

Resistencia antimicrobiana en *Staphylococcus coagulasa* positiva (CoPS) aislados de perros con otitis externa

Antimicrobial resistance in coagulase-positive staphylococci (CoPS) isolated from dogs with external otitis

Joel André Palomino-Farfán^{1,2}, Luis Alvarez V.¹, Juan Siuce M.¹, Sonia Calle E.¹

RESUMEN

El grupo de *Staphylococcus coagulasa* positiva (CoPS) incluye a las especies *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* y a *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. El propósito de este estudio fue evaluar la resistencia antimicrobiana de CoPS aislados de perros con otitis externa, utilizando los antibióticos más usados en la clínica diaria para tratar esta enfermedad. Se obtuvieron 148 muestras de secreciones óticas provenientes de 104 perros con otitis externas que fueron atendidos en una clínica veterinaria de Lima, Perú, en un periodo de seis meses. Se identificaron 113 aislados como *Staphylococcus* sp, de las cuales, 105 fueron CoPS. Las cepas presentaron la mayor resistencia a la ciprofloxacina (27.4%) y la mayor sensibilidad a la nitrofurantoína (82.1%).

Palabras clave: *Staphylococcus*, resistencia antimicrobiana, meticilina, otitis externa

ABSTRACT

The coagulase-positive staphylococci (CoPS) group includes the species *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial resistance of CoPS isolated from dogs with external otitis, using the most commonly antibiotics prescribed in the daily clinic to treat this disease. Samples of ear secretions (n=148) were obtained from 104 dogs with external otitis treated in a veterinary clinic in Lima, Peru in a period of six months. Among them, 113 isolates were identified as *Staphylococcus* sp, of which 105 were CoPS. The isolates showed the greatest resistance to resistance to ciprofloxacin (27.4%) and the greatest sensitivity to nitrofurantoin (82.1%).

Key words: *Staphylococcus*, antimicrobial resistance, methicillin, external otitis

¹ Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² E-mail: joel.palomino2@unmsm.edu.pe

Recibido: 11 de octubre de 2019

Aceptado para publicación: 28 de enero de 2020

Publicado: 31 de marzo de 2020

INTRODUCCIÓN

La microbiota ótica de los perros se compone de bacterias, parásitos y hongos, la cual puede afectarse como consecuencia de una reacción alérgica, presencia de cuerpos extraños o neoplasias (Korbelik *et al.*, 2019). Así mismo, los tratamientos empíricos sin haber identificado al agente infeccioso causante de la otitis externa causan una mayor alteración de la microbiota ótica, lo cual permite la sobrepoblación de bacterias oportunistas o el ingreso de bacterias ambientales (Wiebe, 2015).

Los gérmenes de mayor frecuencia en el ambiente ótico son los *Staphylococcus* sp. Uno de los factores de virulencia de estas bacterias es la enzima coagulasa o estafilo-coagulasa, que convierte el fibrinógeno en fibrina, generando una capa de protección frente a los macrófagos (Hermans *et al.*, 2010). Dentro del grupo de *Staphylococcus* coagulasa positiva (CoPS) se encuentra *S. aureus*, bacteria de importancia en la salud pública por su resistencia a los antimicrobianos (Sasaki *et al.*, 2010). Entre otros CoPS que afectan a los animales se puede mencionar a *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* y *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, los cuales también han sido reportados como resistentes a la meticilina (Devriese *et al.*, 2005; Kawakami *et al.*, 2010; Penna *et al.*, 2010).

Cada año se reportan más casos de bacterias multirresistentes a los antimicrobianos. El *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) se encuentra dentro del grupo de bacterias de alerta mundial, por ser el agente bacteriano de mayor importancia en las infecciones nosocomiales en medicina humana (Sakoulas *et al.*, 2001; Merlino *et al.*, 2002). Adicionalmente, otras especies de *Staphylococcus* como *S. pseudintermedius* y otros CoPS han mostrado ser resistentes a la meticilina (Frank *et al.*, 2009; Weese y van Duijkeren, 2010). Además, se ha demostra-

do que existe una relación de bacterias resistentes a la meticilina con la presencia del gen *mecA*, lo cual le provee a la bacteria no solo resistencia contra los β -lactámicos, sino, además, a otros grupos de antibióticos (Bemis *et al.*, 2006; Bannoehr *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2018). Sin embargo, en el Perú no se han realizado estas evaluaciones, de allí que el objetivo del presente estudio fue determinar el perfil de resistencia antimicrobiana de los aislados causantes de otitis externa en perros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especímenes

Se tomaron 148 muestras de secreción ótica a 104 perros con otitis externa, sin distinción de raza, edad ni sexo, que acudieron a la Clínica de Animales Menores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima, Perú) entre enero y junio de 2018. Como criterio de exclusión para la toma de muestra fue perros que recibieron tratamiento antibiótico durante los tres días previos al muestreo. Las muestras fueron tomadas mediante hisopados de las secreciones óticas. De los 104 perros, 44 cursaron con una otitis bilateral y sus muestras fueron evaluadas de manera independiente debido a las diferencias clínicas reportadas por el médico veterinario tratante.

Identificación de *Staphylococcus* sp

Los hisopados de las muestras de otitis externa fueron sembrados en agar tripticasa de soya (TSA) y agar MacConkey (MC) e incubados a 37 °C por 24 horas. Adicionalmente, se investigó la posible presencia de levaduras en los hisopados. La identificación de las bacterias del género *Staphylococcus* se realizó mediante características macroscópicas, tinción Gram, catalasa y oxidasa (Schleifer y Bell, 2015).

Cuadro 1. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana (%) de 105 cepas de *Staphylococcus coagulasa* positiva (CoPS) aislados de muestras de otitis externa en perros

Interpretación	GN	OX	CL	DA	FD	CIP	N	DO	AMC
Sensible	76.1	74.4	74.4	54.7	82.1	51.3	59.8	74.4	74.4
Intermedio	4.3	0	0	16.2	4.3	11.1	7.7	5.1	0
Resistente	9.4	15.4	15.4	18.0	3.4	27.4	22.2	10.3	15.4

GN: gentamicina, OX: oxacilina, CL: cefalexina, DA: clindamicina, FD: nitrofurantoína, CIP: ciprofloxacina, N: neomicina, DO: doxiciclina, AMC: amoxicilina con ácido clavulánico
Técnica de Kirby-Bauer e interpretado con los estándares del CLSI (2017)

Staphylococcus Coagulasa Positiva

Se realizó la prueba de coagulasa en tubo mezclando los aislados de *Staphylococcus* sp con plasma de conejo (Bactident® Coagulase) e incubando a 37 °C por 4 horas. La formación de un coágulo fue considerada como positivo. Las cepas consideradas como negativas fueron dejadas a temperatura ambiente (20-25 °C) hasta 24 horas para confirmar el resultado como negativo (Zdovc *et al.*, 2004).

Susceptibilidad Antimicrobiana

La prueba de sensibilidad antimicrobiana se hizo siguiendo el método de difusión en disco Kirby-Bauer. Se hizo una dilución bacteriana semejante a la escala de turbidez de 0.5 de McFarland y la muestra fue sembrada en el agar Müller-Hinton con la ayuda de un hisopo estéril (Fariña *et al.*, 2013). Se seleccionaron los antibióticos más usados en la clínica de animales de compañía para el tratamiento de otitis externa. Así, se emplearon los discos de sensibilidad antimicrobiana (Lab Oxoid) de gentamicina (30 µg), cefalexina (30 µg), clindamicina (2 µg), nitrofurantoína (300 µg), ciprofloxacina (5 µg), neomicina (30 µg), doxiciclina (30 µg) y amoxicilina con ácido clavulánico (20 µg/10 µg). Adicionalmente, se evaluó la suscepti-

bilidad a la meticilina usando el disco de oxacilina (1 µg) (Bemis *et al.*, 2006). La interpretación de la susceptibilidad se categorizó de acuerdo con las tablas del Instituto de Estándares Clínicos y Laboratoriales (CLSI) (Weinstein *et al.*, 2018).

RESULTADOS

Se aislaron 113 (76.4%) cepas del género *Staphylococcus* sp de las 148 muestras colectadas. Las cepas fueron identificadas por ser colonias blanquecinas, circulares y de bordes definidos, cocos Gram positivas agrupados en racimos, catalasa positiva y negativa a la oxidasa. Además, entre las bacterias aisladas se encontraron *Pseudo-monas* sp (20.3%), *Proteus* sp (12.8%), *Escherichia coli* (3.4%) y *Streptococcus* sp (2.0%). También se observó un crecimiento excesivo de *Malassezia pachydermatis* (51.4%, 76/148).

De las 113 cepas de *Staphylococcus* sp, 105 fueron positivas a la prueba de coagulasa en tubo. De estas, 72.4% (76/105) fueron positivas en las primeras 4 horas y 27.6% (29/105) fueron inicialmente negativas, pero resultaron positivas en el transcurso de las 24 horas.

Los resultados a la susceptibilidad antimicrobiana demostraron que el antibiótico con mayor número de cepas resistentes fue la ciprofloxacina (27.4%, 32/105), mientras que la nitrofurantoína fue el antibiótico con el menor número de cepas resistentes (3.4%, 4/105). Por otro lado, la susceptibilidad de la oxacilina fue de 15.4% (18/105) para las cepas de *Staphylococcus coagulasa* positiva (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

El estudio concuerda con las investigaciones de otros autores donde *Staphylococcus* sp es la principal bacteria aislada en otitis externa de perros (Yamashita *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2012; Zur *et al.*, 2016). No obstante, Bugden (2013) la reportó como la segunda bacteria más común en este tipo de patología.

Las pruebas bioquímicas para la identificación de especies de *Staphylococcus* sp no logran ser altamente específicas debido a la gran variabilidad de esta bacteria (Schleifer y Bell, 2015). Para lograr la adecuada identificación bacteriana se requiere realizar pruebas moleculares tales como la secuenciación del ARNr 16S (Rodicio y Mendoza, 2004).

Los *Staphylococcus* poseen genes de resistencia hacia las fluoroquinolonas (Schwarz *et al.*, 2018). Esto, en combinación con el uso excesivo de este grupo de antibióticos para las otitis externas explicaría la elevada resistencia que muestra frente a la ciprofloxacina (Kunder *et al.*, 2015).

La resistencia a los β -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas) encontrados en este estudio (15.4%) fueron similares a los reportados por Morris *et al.* (2006). Estos resultados fueron corroborados con la resistencia a la oxacilina, la cual se relaciona con la presencia del gen *mecA* (Bemis *et al.*, 2006).

La resistencia hacia los aminoglucósidos, como la gentamicina (9.4%) y la neomicina (22.2%), fueron inferiores al estudio de Penna *et al.* (2010), quienes obtuvieron 67.1% de resistencia a la gentamicina y 87.8% a la neomicina. Debido a sus características ototóxicas, dichos antibióticos deberían ser reservados para casos de bacterias multiresistentes.

La nitrofurantoína, otro antibiótico reservado para bacterias multiresistentes, fue el antibiótico con mayor sensibilidad en el presente estudio (82.1%). Sin embargo, se debe considerar que en otras localidades, como es el caso de Brasil donde se ha encontrado hasta 42% de resistencia a este antibiótico (Penna *et al.*, 2010). Esto supone una terapia primaria diferente en otros países, por lo cual genera un perfil de resistencia diferente.

En algunos casos, la *M. pachydermatis* puede permanecer como un factor perenne y desencadenar una infección ótica secundaria (Bajwa, 2019). En este estudio se observó un sobrecrecimiento de este microorganismo en el 51.4% (76/148) de los casos, pero debido a que no se tiene un registro citológico previo a la otitis, se hace imposible determinar si el agente desencadenante fue fúngico o bacteriano.

CONCLUSIONES

- Las bacterias *Staphylococcus* sp coagulasa positivo (CoPS) fueron los principales microorganismos aislados de otitis externas caninas.
- La mayor resistencia antimicrobiana de las CoPS fue hacia la ciprofloxacina (27.4%)

LITERATURA CITADA

1. **Bajwa J. 2019.** Canine otitis externa - Treatment and complications. *Can Vet J.* 60: 97-99.

2. **Bannoehr J, Ben Zakour NL, Waller AS, Guardabassi L, Thoday KL, van den Broek AHM, Fitzgerald JR. 2007.** Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J Bacteriol* 189: 8685-8692. doi: 10.1128/JB.01150-07
3. **Bemis DA, Jones RD, Hiatt LE, Ofori ED, Rohrbach BW, Frank LA, Kania SA. 2006.** Comparison of tests to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, and *Staphylococcus aureus* isolates from canine hosts. *J Clin Microbiol* 44: 3374-3376. doi: 10.1128/JCM.01336-06
4. **Bugden DL. 2013.** Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. *Aust Vet J* 91: 43-46. doi: 10.1111/avj.12007
5. **Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Vanechoutte M, De Graef E, Snauwaert C, Cleenwerck I, et al. 2005.** *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1569-1573. doi: 10.1099/ijs.0.63413-0
6. **Fariña N, Carpinelli L, Samudio M, Guillén R, Laspina F, Sanabria R, Abente S, et al. 2013.** *Staphylococcus coagulasa*-negativa clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Rev Chil Infectol* 30: 480-488. doi: 10.4067/S0716-10182013-000500003
7. **Frank LA, Kania SA, Kirzeder EM, Eberlein LC, Bemis DA. 2009.** Risk of colonization or gene transfer to owners of dogs with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet Dermatol* 20: 496-501. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00826.x
8. **Hermans K, Devriese LA, Haesebrouck F. 2010.** *Staphylococcus*. In: Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4th ed. USA: Blackwell Publishing. p. 75-89.
9. **Kawakami T, Shibata S, Murayama N, Nagata M, Nishifuji K, Iwasaki T, Fukata T. 2010.** Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. *J Vet Med Sci* 72: 1615-1619. doi: 10.1292/jvms.10-0172
10. **Korbelik J, Singh A, Rousseau J, Weese JS. 2019.** Characterization of the otic bacterial microbiota in dogs with otitis externa compared to healthy individuals. *Vet Dermatol* 30: 228-e70. doi: 10.1111/vde.12734
11. **Kunder DA, Cain CL, O'Shea K, Cole SD, Rankin SC. 2015.** Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of *Staphylococcus schleiferi* in clinical samples from dogs in different geographic regions of the United States. *Vet Dermatol* 26: 406-411. doi: 10.1111/vde.12254
12. **Merlino J, Watson J, Barbara R, Beard-Pegler M, Gottlieb T, Bradbury R, Harbour C. 2002.** Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Australia. *J Antimicrob Chemoth* 49: 793-801. doi: 10.1093/jac/dkf021
13. **Morris DO, Rook KA, Shofer FS, Rankin SC. 2006.** Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: A retrospective review of 749 isolates (2003-04). *Vet Dermatol* 17: 332-337. doi: 10.1111/j.1365-3164.2006.00536.x
14. **Muñoz L, Molina M, Heresmann M, Abusleme F, Ulloa M, Borie C, San Martín B, Silva V, et al. 2012.** Primer reporte de aislamiento de *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* en perros con pioderma y otitis externa en Chile. *Arch Med Vet* 44: 261-265. doi: 10.4067/S0301-732X2012000300008

15. **Penna B, Vargas R, Medeiros L, Martins GM, Martins RR, Lilenbaum W. 2010.** Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Vet Dermatol* 21: 292-296. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00842.x
16. **Rodicio M, Mendoza M. 2004.** Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Micr Cl* 22: 238-245. doi: 10.1016/S0213-005X(04)73073-6
17. **Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, Degirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. 2001.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J Clin Microbiol* 39: 3946-3951. doi: 10.1128/JCM.39.11.3946-3951.2001
18. **Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirotaki S, Kawakami T, Fukata T, Hiramatsu K. 2010.** Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol* 48: 765-769. doi: 10.1128/JCM.01232-09
19. **Schleifer K-H, Bell JA. 2015.** Staphylococcus. In: *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. Springer. p. 1-43.
20. **Schwarz S, Feßler AT, Loncaric I, Wu C, Kadlec K, Wang Y, Shen J. 2018.** Antimicrobial resistance among *Staphylococci* of animal origin. *Microbiol Spectr* 6(4). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0010-2017
21. **Weese JS, van Duijkeren E. 2010.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol* 140: 418-429. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.039
22. **Weinstein MP, Patel JB, Bobenchik AM, Campeau S, Cullen SK, Galas MF, Gold H, Humphries RM, Kirn TH. 2018.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 13th ed. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 92 p.
23. **Wiebe VJ. 2015.** Drug therapy for infectious diseases of the dog and cat. Iowa: Wiley-Blackwell. 328 p.
24. **Yamashita K, Shimizu A, Kawano J, Uchida E, Haruna A, Igimi S. 2005.** Isolation and characterization of staphylococci from external auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates. *J Vet Med Sci* 67: 263-268. doi: 10.1292/jvms.67.263
25. **Zdovec I, Očepnik M, Pirš T, Krt B, Pinter L. 2004.** Microbiological features of *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, isolated from dogs and possible misidentification with other canine coagulase-positive staphylococci. *J Vet Med Ser B* 51: 449-454.
26. **Zur G, Gurevich B, Elad D. 2016.** Prior antimicrobial use as a risk factor for resistance in selected *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from the skin and ears of dogs. *Vet Dermatol* 27: 468-e125. doi: 10.1111/vde.12382