus* aislados de patologías de piel en Caninos

TUTOR EXTERNO: BOEHRINGER, SILVIA IRENE

TUTOR INTERNO: AMABLE, VALERIA INÉS

RESIDENTE: PAREDES, MARÍA SILVINA

e-mail: marv sil988@hotmail.com

2023

DEDICATORIA

A Canela, Carozo, Albino, Umma, Evaristo, Milú, Ruedas, Rubia y tantos otros que marcaron mi camino.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y mis padres en primer lugar, a quienes agradezco por apoyarme y alentarme a cumplir este tan anhelado sueño.

A Joaquín, quien me impulsó a seguir las veces que se tornó difícil y me acompaña siempre.

A mi segunda casa y familia durante el tiempo de facultad, la Cátedra de Microbiología de la FCV, cuyos integrantes me inculcaron el amor por el laboratorio, me compartieron siempre sus conocimientos, sus consejos, contención y de quienes aprendí tanto.

Y a las amigas que me regaló esta Facultad, Querina, Viviana y Graciela, incondicionales y de fierro.

ÍNDICE

RESÚMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
1. Cultivo y aislamiento de las cepas.....	5
2. Identificación fenotípica de los microorganismos aislados.....	6
3. Sensibilidad de las cepas aisladas a antibióticos.....	9
4. Producción de biofilm.....	11
5. Conservación de las cepas.....	11
6. Análisis de datos y divulgación de resultados.....	12
Lugar de trabajo.....	13
RESULTADOS.....	14
CONCLUSIÓN.....	22
BIBLIOGRAFÍA.....	23

RESÚMEN

Los estafilococos coagulasa positivo (ECP), *Staphylococo pseudintermedius* y *Staphylococo schleiferi* son patógenos primarios en la mayoría de piodermitas y otitis en caninos, mientras que *Staphylococo aureus* se aísla mayormente en humanos. En el tratamiento de estas patologías se utilizan antibióticos, principalmente betalactámicos, que muchas veces resultan ineficaces debido a la resistencia de las bacterias. Tres mecanismos explican la resistencia a betalactámicos en estafilococos: producción de enzimas inactivadoras (betalactamasas), modificación de proteínas de unión a penicilinas (PBPs) y resistencia intrínseca a meticilina debido al gen *mecA*. Estos mecanismos originan fenotipos de resistencia permitiendo clasificar a los ECP en: productores de betalactamasas; hiperproductores de betalactamasas o borderline (BORSA); con modificación mínima de PBPs (MODSA) y productores de proteína de unión a penicilina 2a (PBP_{2a})- El objetivo del trabajo fue evaluar la sensibilidad a antibióticos betalactámicos de 50 cepas de ECP aisladas de infecciones de piel y/o conducto auditivo en caninos. El análisis de datos que resultó en 74% de *S. pseudintermedius*, 20% de *S. aureus* y 6% de *S. schleiferi subsp coagulans*, comprobó que el 84% de las cepas presentaban resistencia a antibióticos betalactámicos. La producción de betalactamasas fue el fenotipo de resistencia más frecuente en todas las especies. Por ello, la penicilina, considerada tradicionalmente como droga de primera línea ya no sería una opción viable para estos casos, prefiriéndose las combinaciones de penicilina más inhibidores de betalactamasas y cefalosporinas. Fenotipos MODSA y BORSA fueron hallados en menor proporción, mientras que no se obtuvieron cepas con fenotipo debido a producción de PBP2a.

INTRODUCCIÓN

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 (Scott, 2002). Entre los microorganismos más frecuentemente aislados en piodermitas y otitis externa en caninos se citan los pertenecientes al género *Staphylococcus*, que a su vez forman parte de la microbiota normal de piel y mucosas tanto en animales como en el hombre. Dicho género está constituido por cocos Gram positivos, inmóviles, aerobios/anaerobios facultativos, catalasa positivo y oxidasa negativo, dividiéndose en dos grandes grupos, según su capacidad para coagular el plasma: Estafilococos Coagulasa Positivos (ECP) y Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN) (Bone, 2001).

Los ECN son considerados patógenos oportunistas y entre los ECP, tres especies han sido documentadas como patógenos primarios en medicina veterinaria: *S. pseudintermedius*, *S. aureus* y *S. schleiferi* suhsp. *coagulans* (Castellanos, 2011) (Devriese, 2005). *S. pseudintermedius* y *S. schleiferi* se presentan como patógenos primarios en la mayoría de las piodermitas en caninos, a diferencia del *S. aureus* que se aísla con mayor frecuencia en el ser humano.

Los antibióticos betalactámicos usualmente se utilizan en la práctica de la medicina veterinaria (Denamiel, 2009) y los estafilococos han sido históricamente sensibles a esta familia de antibióticos, convirtiéndose éstos en agentes antimicrobianos de primera elección para el tratamiento de infecciones producidas por este género. Sin embargo, los aislamientos actuales de estafilococos presentan altos niveles de resistencia a penicilina (Rubio, 2009). 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 (Kadlec, 2012; Weese, 2010) y sus perfiles de resistencia.

Existen tres mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos en ECP: resistencia mediada por enzimas (penicilinasas o betalactamasas), las cuales desactivan al antibiótico; resistencia intrínseca, que no es debida a la inactivación de drogas y es responsable de la resistencia a meticilina; y la modificación de las proteínas de unión a penicilinas (PBPs).

Además, algunos estafilococos pueden expresar el fenómeno de tolerancia, en el que ocurre una disociación de las acciones inhibitoria y bactericida de los antibióticos

betalactámicos. De éstos, el mecanismo más importante, es la resistencia intrínseca debida a la presencia del gen *mecA* (Castellano, 2010); siendo este último, el mecanismo más importante desde el punto de vista clínico pero el de menor presentación.

Estos mecanismos dan lugar a distintos fenotipos de resistencia que permiten clasificar a los estafilococos en 1) productores de betalactamasas, 2) hiperproductores de betalactamasas o borderline (BORSA), 3) con modificación mínima de proteínas de unión a penicilina (MODSA) y 4) productores de proteína de unión a penicilina 2a (PBP_{2a}).

La frecuencia relativa de cada uno de los tipos de resistencia puede variar según el área geográfica y el tipo de paciente, por ello es fundamental poder diferenciarlas y obtener datos epidemiológicos locales. El incremento de la resistencia a dichos antibióticos y/o el desarrollo de factores de virulencia como la formación de biofilm, plantea un gran desafío al momento del desarrollo de la terapéutica médica tanto en medicina humana como en medicina veterinaria.

El presente trabajo se enmarca dentro del proyecto “Resistencia a antimicrobianos en *Staphylococcus spp* y levaduras aisladas de muestras clínicas de origen animal” acreditado por la SGCYT/UNNE por resolución 966/2017-CS para el período 2018-2021. La problemática que aborda este proyecto es un tema prioritario para el grupo de investigación integrante del Servicio de Diagnóstico Bacteriológico y Micológico de la FCV-UNNE, que tiene un gran camino recorrido en el estudio de la resistencia a agentes antimicrobianos de las bacterias aisladas de animales y las diferentes estrategias que generan para lograrlo. Asimismo, el Servicio, posee una amplia trayectoria en análisis de muestras clínicas, el aislamiento y tipificación bioquímica de microorganismos y la determinación de perfiles de sensibilidad. Las técnicas empleadas a tal fin son de uso rutinario en el laboratorio donde se han puesto a punto todas las metodologías a aplicar en el presente trabajo. Las implicancias clínicas de este estudio se evidencian por los distintos perfiles de resistencia de las diferentes especies del género y la epidemiología local.

Por todo lo citado anteriormente y con la hipótesis de que “las diferentes especies de ECP aislados de caninos poseen distintos perfiles de sensibilidad a antimicrobianos betalactámicos” se propusieron los siguientes objetivos:

Objetivo general:

- Evaluar la sensibilidad a antibióticos betalactámicos de *Staphylococcus*

Coagulasa Positivos aislados de muestras clínicas de piel en caninos.

Objetivos particulares:

- Aislare, tipificar y conservar cepas de *Staphylococcus* Coagulasa Positivos aislados de muestras clínicas de piel de caninos.
- Describir los patrones de susceptibilidad antimicrobiana a antibióticos betalactámicos en cepas locales.
- Asociar los perfiles fenotípicos de sensibilidad de los microorganismos frente a los antibióticos, con las posibilidades terapéuticas de la clínica diaria.
- Evaluar la producción de biofilm y correlacionarla con la presentación de resistencia a antibióticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

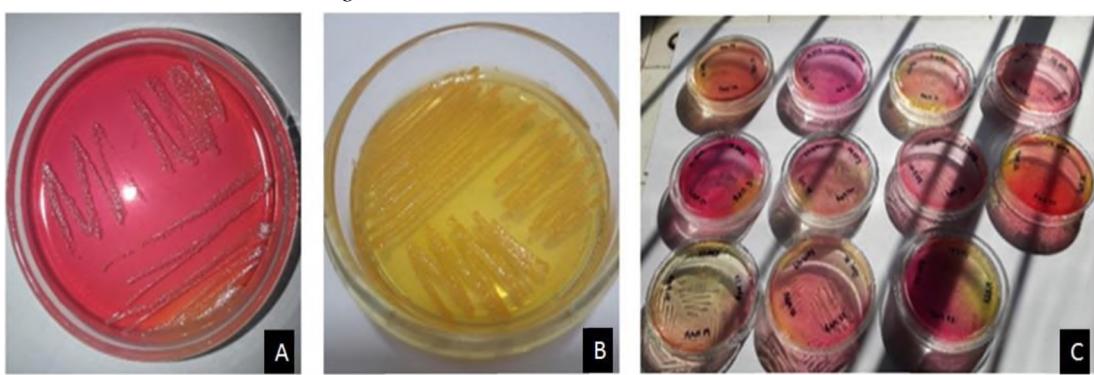
Las muestras que se utilizaron para este estudio fueron tomadas por Médicos Veterinarios del Hospital de Pequeños animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste (FCV-UNNE) y de Clínicas Veterinarias aledañas a la zona, remitidas refrigeradas en medio de transporte de Stuart e ingresadas al Servicio de Diagnóstico Bacteriológico y Micológico de la FCV-UNNE para su procesamiento. Las muestras correspondieron a lesiones de piel y/o conducto auditivo externo de perros clínicamente enfermos de cualquier edad, sexo y raza en el período comprendido entre septiembre del año 2017 a junio del 2019. A partir de estas, se obtuvieron 50 cepas de ECP objeto de estudio de este trabajo. Se excluyeron pacientes con tratamientos antimicrobianos sistémicos y/o tópicos

1. Cultivo y aislamiento de las cepas

Las muestras ingresadas al laboratorio de diagnóstico microbiológico, se sembraron en medio Agar Manitol Salado (Britania®) un medio selectivo, que permite el aislamiento bacteriano (contiene cloruro sódico a dosis elevadas que evitan el crecimiento de otras bacterias) y diferencial (posee un azúcar fermentable, el manitol, y un indicador de pH para verificar la acidificación del medio). El medio sembrado se cultivó en estufa a 37°C por 18-24 hs en aerobiosis (Imagen 1).

Imagen 1

Cultivo y aislamiento en medio Agar Manitol Salado



Nota: (A) Colonias bacterianas de color blanco que no fermentan el manitol del medio. (B) Colonias bacterianas amarillas que fermentan el manitol del medio virando su color de rojo a amarillo. (C) Placas de Petri conteniendo medio Agar Manitol Salado sembradas con muestras clínicas para cultivo y aislamiento de estafilococos que evidencian la mayor o menor fermentación del manitol.

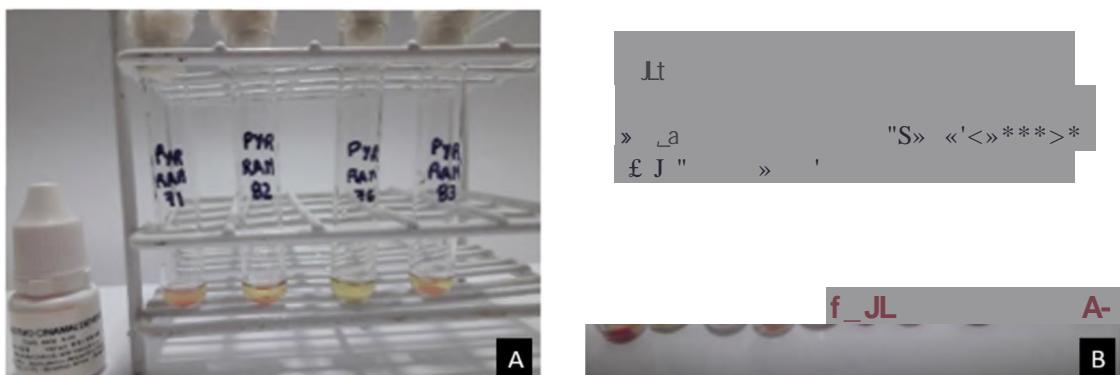
2. Identificación fenotípica de los microorganismos aislados

A fin de ubicar taxonómicamente las cepas de cocos Gram positivos se procedió a identificarlas mediante técnicas de diagnóstico microbiológico basadas en características fenotípicas. Las pruebas y los resultados esperados se obtuvieron de Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (Holt, 2000).

- a) Tinción de Gram: Se realizó la coloración de Gram de los extendidos con el Kit de Britania®. Se observaron al microscopio óptico con objetivo de inmersión (100X), considerando positivos aquellos que presentaron formas cocoides azul violeta dispuestas en racimos, duplas y aisladas.
- b) Actividad catalasa: Para determinar la actividad catalasa de los microorganismos aislados, se mezclaron en un portaobjeto 20 pL de cultivo activo con 20 pL de peróxido de hidrógeno 30 volúmenes. Esta prueba permitió diferenciar los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* (catalasa negativo-ausencia de burbujas) de *Staphylococcus* (catalasa positivo-presencia de burbujas).
- c) Pruebas de identificación bioquímica: las colonias desarrolladas en el medio Manitol Salado Agar se emplearon para la inoculación en diferentes medios líquidos y test complementarios.
 - Prueba de Coagulasa en tubo: Determina la capacidad de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa, se utilizó para diferenciar los estafilococos coagulasa positivos de otros grupos de *Staphylococcus*. La prueba se realizó con plasma equino desfibrinado; el resultado se leyó tras incubación de 4h a 37°C en estufa de cultivo, necesitándose 24h más para afirmar que fuese negativa *S. aureus*, *pseudintermedius* y *schleiferi* subsp *coagulans* son positivos a este test.
 - Aminopeptidasa (PYR-A-ENT Britania®). La L-pirrolidonil- P-naftilamida sirve como sustrato para la detección de pirrolidonil peptidasa. Es una prueba rápida y se utilizó en la diferenciación de especies, ya que *S. aureus* resulta negativa y *S. pseudintermedius* y *S. schleiferi* subsp *coagulans*, positivas. La muestra se incubó en estufa de cultivo a 37°C durante 2 horas, transcurridas las cuales se realizó la lectura (**Imagen 2**).

Imagen 2

Prueba PYR

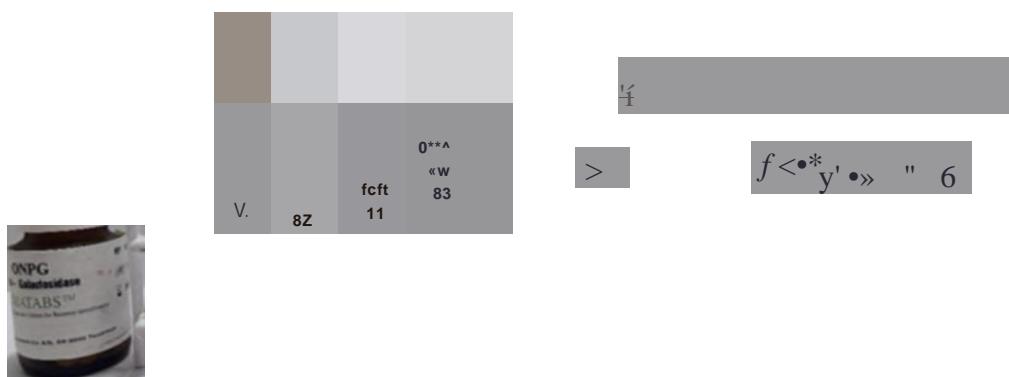


TVo/a: (A) Lectura de resultados de prueba PYR en tubos de ensayo, posterior a su correspondiente incubación y reactivo utilizado para el revelado. (B) Presentación de cepas luego del revelado, positivas en los tubos con disco color rosado (*S. pseudintermedius* y *S. schleiferi* subsp *coagulans*) y negativas en los tubos con disco color blanco (*S. aureus*).

- P-galactosidasa (ONPG- DIATABS®). Esta prueba demuestra la presencia de la enzima P- galactosidasa que hidroliza la lactosa. Para conocer si el microorganismo aislado producía esta enzima se añadió el compuesto orgánico e incoloro, O-nitrofenil- P-D-galactopiranósido (ONPG) y se incubó en estufa de cultivo a 37°C por 24 hs. Las bacterias que poseían la enzima hidrolizante, transformaron el compuesto en 4-nitrofenol, un derivado cromogénico de color amarillo. La prueba permitió diferenciar a *S. aureus* que es negativo de *S. pseudintermedius* que es positivo; no existen datos sobre *S. schleiferi* subsp *coagulans* (Imagen 3).

Imagen 3

Prueba ONPG

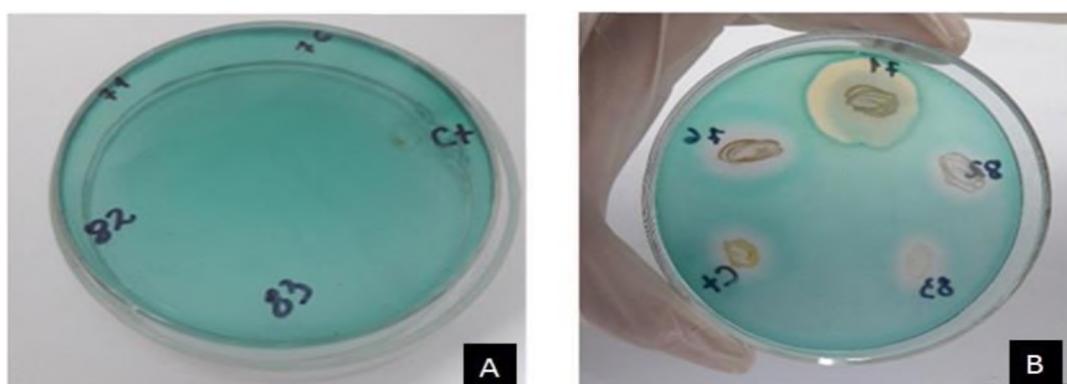


Nota: (A) Lectina de resultados de prueba ONPG en tubos de ensayo, posterior a su correspondiente incubación y frasco contenedor de discos. (B) Presentación de cepas luego de la incubación correspondiente, positivas en los tubos con disco color amarillo (*S. pseudintermedius* y *S. schleiferi* subsp *coagulans*) y negativas en los tubos con disco color blanco (*S. aureus*).

- ADNasa (DNAsa Agar Britania®): este medio pone en evidencia la capacidad que poseen ciertas bacterias para hidrolizar enzimáticamente el ADN produciendo una mezcla de mono y polinucleótidos. Se inoculó en forma de botón en medio de cultivo sólido fraccionado en placas de Petri y se lo incubó en estufa de cultivo a 37°C en aerobiosis, durante 48 hs. Si bien no fue una prueba concluyente contribuyó a la diferenciación de especie, ya que la mayoría de las cepas de *S. aureus* muestran reacción positiva (zona de inoculo rodeada de zona transparente), pero algunas cepas dan la prueba negativa (zona alrededor del inoculo opaca). *S. schleiferi* y también algunas cepas de *S. pseudintermedius* son ADNasa positiva (Imagen 4). •

Imagen 4

Prueba ADNasa



Nota: (A) Placa de Petri con medio ADNasa, sembrado y anterior a la incubación, para evidenciar la hidrólisis del ADN. (B) Placa de Petri posterior a la incubación correspondiente. En todos los puntos inoculados se observa una zona transparente indicativa de resultado positivo a la prueba., coincidente con el punto control (sembrado con cepa de confirmada positividad a la prueba).

- Voges-Proskauer. Permite observar si el microorganismo fermenta la glucosa por la vía butanodiólica. Al medio líquido (MR-VP Medio- Britania®) inoculado e incubado en estufa de cultivo a 37°C durante 48hs, se adicionaron 2 reactivos. En primer lugar, el a-nañol y luego hidróxido de sodio. Las cepas positivas formaron un producto intermedio (acetoína), de color rojizo en la superficie del medio. *S. aureus* y *S. schleiferi* resultan positivos, mientras que *S. pseudintermedius* negativo.
- Ureasa. Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoniaco por acción del enzima ureasa. Los tubos inoculados se incubaron 24 hs considerándose la prueba positiva si el medio presentaba una coloración roja. *S. pseudintermdius* es positivo y *S. aureus* presenta una reacción variable; no existen datos sobre *S. schleiferi subsp coagulans* (Imagen 10).

- Fermentación de azúcares. Las bacterias fermentan carbohidratos a ácidos orgánicos y gas (H₂ o CO₂), pudiendo detectarse la fermentación de los azúcares, incluyendo en el medio un indicador de pH (rojo fenol). Los medios inoculados se incubaron en estufa de cultivo a 37°C durante 24-48 hs, leyéndose como positivos aquellos que viraron al color amarillo, mientras que aquellos que presentaban coloración roja fueron calificados como negativos. Los azúcares que se utilizaron fueron lactosa, maltosa, manitol, ribosa, trehalosa y sucrosa (Imagen 5).

Imagen 5

Fermentación de azúcares y prueba Ureasa



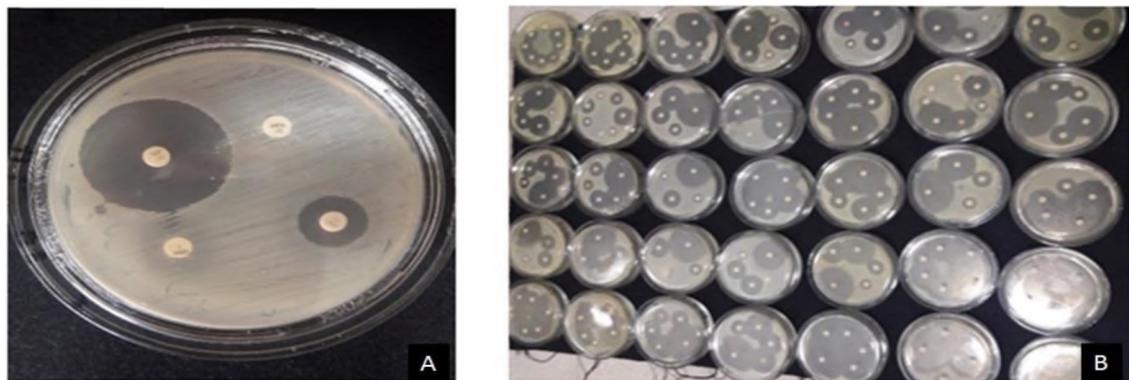
Nota: Viales sembrados con cepa en evaluación y su comparación con los controles correspondientes. Las cepas positivas a la fermentación de azúcares se observan de color amarillo, contrastante con el color rojo de los controles (medio sin sembrar). También se observa el medio ureasa cuyo control presenta color amarillo, siendo el color rojo indicativo de positividad (*S. pseudintermedius*).

3. Sensibilidad de las cepas aisladas a antibióticos

Se probó la sensibilidad a antibióticos betalactámicos, utilizando el método de difusión por discos con la técnica de Kirby-Bauer según normas de la CLSI, 28^oedición, 2018. Las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos se realizaron por el método de difusión en Agar Mueller- Hinton (Britania®). Todas las cepas fueron confrontadas con discos de Penicilina 10 UI (PEN), Cefoxitina 30 pg (FOX), Oxacilina 1 pg (OXA), Amoxicilina 20 pg /Ácido Clavulánico 10 pg (AMC) e Imipenem 10 pg (IMP) de laboratorio Britania®. La interpretación de los halos se realizó tomando en cuenta los puntos de corte de la CLSI 2018 y en el documento VETO 1-02, 2013 del CLSI para bacterias aisladas de animales, 5^o edición (Imagen 6). El disco de Oxacilina se utiliza como marcador de meticilinoresistencia en *S. psudintermedius* y el de Cefoxitina se empleautiliza en *S. aureus*.

Imagen 6

Antibiograma para betalactámicos

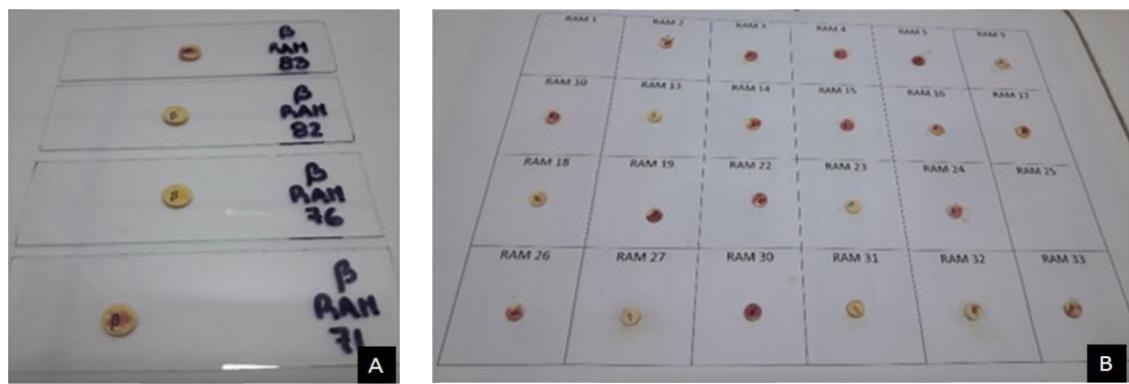


Nota: (A) Lectura de antibiograma, observándose formación de halos en algunos casos y sin formación en otros. La medida correspondiente de dichos halos o su ausencia, clasificara a la cepa estudiada como sensible, moderadamente sensible o resistente a los antibióticos testeados. (B) Placas de Petri con medio Agar Mueller- Hinton y discos de antibióticos betalactámicos evaluados para las distintas cepas.

La producción de betalactamasas se puso en evidencia con la prueba de discos de Nitrocefín (BD BBL™ DrySlide Nitrocefin- Becton Dickinson®). (Imagen 7). Como control de calidad interno se utilizaron *Staphylococcus aureus American Type Culture Collection* (ATCC) 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Imagen 7

Prueba de producción de betalactamasas.



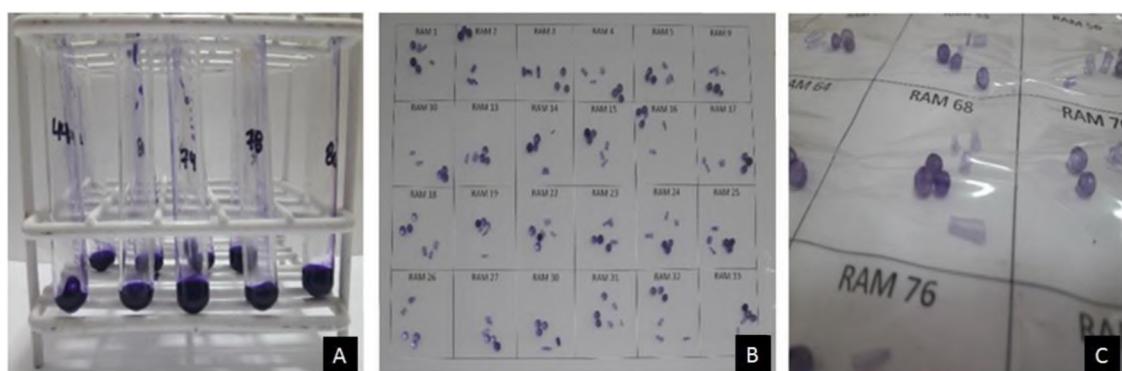
Nota: (A) Portaobjetos contenido los discos de Nitrocefín impregnados con colonias bacterianas tomadas de medios solidos sembrados. (B) Presentación del resultado de la prueba en las cepas evaluadas para la producción de betalactamasas. Se observa una reacción positiva en los discos teñidos de color rojo, mientras que los negativos se observan sin cambio de coloración.

4. Producción de biofilm

La determinación de producción de biofilm se realizó por inoculación en medio TSA caldo adicionado con 1% de glucosa con el agregado de: a) perlas de vidrio y b) capilares de plástico y posterior cultivo a 37 °C por 24 h. Para el revelado, los tubos se lavaron con solución fisiológica estéril, se fijaron con una solución de acetato de sodio al 2% y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0,1%, retirando el exceso de colorante con solución fisiológica estéril. Los resultados se expresaron como: 0- no formador, 1- levemente formador, 2- formador moderado o 3- altamente formador de biofilm. Se empleó un control negativo de medio sin inocular y un control positivo inoculado con una cepa altamente productora. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Imagen 8).

Imagen 8

Prueba de producción de biofilm



Nota: (A) Tubos de ensayo contenido el inoculo con las cepas problema, luego de incubación y lavado con solución fisiológica correspondiente, en proceso de revelado con el agregado de solución de cristal violeta al 0,1%. (B) Presentación de resultados a la prueba de las cepas en estudio, observándose distintos grados de coloración, siendo más oscura en aquellas que producen biofilm con mayor intensidad y transparentes en aquellas que no lo producen. (C) Distintas superficies utilizadas para la realización de la prueba, perlas de vidrio y capilares de plástico.

5. Conservación de las cepas

Una vez aisladas, tipificadas y realizado el perfil de sensibilidad ante los antimicrobianos se procedió a conservar las cepas. Para ello se utilizaron cultivos de 18 hs en Tripteína Soya Caldo (Britania®) que se fraccionaron en viales estériles los cuales fueron adicionados con 20% (v/v) de glicerol estéril y conservados a -20°C.

6. Análisis de datos y divulgación de resultados

Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente permitiendo su correcta interpretación. Se realizaron tablas de registro incluyendo la raza, edad, localización de las lesiones, antibióticos testeados y determinaciones bioquímicas realizadas para cada cepa. Para la interpretación de resultados obtenidos y para asociar los perfiles fenotípicos de sensibilidad de los microorganismos frente a antibióticos, se utilizaron diversas tablas estandarizadas (Tabla 1 y 2). Los resultados fueron presentados en diversas reuniones científicas locales y nacionales.

Tabla 1

(Características diferenciales de especies del género Staphylococcus

Prueba/Test	-í, ñtrifí	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>
Coagulasa	-	-	-
Ureasa	V	-	-
Producción de ác. cernina	-	-	-
ONPG	-	-	SD
PYR	-	-	-
Fermentación de lactosa	-	V	-
Fermentación de maltosa	-	d	-
Fermentación de manitol	-	V	SD
Fermentación de ribosa	-	-	-
Fermentación sucrosa	-	-	-
Fermentación trehalosa	-	-	V

Xotci: Esta tabla enumera las principales pruebas/test a realizar para poner en evidencia las características diferenciales de las diferentes especies de ECP.

(+) Positivo en el 95% de los casos - (-) Negativo en el 95% de los casos - (d) Reacción débil - (SD) Sin datos. Adaptada de "Manual of Determinative Bacteriology" por Holt J.G. 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9na Edición. Editorial Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore.

Tabla 2

Fenotipos de resistencia a betalactámicos de Staphylococcus.

Mecanismo de resistencia	Penicilina	Amoxicilina	Oxacilina	Imipenem
		davulánico	Cefoxitina	
Ninguno	S	S	S	S
Producción de p-lactamasa	R	s	S	S
Producción de PBPs	R	R	R	R
BORSA	R	S,R	R	S
MODSA	S	S	R	S

Nota: Esta tabla enlista los fenotipos de resistencia a betalactámicos de los estafilococos, evidenciados por la presentación de resistencia a diferentes antibióticos.

BORSA: hiperproducción de betalactamasas o resistencia borderline - MODSA: modificación mínima de proteínas de unión a penicilina - PBP2a: proteína de unión a penicilina 2a - (R) Resistente - (S) Sensible.

Adaptada de "Mecanismos de resistencia a antibióticos p-lactámicos en *Staphylococcus aureus*" por Castellano González, M. J; Perozo-Mena, A. J. 2010. Revista Kasmera. 38(1), 18-35.

Lugar de trabajo

El estudio se realizó en el Laboratorio del Servicio de Diagnóstico Bacteriológico y Micológico de la Cátedra de Microbiología de FCV-LTNNE, Corrientes, Argentina. Este laboratorio cuenta con el equipamiento y los materiales utilizados para realizar el proyecto (hisopos, tubos, gradillas, medios de transporte, diluyentes y de cultivo, balanza digital, autoclaves, estufas de secado, de esterilización y de incubación, placas de Petri, micropipetas automáticas de diferentes volúmenes, porta y cubreobjetos, microscopios y todos los colorante y drogas detallados anteriormente).

RESULTADOS

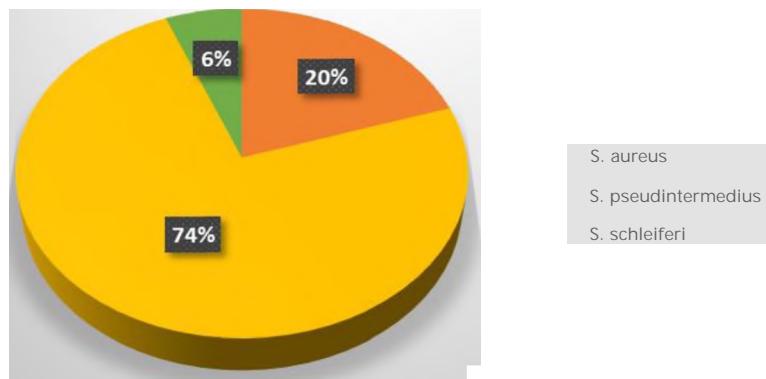
Luego del análisis y evaluación de los datos obtenidos los resultados de la investigación fueron los siguientes:

- La identificación fenotípica de las cepas arrojó un 74% de *S. pseudintermedius*, 20% de *S. aureus* y 6% de *S. schleiferi* subsp *coagulans* (Gráfico 1). Las pruebas que se ensayaron no fueron concluyentes en un 100%, presentándose algunas inconsistencias en las pruebas de ureasa, Voges-Proskauer, ONPG, PYR.

Gráfico 1

Frecuencia de Estafilococos aislados

Frecuencia de Estafilococos aislados



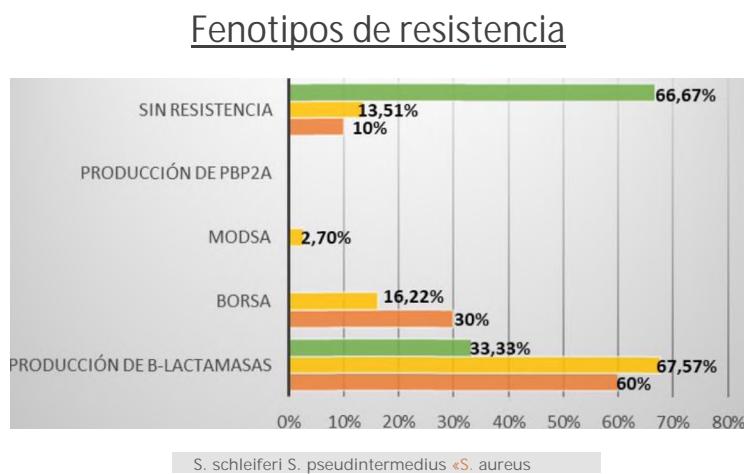
Nota: El gráfico representa la prevalencia de las distintas especies de estafilococos coagulasa positivo hallados en las muestras clínicas evaluadas en para este estudio. Se observa mayor proporción de cepas de *S. pseudintermedius* respecto a las otras dos especies aisladas.

- Respecto a la resistencia a antimicrobianos, un 84% de las cepas evaluadas mostró resistencia a antibióticos betalactámicos. Asimismo, si bien las especies de estafilococos estudiadas presentaron distribuciones diferentes en cuanto a los fenotipos de resistencia a betalactámicos, la producción de betalactamasas es el mecanismo más frecuente, seguido por la resistencia “borderline” a oxacilina o por hiperproducción de betalactamasas (BORSA). No se obtuvieron cepas con fenotipo debido a producción de proteína fijadora de penicilina 2a (PBP2a), inducida por el gen *mecA* por lo que se recomienda un estudio molecular para descartar la presencia del gen.
- De las 10 cepas de *S. aureus* evaluadas, 60% presentó el fenotipo de resistencia por producción de betalactamasas y 30 % fenotipo BORSA, mientras que un 10% no presentó mecanismos de resistencia. Asimismo, de las 37 cepas de *S. pseudintermedius*

analizadas, 67,57% mostraron fenotipo de resistencia por producción de betalactamasas, 16,22% fenotipo BORSA y 2,70% fenotipo compatible con la modificación de proteínas fijadoras de penicilina (MODSA). 13,51% no presentaron resistencia. En cuanto a las 3 cepas de *S. schleiferi* subsp *coagulan*33, 33% presentaron fenotipo de resistencia por producción de betalactamasas, mientras que un 66,67% no presentó resistencia (Gráfico 2).

Gráfico 2

Fenotipos de resistencia



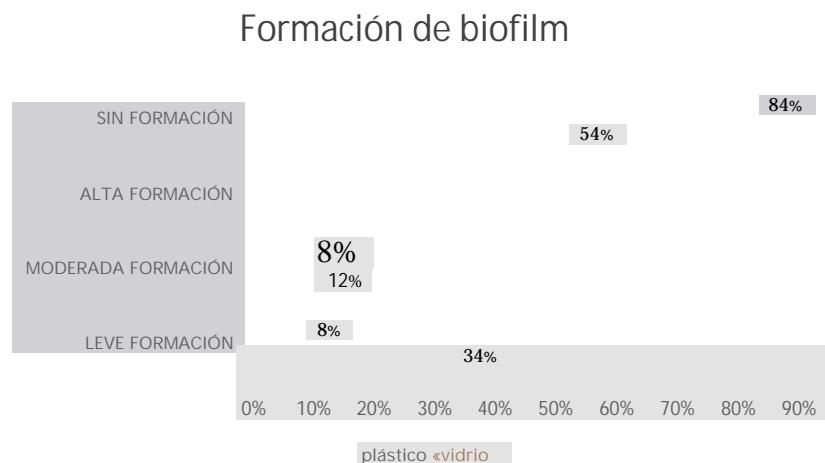
Nota: 1) Esta tabla permite observar en forma proporcional la presentación de cada uno de los fenotipos de resistencia de estafilococos a antibióticos betalactámicos discriminados por especie. El fenotipo que provoca resistencia por producción de betalactamasas es el más prevalente entre las cepas evaluadas en este estudio

BORSA: Hiperproducción de betalactamasas o resistencia borderline - MODSA: Modificación mínima de proteínas de unión a penicilina - PBP_{2a}: protema de unión a penicilina 2a

- Del total de cepas estudiadas el 46% formó biofilm en superficie de vidrio, mientras que solo un 16% formó biopelícula en superficie de plástico. Un 34% de las cepas se clasificó como levemente formadora de biofilm en superficie de vidrio, y un 8% en plástico. Asimismo 12% de las cepas presentaron una producción moderada en vidrio, y un 8% en plástico (Gráfico 3)

Gráfico 3

Formación de biofílm



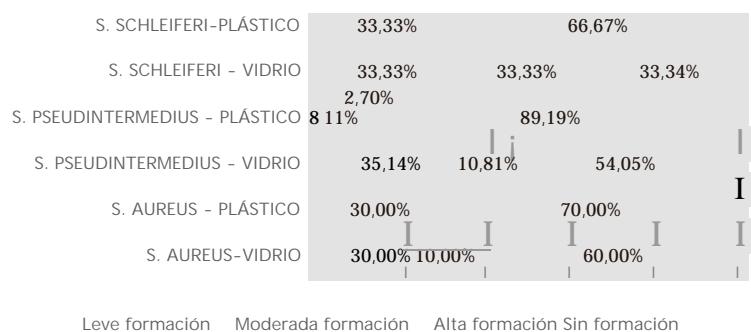
Nota: Esta tabla muestra las distintas categorías en las que se pueden clasificar las cepas sometidas a la prueba de fonnación de bifilm discriminando además por superficie utilizada. Como puede apreciarse la mayor parte de las cepas productoras, formaron la biopelícula sobre vidrio y con intensidad leve en contraste con la pequeña proporción que la formó sobre plástico.

- De las 37 cepas de *S. pseudintermedius* 45,95 % formaron biofilm en superficie de vidrio en menor o mayor intensidad (35,14 % levemente formadoras, 10,08% formadoras moderadas), mientras que el 54,05% fueron no formadoras de biofilm. Por otro lado, sólo el 10,81 % de las cepas de *S. pseudintermedius* fue capaz de formar la biopelícula sobre plástico con distinta intensidad (8,11% levemente formadoras, 2,70% formadoras moderadas) con un 89,19 % de cepas no formadoras.
- De las 10 cepas de *S. aureus* 40% fueron productoras de biofilm en superficie de vidrio (30% levemente formadoras y 10% formadoras moderadas) con un 60 % de cepas no formadoras. En cuanto a la formación de biopelícula en plástico, el 30 % resultaron positivas y formadoras moderadas de bofilm, con un 70 % de cepas no formadoras.
- De las 3 cepas de *S. schleiferi subsp coagulans* el 66,66 % formaron biofilm en superficie de vidrio (33,33 % levemente formadoras, 33,33% formadoras moderadas), mientras que el 33,34% fueron no formadoras de biofilm. Por otro lado, sólo el 33,33 % de las cepas de fue capaz de formar la biopelícula en forma moderada sobre plástico y un 66,67 % no forman biofilm en esta superficie.
- Estos resultados evidencian que no existen diferencias entre ambas especies en la proporción de cepas productoras de biofilm sobre superficie de vidrio ni en la

intensidad en la que la sustancia se produce. Por otro lado, *S. aureus* superó a *S. pseudointermedius* en cuanto a la cantidad de cepas productoras de biopelícula sobre plástico; mientras que, en cuanto a la intensidad, la única cepa que resultó altamente formadora de biofilm fue de la especie *pseudointermedius*. La formación de biofilm depende de la superficie en la cual se desarrolla la cepa observándose que se adhieren mejor al vidrio que al plástico (Gráfico 4).

Gráfico 4

Producción de biofilm por especie y superficie



Producción de biofilm por especie de ECP y superficie

Nota: Esta tabla relaciona las distintas categorías en que se pueden clasificar las cepas luego de la prueba de producción de biofilm, las superficies sobre las que pueden formarlo y las especies de estafilococos que lo producen. Se observa que, en las 3 especies de estafilococos, la mayor producción de biofilm en superficie de vidrio es de intensidad leve, mientras que en la superficie de plástico es moderada, con excepción del *S.pseudointermedius* en la que predomina la formación leve.

- 40% de los *S. aureus*, 54% de los *S. pseudintermedius* y 33,33% de *S. schleiferi* subsp *coagulans* evaluados, presentan alguno de los fenotipos de resistencia mencionados sumado a la capacidad de producir biofilm incrementando así su virulencia. Al ser la producción de biofilm un factor de patogenicidad importante, se debe resaltar la diferencia en la formación de esta biopelícula en ambas especies, debiéndose extremar las medidas de asepsia y desinfección en las diferentes superficies.
- El 68% de las cepas analizadas provinieron de muestras tomadas de infecciones de piel de caninos, mientras que el 32% fueron tomadas de conducto auditivo externo.

DISCUSIÓN

El análisis de los datos obtenidos en el presente trabajo refleja a la especie *S. pseudintermedius* como el patógeno más frecuente de las infecciones por estafilococos, situación que es descripta por varios autores, entre ellos Morris (2017), Ríos (2015) y Olivera (2015), quien además menciona que la presentación clínica más frecuente es la pioderma, seguida por la otitis externa.

Olivera (2015) señala que si bien *S. pseudintermedius* era una bacteria sensible a la mayoría de los antibióticos que se utilizaban en veterinaria y tradicionalmente se ha tratado empíricamente con antibióticos betalactámicos, macrólidos o sulfonamidas potenciadas, recientemente ha surgido un patrón de resistencia a múltiples fármacos. Castellano González (2010) reporta una resistencia a penicilina del 90% en cepas de *S. aureus* debida a la producción de penicilinas (P-lactamasas), identificándolo como fenotipo de resistencia predominante, situación coincidente con lo hallado en este estudio respecto de las 3 especies de estafilococos analizadas. Este patrón de resistencia implica la inactivación de penicilina G, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas. Es importante destacar que las penicilinas son inactivadas por los inhibidores de P-lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam), por lo cual se indica para el tratamiento de estas infecciones, las combinaciones de un betalactámico más un inhibidor, las cefalosporinas y carbapenemes, como lo señala Ardanuy (2011).

En concordancia con la proporción hallada respecto del segundo y tercer fenotipo de resistencia a betalactámicos en este estudio, Cavalieri (2005) refiere que con poca frecuencia el *S. aureus* tiene concentraciones inhibitorias mínimas de oxacilina que se

encuentran cerca del límite de interpretación de resistencia, conocidas como BORSA y no portan el gen *mecA*. Castellano González (2011) describe a las cepas BORSA como hiperproductoras de betalactamasas, lo que hace que oxacilina y meticilina, que fueron desarrolladas para resistir la acción hidrolítica de la penicilinasa, sean lentes, aunque apreciablemente degradadas, presentando una resistencia límite a oxacilina, siendo sin embargo sensibles a las asociaciones de betalactámico con inhibidor de betalactamasa (ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam), cefalosporinas y carbapenemes como lo indica Ardanuy (2011). Asimismo, Cavalieri (2005) describe la presentación rara de cepas MODSA en las cuales hay una modificación de PBPs (1,2 y 4) que no ligan la oxacilina de manera eficiente. Del mismo modo Castellano González (2011) se refiere a estas cepas como de baja afinidad por los betalactámicos, no productoras de betalactamasas y con resistencia a meticilina de bajo nivel debido a la hiperexpresión PBPs o la consecuencia de mutaciones genéticas que alteren la afinidad de la proteína final por el antibiótico. Las cepas MODSA muestran sensibilidad ante cefalosporinas, carbapenemes, combinaciones de penicilina más inhibidor de betalactamasas y penicilinas.

Respecto al fenotipo de resistencia asociado a la producción de proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a) o resistencia intrínseca a meticilina asociada a la presencia del gen *mecA*, si bien en el presente estudio no se han detectado cepas, es mencionado por diversos autores con presentación en proporciones significativas. Así, por ejemplo, Morris (2017) señala que la prevalencia de resistencia a meticilina de *S. aureus* aislado de clínicas veterinarias fue aproximadamente del 25-35%, mientras que *S. pseudintermedius* y *S. schleiferi* documentaron una prevalencia de cerca del 30% y 50% respectivamente, aumentando sustancialmente durante la última década. Del mismo modo Ríos (2015) indica una prevalencia de *S. pseudintermedius* en perros sanos que oscila del 0 al 7%, del 3 al 8% en perros de refugio, y del 7 al 66% en perros con piodermas.

La importancia de la detección de este fenotipo de resistencia está dada por varias circunstancias que se describen a continuación. En primer lugar, Ríos (2015) indica que, en los *Staphylococcus*, el gen *mecA* se localiza en un elemento genético móvil que puede ser transferido a otro de la misma o diferente especie, creando una nueva cepa resistente a la meticilina; Castellano González (2011) añade que las cepas que son resistentes a meticilina por este mecanismo, lo son también a todos los betalactámicos,

incluyendo las penicilinas, cefalosporinas (a excepción de las nuevas cefalosporinas ceftobiprol y ceftarolina) y carbapenemes; y por último Morris (2017) señala que los estafilococos resistentes a meticilina con frecuencia exhiben corresistencia a antimicrobianos no betalactámicos como clindamicina, eritromicina, fluoroquinolonas, gentamicina y tetraciclina por medio de mecanismos no relacionados con el *mecA*. Es por lo antes expuesto que en este trabajo se recomienda un estudio molecular para descartar la presencia del gen *mecA* en las cepas analizadas.

En cuanto al tratamiento de infecciones producidas, Morris (2017) refiere que los estafilococos resistentes a meticilina no son necesariamente más virulentos que los estafilococos susceptibles, aunque su tratamiento representa un desafío clínico debido a la resistencia multidroga de estos microorganismos. Olivera (2015), Morris (2017) y Ríos (2015) coinciden en que el cloranfenicol, la rifampicina y los aminoglucósidos - en particular amikacina- podrían ser los antimicrobianos sistémicos más efectivos para el tratamiento de la piodermia causada por estafilococos resistentes a múltiples drogas. Linezolid y vancomicina comúnmente utilizados para tratar las infecciones graves causadas por *S. aureus* meticilino resistentes en las personas, deberían evitarse en los animales.

Debido a que las opciones terapéuticas citadas anteriormente pueden causar efectos adversos graves (hepatotoxicidad, mielosupresión, nefrotoxicidad, ototoxicidad, entre otros) por su uso sistémico, Kennis (2017) y Olivera (2015) señalan la importancia de adoptar el tratamiento bacteriano tópico, ya no solo como tratamiento adyuvante con agentes elegidos de forma empírica o en función de los resultados del cultivo y antibiograma, sino como tratamiento primario contra cepas resistentes a múltiples drogas. Los más utilizados y efectivos en forma de champú son el peróxido de benzoilo (al 2,5-3%), la clorhexidina (0,5-4%) o el lactato de etilo (10%), indicados para aquellos casos con infecciones cutáneas generalizadas. Asimismo, se mencionan a la mupirocina (ungüento al 2% y solución al 1%), el ácido fusídico (ungüento, crema o gel) y la amikacina (solución al 1%) para infecciones localizadas.

Otra particularidad importante en la patogénesis de las infecciones y la capacidad de sobrevivir y persistir en el ambiente que presentan estas especies es la de formar biopelículas. Giacoboni (2020) explica la importancia de esta característica en el desarrollo de infecciones crónicas y en la complicación del tratamiento debido a la disminución de la eficacia de los agentes antimicrobianos. Asimismo, menciona

coexistencia de genes de virulencia y de resistencia que presentan estas especies comensales, situación que se comprobó en este estudio en un 30 a 55% de las 3 especies estudiadas representando potenciales patógenos altamente virulentos y resistentes.

Ortega Peña (2018) estima que aproximadamente el 65% de las infecciones bacterianas son causadas por bacterias creciendo en forma de biopelículas. Asimismo, refiere que tradicionalmente, las pruebas de sensibilidad antimicrobiana en bacterias patógenas se han realizado determinando la sensibilidad antimicrobiana de bacterias creciendo en forma libre; no así para microorganismos creciendo en biopelículas, no siendo los resultados extrapolables. Es por ello que es importante realizar pruebas para determinar la producción de biofilm como la realizada en el presente trabajo.

La manera de erradicar el biofilm sigue representando un verdadero reto según Ortega Peña (2018) debido a los cambios fisiológicos, metabólicos y bioquímicos que sufren los microorganismos cuando crecen rodeados por una matriz extracelular y muchos de los resultados descritos sobre la actividad antibiopelícula son controversiales, ya que existen muy pocos estudios clínicos controlados que respalden los resultados que se han encontrado en los estudios in vitro.

CONCLUSIÓN

Si bien los estafilococos son parte de la microbiota normal de piel y mucosas, pueden convertirse en patógenos importantes en infecciones de piel y/o conducto auditivo en caninos. Es por ello que luego de cumplimentar los objetivos propuestos, se concluye que la tipificación correcta de ECP en cepas locales, el conocimiento de sus perfiles de sensibilidad y factores de virulencia como la formación de biofilm, son de gran importancia en clínica veterinaria para la prescripción de un tratamiento y la evolución del paciente. Asimismo, el potencial zoonótico de estas especies, sumada a la creciente resistencia antimicrobiana debida a la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos y al desarrollo de factores de virulencia, constituyen una amenaza constante para el ámbito de la salud pública, un reto a nivel del laboratorio y la terapéutica veterinaria y justifican el análisis realizado en este trabajo.

Los datos obtenidos, que muestran un elevado porcentaje de resistencia a betalactámicos y en particular la provocada por producción de betalactamasas, dejan en evidencia la importancia de indicarse rutinariamente un antibiograma. La penicilina considerada tradicionalmente como una droga de primera línea y de amplio uso (presenta una buena disponibilidad con relación a otros antimicrobianos, dado su bajo costo y su toxicidad selectiva) ya no sería una opción viable para estos casos, prefiriéndose las combinaciones de penicilina más inhibidores de betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) y cefalosporinas. Del mismo modo, el reconocimiento del papel de la terapia antimicrobiana sistémica en la selección y posterior colonización del paciente, por parte de cepas con los distintos fenotipos de resistencia evaluados, podrían otorgar mayor relevancia al tratamiento tópico en el manejo de la piodermia canina, en especial en aquellas infecciones localizadas y leves.

Vigilar estas resistencias y reunir una base de datos locales nos permitirá preservar la efectividad de los antimicrobianos en el tratamiento de infecciones y podrían constituir

un aporte fundamental cuando el Médico Veterinario decida instaurar un tratamiento empírico, ya que muchas veces los datos de otras regiones no son extrapolables a la realidad local.

BIBLIOGRAFÍA

1. ARDANUY C, CERCENADO E, MOROSINI MI, TORRES C. SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. 2011. Detección Fenotípica de Mecanismos de Resistencia en Gram positivos.
2. HOLT J.G. 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9^{na} Edición. Editorial Lippincott Williams and Wilkins. Baltimore.
3. BOONE, D.R; CASTENHOLZ, RW; GARRITY, G.M. 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2^{da} Edición. Editorial Springer-Verlag. New York.
4. CASTELLANO GONZÁLEZ, M. J; PEROZO-MENA, A. J. 2010. Mecanismos de resistencia a antibióticos (3-lactámicos en *Staphylococcus aureus*. Revista Kasmera. 38(1), 18-35.
5. CASTELLANOS, I; RODRIGUEZ, G; SANTOS, R. 2011. Aislamiento e identificación bioquímica de microorganismos bacterianos a partir de infecciones de piel en caninos. Revista MedVet. 22, 21-30.
6. CAVALIERI, S.J; HARBECK, R.J; MCCARTER, Y.S; ORTEZ, J.H; RANKIN, I D; SAUTTER, R.L; SHARP, S E; SPIEGEL, C.A. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.
7. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2013. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for bacteria isolated from animáis. Second Informational supplement. CLSI document VET01-S2. Wayne, Pensilvania.
8. CLINICAL AND LAB ORAT ORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2019. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility test for Bacteria that Grow Aerobically. 29th edition. CLSI document M100. Wayne, Pensilvania.

9. DENAMIEL, G; PUIGDEVALL, T; MÁS, J; ALBARELLOS, G; GENTILINI, E. 2009. Prevalencia y perfil de resistencia a betalactámicos en estafilococos de perros y gatos. *Revista InVet.* 11(2), 117-122.
10. DEVRIESE, L. A; VANCANNEYT, M; BAELE, M; VANEECHOUTTE, M; DE GRAEF, E; SNAUWAERT, C; CLEENWERCK, I; DAWYNDT, P; SWINGS, J; DECOSTERE, A; HAESEBROUCK, F. 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animáis. *Revista Int J Syst Evol Microbiol.* 55(4), 1569-1573.
11. FERNANDÉZ OLMOS, A; GARCÍA DE LA FUENTE, C; SAÉNZ NIETO, J. A; VALDEZATE RAMOS, S. SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.
12. GIACOBONI, G. I; GAGETTI, P. 2020. *Staphylococcus pseudintermedius* y el enfoque de Una Salud. *Revista ANALECTA Veterinaria.* 40 (2).
13. KADLEC, K; SCHWARZ, S. 2012. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Revista Vet Dermatol.* 23(4), 276-282.
14. KENNIS, R.A. (2017). Tratamiento tópico de la pyoderma resistente a drogas en pequeños animales. Editorial Intermédica. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 38-47
15. MORRIS, D.O. (2017). Estafilococos con Resistencia a los antimicrobianos en pequeños animales. Editorial Intermédica. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 19-37
16. OLIVERA, A. 2015. Pioderma canina: el problema de la resistencia a la meticilina. *Revista Veterinary Focus.* 25(2), 29-35.
17. ORTEGA PEÑA, S; HERNÁNDEZ ZAMORA, E. 2018. Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín Médico Hospital Infantil de México.* 75, 79-88.
18. RÍOS, A.M; BAQUERO, M R; ORTIZ, G; AYLLÓN, T; SMIT, L; RODRÍGUEZ DOMINGUEZ, M; ET AL. 2015. *Staphylococcus* multirresistentes a los antibióticos y su importancia en medicina veterinaria. Research: <https://www.clinvetpean.com/index.php>. 35 (3), 149-161.
19. RUBIO, M R; BOGGIO, J.C. 2009. Farmacología veterinaria. 2^{da} Edición. Editorial de la Universidad Católica de Córdoba. Córdoba, Argentina. 513-525.

20. SCOTT, D.W; MILLER, W.H; GRIFFIN. 2002. Dermatología en pequeños animales. Editorial Intermédica. Buenos Aires. 246-247, 323-325, 1094-1100.
21. WEESE, JS; VAN DUUKEREN, E. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. Revista Veterinary Microbiology 140 (3), 418-429.