

Prevalencia y perfil de resistencia a betalactámicos en estafilococos de perros y gatos

DENAMIEL, G¹; PUIGDEVALL, T¹; MÁS, J²; ALBARELLOS, G³; GENTILINI, E¹

Resumen

El objetivo de este trabajo fue conocer la prevalencia de especies y perfil de resistencia a betalactámicos en estafilococos aislados de infecciones en caninos y felinos. En perros, de 207 aislamientos, el porcentaje de las especies identificadas fue: *S. intermedius* 29,5%, *S. aureus* y *S. simulans* 20,8%, *S. saprophyticus* 12,6%, *S. chromogenes* 10,6%, *S. haemolyticus* 3,9% y *S. epidermidis* 1,9%. De 63 aislamientos en gatos: *S. simulans* 33,3%, *S. intermedius* y *S. aureus* 15,4%, *S. saprophyticus* 11,1%, *S. haemolyticus* 6,34%, *S. chromogenes* y *S. epidermidis* 3,5%.

En perros, el porcentaje de resistencia a penicilina fue: *S. intermedius* 47,5%, *S. aureus* 34,8% y *S. saprophyticus* 7,7%. Los aislamientos que expresaron meticilina resistencia correspondieron: *S. intermedius* 9,8% y *S. saprophyticus* 3,8%. En gatos los estafilococos resistentes a penicilina fueron *S. saprophyticus* 42,8%, *S. aureus* y *S. intermedius* 15,4% y *S. simulans* 9,5%. No se hallaron especies de estafilococos meticilino resistentes.

Palabras clave: (betalactámico), (resistencia), (*Staphylococcus*), (perro), (gato).

Prevalence and resistance profile to beta-lactam antibiotics in staphylococci from dogs and cats.

Summary

The purpose of this study was to characterize the prevalence and resistance profile to beta-lactam antibiotics of staphylococci isolated from canine and feline infections. Staphylococci were isolated from 207 dog samples. The species frequency for identified staphylococci were: *S. intermedius* 29.5%, *S. aureus* and *S. simulans* 20.8%, *S. saprophyticus* 12.6%, *S. chromogenes* 10.6%, *S. haemolyticus* 3.9% and *S. epidermidis* 1.9%. Sixty three staphylococci isolates were from cats: *S. simulans* 33.3%, *S. intermedius* and *S. aureus* 15.4%, *S. saprophyticus* 11.1%, *S. haemolyticus* 6.34%, *S. chromogenes* and *S. epidermidis* 3.5%.

Resistance to penicillin in samples from dogs were: *S. intermedius* 47.5%, *S. aureus* 34.8% and *S. saprophyticus* 7.7%. Methicillin-resistance was evidenced in *S. intermedius* 9.8% and *S. saprophyticus* 3.8%. In samples from cats, penicillin-resistant staphylococci were: *S. saprophyticus* 42.8%, *S. aureus* and *S. intermedius* 15.4% and *S. simulans* 9.5%. Methicillin-resistant staphylococci were not found among cat isolates.

Keywords: (beta-lactam), (resistance), (*Staphylococcus*), (dog), (cat)

Cátedras de Microbiología Veterinaria¹, Inmunología², Farmacología³. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Chorroarín 280 (1427). Buenos Aires. Argentina. e-mail: gdenam@fvvet.uba.ar.

Recibido: 19.11.2009 - Aceptado: 01.02.2010

InVet. 2009, 11(2): 117-122
ISSN (papel): 1514-6634
ISSN (on line) 1668-3498

Introducción

Los estafilococos integran un género bacteriano que forma parte de la microbiota residente habitual de la piel y mucosas en los animales y el hombre. Es común aislarlos a partir de muestras clínicas de perros y gatos ya que en ocasiones suelen causar infecciones⁴. Se los clasifica en dos grupos: los estafilococos coagulasa positivo (ECP) cuyas especies son conocidas como patógenas: *Staphylococcus intermedius*, *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. pseudointermedius*, *S. lutrae*, *S. delphini* y *S. hyicus*, y los estafilococos coagulasa negativo (ECN) integrado por más de 50 especies, tales como *S. saprophyticus*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. simulans*, *S. haemolyticus* entre otros y, a las que se les adjudica un rol importante como patógenos oportunistas⁴.

Los antibióticos betalactámicos usualmente se utilizan en la práctica de la medicina veterinaria. El Instituto de estandarización para el laboratorio clínico (CLSI)³ sugiere a estas drogas como las de primera elección para ser utilizadas en infecciones ocasionadas por estafilococos. La resistencia (R) a las penicilinas antiestafilococicas, resistentes a las betalactamasas se denomina oxacilino resistencia o meticilino resistencia (MR). La mayor parte de la R a oxacilina (Oxa) es mediada por el gen *mecA* el que codifica para una proteína ligadora de penicilina (PBP) adicional, llamada PBP₂. La MR se puede expresar homogénea o heterogéneamente. Históricamente, la expresión de R en forma simultánea a tres o cuatro antibióticos: aminoglucósidos, fluoroquinolonas, macrólidos, lincosamidas, cloranfenicol, tetraciclinas, era un indicador de cepas de estafilococos MR. En la actualidad hay informes sobre aislamientos de estafilococos MR asociados con infecciones en animales que no expresan multiresistencia antibiótica³. La prueba de «oro» para confirmar una cepa bacteriana MR, es la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para Oxa.

En la década del 70 se describen los primeros casos de *Staphylococcus aureus* MR en el hombre y se ha ido incrementando en todo el mundo. En los últimos años se informa sobre colonización e infección en mascotas por estafilococos MR, estableciéndose la posibilidad de transmisión bidireccional entre el hombre y los animales^{8, 9, 16, 19}.

La sensibilidad antibiótica es una variable que se debería determinar para cada aislamiento porque depende de la idiosincrasia de cada especie y cepa en particular. Es por ello que la elección de los antibióticos para los ensayos de susceptibilidad depende de la correcta identificación del agente causal.

El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de las especies de estafilococos aislados de infecciones en perros y gatos y su perfil de resistencia a betalactámicos.

Materiales y métodos

Aislamientos bacterianos: Se trabajó con 280 aislamientos de estafilococos de animales con antecedentes de haber sido tratados alguna vez con betalactámicos. De perros, se obtuvieron 207 cepas de estafilo-cocos, 64,2% (133) provenían de lesiones de piel, 28,5% (59) de otitis y 7,2% (15) de conjuntivitis. De gatos, 63 aislamientos: 90,5% (57) correspondieron a infecciones de piel y el 9,5% (6) a piómetras; durante el periodo 2007-09. Las muestras provenían de animales de Buenos Aires y conurbano.

Cultivo, aislamiento e identificación: se realizó en placas de agar sangre incubando a 37°C durante 48hs y en aerobiosis. El género se identificó a través de tinción de Gram y pruebas de: catalasa, oxido-fermentación para glucosa y susceptibilidad a 0,04 U de bacitracina. La tipificación de las especies por producción de: hemolisinas, coagulasa, clumping factor, fosfatasa alcalina, pyrrolidonyl arylamidasa (PYR), ureasa, ornithina y arginina dextracarboxilasa, reducción de nitratos, Vogues Proskauer, susceptibilidad a 5 µg de novobiocina, 2 µg de bacitracina y 200 µg/mL de lysostafin.

Producción de ácido de: D-trehalosa, sacarosa, D-ribosa, D-cellobiosa, D-xylosa, á-lactosa, D-manitol, maltosa y D-mannosa. (Laboratorio Britania. Argentina).

Susceptibilidad antibiótica: todas las técnicas se realizaron según recomendaciones del CLSI, por el método de difusión en agar, se ensayaron discos de penicilina (Pen) 10U y oxacilina (Oxa) 1µg para valorar a los ECP. Pen y cefoxitina (Fox) 30 µg para ECN (Laboratorio Britania. Argentina). Por el método de E-test (AB BIODISK, Solna, Sweden) se determinó la concentración inhibitoria mínima para los aislamientos que por antibiograma por difusión expresaron R a Oxa.

Interpretación de resultados: Con el disco de Pen se evalúa la producción de betalactamasas y con Oxa se predice meticilino resistencia (MR). Los estafilococos sensibles (S) a Pen se informan como S a todos los betalactámicos (con excepción de las cefalosporinas de 3º generación y monobactámicos) Los estafilococos resistentes (R) a Pen y S a Oxa se informan como estafilococos productores de betalactamasas, por lo que en estos casos se indica como betalactámico de

mayor actividad antiestafilocócica a las cefalosporinas de 1º generación y aquellos que están asociados a inhibidores de betalactamasas. La R a Oxa predice MR mediada por el gen *mecA* que confiere R intrínseca a todos los betalactámicos y sus derivados.

Recientemente, el CLSI fijó modificaciones para la predicción de MR en los ensayos por difusión e incluyó el disco de cefoxitina (Fox). Este antibiótico guarda equivalencia en sensibilidad y especificidad a la que se obtiene por CIM de Oxa para *S. aureus*. Sin embargo, para ensayar en ECN se recomienda el uso de Fox que guarda equivalencia con la sensibilidad detectada por CIM de Oxa pero resulta más específica. Algunas especies de ECN pueden ser sobrevaluadas respecto a su R a través de la CIM de Oxa.

Punto de corte de CIM para Oxa: S < 2 µg/ml y R > 4 µg/ml.

La cepa control fue *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Resultados

El porcentaje de especies de ECP y ECN hallados en perros y gatos y su porcentaje de R a Pen y Oxa/Fox se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Porcentaje de las especies de estafilococos y su resistencia frente a penicilina, oxacilina y/o cefoxitina aislados de infecciones de perros y gatos.

Estafilococos	Canino n=207			Felino n= 63		
	Aislamientos	Pen R	Oxa R	Aislamientos	Pen R	Oxa R
<i>S. aureus</i>	(43/207) 20,8%	34,8%	0%	(13/63) 20,6%	15,4%	0%
<i>S. intermedius</i>	(61/207) 29,5%	47,5%	9,8 %	(13/63) 20,6%	15,4%	0%
ECN	Aislamientos	Pen R	Fox R	Aislamientos	Pen R	Fox R
<i>S. epidermidis</i>	(4/207) 1,9%	0%	0%	(2/63) 3,2%	0%	0%
<i>S. auricularis</i>	---	---	---	(1/63) 1,6%	0%	0%
<i>S. simulans</i>	(43/207) 20,7%	0%	0%	(21/63) 33,3%	9,5%	0%
<i>S. haemolyticus</i>	(8/207) 3,9%	0 %	0%	(4/63) 6,34%	0%	0%
<i>S. chromogenes</i>	(22/207) 10,6%	0 %	0%	(2/63) 3,17%	0%	0%
<i>S. saprophyticus</i>	(26/207) 12,6%	7,7%	3,8 %	(7/63) 11,1%	42,8%	0%
Total	100%			100%		

Pen: penicilina, Oxa: oxacilina, Fox: cefoxitina, R: resistencia.

ECP: estafilococo coagulasa positivo, ECN: estafilococo coagulasa negativo.

Todos los estafilococos de perros y gatos con R a Pen y los MR provenían de infecciones de piel.

A los estafilococos que por el método de difusión en agar expresaron R a Oxa, el valor obtenido por CIM de Oxa fue superior a 256 µg/ml.

Discusión

Estudios en la población canina sobre especies de estafilococos productores de infecciones, indican que los ECP son los más frecuentes. *Staphylococcus intermedius* es descrito como el más prevalente seguido de *S. aureus*⁴. De lesiones oculares, se informan hallazgos de un 45% de *S. intermedius* y 22,5% de *S. aureus*¹⁹. En una investigación sobre colonización de estafilococos en perros, se comparan animales sanos con animales con dermatitis atópica, donde se extraen hisopados de mucosa nasal, oído y perineo y se observa que los ECP son las especies de mayor prevalencia. Encuentran en perros con dermatitis un 87,5% de *Staphylococcus intermedius* y en sanos 37,2%⁷. Esta especie se caracteriza por presentar diversidad fenotípica y genotípica. Es por ello que algunos investigadores han especulado en denominarlo Grupo *S. intermedius*, donde se incluyen a *S. intermedius*, *S. pseudointermedius*, *S. delphini*². La identificación bioquímica como molecular de las mismas es difícil debido a que presentan secuencias de 16S rRNA similares entre ellas¹⁷. En este monitoreo, en los aislamientos identificados como *S. intermedius*, no se pudo establecer diferencias fenotípicas entre las especies integrantes del grupo.

Staphylococcus schleiferi subsp. *coagulans*, es otro ECP que se describe en relación a otitis y en ocasiones piodermias recurrentes^{4,15}. En la población canina estudiada no se encontró esta especie.

Varios estudios hacen referencia a la distribución de las especies de ECN en perros. En uno de estos se describen a partir de otitis externa: 25% de *S. epidermidis*, 15,9% *S.*

simulans, 11,4% *S. haemolyticus* y 9,1%. *S. saprophyticus*¹³. En otro trabajo, de piel y oído de perros sanos o enfermos se informa a *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*¹⁵. Otros investigadores de mucosa nasal y oral aíslan a *S. sciuri* y *S. epidermidis*⁴ y de lesiones oculares 20% *S. epidermidis* y 12,5% *S. simulans*¹⁸. En este estudio las especies de ECN no presentaron predilección por un nicho ecológico específico en los animales.

En gatos, se describen a las especies de ECP como las más frecuentes en la piel de animales sanos y enfermos, con 58%, de *S. aureus*, 46% de *S. intermedius* y 4% de *S. hyicus*¹. En nuestro estudio las especies de estafilococos de mayor prevalencia en gatos pertenecían al del grupo de ECN y los aislamientos de *S. aureus* y *S. intermedius* fueron en la misma proporción.

Aunque a los ECN se los encuentra habitualmente en los diferentes focos infecciosos, sigue sin estar clara su participación en los procesos patológicos, una misma especie puede ser descrita como agente causal de una infección o no. Sin embargo, hay informes que relacionan a *S. felis* y *S. auricularis* como bacterias productoras de piodermias y otitis externa⁴.

Staphylococcus simulans y *S. felis* se caracterizan por tener proximidad fenotípica y genotípica, esto lleva a que para una correcta identificación sea necesario implementar esquemas completos de pruebas bioquímicas. En este estudio solo se halló a *S. simulans*.

La resistencia antibiótica involucra a muchas especies bacterianas de origen animal y humano. La expresión de la R de los estafilococos frente a betalactámicos en la población canina se encuentra en aumento en todo el mundo. En infecciones en oído, se informa la presencia de cepas de *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* y *S. schleiferi* subsp. *coagulans* MR¹⁵; en piel encuentran MR en un 46,6% de *S. schleiferi*, 23,5% de *S. aureus* y 15,6% de *S. intermedius*; estando *S. intermedius* asociado con multirresistencia y se alerta sobre lo desaconsejable de implementar tratamientos empíricos¹⁰. A partir de hisopados nasales, axilares y rectales de

perros sanos, se reporta MR en 2,1% de cepas de *S. pseudintermedius* y 0,5% en *S. aureus* y *S. schleiferi* subsp. *Coagulans* y sin encontrar MR en *S. intermedius*⁹.

Algunos autores postulan que entre las poblaciones bacterianas de los animales y del hombre existe la probabilidad de transferencia de mecanismos de R para antibióticos^{8, 19}, es por ello que a estas cepas se las podría considerar como patógenos emergentes veterinarios. Se presume que < 4% de la resistencia antibiótica en el humano puede estar asociada a las cepas animales¹⁴.

Existen evidencias fenotípicas y moleculares que sugieren que los aislamientos de *S. aureus* MR de perros y gatos son indistinguibles de los aislamientos humanos¹¹. *S. aureus* es la especie con mayor significado clínico en el hombre y la que expresa el más alto porcentaje de MR¹⁶ mientras que en perros la especie de mayor significado clínico es *S. intermedius*. A partir de hisopados nasales en perros sanos se informa un 17% de *S. intermedius* MR colonizando, aunque ausencia de cepas MR de *S. aureus*.

Algunos autores postulan que las diferentes especies de estafilococos portadoras del gen *mecA* cumplen con el rol de ser agentes productores de zoonosis por la posible diseminación de genes de R interespecie, siendo indistinguibles según su origen: humano, canino o felino^{5, 16}. La transmisión horizontal de *S. aureus* MR de origen humano a un perro se ha comprobado recientemente¹⁶. En nuestro trabajo no se aislaron *S. aureus* MR, los aislamientos de estafilococos MR se obtuvieron de *S. intermedius* y *S. saprophyticus*.

En gatos un 65,4% del total de estafilococos recuperados de saliva fueron R a Pen y de estos el 22,1% expresaron MR. El 83,3% de *S. intermedius* fue R a Pen¹². En otro estudio sobre dos poblaciones de animales, se compara la prevalencia de especies de estafilococos MR: a) piel de gatos sanos: 20% de *S. aureus*, 18% de *S. intermedius* y, b) piodermias: 100% *S. schleiferi* subsp.

schleiferi, 7% *S. aureus*¹. En nuestra investigación no se encontraron estafilococos MR.

Es interesante considerar, desde una mirada epidemiológica, que los estafilococos MR de origen canino, felino y humano son fenotípica y molecularmente idénticos a diferencia de lo que ocurre con estafilococos MR aislados de otros animales domésticos^{6, 10}. En la actualidad, diferentes grupos de investigación se dedican a tratar de comprender la potencial transmisión bidireccional de patógenos entre el humano los animales y su prevalencia⁵.

Conclusión

Los aportes del presente estudio orientan sobre la prevalencia local de las diferentes especies de estafilococos relacionados con infecciones en perros y gatos y su perfil de susceptibilidad a los betalactámicos. La identificación de las especies resulta una herramienta útil para determinar el significado clínico del hallazgo, así como para establecer criterios para una vigilancia epidemiológica sobre el uso de antimicrobianos en la clínica veterinaria. Por otra parte es importante conocer que a través de la estrecha relación entre el hombre y sus mascotas puede existir el riesgo de diseminar genes de resistencia a los antibióticos cuando una o ambas poblaciones persisten en el uso indebido de estas drogas.

Agradecimiento

El presente trabajo fue subsidiado por UBACyT proyecto V011.

Bibliografía

1. Abraham, J.L.; Morris, D.O.; Griffeth, G.C.; Shofer, F.S.; Rankin, S.C. Surveillance of healthy cats with inflammatory skin disease for colonization of the skin by methicillin-resistant coagulase-positive staphylococcus *Schleiferi* ssp. *schleiferi*. *Vet Dermat.* 2007. 18(4): 252-259.

2. Bannoehr, J.; Ben Zakour, N.L.; Waller, A.S.; Guardabassi, L.; Thoday, K.L.; van den Broek, A.H.; Fitzgerald, J.R. Population genetic structure of *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J Bacteriol.* 2007. 189(23):8685-92.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard- Third Edition. M31-A3.
4. Cox, H.U. Infecciones por estafilococos. *Greene CE, editores. Enfermedades infecciosas del perro y el gato*, Buenos Aires, Editorial Intermédica 2008; 352-56.
5. Epstein, C.R.; Yam, W.C.; Peiris, J.S.; Epstein, R.J. Methicillin-resistant commensal staphylococci in healthy dogs as a potential zoonotic reservoir for community-acquired antibiotic resistance. *Infect Genet Evol.* 2009. 9(2):283-5.
6. Faires MC, Tater KC, Weese JS. An investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in people and pets in the same household with an infected person or infected pet. *J Am Vet Med Assoc.* 2009. 1;235(5):540-3
7. Fazakerley J, Nuttall T, Sales D, Schmidt V, Carter SD, Hart CA, McEwan NA. Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. *Vet Dermatol.* 2009.20(3):179-84.
8. Guardabassi, L.; Schwarz, S.; Lloyd, D. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2004. 54:321-332.
9. Hanselman, B.A.; Kruth, S.; Weese, J.S. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. *Vet Microbiol.* 2008. 1:126(1-3):277-81.
10. Jones, R.D.; Kania, S.A.; Rohrbach, B.W.; Frank, L.A.; Bemis, D.A. Prevalence of oxacillin-and multidrug-resistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1,772 samples (2001-2005). *J Am Vet Med Assoc.* 2007. 230: 221-27.
11. Leonard, F.C.; Markey, B.K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review. *Vet J.* 2008. 175: 27-36.
12. Lilenbaum, W.; Esteves, A.L.; Souza, G.N. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from saliva of clinically normal cats. *Lett Appl Microbiol.* 1999. 28(6):448-52.
13. Lilenbaum, W.; Versa, M.; Blum, E.; Souza, G. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Lett Appl Microbiol.* 2000. 31: 42-5.
14. Lloyd, D.H. Reservoirs of antimicrobial resistance in pet animals. *Clin Infect Dis.* 2007.1Suppl. 2: S148-52.
15. May, E.R.; Hnilica, K.A.; Frank, L.A.; Jones, R.D.; Bemis, A.D. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma, or both. *JAVMA.* 2005. 227 (6): 928-931.
16. Rutland, B.E.; Weese, J.S.; Bolin, C.; Au, J.; Malani, A.N. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis.* 2009. 15(8):1328-30.
17. Sasaki, T.; Kikuchi, K.; Tanaka, Y.; Takahashi, N.; Kamata, S.; Hiramatsu, K. Reclassification of Phenotypically Identified *Staphylococcus intermedius* Strains. *J of Clin Microbiol.* 2007. 45(9): 2770-78.
18. Vargas, R.; Penna, B.; Martins, G.; Martins, R.; Lilenbaum, W. Antimicrobial susceptibility of Staphylococci isolated from naturally occurring canine external ocular diseases. *Vet Ophthalmol.* 2007. 12(4):216-220.
19. Weese, J.S.; Dick, H.; Willey, B.M.; McGeer, A.; Kreiswirth, B.N.; Innis, B.; Low, D.E. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Vet Microbiol.* 2006. 115:148-55.