



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE
STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS RESISTENTE A
METICILINA AISLADO DE CANINOS DOMÉSTICOS

ENERO 2024

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO
DE: LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

PRESENTA

LIZBETH GUADALUPE CRUZ GUTIÉRREZ

Director de Tesis

DR. CARLOS GERARDO CASTILLO SOSA

Asesor de Tesis

DRA. MARIANA ALDECO PÉREZ

INDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCION	5
3. MARCO TEORICO	7
3.1 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	7
3.2 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistente a meticilina (MRSP)	9
3.3 Infecciones por MRSP en mascotas	11
3.4 MRSP en humanos.....	14
3.5 La resistencia a antibióticos como un problema de salud publica	16
3.6 Los mecanismos de resistencia a los antibióticos	19
3.6.1 Disminución de la permeabilidad.....	19
3.6.2 Bombas de eflujo	20
3.6.3 Modificación de la molécula blanco	20
3.6.4 Modificación directa del antibiótico	21
3.7 La resistencia a antibióticos en <i>S. pseudintermedius</i>	21
3.8 Métodos de evaluación de susceptibilidad <i>in vitro</i>	24
3.8.1 El método de difusión en disco o antibiograma.....	24
3.8.2 Métodos para la determinación del fenotipo de resistencia a meticilina en <i>S. pseudintermedius</i> ...	25
4. OBJETIVO GENERAL.....	27
4.1 Objetivos particulares	27
5. JUSTIFICACIÓN	28
6. MATERIALES Y METODOS	29
6.1 Aislamiento e Identificación de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	29
6.1.1 Toma de muestras:	29
6.1.2 Sembrado.....	29
6.1.3 Identificación morfológica.....	29
6.2 Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> e identificación del fenotipo MRSP	30
6.2.1 Sembrado.....	30
6.2.2 Prueba de difusión en disco para identificar a las cepas que presenten el fenotipo MRSP	30
7. RESULTADOS.....	31
7.1 Aislamiento e identificación de <i>S. pseudintermedius</i>	31
7.2 Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> e identificación del fenotipo MRSP	31
8. DISCUSION.....	37
9. CONCLUSIÓN.....	39
10. BIBLIOGRAFIA	40

1. RESUMEN

La presente investigación aborda la problemática de la resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus pseudintermedius*, un patógeno oportunista de relevancia en medicina veterinaria y creciente importancia en medicina humana. Se destaca la importancia clínica de esta especie, especialmente en su capacidad para desarrollar resistencia a la meticilina, un fenómeno asociado al gen *mecA* presente en el cassette cromosómico estafilocócico (SCCmec). Se evaluó la susceptibilidad *in vitro* de cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a la meticilina (MRSP), utilizando muestras obtenidas de hisopados nasales de pacientes caninos en la ciudad de Puebla, México. El período de muestreo abarcó febrero-marzo de 2023, y se incluyeron tanto pacientes con signos de infección como aquellos sin evidencia de enfermedad. La metodología empleada incluyó el aislamiento e identificación de las cepas, utilizando pruebas fenotípicas como la catalasa y coagulasa. La prueba de susceptibilidad *in vitro* se realizó mediante la técnica de difusión en disco en medio sólido, con especial énfasis en la identificación del fenotipo MRSP utilizando sensidiscos de oxacilina. Además, se evaluó la susceptibilidad a otros antibióticos relevantes, como sulfametoxazol/trimetoprim, amikacina y tetraciclina. Los resultados revelaron que el 45.2% de las muestras analizadas correspondían a *Staphylococcus pseudintermedius*. De estas cepas, el 66.7% exhibió resistencia al fenotipo MRSP, planteando preocupaciones sobre la presencia de bacterias resistentes en pacientes caninos, incluso en ausencia de signos clínicos evidentes. Además, se observó resistencia a otros antibióticos, aunque todas las cepas fueron sensibles a la amikacina. Se compararon estos hallazgos en el panorama internacional, con estudios similares realizados en Alemania, China, Holanda y Tailandia. Se destaca la posible tendencia al alza en la prevalencia de MRSP, subrayando la importancia de la vigilancia continua para comprender la dinámica de la resistencia bacteriana. Este estudio constituye uno de los primeros informes sobre la presencia de cepas MRSP en animales de compañía en la ciudad de Puebla, México. La resistencia a los antibióticos se presenta como un problema crítico con implicaciones para la

salud humana y animal, subrayando la necesidad de estrategias de monitoreo y control. Los datos recopilados contribuyen a la comprensión de los patrones locales de resistencia y ofrecen información crucial para el desarrollo de estrategias efectivas contra esta problemática creciente.

2. INTRODUCCION

El género *Staphylococcus* consiste en una variedad de patógenos oportunistas de relevancia variable en medicina veterinaria. Los estafilococos clínicamente más relevantes en medicina veterinaria son el *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo y los miembros del grupo *Staphylococcus intermedius*, particularmente *Staphylococcus pseudintermedius* (1).

Una propiedad destacada de los estafilococos es su capacidad para volverse resistentes a los antimicrobianos. La resistencia a la meticilina es de particular relevancia porque es conferida por la presencia del gen *mecA*, que codifica para la producción de una proteína de unión a penicilina (PBP) alterada (PBP2a o PBP2') que tiene baja afinidad por todos los antimicrobianos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos). Por lo tanto, los estafilococos resistentes a la meticilina son resistentes a esta amplia gama de importantes antimicrobianos.

El gen *mecA* reside en un cassette cromosómico estafilocócico (SCCmec). Otros genes de resistencia también pueden estar ubicados en este casete cromosómico o en otra parte del genoma, lo que limita aún más las opciones de tratamiento. *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y *S. pseudintermedius* resistente a la meticilina (MRSP) han surgido como problemas importantes en la medicina veterinaria, desde el punto de vista de la salud animal y la salud pública (2).

La especie estafilocócica coagulasa positiva más prevalente en perros, aislada tanto de piel normal y mucosa oronasal como de infecciones cutáneas y de oído, fue *S. intermedius*. Usando un enfoque de identificación molecular, los aislados caninos que previamente habían sido identificados fenotípicamente como *S. intermedius* fueron reclasificados como *S. pseudintermedius*. Devriese propuso que las cepas caninas identificadas por medios tradicionales deberían informarse como *S. pseudintermedius* a menos que la investigación genómica demuestre que pertenecen a otras especies relacionadas (3) (4).

Se ha demostrado que una pequeña proporción de cepas de *S. intermedius* (clasificación antigua, ahora *S. pseudintermedius*) aisladas tanto de perros sanos

como de perros que muestran infecciones de la piel y del oído son resistentes a la meticilina *mecA* positivas. Aunque *S. pseudintermedius* rara vez es responsable de infecciones humanas, es posible que se transmita de perro a humano (5).

3. MARCO TEORICO

3.1 *Staphylococcus pseudintermedius*

La piel de los mamíferos está colonizada por un gran número de microorganismos que se conocen colectivamente como microbiota, que incluye varias especies del género *Staphylococcus* (6).

Los estafilococos representan importantes patógenos bacterianos oportunistas en humanos y animales. Las especies más comunes asociadas con infecciones en animales de compañía son *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo y *Staphylococcus pseudintermedius* (*S. pseudintermedius*) (7). *Staphylococcus aureus* es un organismo colonizador de la piel y el tracto respiratorio superior de un componente inocuo de la flora comensal y causa infección invasiva tanto en humanos como en animales (8).

Staphylococcus pseudintermedius, descrito inicialmente en 2005, es un comensal en perros y también se reconoce como un patógeno oportunista frecuente, que causa principalmente infecciones de la piel y complicaciones posoperatorias. Además, aunque su huésped natural son los perros y, en menor medida, los gatos, se ha informado de portación o infecciones en humanos, que normalmente se asocian con la exposición a perros, lo que destaca el potencial zoonótico de *S. pseudintermedius* (9).

En perros saludables, *S. pseudintermedius* forma parte de la microflora cutánea normal y coloniza la piel, los folículos pilosos, el pelaje y, en particular, sitios mucocutáneos como la nariz, la boca y el ano. *S. pseudintermedius* constituye aproximadamente el 90% de los estafilococos aislados de portadores sanos caninos y de perros con enfermedades cutáneas subyacentes. Las tasas de portadores informadas por cinco estudios transversales realizados en grandes poblaciones de perros saludables ($n > 50$) e incluyendo múltiples sitios corporales son bastante variables, oscilando entre el 46% y el 92%. La alta variabilidad en las tasas de portadores reportadas por diferentes estudios puede reflejar la diversidad en los

criterios de inclusión utilizados para la selección de las poblaciones estudiadas, en la cantidad y tipos de sitios corporales muestreados (por ejemplo, portadores nasales versus portadores en múltiples sitios corporales) y en los métodos utilizados para el muestreo de cada sitio corporal (10) (11).

S. pseudintermedius se ha identificado tradicionalmente mediante la morfología de colonias y pruebas fenotípicas estándar. Las colonias son de tamaño mediano, elevadas y sin pigmentación, y muestran una b-hemólisis grande e incompleta y una d-hemólisis pequeña y completa, ya sea individualmente o en combinación (hemólisis doble), en agar de sangre de oveja o bovina (12).

La a-hemólisis completa no ocurre en esta especie, y no se recomienda el uso de agar de sangre de caballo para el aislamiento primario porque no se observan patrones de hemólisis en este medio. Un ojo entrenado puede, en la mayoría de las circunstancias, distinguir la morfología de las colonias de *S. pseudintermedius* de la de *S. aureus*, que tiene colores y patrones de hemólisis variables, así como de las especies coagulasa-negativas, que son ligeramente más pequeñas y generalmente no hemolíticas (13).

S. pseudintermedius no puede distinguirse claramente de los otros miembros del SIG (*Staphylococcus intermedius* group) mediante métodos fenotípicos. *Staphylococcus intermedius* puede diferenciarse fenotípicamente de *S. pseudintermedius* y *S. delphini* mediante la reacción de dihidrolasa de arginina (*S. intermedius* es negativo), la producción de ácido a partir de b-gentobiosa en condiciones aeróbicas (*S. intermedius* es positivo) y D-manitol anaeróbicamente (*S. intermedius* es positivo). *S. pseudintermedius* y *S. delphini* no son claramente distinguibles mediante pruebas fenotípicas (14).

Debido a la falta de pruebas fenotípicas confiables y kits de prueba comercialmente disponibles, la identificación rutinaria de *S. pseudintermedius* en laboratorios de diagnóstico se basa actualmente en el hecho de que las especies del SIG, aparte de *S. pseudintermedius*, son virtualmente inexistentes en perros. Sin embargo, para la correcta identificación de especies dentro del SIG, se necesitan métodos moleculares (15).

Similar a *S. aureus*, *S. pseudintermedius* produce una variedad de factores de virulencia, incluyendo enzimas como la coagulasa, la termonucleasa y proteasas, proteínas de superficie como el factor de aglutinación y la proteína A, y toxinas como citotoxinas, toxina exfoliativa y enterotoxinas. Además, se ha demostrado que *S. pseudintermedius* forma biofilms. Sin embargo, nuestro conocimiento sobre la patogénesis de *S. pseudintermedius* sigue siendo muy limitado, y la mayoría de los factores de virulencia no han sido caracterizados en detalle (16).

S. pseudintermedius, a menudo descrito como el "estafilococo dorado del perro", comparte varias características con *S. aureus*, especialmente la capacidad de expresar una variedad de factores de virulencia como: (i) enzimas proteolíticas, incluyendo coagulasa y proteasa, (ii) componentes microbianos de la superficie que reconocen moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMMs), como la proteína A estafilocócica, que son proteínas de la superficie del huésped y participan en la colonización activa de tejidos y en la evasión del sistema inmunológico del huésped, y (iii) toxinas. Entre estas últimas, las toxinas formadoras de poros (PFTs) se han investigado extensamente por su capacidad para dañar las membranas plasmáticas y provocar la lisis celular. Algunas de ellas inducen la muerte celular después de la unión de la toxina a receptores en la superficie celular (17).

3.2 *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a meticilina (MRSP)

Según una encuesta reciente, casi 90,5 millones de hogares estadounidenses, el 70 % de todas las familias estadounidenses, tienen al menos una mascota. Entre ellos, 45,3 millones de hogares tienen un gato y 69,0 millones tienen un perro (18).

Las cifras de prevalencia reportadas encontraron que el 20% de la población era portador nasal persistente, mientras que el 30% tenía casos recurrentes. *S. aureus* sigue siendo una de las principales infecciones bacterianas comunales en humanos y animales (19).

S. pseudintermedius resistente a la meticilina (MRSP) se reportó por primera vez en los EE. UU. en 1999 y en Europa en 2007. Las infecciones causadas por MRSP son

difíciles de controlar debido a sus perfiles característicos de resistencia a los antibióticos betalactámicos (20).

Además, el fenotipo MRSP se asoció frecuentemente con la resistencia a casi todos los antibióticos disponibles en medicina veterinaria, lo que generó serios desafíos terapéuticos y una opción tentadora para los veterinarios de tratar las infecciones por MRSP con antimicrobianos de importancia crítica en la medicina humana (21).

Al igual que *S. aureus*, *S. pseudintermedius* puede contener un elemento móvil llamado *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec). Un casete SCCmec típico contiene un complejo génico de recombinasa (*ccr*) y un complejo génico *mec*, que contiene el gen *mecA* (22).

Una propiedad destacada de los estafilococos es su capacidad para volverse resistentes a los antimicrobianos betalactámicos. El fenotipo MRSP tiene relevancia porque es conferido por presencia del gen *mecA*, que codifica la producción de una proteína fijadora de penicilina (PBP) alterna (PBP2a o PBP2') que tiene baja afinidad por todos los antibióticos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos) Por lo tanto, MRSP son resistentes a esta amplia gama de importantes antimicrobianos. El gen *mecA* reside en un cassette cromosómico estafilocócico (SCCmec) (23).

Otros genes de resistencia también se pueden ubicar en este casete cromosómico o en otras partes del genoma, lo que limita aún más el tratamiento opciones. Han surgido *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) y *S. pseudintermedius* (MRSP) resistentes a la meticilina como problemas importantes en la medicina veterinaria, incluyendo desde el punto de vista de la salud pública y animal (23).

La aparición de MRSP es reciente en relación con la de MRSA y hasta ahora parecen predominar dos clones geográficos con distintos tipos de casetes. Los tipos II-III de SCCmec y VT difieren en el aparato regulador *mecl/mecR1* de *mecA* y son análogos a los dos tipos de estructuras de casete que se encuentran en HA y CA-MRSA. Se caracteriza las regiones promotoras *mecA/mecl/mecR1*, *blaZ/blal/ blaR1*

y *mecA* de aislados de MRSP y se determina el efecto de la presencia o ausencia del gen regulador sobre la velocidad y abundancia de la transcripción de *mecA* (24).

Tanto animales como humanos pueden estar contaminados, colonizados o infectados con MRSP. La colonización se refiere a la presencia, crecimiento y multiplicación de MRSP en uno o varios sitios del cuerpo sin signos clínicos observables o reacción inmunológica. El término "portador" en animales o humanos se refiere a un individuo colonizado con MRSP. El sitio de colonización de MRSP más comúnmente reportado en perros es la nariz y el ano, pero estos también son los sitios más comúnmente evaluados. Otros sitios, como la faringe, también podrían ser importantes, pero esto no ha sido completamente investigado (5).

La infección es una condición en la que MRSP ha invadido un sitio del cuerpo, se está multiplicando en tejido y está causando manifestaciones clínicas de la enfermedad. Puede ocurrir contaminación del pelaje, la piel y la nariz. Cuando un individuo está contaminado, las bacterias pueden lavarse fácilmente, y a menudo solo un cultivo es positivo para MRSP, mientras que cultivos subsiguientes son negativos (25).

La hospitalización previa, las visitas hospitalarias frecuentes y los tratamientos antimicrobianos prolongados son factores de riesgo asociados con las infecciones por *S. pseudintermedius*. Además, ha habido un aumento en la aparición de infecciones humanas asociadas con la colonización por *S. pseudintermedius* (26).

MRSA y MRSP a menudo son multirresistentes a los agentes antimicrobianos y, por lo tanto, a menudo pueden sobrevivir bien en un entorno, como un hospital veterinario, donde están presentes animales enfermos que podrían portar y excretar MRSA y/o MRSP y se utilizan agentes antimicrobianos (27).

3.3 Infecciones por MRSP en mascotas

Staphylococcus pseudintermedius es un organismo comensal que reside en la piel y las mucosas de perros y gatos sanos, pero también puede causar infecciones de la piel y otros tejidos corporales. En los últimos años, *S. pseudintermedius* resistente

a la meticilina (MRSP) se ha aislado con una frecuencia cada vez mayor de animales de compañía y también ha surgido como un patógeno zoonótico de interés (28).

S. pseudintermedius es la causa más frecuente de pioderma en perros. También se aísla a menudo de pacientes veterinarios con heridas infectadas, sitios quirúrgicos, canal auditivo externo, vías respiratorias o urogenitales. *S. pseudintermedius* también se aísla de gatos con infecciones del tracto respiratorio, conjuntivitis, infecciones urogenitales, dermatitis, otitis y heridas (29).

La información sobre la microbiota en felinos es particularmente limitada. En consecuencia, hay escasez de conocimientos sobre cómo ciertas especies bacterianas se han adaptado a los huéspedes felinos. Algunos informes mostraron que *Staphylococcus pseudintermedius* (*S. pseudintermedius*) está menos adaptado para adherirse a los corneocitos felinos en comparación con los corneocitos caninos in vitro. Este fenómeno podría explicar la tasa de prevalencia mucho más baja de colonización por *S. pseudintermedius* en gatos en comparación con perros (29).

Dado que los perros domésticos (*Canis familiaris*) se encuentran entre los animales de compañía más populares en las sociedades occidentales, su microbioma cutáneo, al que están expuestos los humanos, es de interés general. Es importante destacar que la microbiota de la piel de los perros es de especial interés, ya que, dado que los perros y los humanos están frecuentemente en contacto físico y, a menudo, comparten el mismo entorno de vida, puede tener un gran impacto en la microbiota de los humanos que cohabitan (30).

Lo que es más importante, el *S. pseudintermedius* resistente a la meticilina (MRSP) ha surgido recientemente como un patógeno oportunista desafiante que es comparable al *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) en humanos con un problema de salud pública importante. Este importante problema de salud pública tiene consecuencias adicionales para los seres humanos porque el cromosoma mec del casete estafilocócico (SCCmec) que codifica variedades de sus factores patogénicos, son altamente móviles y pueden transferirse entre diferentes especies de estafilococos (31).

La pioderma canina es una de las infecciones cutáneas bacterianas más comunes diagnosticadas en la medicina veterinaria de pequeños animales y está asociada con enrojecimiento, lesiones, dolor e inflamación. La pioderma canina puede variar desde infecciones moderadas hasta infecciones graves y es desencadenada por factores subyacentes como enfermedades cutáneas alérgicas, ectoparásitos y endocrinopatías. Esto inicia la colonización de *S. pseudintermedius* patógeno, que es el patógeno más común asociado con infecciones cutáneas, aislado como el patógeno predominante en hasta un 92% de los casos de pioderma canina (32).

Aunque es evidente que *S. pseudintermedius* es el patógeno predominante asociado con la pioderma canina, también es la especie comensal más común en los perros, y actualmente existe una falta de evidencia clara sobre si las especies comensales causan infección o si los aislamientos externos inician la infección (33).

El aumento de MRSP puede explicar la discordancia entre las especies de *S. pseudintermedius* aisladas de la pioderma canina. MRSP se aísla en hasta el 59% de los casos de pioderma canina, lo que podría indicar que los aislamientos de *S. pseudintermedius* involucrados en las infecciones pueden adquirir genes necesarios para la resistencia a la meticilina y parecer no estar relacionados con la especie comensal (34).

Además, la adquisición de cepas externas que pueden causar enfermedad puede ser respaldada por dos estudios independientes que han demostrado que MRSP de perros infectados puede transmitirse a perros de contacto sanos y al entorno (por ejemplo, áreas de descanso y alimentación). En la mayoría de los casos, los perros sanos solo fueron positivos para MRSP cuando el perro infectado también lo era, sugiriendo contaminación en lugar de colonización en perros sanos. Sin embargo, hubo un caso en el que el perro sano permaneció positivo para MRSP, resultando en una infección en el oído, incluso después de que el perro infectado se recuperara (35).

Esto sugiere que los aislamientos de *S. pseudintermedius* recuperados de infecciones caninas no relacionadas con la especie comensal del perro pueden ser causados por especies externas adquiridas al contacto con perros infectados. Sin

embargo, aún queda espacio para la investigación sobre los factores que pueden contribuir a la diferencia entre la adquisición de la infección versus la no adquisición al contacto de un perro sano con un perro infectado por MRSP que muestra patología de enfermedad. Estos hallazgos sugieren que MRSP puede tener la capacidad de propagarse aún más dentro de la comunidad canina, lo que puede afectar la disponibilidad de opciones de tratamiento para tratar infecciones por MRSP (36).

Dado el menguante arsenal para tratar MRSP, se necesitan con urgencia modalidades de tratamiento alternativas que puedan usarse de manera segura en la población canina sin comprometer la eficacia de agentes reservados para infecciones humanas. Dado que las infecciones involucran predominantemente la piel, las terapias potenciales incluyen geles a base de miel y bacteriófagos. Otras áreas de investigación implican la reutilización de antimicrobianos (por ejemplo, fosmidomicina), y también ha suscitado interés la utilización de agentes no antimicrobianos (37).

Por ejemplo, el carprofeno, un medicamento antiinflamatorio no esteroideo, parece restaurar la susceptibilidad a la doxiciclina en aislamientos de MRSP que llevan tetK, mientras que agentes quimioterapéuticos comúnmente utilizados en oncología veterinaria (por ejemplo, bleomicina) pueden inhibir el crecimiento de *S. pseudintermedius*. Finalmente, se han propuesto componentes candidatos para una vacuna, que incluyen toxinas y factores de virulencia de *S. pseudintermedius*: Luk-I, proteína A y SpEX (38).

3.4 MRSP en humanos

Varios trabajos de investigación indican que las bacterias resistentes a los antimicrobianos más comunes que podrían transmitirse de las mascotas a los humanos incluyen a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a la meticilina (MRSP), Enterobacteriaceae productoras de ESBL/AmpC y bacterias MRD no fermentadoras Gram-negativas. Algunos de estos patógenos se encuentran tanto en humanos

como en mascotas (p. ej., *Enterobacteriaceae*), por lo que puede ser difícil determinar la dirección de transmisión. Sin embargo, otros patógenos como *S. pseudintermedius* y *Pasteurella multocida* están adaptados a perros y gatos domésticos y, por lo tanto, es más probable que se transmitan de mascotas a humanos en lugar de humanos a mascotas (18).

En contraste con *S. aureus*, que ha sido aislado de múltiples especies hospedadoras y muestra una adquisición frecuente o pérdida de genes asociados al hospedador, *S. pseudintermedius* parece estar más restringido en cuanto al tipo de hospedador que puede afectar. La información sobre la variación genética y los mecanismos que permiten la adaptación de *S. pseudintermedius* a los humanos es escasa. Un estudio sobre las propiedades de adherencia de *S. pseudintermedius* a los corneocitos reveló una preferencia general por los corneocitos caninos en comparación con los corneocitos humanos, y otro estudio identificó una proteína asociada a la pared celular con una alta fuerza de unión al fibrinógeno canino en comparación con el fibrinógeno de otras especies hospedadoras (12).

La epidemiología de la transmisión de *S. pseudintermedius* entre animales y humanos no está bien caracterizada. La MRSP ciertamente puede ser transportada por mascotas sanas, sus dueños y veterinarios, y ocasionalmente puede causar infecciones en personas inmunodeprimidas (39).

S. pseudintermedius puede transmitirse a los humanos, pero *S. pseudintermedius* en humanos podría diagnosticarse erróneamente como *Staphylococcus aureus* porque comparten características bioquímicas clave, como la capacidad de producir coagulasa (22).

Las infecciones por *S. pseudintermedius* en humanos son raras, en su mayoría locales y asociadas con heridas por mordedura de perro. Sin embargo, existen informes de casos de neumonía, bacteriemia, endocarditis, absceso cerebral, úlceras de pierna infectadas, sinusitis y otitis. También se han informado infecciones humanas debidas a MRSP adquiridas de perros. El primer informe de infección por *S. pseudintermedius* en humanos se describió en 2006 cuando causó endocarditis después de la implantación de un dispositivo cardioversor-desfibrilador (DCI) (31).

Si bien la relación entre mascotas y dueños viene acompañada de innumerables ventajas que contribuyen a la salud física y mental humana, es importante reconocer que, tal como lo preconiza el concepto One health, el bienestar de ambas contrapartes está entrelazado. Por lo tanto, comprender el resistoma y la motilidad potencial de los genes involucrados en las infecciones caninas resistentes a los antimicrobianos es importante para ayudar a elaborar métodos de control que sean más efectivos y tengan en cuenta la naturaleza holística de la salud humana y animal (40).

3.5 La resistencia a antibióticos como un problema de salud pública

Con el fin de estar aptos para sobrevivir, todos los organismos vivos se esfuerzan por adaptarse a su entorno. Parte de este proceso de adaptación incluye ajustarse a las condiciones climáticas, a los alimentos, al agua y, en muchos casos, a la disponibilidad de oxígeno, así como a la presencia de agentes externos potencialmente peligrosos o incluso letales. No es ningún secreto que muchos insectos se han adaptado de manera notable a su entorno, al igual que los microorganismos. Por lo tanto, no debería sorprendernos que las bacterias hayan demostrado una notable capacidad para resistir y adaptarse a su entorno, incluido el desarrollo de diferentes mecanismos de resistencia frente a la mayoría de los agentes antimicrobianos antiguos y nuevos (41).

La resistencia a los antibióticos en bacterias patógenas puede definirse microbiológica o clínicamente. La resistencia microbiológica se refiere a la presencia de un mecanismo de resistencia genéticamente determinado (adquirido o mutado), clasificando al patógeno como resistente o susceptible mediante la aplicación de un umbral establecido en una prueba fenotípica de laboratorio (42).

La resistencia clínica es un nivel de actividad antimicrobiana que se correlaciona con una alta probabilidad de fracaso terapéutico; en otras palabras, tratar un patógeno con un fármaco al cual ha demostrado ser susceptible produce un resultado mejor que el obtenido con un fármaco al cual el patógeno ha demostrado ser resistente (43).

Las bacterias pueden ser intrínsecamente resistentes debido a la ausencia de una estructura específica sobre la que pueda actuar el antibiótico, o pueden producir enzimas capaces de inhibir la acción de los antibióticos o pueden adquirir genes de resistencia durante la fase evolutiva cuando se acumulan errores genéticos en el plásmido o cromosoma de células bacterianas (llamada resistencia vertical) (44).

También puede ocurrir resistencia horizontal (llamada resistencia adquirida) y abarca que el material genético puede intercambiarse dentro y entre especies bacterianas en las que los organismos obtienen nuevos genes en sus elementos genéticos móviles, incluidos plásmidos, secuencias de inserción, elementos relacionados con fagos e integrones y transposones (44).

La transmisión de bacterias resistentes a los antimicrobianos se ha convertido en un problema de concepto One Health (Una salud) ya que las bacterias resistentes a los antibióticos pueden transmitirse entre humanos, animales y el medio ambiente (18).

La resistencia a los antimicrobianos es una prioridad global urgente que requiere colaboración internacional a través de una respuesta de “Una sola salud” (para humanos, animales, plantas y su entorno compartido). One Health reconoce el vínculo inextricable entre los humanos, los animales y el medio ambiente para lograr una mejor salud y bienestar comunitario. One Health es un concepto interdisciplinario y holístico que considera la salud humana y animal interdependiente en asociación con el ecosistema donde viven (45).

A lo largo de la historia, el descubrimiento y desarrollo de los antibióticos ha sido uno de los avances más importantes tanto en la medicina humana como en la veterinaria; sin embargo, la resistencia a los antimicrobianos (RAM) se ha convertido en un problema crítico en la medicina moderna. AMR ocurre cuando bacterias, parásitos, virus u hongos desarrollan la capacidad de sobrevivir en presencia de antimicrobianos. Se estima que 700 000 personas murieron como resultado de infecciones de AMR en 2014, y se prevé que este número aumente a 10 millones en 2050 si no se toman medidas efectivas (18).

Durante la década de 1940 se informó que la resistencia se desarrolla debido a la mutación del gen de la β -lactamasa, blaZ, para resistir la acción del antibiótico mediante la producción de β -lactamasas que degradan hidrolíticamente el anillo β -lactámico de la penicilina. Varios autores han informado los patrones de resistencia a los antibióticos, como se muestra en la figura 1. De hecho, se ha propuesto que el uso generalizado de la penicilina, en lugar de la introducción de la meticilina, fue responsable del desarrollo de MRSA (19).

El uso extensivo de productos farmacéuticos veterinarios supone un enorme riesgo para la salud pública, que no sólo provoca la aparición y propagación de bacterias resistentes, sino también otros daños a los seres humanos, los animales y el medio ambiente. Tanto en medicina humana como veterinaria, los antibióticos se utilizan para tratar y prevenir enfermedades. Los antibióticos se definen como compuestos naturales, semisintéticos y sintéticos con actividad antimicrobiana que pueden aplicarse por vía parenteral, oral o tópica (46).

Hoy en día, son de particular preocupación en la medicina humana y veterinaria los organismos multirresistentes que, según lo definen Coombs et al.,²² muestran resistencia in vitro a al menos tres clases diferentes de antimicrobianos, además de los antibióticos β -lactámicos (47).

Los patrones de resistencia a los antimicrobianos de *S. intermedius* aislados de perros y gatos parecen variar según su origen geográfico. Estudios realizados en Europa y Japón han demostrado que la resistencia de los aislados de *S. intermedius* de infecciones de piel y oído caninos se ha mantenido relativamente estable durante los últimos 25 años, y se dispone de antimicrobianos eficaces para uso sistémico para la mayoría de dichas infecciones. Por el contrario, informes de EE. UU. han destacado una mayor resistencia a los antimicrobianos entre los aislados de estafilococos de infección canina, incluida la resistencia a la meticilina, las fluoroquinolonas y varios otros agentes antimicrobianos de aislados clínicos (47).

El uso de antimicrobianos en cualquiera de estos sectores puede aumentar la carga de RAM. Debido a la creciente popularidad de las mascotas domésticas, la

probabilidad de contacto cercano entre los dueños de mascotas y las mascotas está aumentando (18).

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una amenaza para la salud humana y animal. Las bacterias se consideran multirresistentes si han adquirido la no sensibilidad a al menos un agente en tres o más categorías de antimicrobianos (48).

Cabe destacar que los genes de resistencia se localizan principalmente en elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones, integrones, casetes de genes y bacteriófagos, transportando indirectamente la capacidad de resistencia de microorganismos no patógenos a microorganismos patógenos. Sólo menos del 5% de la resistencia a los antibióticos se localiza en determinantes cromosómicos (46).

Los antibióticos son muy utilizados en la práctica clínica de los animales de compañía, considerando que el número de mascotas ha ido creciendo sustancialmente en las últimas décadas y la gente pide el mismo nivel de cuidado y curación que se espera de un miembro de la familia representan un punto crucial en la transmisión de la RAM a través del contacto directo, mordeduras, rasguños y lamidos y considerando que comparten estilos de vida, hábitos y espacios con sus dueños (44).

Como ya se ha establecido para otras fuentes, también el uso indiscriminado o excesivo de antibióticos en los últimos años ha mejorado enormemente la RAM, lo que ha resultado en una fuerte presión selectiva con una sensibilidad reducida o la adquisición de resistencia a varias familias de antimicrobianos al mismo tiempo. Esto puede comprometer el éxito terapéutico en animales de compañía, una pérdida de dinero y tiempo para los propietarios y un aumento de la tasa de mortalidad (44).

3.6 Los mecanismos de resistencia a los antibióticos

3.6.1 Disminución de la permeabilidad

La limitación en la captación de medicamentos por parte de las bacterias Gram-negativas se debe a que son intrínsecamente menos permeables a ciertos

antibióticos que las bacterias Gram-positivas. Esto se debe a que su membrana externa crea una barrera de permeabilidad debido a la presencia de una capa de lipopolisacáridos (LPS). Un ejemplo de esta limitación es que los antibióticos glicopéptidos, como la vancomicina, no son efectivos contra las bacterias Gram-negativas. Las moléculas polares encuentran dificultades al ingresar a la pared celular de los enterococos debido a la regulación a la baja de los canales de porina o incluso a la sustitución por canales no selectivos, lo que confiere una tolerancia inherente a los aminoglucósidos (49).

3.6.2 Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo bacteriano transportan activamente muchos antibióticos fuera de la célula y son contribuyentes importantes a la resistencia intrínseca de las bacterias Gram-negativas a muchos de los medicamentos que se utilizan para tratar infecciones bacterianas Gram-positivas. Cuando se sobreexpresan, las bombas de eflujo también pueden conferir niveles elevados de resistencia a antibióticos que previamente eran clínicamente útiles. Algunas bombas de eflujo tienen especificidad de sustrato estrecha (por ejemplo, las bombas Tet), pero muchas transportan una amplia variedad de sustratos estructuralmente diferentes y se conocen como bombas de eflujo de resistencia a múltiples fármacos (50).

3.6.3 Modificación de la molécula blanco

La modificación del objetivo de los antibióticos es un mecanismo común mediante el cual las bacterias desarrollan resistencia a los antibióticos. Los cambios en la disposición y/o cantidad de las proteínas de unión a la penicilina (PBPs) son uno de los mecanismos de resistencia hacia los fármacos de tipo β -lactámico. La cantidad de fármaco que puede unirse al objetivo se ve afectada por cambios en el número de PBPs. Una alteración estructural, como el desarrollo del gen *mecA* en *S. aureus*, reducirá o prevenirá por completo la unión del fármaco (51).

Otro ejemplo es la familia de genes de metilasa de ribosomas de eritromicina (*erm*), que metila el ARNr 16S y cambia el sitio de unión del fármaco, bloqueando la unión

de macrólidos, estreptograminas y lincosaminas. La resistencia a fármacos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos, como las fluoroquinolonas, se produce mediante cambios en la DNA girasa o la topoisomerasa IV. Estas mutaciones alteran la composición de la girasa y la topoisomerasa, reduciendo o excluyendo la capacidad del fármaco de unirse a estos componentes (50).

3.6.4 Modificación directa del antibiótico

Las bacterias pueden generar enzimas que pueden unir diversos grupos químicos a los medicamentos. Esto impide que el antibiótico se una a su objetivo dentro de la célula bacteriana. La transferencia de grupos fosforilo, acetilo y adenilo al compuesto es el método más efectivo de inactivación del medicamento mediante la transferencia de grupos químicos. La acetilación es el mecanismo más utilizado, siendo considerada para su uso tanto con aminoglucósidos, cloranfenicol, estreptograminas y fluoroquinolonas (52). Se cree que los aminoglicósidos son blanco de adenilación y fosforilación. La participación de enzimas modificadoras de aminoglicósidos (AMEs) altera covalentemente los grupos hidroxilo o amino de la molécula de aminoglicósido y la vuelve inactiva. Es uno de los mejores ejemplos de resistencia mediante la modificación del fármaco (53).

3.7 La resistencia a antibióticos en *S. pseudintermedius*

La resistencia a la meticilina indica una resistencia general a los betalactámicos, y esta propiedad genera importantes desafíos terapéuticos y de control de infecciones. Al igual que en *S. aureus*, la resistencia a la meticilina en *S. pseudintermedius* es codificado también por el gen *mecA*. Su producto génico es una proteína PBP modificada que tiene una baja afinidad por la mayoría de los betalactámicos (54).

En general, se puede establecer que la mayoría de las infecciones por estafilococos se pueden controlar fácilmente con antibióticos; sin embargo, en los últimos años diferentes cepas de *Staphylococcus spp.* han demostrado ser resistentes a los más comúnmente utilizados antibióticos como macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas,

gentamicina, cefalosporinas y otros B-lactámicos. La resistencia más relevante en *Staphylococcus* es la resistencia a la meticilina mediada por *mecA*, que está distribuida a nivel mundial, volviendo ineficaces los más utilizados y eficientes clase de antimicrobianos para tratar infecciones estafilocócicas (6).

Los estafilococos resistentes a la meticilina (MRS) albergan una proteína de unión a la penicilina adicional (PBP2a, codificada por *mecA* o *mecC*), que confiere resistencia a los antibióticos betalactámicos al permitir la continuación de pasos esenciales de entrecruzamiento en el proceso de biosíntesis de la pared celular a pesar de la inactivación de otras PBP por betalactámicos (55).

El gen *mecA* está presente en una familia de elementos genéticos estructuralmente complejos designados como SCCmec, que a menudo llevan genes adicionales que confieren resistencia a otros antibióticos y sustancias perjudiciales como metales pesados. Varias líneas de evidencia sugieren que la evolución de SCCmec ocurrió en el grupo *Staphylococcus sciuri*, un grupo primitivo de especies de *Staphylococcus* que son colonizadores frecuentes de la piel de animales domésticos (56).

PBP2a es muy similar a las PBPs nativas codificadas por especies pertenecientes al grupo *S. sciuri*, pero la evolución del gen ancestral *mecA* hacia un determinante de resistencia requirió numerosos cambios genéticos. En concordancia con este hallazgo, parece que el uso generalizado de penicilina y otros beta-lactámicos de primera generación en los años previos a la introducción de la meticilina seleccionó cepas de *S. aureus* que llevan el determinante de resistencia *mecA* (57).

Recientemente se describió un nuevo determinante genético, *mecC*, que codifica una enzima transpeptidasa con solo un 63% de identidad con PBP2a codificada por *mecA* (25). Curiosamente, *mecC*, al igual que *mecA*, parece haber evolucionado en linajes adaptados a animales de *S. aureus*, resaltando la importancia de los estafilococos animales como un reservorio de genes de resistencia que pueden contribuir potencialmente a la evolución de patógenos humanos resistentes a antibióticos (58).

Inicialmente, *S. pseudintermedius* era principalmente susceptible a los antibióticos y no representaba un problema particular para los veterinarios. Sin embargo, desde 2006, *S. pseudintermedius* (MRSP) resistente a la meticilina ha surgido como un patógeno resistente a casi todas las clases de antibióticos disponibles para su uso en perros y representa una amenaza para la terapia con antibióticos en animales pequeños debido a las limitadas opciones de tratamiento (9).

El reciente y rápido aumento de la resistencia a múltiples fármacos y a la meticilina en *S. pseudintermedius* ha generado un mayor interés en el uso de biocidas tópicos para tratar afecciones de la piel canina. Los estudios in vivo e in vitro han mostrado resultados prometedores para el tratamiento tópico de infecciones por *S. pseudintermedius* sensibles y resistentes a la meticilina con biocidas como el gluconato de clorhexidina (59).

En 2007, se detectaron cepas de MRSP resistentes a eritromicina, clindamicina, trimetoprima-sulfametoxazol, gentamicina y levofloxacino en 17 de 57 (30%) perros en una clínica veterinaria en Japón, y la mayoría de los perros habían recibido agentes antimicrobianos en los seis meses anteriores. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para determinar si la terapia antimicrobiana es un factor de riesgo importante para la colonización por MRSP (60).

El análisis de 158 aislamientos de infecciones del tracto respiratorio y de la piel/oidos/boca en perros y gatos en Alemania reveló dos infecciones por MRSP en perros. Ambos aislamientos eran resistentes a los beta-lactámicos, gentamicina, tetraciclina, sulfametoxazol, y uno de los aislamientos también era resistente a cloranfenicol (61). En Suiza, se aislaron MRSP que portaban el gen de la leucocidina lukS-I de tres gatos con infecciones del tracto urinario. Todos los gatos habían sido tratados con beta-lactámicos o fluoroquinolonas, y los aislamientos mostraron resistencia a beta-lactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas y estreptograminas, cloranfenicol, trimetoprim, gentamicina, kanamicina, neomicina y estreptomina (62). Los aislamientos de MRSP multidrogosresistentes representan un desafío para la terapia antimicrobiana en

medicina veterinaria debido a las opciones de tratamiento limitadas en muchos casos.

3.8 Métodos de evaluación de susceptibilidad *in vitro*

3.8.1 El método de difusión en disco o antibiograma

El método de difusión en disco fue descrito por Bauer y Kirby en las décadas de 1950 y 1960. Después de más de 50 años, la difusión con disco sigue siendo un procedimiento ampliamente utilizado para las pruebas o test de susceptibilidad a los antimicrobianos (TSA) en el laboratorio microbiológico clínico (63).

Las directrices nacionales e internacionales se refieren a Kirby-Bauer como una prueba estandarizada, por ejemplo, las directrices del CLSI o del Comité Europeo sobre TSA (EUCAST) para AST. Tradicionalmente, la base de los informes clínicos de TSA es la categorización en susceptible (S), intermedia (I) y resistente (R), en referencia a la probabilidad de éxito clínico. La categoría de susceptibilidad se define como el éxito terapéutico probable de la combinación de especie/fármaco individual analizada si se aplica la dosis estándar recomendada. La categoría intermedia se define como un éxito terapéutico incierto para la combinación de especie/fármaco individual probada por EUCAST y está destinada a compuestos cuya dosificación se puede aumentar (63).

Existen dos variantes principales en los métodos estándar de oro: basado en medio sólido y basado en líquido. El primero utiliza una concentración fija de bacterias, que se distribuyen uniformemente sobre un medio. Después del depósito, se distribuyen sobre el agar discos que contienen una concentración específica de antibiótico y se incuban. Durante la incubación, los antibióticos se difunden parcialmente dentro del medio, inhibiendo el crecimiento bacteriano en las proximidades. Esto produce regiones de inhibición del crecimiento alrededor del disco. El tamaño de las regiones de inhibición se correlaciona inversamente con la concentración de antibiótico. La

medición de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano después de 24 h indica la resistencia de la cepa probada (64).

Finalmente, la variante del medio líquido utiliza el mismo principio de inhibición del crecimiento. Aquí se enriquecen varios tubos o pocillos con una concentración de antibiótico diferente. Dependiendo de la resistencia, el crecimiento es visible o ausente después de 24 h de cultivo. La concentración de antibiótico más baja que inhibió el crecimiento bacteriano es la MIC (64).

3.8.2 Métodos para la determinación del fenotipo de resistencia a meticilina en *S. pseudintermedius*

La mayoría de los laboratorios de diagnóstico veterinario utilizan métodos fenotípicos para la detección de resistencia a la meticilina en estafilococos. Comúnmente, se utiliza oxacilina o cefoxitina como sustituto de la meticilina debido a que es sensible y más estable. Los métodos más comúnmente utilizados son la microdilución en caldo y las pruebas de difusión en disco. Como prueba de detección de la resistencia a la meticilina de *S. pseudintermedius*, la prueba de difusión en disco con cefoxitina utilizando los criterios interpretativos para *S. aureus* conduce a un porcentaje inaceptablemente alto de resultados falsos negativos y se ha informado que es inapropiada. En 2008, el CLSI publicó el documento M31-A3, con nuevos criterios interpretativos para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana in vitro de MRSP para aislamientos de animales, para reemplazar los de 2004 (65).

Esta guía sugiere que la susceptibilidad a la oxacilina de los estafilococos coagulasa-positivos veterinarios, como *S. pseudintermedius*, debe determinarse utilizando puntos de corte clínicos equivalentes a los recomendados para aislamientos humanos y veterinarios de *S. aureus* (es decir, ≥ 4 mg/L para dilución en agar y caldo, y ≤ 10 mm para difusión en disco). Es importante tener en cuenta que estos criterios interpretativos no logran detectar la resistencia a la meticilina en algunos aislamientos de *S. pseudintermedius* positivos para *mecA* (66).

Un valor de CIM de oxacilina ≥ 0.5 mg/L (dilución en agar y caldo) y un diámetro de zona ≤ 17 mm alrededor de un disco de oxacilina de 1 mg (difusión en disco) utilizado para estafilococos coagulasa-negativos (CNS) están altamente correlacionados con la detección de *mecA* en *S. pseudintermedius*. En 2009, el subcomité de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana Veterinaria (VAST) del CLSI reevaluó los criterios interpretativos establecidos en el documento M31-A3 y decidió cambiarlos. Los nuevos criterios interpretativos (punto de corte de la CIM de oxacilina $R \geq 0.5$ mg/L; difusión en disco $R \leq 17$ mm) se incluyeron en el documento M31-A4 (67).

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la susceptibilidad *in vitro* de cepas de *S. pseudintermedius* en muestras provenientes de pacientes caninos de la ciudad de Tecamachalco y la ciudad de Puebla

4.1 Objetivos particulares

- 1) Aislar e identificar a *S. pseudintermedius* a partir de muestras de hisopado nasal de perros
- 2) Evaluar mediante pruebas fenotípicas *in vitro* la susceptibilidad a diferentes antibióticos de las cepas de *S. pseudintermedius*
- 3) Determinar la presencia del fenotipo MRSP en las cepas obtenidas

5. JUSTIFICACIÓN

Existen importantes preocupaciones de salud pública sobre MRSP en mascotas, la mayoría de las cuales solo se han investigado de manera preliminar. Los estafilococos resistentes a la meticilina serán un desafío considerable para la profesión veterinaria. Las infecciones estafilocócicas resistentes a la meticilina, este caso de *staphylococcus pseudintermedius*, son causas importantes de morbilidad y mortalidad en animales de compañía y pueden estar implicadas en la transmisión zoonótica. La mayor preocupación tiene que ver con la posibilidad de que los animales actúen como reservorios de MRSP con la posterior transmisión a los humanos. La resistencia a los antibióticos es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, el uso indebido de estos fármacos en el ser humano y los animales está acelerando este proceso. MRSP, representa un desafío importante en la medicina veterinaria, tanto en términos de salud pública como animal.

Para esto se realiza estudios como este para evaluar la susceptibilidad de MRSP en perros, de medicamentos utilizados en medicina veterinaria y así tener datos sobre estos, para evitar la resistencia antibiótica actualmente, lo cual es un problema importante en la salud animal y salud pública. A partir de esto podemos tener herramientas para poder combatir estas infecciones con tratamientos específicos y debidamente prescritos por médicos veterinarios. El propósito es racionalizar el uso de los antibióticos a fin de disminuir el impacto en la resistencia, además de garantizar la seguridad, eficacia de estos, para aminorar sus complicaciones y disminuir el impacto económico que estos generan en la actualidad.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Aislamiento e Identificación de *Staphylococcus pseudintermedius*

6.1.1 Toma de muestras:

1. Se realizó la toma de muestra en 53 perros
2. La toma de muestra fue por hisopado nasal (muestras dobles)

Criterios de inclusión: pacientes caninos de cualquier edad, raza y sexo

Criterios de exclusión: pacientes recibiendo tratamiento antibiótico o pacientes con tratamiento con antibióticos menor a 15 días de antigüedad

6.1.2 Sembrado

1. Las muestras se sembraron en medio sal manitol por estría cruzada y se incubaron durante 24 horas a 37°C. en la estufa bacteriológica.

6.1.3 Identificación morfológica

1. Las colonias compatibles se identificaron por morfología macroscópica y microscópica (Tinción de Gram)
2. Posteriormente se realizaron las pruebas de catalasa y coagulasa a cada muestra
3. Para realizar la prueba de la catalasa, se tomó con un asa bacteriológica, una colonia aislada del cultivo bacteriano y se colocó sobre un portaobjetos. Sobre ella se agregó una gota de peróxido de hidrógeno. Si el resultado es positivo, se observará la formación de burbujas.
4. Para realizar la prueba de coagulasa, en un portaobjeto se colocó una gota de solución salina y una gota de plasma de forma separada. Se tomó con el asa 1 o 2 colonias puras del microorganismo a probar. Se mezcló la carga bacteriana en la gota de plasma y se repitió la operación en la gota de SSF. Se observaron los resultados de forma inmediata. Un resultado positivo es aquel en donde se observe la formación de un aglutinado macroscópico (precipitado blanco) al cabo de un minuto del lado de la gota con plasma

6.2 Pruebas de susceptibilidad *in vitro* e identificación del fenotipo MRSP

6.2.1 Sembrado

1. Las cepas fueron sembradas en medio TSA y fueron incubadas por 24 horas a 37°C en la estufa bacteriológica.

6.2.2 Prueba de difusión en disco e identificación de las cepas que presenten el fenotipo MRSP

1. Se realizó la preparación de un inóculo que se igualó en turbidez con el tubo 0.5 del estándar de McFarland. ($1,5 \times 10^5$ ufc/ μ l) (108 bacterias por mL.)
2. Luego, con este inóculo se sembraron placas de medio Mueller Hinton.
3. Se colocaron los discos de antibióticos correspondientes Oxacilina 1 μ g, adicionalmente se evaluó la susceptibilidad de 3 familias representativas de antibióticos: sulfametoxazol/trimetoprim (SXT 23.75 μ g/1.25 μ g), amikacina (AN 30 μ g) y tetraciclina (TE 30 μ g), y se incubaron por 24 horas a 37°C en la estufa bacteriológica.
4. Las cepas se clasificaron en sensibles (S), intermedias (I) y resistentes (R) acorde a los diámetros de los halos de inhibición y a los puntos de corte de cada antibiótico
5. La presencia del fenotipo MRSP se determinó en las cepas que se categorizaron como resistentes a oxacilina de acuerdo con los puntos de corte del CLSI (65)

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento e identificación de *S. pseudintermedius*

Se obtuvieron 53 muestras de pacientes caninos durante el periodo contemplado para el muestreo. Las características generales de los pacientes se muestran en la Tabla 1. De estas, el 45.2% (24/53) se identificaron como *Staphylococcus pseudintermedius* de acuerdo con las pruebas fenotípicas.

7.2 Pruebas de susceptibilidad *in vitro* e identificación del fenotipo MRSP

Con respecto al patrón de susceptibilidad *in vitro* mostrado contra las 4 familias de antibióticos probadas, se encontró que el 66.7% de las cepas de *S. pseudintermedius* (16/24) fueron resistentes a oxacilina. La resistencia a este antibiótico se usa como un valor predictivo de la presencia del gen *mecA*, y por lo tanto, del fenotipo MRSP. En cuanto a los otros antibióticos, se demostró una resistencia del 33.3 (8/24); a amikacina se encontró una sensibilidad del 100% (24/24) y contra trimetoprim/sulfametoxazol el 8.3% de resistencia (2/24) (Grafica 1).

En el Grafico 2 se puede observar un comparativo entre los patrones de resistencia de las cepas MRSP con respecto a las no MRSP, donde destaca desde luego, la resistencia a oxacilina en todas las cepas MRSP (24/24) y la resistencia a tetraciclina en estas mismas cepas con el 87.5% (7/8) contra el 13.5% (1/8) de resistencia que mostraron las cepas no MRSA. En contraste, no se encontró ninguna cepa resistente a la amikacina.

Para conocer si existían cepas multirresistentes en los aislados MRSP y no MRSP (determinada como cepa multirresistente aquella que presenta resistencia a un antibiótico de por lo menos 3 familias diferentes) se contabilizo de manera individual la resistencia de cada cepa (Grafico 3) y se halló una sola cepa multirresistente (cepa M23 MRSP).

Cepa	Tipo de muestra	Raza	Sexo	Edad
	Hisopado nasal	schnauzer	hembra	6 meses
M18	Hisopado nasal	mestizo	macho	4 meses
M19	Hisopado nasal	mestizo	macho	2 años
M19	Hisopado nasal	mestizo	hembra	1 año
M20	Hisopado nasal	cocker	macho	3 años
M22	Hisopado nasal	pastor belga	macho	3 años
M23	Hisopado nasal	labrador	macho	4 años
M24	Hisopado nasal	poodle	macho	6 meses
M25	Hisopado nasal	maltes	macho	4 años
M26	Hisopado nasal	mestizo	hembra	2 años
M27	Hisopado nasal	mestizo	macho	10 años
M28	Hisopado nasal	mestizo	macho	7 años
M31	Hisopado otico	labrador	hembra	8 años
M33	Hisopado nasal	pastor aleman	hembra	3 años
M34	Hisopado nasal	mestizo	macho	2 años
M35	Hisopado nasal	beagle	macho	4 años
M36	Hisopado nasal	mestizo	macho	7 meses
M39	Hisopado nasal	Chihuahua	macho	6 meses
M45	Hisopado nasal	boxer	macho	6 años
M46	Hisopado nasal	poodle	hembra	3 años
M47	Hisopado nasal	poodle	hembra	2 años
M48	Hisopado nasal	mestizo	hembra	5 años
M50	Pustula	pastor aleman	macho	3 años
M51	Hisopado nasal	mestizo	hembra	8 años
M52	Hisopado nasal	mestizo	macho	3 años

Tabla 1. Características generales de los pacientes caninos muestreados para este estudio

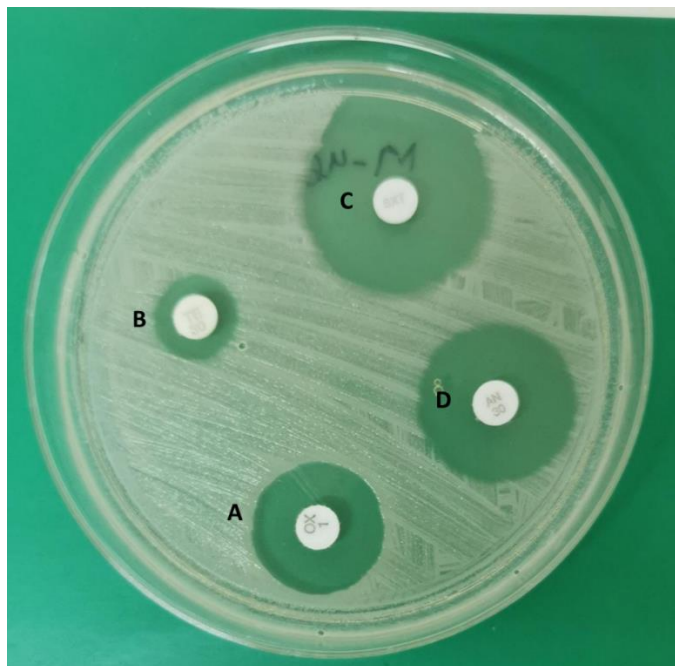


Figura 1. Antibiograma de la cepa de *Staphylococcus pseudintermedius* M46, mostrando resistencia a oxacilina (A) siendo compatible con el fenotipo MRSP. También se observa resistencia a tetraciclina (B), sensibilidad a trimetoprim/sulfametoxazol (C) y amikacina (D)

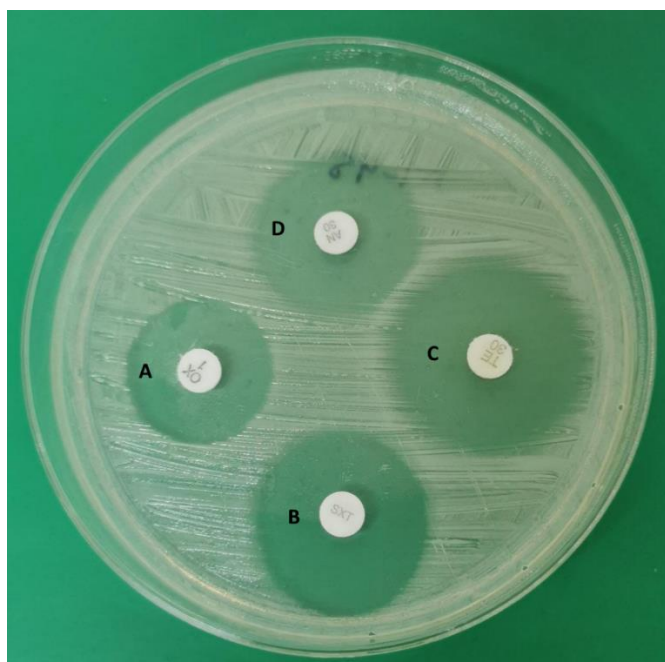


Figura 2. Antibiograma de la cepa de *Staphylococcus pseudintermedius* M45, mostrando resistencia a oxacilina (A) siendo compatible con el fenotipo MRSP. También se observa sensibilidad a tetraciclina (C), trimetoprim/sulfametoxazol (D) y amikacina (B)

Cepa	OX	AN	SXT	TE
M52	S	S	S	S
M50	R	S	S	S
M51	R	S	S	S
M19	R	S	S	R
M20	S	S	I	S
M22	R	S	S	S
M24	R	S	S	I
M25	R	S	S	S
M23	R	S	R	R
M26	R	S	S	I
M31	R	S	S	R
M19	R	S	S	R
M48	R	S	I	S
M27	S	S	S	S
M28	R	S	S	R
M36	R	S	I	R
M39	R	S	S	R
M45	S	S	S	S
M18	S	S	S	S
M33	S	S	S	S
M34	R	S	S	S
M35	S	S	R	S
M46	S	S	S	R
M47	R	S	I	S

Figura 3. Patrón de susceptibilidad de las cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* aisladas de perros

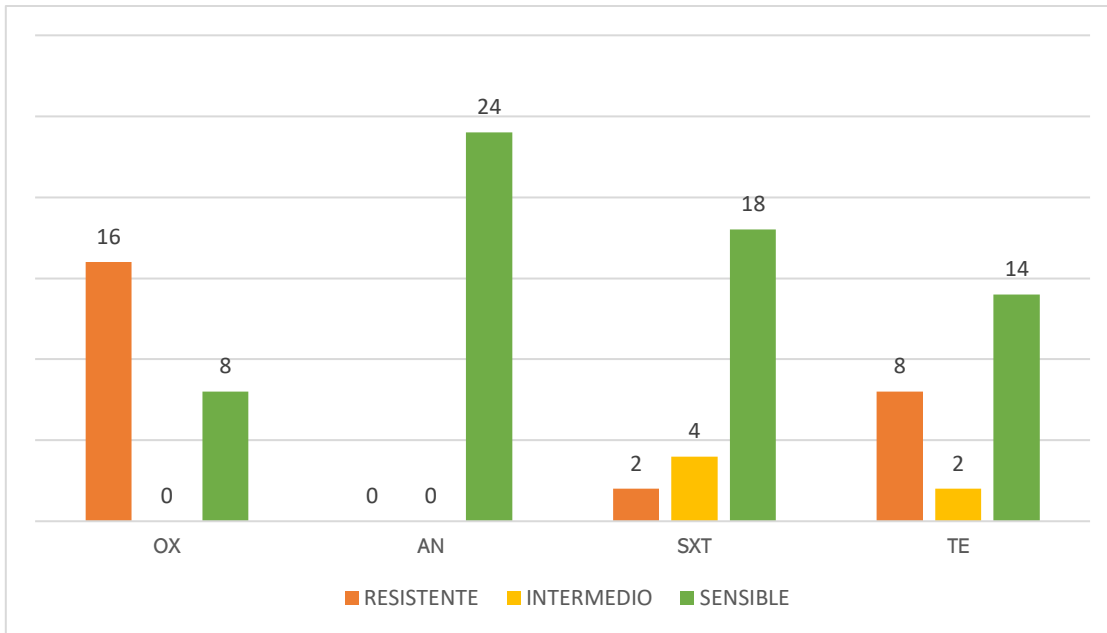


Gráfico 1. Susceptibilidad de las familias de antibióticos, de las cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* aisladas de perros

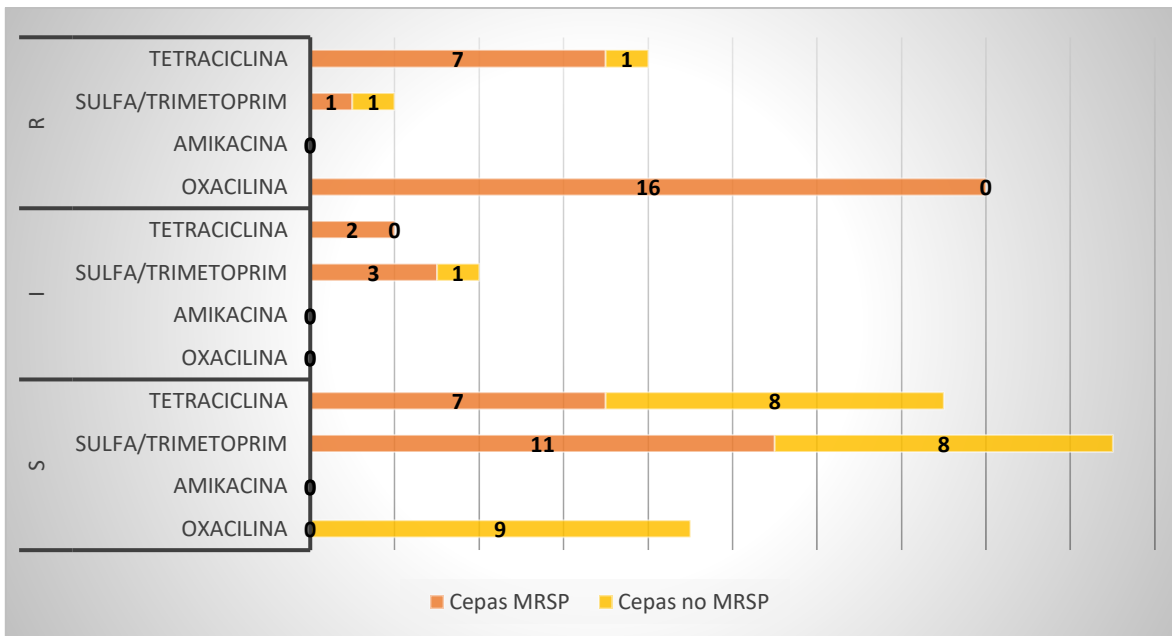


Gráfico 2. Diferencia en el patrón de resistencia a los antibióticos probados entre las cepas MRSP y las no MRSP

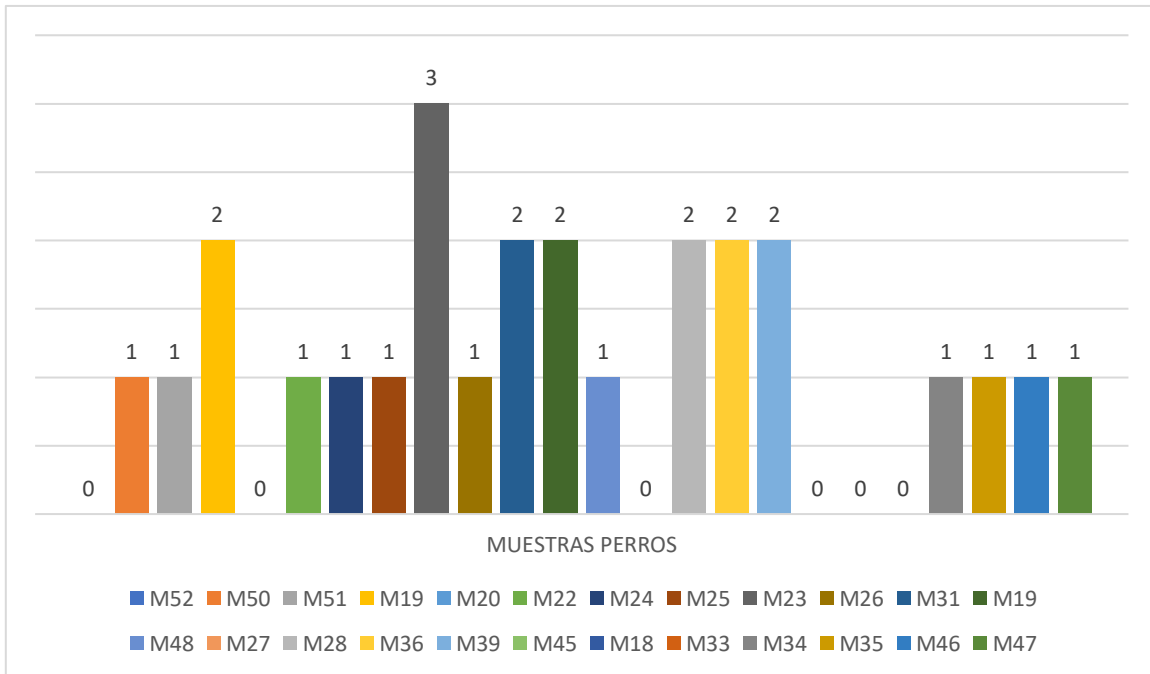


Gráfico 3. Número de familias de antibióticos a las cuales son resistentes las cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* aisladas de perros

8. DISCUSION

La presencia de MRSP en pacientes caninos sanos es de gran importancia médica. *S. pseudintermedius* forma parte de la microbiota normal de la piel de los perros, sin embargo, tiene un gran papel como organismo oportunista y agente zoonótico con gran capacidad para colonizar organismos humanos. En los últimos 50 años ha incrementado el número de mascotas, y su papel como miembros de una familia se ha transformado considerablemente, provocando una mayor interacción perrohumano, propiciando una ruptura de la barrera intrahumana. Esto brinda condiciones adecuadas para la transmisión entre especies de bacterias resistentes y sus genes de resistencia (32).

En este trabajo, se encontró un 66% de cepas positivas al fenotipo MRSP. En una investigación en Alemania, se encontró solo el 0.45% de cepas MRSP, a pesar de que el número de muestras en dicho trabajo fue bastante más alto (68). En China, un muestreo encontró un 47.9% de bacterias MRSP en mascotas, lo cual es cercano a lo hallado en este análisis (69). En 2018, Duim y colaboradores en Holanda, buscaron el fenotipo MRSP en pacientes caninos, encontrándolo en el 50.7% de las muestras, cantidad parecida a la de este trabajo y a otros similares (70). Kadlec en Tailandia, estudió muestras de caninos y felinos, reportando un 28% y 42% respectivamente de cepas MRSP (71). También en Argentina se han llevado a cabo estudios de esta naturaleza, Vigo *et al* solo reportaron un 10% de cepas MRSP a partir de muestras clínicas de caninos (72).

En general, los porcentajes de aislamientos positivos MRSP en este trabajo se asemejan a los reportes de otros países, aunque se puede apreciar una posible tendencia al alza. No suele ser fácil hacer comparaciones entre diferentes estudios, ya que la prevalencia de MRSP varía dependiendo no sólo de la región geográfica sino también de la localización de la muestra y de la población estudiada. Por ejemplo, en pioderma se encuentran tasas de MRSP más altas que en otras manifestaciones clínicas (73). A pesar de estas dificultades, es imprescindible marcar parámetros en el estado de la resistencia de una especie bacteriana

importante, como lo es MRSP en perros. Asimismo, Soimala y colaboradores aislaron 3 cepas MRSP de caninos, las cuales provenían de pacientes con conjuntivitis, y uveítis, aunque dichas cepas solo representaron el 7% de los aislamientos de *Staphylococcus pseudintermedius* (74).

Con respecto al perfil de resistencia que mostraron las cepas MRSP a los demás antibióticos examinados, se encontró que el 33% (8/24) fueron resistentes a tetraciclina y el 25% (6/24) a sulfametoxazol/trimetoprim, hallazgos parecidos a los reportados por Rota (35). (15% para tetraciclina y 23% para trimetoprim/sulfas), sin embargo, cabe destacar que en dicho trabajo se usaron muestras vaginales y de leche en lugar de los hisopados rectales. Es de resaltar también que el 100% de las cepas resultaron sensibles al aminoglucósido probado, lo que mantiene una ventana de posibilidad al momento de seleccionar una alternativa de tratamiento.

La identificación del fenotipo MRSP por medio del uso de discos de oxacilina ha demostrado tener gran sensibilidad en muestras de pacientes caninos, y estudios han demostrado que no existe una diferencia significativa en el rendimiento al predecir la resistencia a meticilina entre el uso de la difusión en disco y pruebas moleculares como la PCR (75). Existe entonces la posibilidad de implementar y mejorar esta metodología en un sistema de monitoreo que permita tener un panorama más claro de los perfiles de resistencia locales de los cocos Gram positivos, lo cual incrementaría a su vez las posibilidades de éxito en los casos de infección por MRSP.

9. CONCLUSIONES

- Este estudio es uno de los primeros en su clase que reporta la existencia de cepas MRSP en caninos domésticos en la ciudad de Puebla, México.
- Las cepas MRSP aisladas de caninos domésticos mostraron un perfil de sensibilidad aceptable, que posibilitaría opciones terapéuticas, a pesar de que estas cepas suelen mostrar patrones de multirresistencia y a pesar de ser resistentes a los betalactámicos
- La presencia de cepas MRSP en animales que tienen una función como animales de compañía puede representar un posible foco de transmisión y transferencia de genes de resistencia a bacterias de humanos
- Se requieren estudios similares de monitoreo con un mayor número de muestras y en más zonas geográficas del estado de Puebla que permitan trazar un perfil más preciso del estado de la resistencia de los cocos gram positivos más comunes en perros y otros animales de compañía y el efecto que esta presencia pueda tener en la salud humana

10. BIBLIOGRAFIA

1. Weese JS, van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. enero de 2010;140(3-4):418-29.
2. Loeffler A, Linek M, Moodley A, Guardabassi L, Sung JML, Winkler M, et al. First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Vet Dermatol*. diciembre de 2007;18(6):412-21.
3. Devriese LA, Hermans K, Baele M, Haesebrouck F. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Microbiology*. enero de 2009;133(1-2):206-7.
4. Rota A, Milani C, Drigo I, Drigo M, Corrò M. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from breeding dogs. *Theriogenology*. enero de 2011;75(1):115-21.
5. Harvey RG, Marples RR, Noble WC. Nasal Carriage of *Staphylococcus intermedius* in Humans in Contact with Dogs. *Microbial Ecology in Health and Disease*. enero de 1994;7(4):225-7.
6. Abusleme F, Galarce N, Quezada-Aguiluz M, Iragüen D, González-Rocha G. Characterization and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococcus* isolated in a veterinary teaching hospital in Chile. *Revista Argentina de Microbiología*. julio de 2022;54(3):192-202.
7. *Veterinary Medicine Sci - 2021 - Rana - Prevalence of coagulase-positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus and.pdf*.
8. Hemeg HA. Determination of phylogenetic relationships among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from infected humans and

Companion Animals. Saudi Journal of Biological Sciences. abril de 2021;28(4):2098-101.

9. Haenni M, De Moraes NA, Châtre P, Médaille C, Moodley A, Madec JY. Characterisation of clinical canine meticillin-resistant and meticillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* in France. Journal of Global Antimicrobial Resistance. junio de 2014;2(2):119-23.
10. Allaker RP, Lloyd DH, Simpson AI. Occurrence of *Staphylococcus intermedius* on the hair and skin of normal dogs. Research in Veterinary Science. marzo de 1992;52(2):174-6.
11. Fazakerley J, Nuttall T, Sales D, Schmidt V, Carter SD, Hart CA, et al. Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. Veterinary Dermatology. junio de 2009;20(3):179-84.
12. Wegener A, Broens EM, Van Der Graaf-van Bloois L, Zomer AL, Visser CE, Van Zeijl J, et al. Absence of Host-Specific Genes in Canine and Human *Staphylococcus pseudintermedius* as Inferred from Comparative Genomics. Antibiotics. 14 de julio de 2021;10(7):854.
13. Bannoehr J, Guardabassi L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. Veterinary Dermatology. agosto de 2012;23(4):253.
14. Nagase N, Sasaki A, Yamashita K, Shimizu A, Wakita Y, Kitai S, et al. Isolation and Species Distribution of Staphylococci from Animal and Human Skin. J Vet Med Sci. 2002;64(3):245-50.
15. Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. Reclassification of Phenotypically Identified *Staphylococcus intermedius* Strains. J Clin Microbiol. septiembre de 2007;45(9):2770-8.

16. Futagawa-Saito K, Ba-Thein W, Sakurai N, Fukuyasu T. Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. *BMC Vet Res.* diciembre de 2006;2(1):4.
17. Maali Y, Badiou C, Martins-Simões P, Hodille E, Bes M, Vandenesch F, et al. Understanding the Virulence of *Staphylococcus pseudintermedius*: A Major Role of Pore-Forming Toxins. *Front Cell Infect Microbiol.* 28 de junio de 2018;8:221.
18. Jin M, Osman M, Green BA, Yang Y, Ahuja A, Lu Z, et al. Evidence for the transmission of antimicrobial resistant bacteria between humans and companion animals: A scoping review. *One Health.* diciembre de 2023;17:100593.
19. Singh S, Numan A, Somaily HH, Gorain B, Ranjan S, Rilla K, et al. Nano-enabled strategies to combat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Materials Science and Engineering: C.* octubre de 2021;129:112384.
20. Ventrella G, Moodley A, Grandolfo E, Parisi A, Corrente M, Buonavoglia D, et al. Frequency, antimicrobial susceptibility and clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in canine clinical samples submitted to a veterinary diagnostic laboratory in Italy: A 3-year retrospective investigation. *Veterinary Microbiology.* noviembre de 2017;211:103-6.
21. Haenni M, Châtre P, Keck N, Franco A, Battisti A, Madec JY. Hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a French veterinary hospital. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* diciembre de 2013;1(4):225-7.
22. Duim B, Verstappen KMH, Kalupahana RS, Ranathunga L, Fluit AC, Wagenaar JA. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs in the description of novel SCCmec variants. *Veterinary Microbiology.* enero de 2018;213:136-41.

23. Weese JS, Van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. enero de 2010;140(3-4):418-29.
24. Black CC, Eberlein LC, Solyman SM, Wilkes RP, Hartmann FA, Rohrbach BW, et al. The role of *mecA* and *blaZ* regulatory elements in *mecA* expression by regional clones of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Microbiology*. agosto de 2011;151(3-4):345-53.
25. Van Duijkeren E, Catry B, Greko C, Moreno MA, Pomba MC, Pyorala S, et al. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 de diciembre de 2011;66(12):2705-14.
26. Phophi L, Abouelkhair MA, Jones R, Zehr J, Kania SA. Temporal changes in antibiotic resistance and population structure of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between 2010 and 2021 in the United States. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. septiembre de 2023;100:102028.
27. Feßler AT, Schuenemann R, Kadlec K, Hensel V, Brombach J, Murugaiyan J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) among employees and in the environment of a small animal hospital. *Veterinary Microbiology*. julio de 2018;221:153-8.
28. Yang C, Wan MT, Lauderdale TL, Yeh KS, Chen C, Hsiao YH, et al. Molecular characteristics of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* harboring arginine catabolic mobile element (ACME) from dogs and cats. *The Veterinary Journal*. junio de 2017;224:46-9.
29. Bierowiec K, Miszczak M, Korzeniowska-Kowal A, Wzorek A, Płókarz D, Gamian A. Epidemiology of *Staphylococcus pseudintermedius* in cats in Poland. *Sci Rep*. 23 de septiembre de 2021;11(1):18898.

30. Wetzels SU, Strachan CR, Conrady B, Wagner M, Burgener IA, Virányi Z, et al. Wolves, dogs and humans in regular contact can mutually impact each other's skin microbiota. *Sci Rep*. 24 de agosto de 2021;11(1):17106.
31. Moses IB, Esimone CO, Iroha IR, Rubin JE, Sniatynsky MK, Ribeiro ÁCDS, et al. Antibiotypes and high frequency of toxin genes in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from nares of dogs and dog guardians in Nigeria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. octubre de 2022;89:101870.
32. Giacoboni GI, Gagetti P. *Staphylococcus pseudintermedius* y el enfoque de Una Salud. *VE*. 16 de diciembre de 2020;40(2):052.
33. Griffeth GC, Morris DO, Abraham JL, Shofer FS, Rankin SC. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Veterinary Dermatology*. junio de 2008;19(3):142-9.
34. Wang Y, Yang J, Logue CM, Liu K, Cao X, Zhang W, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine pyoderma in North China: MRSP isolated from canine pyoderma. *Journal of Applied Microbiology*. abril de 2012;112(4):623-30.
35. Rota A, Milani C, Drigo I, Drigo M, Corró M. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from breeding dogs. *Theriogenology*. enero de 2011;75(1):115-21.
36. Lynch SA, Helbig KJ. The Complex Diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in Canines: Where to Next? *Veterinary Sciences*. 18 de enero de 2021;8(1):11.
37. Newman AM, Arshad M. The Role of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics in Combating Multidrug-Resistant Organisms. *Clinical Therapeutics*. septiembre de 2020;42(9):1637-48.

38. Carroll KC, Burnham CAD, Westblade LF. From canines to humans: Clinical importance of *Staphylococcus pseudintermedius*. Kline KA, editor. *PLoS Pathog.* 2 de diciembre de 2021;17(12):e1009961.
39. Worthing KA, Brown J, Gerber L, Trott DJ, Abraham S, Norris JM. Methicillin-resistant staphylococci amongst veterinary personnel, personnel-owned pets, patients and the hospital environment of two small animal veterinary hospitals. *Veterinary Microbiology.* septiembre de 2018;223:79-85.
40. Souza-Silva T, Rossi CC, Andrade-Oliveira AL, Vilar LC, Pereira MF, Penna BDA, et al. Interspecies transfer of plasmid-borne gentamicin resistance between *Staphylococcus* isolated from domestic dogs to *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution.* marzo de 2022;98:105230.
41. Alanis AJ. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research.* noviembre de 2005;36(6):697-705.
42. MacGowan A, Macnaughton E. Antibiotic resistance. *Medicine.* octubre de 2017;45(10):622-8.
43. MacGowan AP, on behalf of the BSAC Working Parties on Resistance Surveillance. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1 de noviembre de 2008;62(Supplement 2):ii105-14.
44. Vercelli C, Gambino G, Amadori M, Re G. Implications of Veterinary Medicine in the comprehension and stewardship of antimicrobial resistance phenomenon. From the origin till nowadays. *Veterinary and Animal Science.* junio de 2022;16:100249.
45. Aslam B, Khurshid M, Arshad MI, Muzammil S, Rasool M, Yasmeen N, et al. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Front Cell Infect Microbiol.* 25 de noviembre de 2021;11:771510.

46. Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*. enero de 2008;8(1):1-13.
47. Loeffler A, Linek M, Moodley A, Guardabassi L, Sung JML, Winkler M, et al. First report of multiresistant, *mecA* -positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Veterinary Dermatology*. diciembre de 2007;18(6):412-21.
48. Dazio V, Nigg A, Schmidt JS, Brilhante M, Campos-Madueno EI, Mauri N, et al. Duration of carriage of multidrug-resistant bacteria in dogs and cats in veterinary care and co-carriage with their owners. *One Health*. diciembre de 2021;13:100322.
49. Uddin TM, Chakraborty AJ, Khusro A, Zidan BRM, Mitra S, Emran TB, et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*. diciembre de 2021;14(12):1750-66.
50. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. enero de 2015;13(1):42-51.
51. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. agosto de 2016;6(8):a025247.
52. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. En: Kudva IT, Cornick NA, Plummer PJ, Zhang Q, Nicholson TL, Bannantine JP, et al., editores. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens* [Internet]. Washington, DC, USA: ASM Press; 2016 [citado 9 de diciembre de 2023]. p. 481-511. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1128/9781555819286.ch17>
53. Lin J, Nishino K, Roberts MC, Tolmasky M, Aminov RI, Zhang L. Mechanisms of antibiotic resistance. *Front Microbiol* [Internet]. 5 de febrero de 2015 [citado 9

de diciembre de 2023];6. Disponible en:
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00034/abstract>

54. Krapf M, Müller E, Reissig A, Slickers P, Braun SD, Müller E, et al. Molecular characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs and the description of their SCCmec elements. *Veterinary Microbiology*. junio de 2019;233:196-203.
55. Walther B, Tedin K, Lübke-Becker A. Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. *Veterinary Microbiology*. febrero de 2017;200:71-8.
56. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A New Class of Genetic Element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. junio de 2000;44(6):1549-55.
57. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*. agosto de 2011;11(8):595-603.
58. Vestergaard M, Frees D, Ingmer H. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Braunstein M, Rood JI, editores. *Microbiol Spectr*. 12 de abril de 2019;7(2):7.2.18.
59. Worthing KA, Marcus A, Abraham S, Trott DJ, Norris JM. Qac genes and biocide tolerance in clinical veterinary methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Microbiology*. marzo de 2018;216:153-8.
60. Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a Veterinary Teaching Hospital. *J Clin Microbiol*. abril de 2007;45(4):1118-25.

61. Schwarz S, Kadlec K, Strommenger B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004-2006 in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 19 de diciembre de 2007;61(2):282-5.
62. Wettstein K, Descloux S, Rossano A, Perreten V. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Switzerland: Three cases of urinary tract infections in cats. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*. 1 de julio de 2008;150(7):339-43.
63. Hombach M, Böttger EC, Roos M. The critical influence of the intermediate category on interpretation errors in revised EUCAST and CLSI antimicrobial susceptibility testing guidelines. *Clinical Microbiology and Infection*. febrero de 2013;19(2):E59-71.
64. Dietvorst J, Vilaplana L, Uria N, Marco MP, Muñoz-Berbel X. Current and near-future technologies for antibiotic susceptibility testing and resistant bacteria detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. junio de 2020;127:115891.
65. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)/ National Committee for Clinical and Laboratory Standards, (NCCLS). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. M100. CLSI/NCCLS; 2023.
66. Bemis DA, Jones RD, Frank LA, Kania SA. Evaluation of Susceptibility Test Breakpoints Used to Predict *mecA* -Mediated Resistance in *Staphylococcus Pseudintermedius* Isolated from Dogs. *J VET Diagn Invest*. enero de 2009;21(1):53-8.
67. Proposed Changes to Clinical Laboratory Standards Institute Interpretive Criteria for Methicillin-Resistant *Staphylococcus Pseudintermedius* Isolated from Dogs. *J VET Diagn Invest*. enero de 2010;22(1):160-160.
68. Ruscher C, Lübke-Becker A, Wleklinski CG, Şoba A, Wieler LH, Walther B. Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated

- from clinical samples of companion animals and equidae. *Veterinary Microbiology*. abril de 2009;136(1-2):197-201.
69. Feng Y, Tian W, Lin D, Luo Q, Zhou Y, Yang T, et al. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in pets from South China. *Veterinary Microbiology*. diciembre de 2012;160(3-4):517-24.
 70. Duim B, Verstappen KMH, Kalupahana RS, Ranathunga L, Fluit AC, Wagenaar JA. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs in the description of novel SCCmec variants. *Veterinary Microbiology*. enero de 2018;213:136-41.
 71. Kadlec K, Weiß S, Wendlandt S, Schwarz S, Tonpitak W. Characterization of canine and feline methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from Thailand. *Veterinary Microbiology*. octubre de 2016;194:93-7.
 72. Vigo GB, Giacoboni GI, Gagetti PS, Pasterán FG, Corso AC. Resistencia antimicrobiana y epidemiología molecular de aislamientos de *Staphylococcus pseudintermedius* de muestras clínicas de caninos. *Revista Argentina de Microbiología*. julio de 2015;47(3):206-11.
 73. Krapf M, Müller E, Reissig A, Slickers P, Braun SD, Müller E, et al. Molecular characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs and the description of their SCCmec elements. *Veterinary Microbiology*. junio de 2019;233:196-203.
 74. Soimala T, Lübke-Becker A, Hanke D, Eichhorn I, Feßler AT, Schwarz S, et al. Molecular and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from ocular surfaces of dogs and cats suffering from ophthalmological diseases. *Veterinary Microbiology*. mayo de 2020;244:108687.
 75. Badger S, Abraham S, O'Dea M, Saputra S, Abraham RJ, Worthing KA, et al. Diagnostic accuracy of phenotypic assays for determining antimicrobial resistance

status in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine clinical cases.
Veterinary Microbiology. julio de 2019;234:101-9.