

Facultad de Cs. Veterinarias
Universidad Nacional del Nordeste
**PROYECTO DE TRABAJO FINAL DE
GRADUACIÓN**



OPCION: Clinica de Pequeños Animales

TEMA: "Eficacia antimicrobiana de dos biocidas contra cepas de *Staphylococcus* Coagulasa Positivos Meticilino Resistentes aisladas de caninos"

TUTOR INTERNO: Boehringer, Silvia Irene

TUTOR EXTERNO: Amable, Valeria Inés

APELLIDO Y NOMBRE DEL AUTOR: Sosa, Daiana Mariel

EMAIL: daisosa96@outlook.com

-AÑO 2.022-

DEDICATORIA:

Este trabajo es dedicado a mi mamá, por incentivarnos siempre a formarnos, educarnos y avanzar a pesar de los obstáculos y progresar por uno mismo.

A mis abuelos por la eterna satisfacción de que me hayan visto llegar hasta acá.

A mis hermanos, mis pilares de vida.

A mi papá por el sustento durante todos estos años.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco profundamente a mi Directora y Co-directora de la beca por su predisposición, acompañamiento, comprensión y tiempo dedicado desde el primer día.

A mi razón de ser, mi mamá, por el aliento, la confianza y cada una de sus oraciones.

A mi familia por el apoyo y acompañamiento.

A mis dos ángeles de luz, India y Mila, por llegar en el momento indicado, por ser mi refugio y mi paz. Por el apoyo diario y los abrazos que reinician.

A mis amigos y a cada persona con la que me cruce a lo largo de estos años, por las enseñanzas y acompañamiento eterno.

A Dios y la Virgen María, por darme paz y fortaleza en los momentos de flaqueza, por regalarme esto y no soltarme la mano.

INDICE:

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 4 |
| INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| Pioderma canino..... | 5 |
| Clasificación..... | 5 |
| Otitis externa canina..... | 7 |
| Staphylococcus intermedius..... | 8 |
| Resistencia antimicrobiana..... | 9 |
| Desinfectantes químicos..... | 11 |
| Mecanismos de resistencia a antisépticos y microbianos..... | 13 |
| Mecanismo de resistencia bacteriana adquirida..... | 13 |
| Hipotesis..... | 14 |
| Objetivos..... | 14 |
| ORIGEN Y FUNDAMENTO..... | 15 |
| MATERIALES Y METODOS..... | 18 |
| RESULTADOS Y DISCUSION..... | 21 |
| CONCLUSION..... | 27 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 28 |

I. RESUMEN:

Staphylococcus es un género de cocos Gram positivos que se divide en dos grandes grupos, según su capacidad para coagular el plasma: *Estafilococos Coagulasa Positivos (ECP)* y *Negativos (ECN)*.

Las infecciones producidas por los primeros son, usualmente, tratadas con antibióticos betalactámicos. Sin embargo, algunos aislamientos presentan modificación de las proteínas de unión a penicilinas (PBPs) convirtiéndolos en Estafilococos Meticilino Resistentes (EMR).

El *S. pseudintermedius* pertenece a la flora residente normal de la piel y mucosas de perros, siendo aislado con frecuencia desde las uniones mucocutáneas orales, nasales, genitales y anales. *S. pseudintermedius* puede causar infecciones asociadas a pioderma, otitis, infecciones de las vías urinarias, heridas, infecciones post quirúrgicas y septicemia, esta bacteria se convierte en un agente patógeno cuando el equilibrio del ecosistema cutáneo se ve perturbado por los cambios en el microambiente.

La resistencia de estafilococos a antimicrobianos muchas veces se acompaña de una mayor resistencia a biocidas utilizados en los protocolos y estrategias de aplicación de estas sustancias químicas en centros de medicina veterinaria. Esta resistencia a los agentes antimicrobianos puede ser intrínseca, por una característica propia del microorganismo, o adquirida, debido a la mutación o a la incorporación de material genético en forma de plásmidos o transposones.

El uso indiscriminado de los antibióticos y la presión selectiva ambiental realizada por antisépticos y desinfectantes, ha generado una respuesta de supervivencia en los microorganismos que los capacita para evadir con eficiencia la acción bactericida de algunos agentes químicos.

II. INTRODUCCIÓN

Pioderma canino

El pioderma canino (PC) se define como la infección bacteriana de la piel producida por la interrupción en el equilibrio del ecosistema cutáneo, debido a la multiplicación bacteriana en la epidermis y/o invasión de la dermis (Ihrke, 1996).

El pioderma canino generalmente se produce como consecuencia de causas subyacentes como heridas, ectoparásitos, enfermedades metabólicas y/o inmunológicas (Muller, et al., 2001); por lo que tradicionalmente su manejo se ha basado en la identificación y tratamiento de éstas apoyado por una terapia antimicrobiana, ya sea sistémica y/o tópica.

A nivel mundial el PC es una de las enfermedades de la piel más diagnosticada (Ihrke, 1996; Gortel, 2013), desconociéndose las razones de esta alta frecuencia en los caninos comparado a otros mamíferos. Se ha descrito que algunas características de la piel canina podrían ser potenciales factores, tales como un estrato córneo delgado y compacto, escasez de material lípidico intracelular, ausencia de un tapón epitelio-escamoso de lípidos en la apertura u ostium de los folículos y un pH relativamente elevado, dando lugar a una barrera epidérmica menos eficaz (Ihrke, 1996).

Clasificación:

El PC se clasifica de acuerdo a tres criterios principales: 1) Según la profundidad de la infección en superficial y profundo; 2) el agente etiológico 3) si la causa es primaria o secundaria (Schroeder, s.f.). La gran mayoría de los PC son superficiales, siendo las infecciones bacterianas más comunes y también relativamente más sencillos de tratar. El pioderma superficial se caracteriza por la presencia de pápulas, pústulas, costras focales, collaretes epidérmicos, apariencia de “manto apolillado” y prurito (ver Fig. 1 y 2). Los piodermas profundos son menos frecuentes y a menudo más difíciles de tratar. Los signos más comunes son furunculosis, celulitis, alopecia, exudado sanguinolento purulento, ulceraciones, fiebre y septicemia (ver Fig. 3). La clasificación basada en la profundidad de la infección tiene gran importancia clínica debido a que a mayor profundidad de la lesión más agresivo debe ser el tratamiento de la enfermedad de base. También le permite al clínico evaluar el pronóstico y decidir la naturaleza, duración y dosis de la terapia antimicrobiana (Cobb et al., 2005; Ihrke, 2007).

La clasificación etiológica se refiere al organismo patógeno implicado en la infección.

La microbiota de la piel se compone de bacterias residentes y transeuntes, y el pioderma

se desarrolla cuando existe un sobrecrecimiento o colonización por parte de algunas de ellas (Ihrke, 1996).



Fig. 1: Erupción papular, pústulas interfoliculares y costras en un cachorro con pioderma superficial en la zona ventral (Balazs, 2012).



Fig. 2: Lesión típica de una pioderma superficial con la presencia de collaretes epidérmicos, pápulas y prurito (Balazs, 2012).



Fig. 3: Pioderma profunda del pastor alemán con presencia de tejido erosionado y costras focales (Balazs, 2012)

Otitis externa canina:

La otitis de localización externa es la principal causa de morbilidad del canal auditivo en el perro, y se caracteriza por un cuadro inflamatorio de tipo crónico o agudo del epitelio que se encuentra en el meato auditivo externo (Manzuc, 2011). La otitis externa involucra al pabellón auricular, canal vertical y/o horizontal (Manzuc, 2011; Arévalo y Arpi, 2015). La signología de esta patología cursa con inflamación, aumento significativo de descarga auricular, prurito y dolor (Soler et al., 2000; Arévalo y Arpi, 2015) (Ver Fig.4). La alteración del microclima del conducto auditivo externo es un factor predisponente, y esto ocurre, cuando existen variaciones climáticas (temperatura y humedad), anatómicas (la estructura del pabellón auricular) o por ciertas enfermedades sistémicas (disturbios en la piel y endócrinos) (Soler et al., 2000; Arévalo y Arpi, 2015). Todas estas alteraciones, si bien no inducen directamente la otitis, facilitan la colonización del conducto auditivo externo por agentes patógenos u oportunistas (Soler et al., 2000; Arévalo y Arpi, 2015). Estos factores predisponentes generan los cuadros inflamatorios auriculares y son los culpables para que se desarrolle el curso de la enfermedad (Manzuc, 2011; Arévalo y Arpi, 2015). Generalmente en esta patología se observan afecciones microbianas mixtas, infecciones bacterianas

(principalmente cocos) y hongos (Arévalo y Arpi, 2015). Las bacterias que se aislan con mayor frecuencia en estos cuadros de otitis externas en el perro, son los estafilococos coagulasa positivos (*S. aureus*, *S.intermedius*, *S. pseudointermedius*, *S. schleiferi subsp coagulans*) (Manzuc, 2011; Arévalo y Arpi, 2015).

El progreso de esta enfermedad con el tiempo puede originar cambios irreversibles sobre la epidermis, dermis y folículos pilosos de la piel que conforman el conducto externo del oído; originando la inhibición de la migración epitelial normal, mayor acumulación de secreciones y proliferación de microorganismos (Manzuc, 2011). Sumado a estos factores, se adicionan aquellos que son perpetuantes, que aparecen después del estado inflamatorio auricular y ocasionan la cronicidad de la enfermedad (Arévalo y Arpi, 2015).



Fig. 4: Otitis externa en canino con unas lesiones típicas de inflamación, eritema, cerumen y mucho prurito (Manzuc, 2011).

Staphylococcus intermedius:

En el año 2005, el *Staphylococcus intermedius*, una especie coagulasa positive conocido como el agente causal de la mayoría de los PC, fue reclasificado en tres especies genéticamente similares: *S. intermedius*, *S. pseudointermedius* y *S. delphini* (Bannoehr et al., 2007), las cuales se reúnen en un grupo genéticamente homogéneo denominado *Staphylococcus intermedius Group* (SIG).

El *S. pseudintermedius* pertenece a la flora residente normal de la piel y mucosas de perros, siendo aislado con frecuencia desde las uniones mucocutáneas orales, nasales, genitales y anales (May, 2006). *S. pseudintermedius* puede causar infecciones asociadas a pioderma, otitis, infecciones de las vías urinarias, heridas, infecciones post quirúrgicas y septicemia (van Duijkeren et al., 2011; Cain, 2013) (Ver Fig. 5).

Esta bacteria se convierte en un agente patógeno cuando el equilibrio del ecosistema cutáneo se ve perturbado por los cambios en el microambiente. Estos trastornos de la superficie y ecosistema de la piel ocurren debido a enfermedades de base, tales como las dermatosis parasitarias, alérgicas y/o enfermedades metabólicas, las cuales provocan prurito, lamidos y auto traumatismo, favoreciendo la colonización de *S. pseudintermedius*. Estas condiciones subyacentes también predisponen a la aparición del PC debido a un compromiso del sistema inmune, facilitando las infecciones cutáneas (Ihrke, 2007).

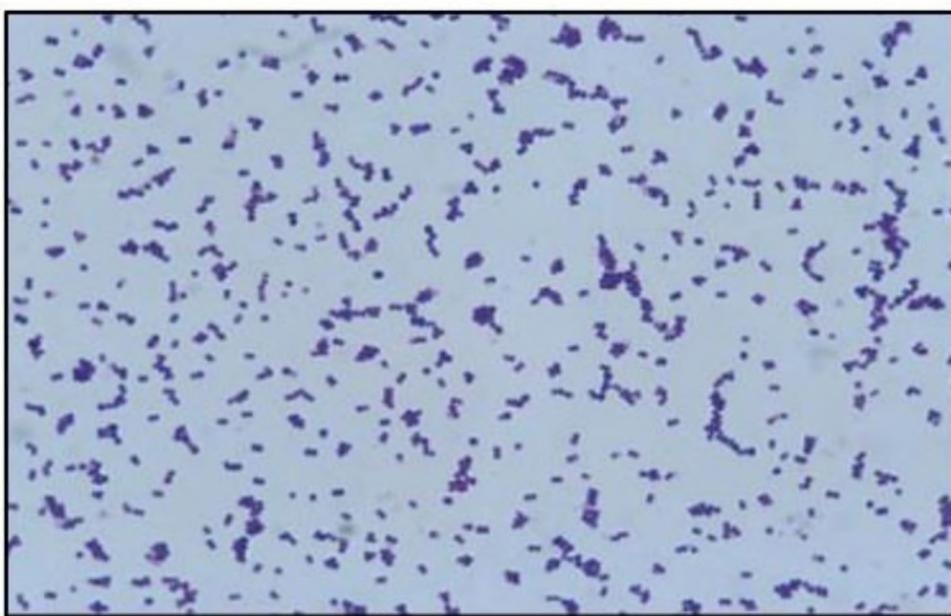


Fig. 5: Frotis de una colonia de *S. pseudintermedius* con tinción Gram (Markey et al., 2013).

Resistencia antimicrobiana:

La resistencia microbiana de los estafilococos a la meticilina está mediada por el gen *mecA*, el que codifica la expresión alterada de una proteína de unión a penicilina (PBP2a), disminuyendo la afinidad a la penicilina (Lim y Strynadka, 2002). Los antibióticos β -lactámicos, normalmente impiden el crecimiento bacteriano mediante la

inactivación de las transpeptidasas bacterianas, las que son necesarias para la síntesis del material de la pared celular. Como tal, la bacteria que expresa PBP2a puede catalizar la reacción de transpeptidación requerida para el entrecruzamiento de los peptidoglicanos, lo que permite la síntesis de la pared celular en presencia de antibióticos (Lim y Strynadka, 2002). La resistencia a la meticilina es de particular importancia porque la expresión de PBP2a confiere resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos incluyendo penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes (Cain, 2013). El gen *mecA* reside en el Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) y se puede transferir genéticamente tanto horizontal como verticalmente entre las diferentes especies de *Staphylococcus* (Black et al., 2009; van Duijkeren et al., 2011; Casagrande Proietti et al., 2012).

El primer aislamiento documentado de *S. pseudintermedius* que contenía el gen de resistencia a meticilina *mecA* (MRSP), fue realizado en 1999 (Gortel, 1999). A partir de ese descubrimiento, las infecciones causadas por MRSP han sido diagnosticadas con mas frecuencia. Aunque el uso de la meticilina está obsoleto y ya no se encuentra disponible comercialmente en muchos países, se continúa utilizando la sigla MRSP para nombrar las cepas de *Staphylococcus* resistentes a este grupo de antimicrobianos (van Duijkeren et al., 2011).

Actualmente se utiliza el antibiótico oxacilina para determinar la resistencia del *S. pseudintermedius*, ya que es un antibiótico de mayor estabilidad a las condiciones ambientales y de almacenamiento; y tambien in vitro aumentando las posibilidades de detectar cepas multirresistentes (van Duijkeren et al., 2011).

La resistencia a la meticilina con frecuencia está asociada a la multirresistencia microbiana. Un estudio que analizó 70 perfiles de resistencia de *S. pseudintermedius*, demostró que el 100% de los aislamientos tenían un fenotipo de multirresistencia a los antimicrobianos (Casagrande Proietti et al., 2012). Estudios sugieren que *S. pseudintermedius* puede adquirir genes de resistencia a los antimicrobianos a través de elementos genéticos móviles, los que pueden desempeñar un papel importante en la diseminación de la resistencia a múltiples antimicrobianos. Hoy en día existen reportes de altas tasas de resistencia a antimicrobianos no β -lactámicos, incluyendo: macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas, fluoroquinolonas, sulfonamidas potenciadas y aminoglucósidos (Casagrande Proietti et al., 2012; Cain 2013).

Debido a que se ha descrito que más del 90% de los casos clínicos de PC son causados por *S. pseudintermedius*, lo que sumado al uso empírico o indiscriminado de

Sosa, Daiana Mariel

antibióticos sistémicos podría originar la selección de cepas MRSP. Una vez que un PC es causado por MRSP, empieza un ciclo donde el tratamiento antibiótico empírico no funciona y favorece la persistencia del agente causal, permitiendo entonces más oportunidades de adquirir mutaciones u otros elementos transmisibles a múltiples antimicrobianos. En consecuencia, se limitan aún más las opciones de tratamiento y aumenta la tasa de resistencia microbiana impactando gravemente el área de la salud pública (Enright et al., 2002).

La adquisición y/o el intercambio de material genético horizontal, en contraste con la transmisión vertical, no requiere que los microorganismos estén relacionados filogenéticamente, siendo comúnmente de diferentes especies. Sólo requieren estar inmersos en una misma población lo que fomenta la multirresistencia característica del MRSP (Casagrande Proietti et al., 2012). En términos de evolución, esto significa que las bacterias no dependen de la mutación al azar ni transmisión genética vertical para producir una variante del gen beneficioso. Una especie podría adquirir un gen ventajoso de otra especie y el proceso de la selección natural podría comenzar a actuar de inmediato, difundiendo la nueva variante a través de las generaciones futuras. Esto se podría extrapolar considerando que cualquiera y eventualmente todas las bacterias pueden adquirir resistencia a los antibióticos (Hiramatsu et al., 2001).

Desinfectantes químicos:

La desinfección se define como la aplicación de un desinfectante a materiales y superficies para destruir los organismos patógenos. Los esquemas de clasificación dividen a los desinfectantes en agentes de bajo, intermedio y alto nivel; y a los equipos médicos en dispositivos críticos, semicríticos y no críticos (Nettleman MD, 2003)

Los desinfectantes de bajo nivel son eficaces contra bacterias vegetativas (no esporuladas), hongos y virus de la influenza. Los desinfectantes en esta categoría se utilizan en elementos no críticos que pueden tocar la piel intacta o que no tocan directamente al paciente. Los desinfectantes de nivel intermedio son efectivos contra *Mycobacterium tuberculosis* y enterovirus y generalmente se utilizan en elementos semicríticos que tocan las membranas mucosas pero que no penetran las superficies corporales. Los desinfectantes de alto nivel son efectivos contra esporas bacterianas y fúngicas y también contra organismos de nivel bajo e intermedio.

Si las superficies no se limpian y desinfectan adecuadamente, pueden ser fuente de patógenos (Kassa y cols., 2001). Por tanto, la aplicación del desinfectante es esencial

para inactivar los microorganismos que quedan en la superficie después de la limpieza (Dunsmore y Thomson, 1981).

La elección del desinfectante se debe basar, además, en si puede o no puede haber presencia de materia orgánica asociada con el biofilm (Chmielewski y Frank, 2003).

La eficacia de un desinfectante puede verse afectada por la exposición al aire, luz o agua. Es importante leer las recomendaciones del fabricante o contactarse con el mismo para garantizar la dilución apropiada y los protocolos de almacenamiento, así como para conocer la eficacia de la solución diluida. El cambio adecuado de las soluciones diluidas en botellas de spray u otros recipientes se debe basar en estas recomendaciones.

La mayor parte de las infecciones hospitalarias son causadas por bacterias. Con el fin de lograr su erradicación se emplean antibióticos, y estos muchas veces provocan cambios genéticos y procesos adaptativos a los nuevos ambientes químicos. Es así como aquellos microorganismos susceptibles a las nuevas terapias antimicrobianas se tornan resistentes y generan problemas sanitarios. Entre los microorganismos comúnmente implicados en las infecciones nosocomiales se encuentran los del género *Staphylococcus*, cuyos miembros provocan cuadros clínicos de diversa gravedad (Magariños MC, et al, 2001).

Pero además de los antibióticos existen otros compuestos químicos, los desinfectantes y antisépticos, que son igualmente importantes y eficaces para el control de las infecciones y la reducción de las tasas de incidencia hospitalarias. La pared celular de los estafilococos no parece actuar como barrera eficaz al ingreso de los antisépticos y desinfectantes, dado que algunas sustancias de alto peso molecular pueden atravesar sus paredes. Sin embargo, la plasticidad de la envoltura bacteriana puede alterar la sensibilidad a los biocidas al modificarse el espesor y el grado de entrecruzamiento del peptidoglucano (Mc Donnell G, et al, 1999). Estos compuestos tienen diferentes modos de acción y su empleo genera inconvenientes, porque las concentraciones de uso recomendadas no son eficaces y muchas veces no se tiene en cuenta dónde, cómo y contra qué agentes se emplean. Podría especularse que con el uso continuo de los antisépticos y desinfectantes se seleccionan cepas, tal como ha ocurrido con los antibióticos.

El empleo de los antibióticos selecciona directamente las variantes resistentes a los antibióticos o desinfectantes, y los elementos genéticos que confieren resistencia a los desinfectantes se hallan también presentes en los plásmidos que confieren resistencia a los antibióticos (Jeljaszewicz et al.2000).

Mecanismos de resistencia a los antisépticos y desinfectantes:

En la actualidad se ha obtenido un avance considerable en la comprensión de la respuesta de las bacterias a los bactericidas. La resistencia puede ser una propiedad natural de un organismo (intrínseca) o conseguida por mutación o adquisición de plásmidos (autorreplicación, ADN extracromosómico) o transposones (cromosomal o integrado en plásmidos, cassettes de ADN transmisibles). Los genes de resistencia naturales en plásmidos, se originan como momentos puntuales en los genes blancos (sitios de inserción de los genes de resistencia) de bacterias susceptibles y también de genes que les brindan protección contra otras bacterias (Frost LS, et al, 2005). La resistencia intrínseca se ha demostrado para bacterias gramnegativas, esporas bacterianas, micobacterias y bajo ciertas condiciones en especies del género Estafilococo.

Mecanismos de resistencia bacteriana adquirida:

Como se ha visto en los antibióticos y en los agentes quimioterapéuticos, la resistencia adquirida a los antisépticos y desinfectantes surge por mutación o por la adquisición de material genético en forma de plásmidos o transposones; Estas configuraciones permiten grandes arreglos de genes de resistencia para la mayoría de los antibióticos y desinfectantes al ser transferidos juntos en un solo evento de conjugación (Frost LS, et al, 2005).

La resistencia surge de estímulos naturales o coinciden en los cromosomas de los genes o de la adquisición de elementos genéticos extracromosomales (plásmidos o transposones) que portan los genes de transferencia (Iruka NO, et al, 2005). Los genes que codifican para estas enzimas se encuentran generalmente en elementos móviles como transposones y plásmidos, por ejemplo en *S. aureus*; algunas veces se han encontrado en el cromosoma bacteriano en *P. aeruginosa* (Prescott LM, et al, 2004). A pesar de los esfuerzos en la producción de medicamentos que pudieron resistir la acción de las betalactamasas como la cloxacilina, las bacterias alteraron el sitio blanco (PBP) y esto llevó al desarrollo de MRSA (*S. aureus* multirresistente). Se produjo entonces la tercera y cuarta generación de cefalosporinas, resistentes a las betalactamasas producidas por bacterias gramnegativas; sin embargo, con la utilización amplia, las bacterias desarrollan un mecanismo para destruir al antibiotico: las betalactamasas de espectro extendido (BLEE). A fin de contrarrestar esta acción de las bacterias se producen los carbapenemes resistentes a las BLEE, al igual que en otros casos, las

poblaciones bacterianas iniciaron la producción de carbapenemasas que hidrolizan estos quimioterapicos (Kapil A, 2005).

HIPÓTESIS:

Existen cepas de *Staphylococcus* Coagulasa Positivo Resistentes a Meticilina con resistencia acompañante a antisépticos y desinfectantes.

OBJETIVOS:

Objetivo General:

Evaluar la sensibilidad a antiséptico y desinfectante de *Staphylococcus* Coagulasa Positivos Meticilino Resistentes (SCPMR) aislados de muestras clínicas en caninos.

Objetivos específicos:

1. Establecer la sensibilidad de SCPMR a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio en distintas condiciones.
2. Establecer la sensibilidad de SCPMR a diferentes concentraciones de digluconato de clorhexidina en distintas condiciones.
3. Asociar la sensibilidad de los microorganismos frente al antiséptico y desinfectante, con los protocolos y estrategias de antisepsia y desinfección utilizadas en la clínica diaria.

III. ORIGEN Y FUNDAMENTOS:

El género *Staphylococcus* está constituido por cocos Gram positivos, inmóviles, anaerobios facultativos, catalasa positivo y oxidasa negativa.

Los *Staphylococcus* se dividen 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* sp coagulans (Castellanos, 2011; Devriese, 2005).

Los ECP presentan resistencia a varias familias de antimicrobianos y diferentes mecanismos están implicados en ello. Existen tres mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en ECP: resistencia mediada por enzimas (penicilinasas o β -lactamasas) las cuales desactivan al antibiótico al hidrolizarlo. Además, algunos estafilococos pueden expresar el fenómeno de tolerancia, en el que ocurre una disociación de las acciones inhibitoria y bactericida de los antibióticos β -lactámicos. De éstos, el mecanismo más importante, es la resistencia intrínseca debida a la presencia del gen *mecA*, que es probablemente más compleja, debido a que varios factores pueden afectar también su expresión (Castellano, 2010) constituyendo los llamados *Staphylococcus* Metilicino Resistentes (MRS).

Los antibióticos betalactámicos usualmente se utilizan en la práctica de la medicina veterinaria (Denamiel, 2015), sin embargo, los 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). La aparición de estos microorganismos multirresistentes muchas veces viene acompañada de una mayor resistencia a biocidas. Es por esto que los hospitales, clínicas y consultorios deben descontaminar adecuadamente, mediante el uso de antisépticos y/o desinfectantes, las manos, suelos, mesas, mesadas, bachas y todo material termolábil que no pueda esterilizarse por calor como termómetros, instrumentos con lentes, tubos de polietileno, catéteres, instrumental clínico reutilizable, etc. (Rutala, 1995). Los biocidas conforman una parte importante de los protocolos y estrategias que se utilizan para disminuir la adquisición y diseminación de las infecciones nosocomiales. Sin embargo, se ha documentado la ineficacia de estos compuestos en algunos procesos de

desinfección. Esto se debe a que las bacterias, como todos los seres vivos, exhiben mecanismos biológicos que las facultan para adecuarse a diferentes presiones ambientales (Cabrera, 2007). La resistencia a cualquier agente antimicrobiano puede ser intrínseca, por una característica propia del microorganismo, o adquirida, debido a la mutación o a la incorporación de material genético en forma de plásmidos o transposones (McDonell, 1999). El uso indiscriminado de los antibióticos y la presión selectiva ambiental realizada por antisépticos y desinfectantes ha generado una respuesta de supervivencia en los microorganismos, que los capacita para evadir con eficiencia la acción bactericida de algunos agentes (Hernandez Rodriguez, 2007). En la actualidad se intenta dilucidar si hay mecanismos compartidos entre antibióticos, antisépticos y desinfectantes que les permita a las bacterias y otros microorganismos activar genes que potencialmente expresen los mecanismos propuestos hasta ahora como respuesta evolutiva a la intervención humana. (Ang, 2004; Cabrera, 2007). La multirresistencia de bacterias aisladas de especímenes clínicos es de importancia en las infecciones nosocomiales ya que, además, se caracterizan por una mayor virulencia (Reynaldo, 2004). Esto afecta a los animales internados elevando la morbitmortalidad y los costos de operación de los hospitales por el empleo de antibióticos, procedimientos más costosos y la prolongación de la estancia hospitalaria (Marquez López, 2008). Por lo tanto, es esencial el uso racional de antisépticos y desinfectantes y que exista un control permanente en el manejo de los elementos de limpieza y desinfección como así también un seguimiento sobre la aparición de microorganismos resistentes (McDonell, 1999; Mamani, 2009).

La evaluación antimicrobiana de los biocidas incluye etapas fundamentales. La primera etapa consiste en determinar la actividad antimicrobiana básica del producto, mediante ensayos *in vitro*, enfrentando suspensiones de distintos microorganismos al desinfectante. Posteriormente en una segunda etapa, se ha de determinar si el desinfectante posee actividad antimicrobiana en las condiciones que se pueden encontrar en la práctica de la desinfección para un determinado uso (concentración y tiempo de contacto compatibles con el material y la práctica clínica). El presente trabajo se propone cumplir la primera etapa de evaluación de desinfectantes.

Hipoclorito de sodio (agua lavandina): Es un desinfectante de uso común en el ambiente hospitalario. Cuando se usa al 1%, su uso queda limitado a laboratorios o sectores donde se manejen cultivos virales o extensas superficies contaminadas con sangre. Cuando se usa al 0,1%, actúa como desinfectante siempre que se haya realizado una buena

limpieza previa en superficies en general. Cuando se lo utiliza en superficies, el personal que lo aplica debe hacerlo con guantes resistentes. De esta forma se preserva el equilibrio de la flora normal de las manos. No debe mezclarse con detergentes produce vapores tóxicos e irritantes para los operadores. Debe mantenerse en su envase original (plástico opaco) y al abrigo de la luz solar, que contribuye a la pronta degradación del cloro.

Las soluciones se preparan con agua y en el momento de ser usadas, el resto debe descartarse ya que pierde un principio activo. De acuerdo con las últimas normativas nacionales al respecto, la lavandina comercial debe expenderse en una concentración de 60 gramos de cloro activo por litro. Su mayor ventaja, además de su bajo costo, es su acción rápida. El hipoclorito de sodio resulta corrosivo para el instrumental médico ya que lo deteriora rápidamente.

Las superficies ambientales no críticas contaminadas con sangre u otros fluidos corporales deben ser limpiadas antes de aplicar hipoclorito de sodio para desinfectarlas. El hipoclorito de sodio, como la mayoría de los desinfectantes, se inactiva en presencia de materia orgánica.

Aun en su envase original de plástico opaco, cerrado y resguardado de la luz, las concentraciones de cloro activo se reducen en un 40 a un 50% después de 30 días de fabricada.

Las soluciones no deben prepararse con agua caliente debido a que se forma trihalometano (cancerígeno animal)

Gluconato de clorhexidina: Es un antiséptico jabonoso de amplio espectro, bactericida eficaz contra gérmenes Gram positivos y Gram negativos. Es también efectivo contra hongos y virus (in vitro resulta efectivo contra virus encapsulados incluyendo el VIH, el herpes simple, citomegalovirus e influenza). Su acción es baja sobre *Mycobacterium tuberculosis*. Su efecto germicida es rápido y prolongado. Tiene una importante acción residual sobre la piel, entre tres y seis horas. Actúa causando la ruptura de las membranas de la célula microbiana y precipitando su contenido celular. No es tóxico y puede usarse en neonatos. Esta recomendada para el lavado de manos antiséptico del personal de salud de las unidades de cuidados intensivos, quirófano y unidades de aislamiento. Resulta de gran utilidad en la descolonización de gérmenes Gram positivos de la piel de los pacientes que van a ser intervenidos quirúrgicamente. Se ha demostrado que una ducha diaria con este producto reduce la colonización por *Staphylococcus aureus*.

IV. MATERIALES Y METODOS:

Microorganismos. Se trabajó con un total de 4 cepas (referenciadas como 71, 80, 82 y 91) de *Staphylococcus* Meticilino Resistentes aisladas de muestras clínicas de piel y conducto auditivo externo de caninos y la cepa ATCC 25923 (American Type Culture Collection) de *S. aureus*, carente de resistencias acompañantes, como control.

Biocidas: Hipoclorito de sodio (desinfectante) marca Ayudín®, con una concentración de 25g de Cl/L y digluconato de clorhexidina (antiséptico) marca Povitol®, con una concentración de 1% .

Reactivación de las cepas conservadas: Las cepas que fueron conservadas en viales estériles con caldo TSA y glicerol estéril a - 20°C fueron reactivadas colocando alícuotas de estos viales en caldo nutritivo e incubadas en estufa a 37°C por 18 hs.

Ante la turbidez del caldo, que indicaba crecimiento, se sembraron en Agar Manitol Salado (medio selectivo y diferencial), que contenía cloruro sódico a dosis elevadas para evitar el crecimiento de otras bacterias; este además es un medio diferencial, ya que posee un azúcar fermentable (manitol) y un indicador de pH para verificar la producción de compuestos ácidos. La incubación se realizó en estufa a 37°C en condiciones aeróbicas.

Pruebas de control de calidad: pureza, identidad y viabilidad Todas las cepas reactivadas incluida la cepa control, fueron evaluadas en cuanto a:

-Pureza: La pureza de las bacterias se evaluó por observación microscópica del cultivo, teñido por el método de Gram.

Tinción de Gram: Se realizó la coloración de Gram con el Kit de Britania®.

-Identidad: La identidad de los cultivos bacterianos se llevó a cabo a través de:
Actividad catalasa: Para determinar la actividad catalasa de los microorganismos aislados, se mezclaron en un portaobjeto 20 µL de cultivo activo con 20 µL de peróxido de hidrógeno 30 volúmenes.

Esta prueba permite diferenciar los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* (catalasa negativo) de *Staphylococcus* (catalasa positiva).

Pruebas de identificación bioquímica: las colonias crecidas en el medio Agar Manitol Salado se emplearon para la inoculación de diferentes test complementarios.

Prueba de Coagulasa en tubo: Determina la capacidad de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa y se utiliza para diferenciar los estafilococos coagulasa positivos de otras especies de *Staphylococcus*. La prueba se realizó con plasma equino desfibrinado, el resultado se leyó tras incubación de 4h, necesitándose la incubación

durante 24h para afirmar que es negativa. *S. aureus*, *pseudintermedius* y *schleiferi sp coagulans* son ECP.

-Viabilidad: se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) por la técnica de diluciones seriadas y siembra en superficie en Agar Triptona Soya (TSA).

Se consideró satisfactoria una concentración celular igual o superior a 105 UFC/mL.

Sensibilidad de las cepas aisladas a antisépticos y desinfectantes: Se evaluó la eficacia de un desinfectante, hipoclorito de sodio y un antiséptico, digluconato de clorhexidina a través de ensayos in vitro que se realizaron en condiciones de laboratorio artificiales y controladas por Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Prueba In Vitro de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

La determinación de la actividad bacteriostática por CIM, se realizó mediante una serie de diluciones decrecientes del desinfectante (5 tubos) y del antiséptico (5 tubos) en Tripteína Soya Caldo, e inoculando cada tubo con una suspensión bacteriana equivalente al tubo N° 1 de la escala de MacFarland (300.000 gérmenes por mililitro). Tras la incubación a 37° durante 24 horas se observó cual es la mínima concentración del producto que inhibía el crecimiento y desarrollo de los microorganismos. Esta prueba de dilución seriada es semicuantitativa.

Sensibilidad de las cepas a hipoclorito de sodio en distintas condiciones • 5 tubos con concentraciones decrecientes (0,1; 0,05; 0,01; 0,005 y 0,0025% (v/v)) de hipoclorito de sodio a pH 7 • 5 tubos con concentraciones decrecientes de hipoclorito de sodio a pH 9 • 5 tubos con concentraciones decrecientes de hipoclorito de sodio a pH 5 • 5 tubos con concentraciones decrecientes de hipoclorito de sodio a pH 7 adicionado con 40% de plasma.

Sensibilidad de las cepas a digluconato de clorhexidina en distintas condiciones • 5 tubos con concentraciones decrecientes de clorhexidina (20; 10; 5; 2,5 y 1,25%) a pH 7 • 5 tubos con concentraciones decrecientes de clorhexidina a pH 9 • 5 tubos con concentraciones decrecientes de clorhexidina a pH 5 • 5 tubos con concentraciones decrecientes de clorhexidina a pH 7 adicionado con 40% de plasma.

Para realizar las pruebas se colocaron en una gradilla plástica con 40 tubos correspondientes a las diluciones seriadas de hipoclorito de sodio con los diferentes pH y con y sin materia orgánica. Para la evaluación de digluconato de clorhexidina se realizó el mismo procedimiento (5 tubos con 4,5 ml de dilución de agua destilada más el antiséptico, por cada condición evaluada). Por último, se adicionó a cada tubo de ensayo

0,5 ml de la suspensión del microorganismo a evaluar con una concentración aproximada 300.000 gérmenes por mililitro, las muestras se colocaron en incubación por 24 horas a 37 °C (+/- 2°C). Como control de calidad interno se utilizó *Staphylococcus aureus* American Type Culture Collection (ATCC) 25923. Realizándose el mismo procedimiento que a las cepas a evaluar. También se utilizó un control negativo para cada biocida en cada una de las condiciones mencionadas (tubos con las diluciones sin sembrar).

V. RESULTADOS Y DISCUSION

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

- Respecto a las cepas con las que se trabajó: De las 50 cepas conservadas provenientes de un proyecto anterior, 10 fueron identificadas como Meticilino Resistentes. De éstas solo 4 (cepas: 71, 80, 82 y 91) alcanzaron los estándares de calidad. Las restantes fueron rechazadas por: Pureza: Las cepas 31 y 44 presentaban signos de contaminación con bacterias de tipo bacilos Gram positivos esporulados. Viabilidad: las cepas 17, 19, 39 y 45 no sobrevivieron al proceso de conservación y reactivación. Por tanto, fueron descartadas. Se trabajó con 1 cepa de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente, 3 cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* Meticilinos Resistentes y una cepa control ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus* Meticilino Sensible.
- Respecto a la sensibilidad de las cepas a distintas concentraciones de Hipoclorito de sodio. La cepa control ATCC a pH 7 y 9 presentó una CIM en la menor dilución probada (0,1), y a pH 5 y pH 7 con plasma la CIM fue de 0,05, estos valores se toman como referencia para comparar las cepas clínicas. Todas las cepas probadas a pH 7 coincidieron con el control en la CIM en 0,1. A pH 9 dos cepas coincidieron con el control (0,1), mientras una tuvo su CIM en 0,05 y otra en 0,01. En cuanto a la prueba a pH 5 dos cepas coincidieron con el control (0,05) y otras dos tuvieron una CIM mayor (0,1). La última serie que correspondía a pH 7 con adición de plasma3 de las cepas coincidieron con el control (CIM de 0,05) y una sola tuvo una CIM de 0,1. (Ver Fig 6 y 7)

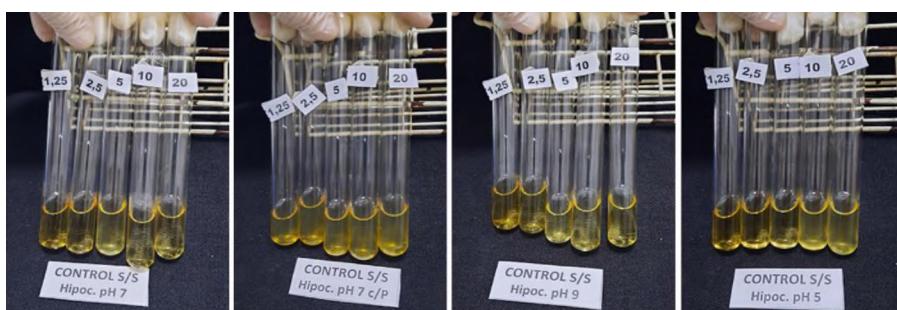


Fig. N°6 Control Negativo de Hipoclorito de Sodio en las distintas condiciones y concentraciones

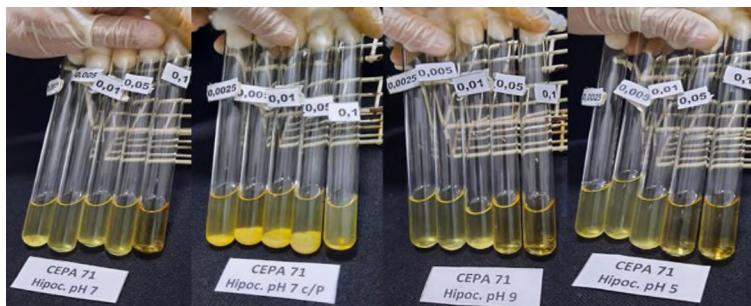


Fig N° 7: Resultados de dos cepas de Hipoclorito de Sodio en las distintas condiciones y concentraciones.

Tabla N° 2:
Concentración inhibitoria mínima (CIM) por cepa

| Biocida | CEPAS | pH 5 | pH 7 | pH 9 | pH 7+Plasma |
|-------------|-------|------|-------|------|-------------|
| Hipoclorito | ATCC | 0,05 | 0,1 | 0,1 | 0,05 |
| | 71 | 0,05 | 0,1 | 0,05 | 0,1 |
| | 80 | 0,05 | 0,1 | 0,1 | 0,05 |
| | 82 | 0,1 | 0,005 | 0,1 | 0,1 |
| | 91 | 0,1 | 0,1 | 0,01 | 0,1 |

- Respecto a la sensibilidad de las cepas a distintas concentraciones de digluconato de clorhexidina La CIM de la cepa control ATCC a pH 7, 9 y 5 fue de 10 para digluconato de clorhexidina, mientras que la adición de materia orgánica redujo la CIM a 5. En comparación, las otras cepas estudiadas arrojaron los siguientes resultados: a pH 7, 2 cepas tuvieron CIM bajas de 2,5, una a 5 y otra a 10. A pH 9 la CIM para todas las cepas coincidieron con la cepa control (10), mientras que a pH 5 ninguna de las cuatro cepas presentó desarrollo en ninguna de las diluciones probadas. En cuanto a la prueba desarrollada a pH 7 con el agregado de plasma una cepa no presentó desarrollo en ninguna de las diluciones, una coincidió con el control (CIM 5) y otras dos tuvieron una CIM de 2,5. Esta gran variabilidad, sumado al escaso número de cepas no permite hacer inferencias con respecto a las CIM del desinfectante y el antisепtic (Ver Fig 8 y 9).

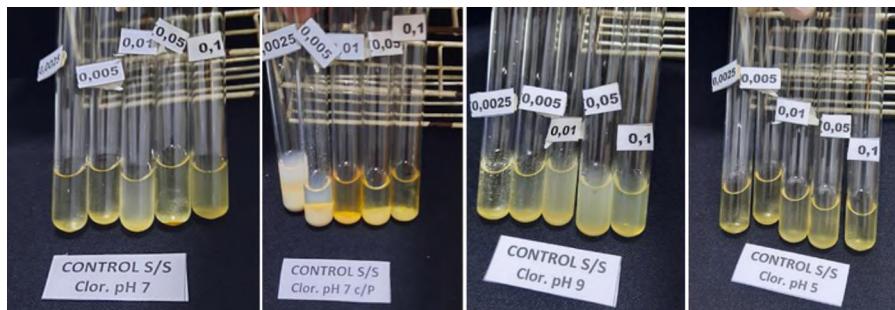


Fig. N°8 Control Negativo de Digluconato de Clorhexidina en las distintas condiciones y concentraciones.



Fig. N°9: Resultados de dos cepas de Digluconato de Clorhexidina e Hipoclorito de Sodio en las distintas condiciones y concentraciones.

Tabla N° 1:
Concentración inhibitoria mínima (CIM) por cepa

| Biocida | CEPAS | pH 5 | pH 7 | pH 9 | pH 7+Plasma |
|--------------|-------|------|------|------|-------------|
| Clorhexidina | ATCC | 10 | 10 | 10 | 5 |
| | 71 | 0 | 5 | 10 | 5 |
| | 80 | 0 | 10 | 10 | 0 |
| | 82 | 0 | 2,5 | 10 | 2,5 |
| | 91 | 0 | 2,5 | 10 | 2,5 |

La resistencia a los antibióticos es un problema constante en el entorno hospitalario. Los organismos que causan las infecciones adquiridas en el hospital son por lo general altamente resistentes, requieren antibióticos costosos y hospitalización posterior.

La desinfección apropiada del hospital y las prácticas higiénicas del personal pueden evitar dichas infecciones ya que reducen la carga patógena en un establecimiento de conformidad con la "triada de prevención en nosocomios":

- uso adecuado de antibióticos,
- higiene del personal y del paciente,

-y mantenimiento y desinfección del hospital.

Esta vista general resalta el desarrollo y la aplicación de protocolos de desinfección en los hospitales y las prácticas de higiene de las manos en los hospitales veterinarios de animales pequeños (Nettleman MD, et al, 2003).

Los organismos que pueden causar las infecciones adquiridas en los hospitales provienen de los profesionales de la salud, las soluciones y líquidos presentes en el hospital, y de las superficies tales como pisos, paredes, jaulas, equipos y mostradores. La desinfección de las superficies es importante para reducir la carga patógena del hospital. Si el patógeno de un paciente afectado contamina el ambiente, la superficie colonizada puede a su vez contaminar al personal sanitario u a otros pacientes, dando como resultado la transmisión de patógenos incluso cuando no existe contacto directo entre los pacientes (Rutala WA, et al, 2001).

Se han publicado recomendaciones relacionadas con las estrategias de prevención para los hospitales de humanos, pero son muy generales y a menudo vagas para el uso práctico, y muchas no son aplicables a la medicina veterinaria (Ducel G, et al, 2007).

La desinfección de las superficies es un proceso de dos pasos. Primero, se debe eliminar los desechos orgánicos con una limpieza general. Los detergentes (jabones) son suficientes para esta tarea. Este paso es extremadamente importante porque muchos desinfectantes son ineficaces ante la presencia de desechos orgánicos, y la materia de las partículas restantes puede hospedar patógenos. Una vez que se han retirado los desechos generales, se debe desinfectar las superficies con especial atención a los tiempos de contacto y los posibles tipos de patógenos. Se debe considerar todo el hospital en las estrategias de desinfección, desde los pisos hasta los equipos médicos más avanzados. Se ha informado la sobrevivencia de bacterias gram-negativas en las superficies y la ropa de cama por más de 60 días en algunas situaciones (Weber DJ, et al, 2003).

Las superficies no críticas (por ejemplo, pisos, paredes, mostradores) en las instalaciones veterinarias tienen mayor probabilidad de contaminarse con patógenos que las instalaciones humanas, ya que los pacientes veterinarios frecuentemente pasan fluidos corporales a las superficies ambientales. Además, los pacientes veterinarios comparten equipos (por ejemplo, termómetros, cortadores, tijeras para gasas/suturas) y mesas de examen, y en muchos casos no están separados en habitaciones privadas o semiprivadas o alejadas del piso gracias a una cama. Los pisos, paredes y mostradores se deben limpiar cuando estén sucios y desinfectar cuando se sospeche de contaminación.

Las jaulas y otros alojamientos del paciente deben desinfectarse con cuidado y deben contar con un tiempo de contacto suficiente antes alojar a otro paciente. Se debe tener cuidado en la desinfección de todas las partes de la jaula: piso, paredes, techos, puertas y cerraduras (Dharan S, et al, 1999).

Drenajes de pisos: El ambiente húmedo y la frecuente introducción de aguas contaminadas con patógenos suponen un riesgo de colonización en los drenajes del piso. Se debe enjuagar generosamente el drenaje con agua limpia después de la limpieza de un área contaminada. Además, se debe verter desinfectantes de nivel intermedio en el drenaje con regularidad, prestando atención a los tiempos de contacto antes de enjuagar. También se recomienda la desinfección rutinaria del lavatorio y los drenajes de las bañeras, especialmente en las tinas utilizadas para el lavado de heridas o baños del paciente.

Equipo Médico: El equipo médico especializado (por ejemplo, endoscopios, unidades dentales, etc) también se debe considerar en los protocolos de desinfección. Después del uso, se debe limpiar y lavar los endoscopios y las unidades dentales con un limpiador enzimático para asegurar la eliminación de todos los restos orgánicos, además se debe lavarlos con agua y aire, y desinfectarlos. Despues de empapar el equipo por el tiempo de desinfección necesario, todas las partes deben secarse a fondo, preferiblemente con aire a presión para eliminar cualquier gota de agua en los canales (Meiller TF, et al, 2001).

Se ha demostrado que las sondas de ultrasonido presentan un riesgo mínimo cuando se limpia con una toalla seca, pero el gel de acoplamiento puede actuar como un medio para el crecimiento bacteriano. Por lo tanto, las sondas se deben limpiar al final de cada día para eliminar cualquier resto de gel de acoplamiento, utilizando un desinfectante de bajo nivel que no dañe el equipo (Muradali D, et al, 1997).

Higiene de las manos: los organismos son más comúnmente transmitidos entre los pacientes a través de las manos de los profesionales de la salud. En consecuencia, los protocolos de higiene de las manos son una parte importante de las estrategias de control nosocomial. Los agentes patógenos contaminan las manos ya sea directamente de una mascota colonizada o de un fomite colonizado. Si la higiene de las manos es inadecuada, los patógenos pueden propagarse a otros pacientes y fomites (por ejemplo, a las superficies de alto contacto) (Boyce JM, et al, 2002). El contacto con los pacientes y su entorno es inevitable y no se puede controlar el comportamiento de los agentes patógenos en el medio ambiente, por lo que la higiene de las manos es la forma más

eficaz de prevenir la transmisión de patógenos en el entorno hospitalario. Se debe poner en práctica un enfoque multifacético, que comience con la educación del personal. Éstos deben comprender los riesgos de los pacientes y del hospital.

Idealmente, se debería utilizar guantes para cada paciente y desinfectar las manos inmediatamente después de quitarse los mismos. Sin embargo, puede resultar costoso y se asocia con un bajo cumplimiento por parte de los trabajadores sanitarios, convirtiéndose así en una meta poco realista en muchos centros hospitalarios. Por lo tanto, deben aplicarse protocolos de higiene de las manos y programas de educación al personal.

Se recomienda el uso de guantes al manipular a pacientes con infecciones altamente transmisibles o de alta resistencia. Asimismo, se debe emplear guantes en pacientes inmunocomprometidos, como aquellos que están sometidos a quimioterapia, los recién nacidos, o aquellos con bajo recuento de glóbulos blancos secundario a procesos de la enfermedad.

El cumplimiento de los protocolos de higiene de las manos es probablemente el mayor obstáculo para reducir la transferencia de patógenos entre los pacientes. Inevitablemente, el cumplimiento de la higiene de manos es <100% en cualquier práctica. La contaminación del medio ambiente inanimado entonces conduce a la contaminación de todos los trabajadores, incluidos los que siguieron las prácticas apropiadas de higiene.

Numerosos factores afectan el cumplimiento entre los trabajadores sanitarios, como el fácil acceso a las soluciones antisépticas, lociones para el lavado de manos, y geles con alcohol, especialmente en situaciones de alta demanda. En algunos estudios, las tasas de cumplimiento fueron del 25% al 50% antes de la aplicación de los programas de educación del personal, que después alcanzaron entre el 65% y 80% (Pittet D, 2003).

La selección de los productos es un aspecto importante en el cumplimiento de la desinfección de manos entre el personal sanitario. El producto utilizado debe ser eficaz, hipoalergénico, no irritante, no desecante, y fácilmente accessible (Pittet D, 2000).

VI. CONCLUSION:

Las estrategias de desinfección para el hospital deben incluir un programa de limpieza periódico que preste atención a los agentes de desinfección apropiados y los tiempos de contacto necesarios para la superficie o el equipo en cuestión. Los accesorios de limpieza, los agentes de desinfección y las estaciones de higiene de las manos deben estar a disposición, además deben ser accesibles y bien tolerados por el personal.

La creación de un programa exhaustivo de desinfección es un proyecto intimidante y tedioso, pero una vez que esté en marcha, dicho programa puede reducir drásticamente la carga de patógenos en el hospital.

La educación del personal es imprescindible para aumentar el cumplimiento de las estrategias de desinfección hospitalaria. A menudo, los trabajadores sanitarios no se dan cuenta de los riesgos potenciales para los pacientes y aumentan.

Los resultados (expresados en tabla N° 1 y 2) no evidencian una tendencia marcada, sin embargo, puede destacarse que ninguna de las cepas se mantuvo viable a la máxima concentración ensayada (dilución recomendada) y puede inferirse que la CIM frente a cualquiera de los biocidas evaluados es cepa dependiente. Se propone continuar los estudios con un mayor número de cepas.

VII .REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Ang JY, Ezike E, Asmar BI. 2004. Antibacterial resistance. Indian Journal of Pediatry, 71: 229-239
- Cabrera CE, Gómez RF, Zúñiga AE. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Colombia Médica, 38: 149-158.
- Castellano González, M. J., & Perozo-Mena, A. J. 2010 Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. Kasmera, 38(1), 18-35.,
- Castellanos I, Rodriguez G, Santos R. 2011. Aislamiento e identificación bioquímica de microorganismos bacterianos a partir de infecciones de piel en caninos. Rev Med Vet [Internet].;22. Recuperado a partir de: <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/mv/article/view/556>
- Denamiel G, Puigdevall T, Más J, Albarellos G, Gentilini E. 2015. Prevalencia y perfil de resistencia a betalactámicos en estafilococos de perros y gatos. InVet.. Recuperado a partir de: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-34982009000200006
- Devriese LA. 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. Int J Syst Evol Microbiol.; 55(4):1569-73.
- Hernández Rodríguez, Á. (2007). Aportaciones al estudio de la actividad antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes. Universitat Autónoma de Barcelona (Doctoral Thesis).
- Kadlec K, Schwarz S. 2012. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. Vet Dermatol.23:276-82.
- Mamani Urquiza, I. (2009). Evaluación del efecto bactericida de los desinfectantes en cepas bacterianas ATCC y cepas aisladas del área de fabricación de productos estériles, realizando pruebas de dilución "in use" en Laboratorios Bagó de Bolivia SA (Doctoral Thesis).
- Marquez López JL, Nevárez Morillón GV, Dávila Sánchez A, Rivera Chavira BE, González Rangel O. 2008. Efecto de la formación de biopelículas en la resistencia de bacterias aisladas de especímenes clínicos. Synthesis, 48: 1-4.

- Reynaldo, M. B., Flores, M. B., Caetano, J. A. V., & Magariños, M. D. C. (2004). Eficacia de algunos biocidas contra estafilococos hospitalarios sensibles y resistentes a la meticilina en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Revista Panamericana de Salud Pública, 16, 187-192.
- Rubio MR, Boggio JC. 2009. Farmacología veterinaria. segunda. Córdoba, Argentina: EDUCC. p 518-520.
- Rutala WA. 1995. APIC guideline for selection and use of disinfectants. American Journal of Infection Control, 23: 313-343.
- Weese JS, van Duijkeren E. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. Vet Microbiol. 140 (3-4):418-29.