



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

BACTERIAS AISLADAS DE CASOS CLÍNICOS DE PERRO Y GATO, SUS RESISTENCIAS A  
ANTIBIÓTICOS Y POSIBLE REPERCUSIÓN EN LA ESPECIE HUMANA

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF BACTERIA ISOLATED FROM CLINICAL CASES OF  
DOG AND CAT, AND POSSIBLE IMPACT ON HUMAN SPECIE

Autor/es

Elena Ces de Paz

Director/es

M<sup>a</sup> del Carmen Simón Valencia

Facultad de Veterinaria

2016

---

## ÍNDICE

<b>1. Resumen</b> .....	3
<b>2. Introducción</b> .....	4
<b>2.1. Las bacterias</b> .....	6
<b>2.2. Los antibióticos</b> .....	7
<b>2.3. Antibióticos estudiados y sus mecanismos de resistencia</b> .....	8
<b>3. Objetivos</b> .....	9
<b>4. Material y métodos</b> .....	9
<b>4.1. Animales que han entrado en el estudio</b> .....	9
<b>4.2. Muestras analizadas</b> .....	10
<b>4.3. Método clásico de aislamiento e identificación bacteriana</b> .....	11
<b>4.4. Realización del test de sensibilidad según el Método de Kirby-Bauer</b> .....	11
<b>4.5. Antibióticos usados en los antibiogramas</b> .....	12
<b>4.6. Análisis estadístico de los datos</b> .....	12
<b>5. Resultados</b> .....	13
<b>5.1. Análisis de la relación entre factores epidemiológicos y clínicos con las características de las bacterias aisladas</b> .....	13
<b>5.2. Frecuencia de resistencia de los principales tipos de bacterias en relación a los antibióticos más usados</b> .....	16
<b>5.2.1. Asociación de la sensibilidad de los antibióticos en relación con las características intrínsecas, extrínsecas y clínicas del animal del que se aíslan las cepas bacterianas</b> .....	17
<b>5.2.2. Análisis de la asociación entre las características de las bacterias aisladas y su sensibilidad a antibióticos</b> .....	21
<b>5.2.3. En relación con las cepas multirresistentes</b> .....	23
<b>6. Discusión</b> .....	24
<b>6.1. Sobre la influencia de factores epidemiológicos y clínicos con las características de las bacterias aisladas</b> .....	24
<b>6.2. Recomendaciones para disminuir la resistencia a los antibióticos</b> .....	30
<b>7. Conclusiones</b> .....	30
<b>8. Conclusions</b> .....	31
<b>9. Valoración personal</b> .....	31
<b>10. Anexo</b> .....	32
<b>11. Bibliografía</b> .....	33

## 1. RESUMEN

**Introducción y objetivos.** Los antibióticos son esenciales en el tratamiento de infecciones humanas y animales. Numerosas bacterias han desarrollado o adquirido resistencia parcial o total a los antibióticos, y esto es consecuencia de su uso y abuso. La resistencia a antibióticos aumenta a un ritmo mucho mayor del que se crean nuevos antimicrobianos, lo que obliga a preservar la eficacia de los ya existentes. El objetivo del presente estudio fue estudiar la resistencia antibiótica de bacterias aisladas de casos clínicos y detectar la posible presencia de factores asociados a la misma en los antibióticos más utilizados en la clínica diaria.

**Material y métodos.** Se incluyeron 114 casos de perros y gatos, que se diagnosticaron en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza durante el año 2015. Los datos epidemiológicos, clínicos, las características de la bacteria aislada y su sensibilidad a los antibióticos se introdujeron en una base de datos para el análisis estadístico.

**Resultados.** De los 114 casos sospechosos de infección, se aislaron bacterias en 68 animales, de los cuales se obtuvieron 95 aislados. Los datos más relevantes se estudiaron en *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp* y Enterobacterias. En las infecciones genitales predominaban los *Streptococcus spp*. (88,33%) y en infecciones urinarias las Enterobacterias (75,00%). La resistencia a Antibióticos fue muy elevada en Enterobacterias, seguido por los *Streptococcus spp* y *Staphylococcus spp*.

**Conclusiones.** Las bacterias aisladas son las que habitualmente se encuentran en la clínica del perro y el gato. Su resistencia a los antibióticos más usados para las infecciones del perro y el gato es elevada y superior a las informadas por otros autores. El riesgo de que estos animales colaboren en la diseminación de bacterias o elementos de transmisión de la resistencia a las personas que conviven con ellos puede ser elevado.

**Palabras clave:** Enterobacterias, Staphylococcus, Streptococcus, perro, gato, resistencia a antibióticos, factores de riesgo.

## SUMMARY

**Introduction and objectives.** Antibiotics are essential for treatment of human and animal infections. An important number of bacteria have developed or acquired partial or total antimicrobial resistance mainly due to their use and overuse. Antibiotic resistance is increasing faster than the production of new antibiotics is achieved, that impose the necessity of preserving the efficacy of the actual ones. The aim of this work is the study of antibiotic resistance of bacteria isolated from clinical cases and to detect the associated factors for more used antibiotics

**Material and methods.** The study was carried out with 114 dog and cat cases, along 2015. These were diagnosed in the Infectious diseases laboratory of the Veterinary Faculty of Zaragoza (Spain), recording epidemiological and

clinical data of each animal together with bacterial characteristics and susceptibility to antibiotics, in a database for statistical analysis.

**Results.** Of the 114 cases suspected as infections, they were isolated any bacteria from 68 animals giving 95 isolates. The most relevant data are for *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* and Enterobacteria. *Streptococcus spp.* (88,33%) was highly prevalent in Genital infections and Enterobacteria urinary tract infections (75,00%). Antibiotic resistance was very high in Enterobacteria, followed by *Streptococcus spp* and *Staphylococcus spp*.

**Conclusions.** Isolated bacteria are those which normally are found in dog and cat clinical practice. Its antibiotic resistance to the more used antibiotics in dog and cat infections is elevated and higher than that informed by other authors. The risk for this animals to collaborate in the dissemination of bacteria and other elements for resistance transmission to people living with them, could be elevated.

**Keywords.** Enterobacteria, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, dog, cat, antibiotic resistance, risk factors.

## 2. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son fármacos mediante los cuales se combaten las infecciones de origen bacteriano y por Mycoplasmas, que comprometen la salud humana y animal. En general, está más extendido el término “antibiótico”. El acceso a los mismos es relativamente fácil, y el uso masivo y descontrolado (en muchos países aún no existe legislación relativa al uso, distribución, fabricación e importación de los antimicrobianos) ha provocado una aceleración de la aparición de resistencias a estos fármacos <sup>[1]</sup>.

Por ‘resistencia a los antibióticos’ se entiende la resistencia que desarrollan las bacterias comunes causantes de infecciones. El término ‘resistencia a los antimicrobianos’ es más amplio y comprende la resistencia a los fármacos (de cualquier tipo) utilizados para actuar frente a otros microorganismos, aunque en general se habla de antivíricos, antifúngicos y antiparasitarios, cuando se dirigen a esos agentes <sup>[2]</sup>.

Desde la introducción de los antibióticos en la práctica clínica, en la década de los años 1940, éstos se han convertido en medicamentos indispensables para el tratamiento de la mayoría de los procesos infecciosos bacterianos, tanto en las personas como en los animales. El desarrollo de la resistencia a los antibióticos (RA) - especialmente la aparición y diseminación de bacterias multirresistentes- y la escasez de tratamientos alternativos, son dos de los mayores problemas de salud pública y sanidad animal que es necesario afrontar en la actualidad (Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos) <sup>[3]</sup>.

La ECDC (European Centre for the Diseases control) <sup>[4]</sup> describe la resistencia a los antimicrobianos como la capacidad de un microorganismo para resistir la acción de un antimicrobiano debido a una adaptación a su

entorno para evadirse de su destrucción. Son microorganismos que colonizan y, a veces infectan a los seres humanos y los animales. Las bacterias y otros microorganismos se vuelven resistentes a los tratamientos con antimicrobianos, pero no las personas o los animales. La RA significa una reducción o eliminación de la efectividad del antimicrobiano para curar o prevenir la infección provocada por un microorganismo.

La resistencia a múltiples fármacos (MDR, de la expresión anglosajona "multidrug resistance") corresponde a la resistencia de un microorganismo a múltiples antibióticos. Los microorganismos pueden desarrollar RA al tratar las infecciones animales y humanas o al usar los antibióticos de forma preventiva o para favorecer el crecimiento de los animales de abasto (uso no permitido en Europa desde el año 2003 aunque hay algunos países extracomunitarios que todavía no lo han prohibido), pero también se pueden encontrar microorganismos resistentes o determinantes de resistencia, en los alimentos, el agua o el medio ambiente <sup>[4]</sup>.

Las bacterias adquieren RA cuando inhiben o dificultan la capacidad del fármaco para destruirlas o detener su crecimiento. Algunas bacterias son naturalmente resistentes a ciertos antibióticos (resistencia intrínseca), pero lo que resulta un problema, es que bacterias que normalmente son susceptibles a los antibióticos se vuelvan resistentes como resultado de la adaptación mediante cambios genéticos (resistencia adquirida). Los genes que codifican la RA en una determinada especie bacteriana, se pueden propagar fácilmente a otras bacterias mediante un intercambio de material genético. En la lucha continua por el "espacio ecológico", las bacterias resistentes se seleccionan mientras el antibiótico destruye las bacterias que aún son susceptibles de su alrededor. Todas las bacterias resistentes sobreviven y se multiplican en presencia de los mismos, alargando las infecciones y llegando a causar incluso la muerte. Una vez establecidas en una persona o animal, pueden propagarse a otros individuos. El elevado consumo de antibióticos en una población (en el hospital o la comunidad) favorece dicha diseminación. Las consecuencias de la RA conllevan una mayor atención clínica, sin contar que las terapias antibióticas alternativas suelen encarecer el tratamiento y pueden tener efectos secundarios más graves <sup>[4]</sup>.

Las escasas opciones de tratamiento para los pacientes infectados con microorganismos MDR resultan un desafío <sup>[4]</sup>. La resistencia se desarrolla como una reacción al modo de acción del antimicrobiano, por lo que el resultado puede ser similar si actúan del mismo modo (Resistencia cruzada) <sup>[2, 5]</sup>.

A esto se le debe añadir que el uso intensivo o inapropiado de los antibióticos en la medicina veterinaria conduce a un mayor riesgo de aparición de la resistencia bacteriana a estos, que puede tener un impacto potencial sobre la salud humana <sup>[6]</sup>.

Se ha establecido la vigilancia sistemática de la aparición de RA en las bacterias de animales de abasto, en los alimentos derivados de estos animales y en los seres humanos, y los datos son publicados anualmente por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria sobre la base de los informes de los estados miembros de la UE. Aunque a través de estos sistemas se comunican datos de diferentes especies animales, los datos sobre la

aparición de resistencia a los antibióticos en las bacterias de los animales de compañía son más escasos <sup>[7, 8]</sup>. La transmisión periódica de los datos de sensibilidad bacteriana a los antibióticos en animales de compañía facilitaría una mejor comprensión del fenómeno de resistencia y de las tendencias en este proceso en el tiempo para asegurar la eficacia a largo plazo de los productos antibacterianos. <sup>[6]</sup>

La aparición de RA en animales de compañía puede ser de importancia para la salud humana; dado su entorno compartido, es probable que se produzca la transferencia de bacterias resistentes o determinantes de resistencia entre ambos, tal como se ha indicado en algunos estudios. Sin embargo, el grado en el que este intercambio ocurre es esencialmente desconocido <sup>[7]</sup>.

El 60% de los agentes patógenos para los seres humanos son de origen animal <sup>[1]</sup>, por lo que es preciso combatir estas bacterias patógenas a nivel nacional, regional y mundial. Para conservar la eficacia terapéutica de los agentes antimicrobianos en la sanidad animal es indispensable un uso responsable y prudente. Aquí entra en juego la profesión veterinaria, cuya función es crucial ante la RA, principalmente durante la supervisión de la prescripción y dispensación de este tipo de productos sanitarios. Una profesión veterinaria bien capacitada desde su formación inicial y regulada por la ley es esencial para conseguir el éxito en la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos <sup>[1]</sup>.

A fin de conseguir un uso responsable y prudente en medicina veterinaria, el Código Sanitario para los Animales Terrestres <sup>[9]</sup>, promulgó una serie de medidas necesarias:

- 1) Garantizar el uso racional de los agentes antimicrobianos en los animales, con vistas a optimizar su eficacia y su inocuidad;
- 2) Cumplir con la obligación ética y la necesidad económica de mantener a los animales en buen estado de salud;
- 3) Prevenir o reducir la transferencia de microorganismos resistentes o determinantes de resistencia en el seno de las poblaciones animales, su entorno y entre los animales y los seres humanos;
- 4) Contribuir a mantener la eficacia y la utilidad de los agentes antimicrobianos utilizados en medicina humana y veterinaria;
- 5) Proteger la salud del consumidor garantizando la inocuidad de los alimentos de origen animal en relación con los residuos de agentes antimicrobianos.

## **2.1. Las bacterias** <sup>[10, 11]</sup>

Los *Staphylococcus* son cocos G (+) que forman parte de la flora normal de piel y mucosas de animales y personas, y además son transitorios en el tracto intestinal de ambos. Sin embargo, son organismos patógenos causantes de múltiples y variados procesos patológicos. Se clasifican u en relación a la producción de la enzima coagulasa:

- *Staphylococcus* Coagulasa Positivo (CoPS): *S. aureus sub. aureus*, grupo *S. intermedius* (*S. intermedius*, *S. pseudointermedius* y *S. delphini*). Están implicados en procesos infecciosos supurativos superficiales cutáneo-mucosos (foliculitis, impétigo, otitis...) y pueden complicarse por difusión hemática o por extensión regional originando septicemia, pleuroneumonía, afección osteo-articular o urinaria (infecciones nosocomiales más importantes sanitaria y económicamente). Además, *S. aureus* produce una enterotoxina que provoca cuadros de intoxicación alimentaria <sup>[12, 13]</sup>.
- *Staphylococcus* Coagulasa Negativo (CoNS): *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, han demostrado su poder patógeno en las personas, principalmente a nivel hospitalario, pero existen otros, frecuentemente encontrados en infecciones animales (*S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* y *S. warneri*, *S. simulans*, entre otros), que están adquiriendo mayor importancia como agentes de infecciones en las personas <sup>[14]</sup>.

La resistencia a la meticilina (debido al gen *mecA*), ha aumentado tanto en medicina veterinaria como en humana, y a la vancomicina (alternativa para los aislados resistentes a la meticilina <sup>[16]</sup>). La infección por *S. aureus* resistente a Meticilina (SARM siglas en español / MRSA siglas en inglés), se considera el principal problema “nosocomial” emergente en medicina humana. Aunque también destaca su importancia en poblaciones animales <sup>[17, 18]</sup>.

Los *Streptococcus* son cocos G (+) cuyo hábitat normal son las mucosas de la cavidad oral, vías respiratorias superiores y genitales de los animales y las personas. Los patógenos más comunes en ambas especies, son *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. disgalactiae*, *S. pneumoniae* y el grupo *S. mitis*, grupo *S. bovis*, *S. uberis*, *S. equi*, *S. suis*; todos ellos contienen diversas especies y subespecies, con frecuencia de presentación variable. En general, muchos de ellos tienen carácter piogénico y pueden provocar infecciones como meningitis, glomerulonefritis, poliartritis, neumonías, endometritis, otitis, endocarditis y septicemia, entre otros.

Las *Enterobacterias* son bacilos, o cocobacilos G (-) con una amplia distribución (tracto intestinal de animales y personas, vegetales, agua, suelo y materia orgánica en descomposición). Son patógenos primarios y secundarios que presentan enterotropismo, aunque no se descartan otros tejidos u órganos. En particular, las cepas de *E. coli* productoras de la  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), son infecciones, frecuentemente nosocomiales en la especie humana, que también se consideran graves y emergentes.

## 2.2. Los antibióticos <sup>[10, 11]</sup>

Los puntos de acción de los antibióticos frente a las bacterias ocurren a diferentes niveles:

- *A nivel de la pared celular*: Inhibiendo la biosíntesis del mucopéptido de la pared en diversos estadios de su síntesis (Oxamicina, Bacitracina, Penicilina, Cefalosporinas...) o degradándolo (Lisostafina)
- *A nivel de la membrana plasmática*: Modificando las funciones energéticas que afectan a la respiración celular (funciones de división celular), como la Colistina.

- *A nivel de la información genética:* Inhibiendo la replicación del DNA (Quinolonas), o el proceso de transcripción del DNA al RNAm (Novobiocina).
- *A nivel de la síntesis proteica:* a nivel del ribosoma o RNAr, inhibiendo la transpeptidación al unirse a la unidad 50S (Cloramfenicol, Macrólidos); a nivel del RNAm, inhibiendo el inicio de la síntesis al actuar sobre la subunidad 30S (Aminoglucósidos); a nivel del RNAt, inhibiendo la síntesis de proteínas en la unión aa-RNAt a la subunidad 30 S (Tetraciclinas).
- *Inhibición de metabolitos:* Existen más antibióticos que pueden actuar de otra forma, como las sulfamidas, que actúan inhibiendo la ruta metabólica de síntesis del ácido fólico de la bacteria.

### 2.3. Antibióticos estudiados y sus mecanismos de resistencia <sup>[19, 20]</sup>

**$\beta$ -lactámicos:** Actúan mediante la interrupción de la síntesis de la pared celular bacteriana. Estos medicamentos son más efectivos cuando los organismos se reproducen rápidamente, por la alta tasa de formación de pared celular. El mecanismo más común de resistencia a los betalactámicos es la producción de la enzima  $\beta$ -lactamasa, la cual daña el anillo betalactámico de estos compuestos. La combinación de penicilina con un protector de la  $\beta$ -lactamasa (como puede ser el clavulanato) mejora la eficacia y por lo tanto amplía el espectro de la penicilina hacia organismos susceptibles que han adquirido resistencia mediante la producción de  $\beta$ -lactamasa.

**Cefalosporinas:** Son bactericidas con actividad tiempo-dependiente. Activos sólo en fase de crecimiento bacteriano. Por lo general son más efectivos que la penicilina, penetrando en la pared celular externa de las bacterias G (-), y son menos susceptibles a la inactivación por las  $\beta$ -lactamasas bacterianas.

**Tetraciclinas:** Son bacteriostáticos e interfieren con la síntesis de proteínas de ARN bacteriano, dependiendo de la concentración. Como grupo, tienen un amplio espectro que incluye ciertos G (+) aerobios y anaerobios, y bacterias G (-), mycobacterias, spiroquetas, mycoplasmas... La resistencia bacteriana a las tetraciclinas está presente en varios géneros bacterianos, y puede relacionarse con el nivel de uso de estos medicamentos. Suele estar mediada por plásmidos, y ha sido un problema importante en general, pero ocurre con menor frecuencia con la doxiciclina.

**Quinolonas:** Grupo de bactericidas derivados de la naftiridina, que impiden la síntesis de ADN bacteriano mediante la inhibición parcial de la topoisomerasa bacteriana TP-II y TP-IV. Tienen menos actividad contra las TP de mamíferos. La menor susceptibilidad de la TP-IV a las quinolonas explica en parte la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mayor para algunos organismos G (+). Tienen una actividad bactericida rápida y en relación directa con la concentración de antibiótico en el medio.

**Aminoglucósidos:** Estos antibióticos bactericidas concentración-dependientes interfieren con la síntesis de proteína bacteriana. Son activos contra ciertas bacterias G (-), G (+) aerobias y anaerobias facultativas, incluyendo algunos *Staphylococcus* y mycobacterias; y particularmente efectivos contra bacilos G (-) aerobios como *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*... y algunos contra las *Pseudomonas*. Su administración junto con  $\beta$ -lactámicos



incrementa su actividad contra aerobios G (+), incluyendo *Enterococcus* spp. En infecciones sistémicas serias en las cuales se prevén organismos mixtos, tratar junto con  $\beta$ -lactámicos y un inhibidor de las  $\beta$ -lactamasas nos asegura un amplio espectro de actuación.

**Inhibidores de la ruta del ácido fólico:** Bacteriostáticos con la misma estructura que el ácido paraaminobenzoico (PABA), que utilizan las bacterias para sintetizar ácido fólico. El trimetoprim interfiere con la dihidrofolato reductasa, un enzima que previene la conversión del ácido dihidrofólico (ácido fólico) en ácido tetrahidrofólico (ácido folínico), el cual es esencial para la síntesis de purinas y pirimidinas, y por lo tanto de ADN. Los mamíferos, al contrario que los microorganismos adquieren la mayoría del ácido fólico con la dieta, lo cual explica la acción selectiva de las sulfonamidas contra los microbios. El aumento de la producción de dihidrofolato reductasa por las bacterias entéricas las hace más resistentes a los efectos de estos medicamentos.

### 3. OBJETIVOS

- Objetivo principal: estudiar la resistencia antibiótica de las bacterias aisladas en casos de infección del tracto urinario y genital principalmente de animales de compañía, tales como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., y Enterobacterias.
- Objetivos secundarios:
  - o Conocer la frecuencia de la resistencia a los antibióticos más usados en la clínica
  - o Establecer la importancia de determinados factores de riesgo en el desarrollo de la Resistencia a antibióticos
  - o En la medida que sea posible se analizará la repercusión de la resistencia a antibióticos en animales de compañía en relación a la especie humana
  - o Recordar las medidas que se deben tener en cuenta en relación con el uso de antibióticos en la clínica de las especies canina y felina

### 4. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 4.1. Animales que han entrado en el estudio: especies, número, origen, datos recogidos de esos animales

En nuestro estudio hemos tenido en cuenta y analizado diversos factores que muestran alguna influencia sobre la RA de Enterobacterias, *Staphylococcus* spp y *Streptococcus* spp, los cuales hemos dividido en:

- Factores intrínsecos a los animales:
  - Especie: perro y gato
  - Sexo: macho y hembra
  - Edad: cachorro (0-2 años), adulto (2-8 años), senior (mayor de 8 años)

- Raza:
  - Según tamaño: pequeños (hasta 15 kg), medianos (16-30 kg), grandes (más de 30 kg)
  - Según la pureza: pura (aunque no tenga pedigree, que se puedan identificar con alguna raza), cruce (mestizos o combinaciones)
- Factores extrínsecos a los animales:
  - Según la fecha de entrada en el laboratorio:
    - Meses: julio, junio, mayo, noviembre
    - Estaciones: invierno, otoño, primavera, verano
- Factores relacionados con el cuadro clínico (se señala en negrita las variables de cada factor con las que se ha realizado el análisis estadístico):
  - Tipo de cuadro clínico: digestivo, **genital**, respiratorio, piel-tegumentos, huesos, **urinario**
  - Si es recidivante o no
  - Tipo de muestra para el diagnóstico: Fluido (F) del lavado nasal; Hisopo (H) de Heridas; H. de lesiones; H. oral; H. ótico; **H. de prepucio**; **H. vaginal**; Líquido (L) articular; L. de seroma; **Orina**; Raspado de mucosa
  - Localización de la muestra: Interna (extraída de órganos internos), externa (piel y mucosas en contacto con el exterior)
  - Se ha considerado en el estudio: si se ha aislado o no algún tipo de bacteria. Si se aisló alguna bacteria, se ha considerado su morfología (bacilo / coco), y la tinción de Gram, como datos generales. Dentro de los aislados bacterianos, se seleccionaron para realizar el análisis estadístico en el estudio *Staphylococcus*, *Streptococcus* y Enterobacteria, por ser los más prevalentes.
  - Factores relacionados con los tratamientos recibidos:
    - Si ha recibido tratamiento antibiótico empírico o no
    - Resultados del antibiograma

#### 4.2. Muestras analizadas

Las muestras recibidas en el laboratorio, varían según el cuadro clínico que presenta el animal. Se ha de mencionar que en el análisis estadístico solo se han usado cuando había un número suficiente (mínimo 10 muestras) para poder interpretar el resultado, de modo que finalmente, se ha trabajado con las muestras de: H. de prepucio, H. vaginal y orina.

Todas las muestras son recogidas con métodos asépticos. Los hisopos utilizados son estériles y llevan medio de transporte, (Amies medium and swab PS + Viscose, Rf, 300287, Deltalab). En el caso de la orina, se obtiene por cistocentesis y llega al laboratorio en la jeringuilla estéril utilizada para su extracción.

### 4.3. Método clásico de aislamiento e identificación bacteriana

Las muestras son cultivadas sobre medios sintéticos:

- Medio Columbia Agar sangre de cordero (OXOID, Rf: PB5039A), cultivado en aerobiosis y anaerobiosis (AnaeroGen, 2,5 L de Thermo-Scientific, Rf: AN0025A) en bolsas de anaerobiosis (GenBag de Biomerieux)
- Agar MacConkey (OXOID, Rf: PO0149)

Las muestras en las que se sospecha que la presencia de bacterias puede ser escasa, también son sembradas en Caldo BHI (Brain Heart Infusion, de OXOID Ref: CM1135) para el enriquecimiento de la muestra.

Tras realizar la incubación a 37°C en aerobiosis (el cultivo en anaerobiosis únicamente se ha realizado en caso de sospecha de estos agentes) durante 24-72 h, se procede a la observación microscópica directa de la muestra, mediante tinción **Giemsa** y a partir de los aislados en cultivo por tinción **Gram**.

#### *Identificación y pruebas bioquímicas utilizadas*

En las placas de agar sangre en que hay crecimiento bacteriano se observa la presencia y tipo de hemólisis, así como color y forma de las colonias. En caso del agar Mac-Conkey, se mira el color (Lactosa +/-) y aspecto de la colonia. Con los datos anteriores y según se trate de Gram+ o Gram-, si son cocos, bacilos o coco-bacilos, se determinan las pruebas bioquímicas a utilizar (las más frecuentes):

Catalasa, Oxidasa, Ureasa, Indol; Oxidación/Fermentación de Azúcares y cultivo en TSI (Triple Sugar Iron Agar, OXOID, Rf. CM0277); Movilidad; prueba de la Coagulasa (diferenciar grupos de *Staphylococcus* spp); Prueba de la ONPG (Beta-galactosidasa) diferenciación de especies de *Staphylococcus* coagulasa positivo

Sistema API de identificación de *Staphylococcus* spp (API® Staph), *Streptococcus* spp (API®20 Strep) y Enterobacterias (API® 20E) para diferenciar la especie, cuando no se ha podido hacer por métodos más sencillos.

### 4.4. Realización del test de sensibilidad según el Método de Kirby-Bauer (difusión en disco) <sup>[21]</sup>

Se utiliza el medio de Agar Müller-Hinton (OXOID, Rf:), como base. Con hisopo estéril se recoge unas colonias del cultivo y se diluyen en solución salina estéril hasta [0,5] de McFarland. A partir de esta dilución, se realiza la siembra en el medio, mediante estrías muy próximas que recorren toda la superficie del Agar en 3 direcciones. A continuación, se depositan asépticamente los discos de los antibiogramas elegidos, con una distancia que permita, al menos que no se mezclen los antibióticos durante la difusión. Tras esto, se incuban a 35°C-37°C durante 18 a 24 h. La lectura se realiza midiendo el halo de inhibición del crecimiento, teniendo como límites la zona en la que el crecimiento es mayor al 10% de la densidad del cultivo sin antibiótico.

#### 4.5. Antibióticos usados en los antibiogramas

En la práctica diaria del diagnóstico de Enfermedades Infecciosas del Perro y el Gato, se utilizan antibióticos que reúnan una serie de condiciones:

- Que sean apropiados al cuadro clínico presentado por el paciente y su especie.
- Que sean apropiados al agente bacteriano aislado
- Que pueda ser administrado por vía oral, para facilitar la administración de los responsables puedan encargarse de la administración del antibiótico en sus domicilios.
- Siempre que el caso lo requiere, se utiliza algún antibiótico que pueda ser administrado en una sola toma o inyección y tenga actividad de larga duración

El estudio ha englobado los principales tipos que se recomiendan para uso en animales de compañía: (en el análisis se han considerado aquellos usados en más de 15 antibiogramas, señalados en negrita)

- **Penicilinas:** Penicilina (PEN), Amoxicilina (AMX), **Ampicilina (AMP)**
- **$\beta$ -lactámicos y Combinados con  $\beta$  lactamasas:** **Amoxicilina-Clavulánico (AMC)**
- **Cefalosporinas:** **Cefalexina (CFL)**, **Cefovecine (CFV)**, Cefalotin (CEP)
- **Aminoglucósidos:** Amikacina (AMK), **Gentamicina (GEN)**, Estreptomicina (STR) y Tobramicina (TOB)
- **Inhibidores de la vía del Ac. Fólico:** **Trimethoprim-sulphamethoxazol (SxT)**
- Lincosamidas: Clindamicina (CLI)
- Macrólidos: Eritromicina (ERY)
- Nitrofuranos: Nitrofurantoina (NIT)
- Nitroimidazoles: Metronidazol (MTZ)
- **Quinolonas:** Ácido Nalidíxico (NAL), Ciprofloxacina (CIP), **Enrofloxacina (ENR)**, **Pradofloxacina (PRD)**, Marbofloxacina (PBF)
- Tetraciclina: Tetraciclina (TE), Doxicilina (DOX)

Además de los resultados individuales a cada antibiótico, en la base de datos se ha tenido en cuenta la resistencia a múltiples antibióticos **MDR**, entendiéndose como tal la resistencia a 4 o más tipos de antibióticos.

#### 4.6. Análisis estadístico de los datos

Este trabajo es un estudio retrospectivo de los patrones de resistencia de bacterias aisladas en casos clínicos registrados en el Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza durante el año 2015. Dada la diversidad de casos y agentes, para el estudio se ha realizado una selección de los que mostraban una prevalencia mayor, para el análisis estadístico (*Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp y Enterobacterias).

*Análisis estadístico:* se trabajó con Excel 2010, y el paquete estadístico Epi Info™ 7.0 (Center for the Diseases Control and Prevention, Atlanta GA, USA), con el que se ha realizado el análisis de frecuencias y se ha determinado la asociación entre factores recogidos en el estudio y la resistencia a los antibióticos más utilizados mediante el test de contingencia chi-cuadrado o el test de Fisher (cuando alguna de las variables de los factores del estudio tiene un número comprendido entre 1 y 5 en alguna celda de la tabla de contingencia). Los valores de  $p \leq 0,05$  al 95% Intervalo de Confianza (IC) fueron se consideran como asociación estadísticamente significativa.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análisis de la relación entre factores epidemiológicos y clínicos con las características de las bacterias aisladas.

En la *tabla 1* se observa cómo la posibilidad de aislar bacterias de la muestra es mayor cuando se trata de un caso de evolución crónica (67,69%), ( $p= 0,0212$ ); así mismo, en el conjunto de las muestras en las que hubo aislamiento de bacterias, el 59,09% procedían de zonas del cuerpo relacionadas con el exterior ( $p= 0,0000$ ). Algo similar ocurría con las muestras procedentes de casos de afección genital, de las que se obtuvo aislamiento de bacterias en un 59,18%, frente a un 80,00% de las muestras de orina, que eran un 80,00% del grupo de casos sin aislamiento de bacterias ( $p = 0,0001$ ).

*Tabla 1: Asociaciones que han mostrado significancia estadística entre factores epidemiológicos y el aislamiento de bacterias a partir de la muestra.*

Factor	Variables	Aislamiento de Bacterias [n; (%)]		Valor de "p"
		No	Sí	
Evolución Clínica	Aguda	24 (61,54)	21 (32,31)	0,0212*
	Crónica	15 (38,46)	44 (67,69)	
	Total	39	65	
Localización de la muestra	Externa	7 (15,22)	39 (59,09)	0,0000*
	Interna	39 (84,78)	27 (40,91)	
	Total	46	66	
Tipo de Cuadro Clínico	Genital	8 (20,00)	29 (59,18)	0,0001*
	Urinario	32 (80,00)	20 (40,82)	
	Total	40	49	

En la *tabla 2* se observa que en el grupo de casos de los que se aisló un solo tipo de bacteria, un 83,33% eran de origen canino, cuando se aisló más de una bacteria, las proporciones en ambas especies eran más próximas (felinas un 40,00% y caninas un 60,00%), ( $p= 0,0263$ ). Por otro lado, en el conjunto de los casos en los que se aisló más de un tipo de bacterias, había un 70,59% de animales que sufrían un caso de gravedad moderada, ( $p = 0,0158$ ), además, en este grupo predominaban las muestras de prepucio y de vagina (ambos con un 40,00%),

frente a los casos con aislamiento único que provenía, mayoritariamente (50,00%) de muestras de orina ( $p = 0,0323$ , según el test de Fisher).

*Tabla 2: Asociaciones que han mostrado significancia estadística entre factores epidemiológicos y el número de bacterias aisladas a partir de la muestra.*

Factor	Variables	Nº Agentes aislados [n; (%)]		Valor de "p"
		1	> 1	
Especie	Gato	8 (16,67)	8 (40,00)	0,0263*
	Perro	40 (83,33)	12 (60,00)	
	Total	48	20	
Estado Clínico	Leve	28 (60,87)	5 (29,41)	0,0158*
	Moderado	18 (39,13)	12 (70,59)	
	Total	46	17	
Tipo de Muestra	H. de Prepucio	15 (41,63)	4 (40,00)	F 0,0323*
	H. de vagina	3 (8,33)	4 (40,00)	
	Orina	18 (50,00)	2 (20,00)	
	Total	36	10	

En relación a la tinción Gram de las bacterias aisladas, dentro de las bacterias Gram (+), la mayoría procedían de animales adultos (65,63%). En el caso de las bacterias Gram (-), se han aislado más de los animales senior (57,69%;  $p = 0,0246$ , según test de Fisher). Así mismo, dentro del grupo de bacterias Gram negativo, procedían, mayoritariamente de animales de raza pura (84,62%) mientras en las Gram positivas tanto las razas puras como los cruces aportaban un 50,00% de las bacterias ( $p = 0,0057$ , según el test de Fisher).

*Tabla 3: Asociaciones que han mostrado significancia estadística entre factores epidemiológicos y la tinción Gram de las bacterias aisladas.*

Factor	Variables	Clasificación por la tinción Gram [n; (%)]		Valor de "p"
		Gram (-)	Gram (+)	
Edad	Adulto	8 (30,77)	21 (65,63)	F 0,0246*
	Cachorro-Jóven	3 (11,54)	3 (9,38)	
	Senior	15 (57,69)	8 (25,00)	
	Total	26	32	
Pureza de la raza	Cruce	4 (15,38)	15 (50,00)	F 0,0057*
	Pura	22 (84,62)	15 (50,00)	
	Total	26	30	

Al estudiar la asociación de los factores respecto a la morfología microscópica de las bacterias aisladas (bacilos y cocos), dentro del grupo de bacilos, el mayor número de aislados procedían de los perros senior (53,85%), mientras en el grupo de cocos, eran los adultos, los que aportaban un 65,52%, mientras que en los cachorros-jóvenes, los aislamientos eran muy bajos en ambos tipos de bacterias ( $p = 0,0356$ ; según el test de Fisher). Por

otro lado, en el grupo de bacilos, la mayoría procedían de las hembras (76,92%), mientras que, en el grupo de cocos, los porcentajes aportados por machos y hembras eran cercanos al 50 % ( $p = 0,0374$ ). Además, los bacilos fueron aislados principalmente, de cuadros de afección del aparato urinario (66,67%), y los cocos de cuadros de afección genital (68,18%), ( $p = 0,0176$ ).

Previo al análisis estadístico, en la *tabla 5* se presentan los diferentes géneros bacterianos aislados, con el porcentaje relativo al número de animales y al número total de cepas aisladas.

*Tabla 4 Asociaciones que han mostrado significancia estadística entre factores epidemiológicos y clínicos y la morfología de las bacterias aisladas.*

Factor	Variables	Morfología de la Bacteria [n; (%)]		Valor de "p"
		Bacilos	Cocos	
Edad	Adulto	8 (30,77)	19 (65,52)	F 0,0356*
	Cachorro-Jóven	4 (15,38)	2 (6,90)	
	Senior	14 (53,85)	8 (27,59)	
	Total	26	29	
Sexo	Hembra	6 (23,08)	14 (46,67)	0,0374*
	Macho	20 (76,92)	16 (53,33)	
	Total	26	30	
Tipo de cuadro Clínico	Genital	6 (33,33)	15 (68,18)	0,0176*
	Urinario	12 (66,67)	7 (31,82)	
	Total	18	22	

*Tabla 5: frecuencia de aislamiento de los géneros bacterianos más aislados, en relación al número de animales (N = 68) y el número de cepas totales aisladas (N = 95).*

Grupo Bacateriano	Bacteria: n	Animales %	Cepas %	Tipo de bacteria	Animales %	Cepas %	
Cocos Gram (+)	<i>Staphylococcus</i> spp: 16	23,53	16,84	CoP: 8	11,76	8,42	
				CoN: 8	11,76	8,42	
	<i>Streptococcus</i> spp: 16	23,53	16,84	S. $\beta$ : 13	19,12	13,68	
				S. $\alpha$ : 3	4,41	3,16	
Cocos Gram (-)	<i>Neisseria</i> spp: 3	4,41	3,16				
	<i>Enterococcus</i> spp: 5	7,35	5,26				
	<i>Micrococcus</i> spp: 3	4,41	3,16				
Bacilos Gram (+)	<i>Corynebacterium</i> spp: 7	10,29	7,37				
Bacilos Gram (-)	<i>Pasteurella</i> spp: 5	7,35	5,26				
	<i>Pseudomonas</i> spp: 4	5,88	4,21				
	<i>Acinetobacter</i> spp: 1	1,47	1,05				
	BGNF: 1	1,47	1,05				
	<i>Haemophylus</i> spp: 1	1,47	1,05				
	<i>Enterobacterias</i>	<i>E coli</i> : 14	20,6	14,74			
		<i>Klebsiella</i> spp: 1	1,47	1,05			
<i>Proteus</i> spp: 6		8,80	6,32				

CoP: *Staphylococcus coagulasa positivos*; CoN: *Staphylococcus coagulasa negativos*; S.  $\alpha$ : *Streptococcus* - hemolíticos; S.  $\beta$ : *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos;

El análisis estadístico de la relación de los factores epidemiológicos y clínicos con los tipos de bacterias aisladas (Tabla 6), se ha restringido a los géneros más numerosos (*Streptococcus* spp y *Staphylococcus* spp, con 16 aislados de cada uno) y al grupo de las Enterobacterias (que incluye los géneros *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp y *Proteus* spp, con un total de 21 aislados).

Se puede observar que el grupo de las Enterobacterias proceden mayoritariamente de las muestras de orina (75,00%), en el grupo de los *Staphylococcus* spp, también (71,43%) mientras que en el grupo de los *Streptococcus* spp el 85,71% procedían de muestras de prepucio ( $p = 0,0149$ ). De modo similar, en el grupo de las Enterobacterias predominan los cuadros de afección urinaria (75,00%), en el de los *Staphylococcus* spp la proporción es similar entre las muestras de cuadros de afección genital y urinaria (50,00%) y en el grupo de los *Streptococcus* spp el 91,67% procedían de muestras de casos de afección genital.

Tabla 6: Asociaciones que han mostrado significancia estadística entre factores epidemiológicos y clínicos y las bacterias aisladas.

Factor	Variables	Bacteria Aislada, [n; (%)]			Valor de "p"
		Enterobacteria	<i>Staphylococcus</i> spp	<i>Streptococcus</i> spp	
Tipo de muestra	H. de prepucio	3 (25,00)	2 (28,57)	6 (85,71)	F 0,0149*
	Orina	9 (75,00)	5 (71,43)	1 (14,29)	
	Total	12	7	15	
Tipo de Cuadro Clínico	Genital	3 (25,00)	5 (50,00)	11 (91,67)	F 0,0032*
	Urinario	9 (75,00)	5 (50,00)	1 (8,33)	
	Total	12	10	12	

## 5.2. Frecuencia de Resistencia de los principales tipos de bacterias en relación a los antibióticos más usados

En general el grupo de las Enterobacterias han presentado frecuencias de resistencia a los antibióticos superior al 50% con la AMC, CFL, DOX, GEN, siendo de un 100,00% de los aislados con la DOX. Por otro lado, las frecuencias de sensibilidad superiores al 50,00% se han observado con CFV, ENR, PRD y SxT, con valores comprendidos entre el 55,00% frente a CFV y el 70,00% frente a PRD. (ANEXO I)

En el grupo de los *Staphylococcus* spp, se han presentado valores de sensibilidad frente a los principales antibióticos estudiados comprendidos entre el 60,00% frente a la ENR y el más alto, frente a la PRD (90,91%). (ANEXO I)

El grupo de los *Streptococcus* spp, ha mostrado una frecuencia de cepas sensibles igual o superior a 50,00% con AMC, CFL, CFV, DOX, PRD, siendo el valor más bajo con DOX (50,00%) y el más alto con AMC (85,71%). (ANEXO I)



**5.2.1. Asociación de la sensibilidad de los antibióticos en relación con las características intrínsecas, extrínsecas y clínicas del animal del que se aislaron las cepas bacterianas.**

En relación con la especie, en la *tabla 7* se observa que las cepas bacterianas aisladas de los gatos muestran un ligero predominio de resistencia a la CFV y PRD (52,94% en ambas), sin embargo, entre las cepas aisladas de los perros, hemos detectado alto porcentaje de cepas sensibles a CFV (71,93%) y PRD (80,39%).

En esta misma tabla, podemos observar que las cepas aisladas de hembras presentan niveles de resistencia variados a CFV (51,72%), ENR (68,97%), PRD (50,00%) y SxT (72,22%), frente a las cepas aisladas de los machos, en las que hay predominio de cepas sensibles a CFV (77,78%), ENR (65,96%), PRD (85,71%) y SxT (57,58%).

*Tabla 7: Resultados de la asociación estadística entre factores intrínsecos del animal del que se han aislado las cepas bacterianas (especie, sexo) y la resistencia de los antibióticos.*

	Especie [n; (%)]		Valor "p"		Sexo [n; (%)]		Valor "p"
	Gato	Perro			Hembra	Macho	
<b>CFV</b>			0,0355*	<b>CFV</b>			0,0056*
R	9 (52,94)	16 (28,07)		R	15 (51,72)	10 (22,22)	
S	8 (47,06)	41 (71,93)		S	14 (48,28)	35 (77,78)	
Total	17	57		Total	29	45	
<b>PRD</b>			0,0067*	<b>ENR</b>			0,0018*
R	9 (52,94)	10 (19,61)		R	20 (68,97)	16 (34,04)	
S	8 (47,06)	41 (80,39)		S	9 (31,03)	31 (65,96)	
Total	17	51		Total	29	47	
				<b>PRD</b>			0,0011*
				R	13 (50,00)	6 (14,29)	
				S	13 (50,00)	36 (85,71)	
				Total	26	42	
				<b>SxT</b>			0,0243*
				R	13 (72,22)	14 (42,42)	
				S	5 (27,78)	19 (57,58)	
				Total	18	33	

En relación con la *edad* del animal del que se han aislado las cepas bacterianas (*tabla 8*), el análisis estadístico reveló que fueron aquellos animales de edad avanzada quienes mostraron un mayor número de resistencias, siendo significativos los resultados frente a la amoxicilina-clavulánico (60,61% de resistencia, con una  $p=0,0012$ ), la cefalexina (78,95% de resistencia, con  $p=7,007$  según el test de Fisher), la cefovecina (66,67%, con  $p=0,02$ ) y la doxiciclina (resistencia del 73,33% con una  $p=0,0147$ ).

Tabla 8: Resultados de la asociación estadística entre la edad del animal del que se aislaron las cepas bacterianas y la sensibilidad a los antibióticos.

	Edad [n; (%)]		Valor "p"
	Adulto	Senior	
<b>AMC</b>			
R	8 (23,53)	20 (60,61)	0,0012*
S	26 (76,47)	13 (39,39)	
Total	34	33	
<b>CFL</b>			
R	8 (36,36)	15 (78,95)	0,0070 (F)**
S	14 (63,64)	4 (21,05)	
Total	22	19	
<b>CFV</b>			
R	7 (20,59)	14 (66,67)	0,0200*
S	27 (79,41)	17 (54,84)	
Total	34	31	
<b>DOX</b>			
R	14 (45,16)	22 (73,33)	0,0147*
S	17 (54,84)	8 (26,67)	
Total	31	30	
<b>PRD</b>			
R	5 (15,15)	11 (37,93)	0,0243*
S	28 (84,85)	18 (62,07)	
Total	33	29	

En la *tabla 9* se observa que en el grupo de las razas grandes se han aislado un alto porcentaje de cepas resistentes a la ENR, de las razas Medianas se ha aislado un porcentaje igual de cepas resistentes y sensibles (50,00%), las aisladas de razas pequeñas son mayoritariamente sensibles (84,62%).

En la *tabla 10* se puede observar el máximo de resistencia a la DOX ha ocurrido con las cepas aisladas en los meses de Mayo (73,33%) y Junio (90,00%), mientras que en los meses de Julio y Noviembre, predominaban las cepas sensibles (54,55% y 70,00%, respectivamente). Sin embargo, cuando se observa la sensibilidad a la PRD, se observa que s en Noviembre hay predominio de cepas resistentes (62,50%), mientras que en las cepas aisladas en Mayo, Junio y Julio se aislaron mayor número de cepas sensibles (80,00%, 90,00% y 76,92%, respectivamente).

En relación con la *estación*, se observa que en el *otoño* ha habido mayor porcentaje de aislados resistentes a PRD (58,82%), mientras que en Primavera, Verano e Invierno, predominan los aislados sensibles (valores superiores al 80,00%).

En la *tabla 11* se puede observar que las cepas aisladas de casos clínicos leves son mayoritariamente sensibles a la CFV y DOX (77,14% y 55,88%, respectivamente) mientras que, si son cepas de cuadros clínicos moderados, hay un

predominio de cepas resistentes frente a la DOX (76, 47%), mientras que hay un ligero predominio de cepas sensibles frente a la CFV (57,14%). Por otro lado, las cepas aisladas de cuadros agudos muestra altos niveles de sensibilidad a AMC, DOX, ENR y GEN (75,00%, 59,09%, 70,83% y 81,82%, respectivamente), mientras que las cepas aisladas de cuadros de evolución crónica son resistentes a DOX (70,73%), ENR (60,87%) y GEN (64,44%), con un porcentaje algo más alto de cepas sensibles frente a AMC (54,36%).

En la *tabla 12* se observa que las cepas aisladas de muestras en contacto con el exterior, muestran mayor nivel de resistencia a SxT (66,67%), mientras que las cepas que se aíslan de muestras de órganos internos, son mayoritariamente sensibles a este antibiótico (64,00%). Las bacterias aisladas de animales que han recibido tratamiento antibiótico de previo, muestran un predominio de resistencia frente a GEN (60,00%), mientras que entre las aisladas de los animales que no los han recibido, son mayoritariamente sensibles a la GEN (73,68%) y PRD (88,89%). Por otro lado, cuando se trata de aislados procedentes de procesos recidivantes hay un alto porcentaje de cepas resistentes a ENR (77,27%) y SxT (66,67%), mientras que, si las cepas se aislaron de infecciones primarias, hay altos porcentajes de cepas sensibles a ENR y SxT.

En la *tabla 13*, se observa que las cepas aisladas de hisopo de prepucio y orina, son mayoritariamente sensibles a ENR (66,67% y 59,09%, respectivamente), pero las aisladas de hisopo vagina son mayoritariamente resistentes (78,57%).

*Tabla 9: Resultados de la asociación estadística entre el tamaño de la raza y la resistencia de los antibióticos.*

ENR	Raza-tamaño [n; (%)]			Valor "p"
	Grande	Mediana	Pequeña	
R	7 (70,00)	13 (50,00)	2 (15,38)	0,0240**
S	3 (30,00)	13 (50,00)	11 (84,62)	
Total	10	26	13	

*Tabla 10: Resultados de la asociación estadística entre el mes y estación del año en los que se aislaron las bacterias y la resistencia de los antibióticos.*

DOX	Mes [n; (%)]				Valor "p"
	Mayo	Junio	Julio	Noviembre	
R	11 (73,33)	9 (90,00)	5 (45,45)	3 (30,00)	0,0132
S	4 (26,67)	1 (10,00)	6 (54,55)	7 (70,00)	
Total	15	10	11	10	
PRD	Estación [n; (%)]				Valor "p"
	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	
R	4 (18,18)	4 (17,39)	10 (58,82)	1 (16,67)	0,0132*
S	18 (81,82)	19 (82,61)	7 (41,18)	5 (83,33)	
Total	22	23	17	6	

Tabla 11: Resultados de la asociación estadística entre el estado y evolución clínica y la resistencia de los antibióticos.

	Estado Clínico [n; (%)]		Valor "p"		Evolución Clínica [n; (%)]		Valor "p"
<b>CFV</b>	<b>Leve</b>	<b>Moderado</b>		<b>AMC</b>	<b>Aguda</b>	<b>Crónica</b>	
R	8 (22,86)	15 (42,86)	0,0416*	R	6 (25,00)	21 (45,65)	0,0499*
S	27 (77,14)	20 (57,14)		S	18 (75,00)	25 (54,35)	
Total	35	35		Total	24	46	
<b>DOX</b>				<b>DOX</b>			
R	15 (44,12)	26 (76,47)	0,0038*	R	9 (40,91)	29 (70,73)	0,0131*
S	19 (55,88)	8 (23,53)		S	13 (59,09)	12 (29,27)	
Total	34	34		Total	22	41	
				<b>ENR</b>			
				R	7 (29,17)	28 (60,87)	0,0069*
				S	17 (70,83)	18 (39,13)	
				Total	24	46	
				<b>GEN</b>			
				R	4 (18,18)	29 (64,44)	F 0,0004*
				S	18 (81,82)	16 (35,56)	
				Total	22	45	

Tabla 12: Resultados de la asociación estadística entre la localización de la muestra, caso recidivante, y haber recibido tratamiento antibiótico previo, con la resistencia de los antibióticos.

	Localización de la muestra [n; (%)]		Valor "p"		Recidiva [n, (%)]		Valor "p"
	<b>Exterior</b>	<b>Interior</b>		<b>ENR</b>	<b>No</b>	<b>Si</b>	
<b>SxT</b>			0,0106*	R	10 (30,30)	17 (77,27)	0,0004*
R	18 (66,67)	9 (36,00)		S	23 (69,70)	5 (22,73)	
S	8 (30,77)	16 (64,00)		Total	33	22	
Total	26	25					
	<b>Tto. Antibiótico previo [n, (%)]</b>		Valor "p"				
<b>GEN</b>	<b>No</b>	<b>SI</b>	0,0128*	<b>SxT</b>			0,0562**
R	5 (26,32)	18 (60,00)		R	7 (38,89)	12 (66,67)	
S	14 (73,68)	12 (40,00)		S	11 (61,11)	6 (33,33)	
Total	19	30		Total	18	18	
<b>PRD</b>			F 0,0114*				
R	2 (11,11)	12 (48,00)					
S	16 (88,89)	13 (52,00)					
Total	18	25					

Tabla 13. Resultados de la asociación estadística entre el tipo de muestra y la resistencia de los antibióticos.

ENR	Tipo de muestra [n; (%)]			Valor "p"
	H. prepucio	H. vagina	Orina	
R	8 (33,33)	11 (78,57)	9 (40,91)	0,0209*
S	16 (66,67)	3 (21,43)	13 (59,09)	
Total	24	14	22	

### 5.2.2. Análisis de la asociación entre las características de las bacterias aisladas y su sensibilidad a los antibióticos.

Como se puede observar en la *tabla 14*, dentro del grupo de bacterias Gram negativas hay un predominio de cepas Resistentes a la AMC (61,11%), CFL (73,91%), mientras que en las Gram positivas, predominan las cepas sensibles (82,50% y 70,83%, respectivamente); sin embargo, con la CFV que también tiene alta proporción de aislados Gram positivos sensibles (76,92%), tiene proporciones muy similares de cepas R y S dentro del grupo de Gram negativo; con la DOX se observa alta prevalencia de aislados Gram negativos resistentes y proporciones muy similares de aislados resistentes y sensibles dentro del grupo de Gram positivos.

Si atendemos a la morfología del agente aislado (*tabla 15*), dentro del grupo de cocos hay alta prevalencia de cepas sensibles a la AMC (83,78%), mientras que entre los bacilos se aprecia una prevalencia de cepas resistentes y sensibles más igualada, aunque con predominio de las cepas resistentes (58,97), respecto a la CFL, la resistencia de las cepas de bacilos es más elevada (79,17%), frente a una sensibilidad alta de las cepas de cocos (78,26%); % y algo similar se observa en relación a la CFV, con alta prevalencia de cepas de cocos sensibles (80,56%), frente a un ligero predominio de cepas sensibles en el grupo de los bacilos (52,63%); en el caso de la DOX se da la situación contraria, con alta prevalencia de cepas resistentes entre los bacilos y un ligero predominio (59,38%), de cepas sensibles entre las cepas de cocos.

En la *tabla 16* se puede observar que dentro del grupo de las Enterobacterias hay un alto porcentaje de cepas resistentes a la AMC (71,43%) y la CFL (90,91%), mientras que se observa la situación contraria respecto a la ENR y el SxT, (61,90% de aislados sensibles en ambas). Dentro del grupo de los *Staphylococcus* spp, se encuentra una alta prevalencia de cepas sensibles a AMC (80,00%), CFL (83,33%), ENR (60,00%) y SxT (63,64%). En el grupo de los *Streptococcus* spp hay una alta proporción de cepas sensibles a la AMC, y un ligero predominio de cepas sensibles a la CFL, mientras predominan las cepas resistentes frente a ENR (78,57%) y SxT (80,00%)

Tabla 14 Asociaciones que han mostrado significancia estadística entre la tinción Gram y la resistencia a los antibióticos del estudio.

Gram/ ATB	Negativo [n; (%)]	Positivo [n; (%)]	Valor "p"
<b>AMC</b>			
R	22 (61,11)	7 (17,50)	0,00006*
S	14 (38,89)	33 (82,50)	
Total	36	40	
<b>CFL</b>			
R	17 (73,91)	7 (29,17)	0,0014*
S	6 (26,09)	17 (70,83)	
Total	23	24	
<b>CFV</b>			
R	16 (45,71)	9 (23,08)	0,0227*
S	19 (54,29)	30 (76,92)	
Total	35	39	
<b>DOX</b>			
R	26 (74,29)	15 (44,12)	0,0063*
S	9 (25,71)	19 (55,88)	
Total	35	34	

Tabla 15: Asociaciones que han mostrado significancia estadística entre la morfología de la bacteria y la resistencia a los antibióticos del estudio

Morfología ATB	Bacilos [n; (%)]	Cocos [n;(%)]	Valor "p"
<b>AMC</b>			
R	23 (58,97)	6 (16,22)	0,00007*
S	16 (41,03)	31 (83,78)	
Total	39	37	
<b>CFL</b>			
R	19 (79,17)	5 (21,74)	0,00005*
S	5 (20,83)	18 (78,26)	
Total	24	23	
<b>CFV</b>			
R	18 (47,37)	7 (19,44)	0,0064*
S	20 (52,63)	29 (80,56)	
Total	38	36	
<b>DOX</b>			
R	28 (75,68)	13 (40,63)	0,0019*
S	9 (24,32)	19 (59,38)	
Total	37	32	

Tabla 16: Asociaciones que han mostrado significancia estadística entre la bacteria aislada y la resistencia a los antibióticos del estudio

ATB / Bacteria	Enterobacteria [n; (%)]	Staphylococcus [n; (%)]	Streptococcus [n; (%)]	Valor "p"
<b>AMC</b>				
R	15 (71,43)	3 (20,00)	2(14,29)	0,0006*
S	6 (28,57)	12 (80,00)	12 (85,71)	
Total	21	15	14	
<b>CFL</b>				
R	10 (90,91)	2 (16,67)	3 (42,86)	0,0005*
S	1 (9,09)	10 (83,33)	4 (57,14)	
Total	11	12	7	
<b>ENR</b>				
R	8 (38,10)	6 (40,00)	11 (78,57)	0,0415*
S	13 (61,90)	9 (60,00)	3 (21,43)	
Total	21	15	14	
<b>SxT</b>				
R	8 (38,10)	4 (36,36)	4 (80,00)	0,0381*
S	13 (61,90)	7 (63,64)	1 (20,00)	
Total	21	11	5	

### 5.2.3 En relación con las cepas multirresistentes

En nuestro estudio se han encontrado 30 cepas con Multirresistencia (31,58% de las cepas aisladas). En relación con la especie, en la *tabla 17* se observa que entre los aislados de los gatos hay un ligero predominio de MDR (58,82%), sin embargo, dentro del grupo de los aislados caninos predominan las que no manifiestan MDR (66,67%). En relación con la edad, se encontró un alto porcentaje de aislados MDR en los animales senior (60,61%), mientras que en los adultos había un porcentaje muy elevado de aislados no MDR (82,96%).

En relación con la estación (*tabla 18*), se observa que es en otoño cuando se aisló el mayor porcentaje de bacterias MDR (61,90%), seguido por las cepas de la primavera (45,83%), las del verano (21,74%) y el mínimo de cepas MDR en Invierno (11,11%).

Tabla 17: Resultados de la asociación estadística entre la especie animal y la MDR de las cepas aisladas.

MDR	Especie		Valor "p"	MDR	Edad		Valor "p"
	Gato	Perro			Adulto	Senior	
No	7 (41,18)	40 (66,67)	0,0344*	No	29 (82,86)	13 (39,39)	0,0001*
Sí	10 (58,82)	20 (33,33)		Sí	6 (17,14)	20 (60,61)	
Total	17	60		Total	35	33	

Tabla 18: Resultados de la asociación estadística entre la estación del año y la MDR

MDR	Estación				Valor "p"
	Primavera	Verano	Otoño	Inviernno	
No	13 (54,17)	18 (78,26)	8 (38,10)	8 (88,89)	0,0121*
Sí	11 (45,83)	5 (21,74)	13 (61,90)	1 (11,11)	
Total	24	23	21	9	

Respecto a las características clínicas del caso, en la *tabla 19*, se detectó un 50,00% de bacterias MDR aisladas de animales que había recibido tratamiento antibiótico previo m, mientras que si no lo habían recibido, el 71,19% de los aislados no era MDR. Las bacterias aisladas de cuadros de evolución aguda no eran MDR en su mayoría (83,33%), mientras había mayor número de bacterias aisladas de casos de evolución crónica con MDR (51,06%).

Tabla 19: Resultados de la asociación estadística entre las características clínicas del caso del que se aislaron las bacterias y la MDR

MDR	Tto. Antibiótico previo [n; (%)]		Valor "p"	MDR	Evolución [n; (%)]		Valor "p"
	No	Sí			Aguda	Crónica	
No	16 (76,19)	15 (50,00)	0,0339*	No	20 (83,33)	23 (48,94)	0,0026*
Sí	5 (23,81)	15 (50,00)		Sí	4 (16,67)	24 (51,06)	
Total	21	30		Total	24	47	

## 6. DISCUSIÓN

Partiendo de la base de que este estudio se ha realizado con un número de animales pequeño que puede condicionar la fiabilidad y la interpretación de los resultados del análisis estadístico, (no es posible realizar el análisis multivariante), la discusión la vamos a realizar basándonos en las frecuencias y en los resultados de la tabla de contingencia que daban un valor de  $p \leq 0,05$  (exacto, o por el test de Fisher).

### 6.1. Sobre la influencia de factores epidemiológicos y clínicos en las características de las bacterias aisladas

El aislamiento de bacterias a partir de un determinado caso clínico, parece más probable si se trata de un proceso crónico, la muestra es de origen externo, y proceden de casos de afección genital. En este caso, muestras externas y proceso genital, podrían estar asociados. En sentido contrario, la posibilidad de no aislar ocurre más en casos de evolución aguda, cuando la muestra es de órganos internos y en afecciones del aparato urinario, (la muestra de orina por cistocentesis es una muestra de origen interno). Estos resultados tienen cierta lógica, de hecho, los casos crónicos pueden estar relacionados con fallos en los sistemas de defensa corporal, no solo a nivel inmune sistémico, también en las barreras defensivas primarias. Las infecciones urinarias y genitales han sido las que con más frecuencia llegan al laboratorio con sospecha de infección y se sabe que muchas de ellas tienen su origen en la flora local que asciende desde las porciones proximales de la uretra y vagina y que en momentos de alteración de esas defensas o un estado de inmunosupresión, natural o adquirida, se favorece el desarrollo de la infección <sup>[22, 23]</sup>.

La posibilidad de aislar una sola bacteria se ha relacionado con la especie canina, en los casos leves y a partir de muestras de orina, el no haber recibido tratamiento antibiótico previo, está muy próximo a la significancia ( $p = 0,0536$ ). Todos estos datos están dentro de la lógica. En las infecciones primarias, cuando el animal no está muy afectado clínicamente y si no ha sido tratado con antibióticos anteriormente, y a partir de una muestra de orina que se obtiene por cistocentesis, parece correcto esperar que si hay infección, esta sea simple. La ventaja de las infecciones no complicadas es que se suelen resolver en 2 o 3 semanas con el tratamiento antibiótico <sup>[24]</sup>. En relación con las UTIs caninas, hay un estudio que habla de que las hembras caninas de mayor edad, sufren más frecuentemente estas infecciones, pero no se puede extrapolar completamente a nuestros resultados, que se refieren al conjunto de las infecciones simples, independientemente del tipo de afección que sufre el animal, aunque la frecuencia de UTIS en nuestra casuística es de un 29,41% (20 de los 68 animales infectados que entran en este estudio), <sup>[24]</sup>. En el sentido contrario, el aislamiento de más de un tipo bacteriano ha ocurrido más con casos clínicos moderados, y en las muestras de origen externo. En el caso de las infecciones del aparato genital, (en este estudio 29 de los 68 casos de infección; 42,65%), se sabe que existe una flora bacteriana permanente, de tal modo que los aislamientos a partir de muestras externas, son más difíciles de interpretar debido al alto riesgo de aislar bacterias de la flora normal, <sup>[19, 22]</sup>. De hecho, numerosas bacterias encontradas en la uretra proximal y en la vagina son las que también se aíslan en los casos de infección de estos órganos (*Staphylococcus* spp, *E. coli*,



*Klebsiella* spp, *Streptococcus* spp etc), dado que puede ser la consecuencia de alteraciones en el equilibrio de la flora por lesiones, fallo de las defensas locales y del sistema inmune <sup>[19, 23]</sup>. De ahí que la interpretación de los resultados de un cultivo deba realizarse con cuidado. El crecimiento profuso de una sola bacteria, o bien recoger muestras de regiones internas que normalmente son estériles (cistocentesis), favorecen un diagnóstico más seguro. En las muestras de origen externo, la citología (para detectar la presencia de leucocitos), es importante para corroborar la infección.

Las bacterias que han predominado en el conjunto de los animales son los *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp y Enterobacterias. Cabe destacar el hecho de que la mitad de los estafilococos, eran Coagulasa positivos, dentro de los cuales se encontraba *S. aureus*, (1 aislado) y los 7 restantes pertenecían al grupo *S. intermedius* (SI), que se agrupan como *S.intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. delphini* basados en el análisis de la secuencia nucleotídica de los genes *sodA* y *hsp60* <sup>[25]</sup>. La mayoría de los *Staphylococcus* spp, de este estudio se aislaron de orina, sin embargo, tanto los procesos de afección genital como urinario, apartaron un número de aislados similar.

En el conjunto de las Enterobacterias aisladas, la mayoría provenían procesos de afección urinaria, y lógicamente, de muestras de orina (es el método de demostrar la infección). Estos resultados se asemejan a los encontrados por otros autores que consideran un hecho admitido tanto en el gato como en el perro <sup>[22, 26]</sup>, y en particular, referido a *E. coli* del que se ha informado que puede suponer entre el 33-55% de los casos de UTIs (en nuestro estudio 6 de los 20 casos de infección urinaria fueron por *E. coli*; 30,00%). Además estos autores en su estudio de las UTIs felinas, observaron que ocurría más en los animales de edad  $\geq 10$  años, y coincidía con lo observado por nosotros (tendencia a la significancia estadística). En relación con las UTIs caninas, Thompson, et al, (2011) <sup>[24]</sup>, también informan de que los animales senior son los que las padecen más frecuentemente. El origen de los *E.coli* en estas infecciones, podría estar en las cepas más virulentas del aparato intestinal que poseen factores de virulencia que favorecen la infección a pesar de que en la zona exista una flora competitiva. Esto podría explicar los casos de infección en perros con sus defensas locales intactas y estado de inmunocompetencia normal. Igualmente, ponen de manifiesto la importancia de acciones traumáticas sobre las vías urinarias (catéter, cistotomía), o enfermedades que pueden conllevar un debilitamiento del sistema inmune como la Diabetes mellitus, Hiperadrenocorticismos, etc, como factores que favorecen estas infecciones, en cepas con menos factores de virulencia. En esta revisión <sup>[24]</sup> también se pone de manifiesto que las Enterobacterias son predominantes, y en general se puede decir que encuentran el mismo tipo de bacterias que nosotros, sin embargo, los *Streptococcus* spp, no parecen entrar dentro de los aislados más importantes, al igual que lo encontrado por nosotros, ya que se refieren a UTIs, y en nuestro estudio, solo representan un 10% de las UTIs (2/20). En sentido contrario, la mayoría de los *Streptococcus* spp aislados por nosotros se obtuvieron de muestras de prepucio (el 50,00% de los *Streptococcus* spp aislados), y del aparato genital (68,75% de los aislados). En la bibliografía consultada, no se habla mucho de los *Streptococcus* spp como agentes habituales de infección genital, salvo en las vaginitis, y mastitis (en nuestra casuística no había ningún caso de mastitis), y se consideran con una

importancia similar<sup>[19]</sup>. En general, la mayoría de las infecciones genitales del perro y gato se consideran asociadas a la flora anal y urogenital, como ya se ha comentado anteriormente, y no se especifica las especies o grupos de *Streptococcus* spp que participen con más frecuencia en los procesos de afección genital<sup>[24]</sup>. Son bacterias piogénicas y las especies descritas en casos de infección de perros y gato<sup>[19]</sup>, pueden producir cuadros clínicos como oportunistas ya que algunos de ellos se encuentran de forma habitual en piel y mucosas externas, incluida la flora urogenital. La gravedad de los cuadros clínicos varía de leves a graves y mortales. Los más asociados a estos cuadros son *S. milleri*, *S. canis*, y ocasionalmente, otros no específicamente caninos como *S. pneumoniae* (grupo A), *S. equi* (grupo C; equino); *S. equi* spp *zooepidemicus*, *S. disgalactiae* y *S. suis*

En nuestro estudio las infecciones por bacterias Gram negativas, ocurrían, principalmente de animales senior y de raza pura, y en sentido contrario, las infecciones por bacterias Gram positivas ha ocurrido más en animales adulto, pero la pureza de la raza no parecía influir (50,00% en razas de cruce y pura). Hay una ligera tendencia a que predominen en casos de afección genital ( $p = 0,0546$ ). Ya hemos visto en apartados anteriores que los perros senior parecían más predispuestos a estar infectados por Enterobacterias y que los Adultos solían tener más infecciones por *Staphylococcus* spp y *Streptococcus* spp, lo que se está en concordancia con estos resultados. Ateniéndonos a la morfología de la bacteria aislada, los bacilos han sido más aislados a partir de animales senior, a partir de los machos, procedentes de casos de afección urinaria; mientras que los cocos se han aislado más de los adultos, y de procesos de afección genital, siendo más equilibrado el aislamiento de estas bacterias entre los machos y las hembras. De nuevo, se pone de manifiesto la interrelación de estos factores ya que se trata de características intrínsecas a las principales bacterias aisladas. La razón por la que los machos se hallan asociado al aislamiento de bacilos o las razas puras con el aislamiento de bacterias Gram positivas, no parecen sencillas de explicar, ya que, por ejemplo, en el estudio de las UTIs felinas<sup>[22]</sup>, se observaba que eran las hembras senior, las que parecían tener mayor predisposición<sup>[22]</sup> y lo justifican diciendo que la uretra es más corta que en el macho y por eso el ascenso desde la región externa urogenital es más sencilla, pero, desconocemos los factores que podrían estar implicados en nuestros resultados, para lo que necesitaríamos un muestreo más amplio.

Nuestros resultados, muestran un descenso importante de la sensibilidad a antibióticos para los tres grupos de bacterias más prevalentes y frente a los antibióticos más usados en la práctica clínica. Un estudio similar<sup>[6]</sup>, realizado con un importante número de aislados de infecciones del perro y el gato (1.857) entre 2002 y 2009, procedentes de toda Europa, analizaba la sensibilidad a antibióticos de *P. multocida*, *B. bronchiseptica*, *P. aeruginosa*, *S.pseudointermedius* (grupo SIM), *S. aureus*, *E. coli* y *P. mirabilis*. Los antibióticos que se usaron en el estudio fueron: AMC, AM (Ampicilina), Penicilina (P), Clindamicina (CM), DOX, ENR, Marbofloxacin (MAR), Trimethoprim (TMP) y SxT. En relación con *E. coli*, aislado de procesos de UTIs, encontraban un alto porcentaje de aislados sensibles a MAR, siendo superior a la sensibilidad encontrada para el resto de los ATBs, que oscilaban entre el 71,96 y el 87,95%, y comprobando que la sensibilidad a la MAR, se mantuvo más o menos estable en el periodo de estudio. En relación con *S. aureus* y grupo SIM, las aislados que usaron provenían de casos de otitis,

que no es nuestro caso y comprobaron que la AMC era el más eficaz (100,00% de los aislados), un 96,98% con la MAR y siendo también muy alta con la DOX, ENR, TMP y SxT (90,00%), También se encontraron altos niveles de susceptibilidad con *S. aureus* con AMC, TMP, AxT, DOX y FQN (> 90,00%)

En nuestro estudio, el grupo de las Enterobacterias ha dado niveles de resistencia elevados, con un 71,43% frente a la AMC y muy elevado frente a CFL (90,91%), que son antibióticos muy usados en la práctica. Por otro lado, los antibióticos que más recientemente se han introducido en la práctica clínica, también están mostrando baja sensibilidad, así vemos un 55,00% con CFV, y mejor situación con PRD (70,00%). Es un hecho preocupante que las resistencias que se están detectando se dan en antibióticos de amplio espectro, este es un hecho que está ampliamente diseminado <sup>[7]</sup>; sin embargo, estos autores encontraban sensibilidad en todos los aislados de *E. coli* a las FQNs que estudiaron.

En otro estudio <sup>[27]</sup>, se comparaba la actividad de la PRD, en relación a otras FQN, utilizando diferentes bacterias, de origen felino y canino. Se utilizaron un total de 908 aislados, la mayoría de *S. aureus*, *S. pseudointermedius*, *E. coli*, *Streptococcus Beta-hemolíticos*, *P. multocida* y *B. bronchiseptica*. Se evaluó la sensibilidad mediante la MIC<sub>90</sub> y encontraron que las MICs de la PRD eran activas frente a estas bacterias a concentraciones más bajas que con el resto de las FQN, si bien se trata de un estudio no independiente..

Únicamente los *Staphylococcus* spp, siguen mostrando valores de Sensibilidad comprendidos entre el 60% frente a ENR, al 90,91% frente a la PRD. En cualquier caso, la sensibilidad de los *Staphylococcus* spp analizados en este estudio, está por debajo de los valores que encuentra Kroemer et al (2014) <sup>[6]</sup>, para *S. aureus* y grupo *S. intermedius* aislados de otitis y Pedersen et al (2007) <sup>[7]</sup> que en su estudio todos los aislados de *S. intermedius*, eran susceptibles a AMC

Los aislados de *S. aureus* y del grupo *S. intermedius* que son resistentes a la Meticilina, son de gran importancia en relación con la salud humana y animal <sup>[2, 4]</sup>. Dentro de los aislados por nosotros uno de los pertenecientes al grupo SI, era resistente a la Oxacilina, que es el método admitido a nivel internacional de detectar la resistencia a la Meticilina. Se trataba de una hembra de Galgo, de 2 años de edad, que se presentó en el HV con un cuadro de traumatismo por atropello. Son bacterias oportunistas, que colonizan la piel y/o mucosas externas. Se ha demostrado su carácter zoonótico, sobre todos en heridas infectadas, aunque también se ha asociado con bacteriemia, neumonía, infección ótica, úlceras varicosas en la pierna y abscesos cerebrales. Se considera que la prevalencia del grupo SIM está aumentando <sup>[25]</sup>.

Por otro lado, aunque el *S. aureus* aislado es sensible a la Meticilina (MSSA, de las siglas en inglés), se pone de manifiesto que aunque esta bacteria se ha considerado típica de las infecciones humanas de la piel y mucosas externas (aparte de las complicaciones orgánicas en las que intervienen diferentes factores), ya es habitual aislarlo en las infecciones de la piel y mucosas de los animales, más frecuente en los bóvidos pero aumentando en prevalencia en el perro y el gato por el estrecho contacto que se establece entre animales y personas <sup>[29, 30]</sup>. Además, puede dar lugar a infecciones no supurativas, de origen toxínico (toxemia estafilocócica), por la ingestión

de un alimento contaminado que las contenga, estas son el síndrome cutáneo estafilocócico, el shock tóxico estafilocócico (SST) y las intoxicaciones alimentarias. El intercambio de cepas ente las especies humana y animal, es un hecho confirmado <sup>[31, 32]</sup>.

El grupo de los *Streptococcus* spp de nuestro estudio muestra todavía niveles aceptables de sensibilidad a un número importante de antibióticos, destacando que solo hay un 14,29% de aislados resistentes a la AMC, pero ya empieza a ser preocupante los valores de resistencia encontrados frente a ENR, PRD y GEN, que superan ampliamente el 60,00%, alcanzando un 80,00% frente a SxT. Curiosamente, este resultado es opuesto al hallado por Pedersen et al (2007) <sup>[7]</sup>, en el que todos los aislados de *S. canis* eran susceptibles al SxT.

El seguimiento de la antibiorresistencia en los animales de compañía, no se ha regulado por ningún estamento internacional, hasta el momento, pero es bien sabido que la resistencia bacteriana a los antimicrobianos es un problema global <sup>[1, 2, 4]</sup> y, aparte de la resistencia natural de las bacterias a algunos antibióticos, se conocen los principales factores que la favorecen, siendo el más importante de ellos el uso inadecuado y el abuso de los antibióticos, que quedó demostrado en los animales de abasto, de modo que los organismos internacionales (OIE, OMS, ECDC, ERASS..), pusieron en marcha una serie de medidas para controlar el aumento continuado de la RA, y la prohibición del uso de los Antibióticos como promotores del crecimiento o de forma preventiva.

Con la finalidad de ayudar a corregir el mal uso de los antibióticos, se realizó un estudio de revisión de trabajos llevados a cabo sobre el uso de ATBs para tratar las UTIs del perro y el gato <sup>[33]</sup>. Se revisaron 14 artículos que tratan de demostrar la duración adecuada de los tratamientos ATBs, pero no pudieron establecer nada concreto por la disparidad de tipos de estudio, la poca fiabilidad o porque no se podían comparar unos con otros por trabajar con ATBs diferentes. Lo único que dedujeron es que el régimen de 3 días con SxT (solo en hembras) o alta dosis de ENR en perros para tratar UTIs no complicada, no está demostrado que sirvan.

Otro hecho realmente importante es el aumento progresivo de cepas MDR, que ya empieza a ser preocupante (el 31,58% de las cepas aisladas por nosotros) , y que hemos visto más frecuente en las Enterobacterias (52,38%) y menos importante en los Staphylococcus spp (20,00%), pero, en cualquier caso, este dato sigue ahondando en la problemática que se está creando alrededor del aumento de la resistencia en las Enterobacterias, tanto en el perro y el gato en los que aíslan con gran frecuencia, pero es un problema más importante en los gatos. Hay el estudio de Liu et al (2012), <sup>[34]</sup> que asocia la MDR con la resistencia a FQNs en los *E. coli* de los perros y gatos. Estos autores demuestran que hay una relación entre el aumento de la MIC a las FQN con el número de mutaciones en genes diana, genes mediados por plásmidos y la actividad de las bombas de eflujo. Cuando una bacteria se hace resistente a FQNs, expresa resistencia al resto de FQNs y se correlaciona con MDR, indicando que se expresa resistencia con diferentes clases de ATBs, aunque puede no tener relación con las expresión de los mismos genes y sin embargo si observa una serie de genes mediados por plásmidos que sí pueden ser un reservorio para el desarrollo de MDR

En relación con los factores epidemiológicos y clínicos que entran este estudio, en la bibliografía consultada no hemos encontrado estudios similares, aunque parece que muchos de estos factores podrían interactuar entre ellos. Es curioso que, con los dos antibióticos más novedosos en la práctica clínica, los aislados de los gatos sean más resistentes que los de los perros. El CFV es más fácil de administrar, (lo que podría explicar un mayor uso por la dificultad que supone la administración de medicamentos en los gatos), pero la PRD se administra por vía oral. Lo mismo sucede con las hembras. Según lo explicado en párrafos anteriores, las hembras podrían tener mayor facilidad para sufrir infecciones genitourinarias, en las que se aíslan mayoritariamente Enterobacterias que son, en general, más resistentes a los ATBs, y por lo comentado anteriormente <sup>[34]</sup>, la resistencia a una FQN favorece la resistencia del resto de los antibióticos de este grupo.

En este sentido, se realizó un estudio independiente con el CFV <sup>[35]</sup>, con el objetivo de comprobar las variaciones que se producen en la flora bacteriana intestinal, tanto en concentración de bacterias habituales como *E. coli*, enterococos, y con *Salmonella* spp. Se medía la sensibilidad al CFV (MIC test), y genética (gen bla<sub>CMY-2</sub>) en los días 0, 3, 7, 14 y 28 tras el tratamiento. Únicamente la concentración de *E. coli* descendió en el día 3 y aumentaba la resistencia al CFV en los días 3, 7, 14 y 28. Los enterococos aumentaron su concentración en el día 7, pero el aislamiento de *Salmonella* fue raro. Tras el tratamiento, la resistencia a  $\beta$ -lactámicos fue más frecuente en los *E. coli*, pero la resistencia de los Enterococcus no se vio alterada. En el día 28, los perros tratados tenían 3,25 veces más probabilidad de portar el gen bla<sub>CMY-2</sub>. Esto nos sugiere que las hembras tendrían mayor facilidad de ser infectadas por bacteria fecales más resistentes, en particular, si ya han recibido tratamiento antibiótico previo, también mencionado por , Thompson, et al, (2011) <sup>[24]</sup>.

Que los aislados de animales senior sean más resistentes a antibióticos de amplio uso en Veterinaria parece lógico puesto que a lo largo de la vida han tenido ocasiones de ser tratados con antibióticos, de contactar con animales que portan bacterias resistentes, o de adquirirlas a través del medio ambiente, los alimentos, etc. <sup>[36]</sup>. Sin embargo, no parece que haya explicaciones lógicas al tamaño de la raza o a la mayor resistencia de los aislados de Mayo y Junio, a la DOX o en Otoño a la PRD, por lo que debemos pensar que otros factores no tenidos en cuenta en este estudio, han podido influir en estos resultados.

Desde el punto de vista clínico, los resultados parecen mostrar una lógica, ya que los cuadros de gravedad moderada y evolución crónica han dado lugar al aislamiento de bacterias más resistentes, no solo por la posibilidad de haber sido tratados con mayor número de antibióticos, también podría estar relacionado a una bajada de defensas del animal, que favorece su persistencia <sup>[23]</sup>.

La influencia del tipo de muestra en la resistencia de los aislados a ENR, podría, indirectamente, estar relacionado con la facilidad de que las infecciones vaginales tengan su origen en la flora intestinal que está formada por enterobacterias, entre las que puede haber elevada resistencia a diferentes antibióticos <sup>[24, 35]</sup>. También tiene lógica que los aislados de animales que han recibido tratamiento antibiótico previo, muestran más resistencia a antibióticos, probablemente por haber sido usados con dosis y/o tiempo inadecuado. Igualmente, se puede

esperar la resistencia a importantes antibióticos de amplio espectro, dado que la utilización de antibióticos de forma continuada lo favorecen, además de que las defensas naturales del animal podrían estar afectadas favoreciendo estas recidivas.

En relación con las bacterias, parece evidente que, si las Enterobacterias dan resultados de alta resistencia a importantes antibióticos de uso frecuente como AMC, CFL y CFV, DOX, los bacilos Gram negativos también la muestra puesto que son características intrínsecas de las Enterobacterias.

## **6.2. Recomendaciones para disminuir la resistencia a los antibióticos**

Dos de las herramientas más importantes en la lucha contra la AR son la prevención de las enfermedades y el uso adecuado de los antibióticos. Las vacunas, las medidas higiénicas y sanitarias que impidan la transmisión horizontal de los microorganismos y el cumplimiento de los protocolos tanto hospitalarios como impuestos por el médico veterinario en sus domicilios, son algunos de los mecanismos para llevarlo a cabo. Se recomienda tomar una serie de medidas a nivel global para realizar una lucha conjunta contra este problema <sup>[2, 4, 8, 37]</sup>:

- Enfatizar y priorizar la higiene y el manejo adecuados que controle la transmisión cruzada de microorganismos resistentes a los antimicrobianos (higiene de las manos, aislamiento bacteriano, etc).
- Apoyarse en los resultados de cultivos y test de sensibilidad para elegir el antibiótico adecuado. Mientras se confirman, las decisiones provisionales se basarán en la tinción Gram y el órgano infectado.
- Utilizar antibióticos de espectro reducido en la medida de lo posible.
- Cualquier alternativa razonable debe considerarse antes que la terapia antimicrobiana. Los antibióticos más activos se reservarán para infecciones refractarias y justificadas (ej. FQNs).
- Tratamiento antibiótico sólo si es necesario, con la dosis adecuada, con los intervalos correctos y durante el mínimo tiempo efectivo posible, para reducir la exposición terapéutica a los antibióticos.
- Minimizar la contaminación ambiental. El uso de antibióticos sin finalidad médica debe ser eliminado.
- Establecer programas de vigilancia para detectar la aparición y la magnitud de las cepas resistentes.
- Invertir en desarrollo de nuevas opciones terapéuticas.

## **7. CONCLUSIONES**

- Las bacterias aisladas son las que habitualmente se encuentran en la clínica del perro y el gato.
- Su resistencia a los antibióticos más usados para las infecciones del perro y el gato es elevada y superior a las informadas por otros autores.
- El riesgo de que estos animales colaboren en la diseminación de bacterias o elementos de transmisión de la resistencia a las personas que conviven con ellos puede ser elevado.

## **8. CONCLUSIONS**

- Isolated bacteria are those which normally are found in dog and cat clinical practice.
- Its antibiotic resistance to the more used antibiotics in dog and cat infections is elevated and higher than that informed by other authors.
- The risk for this animals to collaborate in the dissemination of bacteria and other elements for resistance transmission to people living with them, could be elevated.

## **9. VALORACIÓN PERSONAL**

Este trabajo me ha permitido poner en práctica y ampliar mis habilidades de búsqueda y síntesis de información, ya que he tenido que recurrir a una multitud de fuentes bibliográficas para extraer los datos más relevantes que me permitiesen realizar una comparación de mis resultados interesante.

Durante su elaboración, he podido observar que la emergencia actual que se da en la resistencia a antimicrobianos se debe, entre otras cosas, a las malas prácticas en el uso de antibióticos, tanto a nivel de medicina humana como en medicina veterinaria y producción animal. Los resultados que arrojan los datos propios y los de otros autores son negativos, por lo que es necesaria una actuación inmediata que ponga medidas estrictas y trate, si no de solucionar el problema, de frenar su desarrollo. Además, es imperativo que la profesión veterinaria, por su rol clave en la sanidad pública y animal, actúe de forma prioritaria en el estudio, evaluación y gestión de la RA.

Es también papel de los veterinarios, por el propio interés de la profesión y por el deber de cuidar la Salud Pública, exigir nuevas medidas y normativas a las Administraciones y poner en práctica protocolos de trabajo que sirvan para controlar y disminuir el problema frente al que nos encontramos.

### **Agradecimientos**

A mi tutora de este trabajo, María del Carmen Simón Valencia, con quien he tenido el gusto de trabajar mano a mano durante este año, y a mi familia por apoyarme durante todo el proceso.

## 10. ANEXO

Tabla I: Frecuencias de tipos de bacterias por ATBs

AMC	Enterobacteria		Staphylococcus spp		Streptococcus spp	
	N	%	N	%	N	%
R	15	71,43	3	20,00	2	14,29
S	6	28,57	12	80,00	12	85,71
T	21	100,00	15	100,00	14	100,00
<b>CFL</b>						
R	10	90,91	2	16,67	3	42,86
S	1	9,09	10	83,33	4	57,14
T	11	100,00	12	100,00	7	100,00
<b>CFV</b>						
R	9	45,00	2	13,33	3	23,08
S	11	55,00	13	86,67	10	76,92
T	20	100,00	15	100,00	13	100,00
<b>DOX</b>						
R	21	100,00	3	27,27	7	50,00
S	0	0,00	8	72,73	7	50,00
T	21	100,00	11	100,00	14	100,00
<b>ENR</b>						
R	8	38,10	6	40,00	11	78,57
S	13	61,90	9	60,00	3	21,43
T	21	100,00	15	100,00	14	100,00
<b>PRD</b>						
R	6	30,00	1	9,09	4	33,33
S	14	70,00	10	90,91	8	66,67
T	20	100,00	11	100,00	12	100,00
<b>GEN</b>						
R	11	55,00	5	35,71	11	78,57
S	9	45,00	9	64,29	3	21,43
T	20	100,00	14	100,00	14	100,00
<b>SxT</b>						
R	8	38,10	4	36,36	4	80,00
S	13	61,90	7	63,64	1	20,00
T	21	100,00	11	100,00	5	100,00



## 11. BIBLIOGRAFÍA

- [1] OIE (2015). Hoja informativa; Resistencia a los antimicrobianos. Recuperado de [www.oie.int/fileadmin/Home/espe/Media\\_Center/docs/pdf/Fact\\_sheets/ANTIBIO\\_ES.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/espe/Media_Center/docs/pdf/Fact_sheets/ANTIBIO_ES.pdf) [Consultado el 21/04/2016]
- [2] OMS (2015). Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos (nota descriptiva N° 194). Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/> [Consultado el 25/04/2016]
- [3] AEMPS, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (2014). El Veterinario y el uso responsable de antibióticos. Recuperado de <https://www.aemps.gob.es/> [Consultado el 21/01/2016]
- [4] European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) (2005-2009). Recuperado de [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial\\_resistance/basic\\_facts](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/basic_facts) [Consultado el 25/04/2016]
- [5] D'Costa VM, King CE, Kalan L, et al. (2011) Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 477:457-461
- [6] Kroemer S.; El Garch F.; Galland D.; Petit J.L; Woehrle F.; Boulois HJ (2014) Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from infections in cats and dogs throughout Europe (2002-2009). In: *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, volume 37: 97-108
- [7] Pedersen K, Pedersen K, Jensen, H, Finster K, Jensen V.F., Heuer O. (2007) Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 60: 775-781
- [8] American Association of Feline Practitioner, American Animal Hospital Association (2014). *Basic Guidelines of Judicious Use of Antimicrobials*
- [9] OIE (2015). *Uso responsable y prudente de agentes antimicrobianos en medicina veterinaria*. En Código Sanitario para los Animales Terrestres (Capítulo 6.9)
- [10] P.J. Quinn [et al.] (2005) *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. Zaragoza: Acribia.
- [11] Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V., Clark D.P.; coordinación Ricardo Guerrero. (2009) *Biología de los Microorganismos* 12ª ed. Madrid: Pearson Education
- [12] Leonard FC, Markey BK (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Vet J.*; 175:27-36
- [13] Weese JS, van Duijkeren E. (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol.*; 140: 418–29.
- [14] Montúfar Andrade FE, Madrid Muñoz CA, Villa Franco JP, Díaz Correa LM, Vélez Rivera JD, Vega Miranda J, Bedoya Londoño AM, Zuleta Tobón JJ, Montufar Pantoja MC y Grupo de Investigación GIERI. (2016) Bacteremia por *Staphylococcus coagulasa negativo* con concentración inhibitoria mínima para vancomicina  $\geq 2$ . *Infectio.*; 20(1): 3-8
- [16] Daniels J.B. (2013) Molecular Diagnostics for Infectious Disease in Small Animal Medicine: An Overview from the Laboratory. In: *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*; 43: 1373-1384

- [17] Weese J.S., Dick H., Willey B.M., McGeer A., Kreiswirth B.N., Innis B., Low D.E. (2006) Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Veterinary Microbiology*; 115: 148-155.
- [18] EFSA (2009) Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. 993: 1-29. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/993.htm>. [Consultado el 10/08/2016]
- [19] Greene, Craig E. (2013) *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. St. Louis, Missouri: Elsevier
- [20] Mensa J, Gatell JM, García-Sánchez JE, Letang E, López-Suñé E (2010) *Guía de Terapéutica Antimicrobiana*. Molins de Rei, Barcelona: Antares
- [21] Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth information supplement. M100-S25
- [22] Litster A, Thompson M, Moss S, Trott D (2011). Feline bacterial urinary tract infections: An update on an evolving clinical problem. In: *The Veterinary Journal*, 187: 18-22
- [23] Graham EM, Taylor DJ (2012). Bacterial reproductive Pathogens of Cars and Dogs. In: *Vet. Clin. Of Small Animals*, 42: 561-582
- [24] Thompson MF, Litster AL, Platell JL, Trott DJ (2011). Canine bacterial urinary tract infections: New developments in old pathogens. In: *The Veterinary Journal*, 190: 22-27
- [25] Weese J.S., van Duijkeren E. (2010) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*; 140: 418–429
- [26] Bartges, J., Barsanti, J., (2000). Bacterial urinary tract infection in cats. In: Bonagura, J.D. (Ed.), *Current Veterinary Therapy XIII*. WB Saunders Co., Philadelphia, pp. 880–882.
- [27] Schink A.K., Kadlec K., Hauschild T., Michael G.B., Dörner J.C., Ludwig C., Werckenthin C, Hehnen H.R., Stephan B., Schwarz S. (2013) Susceptibility of canine and feline bacterial pathogens to pradofloxacin and comparison with other fluoroquinolones approved for companion animals. In: *Veterinary Microbiology*; 162: 119-126
- [28] Van Duijkeren E., Houwers D.J., Schoormans A., Broekhuizen-Stins M.J., Ikawaty R., Fluit A.C., Wagenaar J.A. (2008) Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* between humans and animals. *Veterinary Microbiology*; 128: 213–215
- [29] Leonard F.C., Markey B. K. (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Veterinary Journal*; 175: 27-36.
- [30] Safdar N., Bradley E.A. (2008) The risk of infection after nasal colonization with *Staphylococcus aureus*. *American Journal of Medicine*; 121: 310-315.
- [31] Morgan M. (2008) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 62: 1181-1187

- [32] Weese J.S. (2008) A review of multidrug resistant surgical site infections. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*; 21: 1-7
- [33] Jessen L.R.; Sørensen T.M.; Bjornvad C.R.; Nielsen S.S; Guardabassi L. (2015) Effect of antibiotic treatment in canine and feline urinary tract infections: A systematic review. In: *The Veterinary Journal*, 203: 270-277
- [34] Liu X.; Boothe D.M.; Thungrat K.; Aly S. (2012) Mechanisms accounting for fluoroquinolone multidrug resistance *Escherichia coli* isolated from companion animals. In: *Veterinary Microbiology* 161: 159-168
- [35] Lawrence M., KuKanich K., KuKanich B., Heinrich E., Coetzee J.F., Grauer G., Narayanan S. (2013) Effect of cefovecine on the fecal flora of healthy dogs. In: *The Veterinary Journal*, 198: 259-266
- [36] Alós J.I. (2014) Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. In: *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 33 nº 10: 692-699
- [37] Ponce de León-Rosales S.; Arredondo-Hernández R.; López-Vidal Y. (2015). *La resistencia a los antibióticos: Un grave problema global*. *Gaceta Médica de México*, 151: 681-9
- [38] Hanselman B.A., Kruth S., Weese J.S. (2007) Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. *Veterinary Microbiology*; 126: 277–281.