



Máster Oficial Universitario en Salud Pública 2011-2012.

Facultad de Medicina de Zaragoza.

Trabajo de fin de Máster.

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN *Staphylococcus aureus* Y OTROS *Staphylococcus* spp. DE ORIGEN ANIMAL; IMPLICACIONES PARA LA SALUD PÚBLICA

Alumno: Leticia Alcalá García. Licenciada en Veterinaria

Director: Carmelo Ortega Rodríguez. Profesor titular del
Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de
Zaragoza.

Fecha de entrega: 30/08 al 04/09 de 2012.

ÍNDICE

RESUMEN:.....	4
INTRODUCCIÓN:.....	7
1. El concepto de Salud Global “ <i>One world, one health</i> ” y las enfermedades emergentes:.....	7
2. Relación entre las enfermedades emergentes y la resistencia a antibióticos:	8
3. El problema de la resistencia a los antibióticos:	10
a) Fundamentos de la resistencia a antibióticos:	10
b) Resistencia a los antibióticos en Salud Pública y Sanidad Animal:	11
c) Funcionamiento de los antibióticos y su utilización:	12
d) Condiciones para el buen funcionamiento de los antibióticos:.....	14
e) Consecuencias del mal uso de los antibióticos:	15
f) Mecanismos de resistencia a antibióticos:	16
4. <i>Staphylococcus aureus</i> y otros <i>Staphylococcus spp</i> :.....	18
a) Características microbiológicas, patogenidad y factores de virulencia:	18
b) El problema de la resistencia a los antibióticos en estos microorganismos: ..	21
c) <i>S. aureus</i> resistente a metilina (MRSA):	23
d) Opciones terapéuticas para el tratamiento de las cepas MRSA:.....	26
e) Clasificación epidemiológica de las cepas MRSA:	27
f) Factores de riesgo asociados:.....	28
g) Bases genéticas de la resistencia de MRSA:	30
5. Falta de concordancia en la valoración de la resistencia a antibióticos:	32
6. Bases de la lucha frente a la resistencia a antibióticos:	33
a) Uso racional de los antibióticos:.....	34
b) Prevención de las enfermedades microbianas y su propagación:	38
c) Diseño de nuevos antibióticos eficaces o de tratamientos alternativos:.....	38
d) Aunar esfuerzos con socios internacionales para reducir los riesgos de propagación de la resistencia, relacionados con el comercio y los viajes internacionales y por el medio ambiente:	40
JUSTIFICACIÓN:	41
OBJETIVOS:	42
MATERIALES Y MÉTODOS:	44
1. Selección de animales y recogida de las muestras:	44
2. Aislamiento e identificación bacteriana:	45
3. Determinación de los patrones fenotípicos de resistencia y sensibilidad a antibióticos:.....	46

4. Caracterización de las cepas, mediante biología molecular:	48
5. Análisis estadístico de los resultados:	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN:.....	49
1. Distribución y caracterización de las cepas de estafilococos aisladas:	49
Resultados:.....	49
Discusión:	52
2. Patrones de resistencia y sensibilidad a los antibióticos:	53
Resultados:.....	53
Discusión:	55
3. Estudio genético de las cepas de <i>S. aureus</i> y <i>S. pseudointermedius</i> que presentaron patrones de resistencia específicos de interés para Salud Pública:.....	58
Resultados:.....	58
Discusión:	60
4. Estudio de la fiabilidad y la concordancia entre los métodos de selección de resistencia utilizados en el laboratorio:	62
Resultados:.....	62
Discusión:	66
CONCLUSIONES:.....	69
BIBLIOGRAFÍA:	71

RESUMEN:

El género *Staphylococcus*, está formado por un importante grupo de bacterias patógenas oportunistas y ubicuitarias, capaces de colonizar piel y mucosas, tanto de personas como de animales. Las especies con una mayor relevancia a nivel clínico, son particularmente *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus intermedius/pseudointermedius*. Estos microorganismos se caracterizan, por su capacidad de transmisión de resistencia a antibióticos, fundamentalmente al grupo de los β -lactámicos, entre los que se incluye la meticilina.

Las infecciones causadas por los *Staphylococcus* resistentes a meticilina (MRSA), son una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad de los animales de compañía. Uno de los principales problemas con el que nos encontramos, es, la repercusión que esas resistencias detectadas en el entorno veterinario, van a tener en medicina humana, ya que estos microorganismos, son potencialmente zoonóticos. Por ello, el objetivo del estudio, fue conocer la distribución de las cepas de *S. aureus* y de *S. intermedius/pseudointermedius* en animales de compañía, así como la caracterización fenotípica y genotípica de sus resistencias a antibióticos. El trabajo se completó con la valoración de la fiabilidad y grado de acuerdo existente entre las pruebas diagnósticas disponibles y utilizadas de forma habitual para detectar dichas resistencias.

La metodología de trabajo se centró en el muestreo de animales de compañía con el fin de aislar e identificar la presencia de *S. aureus* y *S. intermedius/pseudointermedius*. Estos aislamientos se completaron con la determinación de los patrones fenotípicos de resistencia a los antibióticos de mayor interés en medicina humana y veterinaria, mediante los test de Difusión en disco de Kirby Bauer (KB) y la determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI_s). También se caracterizaron los patrones de resistencia a β -lactámicos, mediante el test de aglutinación para la proteína PBP2a (específica de cepas resistentes a aquellos antibióticos). Finalmente, aquellas cepas con patrones de resistencia fenotípica que suponían un riesgo para la Salud Pública, se tipificaron genéticamente por PCR a través de la detección directa del gen *mec-A*.

El estudio se concluyó con la determinación de la fiabilidad de las pruebas utilizadas mediante los parámetros de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo, de los test. El grado de acuerdo entre las pruebas se definió mediante el valor Kappa.

Se muestrearon un total de 135 animales, de los cuales, las especies más representadas fueron perros (71,85%), y caballos (14,81%). De las cepas identificadas, un 23,93% fueron *S. aureus* y un 76,06% *S. intermedius/pseudointermedius*. La prevalencia de cepas de *S. intermedius/pseudointermedius* fue muy elevada, mientras que en caballos, fue *S. aureus* el que presenta la prevalencia más alta.

Los test de KB, pusieron de manifiesto, que un alto porcentaje de cepas de estafilococos presentaron resistencias a la estreptomicina (90- 100%), y un bajo porcentaje a las quinolonas (10- 25%). Se mostraron altos porcentajes de cepas resistentes a β - lactámicos en *S. aureus*. *S. intermedius/pseudointermedius*, evidenciaron bajos porcentajes de resistencias a β - lactámicos tales como meticilina (16,36%), oxacilina (14,55%), y cefoxitina (1,82%).

Mediante la determinación de las CMI's se observó que un 50% de los *S. aureus*, eran resistentes a penicilina, en contraste con el 0% de resistencia a vancomicina, distribución prácticamente similar a lo observado en *S. intermedius/pseudointermedius*. Las proporciones de resistencia para oxacilina y amoxicilina fueron más bajas; resultados estos, que no coincidían con los obtenidos mediante el Test de KB.

Un alto porcentaje de cepas fueron positivas a la presencia de la proteína PBP2a, siendo ese porcentaje similar en *S. aureus* (43,75%) y en *S. intermedius/pseudointermedius* (38,18%). Las cepas consideradas de riesgo para la Salud Pública y analizadas por PCR fueron principalmente *S. intermedius/pseudointermedius* (20), estas en su mayoría fueron negativas a la presencia del gen *mec-A* (13) y procedentes de aislamientos de perros; de las cepas de *S. aureus* aisladas (8), prácticamente todas fueron positivas a la presencia de dicho gen (7).

Considerando que estos son microorganismos potencialmente zoonóticos, es posible el intercambio de cepas, incluidas las resistentes a antibióticos, entre animales y personas, siendo las personas en contacto con estos animales (veterinarios, cuidadores y propietarios) el primer eslabón en la cadena de difusión del patógeno en la comunidad, pero no el único, ya que el carácter ubicuitario de *Staphylococcus*, le permite su persistencia en el medio. La difusión de resistencias puede comprometer las opciones terapéuticas frente a este patógeno, y favorecer la adaptación de estas bacterias en otros hospedadores, dando lugar a la aparición de nuevas enfermedades.

Finalmente, los resultados del estudio ponen en evidencia, la escasa fiabilidad y grado de concordancia, de la que gozan los diferentes métodos de detección de resistencia a antibióticos utilizados habitualmente, sobre todo en el caso de *S. intermedius/ pseudointermedius*, hecho que complica la eficacia del tratamiento de este patógeno, así como el control de sus prevalencias por los Sistemas de Vigilancia.

Palabras clave: Salud Pública, Sanidad Animal, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, resistencia, antibiótico, diagnóstico, fiabilidad.

INTRODUCCIÓN:

1. El concepto de Salud Global “One world, one health” y las enfermedades emergentes:

A lo largo de las últimas décadas, se ha observado un incremento en la emergencia de enfermedades de naturaleza infecciosa y parasitaria a nivel mundial. La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), las denomina enfermedades emergentes y las define, como nuevas infecciones, resultado de la evolución o modificación de un agente patógeno o parásito existente, que cambia de espectro de hospedadores, vector, patogenicidad o cepa; también incluyen las infecciones o enfermedades desconocidas hasta el momento de su aparición (enfermedad reemergente). A su vez, la enfermedad reemergente es definida, como una infección conocida que, o bien cambia de ubicación geográfica, amplía su espectro de hospedadores o su prevalencia aumenta considerablemente.

Si tenemos en cuenta, que las enfermedades infecciosas son la tercera causa de mortalidad en el mundo, es evidente que estas enfermedades, constituyen un gran problema para la humanidad y un desafío para los sanitarios. (EASAC, 2008).

Fenómenos como la migración de poblaciones, tanto humanas como animales, favorecen el desarrollo de dichas enfermedades; pero esta, no sería la única causa de aparición de enfermedades emergentes. Los expertos, coinciden en la existencia de una correlación entre factores, que predisponen su aparición, como son en el caso de las enfermedades animales: los nuevos sistemas de producción animal, la influencia humana sobre el medio ambiente y el cambio climático (OIE, 2010). Desde la perspectiva de la Salud Pública, también es importante, el papel que juegan la globalización y las desigualdades existentes en recursos sanitarios entre los países, puesto que la aparición de una nueva enfermedad, no se va a abordar de la misma forma, en países desarrollados que en subdesarrollados.

Los factores anteriormente citados, van a crear nuevas condiciones para la difusión de los microorganismos (no hay que olvidar, que las bacterias, presentan una capacidad de adaptación, mucho mayor que la humana o animal). Algunos de estos microorganismos causantes de enfermedades emergentes, pueden ser patógenos, tanto para el hombre como para los animales; aunque también saprófitos o comensales del medio o de los animales, que si bien no producen de forma habitual enfermedad en estos últimos, si pueden ser patógenos para el hombre.

Una parte muy importante de las enfermedades emergentes detectadas en los últimos diez años, son zoonosis con un origen animal (en torno al 75% según la OIE). La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a las zoonosis, como aquellas enfermedades que se transmiten de forma natural de los animales vertebrados al hombre y viceversa. La globalización, está aumentando el riesgo de aparición de zoonosis nuevas, y la lucha frente a ellas es fundamental, debido al gran impacto que estas tienen en Salud Pública.

Estos aspectos, nos hacen reflexionar, sobre la necesidad de trabajar en sanidad con una perspectiva global (humana, animal, ambiental), tal y como sugiere la filosofía sanitaria *“One World, one Health”* (FAO, 2008). Esta corriente, aboga por un marco estratégico para reducir los riesgos derivados de las enfermedades infecciosas en la interfaz entre humanos, animales y ambiente, y que promueve, la actuación conjunta de profesionales de medicina humana, Salud Pública, salud Animal y ambiental.

2. Relación entre las enfermedades emergentes y la resistencia a antibióticos:

Entre las enfermedades infecciosas de carácter emergente, han adquirido gran importancia en los últimos años, las causadas por cepas de microorganismos resistentes a antibióticos, tanto en medicina humana, como en sanidad animal. Por esta razón, la resistencia a los antibióticos, está considerada como uno de los problemas emergentes de mayor impacto en el siglo XXI por la OMS (OMS, 2012).

La resistencia a los antibióticos, es definida como el fenómeno por el cual un microorganismo, deja de verse afectado por un antibiótico, al que anteriormente era sensible. En general, hay que considerar que los microorganismos resistentes (entre ellos las bacterias, los virus y algunos parásitos), han perdido su sensibilidad a los efectos de los antimicrobianos, como los antibióticos, los antivíricos o los antipalúdicos, de modo que los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras poblaciones contiguas, entre ellas las personas (OMS, 2012).

Entre las causas de aparición de la resistencia a antibióticos, está el uso inadecuado y abusivo de los antibióticos, que favorece la aparición y diseminación de los microorganismos resistentes (mala adherencia del paciente al tratamiento, mala prescripción o mala calidad del medicamento prescrito), tanto en medicina humana

como en medicina veterinaria. Estos hechos, predisponen a que surjan mutaciones de los microorganismos o adquisiciones de genes de resistencia, que son finalmente los responsables de este problema (OMS, 2012).

La relevancia de este fenómeno, radica en las consecuencias que acarrea, y que se resumen en seis puntos, según la OMS:

- **La resistencia a los antibióticos mata:** Las infecciones por microorganismos resistentes no responden a los tratamientos habituales, lo cual prolonga la duración de la enfermedad y aumenta el riesgo de muerte.
- **Pone en peligro el control de las enfermedades infecciosas:** se reduce la eficacia del tratamiento, con lo que los enfermos persisten infectados por más tiempo, hecho que a su vez propicia la propagación de los microorganismos resistentes a otras personas o animales.
- **Amenaza con hacer retroceder a la humanidad a la época anterior al descubrimiento de los antibióticos:** Existe el riesgo de que muchas enfermedades infecciosas se vuelvan intratables, lo cual podría echar por tierra lo que se ha conseguido para cumplir los Objetivos de Desarrollo del Milenio relacionados con la salud para el año 2015.
- **Encarece la asistencia médica:** Cuando las infecciones dejan de responder a los medicamentos de primera línea, hay que recurrir a productos más caros. La prolongación de la enfermedad y del tratamiento, a menudo en hospitales, también aumenta los costos asistenciales y la carga económica sobre las familias y la sociedad.
- **Pone en riesgo los logros de la sociedad en materia de asistencia sanitaria:** hace peligrar los adelantos de la medicina moderna. En ausencia de antimicrobianos eficaces para el tratamiento y la prevención se pondría en peligro el éxito de tratamientos como el trasplante de órganos, la quimioterapia antineoplásica o las grandes intervenciones quirúrgicas.
- **Afecta a la seguridad sanitaria y perjudica el comercio y las economías.** El aumento del comercio y los viajes internacionales permite que los microorganismos resistentes se propaguen rápidamente a países y continentes lejanos.

Hoy en día, la resistencia a los antibióticos, está teniendo un impacto importante en la sanidad mundial, por sus repercusiones sanitarias. Cuando hablamos de datos, este problema afecta cada vez a más enfermedades: tuberculosis

multirresistentes, gonorreas, malaria, VIH, estafilococosis resistentes a meticilina, enterococosis resistentes a vancomicina, shigelosis únicamente tratables con ciprofloxacino, clostridiosis... incluso están apareciendo nuevos mecanismos de resistencia, como por ejemplo, la *betalactamasa NDM-1*, en varios bacilos gram-negativos. Esto puede volver ineficaces a varios antibióticos potentes, que a menudo se utilizan como última defensa frente a cepas bacterianas multirresistentes (OMS, 2012).

Como ya se ha indicado, la OMS, ha reconocido la resistencia a los antibióticos, como el principal desafío de la sanidad global en el mundo, máxime cuando gran parte de esos microorganismos resistentes son zoonosis o microorganismos comensales, que pueden ser compartidos por el hombre y los animales (EASAC, 2007). Considerarlo como un desafío, se debe fundamentalmente a dos motivos: por un lado está la capacidad de las bacterias de transmitir la información genética sobre resistencia entre sí; por el otro, la globalización, que facilita enormemente la posibilidad de difundir esas resistencias en cortos periodos de tiempo (Ortega *et al*, 2008).

El hecho de que las poblaciones, tanto humanas como animales se desplacen, va a favorecer el contacto entre microorganismos resistentes y no resistentes; por este motivo, se espera que los niveles de resistencia a antibióticos cambien de acuerdo con los patrones de migración o movimiento de poblaciones, ya que en esos movimientos de están desplazando los microorganismos con resistencia ya adquirida (EASAC 2007).

3. El problema de la resistencia a los antibióticos:

a) Fundamentos de la resistencia a antibióticos:

Hay algunos antibióticos que han perdido totalmente su efectividad frente a los microorganismos para los cuales hace pocos años eran antibióticos de elección, hecho que dificulta en gran medida la selección de tratamientos ante brotes de enfermedad, y agrava en gran medida el problema de aparición de brotes de enfermedades infecciosas (EASAC, 2007).

Resulta tan evidente la importancia de la resistencia a antibióticos y la relación que esta tiene en la interacción animal- hombre- medio, que constituye un punto clave entre los objetivos del proyecto de la FAO “*One world, one health*”.

Es el propio uso de los antibióticos, lo que va a favorecer el desarrollo de resistencias, por diferentes motivos. La subdosificación y el desconocimiento generalizado en la sociedad sobre cuáles son las funciones de los antibióticos (no útiles frente a virus, por ejemplo), juegan un papel importante. Es interesante a su vez, que se tenga en cuenta que, en la mayoría de los casos, el antibiótico es un mero colaborador del sistema inmune, que es el verdadero sistema de defensa del ser vivo (EASAC; 2007, pgn 19).

b) Resistencia a los antibióticos en Salud Pública y Sanidad Animal:

En el caso del hombre, hasta hace poco se pensaba que el problema de las resistencias, se centraba en los hospitales, ya que se había observado que más de la mitad de las infecciones adquiridas a nivel hospitalario, estaban causadas por microorganismos resistentes a antibióticos, microorganismos que en algunos casos no son patógenos en condiciones normales (Vicente *et al*, 2006 en EASAC, 2007). Sin embargo, en los últimos años, se ha apreciado un incremento muy importante de aislamiento de microorganismos como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) o a oxacilina, y algunos enterococos altamente resistentes y que no están relacionados con hospitales, sino, que son problemas de tipo comunitario (EASAC, 2007, pgn 9).

También en Sanidad Animal, se está detectando un incremento de microorganismos que presentan resistencia a los antibióticos. Estos microorganismos, que en gran medida han podido adquirir esta resistencia por un uso incorrecto de los mismos en el entorno veterinario, poseen un riesgo añadido, el de ser potencialmente capaces de transferir esa resistencia al hombre: bien mediante la cadena alimenticia o incluso a través de los propios microorganismos comensales (microorganismos que conviven permanentemente con el ser vivo), que podrían actuar como vehículos de esa transferencia para microorganismos más patógenos de una forma horizontal en ambos casos (Pantosti, 2012). Si bien no existe un consenso generalizado, sobre cuál es el papel real del uso de antibióticos en veterinaria para que se haya desarrollado resistencia en el hombre, diversos estudios epidemiológicos y moleculares han sugerido una estrecha relación entre las resistencias humanas y animales (Van Vuuren, 2001). Este hecho, supone que la interacción entre personas y animales, puede ser un elemento importante en la transmisión y mantenimiento de aquellas situaciones de resistencia (EASAC, 2008).

Pero el problema no termina aquí; también se ha detectado que la persistencia en el ambiente de residuos antibióticos o de microorganismos saprófitos, capaces de resistir a la mayoría de los antibióticos debido a que tienen un contacto permanente con ellos, serán claves como transmisores de la resistencia a microorganismos patógenos, respecto a los cuales la actividad de los antibióticos resulta tan importante.

Todo esto, hace que en definitiva, aquellos microorganismos denominados genéricamente ubicuos, ya sean saprófitos o comensales, puedan actuar como reservorios de genes de resistencia, y sean capaces de transferir esa información genética de resistencia a antibióticos a otras bacterias que sí son patógenas, tanto para el hombre, como para los animales (EASAC, 2007).

En este contexto, los animales de compañía (perros, gatos, caballos y animales exóticos), pueden desempeñar un papel fundamental en la transmisión de zoonosis asociadas a resistencia a antibióticos, o incluso transmitiendo microorganismos comensales (no patógenos), pero resistentes a antibióticos, capaces de transmitir esa resistencia a otros patógenos específicos para el hombre.

Algunos estudios, han evidenciado la transferencia de elementos genéticos desde bacterias comensales a bacterias patógenas, lo que contribuye a la emergencia de microorganismos con marcada resistencia a antibióticos (Molbak, 2004). Hoy en día se considera que existe un constante flujo de genes de resistencia entre bacterias, comensales y patógenas en el entorno de poblaciones humanas, animales e incluso plantas del propio medio (Fries, 2004).

c) Funcionamiento de los antibióticos y su utilización:

Antes de empezar a hablar del funcionamiento de los antibióticos, es interesante conocer la diferencia entre algunos conceptos que se utilizan de habitualmente (Gimeno y Ortega, 2005):

- **MEDICAMENTO:** Agente o sustancia, simple o compuesta, que se administra exterior o interiormente con un objetivo terapéutico.
- **ANTIMICROBIANO:** Sustancia que impide el desarrollo de microbios.
- **ANTIBIÓTICO:** Término que comprende todas las sustancias antimicrobianas, ya sean derivadas de las bacterias, de actinomices, de sustancias naturales o de productos sintéticos. Son, por tanto, sustancias químicas producidas total o parcialmente por un

microorganismo, y que tiene la capacidad, generalmente a concentraciones muy bajas, de inhibir el crecimiento, o de destruir completamente a las bacterias y otros microorganismos. Según sean activos, contra muchos o pocos grupos de microorganismos, se dividen en “de amplio espectro”, o de “reducido espectro”.

Cuando empleamos antibióticos, podemos encontrarnos con dos situaciones:

- QUIMIOTERAPIA: empleo del antibiótico para tratar una enfermedad clínicamente reconocible o limitar su propagación posterior.
- QUIMIOPROFILAXIS: Administración de antibióticos para prevenir el desarrollo de una infección o su propagación hacia una enfermedad manifiestamente activa.

En el entorno veterinario, el antibiótico se ha utilizado históricamente, además de como quimioterapéutico o quimioproláctico, como aditivo; dentro de este último término, se engloban los promotores de crecimiento, cuyo fin es mejorar el rendimiento económico en producción animal. Un aditivo para piensos, es todo ingrediente añadido deliberadamente al pienso, que normalmente no se incluye en él, tenga o no valor nutritivo, y que va a influir en las características del pienso o de los productos animales (Codex Alimentarius, 2004). En el caso concreto de los promotores de crecimiento, el objetivo final, es el de aumentar la tasa de crecimiento del animal, a través de la disminución de la carga bacteriana a nivel intestinal y de esta manera aumentar la absorción de los nutrientes, para obtener animales de mayor tamaño con la misma cantidad de pienso (www.elika.net). Estas prácticas ganaderas, han facilitado y están contribuyendo a la emergencia de nuevos patógenos, incluyendo aquellos organismos resistentes a antibióticos, y su transmisión a humanos (Pantosti, 2012).

La Unión Europea prohibió el uso de antibióticos como aditivos en el año 2006. No obstante, el uso del antibiótico como profiláctico, también es controvertido, ya que no existe un límite claro entre los usos permitidos. A modo de ejemplo, se ha puesto de manifiesto, que la resistencia general a las Fluoroquinolonas por parte de *Campylobacter* en animales, está claramente asociada al uso de enrofloxacin, como prevención de enfermedades (EASAC, 2007).

En general, hay que considerar que el uso de antibióticos, suele tener una acción bastante inmediata frente a la enfermedad; sin embargo, el inconveniente, es que el efecto dura unas pocas horas, por lo que para mantener en el organismo una dosis adecuada que mantenga la actividad, se deben realizar administraciones periódicas durante cierto tiempo.

Desde el punto de vista de su utilización en la lucha directa frente a enfermedades, hay que considerar, que los antibióticos, serán un “complemento” del sistema inmune, que será el verdadero responsable de la destrucción del agente o de la resistencia al mismo. Por este motivo, el antibiótico nunca deberá sustituir al sistema inmune, y será de especial importancia establecer medidas destinadas a reforzar ese sistema inmune y prevenir la inmunodepresión; hay que entender el uso de los antibióticos como una terapia complementaria a los mecanismos de defensa naturales del ser vivo.

Desde el punto de vista de su actuación, se consideran dos tipos de antibióticos (Gimeno y Ortega, 2005):

- BACTERICIDA: Agente o sustancia que destruye las bacterias de forma directa.
- BACTERIOSTATICO: Agente o sustancia que detiene el desarrollo de bacterias, dificultando su multiplicación; así se facilita la acción destructora del sistema inmune del ser vivo.

Ante estas opciones, la pregunta es evidente ¿qué será mejor utilizar: un bacteriostático o un bactericida? La respuesta generalizada no existe. En principio, se podría decir que es preferible un bactericida, ya que tendrá una acción directa de eliminación del microorganismo. Esta acción, resulta particularmente importante en infecciones septicémicas agudas, y cuando existe una gran difusión del agente. Sin embargo, en infecciones intracelulares, los bactericidas no suelen ser efectivos y debe recurrirse a los bacteriostáticos, que buscarán facilitar la acción del sistema inmune, que sí es capaz de actuar a aquel nivel; no obstante, esta situación conlleva el riesgo adicional de la permanencia de infecciones latentes.

En muchas ocasiones, se observa que el antibiótico, funciona como bacteriostático a bajas concentraciones, y como bactericida a concentraciones más elevadas, por lo que la dosis resulta clave para definir la actividad del antibiótico.

d) Condiciones para el buen funcionamiento de los antibióticos:

A la hora de utilizar un antibiótico, hay que tener en cuenta, que el producto sea capaz de alcanzar el lugar (órganos y/o tejidos) donde se está produciendo la infección, y que persista en esa lugar durante un periodo de tiempo adecuado y a dosis suficientes, para mantener un efecto inhibitorio o letal frente al agente. Estos

principios, deberán definir el antibiótico a utilizar, si bien, en medicina veterinaria, el coste económico, será otro condicionante importante.

Otro punto a considerar, es la vía de administración. Cada producto, se absorbe mejor por una vía que por otra, pudiendo alcanzar mejor determinados órganos diana. También hay que recalcar, que existen determinados órganos que constituyen auténticas barreras para algunos antibióticos, tales como el cerebro o los ojos.

Del mismo modo, deben ser respetadas las fechas de caducidad del producto, así como las recomendaciones en cuanto a condiciones adecuadas de mantenimiento.

Por otro lado, hay que tener claro, que no todos los antibióticos son efectivos frente a un microorganismo, ni que un mismo microorganismo vaya a ser sensible a un antibiótico, cuando las condiciones han cambiado; razón por la cual, la elección del antibiótico ha de ser cuidadosa.

Finalmente, no hay que olvidar, que cuando se realiza un tratamiento antibiótico, este va a persistir en el organismo del animal durante un tiempo, en forma de restos de las drogas utilizadas, y que por tanto, estos animales, actuarán como portadores de restos de antibióticos. Por ello, antes de ser enviados a matadero, o de destinar sus productos a consumo, es necesario cumplir los llamados "tiempos de supresión", que permiten una completa eliminación del producto del organismo animal.

e) Consecuencias del mal uso de los antibióticos:

La consecuencia inmediata y más importante derivada del uso incorrecto de los antibióticos, es la del desarrollo de resistencia a los mismos.

Desde una perspectiva clínica, se considera que se ha presentado resistencia bacteriana, cuando el tratamiento antibiótico falla en su objetivo de curar al animal enfermo; mientras, desde el punto de vista microbiológico, se habla de resistencia al antibiótico, cuando tras un tratamiento, el microorganismo persiste. La resistencia a un antibiótico en concreto, puede existir de forma natural o bien adquirida, es decir, el microorganismo anteriormente era sensible a esa sustancia, pero siempre, va a ser un fenómeno que debemos esperar, ya que las bacterias buscarán el mecanismo para defenderse de los efectos de los antibióticos.

Por tanto, los fenómenos de resistencia a los antibióticos, pueden deberse a (Gimeno y Ortega, 2005):

- Falta de especificidad por el antibiótico (al antibiótico no alcanza su objetivo, es inactivado...)
- Mutaciones esporádicas del agente en un determinado momento.
- Adquisición de DNA que codifica la resistencia a los antibióticos.

Las características de resistencia y sensibilidad a los antibióticos de las cepas bacterianas, es lo que se conoce como “fenotipo de resistencias” o “patrón de resistencias”.

Como se ha comentado anteriormente, la aparición de resistencia a antibióticos, y la posibilidad de su transmisión, es un hecho que no sólo afecta a los grupos de población localizados más o menos próximos, sino que es un problema universal, desde el momento en que la globalización ha afectado a las poblaciones animales; la posibilidad de realizar grandes desplazamientos de animales, en breves periodos de tiempo, también hacen posible la difusión de esos microorganismos resistentes a antibióticos a grandes distancias. Por ello, conocer profundamente cómo funcionan los mecanismos de adquisición y transmisión de resistencias, es fundamental para decidir cómo actuar correctamente.

f) Mecanismos de resistencia a antibióticos:

A priori, el fenómeno de la resistencia a los antibióticos, es un fenómeno natural, que puede ser amplificado o acelerado por varios factores, dentro de los que se incluye la acción humana.

El uso de los antibióticos, constituye de una manera u otra, una intervención genética en los seres vivos más abundantes del planeta: las bacterias. La aplicación a gran escala de los antibióticos, conlleva una presión selectiva, que favorece la desaparición de las cepas sensibles y la proliferación de cepas bacterianas con mecanismos de resistencia. Se ha demostrado, que los antibióticos, son capaces de seleccionar los mutantes resistentes espontáneos, que surgen en la población bacteriana. El fármaco, inhibe o mata las bacterias sensibles, pero no afecta a los individuos que por mutación espontánea, o por transmisión genética desde otras bacterias donantes, han adquirido un alelo resistente, en consecuencia, estas bacterias se multiplican, de modo que al final son los más prevalentes.

Para que se produzca la resistencia, hacen falta dos condiciones (Gimeno y Ortega, 2005):

- Un contacto persistente y estrecho del microorganismo con el antibiótico.
- Dicho contacto tiene que realizarse a una concentración de antibiótico que permita la supervivencia del microorganismo.

Los mecanismos de resistencia bacterianos más frecuentes, son los relacionados con los fenómenos que afectan a la pared celular, que además presentarán base genética. Además, cuando una bacteria presenta un alto grado de resistencia, se debe probablemente a la coexistencia en la misma, de varios mecanismos de resistencia.

Desde el punto de vista genético, hay dos mecanismos principales encargados de proporcionar dicha resistencia (Gimeno y Ortega, 2005):

- Mutación de un gen existente: mediante el cual se produce una transmisión de la resistencia en las sucesivas divisiones celulares (Transmisión vertical).
- Adquisición de un nuevo gen, que va a conferir resistencia a partir de otras bacterias: la transmisión se produce entre una bacteria donante a una receptora a través de un plásmido (moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico), que lo transporta (transmisión horizontal).

En el primer caso, la mutación se produce en la población en contacto con el antibiótico, mientras que en el segundo caso, será necesaria una primera bacteria con un gen de resistencia a un antibiótico, que realizará el papel de “donante” del gen de la resistencia, y una segunda bacteria “receptora” de ese gen. En este último caso, es dónde tienen una mayor importancia los microorganismos saprófitos o comensales.

La adquisición de los nuevos genes de resistencia a antibióticos, puede producirse de tres formas (Gimeno y Ortega, 2005):

- Transducción: cuando un virus bacteriano o bacteriófago, actúa como vector del ADN de una bacteria donante a otra receptora.
- Conjugación: cuando las células bacterianas se ponen en contacto, y hay transmisión directa de ADN de una bacteria donante a una receptora.

- Transformación: cuando la bacteria receptora incorpora ADN extracelular procedente de una bacteria donante.

El origen de esos genes de resistencia a antibióticos, no está claro hoy en día; pero se piensa que pudiera estar, en las bacterias productoras de los propios antibióticos que utilizarían estos mecanismos de resistencia, para sobrevivir a su propia producción de antibióticos. Este hecho sugiere, que para que se transmitan genes de resistencia, debe darse un nicho ecológico adecuado, es decir, que exista un punto en concreto y simultáneamente una población de bacterias, de diferentes especies, y que tengan un contacto con el antibiótico a dosis no letales para las bacterias. Como ejemplo más claro, está el de las bacterias del aparato digestivo, lugar que constituye en sí mismo en un nicho ecológico de bacterias que además son necesarias de forma permanente allí, y por dónde pasan la gran mayoría de los antibióticos utilizados, tanto en el hombre, como en los animales (la vía oral es la vía de administración más utilizada).

Los estudios de patrones de resistencia realizados hasta el momento, parecen indicar, que el mecanismo de adquisición de resistencia a antibióticos por mutaciones genéticas es poco frecuente, siendo la adquisición de nuevos genes de resistencia a través del contacto entre bacterias resistentes donantes y bacterias susceptibles receptoras el principal mecanismo, lo que en definitiva, vuelve a incidir en la importancia de los agentes saprófitos y comensales como vehículos de transmisión de resistencias.

4. *Staphylococcus aureus* y otros *Staphylococcus* spp:

a) Características microbiológicas, patogenidad y factores de virulencia:

Desde un punto de vista microbiológico, el género *Staphylococcus* se clasifica, junto con los géneros *Micrococcus*, *Stomatococcus* y *Planococcus*, dentro de la familia *Micrococcaceae*. Se caracterizan por ser cocos Gram- positivos, catalasa positivos, oxidasa negativos y no esporulados. Tienen un tamaño que va de 0,5-1,5µm de diámetro; en los crecimientos, se presentan aislados, por parejas o tétradas, formando racimos irregulares. Son aerobios o anaerobios facultativos (crecen con oxígeno en el aire, pero también con concentraciones bajas del mismo), que se encuentran

colonizando de forma habitual, la superficie de los seres vivos, sin que necesariamente sean patógenos para estos (Modric, 2011; Prescott, 1999)

Otras características, son su crecimiento en condiciones de termofilia (puede llegar a crecer a 50°C, siendo su óptimo 37°C), su halofilia o capacidad para crecer con altas concentraciones de sal, y su crecimiento en ambientes secos (Modric, 2011).

Cuando hablamos de *Staphylococcus aureus*, podemos decir que presenta un alto grado de patogenicidad, conferido por diferentes factores de virulencia; estos, son los encargados de producir una gran variedad de proteínas, que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades, tanto en el hombre como en los animales (Bustos-Martínez *et al.*, 2006).

En el CUADRO- 1 se muestra una clasificación de los factores de virulencia de *S. aureus*, teniendo en cuenta si forman parte estructural de la bacteria o si son enzimas o toxinas:

Estructurales	Enzimas	Toxinas
Peptidoglucano	Catalasa	Toxina α (Hemolisina α)
Proteína A	Hialuronidasa	Hemolisina β
Factores de adhesión	Lipasas	Hemolisina γ
Ácidos teicoicos	Coagulasa	Hemolisina δ
Polisacáridos capsulares	Nucleasas	Leucocidina de Pantone-Valentine (PVL)
	Proteasas	Enterotoxinas estafilocócicas (SE)
	Estafilocinasa	Toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1)
	Colagenasa	Toxinas exfoliativas (ETA y ETB)

CUADRO- 1: Principales factores de virulencia de *S. aureus*

Fuente: Bustos- Martínez *et al.*, 2005.

Los factores de virulencia, participan en la adhesión y adquisición de nutrientes para el microorganismo y sirven también para evadir la respuesta inmune del huésped. En base a esto los factores se han clasificado en tres categorías (Bustos-Martínez *et al.*, 2006):

- Los involucrados en la adherencia a la célula huésped o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa.

- Aquellos que están involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas; la TSST-1, la leucocidina de Panton-Valentine (PVL), proteína A, lipasas, y polisacáridos capsulares.
- Los involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como la toxina α , hemolisinas β , γ y δ .

Casi todas las cepas de *S. aureus*, producen un grupo de enzimas y citotoxinas. La función principal de estas proteínas puede ser la de ayudar a degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias. Una de ellas, la **coagulasa**, nos va a permitir diferenciar a *S. aureus* (coagulasa positivo) de otras especies estafilocócicas (coagulasa negativas). La importancia de la coagulasa en la patogenia de la enfermedad, radica en que esta enzima causa la formación de una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico, localizando la infección y protegiendo a la bacteria de la fagocitosis (Bustos- Martínez *et al.*, 2006).

Algunas cepas, producen proteínas adicionales como la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (SE), las toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y la leucocidina. Vamos a desarrollar alguno de ellos (Bustos- Martínez *et al.*, 2006):

- Las **enterotoxinas estafilocócicas**, forman parte del grupo de toxinas conocidas como superantígenos toxina pirogénicos (PTSAs), ya que tienen la habilidad de estimular la proliferación de linfocitos T sin tener en cuenta la especificidad antigénica de estas células. Son las toxinas causantes de toxiinfecciones alimentarias por *S. aureus*.
- Otra de las toxinas interesantes, son las **Toxinas 1**, responsables de producir el shock tóxico, a través de la supresión de la quimiotaxis de los neutrófilos, de la acción de los linfocitos T, y del bloqueo del sistema reticuloendotelial.
- La **leucocidina de Panton-Valentine (PVL)** es una citotoxina detectada en cepas humanas principalmente (Morgan, 2008), que produce la destrucción de los leucocitos y necrosis tisular. La lisis de esos leucocitos, produce la liberación de mediadores de la inflamación, con una consecuente respuesta inflamatoria grave.

Ocurre en menos del 5% de las cepas de *S. aureus*, y suele estar asociada a las cepas de MRSA adquiridas en la comunidad (CA-MRSA) (Hanselman *et al.*, 2006; Rankin *et al.*, 2005), ausentándose en cepas MRSA hospitalarias (Pantosti, 2012).

b) El problema de la resistencia a los antibióticos en estos microorganismos:

Entre los diferentes estafilococos con resistencia a los antibióticos, destaca *S. aureus*, por ser una de las principales bacterias, que hoy en día se incluyen en las listas de microorganismos clave en la resistencia a antibióticos, especialmente en medicina humana, ya que el hombre es su principal reservorio y hospedador. Este hecho, se sustenta en la necesidad de *S. aureus* de nutrirse a base del hierro localizado en la hemoglobina, el cual adquiere a través de uno de sus factores de virulencia, la hemolisina, y los receptores bacterianos para la hemoglobina, tienen más afinidad por la humana que por la de otras especies (Pantosti, 2012).

Dentro de las resistencias de este microorganismo, destaca su resistencia a los β -lactámicos del grupo de las penicilinas; especialmente a penicilinas semisintéticas como la metilicina (MRSA) y la oxacilina, a las cefalosporinas, a los carbapenems (Rubin y Chirino, 2011), y a glicopéptidos como la Vancomicina (*S. aureus* resistente a vancomicina o VRSA), antibiótico utilizado actualmente frente a las cepas MRSA (Kobayashi *et al.*, 2012; Wertheim *et al.*, 2005; Van Vuuren, 2001). A priori, hay que indicar que las cepas MRSA y VRSA, no son más peligrosas o virulentas, que otras variedades de *S. aureus* no resistentes a esos antibióticos; el problema principal, radica en que estos implican una mayor dificultad de tratamiento.

Las primeras situaciones de emergencia a metilicina en *S. aureus*, se detectaron en personas de Inglaterra entre 1960-1961, justo dos años después de la introducción de la metilicina como tratamiento (Kobayashi *et al.*, 2012; Tokateloff *et al.*, 2009; Wertheim, 2005); una década después se reportó MRSA como agente infeccioso en animales, en Asia, Norte América y Europa, caracterizándose como un importante patógeno nosocomial (Walther *et al.*, 2008) (Tabla- 1). Desde su aparición, la prevalencia ha ido aumentando progresivamente, así como su distribución a nivel mundial.

Year	Event
1880	Alexander Ogston identifies micrococci in purulent infections ¹²
1931	Association between nasal colonisation and furunculosis discovered ⁴
1934	Popularisation of the coagulase test for the identification of <i>S aureus</i> ⁵
1944	Introduction of phage typing ¹³
1947	Penicillin-resistant <i>S aureus</i> reported ¹⁴
1952	Association between nasal colonisation of <i>S aureus</i> and infection with the same strain determined by phage typing ^{10,15}
1961	Meticillin-resistant <i>S aureus</i> (MRSA) reported ¹⁶
1991	Pulsed field gel electrophoresis used for genotyping <i>S aureus</i> ¹⁷
1994	Identification of microbial surface components recognising adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) ¹⁸
2000	Multilocus sequence typing developed for studying clonality of <i>S aureus</i> ¹⁹
2001	Whole genome of <i>S aureus</i> sequenced ²⁰
2001	80% of bacteraemic <i>S aureus</i> isolates are endogenous ⁸
2001	Increase in community-onset MRSA infections ²¹
2002	Vancomycin-resistant <i>S aureus</i> reported ²²

TABLA- 1: Listado de principales eventos históricos en el estudio de *S. aureus*

Fuente: Wertheim et al., 2005

Actualmente, en Europa, se ha observado que la prevalencia de MRSA es más elevada en los países del Sur (Italia, Portugal, Malta, España), que en los del Norte (sobre todo los nórdicos). (ECDC, 2010; Pantosti, 2012). Algunos países industrializados de Europa, han visto incrementado de forma dramática, el número de cepas resistentes a meticilina; por ejemplo, el Reino Unido, ha pasado de un 5% de cepas resistentes en 1992, a un 50% en 2002 (Catry *et al.*, 2012). (Figura- 1):

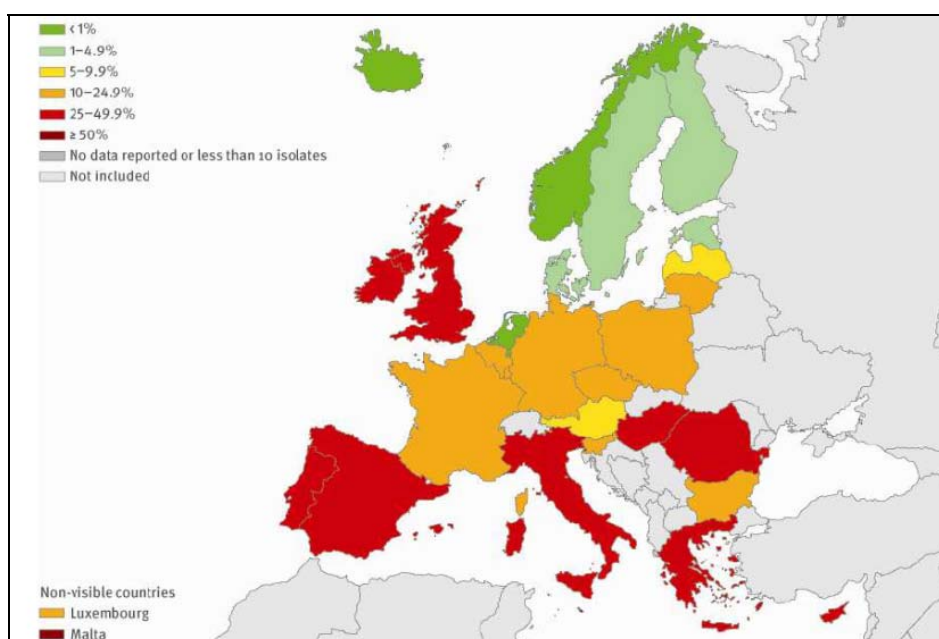


FIGURA- 1: *S. aureus*: proporción de MRSA en el año 2009.

Fuente: ECDC, 2010.

En España, algunos trabajos realizados en entornos hospitalarios, indican un aumento progresivo de la prevalencia de cepas MRSA, habiendo pasado del 1,5% de los aislamientos de *S. aureus* en el año 1986 a un 17,9% en 1996, lo que ponía desde el principio a nuestro país en valores que se consideran de los más altos de Europa, junto con los de Italia y Francia (Voss *et al* ,1994); país este último, donde ya en 1998 se consideraba que un 40% de las cepas aisladas eran resistentes a meticilina, pero además, la mayoría de ellas, también poseían a la vez resistencia a tobramicina, amikacina, neomicina y kanamicina, siendo variable para la gentamicina (Lemaître *et al.*, 1998).

c) *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA):

Los MRSA, están considerados como el principal problema emergente de tipo nosocomial en medicina humana, y ya se destaca con la misma importancia en las poblaciones animales, especialmente en perros y caballos, donde la prevalencia de estos microorganismos con resistencia es cada vez mayor.

La aparición de MRSA y a otros antibióticos, no sólo tiene efectos sanitarios, sino que también son considerables las pérdidas económicas que producen sus brotes de enfermedad; se ha estimado en 350 millones de euros anuales el coste de los brotes de MRSA en Alemania (Wertheim *et al.*, 2005; Wernitz, 2005 en EASAC 2007).

En un principio, la presencia de este microorganismo, es rara en animales de compañía, no aislándose en gatos sanos, tomando valores de entre 0-2,1% en perros (llegando al 9% en perreras), y del 0-11% en caballos. Es interesante destacar, que las cepas aisladas en caballos, a diferencia de las aisladas en mascotas, son cepas MRSA bastante distintas a las cepas humanas aisladas predominantemente en la zona (Pantosti, 2012).

El origen de esas infecciones con cepas MRSA, no está claro, pero los aislamientos obtenidos de gatos y perros parecen MRSA nosocomiales, y es normal asumir que los animales de compañía adquieren MRSA de los humanos (*humanosis*), aunque también, se han aislado en personas cepas atípicas, que muy probablemente tengan su origen en animales. Esta situación, se ha presentado con cierta frecuencia en caballos, dónde además parece que el contacto habitual con poblaciones grandes de animales (mayor de 20 caballos), es un factor de riesgo para el hombre (Catry *et al.*, 2010).

Pero no sólo los animales de compañía, actúan como reservorios de cepas de MRSA; también los animales de abasto (fundamentalmente cerdos y vacas), suponen un reservorio importante del mismo, pero a diferencia de las cepas de MRSA aisladas en animales de compañía, las cepas detectadas en estos, parecen ser clones adaptados a los animales (Pantosti, 2012).

Dentro de los animales de abasto, hay que hacer mención especial al caso del cerdo, ya que se han puesto de manifiesto niveles de infección elevadas con la cepa MRSA ST398 (en Holanda se considera que el 40% de los cerdos están colonizados con cepas MRSA y también se han descrito casos en Bélgica, Dinamarca, Alemania, España y Canadá) (Pantosti, 2012).

Las bacterias del género *Staphylococcus*, son patógenas oportunistas y ubicuitarias, por lo que podemos encontrarlas también en el medio ambiente. En el caso concreto de MRSA, el papel del ambiente en su difusión no está claro. Si bien el microorganismo se localiza naturalmente en los seres vivos, parece claro que en determinados momentos, puede encontrarse en el medio, especialmente en material que ha estado en contacto con seres vivos infectados, y a partir de allí, puede pasar a otros seres vivos no infectados, actuando el ambiente como vehículo del microorganismo. En algunas superficies contaminadas, esta bacteria puede persistir infectante durante días, e incluso excepcionalmente meses dependiendo de factores como temperatura, humedad o presencia de materia orgánica.

La mayoría de los estafilococos, suelen localizarse en piel, mucosas y vías respiratorias altas, sin producir ninguna patología, tanto en animales como en personas. En función del grado de interacción entre *S. aureus* y su hospedador, pueden producirse distintas situaciones o estados: infección (por contacto directo con la piel de un individuo sano, que ha sufrido una solución de continuidad o con material contaminado que alcanza mucosas como la digestiva o la nasal), contaminación (presencia transitoria de *S. aureus* en el individuo) o colonización (presencia permanente de *S. aureus* en el individuo), estado este último, que con mayor frecuencia se da, tanto en animales como en personas (Pantosti, 2012).

Su transmisión, se va a producir a través del contacto directo de piel con piel, por el contacto de heridas abiertas, en cirugías, por hacinamiento, contacto con artículos o superficies contaminadas y por la falta de higiene.

En las personas, suele localizarse de forma habitual en la piel y en las vías respiratorias altas, sin producir ningún tipo de patología, dando lugar al estado de portador. Se considera que entre el 25 y el 50% de las personas son portadoras asintomáticas de *S. aureus*, bien de forma transitoria o permanente (Wertheim *et al*,

2005). En algunos casos, puede ocasionar cuadros cutáneos de moderados a severos y excepcionalmente infecciones sistémicas más graves (infecciones óseas, neumonías o septicemias que pueden evolucionar a endocarditis o meningitis).

En los animales de compañía (perros, gatos y caballos), son habituales tanto *S. aureus* (se considera que es comensal y patógeno oportunista) (Burton *et al.*, 2008), como *S. intermedius/ pseudointermedius* (Hanselman *et al.*, 2008). Este último microorganismo, es el *Staphylococcus* coagulasa positivo predominante en la piel sana de perros y gatos. Se piensa, que es el agente causal más común de pioderma y otitis externa en la especie canina (Bannoehr *et al.*, 2008; Onuma *et al.*, 2011), aunque en ocasiones, también puede originar procesos patológicos más graves, que abarcan desde bacteriemia a neumonía. Como el resto de los estafilococos, también tiene la capacidad de desarrollar resistencia a antibióticos, tales como penicilinas, fluoroquinolonas, tetraciclinas y macrólidos (Jong- Hyung *et al.*, 2009; Onuma *et al.*, 2011).

Los MRSA en estos animales de compañía, producen también lesiones en piel y en tejidos blandos (especialmente tras una cirugía). Cuando hablamos de la especie equina, podemos encontrarlos produciendo bacteriemia, artritis séptica, osteomielitis, infecciones debidas a implantes, metritis, onfalitis, infecciones debidas a cateterización y neumonía (Morgan, 2008).

Además, *S. aureus*, y consecuentemente MRSA, es un patógeno importante en animales de abasto, principalmente en el ganado porcino y bovino, con las implicaciones económicas que eso supone. Las patologías que pueden encontrarse en las granjas, debidas a este patógeno son entre otras: mastitis (en el ganado vacuno es el agente causal más importante de mastitis) (Pantosti, 2012), lesiones en aparato locomotor, pododermatitis, así como infecciones tanto de piel como de tejidos blandos. La presencia de este microorganismo en granjas, da una idea de su presencia en los animales; en un estudio realizado en granjas de cerdos de 17 países Europeos, se han encontrado cepas de MRSA, con una prevalencia que varía entre países que va del 1 al 50%, en función de la densidad de la granja (Morgan, 2008; Pantosti, 2012).

Por último, hay que hablar de los MRSA transmitidos por alimentos. La contaminación de productos alimentarios, con MRSA procedente de animales, se considera como un gran desafío, debido a su potencial papel como diseminador de este patógeno en toda la población. Se han realizado diferentes estudios a nivel europeo, donde se encontró una prevalencia del 11-12% de MRSA, en muestras de carne cruda procedentes de cerdo, ternera, cordero y pollo (Pantosti, 2012; Scott Weese *et al.*, 2010). En América, se han encontrado aislamientos de MRSA en el 5,6%

de las carnes de porcino, y en el 3,3% de las carnes de vacuno (Scott Weese *et al.*, 2010). Aunque la relevancia de esta vía como vehículo de transmisión a personas no es clara, es posible que la colonización a nivel nasal de MRSA podría ocurrir si los humanos contaminan sus manos, tocando carne o superficies con MRSA y posteriormente tocan su nariz antes de lavarse las manos; también las heridas representan una papel importante, lo que habría que tenerse en cuenta en la industria cárnica, debido al manejo habitual de utensilios que podrían causarlas accidentalmente (Scott Weese *et al.*, 2010).

d) Opciones terapéuticas para el tratamiento de las cepas MRSA:

En los últimos años, la resistencia bacteriana, ha empezado a llevar asociado el carácter de multirresistencia para otros grupos de antibióticos como macrólidos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas (hasta un 95% de las cepas MRSA, han resultado resistentes a la ciprofloxacina), tetraciclinas y lincosamidas; siendo en general, la alternativa el tratamiento con clindamicina, mupirocina o ácido fusídico, y sobre todo, con vancomicina que es, a día de hoy, el tratamiento de elección en hospitales, a pesar del aislamiento de cepas resistentes (Kobayashi *et al.*, 2012; Wertheim *et al.*, 2005).

El carácter multirresistente de MRSA, limita seriamente las opciones de tratamiento (Burton *et al.*, 2008). Seguramente, la evolución de las resistencias a otros antibióticos en cepas MRSA, tiene mucho que ver con el uso de los mismos, a veces de manera inadecuada, lo que favorece enormemente la proliferación de resistencias.

El estudio de la evolución de la resistencia de estas cepas MRSA, determinó que inicialmente la mayoría de las cepas tenían un antibiotipo de resistencia a aminoglucósidos y tras suprimir el uso de estos antibióticos, se apreció una variación hacia antibiotipos sensibles a ellos. Sin embargo, estudios realizados en Alemania, indicaron que las cepas aisladas de MRSA, eran cada vez más sensibles a antibióticos como la gentamicina, la oxitetraciclina y la eritromicina, pero que ese aumento de sensibilidad no se puede atribuir a un menor uso de antibióticos, sino a la aparición de nuevas cepas que según se evidenció en la tipificación de las cepas. Además durante ese periodo de estudio, el consumo de aquellos antibióticos no había disminuido (Lemaître *et al.*, 1998).

e) **Clasificación epidemiológica de las cepas MRSA:**

En base a la transmisión de esas cepas resistentes, EMEA en el año 2009, elaboró una clasificación epidemiológica, distinguiendo entre:

- **MRSA contraídos en el hospital (HA-MRSA, hospital acquired MRSA).** Dentro de este grupo, se engloban las personas que han adquirido la infección en una estancia de al menos 48 horas en un hospital, y que hayan estado expuestas a algún factor de riesgo.
- **MRSA comunitarios (CA-MRSA, community acquired MRSA)** por transmisión en las poblaciones sin intervención hospitalaria, o si la han tenido, fue hace tiempo. Son frecuentes en grupos de población tales como cárceles, centros militares, residencias para inmigrantes o ancianos, equipos deportivos... pero también pueden presentarse en el lecho familiar.
- **MRSA comunitarios, relacionados con el cuidado de la salud (HCA-MRSA, healthcare- associated community MRSA).** Son personas, que no están hospitalizadas, pero que lo han estado durante un tiempo, o que están en contacto, bien con el ámbito hospitalario (centros de diálisis...) o con personal sanitario (personas que requieren cuidados de enfermería).
- **MRSA adquiridos en granjas (LA-MRSA, livestock- associated MRSA).** Son cepas de MRSA que colonizan las especies de producción animal (incluyendo los caballos), y que pueden colonizar a las personas que trabajan con ellos (veterinarios, ganaderos, personal que trabaja en la granja...).

Existen diferencias entre las características de las cepas de cada uno de los grupos, sobre todo entre cepas adquiridas en hospital y en la comunidad. Inicialmente, las cepas CA-MRSA se caracterizaban por ser menos resistentes que las hospitalarias: solían ser resistentes a β -lactámicos, y no multirresistentes, como la HA-MRSA. En cambio, eran más virulentas debido a que son portadoras de información genética para elaborar la Pantón- Valentine Leucocidina (PVL), toxina presente principalmente en cepas humanas y que pueden causar un cuadro de necrosis

cutánea severa, y en algunas ocasiones neumonía (Morgan, 2008; Sung *et al.*, 2008), ambos cuadros de tratamiento complejo.

Finalmente, se ha incluido otro grupo **cepas MRSA no tipificables (NT-MRSA)**, descritas por primera vez en el año 2003, asociadas a poblaciones animales bovinas y porcinas, y que se caracterizan por tener baja virulencia, y una circulación muy restringida, hasta el momento, entre la población humana (Chirino- Trejo, 2012 comunicación personal). Sin embargo, su prevalencia está siendo muy elevada en granjas porcinas en Holanda, donde ya se considera que el 80% de las granjas, y el 40% de los cerdos, están colonizados por estas cepas, y ya se han descrito casos en trabajadores de esas granjas con cepas indistinguibles de las aisladas en cerdos, hecho que sugiere una transmisión directa entre ambos (Van Duijkeren *et al.*, 2007).

f) Factores de riesgo asociados:

La gran cantidad de hospedadores y la amplia distribución de estos microorganismos, sugieren la revisión de los factores de riesgo, asociados a esta bacteria emergente y zoonótica, tanto desde el punto de vista veterinario, como desde el punto de vista de la Salud Pública (Catry *et al.*, 2010).

Al considerar las situaciones o circunstancias, en las que se aumentan las probabilidades de ser infectado o colonizado por este microorganismo, van a ser diferentes, en función de si hablamos de animales de granja o de compañía (incluyendo en este grupo de los caballos).

En los animales de granja (cerdos y vacas principalmente), el uso de antibióticos como preventivos, el contacto de animales sanos con animales enfermos, el tratamiento de animales sin haber sido diagnosticados previamente, así como las condiciones de producción intensivas, van a ser los principales factores de riesgo (Catry *et al.*, 2010).

En caballos, la administración de antibióticos 30 días antes del ingreso de un caballo en un hospital veterinario universitario, la colonización previa al ingreso hospitalario, la administración de ceftiofur o de aminoglucósidos durante la hospitalización, compartir granja con caballos colonizados, estancias en la UCI neonatal del hospital e intervenciones quirúrgicas, son los factores de riesgo más importantes en esta especie (Catry *et al.*, 2010; Scott Weese y Lefebvre, 2007; Walther *et al.*, 2008).

Cuando hablamos de animales de compañía (perros y gatos), el factor de riesgo asociado más importante, es el tratamiento de los mismos sin ser diagnosticados (por ejemplo, esto ocurre con el uso de antibióticos como las fluoroquinolonas). Otros factores de riesgo considerados son: dueños con MRSA, exposición a hospitales veterinarios y al personal hospitalario, heridas extensas, hospitalizaciones prolongadas (estancia en UCI) e inmunosupresión de los animales. Los procedimientos invasivos, (material de sutura, implantes ortopédicos, catéteres urinarios, catéteres venosos, drenajes), como también ocurre con los caballos, también están asociados a la persistencia de la infección. Por último, la transmisión de MRSA entre perros y gatos, puede estar asociada a la contaminación del suelo en la clínica veterinaria; es por ello, que la limpieza y desinfección de los suelos, es una de las medidas más importantes en el control de las infecciones humanas y animales de MRSA (Catry *et al.*, 2010).

El hecho de que una persona, presente colonización de las vías respiratorias altas, aumenta el riesgo de infección y de enfermedad por este microorganismo, ya que se ha determinado que en general *S. aureus* aislado en fosas nasales y en procesos patológicos, suelen tener idéntico genotipo (Wertheim *et al.*, 2005). Las personas de raza blanca, los hombres y los niños presentan las tasas más altas de colonización nasal de *S. aureus*, así como los pacientes con diabetes mellitus, sometidos a hemodiálisis, y a diálisis peritoneal, pacientes VIH (+), con infecciones cutáneas (psoriasis...), obesidad o con historial de accidentes cerebrovasculares (Wertheim *et al.*, 2005).

Además de las personas hospitalizadas y la exposición prolongada a antibióticos (EMEA, 2009), se consideran grupos de riesgo al personal sanitario y veterinario. También cualquier otra persona que esté relacionada con animales, bien profesionalmente como recreacionalmente, corre el riesgo de ser colonizada o infectada. En concreto, las personas en contacto constante con animales de especies porcina y equina, son las que presentan un mayor riesgo, si bien en otras especies animales como bovino, aves, perro o gato presentan riesgos menores pero apreciables (Catry *et al.*, 2010). Incluso existen estudios, que evidencian, que el hecho de utilizar medidas de higiene en las granjas, como por el ejemplo el uso de máscaras, no evita el ser portador de *S. aureus* (Catry *et al.*, 2010). Para concluir, hemos citado en el trabajo, el riesgo que supone el consumo o la manipulación de carnes o superficies infectadas en personas en la adquisición y diseminación de cepas MRSA.

g) Bases genéticas de la resistencia de MRSA:

Los MRSA, tienen la característica de poseer una gran variabilidad antigénica y una rápida capacidad adaptativa frente a cambios ambientales; hecho que ha favorecido, que muchos de ellos hayan sido capaces de desarrollar resistencia a diversos antibióticos de uso frecuente para su tratamiento, especialmente las penicilinas resistentes a penicilinasas (PRP) (Pantosti, 2012).

En general, se ha recurrido a los β -lactámicos asociados a aminoglucósidos, como tratamiento de los estafilococos, puesto que han demostrado ser los más eficaces. Los β -lactámicos, son habitualmente bactericidas, es decir, son capaces de inhibir la formación de la pared celular bacteriana, a través de la inhibición de la formación de peptidoglicanos (constituyentes básicos de la pared celular en bacterias) y también, actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano (Marín *et al.*, 2003). Para ejercer su acción, estos antibióticos, tienen que unirse a las proteínas fijadoras de penicilinas (PBP), localizadas en la membrana citoplasmática bacteriana, que intervienen en la síntesis y estructuración de su propia pared.

La resistencia de estos microorganismos a los β -lactámicos (incluidas meticilina, isoxazolilpenicilinas y cefalosporinas), viene dada, por la síntesis de la bacteria, de unas PBP alteradas (PBP2a) codificadas por el gen *mec-A* (Catry *et al.*, 2010). La presencia o no de ese gen, y por tanto de la proteína PBP2a, junto con la existencia de una β -lactamasa, definen tres tipos de *S. aureus*, en función de su sensibilidad a la penicilina (Gil, 2000):

- **MRSA**, capaz de producir intrínsecamente esa proteína PBP2a, con baja susceptibilidad a las penicilinas PRP.
- **BORSA** (del inglés borderline Methicillin- resistant *S. aureus*), con una sensibilidad variable a meticilina, y dónde el elemento clave no es la proteína PBP2a, sino la hiperproducción de la β -lactamasa.
- **MODSA** (del inglés modified *S. aureus*), con una modificación de las PBPs, que presentan una menor afinidad por los β -lactámicos.

Esta resistencia, también ha sido detectada en otras especies de *Staphylococcus* diferentes a *S. aureus*, tanto de origen humano como animal. Este es el caso de algunos *Staphylococcus* coagulasa negativos, como *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. vitulinus*, *S. lentus*, *S. warneri*, *S. saprophyticus* y *S. epidermidis*. En todos

ellos, se ha observado que dicha resistencia, está mediada por el gen *mec-A*, lo que indica que esta información genética, no es exclusiva de *S. aureus*. De hecho, existe una teoría evolutiva, que sugiere que este gen pudo ser adquirido por *S. aureus* a través de *S. sciuri* (De Martino *et al.*, 2012).

A estos *Staphylococcus* coagulasa negativos resistentes a meticilina, se les conoce como **MRCoNS**, y se ha detectado en diversas especies animales, presentando una mayor frecuencia en animales de compañía (siendo importantes en la especie equina) (De Martino *et al.*, 2012), como flora comensal, sin que lleguen a producir patología en la mayoría de las ocasiones (*S. epidermidis* es de los citados, el que en mayor número de casos patológicos ha sido detectado). (Bagcigil *et al.*, 2007).

Otra de las características importantes de los estafilococos, que además le va a conferir parte de su carácter emergente, es la capacidad de transferir y adquirir información genética, incluida la de la resistencia a los antibióticos (*mec-A*). Ya hemos hablado del caso de las cepas VRSA, cuya resistencia viene determinada por el gen *van-A* (Kobayashi *et al.*, 2012; Sung *et al.*, 2008; Van Vuuren, 2001), y que *S. aureus*, es capaz de adquirir a través de otros microorganismos, como son los *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE) (Sung *et al.*, 2008). Estos datos suponen que el hecho de que varios estafilococos, cohabiten en un animal o en una persona, va a predisponer dicho intercambio de información.

De todas formas, el hecho de poseer el gen *mec-A*, no implica que necesariamente la cepa sea resistente a la meticilina (Sung *et al.*, 2008), puesto que un 2% de las cepas que lo poseen, y que por tanto tendrían que ser resistentes, son sensibles a los β -lactámicos, lo que sugiere que alguna otra estructura genética debe estar implicada, junto a este gen, en el desarrollo de la resistencia (Duquette y Nutall, 2004). Pero también pueden existir variaciones en ese gen: un estudio publicado por García- Álvarez en 2011, determinó la presencia de cepas de MRSA con rasgos no usuales en muestras de leche bovina, que contenían nuevo gen *mec-A*, que sólo se asemejaba en un 70% al gen *mec-A* clásico, lo que dificultaba su detección por PCR (Pantosti, 2012).

Todas las cepas, contienen una variedad de elementos genéticos móviles (MGEs), alojando genes de resistencia y de virulencia, que varían entre las cepas de *S. aureus* aisladas, lo cual sugiere una frecuente transferencia horizontal de genes (Sung *et al.*, 2008). Dentro de estos MGEs, se encuentran el cassette cromosómico estafilocócico o SCC*mec*, que contiene el gen *mec-A*, plásmidos, transposones y bacteriófagos.

Estos genes localizados en los MGEs, son menos comunes en aislamientos de *S. aureus* de animales que de personas, no existiendo mucha variación de MGEs dentro de cada clon. Además, se evidenció el intercambio de genes a través de bacteriófagos o transposones entre clones humanos y animales, pero hay una menor evidencia de que los genes que transmiten resistencia a antibióticos, se transfieran en el *SCCmec* o en los plásmidos, si bien hay estudios más antiguos, donde se habían identificado plásmidos de *S. aureus* humano en *S. intermedius* de perros (Schwarz *et al.*, 1998), incluso a nivel laboratorial se ha demostrado la transferencia horizontal de plásmidos con resistencia a vancomicina de VRSA a MRSA (Kobayashi *et al.*, 2012).

Sorprendentemente, las líneas animales están cercanas a las humanas y sólo un puñado de genes o combinaciones de genes pueden ser responsables de la especificidad de hospedador (Sung *et al.*, 2008). Algunos estudios epidemiológicos, que incluyen la secuenciación genética de cepas MRSA aislados en animales, indican que las cepas de perros y gatos son indiferenciables de las cepas humanas, lo que sugiere que ambas especies compartirían esas cepas, y que tienen el mismo origen, posiblemente humano, algo que no ocurre entre las cepas de animales (Leonard y Markey, 2007). Lo mismo ocurre con la especie equina, donde se han encontrado coincidencias importantes con cepas humanas, que sugiere un mismo origen (De Martino *et al.*, 2012; Sung *et al.*, 2008).

5. Falta de concordancia en la valoración de la resistencia a antibióticos:

Otro problema añadido a la existencia de microorganismos resistentes a antibióticos, es la falta de acuerdo a la hora de estandarizar los protocolos de diagnóstico de resistencias, y sobre todo, la interpretación de los mismos. Al no existir un criterio común (para lo que unos es resistencia, para otros es sensibilidad, en función del método o criterio de interpretación utilizado), se genera en muchas ocasiones, un conflicto en la toma de decisiones sobre los tratamientos, se inducen fallos de los mismos y/ o se alteran las valoraciones de riesgos existentes para el hombre desde la perspectiva de la Salud Pública (Franklin *et al.*, 2003; Rahbar, 2005).

Por ello, la correcta valoración de la existencia de bacterias con resistencia a antibióticos, especialmente a aquellos de uso específico para su tratamiento, resulta ser una de las piezas angulares, en la resolución de los problemas en Medicina Preventiva.

Una vez conocida la trascendencia que tienen en la actualidad las cepas MRSA en medicina humana, así como el papel de otros *Staphylococcus* coagulasa positivo (*S. intermedius/ pseudointermedius*), de origen animal, se hace necesario conocer mucho más a fondo, la importancia de estas cepas en el entorno animal, su relación con las infecciones por estas bacterias en personas, así como también es necesario verificar la capacidad de detección de las mismas, tanto a nivel laboratorio como en condiciones de campo. Pero para ello, es necesario que los protocolos de detección de resistencia sean suficientemente fiables, máxime cuando tienen repercusiones en Salud Pública.

De este hecho depende, en gran medida, la calidad de las medidas de lucha y las evaluaciones de riesgo que supone, para la salud pública, la presencia de estos microorganismos en animales de compañía. Por ello, para poder abordar correctamente el problema de las resistencias, uno de los aspectos prioritarios a resolver en la actualidad, es la “estandarización” de los protocolos de diagnóstico y valoración de las resistencias, tanto fenotípica como genotípicamente, con el fin de disponer de datos fiables y comparables en los diferentes contextos, en donde se puedan ir desarrollando brotes de enfermedades, asociadas a microorganismos con resistencia a antibióticos.

6. Bases de la lucha frente a la resistencia a antibióticos:

La resistencia bacteriana es en Europa y en el mundo, es un grave problema de la sociedad, que atañe a muy diversos sectores, como los de la medicina, la veterinaria, la cría de animales, la agricultura, el medio ambiente y el comercio. Para hacer frente a este problema, es necesaria la colaboración conjunta de todos ellos.

Tanto los alimentos, como el contacto directo con los animales o indirectamente a través del medio, pueden desempeñar un papel clave en la transmisión zoonótica de la resistencia, lo que subraya el nexo entre la medicina y la veterinaria, como resalta la iniciativa “*One world, one health*”.

Prueba de que estamos ante un problema serio para la Sanidad Global (humana y veterinaria), son los resultados de una encuesta realizada recientemente por la OIE, que ha evidenciado que el 64% de los países encuestados, reconocen tener resistencia a los antibióticos en bacterias, que pueden compartir los hombres y los animales, especialmente en microorganismos como *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Staphylococcus spp.* o *E. coli* (todos ellos pueden causar graves

enfermedades en el hombre, debido en gran medida a su carácter zoonótico) (OIE, 2003). Al hecho del riesgo que supone para la Salud Pública, la existencia de bacterias de origen animal resistentes, se suma el que, una vez aparecida la resistencia, pasa a ser un fenómeno persistente a largo plazo, es decir, se prolonga en el tiempo, incluso una vez que ha cesado el contacto con el antibiótico.

La clave del éxito en la lucha contra la resistencia a los antibióticos, según la Comisión Europea, consiste en establecer un planteamiento integrado, que además pueda explotar las nuevas oportunidades que ofrece la investigación genómica. Este organismo, ha creado un **“Plan de acción contra la amenaza creciente de las resistencias bacterianas”**, en Noviembre de 2011, basado en la colaboración conjunta, de todas las personas que trabajan en Salud Pública. Son 4 los puntos abordados en este Plan de acción:

a) Uso racional de los antibióticos:

La iniciativa denominada uso racional o uso apropiado y responsable de los antibióticos está considerada actualmente, como un punto esencial para reducir y prevenir la resistencia bacteriana, y la base para luchar contra ella, tanto en medicina veterinaria como en medicina humana. Sólo hay que emplear antibióticos cuando sea necesario, y de una forma correcta, puesto que una vez que han aparecido las resistencias, la reversión al estado de sensibilidad a los mismos, es un proceso muy lento. La EASAC, además de este uso racional, sugiere otra estrategia, la del establecimiento de programas de vigilancia de dichas resistencias (EASAC, 2007).

Una vez considerada la importancia de esas dos estrategias, es necesario comprender los mecanismos de adquisición y transmisión de resistencia a los microorganismos en cada situación, así como la ecología y la dinámica de esos microorganismos en sus hospedadores y en el medio, es decir, conocer la influencia de la relación agente, hospedador y medio en el desarrollo de las resistencias (EASAC, 2007). Pero además, la efectividad de esos planes de vigilancia de resistencias, dependerá de que se contemplen, no sólo los microorganismos patógenos con resistencia adquirida, sino también aquellos microorganismos saprófitos y comensales que pueden desempeñar algún papel importante en el mantenimiento y la transmisión de la resistencia a otras bacterias, que sí pueden ser altamente patógenas.

A este nivel, otro de los puntos en los que se hace hincapié, es el de desarrollar un método de análisis de riesgos para poder evaluar y gestionar las medidas encaminadas a reducir el impacto de la resistencia a antibióticos de origen animal en Salud Pública (Van Vuuren, 2001). La vigilancia y el análisis de riesgos de resistencias deben prestar especial atención a las cepas MRSA y VRSA de poblaciones animales que están en contacto permanente con personas, y al uso de antibióticos en estas poblaciones, ya que de ello depende, en gran medida evitar su paso posterior al hombre.

Por supuesto, conseguir estos objetivos ligados al uso prudente de los antibióticos, implica desarrollar programas de formación y educación, tanto a nivel profesional (médicos, veterinarios, farmacéuticos), como a nivel social. Cuando se habla del uso responsable de los antibióticos para reducir las resistencias, en medicina humana, es muy importante la colaboración estrecha entre médicos y farmacéuticos, que serán los responsables de fomentar ese comportamiento entre los pacientes; mientras que en medicina veterinaria, también se han establecido mecanismos de cooperación entre las partes interesadas (la industria de Sanidad Animal, veterinarios, propietarios de animales de compañía y ganaderos).

Un último aspecto, no menos importante, considerado en la lucha frente a las resistencias a antibióticos, es la creación de protocolos estandarizados de diagnóstico, así como el diseño de nuevas herramientas de diagnóstico, que sean precisas, eficaces a la vez que factibles y de rápida realización. Aunque, también es cierto, que siempre que tenemos un resultado laboratorial, habría que realizarse una pregunta: ¿el hecho de que la bacteria responsable de la enfermedad resulte sensible a un determinado antibiótico “*in vitro*”, implica que el ser vivo tratado se vaya a curar? Siempre deberemos estar preparados para que la respuesta a la misma sea NO NECESARIAMENTE, ya que la respuesta “*in vivo*” puede no coincidir con el resultado de laboratorio.

La estrategia “uso racional de los antibióticos” en veterinaria, plantea los siguientes objetivos (Gimeno y Ortega, 2005)

1. Mantener la eficacia de los agentes antimicrobianos y asegurar el uso racional de estos, con el propósito de asegurar su eficacia y seguridad en los animales.
2. Mantener a los animales en buen estado sanitario de acuerdo a las necesidades económicas y las obligaciones éticas.

3. Prevenir o reducir, tanto como sea posible, las transmisiones bacterianas entre poblaciones animales,
4. Prevenir o reducir la transmisión de bacterias de animales a humanos.
5. Prevenir la contaminación de alimentos de origen animal con residuos de antimicrobianos.
6. Proteger la salud de los consumidores, garantizando la seguridad de los alimentos de origen animal destinados al consumo humano.

Ante la elección de un antibiótico, hay que plantearse primero si está realmente indicado el uso del antibiótico. Si la respuesta es afirmativa, los pasos a seguir son los siguientes (Gimeno y Ortega, 2005):

1. Localización de lugar dónde se ha producido la infección (localización del microorganismo).
2. Determinación de sensibilidades a antibióticos mediante antibiograma.
3. Selección inicial en función de los dos puntos anteriores.
4. Si es necesario el uso de un antibiótico de amplio espectro hasta obtener los resultados de laboratorio, seleccionarlo atendiendo al historial de uso de antibióticos y sus resultados.
5. Considerar la vía, la dosis y la frecuencia de administración adecuadas.
6. Salvo antibióticos específicos, el tratamiento, no debería durar menos de 7 días, salvo en profilaxis quirúrgica, donde el tratamiento no excederá las 24h.
7. Evitar el cambio de antibiótico, antes de 48 horas de haber iniciado un tratamiento.
8. Considerar la potencial toxicidad para el hospedador.
9. En el caso de que sea necesario, asociar más de un antibiótico, prestando atención a sus posibles antagonismos (guías de asociación de antibióticos).
10. Rotación de antibióticos en tratamientos muy prolongados en el tiempo.
11. Valorar su posible efecto ante situaciones de debilidad inmunológica del hospedador a tratar.
12. Conveniencia de disponer de una base de datos específica de susceptibilidad a antibióticos basada en la realización de cultivos y antibiogramas dentro de programas de vigilancia.

13. En el caso de su uso veterinario en animales cuyos productos se destinan a consumo humano, considerar los periodos de supresión.

En el ámbito veterinario, existen determinadas prácticas habituales, que predisponen al desarrollo y al mantenimiento de las cepas resistentes, y que requieren diseñar una estrategia correcta de uso de antibióticos. En animales de abasto, la administración de antibióticos en el pienso o en el agua de bebida a grandes lotes de animales, conlleva generalmente una inadecuada relación dosis peso, por lo que debería restringirse esta práctica o realizarla en lotes de animales relativamente homogéneos. Cuando hablamos de animales de compañía, tenemos el ejemplo de la interrupción de la administración de los tratamientos por parte de los propietarios cuando el animal muestra cierta mejoría.

Existen dos ejemplos claros, citados por Van Vuuren en 2001: el primero es el uso de fluoroquinolonas en aves, que predisponen a la resistencia de *Campylobacter* spp en humanos frente a este antibiótico considerado de elección para este microorganismo y el segundo es el uso veterinario de avoparcina, la cual parece estar detrás de parte de la resistencia a la vancomicina en cepas humanas de *Enterococcus faecium* (Román, 2008).

También la prohibición de uso de determinados antibióticos en el entorno veterinario, puede ser una medida óptima de cara a la Salud Pública, puesto que evitaría el paso de la resistencia de animales a hombre. Es razonable considerar, por tanto, que el uso prudente de antibióticos como estrategia para reducir los problemas de resistencia, y sus posibles implicaciones en Salud Pública, requiere, en muchos casos, de la elaboración de legislaciones, que restrinjan el uso de algunos antibióticos en veterinaria, por su importancia en medicina humana.

No es desdeñable destacar, que un diagnóstico de las resistencias, complementadas con el cese en el uso de esos antibióticos, ha permitido en algunos casos y a largo plazo, recuperar la sensibilidad de las nuevas cepas a aquellos antibióticos a los que eran resistentes. Es el caso de las cepas de *S. aureus* resistentes a la gentamicina, detectadas en Francia, entre los años 1991 y 1998, que han ido perdiendo la resistencia a dicho antibiótico conforme ha pasado el tiempo sin utilizarlo (Lemaître *et al*, 1998). Esto quiere decir que, el hecho de preservar ciertas moléculas de antibióticos para situaciones de emergencia en medicina humana, podría garantizar que su uso sea efectivo en esas situaciones de verdadera necesidad.

Pero además del uso racional de los antibióticos, hay que valorar las posibles resistencias cruzadas, debido al uso de otros antibióticos de las mismas familias, o

incluso de familias diferentes afines en el entorno animal, ya que los problemas de resistencia a vancomicina por el uso de avoparcina, son una clara referencia a ello.

b) Prevención de las enfermedades microbianas y su propagación:

Está demostrado científicamente, que la aplicación de medidas preventivas e higiénicas (protocolos de limpieza y desinfección, lavado de manos entre pacientes), tanto en hospitales o en ámbitos sanitarios, así como la instauración de medidas de bioseguridad y buenas prácticas ganaderas, serían un buen punto de inicio en la lucha frente a las resistencias microbianas. Permiten reducir el uso de los antibióticos y con ello, la posible aparición de resistencias en los patógenos de los animales y en los agentes zoonóticos.

c) Diseño de nuevos antibióticos eficaces o de tratamientos alternativos:

En 2009, el informe “*The bacterial challenge: time to react*”, realizado por el ECDC y el EMEA, ya pone de manifiesto la necesidad de diseñar nuevos antibióticos capaces de cubrir necesidades médicas frente al creciente problema que suponen las bacterias polifarmacorresistentes en la UE. A lo largo de los años, la industria farmacéutica, proporcionaba un flujo constante de nuevos antibióticos, con distintos mecanismos de acción que solucionaban rápidamente los problemas de resistencias bacterianas que iban sucediéndose. Desde los años 70, hasta la actualidad, sólo se han sacado al mercado, tres antibióticos de tipo sistémico (quinupristinadalfopristin, linezolida y daptomicina), y dos grupos nuevos (Oxazolidinonas y lipopéptidos), para utilizarse como tratamiento de infecciones de microorganismos multirresistentes Gram positivos (dentro de los que se incluyen los *S. aureus*) (ECDC y EMEA, 2009).

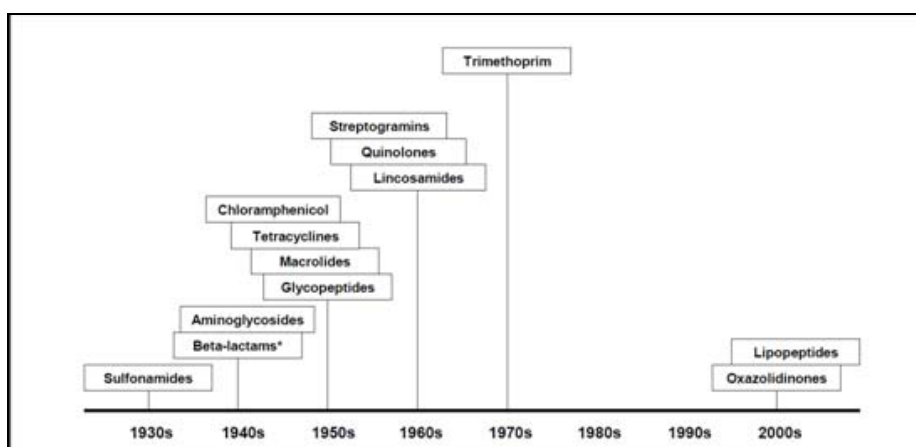


FIGURA- 2. Descubrimiento a lo largo del tiempo de nuevos antibióticos.

Fuente: ECDC, EMEA, 2009.

* Las penicilinas fueron los primeros β -lactámicos. Otros agentes frecuentemente utilizados del grupo de los β -lactámicos, además de las cefalosporinas y los carbapenems, fueron desarrollados en los años 60 y 80 respectivamente.

Existen diversas razones de esa falta de inversión industrial en nuevos antibióticos (Comisión Europea, 2011):

1. Diseñar antibióticos nuevos, eficaces y seguros presenta cada vez más dificultad tanto a nivel científico como económico.
2. Cada vez está más restringido su uso.
3. La estructura de los precios no prima la utilidad.
4. La mayor parte de los antibióticos se administran durante breves periodos de tiempo.
5. Los antibióticos genéricos, van incrementando su parte de mercado.
6. En el ámbito de los antibióticos hay una necesidad imperiosa de más investigación y desarrollo, y de un nuevo modelo comercial.

En medicina veterinaria, además existe otro problema añadido: el desarrollo de nuevos antibióticos, se ve frenado por la incertidumbre sobre si a los nuevos antibióticos, o incluso a nuevas indicaciones de sus principios activos, se les concedería la autorización de comercialización para el sector veterinario (Comisión Europea, 2011).

Además de organismos como la OMS, en Europa son fundamentalmente dos los entes que trabajan conjuntamente, para el desarrollo de nuevos tratamientos frente a los nuevos desafíos en Salud Pública. Por un lado tenemos el EMEA, que creó un grupo en 2006, encargado de promover la investigación e innovación en la industria farmacéutica, y por tanto desarrollar nuevos antibióticos, y por el otro lado el ECDC, que desde 2005, trata de identificar, comunicar y apoyar los desafíos actuales y emergentes producidos por enfermedades de carácter infeccioso en Salud Humana; dentro de sus objetivos, se encuentra la identificación de antibióticorresistencias.

La utilización de los antibióticos, debe ser un complemento al apoyo al sistema inmune del ser vivo, que es el último responsable de la eliminación de la infección, así como de las consecuencias derivadas de esta (enfermedad). Es por ello, que en la lucha frente a los agentes bacterianos capaces de desarrollar resistencias a antibióticos, que al final son todos, debe considerarse la mejora de esa respuesta

inmune, es decir, potenciar de alguna manera la capacidad de respuesta del ser vivo a la infección.

Por ello, no sólo los antibióticos son la única respuesta: las vacunas y otras medidas preventivas, también son capaces de reducir la propagación de las infecciones, y por tanto, de la necesidad de un tratamiento. Podemos concluir, que la otra gran alternativa de lucha frente a la resistencia a los antibióticos, junto con un uso responsable de los mismos, es la búsqueda de la inmunización de las poblaciones frente a aquellos agentes, capaces de desarrollar dicha resistencia.

d) Aunar esfuerzos con socios internacionales para reducir los riesgos de propagación de la resistencia, relacionados con el comercio y los viajes internacionales y por el medio ambiente:

El problema de las resistencias bacterianas, es un problema global, por lo que la UE está colaborando con distintos organismos internacionales, para desarrollar estrategias conjuntas y para promover medidas comunes y aumentar la concienciación social sobre este asunto. Dentro de este grupo de organismos se encuentran: la Oficina Regional para Europa de la OMS, la OIE a través de la elaboración de sus Códigos Sanitarios y fomentando la aplicación de los protocolos internacionales del *Codex Alimentarius* sobre las resistencias bacterianas y por último, el grupo operativo transatlántico EE.UU.-UE, sobre la resistencia a los antimicrobianos (grupo TAFTAR).

JUSTIFICACIÓN:

Dada la significación que tienen en la actualidad las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina y a vancomicina en medicina humana, resulta fundamental estudiar la importancia de estas cepas en el entorno animal, y especialmente la interacción entre las personas, los animales y el medio en la proliferación, mantenimiento y transmisión de estos microorganismos, así como de otros *Staphylococcus* coagulasa positivo y que puedan presentar resistencia a Meticilina, al resto de β -lactámicos y glucopéptidos, como la vancomicina, antibióticos de referencia en medicina humana.

Con esta inquietud por conocer la situación de la resistencia a antibióticos en esos microorganismos en poblaciones animales, y ante el riesgo potencial que suponen los animales colonizados o infectados, para la salud Pública, surge la iniciativa de desarrollar un trabajo que analice la situación actual y el riesgo que para la Salud Pública suponen, las cepas de *S. aureus* y de *S. intermedius/pseudointermedius* con resistencia a antibióticos, en la interacción animales, hombre y entorno.

El estudio parte de una primera línea de trabajo desarrollada en conjunto por varios grupos de investigación; por un lado, por el grupo de Microbiología del Hospital Miguel Servet de Zaragoza en el estudio de cepas de *S. aureus* resistentes de meticilina en el entorno hospitalario, a partir del cual se ha elaborado un importante cepario, y por otro lado, por el grupo de Medicina Preventiva de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza que, a través del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, ha desarrollado un estudio sobre la importancia de la resistencia a antibióticos, y especialmente a β -lactámicos en cepas de *Staphylococcus* spp. de origen animal, y el riesgo que la relación hombre-animal, implica en la transmisión de la resistencia a personas en contacto con ellos, y por tanto, el riesgo de que estos animales actúen como portadores de la resistencia para el hombre.

OBJETIVOS:

Como objetivo principal del trabajo, se plantea realizar un estudio de la presencia de cepas de *S. aureus*, y *S. intermedius/ pseudointermedius*, en animales de compañía (entendiendo por animales de compañía, poblaciones de perros, gatos y caballos), así como en la evaluación de sus patrones de resistencia y sensibilidad a diversos antibióticos de interés, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. De esos resultados, se pretende realizar una aproximación al posible riesgo que suponen las interacciones entre las poblaciones animales y humanas, en el intercambio de cepas con resistencia a antibióticos.

Como objetivos más concretos, se proponen:

1. Conocimiento de la distribución de cepas de *S. aureus*, *S. intermedius/ pseudointermedius* y otros *Staphylococcus* en las poblaciones animales estudiadas:
 - Cepas aisladas en animales.
 - Distribución por especies y relación con el hombre.
2. Caracterización de los patrones fenotípicos de resistencia y sensibilidad para los antibióticos de uso humano y veterinario, en las cepas aisladas:
 - Patrones de resistencia a antibióticos de interés en medicina humana (β -lactámicos y vancomicina).
 - Patrones de resistencia en antibióticos de uso veterinario.
 - Características de multirresistencia asociada en todas las cepas.
3. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMLs), para los principales β -lactámicos y glicopéptidos (Oxacilina, Vancomicina, Amoxicilina y Penicilina), debido a su importancia en Salud pública.
4. Identificación en las cepas aisladas de la presencia de la proteína PBP2a, que determina la presencia de resistencia a meticilina.
5. Caracterización, mediante PCR, de los patrones genéticos de resistencia a β -lactámicos, gen *mec-A*, de aquellas cepas que, por sus características de resistencia fenotípica, pueden constituir un riesgo especial para la Salud Pública.

6. Evaluación de la fiabilidad y del grado de concordancia, de las técnicas utilizadas en el laboratorio de forma rutinaria para determinar la sensibilidad o resistencia de las cepas estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS:

La metodología de trabajo en el estudio, se centró en la realización de muestreo y el posterior aislamiento en esas muestras, de cepas de especies de *S. aureus* y *S. intermedius* a partir de animales de compañía (tanto con algún tipo de patología como sin ella).

Esos aislamientos, se completaron con la determinación de los patrones fenotípicos de resistencia y sensibilidad a diferentes antibióticos de interés tanto en medicina humana como en sanidad animal, utilizando para ello, los test de Difusión en disco de Kirby Bauer (KB) y de la determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI_s). También se han estudiado las cepas aisladas desde una perspectiva genotípica, para identificar genes de resistencia como elementos de riesgo para la transmisión de la resistencia.

A partir del análisis que se realizó de los resultados, se ha tratado de realizar una aproximación cualitativa al riesgo que estos microorganismos y sus patrones de resistencia asociados, pueden suponer para las personas en contacto con ellos (Salud Pública).

Por otro lado, con el fin de valorar la fiabilidad de los resultados obtenidos con las pruebas utilizadas, y que son de uso frecuente ante casos clínicos, se estudió la sensibilidad y especificidad de las pruebas para los β -lactámicos, y glucopéptidos y se valoró el grado de concordancia entre las pruebas utilizadas para algunos de esos antibióticos, a la hora de definir la resistencia o sensibilidad.

1. Selección de animales y recogida de las muestras:

Los animales participantes en el estudio, fueron 97 perros, 20 caballos y 14 gatos, que acudieron a consulta en el Hospital clínico Veterinario de la Universidad de Zaragoza. Como algo anecdótico, también se incluyeron en dicho estudio, muestras de una cabra, un cerdo y un conejo (que no eran animales de producción intensiva, sino animales de compañía).

El estudio durante el cual se realizó la recogida de muestras, abarcó el periodo 2010-2011; en todos los casos, se trataba de animales que presentaban algún tipo de patología o bien que, estando sanos, realizaron alguna visita rutinaria al hospital. En

estos últimos, la participación o no del animal en el estudio era voluntaria de acuerdo con el propietario.

Las muestras, se recogieron mediante hisopos estériles con medio de mantenimiento AIMES, en fosas nasales de todos los animales (con o sin patología asociada), siendo especialmente importantes los que tenían alguna infección sospechosa de ser producida por *Staphylococcus spp.*, en órganos o tejidos; casos concretos, estos últimos, en los que el muestreo se realizaba también en la lesión. Los protocolos de muestreo habían sido aprobados por el comité ético veterinario (ref: PI45/08).

2. Aislamiento e identificación bacteriana:

Una vez recogidas las muestras, se remitían al laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria y allí se procedía al aislamiento e identificación de los microorganismos de interés en el estudio (*S. aureus* y *S. intermedius/pseudointermedius*).

Dicho aislamiento, comenzaba con el enriquecimiento de las muestras en medio BHI con un 10% de Cloruro Sódico (CINa), incubadas a 35-37°C en un ambiente aeróbico durante 24 horas. A partir de ese enriquecimiento inicial, se realizaba la resiembra en Agar Sangre y en el medio selectivo para *Staphylococcus spp.*, Manitol Sal Agar. Todas las placas se incubaban a 35-37°C durante 24 horas, en un ambiente aeróbico.

Todos los crecimientos, se identificaron en función de la morfología de las colonias, de la hemólisis producida en agar sangre, de su crecimiento o no en Manitol Sal Agar, de la tinción de Gram, y de la presencia o no de la enzima catalasa. Todas las colonias compuestas por cocos Gram positivos, catalasa positivos, hemolíticas y con morfología compatible con *Staphylococcus spp.* se seleccionaron para continuar con su estudio.

Posteriormente, tras haber realizado la identificación, se procedía a realizar la prueba de la coagulasa, que resulta positiva para los dos microorganismos de interés, *S. aureus* y *S. intermedius*. El resto de colonias del crecimiento que resultaban coagulasa negativos, fueron identificados utilizando el API 20 STAPH system (bioMérieux S. A.), de acuerdo a las recomendaciones del laboratorio fabricante.

Finalmente, para diferenciar entre *S. aureus* y *S. intermedius*, se realizaba la prueba de la β - Galactosidasa (ONPG) previo paso de las colonias en el medio Tripple Sugar Agar Iron (TSI) a 35-37°C durante 24 horas, pruebas dónde: *S. aureus* será negativo y *S. intermedius* será positivo. La interpretación de esta prueba se completaba con el resultados observado para la utilización de la lactosa en el Manitol Sal Agar, lo que les daba una coloración distinta según la especie (*S. aureus* daba lugar a colonias amarillas y *S. intermedius*, a colonias rosas).

3. Determinación de los patrones fenotípicos de resistencia y sensibilidad a antibióticos:

Tras realizar el aislamiento y la identificación, se sometía a las cepas a los test de resistencia y sensibilidad a antibióticos mediante dos métodos: **Prueba de difusión en disco Kirby Bauer (KB)** (Bauer *et al*, 1966) adaptado según los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2011) y la **determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria** según el método CIMEvaluator (OXOID).

Para ellos, las cepas aisladas, se cultivaban en Agar Sangre, con el fin de tener un cultivo puro joven de 24 horas; posteriormente se diluían en Solución Salina Fisiológica hasta lograr una concentración de $1,5 \times 10^8$ ufc/ml (0,5 en la escala de McFarland).

A partir de esa suspensión, se realizaba una siembra homogénea con hisopo estéril en medio de cultivo Mueller Hilton, donde posteriormente, se realizaría el estudio de los patrones de resistencia y sensibilidad.

Una vez sembradas las placas, se colocaban los discos de antibióticos en el test de KB o las tiras de antibiótico del sistema MICE. Tras completarse el proceso, las placas se incubaban a 35-37°C durante 24 horas. A las 48 horas se volvían a leer ante la posibilidad de la existencia de algún cambio.

La interpretación de las pruebas de resistencia a antibióticos se realizaba siguiendo los criterios del CLSI (CLSI, 2011), considerando las cepas como resistentes o sensibles en función de las medidas de los halos de inhibición en el test KB o en mg/ml de antibiótico necesario para inhibir el crecimiento bacteriano para las CMIs.

Todas las cepas de ambas especies de *S. aureus* y *S. intermedius* aisladas, eran testadas mediante **el test KB** para los siguientes antibióticos (Flórez *et al.*, 1999):

- **β- lactámicos**: amoxicilina- ácido clavulánico (30 µg), ampicilina (10 µg), penicilina G (6 µg), metilicina (10 µg) y oxacilina (5 µg).
- **Fluorquinolonas**: ciprofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg), levofloxacina (5 µg) y marbofloxacina (5 µg).
- **Macrólidos**: eritromicina (15 µg)
- **Tetraciclinas**: tetraciclina (30 µg).
- **Aminoglucósidos**: estreptomina (10 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg).
- **Sulfamidas**: sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg).
- **Glicopéptidos**: teicoplanina (30 µg) y vancomicina (30 µg); esta última, se considera la alternativa de tratamiento en medicina humana, ante la resistencia a los β-lactámicos.
- **Cefalosporinas**: cefoxitina (30 µg), como alternativa diagnóstica a la Oxacilina.
- **Lincosamidas**: lincomicina (15 µg) y clindamicina (2 µg).

Por otro lado la **determinación de CMIs** se realizó para: Oxacilina, Vancomicina, Amoxicilina y Penicilina, antibióticos de especial interés en Salud Pública.

Como desde un principio se asumió la falta de estandarización de los métodos de detección de cepas resistentes, dificultando su interpretación en algunos casos, la detección de cepas con resistencia a β-lactámicos, se completó con la detección de la proteína PBP2a, que se identifica con la presencia del gen *mec-A*. Esta detección, se realizó mediante la **prueba de aglutinación en látex de la proteína PBP2a** (OXOID Penicillin- Binding Protein Latex Agglutination) siguiendo el protocolo definido por el fabricante. La selección de esta prueba como gold standard, se decidió a través de la evidencia científica proporcionada por los diferentes estudios, que otorgan a este tipo de pruebas la mayor sensibilidad y especificidad en relación con la detección de los genes de resistencia mediante PCR, especialmente en *S. aureus* pero también en el caso de otros estafilococos, tanto coagulasa positivos como negativos (Hanselman *et al.*, 2008; Hussain *et al.*, 2002; Louie *et al.*, 2001; Ortega *et al.*, 2011; Wilkerson *et al.*, 1997).

4. Caracterización de las cepas, mediante biología molecular:

A partir de los resultados obtenidos en los aislamientos, y la caracterización de los patrones fenotípicos de resistencia y sensibilidad a los antibióticos, se seleccionaron 28 cepas, que por sus patrones fenotípicos de resistencia, considerábamos que podían constituir un riesgo especial para la Salud Pública. Estas 28 cepas, fueron tipificadas genéticamente mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); esta actividad fue desarrollada por un laboratorio externo, con el que el grupo de investigación colabora.

Esta prueba, en concreto, determinaba los patrones genéticos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, especialmente detectaba la presencia del gen *mec-A*.

5. Análisis estadístico de los resultados:

La información obtenida de los aislamientos y los patrones de resistencia y sensibilidad a los antibióticos, se introdujeron en una base de datos EXCEL y la información almacenada en esta, se analizó utilizando el mismo programa informático.

En el análisis de los resultados, se determinó la distribución de frecuencias, proporciones, de los aislamientos y de la resistencia o sensibilidad a los diferentes antibióticos.

Por otro lado, la evaluación de la fiabilidad de algunas de las pruebas de detección utilizadas en el estudio y del grado de concordancia entre esos métodos utilizados, se realizó con el programa informático WINEPISCOPE 2.0. (Thrusfield *et al*, 2001). En el caso de determinar la fiabilidad de las pruebas se utilizó como gold standard, la aglutinación en látex de la proteína PBP2a.

El acuerdo (concordancia) entre pruebas se ha valorando mediante el parámetro Kappa. En este caso, cuanto más se aproxima a 1 el valor, mayor es el grado de acuerdo entre las pruebas.

La fiabilidad de los test KB y las CMI's se ha valorado mediante el cálculo de los parámetros: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo y J de Youden, parámetro este último que, proporciona una valoración global para la prueba, de manera que, cuanto más se aproxime su valor a 1, mayor fiabilidad global se atribuye a esa prueba.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

1. Distribución y caracterización de las cepas de estafilococos aisladas:

Resultados:

a) Distribución por especies:

A lo largo del periodo de estudio, se muestrearon un total de 135 animales, de los cuales un 71,85% fueron perros, 14,81% caballos, 10,37% gatos, 0,74% cabra, 0,74% cerdo, 0,74% conejo y 0,74% muestra de origen desconocido (GRÁFICO- I).

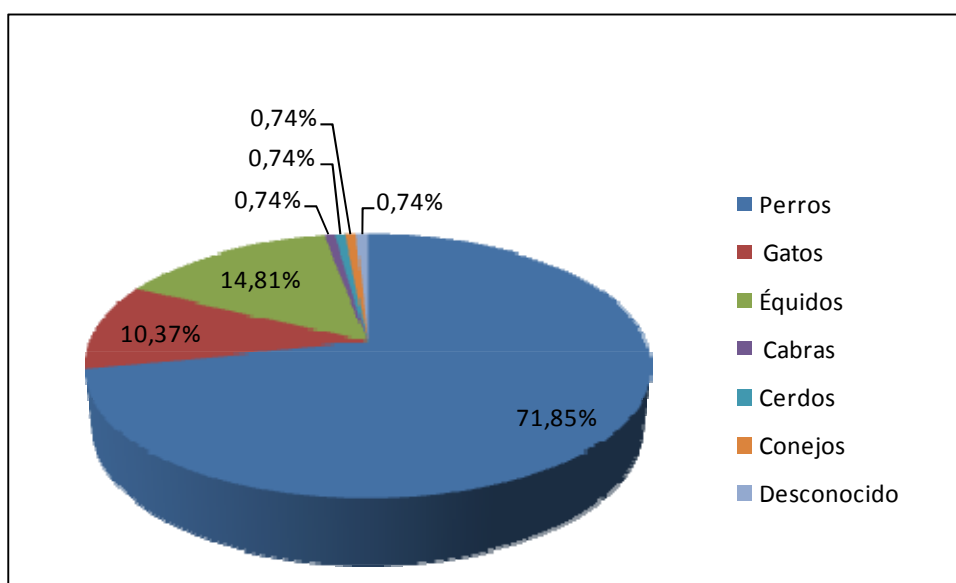


GRÁFICO- I. Distribución de las proporciones (%) de las distintas especies animales incluidas y muestreadas en el estudio, y que resultaron positivas a la presencia de alguna bacteria del género *Staphylococcus* spp.

b) Caracterización de las cepas aisladas para la prueba de la coagulasa:

Tras realizar los análisis microbiológicos pertinentes, de esas muestras, un 53% fueron positivas a la prueba de la coagulasa, grupo dentro del cual se encuentran las dos especies de mayor interés en animales de compañía, *S. aureus* y *S. intermedius/pseudointermedius*, frente a 47,41% que fueron coagulasa negativas.

c) **Distribución de las especies de *S. aureus*, *S. pseudointermedius* y otros *Staphylococcus*.**

Del total de cepas de estafilococos que se aislaron, un 52,59% de cepas eran coagulasa positivo y un 47,41% fueron coagulasa negativo (GRÁFICO II): Entre las cepas que resultaron positivas a la prueba de la coagulasa, un 23,93% fueron identificadas como *S. aureus* y un 76,06% fueron *S. intermedius* o *S. pseudointermedius*. La diferenciación entre estos dos últimos, solo puede llevarse a cabo mediante técnicas de biología molecular, que en nuestro caso, no fueron factibles de realizar para todas ellas, razón por la que a partir de este momento hablaremos de *S. intermedius/ pseudointermedius* sin diferenciar entre ambos salvo en el punto 3 de los resultados donde se realiza el estudio genético de algunas de las cepas, en cuyo caso, si se pudo diferenciar.

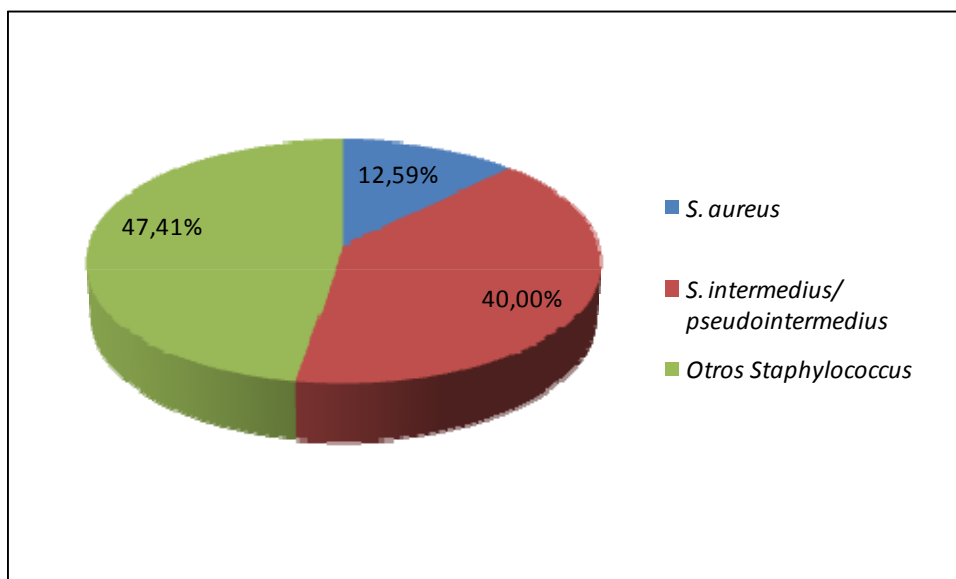


GRAFICO- II. Distribución de las proporciones (%) de las cepas de *Staphylococcus* spp. aislados en el estudio.

Las especies animales más representadas en el muestreo, fueron la especie canina y la equina. De los perros estudiados, se aislaron un 48,45% de *S. intermedius/ pseudointermedius*, un 6,18% de *S. aureus* y un 45,36% de otros estafilococos (GRÁFICO- III).

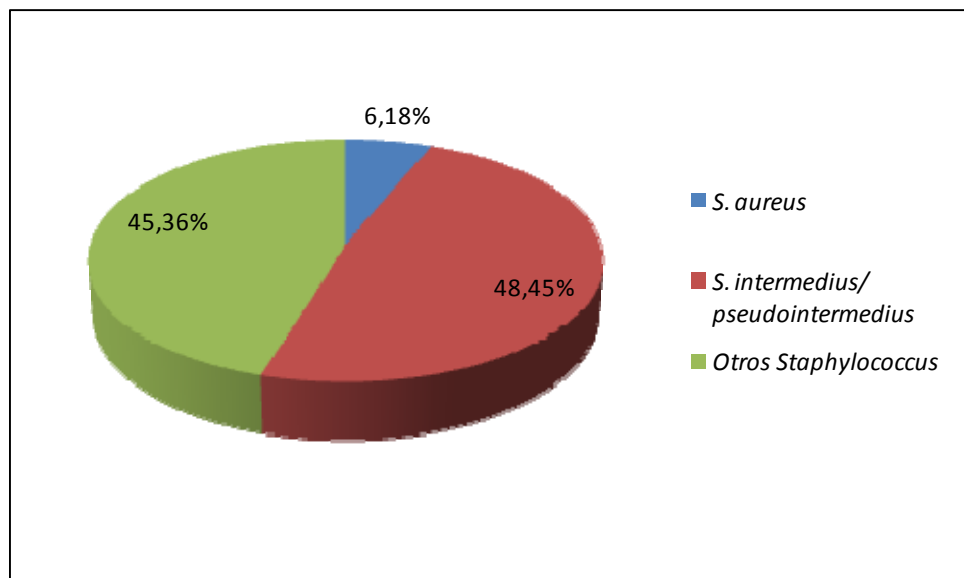


GRÁFICO- III. Distribución de las proporciones (%) de las diferentes especies de *Staphylococcus* spp. aisladas en perros.

En cuanto a los équidos muestreados, se aislaron un 10% de *S. intermedius/pseudointermedius*, un 35% de *S. aureus* y un 55% de otros estafilococos (GRÁFICO-IV).

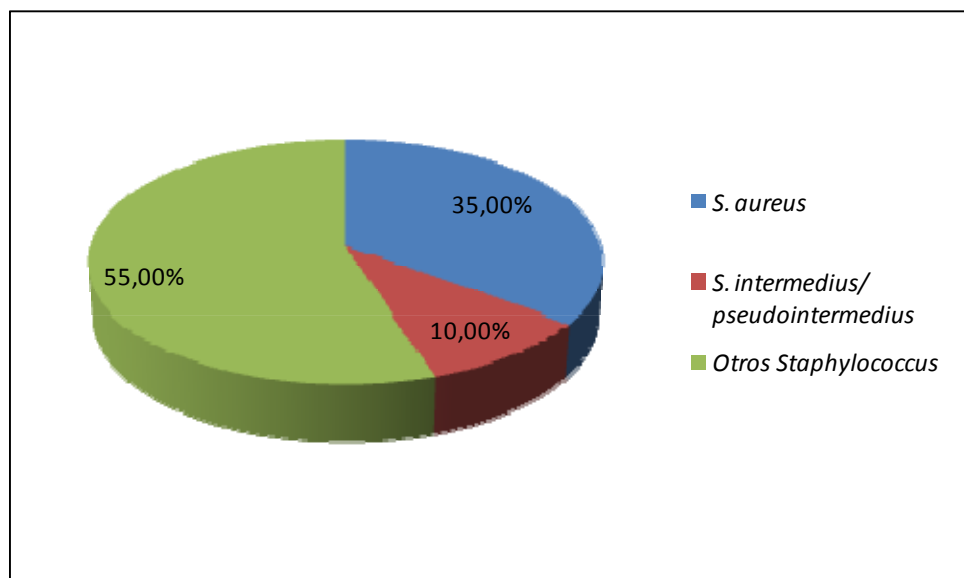


GRÁFICO- IV. Distribución de las proporciones (%) de las diferentes especies de *Staphylococcus* spp. aisladas en caballos.

Discusión:

El estudio, se ha centrado en el aislamiento de cepas procedentes de muestras, tomadas en animales de compañía (perros, gatos y caballos). La razón principal es el aumento del número de cepas de *S. aureus* aisladas en ellos con origen humano en los últimos años, y al papel que desempeñan estos animales, en la transmisión y difusión de las mismas, y consecuentemente de la resistencia a los antibióticos; ya que los animales de compañía, pueden ser colonizados por cepas humanas, a consecuencia de su estrecho contacto con ellos, actuando como portadores (EMEA, 2009).

Cuando hablamos de colonización por estas bacterias en personas, es mayor por *S. aureus* que por *S. intermedius/ pseudointermedius*, incluso en personas con un estrecho contacto con animales de compañía; si bien, la presencia de *S. intermedius/ pseudointermedius* en dueños de perros, es mayor que en la del resto de la población, siendo esta presencia, similar a la de sus animales (Scott Weese y Van Duikeren, 2009).

En cuanto a los resultados de los aislamientos obtenidos, se aislaron cepas coagulasas positivas en similar proporción que coagulasas negativas. Dentro de esas coagulasas positivas, existió un mayor porcentaje de cepas de *S. intermedius/ pseudointermedius*, hecho que puede ser debido, a una mayor representación de la especie canina en el estudio; ya que este microorganismo, es uno de los más comúnmente aislados, tanto en perros sanos como con algún tipo de patología a nivel tisular (Huerta *et al.*, 2010; Scott Weese y Van Duikeren, 2009; Rubin *et al.*, 2011; Onuma *et al.*, 2011). Además, existe evidencia, de que la colonización de *S. aureus* es transitoria en perros y gatos, quizás porque este, no es un comensal natural predominante en esas especies (Scott Weese y Van Duikeren, 2009). Por otro lado, cuando hablamos de la especie equina, existen grandes variaciones de distribución de las cepas aisladas con respecto al perro. El porcentaje de cepas aisladas de *S. aureus* es muy superior (es un microorganismo comensal en caballos) (Burton *et al.*, 2008), así como se observa un descenso de las cepas de *S. intermedius/ pseudointermedius* aisladas, puesto que este último microorganismo, o no está presente, o es muy raro en caballos (Scott Weese y Van Duikeren, 2009).

2. Patrones de resistencia y sensibilidad a los antibióticos:

Resultados:

a) Proporción de cepas positivas a la presencia de la proteína PBP2a:

Dentro de las cepas aisladas de las especies *S. aureus* y *S. intermedius/pseudointermedius*, interesaba especialmente conocer que cepas son resistentes a la meticilina, lo que se identifica con la resistencia general a los β -lactámicos, por ser estos los antibióticos de elección en los tratamientos de infecciones por estas bacterias en humanos. Esa resistencia al grupo de los β -lactámicos, viene determinada por la presencia de la proteína PBP2a (gold standard en este estudio). Un 43,75% de los aislados de *S. aureus* y un 38,18% de *S. intermedius/pseudointermedius*, resultaron positivos a esta prueba.

Una vez determinada la presencia de la proteína PBP2a, se analizaron los patrones de resistencia a diferentes antibióticos por dos procedimientos: test de difusión en disco de Kirby Bauer y determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

b) Características de resistencia y sensibilidad fenotípica a los antibióticos estudiados mediante el Test de Kirby Bauer (KB):

Los resultados obtenidos con el Test de KB, ponen de manifiesto que un 100% de las cepas aisladas de *S. aureus*, eran resistentes a la estreptomicina, pero especialmente destacaba que un 93,75% presentaban resistencia a ampicilina y un 87,50% a penicilina, ambos antibióticos importantes β -lactámicos. Las menores proporciones de cepas resistentes fueron observadas para las quinolonas: marbofloxacin y levofloxacin, ambas con un 12,5% de resistencia, y norfloxacin con un 18,75%. (TABLA-2)

Entre las cepas aisladas de *S. intermedius/pseudointermedius*, el 98,18% presentaban resistencia a la estreptomicina, un 89,09% a penicilina y un 87,27% a ampicilina, mientras que los menores porcentajes de resistencia fueron para meticilina (16,36%), oxacilina (14,55%), y cefoxitina (1,82%) (TABLA-2). Indicaremos también y de forma general, que para el resto de estafilococos aislados (coagulasa negativos), en su mayoría (91,23%) eran resistentes a estreptomicina; por el otro lado, sólo un 5,26% eran resistentes a amoxicilina, meticilina y oxacilina (TABLA-2).

TABLA-2. Distribución (valores absolutos y porcentajes) de las características de resistencia a los antibióticos de las distintas cepas aisladas mediante el test de Kirby-Bauer.

Antibióticos	Número de aislamientos (%)		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	Otros estafilococos
Meticilina	7 (43,75)	9 (16,36)	3 (5,26)
Oxacilina	6 (37,5)	8 (14,55)	11 (5,26)
Vancomicina	6 (37,5)	18 (32,73)	11 (19,3)
Ampicilina	15 (93,75)	48 (87,27)	27 (47,37)
Amoxicilina- Ac. Clavulánico	6 (37,5)	11 (20)	6 (10,53)
Penicilina	14 (87,5)	49 (89,09)	34 (59,65)
Eritromicina	8 (50)	45 (81,82)	35 (61,4)
Tetraciclina	8 (50)	41 (74,55)	27 (47,37)
Estreptomicina	16 (100)	54 (98,18)	52 (91,23)
Gentamicina	6 (37,5)	17 (30,91)	6 (10,53)
Sulfa- Trimetoprim	4 (25)	32 (58,18)	14 (24,56)
Ciprofloxacina	4 (25)	13 (23,64)	6 (10,53)
Clindamicina	4 (25)	35 (63,64)	24 (42,11)
Marbofloxacina	2 (12,5)	10 (18,18)	4 (7,02)
Levofloxacina	2 (12,5)	11 (20)	4 (7,02)
Norfloxacina	3 (18,75)	13 (23,64)	6 (10,53)
Cefoxitina	4 (25)	1 (1,82)	
Tobramicina	5 (31,25)	13 (23,64)	
Lincomicina	5 (31,25)	46 (83,64)	
Teicoplanin	4 (25)	26 (47,27)	
TOTAL	16	55	57

c) Características de resistencia y sensibilidad fenotípicas a los antibióticos estudiados mediante la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI_s):

El estudio de los patrones de resistencia a los antibióticos de interés en Salud Pública (β - lactámicos y vancomicina) mediante la determinación de las CMI_s (Método MICE), ha puesto de manifiesto que un 50% de los *S. aureus*, eran resistentes a penicilina, en contraste con el 0% de resistencia a vancomicina, distribución prácticamente similar a lo observado en *S. intermedius/pseudointermedius*. Si bien las proporciones de resistencia para oxacilina y amoxicilina son más bajas (TABLA- 3).

Por el contrario, hay que recalcar que en el caso de los *Staphylococcus* coagulasa negativos la resistencia a la vancomicina alcanzaba el 77,19%. (TABLA-3).

TABLA- 3. Distribución (valores absolutos y porcentajes) de las características de resistencia, de las distintas cepas de *Staphylococcus* spp aisladas, a los antibióticos de interés en Salud Pública a través de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI).

Antibióticos	Número de aislamientos (%)		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	Otros estafilococos
Amoxicilina	4 (25)	7 (12,73)	18 (31,58)
Oxacilina	4 (25)	1 (1,82)	3 (5,26)
Vancomicina	0 (0)	0 (0)	44 (77,19)
Penicilina	8 (50)	28 (50,9)	0 (0)
TOTAL	16	36	65

Discusión:

Los resultados observados en el estudio, ponen de manifiesto la creciente importancia de cepas de *S. aureus* y *S. intermedius/ pseudointermedius* con resistencia muy significativa a antibióticos, que son referencia en el tratamiento de enfermedades causadas por los mismos, tanto en medicina humana como en veterinaria. Puesto que, aunque en el caso de algunos antibióticos, el porcentaje de cepas resistentes es bajo, siempre existen cepas resistentes, para las especies de *Staphylococcus* analizadas. Esta multirresistencia, nos hace reflexionar sobre la necesidad de frenar este problema, ya que, de seguir así, las opciones terapéuticas frente a estos microorganismos, podrían verse gravemente disminuidas.

Es cierto que en este estudio los muestreos, se han llevado a cabo en su totalidad en animales; no obstante, ya hemos hablado de la importancia que tienen los animales de compañía, como transportadores de estos microorganismos en el ambiente (EMEA, 2009). Teniendo en cuenta las características epidemiológicas de estas bacterias, estos resultados, pueden ayudar a hacernos una idea de la magnitud del problema de la resistencia a antibióticos de estos microorganismos en la población humana, y por tanto, debemos considerar que su presencia en animales, constituye un punto crítico en la transmisión de estas cepas al hombre y por ende, un problema a corto plazo para la Salud Pública.

Al analizar las cepas aisladas, la misma proporción de cepas de *S. aureus* y de *S. intermedius/pseudointermedius* (alrededor de un 40% en ambos casos), resultaron positivas a la presencia del gen *mec-A* (test PBP2a), lo que se identifica con la presencia de resistencia (actual o potencial) a los β -lactámicos, y por extensión en la mayoría de los casos, resistentes a otros antibióticos (EMEA, EFSA y ECDC, 2009).

Desde el punto de vista de su diagnóstico, en medicina veterinaria la detección de resistencia a antibióticos se realiza, salvo situaciones muy excepcionales, mediante técnicas básicas como los test de KB o la determinación de CMI, en el mejor de los casos.

Mediante los test de difusión de KB, en lo que a *S. aureus* se refiere, el 100% de las cepas son resistentes a un aminoglucósido, la estreptomina, y presentan porcentajes muy altos de resistencia para β -lactámicos como ampicilina y penicilina. Los menores porcentajes de resistencia, fueron para las quinolonas; quizás se deba a que la utilización de estas, está considerado desde hace tiempo, como un factor de riesgo en la adquisición de MRSA, tanto en humanos como en perros, y su uso, está restringido a situaciones, en las que no existan otras alternativas terapéuticas (Rubin y Chirino, 2011). En *S. intermedius/pseudointermedius*, las cepas más resistentes son para los mismos antibióticos que para *S. aureus*, aunque es destacable, que los β -lactámicos meticilina y oxacilina, así como una cefalosporina (cefotaxima), presentan un menor número de cepas resistentes. Es curioso este bajo porcentaje a cefalosporinas, y en concreto a cefotaxima, ya que es el tratamiento de elección para las infecciones por *S. pseudointermedius* en perro, sobre todo en la pioderma canina (Kawakami *et al*, 2010), una de las principales patologías causadas por este microorganismo.

Las variaciones en cuanto a la meticilina (penicilina de referencia para el tratamiento de *S. aureus* en Salud Pública), van desde un 43,75% en el caso de *S. aureus*, a un 16,36% en *S. intermedius/pseudointermedius*, y prácticamente ocurre lo mismo en el caso de la oxacilina, que es otra de las penicilinas sintéticas de elección. Debido a la aparición de cepas resistentes a la meticilina, se empezó a utilizar la vancomicina como tratamiento alternativo frente a *S. aureus* en humanos. El hecho de que ya aparezcan cepas resistentes a vancomicina, es un punto a reflexionar.

Otros antibióticos que presentan grandes diferencias entre estas dos especies de *Staphylococcus*, son la lincomicina y la tetraciclina; ambos están representados por un alto porcentaje de cepas resistentes a ellos en *S. intermedius/pseudointermedius*; quizás la gravedad de los efectos secundarios producidos por las tetraciclinas limita su uso sobre todo a animales (Pantosti, 2012). Las diferencias en cuanto a la lincomicina entre estas dos especies de *Staphylococcus*, pueden ser debidas al menor uso de

este antibiótico en humanos, por la aparición de nuevas moléculas dentro de su misma familia, como la clindamicina, con un mayor espectro de actuación.

Estas diferencias en los patrones de resistencia y sensibilidad entre las especies de *Staphylococcus*, también podrían ser ocasionadas, entre otros factores, por los diferentes criterios de selección de antibióticos en el tratamiento de enfermedades a nivel veterinario y médico, y probablemente a un uso no racional de los mismos; aunque también podrían deberse a intercambios de información genética entre cepas humanas y animales, puesto que existen estudios en los que sí se ha demostrado, que cepas susceptibles a estos antibióticos, pueden ser convertidas en resistentes en el laboratorio, lo que revela su facilidad de adquirir resistencia (Jiménez y Correa, 2009).

No obstante, este es un estudio transversal, una radiografía de lo que está sucediendo en un momento determinado, y sería interesante conocer los patrones fenotípicos de resistencia a los antibióticos de ambos microorganismos, con el paso de los años en estos animales y en las personas, tanto de su entorno veterinario como sus dueños, para ver si dichas sensibilidades derivan en resistencias en el futuro. Así, se evidenciaría esa capacidad de los *Staphylococcus* de transferir información genética, incluida la de la resistencia a los antibióticos, conferida por el gen *mec-A*, que podría ser transferido desde los animales a otras cepas más patógenas para el hombre, hecho que se ha referenciado en numerosas ocasiones (Heymann, 2006).

Cuando se analizaron las CMIs para los antibióticos de mayor interés en Salud Pública, se encontraron diferencias importantes entre microorganismos coagulasa positivos y negativos. Si bien los coagulasa positivos, no presentaron cepas resistentes a vancomicina, los negativos sí; pero cuando hablamos del caso de las penicilinas, en los estafilococos coagulasa negativos, todas las cepas fueron sensibles a las penicilinas, mientras que en *S. aureus* y *S. intermedius/pseudointermedius*, aproximadamente un 50% de las cepas, fueron resistentes a ella.

Lo más curioso, es que salvo en el caso de la oxacilina en las cepas coagulasa negativas, los porcentajes de cepas resistentes no coinciden exactamente con los obtenidos en los test de difusión de KB. Los casos más llamativos son los de la vancomicina en *S. aureus* y *S. intermedius/pseudointermedius*, puesto que ya hemos dicho que mediante las CMI no existen cepas de ambos microorganismos resistentes a este antibiótico, mientras que el test KB, evidencia entre un 37,50 % y un 32, 73% respectivamente de cepas resistentes. Pero cuando hablamos del número de cepas resistentes a vancomicina en los coagulasa negativos, las CMI nos dan un porcentaje de 77,19%, mientras que el test de KB un 19,30%. Otra diferencia interesante, es el

caso de las penicilinas: mientras que las CMIs dicen que todas las cepas coagulasa negativas son susceptibles a ellas, el test de KB habla de un 59,65% de cepas resistentes; en los coagulasa positivos, existe una variación en porcentaje de aproximadamente un 40% más en ambas especies. Estos resultados, ponen de manifiesto, que los resultados de ambas pruebas (test de KB y CMIs), no coinciden.

Al citar las bases de la lucha frente a la resistencia a los antibióticos, se habló de la vigilancia de la resistencia a los antibióticos, como estrategia para prevenirlas (EASAC, 2007). Difícilmente se va a poder llevar a cabo una vigilancia fiable, si no se aúnan criterios para determinar los patrones de resistencia a los antibióticos.

3. Estudio genético de las cepas de *S. aureus* y *S. pseudointermedius* que presentaron patrones de resistencia específicos de interés para Salud Pública:

28 de las cepas aisladas, y que poseían características especiales de resistencia a nivel fenotípico, fueron estudiadas desde la perspectiva genética, mediante métodos moleculares (PCR). De estas cepas, 21 pertenecían a muestras de perro, 5 de caballo, una de gato y otra de conejo. Tras ser procesadas, 8 cepas fueron identificadas genéticamente como *S. aureus* y 20 como *S. pseudointermedius*. En ellas, se determinó la existencia del gen *mecA*, como base genética de la resistencia a los β -lactámicos.

Estos resultados, llevaron a clasificar las cepas de *S. aureus* como resistentes a meticilina (MRSA), o sensibles a meticilina (MSSA), y a las cepas de *S. pseudointermedius* como resistentes a meticilina (MRSP), o sensibles a esta (MSSP).

Resultados:

a) *S. aureus* resistentes a meticilina: sus patrones de resistencia fenotípicos y origen de las muestras:

Es interesante remarcar, que el estudio genético determinó que 7 de las 8 cepas de *S. aureus* muestreadas eran MRSA con identificación del gen *mecA*. De esas muestras, 5 procedían de caballo y 2 de perro; sólo uno de los muestreos, realizado en un conejo, resultó MSSA. En cuanto al origen de los aislamientos, los aislamientos de caballos ser obtuvieron de heridas (3), de una infección de un ganglio linfático (papera) y de saliva perteneciente a una glándula salivar. Los muestreos en

perro se realizaron en heridas post- quirúrgicas, mientras que la única muestra del conejo pertenecía a una neumonía (TABLA- 4).

Los patrones de resistencia fenotípica para cada una de esas 8 cepas de *S. aureus*, en relación con su caracterización como MRSA o MSSA y el origen de las muestras, se observan en la TABLA- 4:

TABLA-4. Patrones de resistencia fenotípica de las cepas de *S. aureus* con su carácter MRSA o MSSA, orígenes *

nº Muestras	Animal	Caracterización fenotípica de la resistencia	Origen de la muestra
MRSA	1 Caballo	PEN-GEN-STR-SXT-TET-TOB	Glándula salivar
	1 Caballo	PEN-ERY-GEN-CIP-STR-SXT-TET-TOB	Herida
	1 Caballo	PEN-GEN-CIP-NOR-STR-SXT-TET-TOB	Herida
	1 Caballo	PEN-ERY-LYN-GEN-STR-SXT-TET-TOB	Herida
	1 Caballo	PEN-LYN-STR-TET-TOB	Gánglio linfático (papera)
	2 Perro	PEN-ERY-CLI-LYN-GEN-CIP-LEV-NOR-STR-TET	Fístula post- quirúrgica
MSSA	1 Conejo	ERY-STR	Neumonía

*PEN: Penicilina; GEN: Gentamicina; STR: Estreptomicina; SxT: sulfametoxazol-trimetoprim; TET: Tetraciclina; TOB: Tobramicina; ERY: Eritromicina; CIP: Ciprofloxacina; NOR: Norfloxacina; LYN: Lincomicina; LEV: Levofloxacina.

b) *S. pseudointermedius* resistentes a meticilina: sus patrones de resistencia fenotípicos y origen de las muestras:

El genotipo meticilina resistentes, determinado mediante la detección del gen *mecA*, estaba presente en 7 de los 20 *S. pseudointermedius* aislados; todas las muestras se detectaron en perros, salvo una de las cepas MRSP, cuyo origen era felino. Los muestreos fueron realizados en infecciones de orina a través de cistocentesis (6), infecciones genitales (5), otitis (4), faringe de perros sanos (2), herida (1), osteomielitis (1) y un exudado seromatoso (1) (TABLA- 5).

La caracterización de los patrones fenotípicos asociados a su identificación de MRSP o MSSP, así como la localización de su muestreo, puede observarse en la TABLA- 5.

TABLA-5. Patrones de resistencia fenotípica de las cepas de *S. pseudointermedius*, con su carácter MRSP o MSSP, orígenes *

nº Muestras	Animal	Caracterización fenotípica de la resistencia	Origen de la muestra
MRSP	2 Gato	PEN-ERY-CLI-LYN-GEN-CIP-LEV-NOR-STR-SXT-TET	Cistitis (cistocentesis)
	Perro		Infección genital
	4 Perro	PEN-ERY-CLI-LYN-GEN-CIP-LEV-NOR-STR-SXT-TET-TOB	Infección genital
			Osteomileitis (músculo)
			Seroma (exudado)
			Herida
	1 Perro	PEN-ERY-CLI-LYN-STR-SXT-TET	Cistitis (cistocentesis)
MSSP	1 Perro	PEN-ERY-CLI-LYN-GEN-STR-SXT-TET-TOB	Otitis
	2 Perro	PEN-ERY-CLI-LYN-STR-SXT-TET	Infección genital
			Otitis
	1 Perro	PEN-STR	Cistitis (cistocentesis)
	1 Perro	PEN-STR-TET	Infección genital
	1 Perro	PEN-LYN-STR-TET	Infección genital
	1 Perro	PEN- ERY- CLI- GEN- CIP- LEV- MRB- NOR- STR- TET	Cistitis (cistocentesis)
	1 Perro	PEN- ERY- STR	Otitis
	1 Perro	PEN- LYN- STR- SXT- TET	Perro sano (faringe)
	1 Perro	PEN- ERY- LYN- GEN- STR	Cistitis (cistocentesis)
	1 Perro	PEN- ERY- CLI- LYN- STR- TET	Otitis
	1 Perro	STR- ERY- LYN	Perro sano (faringe)
	1 Perro	PEN- ERY- LYN- STR- TET- TOB	Cistitis (cistocentesis)

*PEN: Penicilina; ERY: Eritromicina; LYN: Lincomicina; GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacina; LEV: Levofloxacina; NOR: Norfloxacina; STR: Estreptomicina; SxT: sulfametoxazol-trimetoprim; TET: Tetraciclina; TOB: Tobramicina; MRB: Marbofloxacina.

Discusión:

La definición de MRSA, como ya hemos citado en el trabajo, es la de aquel microorganismo, caracterizado por ser sensible además de a meticilina y a los β -lactámicos, ser sensible a casi todas las otras familias de antibióticos y poseer características moleculares especiales, como la portación de un elemento genético móvil, denominado *casette* cromosómico del estafilococo (*SCmec*), que contiene el gen *mec-A* (Sung *et al*, 2008). La tipificación de MRSA por métodos moleculares (PCR), tiene como objetivo el evitar las limitaciones discriminatorias de los métodos fenotípicos (Jiménez y Correa, 2009).

La mayor parte de las cepas genotipadas, pertenecían a muestras de perro y de caballo, como ocurre con el resto del estudio. Llama la atención, que la mayoría de las cepas de MRSA, procedían de caballos, a la vez que todas las cepas de MRSP salvo una perteneciente a un gato, procedían de perros. Hay que decir, que el mayor número de cepas de *S. pseudointermedius* con patrones de resistencia de interés, puede deberse, al hecho del mayor muestreo llevado a cabo en la especie canina, puesto que como ya hemos citado previamente, este microorganismo es de los más

comúnmente aislados en perro, lo mismo que sucede con *S. aureus* en caballos (Huerta *et al.*, 2010; Rubin *et al.*, 2011; Scott Weese y Van Duijkeren, 2009).

Como ocurre en otros estudios, todas las cepas, independientemente de que posean el gen *mec-A* o no, presentan algún tipo de resistencia a antibióticos (Sung *et al.*, 2008).

En el caso de *S. aureus*, 3 de las cepas aisladas en caballo, tenían su origen en heridas de la piel, uno de los factores de riesgo para presentar MRSA (Walther *et al.*, 2009). Además, el carácter sociable de esta especie, facilita el contacto con otros caballos (fosas nasales) y con las personas, habiendo estudios que demuestran la transmisión de MRSA entre caballos y su comportamiento zoonótico (Scott Weese y Lefebvre, 2007). Por otro lado, no hay que olvidar el papel del medio en la transmisión de este agente, ya que comederos y bebederos, también pueden tener importancia, en la diseminación de este microorganismo, así como el material utilizado para montar o transportarlos (Scott Weese y Lefebvre, 2007).

Es destacable, que las dos muestras MRSA caninas, habían sido tomadas en una fístula post-quirúrgica; esta especie se considera mera transportadora de este microorganismo, y hay que decir que uno de los factores de riesgo asociados a la persistencia de MRSA y a la consecuente aparición de infección, es que el animal haya estado tanto ingresado, como sometido a procedimientos invasivos, como puede ser una cirugía (Catry *et al.*, 2010). Esas dos muestras MRSA, también presentaban el mismo patrón fenotípico de resistencia por lo que podríamos pensar que la cepa pudiese tener un origen nosocomial. La única cepa MSSA, fue una muestra de neumonía en el único conejo muestreado, que además presenta resistencia a antibióticos de otras familias, como son la eritromicina y la estreptomicina; actualmente ya existen estudios que advierten de la aparición de estos estafilococos resistentes en conejos de compañía (Rubin *et al.*, 2011; Walther *et al.*, 2007), incluso en loros, tortugas o murciélagos (Walther *et al.*, 2007), lo que podría incentivar nuevas vías de estudio sobre la actuación de estos patógenos en animales exóticos.

S. pseudointermedius, forma parte de la flora normal de los perros y de los gatos (Kawakami *et al.*, 2010; Perreten *et al.*, 2010), y es un importante patógeno oportunista (Windahl *et al.*, 2012). Su presencia es rara en personas, pero ya se ha demostrado su potencial carácter zoonótico: el primer caso en humanos apareció en Bélgica, en un hombre de 60 años que se había sometido a una intervención cardiaca (Van Hoovels *et al.*, 2006); en este caso no había habido un contacto previo con animales, pero en posteriores aislamientos se detectó la infección de personas como consecuencia de la exposición a perros (Chuang *et al.*, 2010).

Como en nuestro estudio, los aislamientos más habituales tienen que ver con infecciones, lo que coincide con que este microorganismo sea la causa más frecuente de piodermas caninas y está asociado a heridas en perro y en gato (Perreten *et al.*, 2010; Schissler *et al.*, 2009), infecciones del tracto urinario, otitis externa en perros (Kadlec *et al.*, 2010, 2011; Windahl *et al.*, 2012) y procesos post- quirúrgicos en perro y gato (Perreten *et al.*, 2010). Todas las muestras de *S. pseudointermedius*, fueron resistentes a penicilina, salvo en el caso de una muestra de perro sano en faringe. Es llamativo, el carácter multirresistente de las cepas MSSP, sobre todo una muestra de perro procedente de orina que fue obtenida por un procedimiento invasivo: la cistocentesis, hecho que también ocurre, en la única muestra de gato MRSP.

Las cepas más multirresistentes de *S. pseudointermedius*, han estado relacionadas con algún tipo de procedimiento invasivo en el hospital veterinario. Por otro lado, se conoce el papel que desempeñan los animales como transportadores de estos microorganismos, tanto entre animales como entre personas, así como el papel que juega el entorno veterinario (Catry *et al.*, 2010; EASAC, 2007). Si un animal, es capaz de infectarse a nivel hospitalario, tanto con *S. aureus*, como con *S. intermedius/pseudointermedius*, las personas que trabajan en ese hospital también pueden infectarse y actuar como portadores de ese microorganismo, siendo capaces de diseminar al patógeno y de infectar a otros animales susceptibles. Estos resultados, vuelven a poner de manifiesto el carácter nosocomial de estas bacterias y la importancia del entorno veterinario en la transmisión de las cepas y de sus resistencias, como ya se ha hecho en otros estudios (Perreten *et al.*, 2010; Rubin *et al.*, 2011).

4. Estudio de la fiabilidad y la concordancia entre los métodos de selección de resistencia utilizados en el laboratorio:

Resultados:

Uno de los problemas que se observó en el estudio, fue que los resultados entre los test aplicados, especialmente entre la prueba de KB, y la determinación de las CMI, presentaban discrepancias importantes en algunos casos. Por este motivo, se decidió evaluar hasta qué punto, los resultados de estas pruebas fenotípicas, que se utilizan de forma rutinaria, eran fiables. La TABLA-6, presenta los resultados

obtenidos por las dos pruebas del estudio fenotípico, para las cepas de *S. aureus* y *S. intermedius/pseudointermedius* aisladas:

TABLA- 6. Porcentaje de cepas resistentes para los principales antibióticos testados, y según cada una de las pruebas utilizadas.

PRUEBA	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>
PBP2a	43.8	38.2
KB Amoxi.	37.5	21.8
KB Metic.	43.8	18.2
KB Cefox.	25	1.8
KB Oxac.	43.8	16.3
KB Penic.	87.7	89.1
KB Vanco.	37.5	32.7
MICE Amoxi.	43.8	12.7
MICE Oxac.	31.1	3.6
MICE Penic.	50	54.5
MICE Vanco.	6.2	1.8

Cuando se realizó la comparación entre los diferentes métodos de detección de resistencia para los diferentes antibióticos de interés, se observó que, en general, la concordancia entre las pruebas, es mayor en el caso de *S. aureus* que en *S. intermedius/pseudointermedius*.

TABLA-7. Concordancia (GRADO DE ACUERDO) entre pruebas (valor de Kappa y su Intervalo de confianza).

Pruebas comparadas	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>
PBP2a-KB Metic.	1 (0.48-1.00)	0.31 (0.08-0.53)
PBP2a-KB Oxac.	0.49 (.,00-.,90)	0.13 (0.00-.,36)
PBP2a-KB Cefox.	0.60 (0.12-1.00)	NEGATIVO
PBP2a-KB Amoxi.	0.61 (0.13-1.00)	0.03 (0.00-0.28)
PBP2a-KB Penic.	0.21 (0.00-0.49)	0.14 (0.00-0.28)
PBP2a-MICE Amoxi.	0.49 (0.02-0.98)	NEGATIVO
PBP2a-MICE Oxac.	0.74 (0.26-1.00)	0.02 (0.00-0.14)
PBP2a-MICE Penic.	NEGATIVO	0.11 (0.00-0.36)
MICE Amoxi.-KB Amoxi.	0.61(0.13-1.00)	0.51 (0.26-0.77)
MICE Oxac.-KB Oxac.	0.59 (0.10-1.00)	0.32 (0.13-0.52)
MICE penic.-KB Penic.	0.25 (0.00-0.57)	0.16 (0.00-0.34)
MICE Vanco_KB Vanco.	NEGATIVO	NEGATIVO
KB oxac-KB Cefox.	0.33 (0.10-0.78)	NEGATIVO
MICE Oxac.-KB Cefox.	0.53 (0.05-1.00)	NEGATIVO

Mediante la determinación de Kappa, se ha observado que, la única situación que ha presentado el valor máximo de concordancia ($Kappa=1$), es la que resulta de comparar el test PBP2a con el test KB para la meticilina en *S. aureus* (TABLA- 6). En todos los demás casos, se observa que los niveles de concordancia disminuyen mucho, tanto para el test KB como para las CMI (TABLA-7).

Como referencia para el uso de la PBP2a como gold standard en el estudio, debemos indicar que, además de los datos de otros autores que así lo indicaban en estudios previos (Hussain *et al*, 2002; Louie *et al*, 2001; Wilkerson *et al*, 1997), en un trabajo realizado paralelamente a este y del que no se presentan aquí los resultados (Ortega *et al*, 2011), se testaron 28 cepas de las aisladas y aquí estudiadas mediante PCR para detectar la presencia del gen *mec- A*, observándose máxima concordancia para *S. aureus* y muy alta para *S. intermedius/pseudointermedius*.

También se observa un nivel de concordancia elevado ($Kappa=0.61$) entre el test KB para la Amoxicilina y la CMI para la Amoxicilina. En cambio, también en el caso de *S. aureus*, se ha observado una total discrepancia entre el test KB para la Vancomicina y la CMI para la misma Vancomicina, hecho que posiblemente esté ligado a la interpretación de las pruebas (antibiótico para el que existen diferentes criterios a la hora de establecer el punto de corte entre resistencia y sensibilidad), más que a su capacidad de detectar la resistencia, lo que ha generado un número mínimo de cepas resistentes a este antibiótico.

Además de este desacuerdo entre pruebas, es muy significativa la falta total de concordancia ($Kappa <0$) entre la PBP2a y la CMI para la Penicilina, en *S. aureus*. Para el resto de situaciones estudiadas para las cepas de este microorganismo, el grado de acuerdo entre las pruebas es medio con valores que oscilan entre 0.29 y 0.58 (TABLA-7).

Entre las cepas de *S. intermedius/pseudointermedius*, la situación es muy diferente; en todos los casos, la concordancia observada es baja o como mucho media, con un valor de Kappa más elevado para el test KB y la CMI en la Amoxicilina (TABLA-7), observándose un desacuerdo absolutos ($Kappa<0$) en el caso de antibióticos de referencia como la Oxacilina o la Vancomicina.

Atendiendo a esa falta de concordancia en algunos casos, se ha tratado de definir la fiabilidad (mediante la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo) del test KB para la Meticilina, la Oxacilina y la Cefoxitina y la CMI para la Oxacilina como pruebas más frecuentemente utilizadas en el laboratorio para definir la resistencia a los β -lactámicos, contrastándolas con la PBP2a como gold standard. Los resultados obtenidos pueden observarse en las tablas 8 y 9.

TABLA-8. Parámetros de fiabilidad de las pruebas utilizadas en el estudio para antibióticos de referencia en Salud Pública en el caso de *S. aureus*.

Prueba evaluada	S	E	VP+	VP-	J-Youden
KB Metic.	100	100	100	100	1
KB Oxac.	71.4 (37.9-100)	77.8 (50.6-100)	71.4 (37.9-100)	77.8 (50.6-100)	0.49 (0.06-0.92)
KB Cefox.	57.1 (20.5-93.8)	100	100	70 (41.6-98.4)	0.57 (0.20-0.94)
MICE Oxac.	71.4 (38.0-100)	100	100	78 (50.6-100)	0.71 (0.38-1)

(*S. aureus*)

TABLA-9. Parámetros de fiabilidad de las pruebas utilizadas en el estudio para antibióticos de referencia en Salud Pública, en el caso de *S. intermedius/pseudointermedius*.

Prueba evaluada	S	E	VP+	VP-	J-Youden
KB Metic.	33.3 (13.2-53.5)	94.1 (86.2-100)	77.8 (50.6-100)	69.5 (56.3-82.9)	0.27 (0.05-0.49)
KB Oxac.	23.8 (5.6-42.0)	88.2 (77.4-99.1)	55.6 (23.1-88.0)	65.2 (51.4-79.0)	0.12 (0.00-0.33)
KB Cefox.	0	97.2 (91.8-100)	0	61.1 (48.1-74.1)	NEGATIVO
MICE Oxac.	4.8 (0-13.9)	97.2 (91.8-100)	50 (21.0-100)	62.3 (49.2-75.3)	0.02 (0.0-0.13)

(*S. pseudointermedius*)

En *S. aureus*, se observa que el test KB para la Meticilina ha presentado una sensibilidad y especificidad del 100%, hecho ratificado por que en todas las cepas estudiadas por esta prueba y la PBP2a ha existido coincidencia en sus diagnósticos (TABLA-8).

En las otras tres situaciones estudiadas, el test KB para Oxacilina y Cefoxitina y la CMI para la Oxacilina, se observa que la especificidad de las pruebas se mantiene muy elevada, entre el 77.8% para el test KB en el caso de la Oxacilina y el 100% para el resto; pero su sensibilidad disminuye variando entre un 57.1% y un 71.4%, lo que sugiere que estas pruebas evitan la existencia de falsos positivos, pero que, salvo el test KB para la Meticilina, introducen falsos negativos, es decir, habría resultados negativos en las pruebas habituales que por el contrario presentarían reacción positiva a la PBP2a, cepas que por tanto presentarían el gen *mec-A* de resistencia a los β -lactámicos (TABLA-8).

Los valores predictivos positivo y negativo confirman aquellas interpretaciones en el caso de *S. aureus*, y así, un valor predictivo positivo del 100%, indica que, una cepa diagnosticada como positiva por la prueba será realmente una cepa positiva a la PBP2a, pero por el contrario, los valores predictivos negativos más bajos indican que los individuos considerados negativos por la prueba habitual pueden ser positivos en la PBP2a, es decir, falsos negativos (TABLA-8).

La fiabilidad global de las pruebas habituales, valorada respecto a la PBP2a y determinada por la J de Youden, es muy alta para el test KB con Meticilina (1) y alta (valores entre 0.49 y 0.71) en el caso del resto.

En el de *S. intermedius/pseudointermedius*, se observa que los valores de sensibilidad y especificidad de las pruebas habituales en laboratorio son inferiores a lo observado para *S. aureus* (TABLA-9).

La sensibilidad de las pruebas se ha reducido hasta un 33.3% en el mejor de los casos y la especificidad, si bien presenta valores elevados, también es inferior, entre un 88.2 y un 94.1%, lo que indica que, en estas cepas pueden presentarse algunos falsos positivos y un número muy elevado de falsos negativos, algo que confirman claramente los resultados obtenidos para los valores predictivos positivo y negativo (TABLA-9)

Se puede concluir, por tanto, que en el caso de *S. intermedius/pseudointermedius* la fiabilidad de las pruebas habituales de laboratorio es baja, valores de la J de Youden inferiores a 0.27 en el mejor de los casos, luego, la probabilidad de error cuando se utilizan aquellas pruebas para diagnosticar cepas resistentes o sensibles a los β -lactámicos, es elevada (TABLA-9).

Discusión:

Los resultados obtenidos, plantean la necesidad de considerar, hasta qué punto las pruebas utilizadas habitualmente para la detección de la resistencia a β -lactámicos y vancomicina en *S. aureus* y *S. intermedius/pseudointermedius*, requieren ser interpretadas atendiendo, no sólo a los resultados del laboratorio, sino también a las características de sensibilidad y especificidad de las propias pruebas.

A pesar de que algunos organismos, han tratado de definir protocolos y métodos de interpretación de las pruebas de laboratorio específicos, estos muchas veces no coinciden con los propuestos por otros grupos distintos (ej: interpretación de el test de KB para algunos antibióticos entre la CLSI y ERASS), lo que induce a algunos errores y a la dificultad de comparar datos y por tanto, a utilizarlos como modelos en estudios de riesgo. Por ello, se viene reclamando la necesidad de estandarizar de forma universal esos protocolos y de ese modo poder utilizar y contrastar la situación existente (EASAC, 2008; ECDC, 2010).

Desde ya hace tiempo, las pruebas para detección del gen *mec- A* mediante técnicas de biología molecular como la PCR se han definido en algunos estudios como la herramienta perfecta para detectar esas resistencias (actuales o potenciales) (Jona *et al*, 2002), ya que es rápida y dotada de una gran sensibilidad y especificidad (Jiménez y Correa, 2009). Sin embargo, su coste las hace poco viables en la clínica habitual, razón por la que se han buscado otras alternativas.

Una de las alternativas propuestas, y utilizadas en nuestro estudio, es la detección del gen *mec- A*, mediante el test de aglutinación en látex de la proteína PBP2a. Esta prueba presenta una mejor fiabilidad, puesto que mejora la sensibilidad de las detecciones, disminuyendo el número de falsos negativos, algo fundamental cuando se trata de evaluar situaciones de riesgo de transmisión de esas resistencias (Wilkerson *et al*, 1997; Luie *et al.*, 2001).

Una segunda alternativa planteada por algunos autores para *S. aureus*, es el uso de medios de cultivo específicos para crecimiento de cepas de resistentes a meticilina (MRSA). No obstante, estos medios también tienen problemas de sensibilidad y por tanto de la existencia de falsos negativos (Pape *et al*, 2006).

Los resultados de nuestro estudio, evidencian importantes diferencias en cuanto a la fiabilidad de las pruebas utilizadas entre *S. aureus* y *S. intermedius/pseudointermedius*.

Al valorar la concordancia entre pruebas, salvo en el caso del test de KB para la Meticilina en *S. aureus*, hay una significativa falta de concordancia de las pruebas con la PBP2a, prueba utilizada como referencia, y de las otras pruebas entre sí. En el caso de los *S. intermedius/ pseudointermedius*, esas concordancias son mínimas e incluso inexistentes.

Hay que destacar además, que en el caso de *S. aureus*, tanto Kappa como el resto de parámetros determinados, poseen una amplia dispersión de valores (rango), lo que se debe a que el número de cepas que finalmente se aislaron de esta especie no fue elevado, algo que no ocurre para *S. intermedius/ pseudointermedius*.

Cuando se analizaron los parámetros de fiabilidad, se observó que, si bien los test de KB y las CMI's presentan una buena especificidad (respecto a la PBP2a), máxima en el caso de *S. aureus*, se produce una importante falta de sensibilidad, hecho que determina la existencia de "falsos negativos".

La PBP2a determina en última instancia la presencia del gen *mec- A*, lo que no significa necesariamente, que esa cepa deba ser resistente en ese momento a los β -lactámicos. También es cierto que la presencia de ese gen, debe ser considerado como un elemento de riesgo, para el desarrollo de resistencia a corto plazo. Por ello, consideramos estas dos pruebas habituales de laboratorio (KB y CMIs), como de “escasa” fiabilidad para determinar la existencia de cepas con resistencia, siendo su resultado solo un indicador de una situación puntual en ese momento, algo otorgado por otros estudios que llegan a poner en duda su utilidad para determinar la existencia de resistencia a β -lactámicos en cepas de estafilococos (Rahbar, 2005).

De una u otra manera, es evidente que ante la creciente importancia de las cepas de estafilococos con resistencia a β -lactámicos entre los animales, es necesario realizar programas de vigilancia más fiables y para ello, las técnicas clásicas de laboratorio para determinación de resistencia a antibióticos no son suficientes por su falta de sensibilidad, por lo que sería conveniente introducir métodos como la PBP2a como pruebas de rutina, que evidencien la presencia del gen *mec- A* responsable del desarrollo de esa resistencia a los β -lactámicos, claves en el tratamiento de las estafilococias en medicina veterinaria y sobre todo en medicina humana.

CONCLUSIONES:

La prevalencia de cepas de *S. intermedius/ pseudointermedius* es muy elevada en perros, mientras que en caballos, es *S. aureus* el que presenta la prevalencia más alta. Estos microorganismos, pueden formar parte de la flora habitual de personas y/ o animales de compañía, por lo que ambos son susceptibles de ser reservorios de estos patógenos. De ahí que sea necesario profundizar sobre el papel de los animales en la transmisión de esta bacteria, ya que la colonización de estos, está considerada como un factor de riesgo para la difusión de estas bacterias, tanto en humanos como en animales.

Aunque las cepas de *S. aureus* aisladas, han presentado menor proporción de resistencia con respecto a los obtenidos en *S. intermedius/ pseudointermedius*, se ha observado resistencia en mayor o en menor medida, a todos los antibióticos analizados en nuestro trabajo, lo cual sugiere una importante probabilidad de fallos en la eficacia de los tratamientos de las infecciones causadas por estos patógenos en veterinaria. Este hecho, lleva implícitas una serie de consecuencias: la primera de ellas y más importante, es que el contacto directo entre personas y animales, puede permitir el intercambio de cepas bacterianas, o de información genética entre ellas, incluida la de la resistencia a antibióticos.

Un alto porcentaje de cepas, resultaron positivas a la presencia del gen *mec-A* indicativo de resistencia a los β - lactámicos, siendo ese porcentaje similar en *S. aureus* y en *S. intermedius/pseudointermedius*. Las cepas de *S. intermedius/ pseudointermedius* analizadas por PCR, fueron en su mayoría sensibles a meticilina, mientras que las cepas de *S. aureus* aisladas, prácticamente todas fueron resistentes, MRSA. Esta presencia de cepas MRSA, puede acompañarse de la adaptación de esos microorganismos a nuevos comensales, lo que podría originar nuevas enfermedades en un futuro. El principal patógeno en humanos es el *S. aureus*, pero ya se ha observado la presencia de *S. pseudointermedius* a nivel comunitario, independientemente del contacto más o menos directo con animales. A este nivel, los veterinarios, los cuidadores, y los propios dueños, son grupos de riesgo importantes, ya que pueden ser colonizados.

Con esta perspectiva, sería interesante estudiar el papel de los fómites en el intercambio y transmisión de esas cepas bacterianas y de su resistencia a antibióticos, puesto que se ha demostrado en algunos casos, la existencia de contaminación a nivel ambiental por parte de *Staphylococcus* spp.

Desde el punto de vista diagnóstico, el estudio pone de manifiesto una baja fiabilidad y grado de concordancia, de la que gozan los diferentes métodos de detección de resistencia para los antibióticos de interés analizados, sobre todo en el caso de *S. intermedius/pseudointermedius*. Este hecho puede repercutir directamente en los tratamientos, y en la valoración de las prevalencias de estas cepas con resistencia por los Sistemas de Vigilancia. Por ello se hace necesaria una estandarización de los métodos de diagnósticos y de los protocolos de interpretación de resistencias en dichas pruebas.

BIBLIOGRAFÍA:

- Adhikari RP, Karauzum H, Sarwar J, Abaandou L, Mahmoudieh M, Boroun AR et al. Novel structurally designed vaccine for *S. aureus* α - Hemolysin: Protection against bacteraemia and pneumonia. PlosOne, 2012; 7(6): e38567
- Bagcigil FA, Moodley A, Baptiste KE, Jensen VF, Guardabassi L. Occurrence, species, distribution, antibiotic resistance and clonality of methicillin- resistant *Staphylococci* in the nasal cavity of domestic animals. Vet Microbiol, 2007; 121, 3-4: 307- 315.
- Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudointermedius*. J Clin Microbiol. 2009; 47(2): 469- 471.
- Bauer, A. W., W. M. M., Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 1966; 45:493-496.
- Burton S, Reid- Smith R, McClure JT, Scott Weese J. *Staphylococcus aureus* colonization horses in Atlantic Canada. Can Vet, 2008; 49: 797-799.
- Bustos- Martínez JA, Hamdan- Partida A, Gutiérrez- Cárdenas M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomed. 2006; 17: 287: 305.
- Catry B, Van Duijken E, Pomba MC, Greko C, Moreno MA, Pyörälä S et al. Review Article: Reflection paper on MRSA in Food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. Epidemiol. Infect. 2010; 138: 626- 644.
- Chuang CY, Yang YL, Sueh PR, Lee PI. Catheter- related bacteremia caused by *S. pseudointermedius* refractory to antibiotic- lock therapy in a hemophilic child with dog exposure. J Clin Microbiol. 2012; 48(4): 1497- 1498.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement. Document M100-S21. Vol.31. No.1.
- Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo y al Consejo. Plan de acción contra la amenaza creciente de las resistencias bacterianas. Bruselas, 2011.
- Codex Alimentarius. Código de prácticas sobre buena alimentación animal. CAC/RCP 54-2004
- De Martino L, Lucido M, Mallardo K, Facello B, Mallardo M, Iovane G, et al. Methicillin- resistant *Staphylococci* isolated from healthy horses and horse personnel in Italy. J Vet Diagn Invest, 2010; 22:77.
- Duquette RA, Nuttall TJ. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? J Small Anim Pract. 2004 Dec;45(12):591-7.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority (EFSA), European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections (EMA). Joint scientific report of ECDC, EFSA and EMA on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in livestock, companion animals and food. June 2009.
- European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspections (EMA). Reflection paper on MRSA in food producing and companion animals in the European Union: Epidemiology and control options for human and animal health. London, March 2009.
- European Academies Science Advisory Council (EASAC). "Tackling antibacterial resistance in Europe". London, 2007.

- European Academies Science Advisory Council (EASAC). "Impact of migration on infectious diseases in Europe". London, 2007.
- European Academies Science Advisory Council (EASAC). "Healthcare-associated infections: the view from EASAC". Berlin, 2008.
- European Food Safety Agency (EFSA) 2009. Joint scientific report of ECDC; EFSA and EMEA on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in livestock, companion animals and food. EFSA-Q-2009-00612 (EFSA scientific report 2009301: 1-10 and EMEA/CVMP/SAGAM/ 62464/2009)
- European Medicines Agency (EMA). 2009. Reflection paper on MRSA in food producing and companion animals in the European Union: epidemiology and control options for human and animal health. EMEA/CVMP/SAGAM/68209: 1-29.
- European Centre for disease prevention and control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2010
- European Centre for disease prevention and control (ECDC), European Medicines Agency (EMA). Technical Report: The bacterial challenge: time to react . EMA doc. ref. EMA/576176/2009. Stockholm, September 2009
- Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. Farmacología humana. 3ª Edición. Barcelona: Masson. 1999.
- Food Agricultural Organization (FAO). 2008. Una contribución a "One World, One Health"; Un marco estratégico para reducir los riesgos de enfermedades infecciosas en la interfaz entre animales, humanos y ecosistemas. Doc de consulta FAO-OIE-WHO- UNICEF-BANCO MUNDIAL. Octubre de 2008.
- Franklin, A; Acar, J; Anthony, F; Gupta, R; Nicholls, T; Tamura, Y et al. Antimicrobial resistance: harmonisation of national antimicrobial resistance monitoring and surveillance programmes in animals and in animal-derived food. In: OIE International Standards on Antimicrobial Resistance, 2003; pp 81-200.
- Fries, R. Conclusions and activities of previous expert groups: The scientific steering Committee of the EU. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2004; 51(8-9):403-7.
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria (ELIKA). ¿Qué es la resistencia antimicrobiana? [Internet]. 2012. [Consulta el 10 de Agosto de 2012]. Disponible en: http://www.elika.net/consumidor/es/preguntas_resistencia_antimicrobiana.asp
- Gil M. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. Rev Chil Infect. 2000; 17(2): 145-152
- Gimeno O, Ortega C. Antibioterapia y Salud Pública veterinaria; desarrollo de microorganismos resistentes, mecanismos de resistencia, y estrategias para el uso prudente de antibióticos. Texto presentado en el seminario: A problemática dos resíduos medicamentosos e contaminantes em produção animal e Saúde Pública, Facultad de Veterinaria de Évora (Portugal), 4 noviembre 2005.
- Hanselman BA, Kruth S, Scott Weese J. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. Vet Microbiol. 2008; 126: 277- 281.
- Hanselman BA, Kruth SA, Rousseau J, Low DE, Willey BM, McGeer A, Scott Weese J. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel. Emerg Infect Dis, 2006; 12 (12): 1933- 1938.
- Heymann, D.L.: 2006. Resistance to anti-infective drugs and the threat to public health. Cell. 124: 671-675.
- Huerta B, Maldonado A, Ginel PJ, Tarradas C, Gómez- Gascón L, Astorga RJ, Luque L. Risk factors associated with the antimicrobial resistance of *Staphylococci* in canine pyoderma. Vet Microbiol. 2001; 150: 302- 308

- Hussain, Z; Stoakes, L; John, M.A; Garrow, S; Fitzgerald, A. Detection of Methicillin Resistance in Primary Blood Culture Isolates of Coagulase-Negative *Staphylococci* by PCR, Slide Agglutination, Disk Diffusion and a Commercial Method. J. Clin. Microbiol. 2002; 40 (6): 2251-2253.
- Jiménez Quiceno JN, Correa Ochoa MM. *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina: bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. Iatreia. 2009; 22 (2): 147- 158.
- Jona, D; Speck, M; Daschner, F.D; Grundmann, H. Rapid PCR-Based Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Screening Swabs. J. Clin. Microbiol; 2002; 40(5): 1821-1823.
- Jong- Hyun Y, Yoon JW, Young Lee S, Myung Park H. High prevalence of fluoroquinolone and methicillin resistant *Staphylococcus pseudointermedius* isolates from canine pioderma and otitis externa in veterinary teaching hospital. J Microbiol Biotechnol, 2010; 20 (4): 798- 802.
- Kadlec K, Van Duijkeren E, Wagenaar JA, Schwarz S. Molecular basis of rifampicina resistance in methicillin- resistant *Staphylococcus pseudointermedius* isolates from dogs. J Antimicrob Chemother, 2011; 66: 1236- 1242.
- Kadlec K, Schwarz S, Perreten V, Andersson UG, Finn M, Greko C et al. Molecular analysis of methicillin- resistant *Staphylococcus pseudointermedius* of feline origin from different European countries and North America. J Antimicrob Chemother. 2010; 65: 1826- 1837.
- Kawakami T, Shibata S, Murayama N, Nagata M, Nishifuji K, Iwasaki T, Fukata T. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudointermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subs. *coagulans* isolated from dogs with pioderma in Japan. J Vet Med Sci. 2012. 72(12): 1615- 1619.
- Kobayashi SD, Musser JM, DeLeo FR. Genomic analysis of the Emergence of Vancomycin- Resistant *Staphylococcus aureus*. MBio, 2012;3 (4): 1-3.
- Lemaître N, Sougakoff W, Masmoudi A. Characterization of Gentamicin- Susceptible Strains of Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* involved in nosocomial spread. J Clin Microbiol. 1998; 36 (1): 81- 85.
- Louie, L; Majury, A; Goodfellow, J; Louie, M; Simor, A.E. Evaluation of a Latex Agglutination Test (MRSA-Screen) for Detection of Oxacillin Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci. J. Clin. Microbiol. 2001; 39 (11): 4149-4151.
- Leonard, F.C; Markey, B.K. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. Vet. J. 2008; 175: 27-36.
- Marín M, Gudíol F. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003;21(1):42-55
- Modric J. What is *Staphylococcus aureus*? [Internet]. 2011. [Consulta el 10 de Agosto de 2012]. Disponible en: <http://www.healthype.com/staphylococcus-aureus.html>
- Molbak, K. Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans- The Public Health Consequences. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2004; 51 (8-9): 364- 369.
- Morgan M. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? J Antimicrob Chemother, 2008; 62: 1181- 1187
- OIE (World Organization for Animal Health). Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing. In: International Standards on Antimicrobial Resistance. Paris, 2003.
- OIE (World Organization for Animal Health). Vínculos entre los sistemas de producción animal, el cambio climático y las enfermedades emergentes. París, 2010.

OMS (Organización Mundial de la Salud). Resistencia a los antimicrobianos (RAM). Nota descriptiva nº 194. Marzo de 2012

Onuma K, Tanabe T, Sato H. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudointermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pododermatitis in Japan. *Vet Dermatol*, 2011; 23:17- 23.

Ortega C, Simón MC, Alonso JL. Resistencia a antibióticos como desafío emergente en Salud Pública, ¿realidad actual o un problema para el futuro? *Revista de actualidad SEM*. 2008; 46: 26- 30.

Ortega, C; Simón, M.C; Zarazaga, M; Rezusta, ; Gomez-Sanz, E; Ferrer, I; Revillo, M.J; Peyman-Fard, N; Torres, C. 2011. Contribution to the new concept of One World One Health: Preliminary results of the study of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); joining the veterinarian and medical efforts. International Conference on Responsible Use of Antibiotics in Animals. Egmond aan Zee. The Netherlands. November 2011.

Pape, J; Wadlin, J; Nachamkin, I. 2006. Use of BBL CHROMagar MRSA Medium for Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol*. 44(7): 2575-2576.

Pantosti, A. Review article: Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. *Front Microbiol*, 2012; 3: 127.

Perreten V, Kadlec K, Schwarz S, Andersson UG, Finn M, Greko C et al. Clonal spread of methicillin- resistant *Staphylococcus pseudointermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65: 1145- 1154.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiología. 5ª Edición. Madrid: Mc Graw- Hill Interamericana. 2004.

Rahbar, M. Is disk diffusion method reliable for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. April 2-5 2005. Copenhagen. Dk.

Rankin S, Roberts S, O'Shea K, Maloney D, Lorenzo M, Benson CE. Panton valentine leukocidin (PVL) toxin positive MRSA strains isolated from companion animals. *Vet Microbiol*. 2005; 108: 145- 148.

Román Márquez E. Análisis de los patrones de resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus agalactiae* aislados en muestras clínicas de nuestro medio [Tesis doctoral]. Facultad de Medicina de Granada, 2008.

Rubin JE, Ball KR, Chirino- Trejo M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudointermedius* isolated from various animals. *Can Vet J*. 2011; 52 (2): 153- 157.

Rubin JE, Chirino- Trejo M. Antimicrobial susceptibility of canine and human *Staphylococcus aureus* collected in Saskatoon, Canada. *Zoonoses Public Health*. 2011; 58: 454- 462.

Selva L., Viana D., Penadés J.R., Corpa J.M. ¿Por qué se está produciendo un incremento en la resistencia a antibióticos frente a *Staphylococcus aureus*? ¿Existen otras alternativas? *Cunicultura*, Agosto 2009: 33-38.

Schissler JR, Hillier A, Daniels JB, Cole LK, Gebreyes WA. Evaluation of Clinical Laboratory Standards Institute Interpretive Criteria for Methicillin- Resistant *Staphylococcus pseudointermedius* isolated from dogs. *J Vet Diagn Invest*. 2009; 21: 684.

Schwarz, S.; Roberts, M.C.; Werckenthin, C; Pang, Y.J; Lange, C. Tetracycline resistance in *S. aureus* spp from domestic animals. *Vet Microbiol*.1998; 63:217-227.

- Scott Weese J, Van Duijkeren E. Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudointermedius* in veterinary medicine. Vet Microbiol. 2009; 140: 418- 429.
- Scott Weese J, Reid- Smith R, Rousseau J, Avery B. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) contamination of retail pork. Can Vet 2010; 51: 749- 752
- Scott Weese J, Lefebvre SL. Risk factors for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in horses admitted to a veterinary teaching hospital. Can Vet, 2007; 48: 921- 926.
- Sung, JM-L, Lloyd DH, Lindsay JA. *Staphylococcus aureus* host specify: comparative genomics of human versus animal isolates by multi- strain microarray. Microbiology, 2008; 154: 1949- 1959.
- Thrusfield M., C. Ortega, I. De Blas, J. Noordhuizen and K. Frankena. 2001. Winepiscopes 2.0: Improved epidemiological software for veterinary medicine Vet. Rec. 148: 567-572.
- Tokatelloff N, Manning ST, Scott Weese J, Campbell J, Rothenburger J, Stephen C *et al.* Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in horses in Saskatchewan, Alberta, and British Columbia. Can Vet, 2009; 50: 1177-1180.
- Van Duijkeren E, Cansen MD, Fleming SC, De Neeling H, Wagenaar JA, Schoormans AHW *et al.* Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis. Emerg Infect Dis, 2007; 13(9): 1-5.
- Van Hoovels L, Vankeerberghen A, Boel A, Van Vaerenbergh, De Beenhouwer H. First case of *Staphylococcus pseudointermedius* infection in a human. J Clin Microbiol. 2006; 44(12): 4609–4612.
- Van Vuuren M. Antibiotic Resistance with special reference to poultry production. Conf. OIE. 2001;135- 146.
- Voss A, Milatovic D, Wallrauch-Schwarz C, Rosdahl VT, Braveny I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994;13(1):50-5
- Walther B, Monecke S, Ruscher C, Friedrich AW, Ehrlich R, Slikers P *et al.* Comparative Molecular Analysis Substantiates zoonotic potential of equine methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2009; 47(3): 704- 710.
- Walther B, Wieler LH, Friedrich W, Hanssen AM, Kohn B, Brunnberge, Lübke- Becker A. Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. Vet Microbiol. 2008; 127: 171- 178.
- Wertheim, H.F.L; Melles, D.C.; Vos, M.C.; Van Leeuwen, W.; Van Beikum, A.; Verbrugh, H.A; Nouwen, J. The role of nasal carriage in *S. aureus* infections. Lancet Infect Dis. 2005; 5:751-762
- Wilkerson, M; McAllister, S; Miller, J.M; Heiter, B; Bourbeau, P.P. Comparison of Five Agglutination Tests for Identification of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 1997; 35(1): 148-151.
- Windahl U, Reimegard E, Holst BS, Egenvall A, Fernström L, Fredriksson M, *et al.* Carriage of methicillin- resistant *Staphylococcus pseudointermedius* in dogs- a longitudinal study. BMC Vet Res. 2012; 8: 34.