

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. EN MUESTRAS CLÍNICAS RECOGIDAS DE CÁNIDOS Y FÉLIDOS: ESTUDIO DE SENSIBILIDAD/RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Isolation and identification of *Staphylococcus* spp. In clinical samples collected from canids and felines: antibiotic sensitivity/resistance study

Vidal-Amorós, V., Salinas-Lorente, J., Ortega-Hernández, N.*

Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Murcia, Campus de Excelencia Mare Nostrum, 30100 Espinardo, Murcia (España).

***Autor de correspondencia:** Dra. Nieves Ortega Hernández. Tel.: +34 868881899; fax: +34 868884147; E-mail: nortega@um.es

Tipo de artículo: Trabajos Fin de Grado (Veterinaria)

Recibido: 04/11/2024

Aceptado: 10/12/2024

RESUMEN

El género bacteriano *Staphylococcus* spp. aglutina especies de bacterias muy ubicuas, colonizadores habituales de personas y animales, que ejercen su acción patógena de manera oportunista, en base a factores predisponentes. Dentro del género, las especies más relevantes son *S. aureus* y *S. pseudintermedius*, ambas relacionadas con procesos dermatológicos en el perro. Los estafilococos han desarrollado mecanismos de resistencia a los antibióticos, como el gen *mecA*, que confiere resistencia frente a la meticilina, y con ello a toda la gama de antibióticos β -lactámicos. El riesgo zoonótico de estos microorganismos es elevado, con colonizaciones transitorias que en caso de inmunodepresión u otros factores predisponentes, pueden generar infecciones también en los seres humanos. El objetivo de este estudio es aislar e identificar estafilococos de muestras clínicas de casos veterinarios en cánidos y félidos, para posteriormente realizar el estudio de resistencia a antibióticos, mediante la elaboración de antibiogramas con una selección de antibióticos representativos, y la detección del gen *mecA* mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permita clasificar los estafilococos aislados en

este estudio como sensibles (SSM) o resistentes a la meticilina (SRM), o como multirresistentes. Se aislaron un total de 13 cepas de estafilococos de las 16 muestras analizadas, todas ellas procedentes de cánidos. El diagnóstico microbiológico reveló que un 84.62% de las cepas aisladas eran estafilococos coagulasa positivos (ECP): *S. aureus*/Grupo *Staphylococcus intermedius* (GSI); y el resto (15.38%) fueron estafilococos coagulasa negativos (ECN): *S. lentus* y *S. xylosus*. Se detectaron elevados valores fenotípicos de resistencia antibiótica, especialmente frente a β -lactámicos, donde 100% las cepas aisladas en este estudio resultaron ser resistentes a la penicilina natural, y más del 45% lo fueron a otros antibióticos del mismo grupo. Además, el análisis molecular mediante PCR mostró que el 23.08% de las cepas aisladas de estafilococos eran SRM.

Palabras clave: Estafilococos, perros, resistencia antibiótica, meticilina.

SUMMARY

The bacterial genus *Staphylococcus* spp. includes very ubiquitous bacterial species, common colonisers of humans and animals, which exert their pathogenic action in an opportunistic manner, based on predisposing factors. Within the genus, the most relevant species are *S. aureus* and *S. pseudintermedius*, both related to dermatological processes in dogs. Staphylococci have developed antibiotic resistance mechanisms, such as the *mecA* gene, which confers resistance to methicillin, and thus to the full range of β -lactam antibiotics. The zoonotic risk of these microorganisms is high, with transient colonisations which, in the case of immunosuppression or other predisposing factors, can also lead to infections in humans. The aim of this study is to isolate and identify staphylococci from clinical samples of veterinary cases in canids and felids, in order to subsequently carry out a study of antibiotic resistance, by means of antibiograms with a selection of representative antibiotics, and the detection of the *mecA* gene by polymerase chain reaction (PCR), which allows the staphylococci isolated in this study to be classified as sensitive (MSS) or methicillin-resistant (MRS), or as multi-resistant. A total of 13 staphylococcal isolates were isolated from the 16 samples tested, all from canids. Microbiological diagnosis revealed that 84.62% of the isolates were coagulase-positive staphylococci (CPS): *S. aureus*/*Staphylococcus intermedius* group (SIG); and the rest (15.38%) were coagulase-negative staphylococci (CNS): *S. lentus* and *S. xylosus*. High phenotypic values of antibiotic resistance were detected, especially against β -lactams, where 100% of the strains isolated in this study were resistant to natural penicillin, and more than 45% were resistant to other antibiotics of the same group. In addition, molecular analysis by PCR showed that 23.08% of the staphylococcal isolates were MRS.

Keywords: Staphylococci, dogs, antibiotic resistance, methicillin.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Staphylococcus* tienen forma cocoide, con 0,5-1,5 μ m de diámetro, son Gram positivas, se dividen en más de un plano para agruparse de forma característica en racimos irregulares, son inmóviles y no esporuladas, pero pueden resistir en sus hospedadores y medio ambiente durante largos periodos de tiempo. Son bacterias que resisten un amplio espectro de temperaturas y elevada concentración salina en su medio (Smeltzer y Beenken, 2013). Además, son anaerobias facultativas, oxidasa negativas y catalasa positivas, menos *S. aureus* subsp. *anaerobius* y *S. sacharolyticus*, que no crecen en condiciones aerobias y

son catalasa negativas. Estas características son útiles para diferenciar al género *Staphylococcus* ssp. de otros cocos Gram positivos y catalasa positivos como *Streptococcus* y *Enterococcus* (Smeltzer y Beenken, 2013). Estas bacterias están muy presentes en la naturaleza, colonizando la piel y mucosas, o presentándose transitoriamente en el intestino tanto de mamíferos como de aves (De La Fuente y Orden, 2002). Son patógenos oportunistas, con acción piogénica. El género se divide según la capacidad de producir la enzima coagulasa, considerada factor de virulencia por convertir en el plasma el fibrinógeno en fibrina. Así tenemos los estafilococos coagulasa positivos (ECP), como *S. aureus* y *S. pseudintermedius*, y los estafilococos coagulasa

negativos (ECN), de menor virulencia (Quinn *et al.*, 2019).

La especie más estudiada dentro de este género ha sido *S. aureus*. Esta especie cuenta con una gran variedad de factores de virulencia, como las enzimas: lipasa, hialuronidasa, elastasa o coagulasa, entre otras. Esta última puede hacer que la cantidad de fibrina que produce proteja a las bacterias de la acción fagocítica. También existen componentes en la superficie de la bacteria, como la proteína A, que evita la opsonización y posterior fagocitosis por las células de la respuesta inmunitaria innata (Quinn *et al.*, 2019). Además, puede producir una gran variedad de toxinas como la leucocidina, que provoca lisis de leucocitos, toxinas hemolíticas (alfa, beta, gamma y delta), enterotoxinas (A, B, C, D, E, F), la toxina del síndrome del choque tóxico (TSST-1), que provoca reacciones superantigénicas, y toxinas exfoliativas (A y B), causantes de dermatitis pustulosas (Markey *et al.*, 2013). Por último, se sabe que los neutrófilos, recursos fundamentales en defensa, pueden actuar como “Caballo de Troya” de *S. aureus*. Esto le permite, protegerse de la acción antibiótica, y les capacita para alcanzar otras localizaciones del cuerpo. Este mecanismo patogénico es muy relevante en pacientes inmunodeprimidos (Bongers *et al.*, 2019).

S. aureus coloniza mayoritariamente la piel y mucosas del ser humano, siendo su principal reservorio, pero no el único. Se estima que el 15% de la población es portadora permanente de la bacteria en las fosas nasales, porcentaje que puede ascender hasta el 80% en personal sanitario o personas inmunodeprimidas (Taylor y Unakal, 2017). El espectro de enfermedades que abarca es muy amplio, desde infecciones cutáneas, forúnculos o abscesos entre otros, hasta procesos cardiovasculares o respiratorios; los casos más graves están asociados normalmente a entornos hospitalarios, con tasas de mortalidad en torno al 20% (Cheung *et al.*, 2021). No obstante *S. aureus* afecta también a otras especies animales, generando grandes

pérdidas económicas en producción animal. En ganado bovino de leche, se asocia a cuadros de mamitis, con gran pérdida de la producción lechera, en cunicultura se asocia a casos de mamitis, dermatitis o pododermatitis, y en avicultura a casos de dermatitis gangrenosa o artritis séptica (Haag *et al.*, 2019). En perros y gatos, provoca infecciones supurativas, al igual que *S. pseudintermedius* (Quinn *et al.*, 2019).

El Grupo *Staphylococcus intermedius* (GSI), fue definido el año 2005 tras una reclasificación de las especies pertenecientes a este género, basada en análisis moleculares de varias cepas de origen animal, lo que hizo que se agrupan bajo este término las especies: *S. intermedius*, *S. delphini* y *S. pseudintermedius*, siendo esta última, la especie más prevalente en perros (Ríos *et al.*, 2015). Los hospedadores naturales son el perro y el gato, en los que se describen prevalencias del 46.2% y 6.8%, respectivamente. Esta especie también ha sido aislada en el ser humano, considerándose un hospedador transitorio. Las infecciones principalmente son cutáneas, y abarcan desde foliculitis bacteriana superficial hasta infecciones de estratos más profundos como la celulitis o forunculosis. Además, han sido aisladas también en otitis e infecciones del tracto urinario (Carroll *et al.*, 2021).

En 1988, se aisló de humanos una nueva bacteria con actividad coagulasa negativa, descrita como *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*. Dos años más tarde, fue aislada del meato auditivo externo en perros, la subespecie, coagulasa positiva, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (May *et al.*, 2005). Estas especies han sido reclasificadas como *S. schleiferi* y *S. coagulans*. Es esta última, la que se considera comensal y patógeno oportunista en perros, con reservorio en la piel y canal auditivo externo y causante de piodermas u otitis en cánidos. De forma poco común, también puede causar en personas inmunodeprimidas infecciones oportunistas (Abouelkhair y Kania, 2024).

Los Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN) forman parte de la microbiota habitual de piel y

mucosas de personas y animales, y su incidencia en humanos se ha incrementado en los últimos años debido a cambios poblacionales, como consecuencia del aumento de pacientes prematuros, geriátricos, enfermos crónicos o inmunodeprimidos. Esto ha provocado la aparición de una gran cantidad de infecciones, causadas por microorganismos considerados como no patógenos o de escasa virulencia (Becker *et al.*, 2014). En este grupo se encuentra *S. epidermidis*, que es la especie de estafilococo más aislada en el epitelio humano. Esta bacteria se asocia a contaminaciones intrahospitalarias de dispositivos médicos permanentes, como por ejemplo los catéteres intravenosos o las válvulas protésicas cardíacas (Otto, 2009). También se incluye en este grupo a *S. lentus*, que pertenece al grupo de *S. sciuri*, y que ha sido aislada en procesos infecciosos en personas y animales (Nemeghaire *et al.*, 2014). La especie *S. felis* se descubrió en 1989 a través de muestras aisladas en gatos. Se trata de una bacteria comensal en gatos, que puede provocar infecciones oportunistas como infecciones en piel, tracto urinario u oído externo (Sips *et al.*, 2023). *S. xylosus* es una especie comensal común en mamíferos, pequeños mamíferos o ganado, donde su elevada cantidad explica su presencia en los productos cárnicos. Su aislamiento también ha sido descrito en humanos, aunque de forma menos frecuente (Leroy *et al.*, 2017).

Los antibióticos juegan un papel fundamental en la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas, sin embargo, un uso inadecuado de ellos puede desencadenar cambios en las bacterias que provocan una pérdida de sensibilidad y por tanto dejan de responder a estos medicamentos. El aumento en el número de bacterias resistentes a tratamiento antibiótico está provocando un serio problema a nivel mundial, del que se alerta desde la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Chinemerem Nwobodo *et al.*, 2022). Las infecciones estafilocócicas disminuyeron su gravedad desde el descubrimiento de los antibióticos β -lactámicos, que imposibilitan la síntesis de peptidoglicanos de la pared bacte-

riana (Ríos *et al.*, 2015). Sin embargo, algunas cepas de este género que codifican para el gen *mecA* son capaces de convertir la proteína fijadora de penicilinas (PBP) en una proteína alterada (PBP2), con menor afinidad por estos antibióticos. Estas cepas reciben el nombre de estafilococos resistentes a la meticilina (SRM), dentro de este grupo destacan los *S. aureus* resistentes a la meticilina (SARM) y *S. pseudintermedius* resistentes a la meticilina (SPRM), cepas resistentes a todo el espectro de antibióticos β -lactámicos (Weese y Van Duijkeren, 2010). Partiendo de esta situación surgen dos nuevos problemas: en primer lugar, este gen *mecA* localizado en el casete cromosómico móvil, puede ser transferido de una bacteria del género a otra, creando una nueva cepa de SRM, y por otro lado, es muy común encontrar que estas cepas, además de ser resistentes a los β -lactámicos, lo son también a otras familias de antibióticos, y por tanto se les considere como cepas multirresistentes (Ríos *et al.*, 2015). En la clínica veterinaria, se describen con una frecuencia cada vez más habitual la aparición en perros y gatos de piodermas causados por cepas de SRM, insensibles a los antimicrobianos comúnmente utilizados, lo que dificulta las opciones terapéuticas en infecciones adquiridas (Gould *et al.*, 2020). También, como bacterias comensales, los estafilococos se exponen de forma indirecta a tratamientos antibióticos sistémicos, aunque no sean estas mismas el objetivo del mismo, pudiendo generar cepas resistentes (Gortel, 2020).

Las zoonosis estafilocócicas se producen por una colonización de piel y mucosas, que posteriormente evoluciona a infección cuando existen traumatismos como heridas en la piel. Generalmente en pacientes inmunocompetentes estas infecciones suelen ser superficiales causando abscesos, foliculitis o piodermas. Pero en casos más graves, pueden generalizarse y provocar una bacteriemia desencadenando una neumonía, endocarditis o sinusitis entre otras afecciones (Bauerfeind *et al.*, 2016). En el caso de *S. aureus*, los humanos actúan de reservorio principal para los saltos inte-

respecie. Esta especie, no coloniza comúnmente a perros y gatos, solo de forma transitoria, y las cepas de *S. aureus* aisladas en mascotas tienen su origen mayoritariamente en los propietarios. Esta capacidad de cruzar barreras específicas de cada hospedador se debe a la larga proporción de los elementos genéticos móviles en el genoma de la bacteria (Haag *et al.*, 2019). Al contrario, sucede con *S. pseudintermedius*, donde los humanos son colonizados de forma transitoria a través del contacto con sus mascotas infectadas con esta especie (Carroll *et al.*, 2021). Además, los SRM, podrían ser especialmente prevalentes en lugares con animales enfermos tratados con agentes antimicrobianos, como los hospitales veterinarios (Feßler *et al.*, 2018), o en salones de peluquería canina, a donde pueden acudir pacientes con alteraciones cutáneas y por tanto elevar el riesgo de transmisión (Gould *et al.*, 2020). También, la colonización en personas por SPRM aumenta si están en contacto con una mascota con SPRM oscilando entre el 3-50% en propietarios y veterinarios clínicos (Ríos *et al.*, 2015). Sin embargo, en medicina humana, *S. pseudintermedius* se sigue diagnosticando erróneamente como *S. aureus*, mucho más prevalente en personas. Se recomienda por tanto valorar en el diagnóstico diferencial de infecciones invasivas, en personas que tengan un contacto estrecho con perros, la posibilidad de que sea *S. pseudintermedius* la especie implicada (Wang *et al.*, 2013). En vista de la importancia que ha adquirido en los últimos años la patología causada por estafilococos multirresistentes en diversas especies animales de interés veterinario, la hipótesis de partida de este estudio es que muchas de las infecciones producidas en estas especies animales, especialmente las cutáneas, pueden estar asociadas a estafilococos que presenten resistencia a antibióticos y, por tanto, podrían ser una fuente importante de transmisión a los seres humanos, por el estrecho contacto que existen entre ambos. Por ello, los objetivos de este estudio fueron (I) aislar e identificar microorganismos del género *Staphylococcus* a partir de muestras clínicas cutáneas de cánidos y félidos, (II) analizar sobre las

cepas aisladas los perfiles de sensibilidad/resistencia a antibióticos pertenecientes a diferentes familias, (III) detectar cepas resistentes molecularmente mediante la identificación del gen *mecA* de resistencia a meticilina.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Muestras analizadas

Para el estudio se tomaron muestras de un total de 16 animales domésticos o en cautividad. Las muestras se obtuvieron mediante frotis con escobillones estériles de lesiones dermatológicas representativas, excepto en los casos 1, 3 y 16 (Tabla 1), en los que las muestras se obtuvieron de moco nasal (muestra 1), de un absceso intraabdominal localizado intraoperatoriamente (muestra 3) o de pulmón durante la necropsia del animal (muestra 16). Los escobillones fueron mantenidos en medio de transporte Stuart a 4°C y no más de 48 horas, hasta su siembra en los laboratorios de la Unidad Docente de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Veterinaria de Murcia (Tabla 1). Este estudio no requirió aprobación del Comité de Experimentación Animal, porque la toma de muestra fue realizada por un veterinario durante la exploración clínica de animales que acudieron a consulta y presentaron lesiones dérmicas compatibles con infecciones estafilocócicas.

2. Aislamiento

Para el aislamiento de los estafilococos se emplearon los medios de cultivo: Agar nutritivo y Agar manitol salado. El Agar nutritivo es un medio de cultivo no selectivo, utilizado para microorganismos con escasas necesidades nutricionales. El Agar manitol salado, al contrario, es un medio selectivo y diferenciador, utilizado comúnmente en el aislamiento de estafilococos. Posee una alta concentración de sal, y permite diferenciar los estafilococos fermentadores o no del manitol, el medio vira de rojo a amarillo cuando hay una producción de ácidos como consecuencia de la

Tabla 1. Identificación inicial de las muestras según especie, patología y procedencia.

NÚMERO	ESPECIE	PATOLOGÍA	CENTRO DE PROCEDENCIA
1	<i>Canis familiaris</i>	Rinitis crónica	C.V. Esperanza Ribes (Alicante)
2	<i>Felis silvestris catus</i>	Dermatitis miliar	C.V. Esperanza Ribes (Alicante)
3	<i>Felis silvestris catus</i>	Absceso intrabdominal	C.V. Esperanza Ribes (Alicante)
4	<i>Canis familiaris</i>	Pioderma	C.V Doctor Bernal (Murcia)
5	<i>Canis familiaris</i>	Fístula	H.C.V (Murcia)
6	<i>Canis familiaris</i>	Pioderma	C.V. Doctor Bernal (Murcia)
7	<i>Canis familiaris</i>	Pioderma	C.V. Doctor Bernal (Murcia)
8	<i>Canis familiaris</i>	Pioderma	C.V. Wecan De Carreres (Alicante)
9	<i>Canis familiaris</i>	Pioderma	C.V. Wecan De Carreres (Alicante)
10	<i>Canis familiaris</i>	Pioderma	C.V. Wecan De Carreres (Alicante)
11	<i>Canis familiaris</i>	Pioderma	C.V. Wecan De Carreres (Alicante)
12	<i>Canis familiaris</i>	Pioderma	C.V. Doctor Bernal (Murcia)
13	<i>Canis familiaris</i>	Pioderma	C.V. Wecan De Carreres (Alicante)
14	<i>Canis familiaris</i>	Pioderma	C.V. Wecan De Carreres (Alicante)
15	<i>Canis familiaris</i>	Pioderma	C.V. Wecan De Carreres (Alicante)
16	<i>Cuon alpinus</i>	Neumonía septicémica	Terra Natura Benidorm (Alicante)

C.V.: Clínica Veterinaria. H.C.V: Hospital Clínico Veterinario UMU.

fermentación de este azúcar. A partir del hisopo transportado en el medio Stuart, se hizo una siembra por extensión superficial en estría en cada uno de estos medios. Posteriormente, se incubaron en la estufa a 37°C durante 24 horas.

3. Identificación

Para la identificación de las colonias que crecieron en los medios de cultivo anteriormente indicados, se realizaron las siguientes pruebas:

3.1. Tinción GRAM: permite verificar la morfología, la agrupación en racimos característica de los estafilococos, así como la coloración violeta característica de las bacterias Gram positivas. Aquellas muestras identificadas como estafilococos fueron resembradas en Agar Triptosa inclinado, con la finalidad de conservar y obtener un cultivo puro de la bacteria. A partir de estos cultivos se realizaron:

3.2. Prueba de la coagulasa: fundamental en la distinción de ECP y ECN. Para su realización se sembró el microorganismo aislado empleando un asa de siembra en un tubo de hemólisis con plasma de conejo citratado, que se incubó a 37°C durante 24 horas. Esta prueba fue interpretada a las 24h, considerándose positiva (ECP) si el plasma había coagulado (por la conversión del fibrinógeno en fibrina), o negativa (ECN) en la situación contraria.

3.3. Galería Biomérieux API Staph®: permite la identificación de bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kokuria*, a través de un sistema estandarizado de 20 microtubos de pruebas bioquímicas. Para su utilización se preparó una suspensión bacteriana y se inocularon los microtubos de la galería, siguiendo las instrucciones del fabricante (Biomérieux). Una vez transcurrido el tiempo de incubación (24 horas a 37°C), se interpretaron

cada una de las pruebas, añadiendo reactivos específicos. y se recurrió a la aplicación informática APIWEB de Biomérieux para identificar las especies aisladas.

4. Estudio de la resistencia a los antibióticos

Para determinar la susceptibilidad *in vitro* de los estafilococos aislados empleamos el método de difusión en discos (también conocido como prueba de Kirby-Bauer). Para ello se realizó una siembra en sábana con 100µl de la suspensión bacteriana en placas de Petri con Agar Mueller-Hinton, sobre la que se aplicaron 7 discos de antibióticos de forma equidistante, incubándose posteriormente en la estufa durante 24 horas a 37°C. Los antibióticos empleados fueron: penicilina, amoxicilina, ampicilina, oxacilina, tetraciclina, gentamicina y cefoperazona. Para la valoración de la eficacia de la acción antibiótica, se midió el diámetro en mm, del halo de inhibición alrededor del disco antibiótico. Los valores de referencia se reflejan en la tabla 2.

Para la detección de genes específicos de resistencia a antibióticos, se realizó una PCR convencional cuyo gen diana fue el gen *mecA* de los SRM. En primer lugar, se realizó la extracción del ADN de los estafilococos. Para ello, se recogieron de 10-20 colonias y se suspendieron en 200 µl de agua destilada. Los tubos fueron calentados durante 10 minutos a 100°C y centrifugados para lograr una correcta homogenización del contenido. Este ADN fue conservado en refrigeración hasta su utilización.

Para la detección y amplificación del gen *mecA* se realizó una PCR convencional (Zhang *et al.*, 2004), en una cabina de PCR aislada del exterior (Modelo DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T Lam Technics). En cada reacción se utilizó un volumen final de 20 microlitros (µl) con el kit NXT Taq PCR EURx®, al que se adicionaron los cebadores específicos (Tabla 3) y 1 µl de ADN extraído de la muestra. Como control negativo, se utilizó 1 µl de agua destilada estéril y como control positivo 1µl de ADN extraído de una cepa control SRM.

Tabla 2. Valores de referencia de interpretación del antibiograma para estafilococos del Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI, 2011).

	Contenido (disco)	Sensible (S)	Intermedio (I)	Resistente (R)
Penicilina	10 UI	≥29 mm	-	≤28 mm
Amoxicilina	20 µg	≥20 mm	-	≤19 mm
Ampicilina	10 µg	≥29 mm	-	≤28 mm
Oxacilina	1 µg	≥18 mm	-	≤17 mm
Tetraciclina	30 µg	≥19 mm	15-18 mm	≤14 mm
Gentamicina	10 µg	≥15 mm	13-14 mm	≤12 mm
Cefoperazona	30 µg	≥21 mm	16-20 mm	≤15 mm

UI: unidades internacionales, µg: microgramos; mm: milímetros de diámetro.

Tabla 3. Cebadores empleados para la PCR.

Gen diana	Nombre (secuencia de los cebadores) (5'-3')	Concentración	Tamaño del amplícón
<i>mecA</i>	MecA1 (GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A)	450 nM	
	MecA2 (CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A)	450 nM	310 pb

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Para llevar a cabo la PCR se usó un termociclador Hangzhou Bioer Technology (modelo TC-96/G/H(b)C), que fue programado de la siguiente manera: una desnaturalización inicial a 95°C/3min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C/15seg, acoplamiento a 60°C/15seg y elongación a 72°C/15seg. Por último, se realizó una extensión final de 72°C/1min. Una vez finalizados los 35 ciclos, los amplicones se corrieron sobre un gel de agarosa (Pronadisa Laboratorios CONDA. España) al 1.5% teñido con Midori Green (Nippon Genetics), para ello se utilizó una cubeta de electroforesis horizontal (Modelo DN-CN-BN, LABOLAN S.L.). Finalmente, para la visualización de los fragmentos amplificados se empleó un transiluminador (FastGene© Blue/Green LED Transilluminador, Nippon Europe Genetics).

RESULTADOS

De las 16 muestras iniciales que formaron parte del estudio, se aislaron un total de 13 cepas de estafilococos. De las muestras 1, 2, 3 y 9, no

se consiguió aislar ningún estafilococo. Después del cultivo de la muestra 15, se aislaron 2 tipos de colonias de estafilococos que identificamos como: colonias grandes (15G) y colonias pequeñas (15P). Además, debemos mencionar que las muestras 7 y 12 pertenecían a un mismo animal que fue muestreado dos veces, con un intervalo de muestreo de 3 semanas entre ambos (Tabla 1).

La interpretación de la galería API y de la prueba de la coagulasa, permitió identificar las especies de estafilococos que se detallan en la tabla 4. Los resultados muestran que el 84.62% de las muestras resultaron ser ECP, y el 15.38% restante se englobaron en el grupo de los ECN. Al ser la galería API una prueba diseñada para microbiología humana, no se pudo discernir entre *S. aureus* y el GSI, de características bioquímicas muy similares.

La interpretación del antibiograma se hizo en base a los valores estándar para estafilococos según el Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI, 2011) recogidos en la Tabla 2, midiendo el diámetro del halo de inhibición para cada antibiótico, lo que se refleja en la Tabla 5.

Tabla 4. Resultados de la interpretación de la prueba de la coagulasa y de la galería API Staph.

MUESTRA	COAGULASA	IDENTIFICACIÓN API	PROBABILIDAD
4	+	<i>S. aureus</i> / <i>S. intermedius</i>	97.7%
5	-	<i>S. lentus</i>	99.4%
6	+	<i>S. aureus</i> / <i>S. intermedius</i>	97.7%
7	+	<i>S. aureus</i> / <i>S. intermedius</i>	97.7%
8	+	<i>S. aureus</i> / <i>S. intermedius</i>	88.4%
10	+	<i>S. aureus</i> / <i>S. intermedius</i>	97.1%
11	+	<i>S. aureus</i> / <i>S. intermedius</i>	97.7%
12	+	<i>S. aureus</i> / <i>S. intermedius</i>	97.7%
13	+	<i>S. aureus</i> / <i>S. intermedius</i>	91.6%
14	+	<i>S. aureus</i> / <i>S. intermedius</i>	97.7%
15G	+	<i>S. aureus</i> / <i>S. intermedius</i>	95.5%
15P	+	<i>S. aureus</i> / <i>S. intermedius</i>	96%
16	-	<i>S. xylosus</i>	97.6%

Tabla 5. Resultados de los antibiogramas.

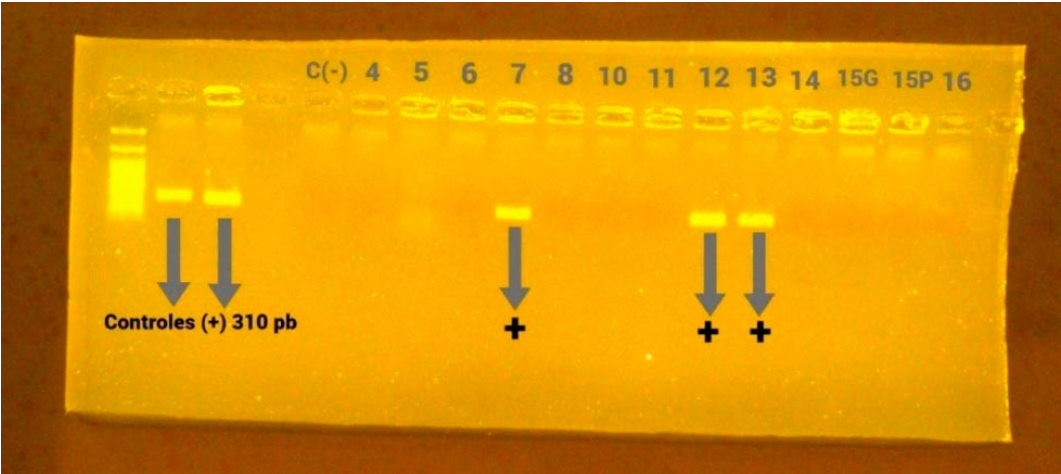
	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15G	15P	16	%R total
PNG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	100%
AMP	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	84.62%
OXC	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S	R	46.15%
AMX	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	61.54%
CPZ	S	S	S	I	S	R	R	I	I	I	R	I	I	23.08%
CN	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	R	I	30.77%
TET	R	I	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	38.46%

PNG (penicilina), AMP (ampicilina), OXC (oxacilina), AMX (amoxicilina), CPZ (cefoperazona), CN (gentamicina) y TET (tetraciclina). R (resistente), S (sensible), I(intermedio), %R total (porcentaje de resistencia total).

La PCR convencional para la detección del gen *mecA* mostró resultados positivos para las muestras: 7, 12 y 13 (Figura 1). No obstante, como ya ha sido mencionado, dos de ellas, la 7 y la 12, pertenecían al mismo animal.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se consiguieron aislar 13 cepas de estafilococos procedentes de 12 de las 16 muestras analizadas, lo que representa un



C(-): control negativo.

Figura 1. Gel de agarosa con productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para detección del gen *mecA*.

75% del total de muestras. Este microorganismo que coloniza comúnmente la piel y mucosas ejerce su acción patógena de manera oportunista, desde infecciones más superficiales, hasta infecciones generalizadas que entrañan riesgo para la vida, en diferentes especies animales y en humanos (Sanz, 2013; O’Gara, 2017).

La interpretación de la galería API permitió identificar diferentes especies de estafilococos, donde el diagnóstico microbiológico con la prueba de la coagulasa determinó que el 84.62% de las cepas fueron ECP, siendo el resto, 15.38%, cepas ECN. Como apuntan otras revisiones y estudios, los ECP, presentan mayor virulencia, aislándose con mayor frecuencia de procesos patológicos, en comparación con los ECN (Castellanos *et al.*, 2011).

Los test bioquímicos disponibles en el mercado, como es el caso de la galería API Staph, están diseñados para el diagnóstico de muestras de procedencia humana, por lo que no permiten diferenciar *S.aureus* del GSI, en el caso de muestras procedentes de animales. Para verificar con exactitud la especie concreta, deberíamos emplear técnicas más específicas. Un ejemplo de protocolo se describe en un estudio reciente, donde realizaron en primer lugar la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-ToF), para comprobar si las cepas aisladas de estafilococos pertenecían al GSI, y posteriormente por PCR la identificación de la especie específica dentro de este grupo (Viegas *et al.*, 2022). El GSI, incluye entre otras especies, al *S. pseudintermedius*, que es colonizador principal en perros (Han *et al.*, 2016; Štempelová *et al.*, 2022). Además, hay que tener en cuenta que las muestras de este estudio pertenecen a aislamientos de piodermas en perros, donde *S. pseudintermedius* es el microorganismo más comúnmente aislado, como apuntan numerosos estudios (Vasilescu & Togoe, 2014; Loeffler & Lloyd, 2018; Nakaminami *et al.*, 2021). Por este motivo podríamos considerar como primera opción en estos casos, *S. pseudintermedius* en lugar de *S. aureus*.

En este estudio, hubo dos muestras identificadas como ECN, microorganismos que pueden ser patógenos en situaciones de inmunosupresión. En la muestra 16, una cepa de *S. xylo-sus* procedente de un proceso septicémico, que venía de presentar otras comorbilidades en los últimos meses, y en la muestra 5, una cepa de *S. lentus* procedente de un absceso inguinal en un animal inmunocomprometido. Estos patógenos nosocomiales son comúnmente aislados en casos clínicos descritos en animales y personas (Mazal y Sieger, 2010; Rissi *et al.*, 2015; Giordano *et al.*, 2016).

Los resultados microbiológicos, concuerdan con los de otros estudios sobre la materia, donde se han aislado los microorganismos *S. pseudintermedius*, *S. lentus* y *S. xylo-sus* en muestras caninas de individuos enfermos y sanos, siendo el primero de ellos, el principal patógeno dermatológico en estos animales (Kaspróicz *et al.*, 2011; Levi, 2024). No obstante, debido al limitado número de muestras utilizadas en este estudio, no se han detectado otras especies de estafilococos relativamente frecuentes, como *S. coagulans*, agente causante de piodermas en varios estudios (Costa *et al.*, 2021; Lai *et al.*, 2022).

Las cepas de estafilococos de este estudio presentaron un destacado perfil de resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos, donde estos microorganismos manifestaron su resistencia en el 100% de los casos a la penicilina. Resultados similares fueron descritos por Levi con muestras españolas, donde todos los casos también fueron resistentes a este antibiótico (Levi, 2024). De las penicilinas sintéticas, los estafilococos fueron altamente resistentes en el 84.62% de los casos a la ampicilina, porcentajes similares han reportado otros estudios recientes (Bertelloni *et al.*, 2021, Lord *et al.*, 2022), con menor resistencia a la oxacilina, 46.15%, al igual que otros estudios (Makwana *et al.*, 2023) y amoxicilina, 61.54%. En este estudio se detectó una mayor resistencia de los estafilococos a este último antibiótico que la descrita en otros estudios donde se combinaba con ácido

clavulánico (Chanayat *et al.*, 2021; Makwana *et al.*, 2023). Por otro lado, los estafilococos fueron resistentes a la cefoperazona en el 23.08% de los casos, presentando una sensibilidad intermedia, del 46.15%. En vacas con mastitis, también se ha reportado llamativa sensibilidad intermedia de estas bacterias al citado antibiótico (Wald *et al.*, 2019), y perfiles de resistencia que están aumentando respecto a años anteriores (Karell *et al.*, 2024).

Por otra parte, los estafilococos del presente estudio mostraron una resistencia del 30.77% a la gentamicina, similar a otros estudios recientes con estafilococos (Bertelloni *et al.*, 2021; Levi, 2024) y fueron resistentes en el 38.48% de los antibiogramas a la tetraciclina, porcentaje semejante al del estudio de Viegas *et al.* (2022).

Por el otro lado, las PCR mostraron que un 23.08% de las cepas aisladas fueron SRM. Comparando las muestras positivas con su antibiograma, se observó que las muestras 7 y 12 (procedentes del mismo animal), son resistentes a todos los antibióticos menos a la cefoperazona, que presenta sensibilidad intermedia. Este hecho nos permite afirmar que se trataba de una bacteria multiresistente, debido a su capacidad de resistir *in vitro* al menos a un agente de tres o más categorías antibióticas (Magiorakos *et al.*, 2012), hecho que concuerda con la historia clínica de este animal, que volvió a consulta tras 3 semanas sin mejoría tras el tratamiento antibiótico prescrito. La muestra 13, considerada SRM molecularmente, también lo es fenotípicamente al presentar perfil de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, con sensibilidad intermedia a la cefalosporina, aunque sensible a la gentamicina y tetraciclina. Existen otras revisiones y estudios que señalan que las poblaciones de SPRM, patógeno supuesto como causante de los piodermas estudiados, tienen una prevalencia que oscila del 7 al 66% en perros que presentan esta patología, y varía mucho entre países (Ríos *et al.*, 2015). En Europa continental, esta prevalencia se estima alrededor del 30% (Loeffler & Lloyd, 2018). Si además, las

muestras proceden de animales refractarios al tratamiento antibiótico, podría llegar al 100% de aislamientos SPRM (Silva *et al.*, 2021).

Está claro que la resistencia a antibióticos es un problema latente que se ha comprobado en este estudio. Pese a que el 23.08% de las muestras presentaban el gen *mecA*, la resistencia fenotípica a los β -lactámicos mostrada en los antibiogramas de los estafilococos fue superior, y es que el gen *mecA* no es el único gen implicado en la resistencia a esta clase antibiótica. Existen otros mecanismos, descritos en varios estudios y revisiones, como los genes *bla_Z* o *bla_{ARL}*, que también confieren resistencia, y otros genes similares que codifican resistencia a tetraciclinas, como los *tet(K)*, *tet(L)* o *tet(M)*, o para aminoglucósidos como la gentamicina, los genes *aacA-aphD* (Schwarz *et al.*, 2018).

Las claves para reducir el riesgo de resistencias a la hora de elegir un tratamiento para piodermas, pueden ser, aplicar tratamiento tópico en piodermas superficiales, evitando que otros microorganismos no diana en otras localizaciones se vean expuestos (Gortel, 2020), o un tratamiento combinado tópico y sistémico si son piodermas profundos, previo cultivo y estudio de la sensibilidad antimicrobiana (Loeffler y Lloyd, 2018). Algunos agentes antibacterianos probados con acción antiestafilocócica son la clorhexidina, mupirocina, polimixina B, ácido fusídico o sulfadiazina argéntica (Valentine, 2019).

CONCLUSIONES

En conclusión, este estudio revela una alta prevalencia de *Staphylococcus* spp. en muestras clínicas procedentes de cánidos, ya que en el 85.7% (12/14) de las mismas se aisló alguna especie de este microorganismo. La mayoría de las cepas de estafilococos aisladas pertenecen al grupo de los ECP (84.6%) frente a los ECN (15.4%), lo cual es coherente con la patología que muestran los animales muestreados. La mayoría de las cepas de estafilococos identificados causantes de piodermas caninas pertenecen al

Grupo *Staphylococcus intermedius*, posiblemente a la especie *S. pseudintermedius*, aunque no hayamos podido discernir esta especie de *S. aureus* en este estudio. La interpretación de los antibiogramas arrojó preocupantes datos de resistencia antibiótica, especialmente frente a los antibióticos β -lactámicos, siendo los estafilococos aislados resistentes en el 100% de los casos a penicilina G natural y en un 84.62% a la ampicilina. Pese a que en el estudio molecular se detectó que el 23.1% de los estafilococos aislados portaban el gen de resistencia a la meticilina, el estudio fenotípico mostró un porcentaje superior de resistencia de los estafilococos a los antibióticos β -lactámicos, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos de resistencia en paralelo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los centros veterinarios: Clínica Veterinaria Wecan de Carreres, Clínica Veterinaria Doctor Bernal, Centro Veterinario Esperanza Ribes, Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia, así como al zoológico Terra Natura Benidorm, por haber proporcionado las muestras clínicas necesarias para este estudio.

REFERENCIAS

- Abouelkhair, M. A., & Kania, S. A. (2024). Whole Genome Sequencing and Comparative Genomics of Six *Staphylococcus schleiferi* and *Staphylococcus coagulans* Isolates. *Genes*, 15(3), 284.
- Bauerfeind, R., Von Graveenitz, A., Kimmig, P., Schiefer, H. G., Schwarz, T., Slenczka, W. & Zahner, H. (2016). Staphylococcal Infections. En *Zoonoses: Infectious diseases transmissible between animals and humans* (262-264). USA: ASM press.
- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870-926.
- Bertelloni, F., Cagnoli, G., & Ebani, V. V. (2021). Virulence and antimicrobial resistance in canine *Staphylococcus* spp. isolates. *Microorganisms*, 9(3), 515.
- Bongers, S., Hellebrekers, P., Leenen, L. P., Koenderman, L., & Hietbrink, F. (2019). Intracellular penetration and effects of antibiotics on *Staphylococcus aureus* inside human neutrophils: a comprehensive review. *Antibiotics*, 8(2), 54.
- Carroll, K. C., Burnham, C. A. D., & Westblade, L. F. (2021). From canines to humans: Clinical importance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *PLoS Pathogens*, 17(12), e1009961.
- Castellanos, I., Rodríguez, G., & Santos, R. (2011). Aislamiento e identificación bioquímica de microorganismos bacterianos a partir de infecciones de piel en caninos. *Revista de Medicina Veterinaria*, (22), 21-30.
- Chanayat, Y., Akatvipat, A., Bender, J. B., Punyapornwithaya, V., Meeyam, T., Anukool, U., & Pichpol, D. (2021). The SCC mec Types and Antimicrobial resistance among methicillinresistant *Staphylococcus* species isolated from dogs with superficial pyoderma. *Veterinary Sciences*, 8(5), 85.
- Cheung, G. Y., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547-569.
- Chinemerem Nwobodo, D., Ugwu, M. C., Oliseloke Anie, C., Al-Ouqaili, M. T., Chinedu Ikem, J., Victor Chigozie, U., & Saki, M. (2022). Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(9), e24655.
- CLSI. Clinical & Laboratory Standards Institute (2011). Zone diameters of antimicrobial agents according to CLSI guidelines 2011. Recuperado de: https://www.microrao.com/micronotes/pg/kirby_bauer.pdf. Última consulta: 21/10/2024.
- Costa, S. S., Oliveira, V., Serrano, M., Pomba, C., & Couto, I. (2021). Phenotypic and mo-

- molecular traits of *Staphylococcus coagulans* associated with canine skin infections in Portugal. *Antibiotics*, 10(5), 518.
- De la Fuente, R., & Orden, J.A. (2002). Género *Staphylococcus*. En S. Vadillo, S. Piriz & E. Mateos (Eds.), *Manual de microbiología veterinaria* (431-439). España: McGraw Hill Interamericana.
- Feßler, A. T., Schuenemann, R., Kadlec, K., Hensel, V., Brombach, J., Murugaiyan, J., Oechtering, G., Burgener, I.A. & Schwarz, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) among employees and in the environment of a small animal hospital. *Veterinary Microbiology*, 221, 153-158.
- Giordano, N., Corallo, C., Miracco, C., Papakostas, P., Montella, A., Figura, N., & Nuti, R. (2016). Erythema nodosum associated with *Staphylococcus xylosus* septicemia. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49(1), 134-137.
- Gortel, K. (2020). Twenty years of pyodermas: how antimicrobial resistance has changed the way I practice. *The Canadian Veterinary Journal*, 61(7), 781.
- Gould, A. P., Coyner, K. S., Trimmer, A. M., Weese, J. S., & Budke, C. M. (2020). Recovery of methicillin-resistant *Staphylococcus* species from pet-grooming salons. *Veterinary Dermatology*, 31(4), 262-e60.
- Haag, A. F., Fitzgerald, J. R., & Penadés, J. R. (2019). *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiology Spectrum*, 7(3), 10-1128.
- Han, J. I., Yang, C. H., & Park, H. M. (2016). Prevalence and risk factors of *Staphylococcus* spp. carriage among dogs and their owners: A cross-sectional study. *The Veterinary Journal*, 212, 15-21.
- Karell, J., Petzl, W., Gangl, A., Huber-Schlenstedt, R., & Sorge, U. S. (2024). Changes in antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* in bovine quarter milk samples from Southern Germany between 2012 and 2022. *Journal of Dairy Science*, 107(6), 38023812.
- Kasprowicz, A., Białocka, A., Białocka, J., Godzisz, I., Barabasz, W., Jaworska, O., Małachowa, N., & Miedzobrodzki, J. (2011). The occurrence and comparative phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. from healthy and diseased, household and shelter dogs, based on routine biochemical diagnostic methods. *Polish journal of microbiology*, 60(1), 19-26.
- Lai, C. H., Ma, Y. C., Shia, W. Y., Hsieh, Y. L., & Wang, C. M. (2022). Risk factors for antimicrobial resistance of *Staphylococcus* species isolated from dogs with superficial pyoderma and their owners. *Veterinary Sciences*, 9(7), 306.
- Leroy, S., Vermassen, A., Ras, G., & Talon, R. (2017). Insight into the Genome of *Staphylococcus xylosus*, a Ubiquitous Species Well Adapted to Meat Products. *Microorganisms*, 5(3), 52.
- Levi, L. (2024). *Differences in Antimicrobial Susceptibility of Staphylococcus spp. Isolated from the Skin of Healthy and Sick Dogs* (Doctoral dissertation, Lithuanian University of Health Sciences).
- Loeffler, A., & Lloyd, D. H. (2018). What has changed in canine pyoderma? A narrative review. *The Veterinary Journal*, 235, 73-82.
- Lord, J., Millis, N., Jones, R. D., Johnson, B., Kania, S. A., & Odoi, A. (2022). Patterns of antimicrobial, multidrug and methicillin resistance among *Staphylococcus* spp. isolated from canine specimens submitted to a diagnostic laboratory in Tennessee, USA: A descriptive study. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 91.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T. & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resis-

- tant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A. & Maguire, D. (2013). *Staphylococcus* species. En *Clinical Veterinary Microbiology* (105-119). UK: Mosby Elsevier.
- Makwana, P. M., Parmar, S. M., Vala, J. A., Parasana, D. K., Patel, D. R., Kalyani, I. H., Solanki, J. B. (2023). Molecular characterization and antimicrobial-resistant pattern of *Staphylococcus* species isolated from pyoderma cases in dogs. *Biological Forum*, 15(11), 82-87.
- May, E. R., Hnilica, K. A., Frank, L. A., Jones, R. D., & Bemis, D. A. (2005). Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma, or both. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(6), 928-931.
- Mazal, C., & Sieger, B. (2010). *Staphylococcus lentus*: The troublemaker. *International Journal of Infectious Diseases*, 14, e397.
- Nakaminami, H., Okamura, Y., Tanaka, S., Wajima, T., Murayama, N., Noguchi, N. (2021). Prevalence of antimicrobial-resistant staphylococci in nares and affected sites of pet dogs with superficial pyoderma. *Journal of Veterinary Medical Science*, 83(2), 214-219.
- Nemeghaire, S., Argudín, M. A., Fessler, A. T., Hauschild, T., Schwarz, S., Butaye, P. (2014). The ecological importance of the *Staphylococcus sciuri* species group as a reservoir for resistance and virulence genes. *Veterinary Microbiology*, 171(3-4), 342-356.
- O'Gara, J. P. (2017). Into the storm: Chasing the opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus* from skin colonisation to life-threatening infections. *Environmental Microbiology*, 19(10), 3823-3833.
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7(8), 555-567.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., & Fanning, S. (2019). Género *Staphylococcus*. En *Elementos de microbiología veterinaria* (51-53). USA: John Wiley & Sons Limited (traducido por editorial Acribia, S.A).
- Ríos, A., Baquero, M., Ortiz, G., Ayllón, T., Smit, L., Rodríguez, M., & Sánchez, A. (2015). *Staphylococcus* multirresistentes a los antibióticos y su importancia en medicina veterinaria. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales AVEPA*, 35(3), 149-161.
- Rissi, D. R., Elsmo, E. J., & Sanchez, S. (2015). Cystitis and peritonitis caused by *Staphylococcus xylosus* infection in a calf. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 8(3), 99-101.
- Sanz, E. G. (2013). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in animals: molecular epidemiology, antimicrobial resistance, virulence and zoonotic potential (Doctoral dissertation, Universidad de La Rioja).
- Schwarz, S., Feßler, A. T., Lončarić, I., Wu, C., Kadlec, K., Wang, Y., & Shen, J. (2018). Antimicrobial resistance among staphylococci of animal origin. *Microbiology Spectrum*, 6(4), 10-1128.
- Silva, V., Oliveira, A., Manageiro, V., Caniça, M., Contente, D., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Carvalho, I., Capelo, J. L., Igrejas, G., Poeta, P. (2021). Clonal Diversity and Antimicrobial Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Canine Pyoderma. *Microorganisms*, 9(3), 482.
- Sips, G. J., van Dijk, M. A., van Westreenen, M., van der Graaf-van Bloois, L., Duim, B., Broens, E. M. (2023). Evidence of cat-to-human transmission of *Staphylococcus felis*. *Journal of Medical Microbiology*, 72(2), 001661.
- Smeltzer, M. S. & Beenken, K. (2013). *Staphylococcus*. En D.S. McVey, M. Kennedy and M.M. Chengappa (Eds.), *Veterinary*

- Microbiology* (184-193). USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Štempelová, L., Kubašová, I., Bujňáková, D., Kačírová, J., Farbáková, J., Maďar, M., Karahutová, L., Strompfová, V. (2022). Distribution and characterization of *Staphylococcus* isolated from healthy canine skin. *Topics in Companion Animal Medicine*, 49, 100665.
- Taylor, T. A., Unakal, C. G. (2017). *Staphylococcus aureus* Infection. In *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Valentine, B. (2019). Treating pyoderma without the use of systemic antibiotics. *The Canadian Veterinary Journal*, 60(12), 1361.
- Vasilescu, C. A., Togoe, I. (2014). The morphological properties of the *Staphylococcus* spp, strains isolated in canine pyodermas. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca*, Vol. 71, No. 1, 250-255 ref. 17.
- Viegas, F. M., Santana, J. A., Silva, B. A., Xavier, R. G. C., Bonisson, C. T., Câmara, J. L. S., Rennó, M. C., Cunha, J. L. R., Figueiredo, H. C. P., Lobato, F. C. F., Silva, R. O. S. (2022). Occurrence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. in diseased dogs in Brazil. *PLoS One*, 17(6), e0269422.
- Wald, R., Hess, C., Urbantke, V., Wittek, T., Baumgartner, M. (2019). Characterization of *Staphylococcus* species isolated from bovine quarter milk samples. *Animals*, 9(5), 200.
- Wang, N., Neilan, A. M., & Klompas, M. (2013). *Staphylococcus intermedius* infections: case report and literature review. *Infectious Disease Reports*, 5(1), e3.
- Weese, J. S., & van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 418-429.
- Zhang, K., Sparling, J., Chow, B. L., Elsayed, S., Hussain, Z., Church, D. L., Gregson, D. B., Louie, T., y Conly, J. M. (2004). New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative *Staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 4947-4955.