



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CUANTIFICACIÓN DE LA RESISTENCIA A METICILINA EN
CEPAS DE *Staphylococcus* spp. AISLADAS DESDE PERROS SANOS
Y DERMÓPATAS**

Valentina Alejandra Pinilla Jara

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESORA GUÍA: CONSUELO BORIE POLANCO
Laboratorio de Microbiología Veterinaria

SANTIAGO, CHILE
2019



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CUANTIFICACIÓN DE LA RESISTENCIA A METICILINA EN
CEPAS DE *Staphylococcus* spp. AISLADAS DESDE PERROS SANOS
Y DERMÓPATAS**

Valentina Alejandra Pinilla Jara

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

Nota Final:

Profesora Guía: Consuelo Borie P.

Profesora Correctora: Sonia Anticevic C.

Profesora Correctora: Lisette Lapierre A.

PROFESORA GUÍA: CONSUELO BORIE POLANCO
Laboratorio de Microbiología Veterinaria

SANTIAGO, CHILE
2019

A María Teresa Jara

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi gratitud a todas las personas que me acompañaron durante la carrera y a aquellos que, de alguna u otra forma, hicieron este trabajo posible. Especialmente a mi profesora guía, Consuelo Borie, cuya perseverancia y sabios consejos potenciaron enormemente el acabado. Igualmente, a mis profesoras correctoras, Sonia Antícevic y Lisette Lapierre, por su atenta lectura y comentarios. A Nicolás Galarce, Beatriz Escobar, Andrea Núñez y al equipo del laboratorio de microbiología, por el todo apoyo, tanto académico como emocional.

Mis agradecimientos al cariño de mis amigas y amigos, quienes hicieron del paso por la Universidad una gran etapa de crecimiento, que atesoro y valoraré por siempre. Entre ellos, a Daniela Prado, Giselle Salas, Pilar Paredes, Florencia Infante, Florencia Olivares, Yanina Villarreal, Valeria Villanueva, Natalia Pereira, Nicolás Alé, Angello Morgado, Cristobal Carrillo, Kevin Kettlun y Karen Chávez. A Sergio López, por su compañía y apoyo incondicional.

Finalmente, a mi familia, por hacer posible este y tantos otros proyectos con su entrega total. A Juan Pablo Pinilla, quien siempre tendrá lugar en lo que piense y haga. Muchas gracias por depositar su confianza en mí, y por ser fuente de inspiración.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
<i>Staphylococcus spp.</i>	3
Bases moleculares de resistencia a meticilina.....	4
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina en perros	5
<i>Staphylococcus pseudointermedius</i> resistente a meticilina en perros	5
<i>Staphylococcus schleiferi</i> resistente a meticilina en perros	5
Detección fenotípica de resistencia a meticilina en <i>Staphylococcus spp.</i>	6
Detección de <i>Staphylococcus</i> meticilino resistente en Chile	7
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
1. Cepas en estudio	10
2. Susceptibilidad antimicrobiana a meticilina por método de Kirby-Bauer	11
3. Concentración mínima inhibitoria (CIM)	11
4. Análisis de datos	13
5. Medidas de bioseguridad	13
RESULTADOS	14
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26
PLANIFICACIÓN	34
ANEXOS	35
Anexo 1.....	35
Anexo 2.....	37
Anexo 3.....	40
Anexo 4.....	40
Anexo 5.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema para la preparación de diluciones de agentes antimicrobianos para ser usados en pruebas de susceptibilidad de dilución en agar	12
Tabla 2: Resistencia a meticilina por método de concentración mínima inhibitoria en 106 cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. aisladas desde perros sanos y dermatopatías, según especie bacteriana	16
Tabla 3: Sensibilidad (S) y resistencia (R) a meticilina de las 106 cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivas aisladas desde perros sanos y dermatopatías, según concentración mínima inhibitoria y prueba de Kirby-Bauer	16
Tabla 4: Análisis de concordancia entre los métodos de Kirby-Bauer y de concentración mínima inhibitoria para resistencia a meticilina en cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. aisladas desde perros sanos y dermatopatías, según población total y condición clínica	17
Tabla 5: Resistencia a meticilina en diferentes especies de <i>Staphylococcus</i> según métodos de Kirby-Bauer, concentración mínima inhibitoria y detección del gen <i>mecA</i>	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Replicador de Steers utilizado para inocular bacterias en placas Petri	13
Figura 2: Prueba de coagulasa luego de 24 h de incubación	14
Figura 3: Porcentaje de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. aisladas desde perros sanos y dermatopatías, según susceptibilidad a meticilina mediante el método de Kirby-Bauer.....	15
Figura 4: Porcentaje de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. aisladas desde perros sanos y dermatopatías, según susceptibilidad a meticilina mediante el método de concentración mínima inhibitoria.....	15

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana corresponde a uno de los principales desafíos que presenta actualmente la salud pública. La incidencia de bacterias multirresistentes se ha incrementado rápidamente a nivel mundial en la última década, particularmente la resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivas (SCP) tanto de origen humano como animal. Si bien en Chile existe una vigilancia activa de *Staphylococcus* spp. resistente a meticilina en humanos, en medicina veterinaria no ocurre lo mismo, aun reconociendo que este patógeno en particular es zoonótico, donde las mascotas podrían jugar un rol importante como reservorios. El objetivo de este estudio fue cuantificar la resistencia a meticilina en cepas SCP aisladas desde perros sanos y con patología dermatológica. Para esto, se utilizaron 106 cepas obtenidas en un estudio previo, a las cuales se les determinó su resistencia a meticilina por Kirby-Bauer (K-B) y mediante concentración mínima inhibitoria (CIM). Se realizó un análisis de concordancia entre ambos métodos. La prueba de K-B detectó un 7,5% de cepas resistentes a meticilina (8 cepas), mientras que CIM reveló un 30,2% de cepas meticilino resistentes (32 cepas), tanto en perros sanos (18,8% de ellos) como en dermatopatías (50% de ellos). De las 32 cepas resistentes, un 71,9% presentaron valores de CIM denominados *border line* (0,5 – 4 µg/mL) y un 28,1% revelaron elevados niveles de resistencia (≥ 8 µg/mL) asociados a la presencia del gen *mecA*. La mayoría de las cepas correspondieron a *S. pseudointermedius* resistente a meticilina y ninguna de las cinco cepas de *S. aureus* fue resistente. La concordancia entre ambos métodos fue de “moderada” a “aceptable”, en las cepas provenientes de ambos grupos de perros.

El presente estudio da cuenta de una elevada frecuencia de resistencia a meticilina revelando la importancia de cuantificar, mediante el método de CIM, la resistencia en cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas desde perros. Por lo anterior, se sugiere incorporar a esta especie animal en los sistemas de vigilancia de salud pública, abordando el problema desde la perspectiva de Una Salud.

Palabras clave: Meticilina, CIM, *Staphylococcus* spp., perros.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance represents one of the main challenges for public health today. The emergence of multiresistant bacteria has increased rapidly worldwide in the last decade, particularly the resistance to methicillin in coagulase positive *Staphylococcus* (CoPS) isolated from both human and animal origin. Although in Chile there is an active monitoring of *Staphylococcus* spp. resistant to methicillin in humans, this is not the case in animals, notoriously in pets, which are considered reservoirs of this zoonotic pathogen. The objective of this study was to quantify the resistance to methicillin in SCP strains isolated from healthy dogs and from dogs with dermatological pathology. For this purpose, 106 strains obtained in a previous study were used, to which their resistance to methicillin was determined through Kirby-Bauer (K-B) and the minimum inhibitory concentration (MIC). A concordance analysis between both methods was carried out. While the K-B test detected 7.5% of methicillin-resistant strains (8 strains), the MIC revealed 30.2% of methicillin-resistant strains (32 strains), both in healthy (18.8%) and in dermopath (50%) dogs. Of the 32 resistant strains, 71.9% presented MIC values considered as “borderline” (0.5 – 4 µg/mL), and 28.1% revealed high levels of resistance (≥ 8 µg/mL) associated with the presence of the *mecA* gene. The majority of the strains corresponded to methicillin resistant *S. pseudintermedius*, and none of the five strains of *S. aureus* was resistant. The agreement between both methods was between "moderate" to "acceptable" in the strains from both groups of dogs.

This study shows a high frequency in the resistance to methicillin, revealing the importance of quantifying, through the MIC method, the resistance in strains of *Staphylococcus* spp. isolated from dogs. Therefore, it is suggested to incorporate this animal species into the public health surveillance systems, addressing the problem from a One Health perspective.

Key words: Methicillin, MIC, *Staphylococcus* spp., dogs.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas dérmicas en las mascotas son muy frecuentes, y corresponden a una de las principales causas de consultas veterinarias. Las bacterias del género *Staphylococcus* son las mayores causales de estas patologías, siendo las especies *S. pseudintermedius*, *S. aureus* y *S. schleiferi* los patógenos primarios encontrados en la práctica dermatológica de perros y gatos. Estas pueden habitar, normal o transitoriamente, la piel y mucosas; sin embargo, poseen la capacidad de generar graves infecciones cutáneas, tisulares o cavitarias. Además de la gravedad de los cuadros, actualmente se ha documentado resistencia antimicrobiana (RAM) y multiresistencia dentro de todas las especies de *Staphylococcus* que infectan humanos y animales domésticos.

La problemática actual de la RAM radica en su emergencia y rápida diseminación. La Organización Mundial de Sanidad Animal ha demostrado su preocupación desarrollando estrategias para el uso prudente de antimicrobianos, sin embargo, no manifiesta una prioridad en los patógenos multiresistentes que deban ser vigilados en mascotas. La Organización Mundial de la Salud, para el 2017, señala a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en su listado global de prioridades para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos en medicina humana en la categoría de prioridad elevada, ya que la infección con esta bacteria ha demostrado aumentar en un 64% la probabilidad de morir en comparación con los infectados por cepas sensibles.

En medicina veterinaria, la resistencia a meticilina se ha reconocido como un problema durante la última década, demostrándose que cepas de *S. pseudintermedius* resistentes a meticilina (SPRM) y SARM pueden colonizar perros enfermos y sanos. A su vez, el traspaso zoonótico y transferencia de genes de resistencia han sido ampliamente evidenciados, lo que indica la necesidad de generar estrategias de prevención desde el enfoque de “Una Salud”.

Así, el generar información objetiva y precisa respecto a los niveles de resistencia a meticilina de manera cuantitativa, a través de métodos confiables, prácticos y oficiales toma relevancia. En este contexto, la determinación de la concentración mínima inhibitoria es una herramienta que cumple con estos requisitos, permitiendo cuantificar la actividad *in vitro* de las drogas frente a diversos patógenos bacterianos. De esta forma, el presente estudio pretende

establecer la cantidad de metilina capaz de inhibir el crecimiento de cepas *Staphylococcus* coagulasa positivas aisladas desde caninos con y sin lesiones dermatológicas, atendidos durante el año 2016 en las tres sedes de la Red de Atención Veterinaria de la Universidad de Chile.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Staphylococcus spp.

Las bacterias del género *Staphylococcus* spp. son cocáceas Gram positivas que forman parte de la microbiota normal de piel y mucosas de animales y humanos, pudiendo comportarse como agente comensal o patógeno y causar serias infecciones de piel y otros tejidos. El potencial patógeno de las especies está dado por diversos factores de virulencia, tales como adhesinas, toxinas o enzimas (Hermans *et al.*, 2010).

Las cepas de *Staphylococcus* coagulasa-positivas (SCP) son las principales causantes de infecciones en piel y tejidos blandos, y las más aisladas desde piodermas caninos, siendo común encontrar cepas con resistencia a meticilina y multirresistencia a tres o más antimicrobianos (Morris *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2017). Además de su presencia en el ambiente ambulatorio, *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina (SRM) son los más frecuentemente asociados a infecciones intrahospitalarias en medicina veterinaria. Estos acumulan factores de resistencia debido a su adaptación al medio ambiente hospitalario, problema que se ve agravado al ser patógenos zoonóticos (Walther *et al.*, 2017). Los seres humanos pueden ser una fuente de infección para mascotas, y a su vez estas pueden ser consideradas fuentes de re-infección y/o colonización para las personas (Vincze *et al.*, 2014). En este contexto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) como de alta prioridad en su listado de patógenos resistentes de importancia para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos (WHO, 2017), debido a su drástico aumento en hospitales, al número de muertes que provoca, y al aumento de costos por tiempos prolongados de hospitalización. Así, la multirresistencia ya no se considera sólo un fenómeno intrahospitalario, ya que en la comunidad han emergido las infecciones en individuos sanos sin factores de riesgo nosocomiales, sumándose a este desafío la diseminación dentro del ambiente veterinario (Morris *et al.*, 2017; Walther *et al.*, 2017).

Entre los SCP que colonizan la piel de mascotas, *S. pseudintermedius* es el más frecuente en perros, mientras que en gatos se presentan *S. pseudintermedius* y/o *S. aureus*. Por otro lado, *S. schleiferi* subesp. *coagulans* raramente se aísla desde mascotas sanas (Griffeth *et al.*, 2008; Iverson *et al.*, 2015), aunque es común en infecciones de oídos en perros con

exposición previa a antimicrobianos (Cain *et al.*, 2011). Además de lo anterior, se ha demostrado que *Staphylococcus pseudointermedius* resistente a meticilina (SRM) y SARM también colonizan caninos y felinos sanos (Weese y Van Duijkeren, 2010). En este último caso, se presentaría más comúnmente cuando los animales conviven con una persona infectada por este mismo patógeno (Iverson *et al.*, 2015).

Desde el enfoque de “Una Salud” propuesto por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) y la OMS, llama la atención que a nivel internacional y puntualmente desde los gobiernos, no se adopten estrategias globales dirigidas hacia la armonización y terapéutica de perros y gatos, a diferencia de lo propuesto para animales de producción.

Bases moleculares de resistencia a meticilina

La meticilina es una penicilina semi-sintética introducida en la clínica humana por su capacidad de resistir la acción de las penicilinasas bacterianas que inactivan β -lactámicos. No obstante, poco después de su introducción en la práctica clínica se detectaron las primeras cepas de *S. aureus* resistentes. Esta resistencia está dada por la habilidad de SRM de modificar el sitio blanco de unión de los fármacos β -lactámicos, la proteína de unión a meticilina o PBP2, proteína ubicada en la pared celular bacteriana (Figura 1 del Anexo 1) (Peacock y Paterson, 2015).

En la pared de *Staphylococcus* spp., las capas del peptidoglicano están entrelazadas en sus cadenas por la acción enzimática de la PBP2 y sobre la cual los β -lactámicos tienen gran afinidad. En una cepa sensible a meticilina, al unirse este tipo de antimicrobiano con la PBP2, la proteína no tendrá actividad enzimática sobre la transpeptidación para entrelazar las capas de la pared celular y la bacteria morirá. De forma contraria, las cepas SRM presentan una mutación en esta proteína, denominada PBP2a, la cual no permite la interacción de la droga con el sitio blanco, de manera que la bacteria puede continuar la transpeptidación del peptidoglicano en presencia de elevadas concentraciones de β -lactámicos, incluida la meticilina (Figura 2 de Anexo 1). Esta mutación se produce principalmente por la adquisición del gen *mecA*, el cual se encuentra en el *cassette* cromosómico estafilocócico *mec* (Anexo 1,

Figura 3) (Kim *et al.*, 2013; Vincze *et al.*, 2014). Además, SRM pueden expresar co-resistencia a otras drogas, lo que explica su multiresistencia (Peacock y Paterson, 2015).

***Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en perros**

Las infecciones por SARM en perros se han incrementado de manera similar a lo que ocurre en medicina humana (Vincze *et al.*, 2014), siendo comúnmente reportadas en heridas o sitios quirúrgicos, en la piel, oídos y en el tracto urinario (Weese y Van Duijkeren, 2010). No obstante, su aislamiento sigue siendo menor en comparación con SPRM y *S. schleiferi* subesp. *coagulans* resistente a meticilina (SSRM) en mascotas (Morris *et al.*, 2017). En Norte América y Europa, se presume que las cepas dominantes de SARM que colonizan y generan infecciones en mascotas, reflejan la prevalencia de linajes exitosos dentro de la población humana, y generalmente corresponden a cepas multiresistentes (McCarthy *et al.*, 2012). La importancia clínica de SARM en animales de compañía se evidenció en un estudio en Alemania, donde las prevalencias de SARM correspondieron a un 62%, 46,4% y 41% en perros, gatos y equinos, respectivamente (Vincze *et al.*, 2014).

***Staphylococcus pseudointermedius* resistente a meticilina en perros**

S. pseudointermedius es el causante más común de pioderma en caninos (Morris *et al.*, 2017). Puntualmente, las cepas de SPRM han surgido como un importante problema de salud animal en medicina veterinaria (Walther *et al.*, 2017). Las prevalencias mundiales oscilan desde un 15,6% a 30% en Estados Unidos (Bemis *et al.*, 2009) a un 66,7% en Japón (Kawakami *et al.*, 2010). La incrementada incidencia de SPRM se considera una resistencia emergente, siendo común encontrar cepas de SPRM resistentes a una gran variedad de antimicrobianos no β -lactámicos, como amikacina, gentamicina y enrofloxacino (Moodley *et al.*, 2014), situación alarmante al ser posible el contagio zoonótico de estas cepas (Weese y Van Duijkeren 2010).

***Staphylococcus schleiferi* resistente a meticilina en perros**

Pese a que los aislamientos de *S. schleiferi* subesp. *coagulans* en perros sanos son raros, es probable que sean estos su reservorio natural (Griffeth *et al.*, 2008). Las infecciones con SSRM en medicina veterinaria son elevadas, con valores de hasta un 50% (Cain *et al.*, 2011), causando comúnmente infecciones de piel y canal auricular. En humanos, las infecciones con

este patógeno son raras, existiendo una evidencia de contagio desde un perro con otitis hacia una persona inmunosuprimida (Kumar *et al.*, 2007).

Detección fenotípica de resistencia a meticilina en *Staphylococcus* spp.

Uno de los métodos de detección fenotípica de resistencia a meticilina es mediante la técnica de concentración mínima inhibitoria (CIM), definida como la concentración mínima necesaria de un antimicrobiano para inhibir el crecimiento de una población bacteriana. Es el método cuantitativo oficial, que a diferencia de los métodos de *screening* (como el Kirby-Bauer), permite presumir el mecanismo de resistencia. La CIM de oxacilina en cepas de *Staphylococcus* spp., de origen animal, ha demostrado ser un buen predictor de la presencia del gen *mecA* en aislados del grupo de *Staphylococcus intermedius* (SIG, por sus siglas en inglés), constituido por *S. intermedius*, *S. pseudointermedius* y *S. delphini* (Devriese *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2016). Además, se han reportado discordancias entre el método de *screening* y la técnica oficial en la detección fenotípica de resistencia a meticilina. En este contexto, Galarce *et al.* (2016) señalaron la existencia de tres cepas sensibles a meticilina por Kirby-Bauer (K-B), pero con resistencia genotípica. Esto señala la necesidad de realizar la prueba oficial y no sólo el método de K-B para el estudio de este tipo de resistencia.

Además de existir diferencias entre los métodos fenotípicos para detectar resistencia a meticilina, se presentan distintos factores que influyen en la frecuencia de resistencia en cepas SCP, dentro de los que se incluyen:

a) Área geográfica

Existen diferencias geográficas respecto a las prevalencias descritas de SRM. Así, en Asia se ha reportado una prevalencia de 66,7%, mientras que en Europa de un 33% (Kawakami *et al.*, 2010; Ventrella *et al.*, 2017). Al respecto, se cree que contribuyen a esta diferencia la disponibilidad y prescripción de drogas para su uso en animales. Estas diferencias podrían disminuir si se considera el hecho de que en la actualidad los viajes de personas y mascotas entre continentes son cada vez más usuales, siendo este un factor de riesgo para la diseminación geográfica de cepas resistentes (Ríos *et al.*, 2015; Morris *et al.*, 2017).

b) Tratamientos empíricos y presión de selección antimicrobiana

Las infecciones dermatológicas son una de las principales causas de consulta veterinaria en mascotas y a su vez, los patógenos primarios principalmente encontrados en estas infecciones corresponden a cepas de SCP (Morris *et al.*, 2006). De esta forma, se cree actualmente que el uso empírico de antimicrobianos como tratamiento ha generado un aumento en la aparición de cepas SRM multirresistentes, por la presión selectiva de estas drogas sobre la población bacteriana y la transmisión de genes de resistencia (Morris *et al.*, 2017). El uso de antimicrobianos no afecta únicamente al patógeno causante de enfermedad, sino que diezma la población bacteriana sensible que hay en todo el organismo, y se estimula la proliferación de cepas resistentes (WHO, 2015).

c) Sensibilidad de técnicas de detección de resistencia

Existen variaciones de resultados en cuanto a los distintos métodos empleados para reportar resistencia a meticilina. Si bien la prueba de K-B, método de *screening* ampliamente utilizado, ha demostrado ser concordante con el método de CIM frente a otras drogas (CLSI, 2015), se ha evidenciado que en la detección de resistencia a meticilina la prueba de K-B es poco sensible para presumir la presencia del gen *mecA* en cepas SCP (Galarce *et al.*, 2016; Wu, *et al.*, 2016; Saputra *et al.*, 2017).

d) Valores de puntos de corte para resistencia a meticilina

Antes del año 2015, los puntos de corte para resistencia a meticilina según el CLSI no hacían diferencias entre las especies de *Staphylococcus*, siendo el valor para resistencia de ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$. Posterior a ese año, el CLSI determinó que los puntos de corte fueran distintos según la especie, así por ejemplo para *S. aureus* el valor de resistencia es de ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para *S. pseudointermedius* es de $\geq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2015). Esto quiere decir que es difícil comparar las frecuencias de resistencia entre ambos periodos de tiempo para las especies de SCP no *S. aureus*.

Detección de *Staphylococcus* meticilino resistente en Chile

En Chile existen estudios como el de Lubí (2011), en cepas aisladas desde gatos dermatopatas, donde detectó cuatro cepas de SRM resistentes a meticilina (n=30) según el método de K-B, y el de Molina (2011), desde cepas aisladas de perros con patología dermatológica, que

obtuvo solo una cepa (n=29) de SRM determinada por CIM. El 2012, Muñoz *et al.*, también mediante CIM, no detectaron resistencia a meticilina en cepas SCP aisladas desde perros dermatopatas (n=169). Otra publicación de cepas de SRM en mascotas data del año 2016, donde se detectó el gen *mecA* en 11 cepas SCP aisladas desde 72 gatos, sanos y dermatopatas (Galarce *et al.*, 2016). Por otro lado, un estudio de Núñez *et al.* (2017) analizó cepas SCP aisladas desde de perros sanos y con patologías dermatológicas, en el cual la detección de resistencia a meticilina se realizó mediante el método de Kirby-Bauer, obteniendo dos cepas resistentes en perros enfermos (n=39) y cinco en perros sanos (n=42). También existe un estudio, de Da Costa (2018), sobre cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas desde médicos veterinarios, donde a partir de 67 personas muestreadas determinó que 34 de ellas estaban colonizadas con cepas meticilino resistentes. De estas, el 100% presentó resistencia fenotípica por CIM, sin embargo, sólo 47 de las 56 cepas fueron *mecA* positivas.

Dados los antecedentes expuestos, y considerando la importancia de la RAM para la salud animal y salud pública a nivel mundial, este estudio pretendió determinar la concentración mínima inhibitoria de meticilina en cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivas aisladas de perros sanos y con patologías dermatológicas, para así contribuir a la caracterización de la RAM en cepas aisladas desde mascotas y sus implicancias para la salud pública.

OBJETIVO GENERAL

Cuantificar la resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivas aisladas de perros sanos y con patologías dermatológicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) de meticilina en cepas de *Staphylococcus* coagulasa positiva aisladas desde perros.
2. Calcular la concordancia entre el método de Kirby-Bauer y la CIM para meticilina en cepas de *Staphylococcus* coagulasa positiva aisladas desde perros.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile (FAVET).

1. Cepas en estudio

Se utilizaron 106 cepas de SCP aisladas el 2016 desde caninos con y sin lesiones dermatológicas, provenientes de consultas de la Red de Atención Veterinaria de FAVET, ubicadas en la Región Metropolitana de Chile (Núñez *et al.*, 2017). Se consideraron 49 cepas SCP provenientes de 38 caninos con lesiones dermatológicas y 57 cepas SCP aisladas de 48 caninos sanos. Las cepas fueron sometidas a control de pureza y determinación de coagulasa para ser mantenidas posteriormente en un cepario, a temperatura de refrigeración mientras duró el ensayo. Las especies de *Staphylococcus* se identificaron por Núñez, 2019¹, a través del método de reacción en cadena de la polimerasa, para la amplificación especie específica del gen *nuc*, obteniendo: 82 cepas de *S. pseudintermedius*, 5 cepas de *S. aureus*, 5 cepas *S. schleiferi* subesp. *coagulans* y 14 cepas catalogadas como *Staphylococcus* spp., al no pertenecer a ninguna de estas especies. En el Anexo 2 se encuentran los perfiles de resistencia fenotípica de las cepas (Núñez *et al.*, 2017), de las cuales solo se corroboró su resistencia a meticilina realizando la prueba de Kirby-Bauer.

1.1. Control de pureza: Las cepas fueron sembradas en agar sangre, mediante el método de agotamiento e incubadas a 37°C por 24 h. Luego se observó forma, tamaño, presencia de endopigmentos y hemólisis de las colonias, realizando tinción de Gram a todas las colonias sospechosas para corroborar la visualización de cocáceas Gram positivas.

1.2. Prueba de coagulasa: Se procedió a confirmar la presencia de coagulasa libre en todas las cepas. Para ello, se sembraron en caldo común y se incubaron en estufa a 37°C por 18 h. En tubos estériles, se agregaron 0,3 mL del cultivo bacteriológico y adicionaron 0,3 mL de plasma citratado de conejo, diluido en agua destilada estéril en una proporción de 1:3. Como control positivo, se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC®

¹ Comunicación personal Andrea Núñez, 2019. Tesis en curso. Programa de Magister, FAVET. Universidad de Chile.

25923 y como control negativo se usó un tubo con plasma diluido y caldo común sin sembrar. Cada cepa se incubó a 37°C observando cada 30 min. y hasta un máximo de 24 h si ocurría coagulación del plasma (Hersman *et al.*, 2010).

2. Susceptibilidad antimicrobiana a meticilina por método de Kirby-Bauer

Se corroboró de acuerdo a las indicaciones de CLSI (2015). Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- Sembrar cada cepa en caldo común e incubar a 37°C por un máximo de 18 h. Como control, utilizar la cepa *S. aureus* ATCC® 25923.
- Ajustar la turbidez del cultivo en campo estéril, con suero fisiológico, al N° 0,5 estándar de McFarland (concentración aproximada de $1,5 \times 10^8$ bacterias/mL).
- Con un hisopo estéril, transferir el inóculo de cada cepa a una placa con agar Müeller-Hinton (Difco®) con un 2% de NaCl (Merk®), realizando tres improntas.
- Una vez seca la placa, colocar el sensidisco de oxacilina (1µg) (Oxoid®) para luego incubar a 35°C por 24 h.
- Realizar la lectura a partir de la medición en milímetros, con vernier de precisión, del halo de inhibición de desarrollo bacteriano y su interpretación de acuerdo a los puntos de corte del CLSI 2015 (Anexo 3).

3. Concentración mínima inhibitoria (CIM)

Se realizó mediante el método de dilución en agar, de acuerdo a los protocolos estandarizados del CLSI (2015) para medicina veterinaria. Se utilizó oxacilina como droga indicadora de la resistencia a meticilina, analizando diez concentraciones del antimicrobiano.

3.1. Preparación del antimicrobiano:

- Se realizaron diluciones de oxacilina sal sódica, de 95% de potencia (Dr. Ehrenstorfer), desde 512 µg/mL a 0,125 µg/mL, con agua destilada estéril como solvente y diluyente. Estas siguieron el esquema del CLSI, como se muestra en la Tabla 1.
- La cantidad de antimicrobiano necesario para producir la solución *stock* se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Peso (g)} = \frac{\text{Volumen solvente (mL)} \cdot \text{Concentración (}\mu\text{g/mL)}}{\text{Potencia (}\mu\text{g/mL)}}$$

Tabla 1. Esquema para la preparación de diluciones de agentes antimicrobianos para ser usados en pruebas de susceptibilidad de dilución en agar

Paso	Fuente	Solución Antimicrobiana		Diluyente (mL)	Concentración intermedio (µg/mL)	Concentración Final de Dilución en Agar a 1:10 (µg/mL)
		Volumen (mL)	Concentración (µg/mL)			
	Stock	-	5120	-	5120	512
1	Stock	2	5120	2	2560	256
2	Stock	1	5120	3	1280	128
3	Stock	1	5120	7	640	64
4	Paso 3	2	640	2	320	32
5	Paso 3	1	640	3	160	16
6	Paso 3	1	640	7	80	8
7	Paso 6	2	80	2	40	4
8	Paso 6	1	80	3	20	2
9	Paso 6	1	80	7	10	1
10	Paso 9	2	10	2	5	0,5
11	Paso 9	1	10	3	2,5	0,25
12	Paso 9	1	10	7	1,25	0,125

Fuente: CLSI, 2015. **Nota:** modificado y traducido por Valentina Pinilla.

3.2. Preparación de placas:

- Se utilizó como medio de cultivo agar Müeller-Hinton (Difco®) suplementado con 2% peso/volumen de NaCl (Merk®), pH 7,2 a 7,4.
- Se prepararon tubos de ensayo con 18 mL del agar estéril y se mantuvieron en baño termorregulado a una temperatura de 45-55°C.
- Luego, dos mL de cada dilución del antimicrobiano, de 640 a 1,25 µg/mL, fueron añadidos a 18 mL de agar Müeller-Hinton (1:10), logrando las concentraciones finales requeridas (Tabla 1). Se contempló usar una placa sin antimicrobiano como control de crecimiento de las bacterias. Las placas identificadas con su respectiva concentración se almacenaron a temperatura de refrigeración (4-8°C) por no más de 5 días.

3.3. Preparación de inóculos:

- A partir del cepario, se sembró cada cepa en caldo común e incubaron en estufa a 37°C por un máximo de 18 h. Se utilizó como control la cepa *S. aureus* ATCC® 29213.

- La turbidez de los caldos se ajustó en campo estéril al N° 0,5 del nefelómetro de McFarland con suero fisiológico. Los inóculos se colocaron en un Replicador de Steers (Figura 1) para realizar la impresión de placas, partiendo primero con la placa control y luego con las de menor a mayor concentración antimicrobiana. Estas se incubaron en estufa a temperatura de 35°C, por 24 h.

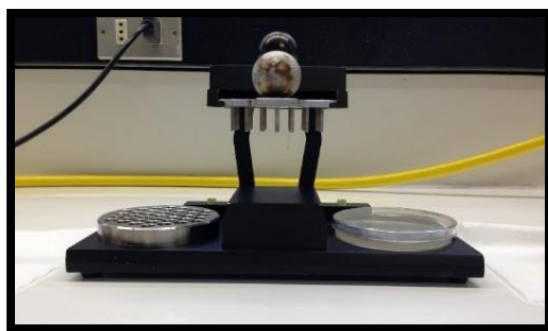


Figura 1: Replicador de Steers para inocular bacterias en placas Petri.

3.4. Lectura: Se realizó observando el crecimiento bacteriano en relación a la concentración creciente de antimicrobiano. La interpretación del valor cuantitativo de concentración de oxacilina ($\mu\text{g/mL}$) que fue capaz de inhibir el crecimiento de cada cepa, se clasificó como resistente (R) o sensible (S) según los puntos de corte establecidos por el CLSI (2015) para las distintas especies y cepas SCP (Anexo 4).

4. Análisis de datos

Los resultados de las CIM se expresaron en porcentajes de cepas sensibles y resistentes. Para determinar el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por el método de K-B y por CIM, se utilizó el análisis de coeficiente kappa (k), mediante el software IBM® SPSS® V21.

5. Medidas de bioseguridad

Staphylococcus spp. es un patógeno de riesgo clase 2, por lo que las normas requeridas contemplan el trabajo en un laboratorio con acceso limitado, zonas de trabajo estéril, el uso de alcohol yodado y elementos de protección como delantal, calzado cerrado y guantes de látex. Los desechos contaminados fueron autoclavados previo a su eliminación (CONICYT, 2008).

RESULTADOS

A las 106 cepas en estudio se les confirmó su estado de pureza y su actividad positiva a coagulasa (Figura 2), verificando que fueran SCP. La susceptibilidad antimicrobiana según el método de K-B detectó la presencia de ocho cepas resistentes a meticilina (Figura 3), de las cuales tres correspondieron a *S. pseudointermedius* y cinco a *Staphylococcus* spp. Por otro lado, mediante la determinación de CIM, 32 cepas resultaron ser resistentes a meticilina (Figura 4), de las cuales la mayoría fue *S. pseudointermedius*, sin detectar resistencia en las cepas *S. aureus* (Tabla 2). De las 32 cepas resistentes, 9 presentaron elevados valores de CIM (≥ 8 $\mu\text{g/mL}$), correspondiendo cinco cepas a *S. pseudointermedius* y cuatro a *Staphylococcus* spp.

En la Tabla 3 se presentan los valores e interpretaciones individuales de CIM para cada cepa, comparándolos con sus resultados de susceptibilidad antimicrobiana según el método de K-B.

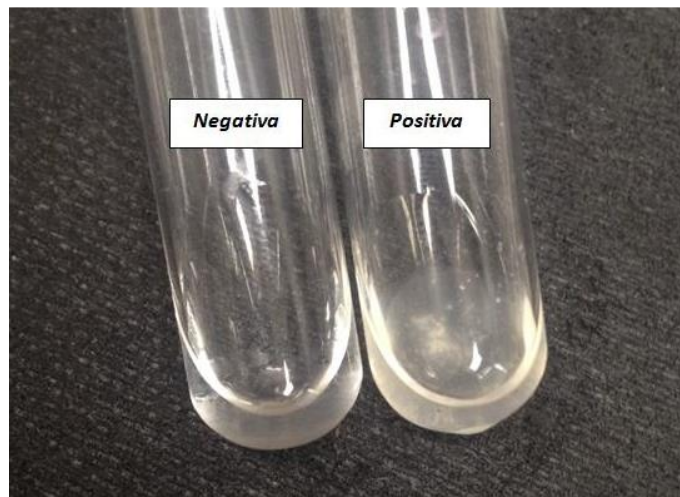


Figura 2: Prueba de coagulasa luego de 24 h de incubación. El tubo negativo muestra ausencia de coagulación y el tubo positivo evidencia coagulación del plasma

Fuente: Da Costa, 2018.

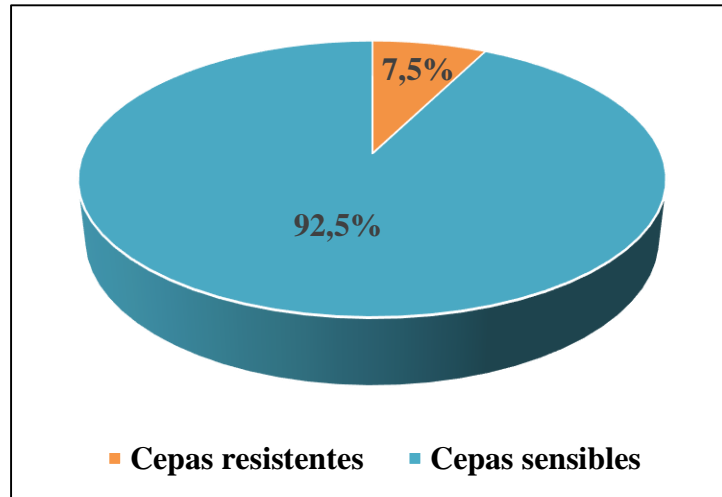


Figura 3: Porcentaje de cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas desde perros sanos y dermatópatas, según susceptibilidad a meticilina mediante el método de Kirby-Bauer

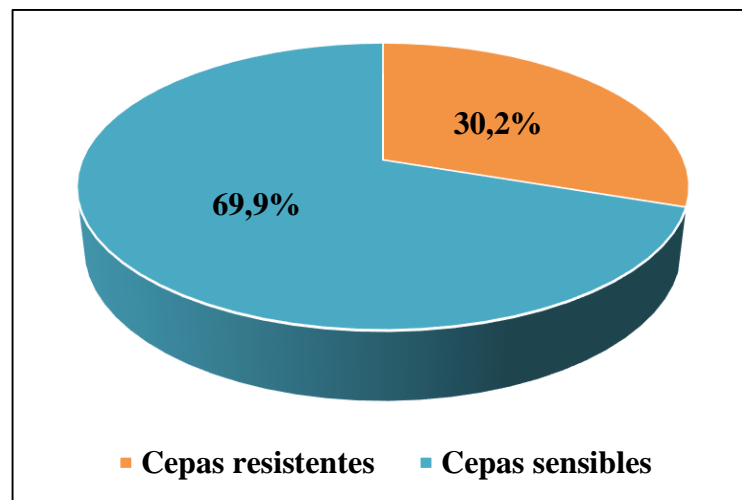


Figura 4: Porcentaje de cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas desde perros sanos y dermatópatas, según susceptibilidad a meticilina mediante el método de concentración mínima inhibitoria

Tabla 2: Resistencia a meticilina por método de concentración mínima inhibitoria en 106 cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas desde perros sanos y dermatopatías, según especie bacteriana

N° de cepas	Especie bacteriana	N° cepas resistentes
82	<i>S. pseudintermedius</i>	19
5	<i>S. aureus</i>	0
5	<i>S. schleiferi</i> subesp. <i>coagulans</i>	1
14	<i>Staphylococcus</i> spp.	12

Tabla 3: Sensibilidad (S) y resistencia (R) a meticilina de las 106 cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivas aisladas desde perros sanos y dermatopatías, según concentración mínima inhibitoria y prueba de Kirby-Bauer

N° de cepas	CIM		N° de cepas según K-B	
	Valor ($\mu\text{g/mL}$)	Interpretación*	S**	R**
73	<0,5	S	73	0
1	0,5	S	1	0
21	0,5	R	17	4
1	1	R	1	0
1	2	R	1	0
2	8	R	1	1
4	32	R	3	1
3	>64	R	1	2

*Valor de CIM para resistencia a meticilina: *S. aureus*: ≥ 4 ; *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* y SCP no *S. aureus*: $\geq 0,5$.

**Valores del diámetro de la zona (mm) para la prueba de K-B: Sensible: ≥ 18 ; Resistente: ≤ 17 .

En la determinación de resistencia a meticilina, 24 cepas sensibles por K-B fueron resistentes por CIM (Tabla 3), mientras que no hubo cepas resistentes por K-B que fueran sensibles por CIM. El análisis de concordancia entre ambos métodos según la estimación del coeficiente kappa se calculó para la población total en estudio (106 cepas) y luego por separado para los

grupos de perros sanos (57 cepas) y perros con patologías dermatológicas (49 cepas) (Tabla 4).

Tabla 4: Análisis de concordancia entre los métodos de Kirby-Bauer y de concentración mínima inhibitoria para resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas desde perros sanos y dermatópatas, según población total y condición clínica

Perros	Valor kappa	Valor de p	Intervalo de confianza de 95%		Interpretación*
Total	0,318	0,000	0,142	0,493	Acuerdo aceptable
Sanos	0,457	0,000	0,112	0,802	Acuerdo moderado
Dermópatas	0,228	0,012	0,047	0,408	Acuerdo aceptable

*Viera y Garret, 2005. Los rangos de interpretación de resultados de los valores de kappa se encuentran en el Anexo 5.

DISCUSIÓN

Se logró cuantificar la susceptibilidad antimicrobiana a meticilina en 106 cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas desde perros sanos y con patologías dermatológicas. De acuerdo a los valores de CIM determinados, se evidencia que un 30,2% de las cepas demostraron ser resistentes a meticilina (SRM), cifra mayor en comparación a diversos estudios internacionales, como los de Dium *et al.* (2016) en Holanda, Ventrella *et al.* (2017) en Italia y Saputra *et al.* (2017) en Australia, quienes reportaron 7%, 12% y 11% de resistencia, respectivamente, en aislados clínicos de perros. Pese a lo anterior, el valor es similar a lo determinado por Bemis *et al.* (2009) en Estados Unidos, cuyos porcentajes alcanzaron un 30%. Cifras aún más elevadas se encuentran en estudios realizados en Asia, donde Kasai *et al.* (2016) reportaron en Japón un porcentaje de resistencia a meticilina de un 69,1% en aislados clínicos de *S. pseudintermedius* desde perros con infecciones en piel. La detección de cepas SRM ha incrementado globalmente en estas mascotas (Beck *et al.*, 2012; Dium *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2017), aumento asociado a multirresistencia, probablemente debido a presión de selección por tratamientos empíricos (Reddy *et al.*, 2016). Así, la administración de antimicrobianos, particularmente fluoroquinolonas, se presenta como un factor de riesgo para la aparición de cepas SRM versus cepas sensibles (Faires *et al.*, 2010; Weese y Van Duijkeren, 2010).

Respecto de la situación nacional, el presente estudio determinó un mayor porcentaje de resistencia a meticilina que la señalada en estudios anteriores en cepas aisladas desde perros. Llama la atención que Núñez *et al.* (2017) informaron un 8,6% de cepas SCP resistentes a meticilina, mientras que el presente estudio muestra un 30,2%, siendo prácticamente las mismas cepas estudiadas. Esta variación se explica por las técnicas utilizadas, ya que Núñez *et al.* (2017) utilizaron K-B, técnica que ha revelado ser insuficiente en la detección de cepas metilino resistentes de origen animal en comparación con la CIM (Wu *et al.*, 2016).

Dado que los tratamientos antimicrobianos empíricos se presentan como factores contribuyentes a la RAM, toma especial relevancia la correcta detección fenotípica de la resistencia a meticilina, a través de un método confiable y aceptado internacionalmente. De esta forma, la CIM actualmente es el método oficial para detectar esta resistencia debido a su

mayor sensibilidad, reproducibilidad y comparación entre laboratorios, además de que permite presumir el mecanismo de resistencia de las cepas SCP; en efecto, valores de CIM ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ sugieren la presencia del gen *mecA* (Peacock y Paterson, 2015). En este estudio, nueve de las cepas con resistencia a meticilina (28,1%) presentaron estos valores, proviniendo de seis perros dermatopatías y de tres perros sanos. Es interesante destacar que en una investigación paralela realizada por Núñez (2019)² con las cepas meticilino resistentes del presente estudio, se evidenció que cinco de las nueve cepas no presentaron el gen *mecA* (Tabla 5). Si bien este hecho no era esperado, fue también observado por Mustapha *et al.* (2016), quienes no detectaron cepas con el gen *mecA* de las 80 cepas de SARM determinadas fenotípicamente. Este fenómeno se puede atribuir a la existencia de otro mecanismo de resistencia descrito en *Staphylococcus* spp., el cual es mediado por la expresión de un gen homólogo de *mecA*, el gen *mecC*. Aunque es menos común de encontrar, como lo señalaron Díaz *et al.* (2016) en un estudio de meta-análisis sobre cepas de SARM portadoras del gen *mecC*, estas pueden presentar elevados valores de CIM, en ausencia del gen *mecA* (Dien Bard *et al.*, 2014).

Tabla 5: Resistencia a meticilina en diferentes especies de *Staphylococcus* según métodos de Kirby-Bauer, concentración mínima inhibitoria y detección del gen *mecA*

Identificación cepa*	Especie	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Interpretación	<i>mecA</i> **
S-4	SCP	8	R	+
S-5	<i>S. pseudointermedius</i>	> 64	R	+
S-6	SCP	> 64	R	-
D-1	<i>S. pseudointermedius</i>	8	R	+
D-2	<i>S. pseudointermedius</i>	32	R	-
D-3	<i>S. pseudointermedius</i>	32	R	-
D-4	SCP	32	R	-
D-5	SCP	32	R	-
D-6	<i>S. pseudointermedius</i>	> 64	R	+

*S = cepa aislada de perro sano; D = cepa aislada de perro dermatopata.

**Núñez, 2019.¹

Fuente: Elaboración propia.

¹ Comunicación personal Andrea Núñez, 2019. Tesis en curso. Programa de Magister, FAVET. Universidad de Chile.

Pese a lo anterior, según las normas del CLSI (2015), todos los aislados que sean *mecA* negativos pero con valores de CIM resistentes a oxacilina, deben ser informados como cepas meticilino resistentes. De esta forma, se demuestra el impacto de detectar la resistencia a meticilina fenotípicamente por el método de CIM y no por otras pruebas fenotípicas incapaces de revelar los diferentes niveles de resistencia.

Además, y dentro de las 32 cepas resistentes detectadas, nueve cepas presentaron altos valores de resistencia a meticlina ($\geq 8 \mu\text{g/mL}$); y las 23 cepas restantes, valores de resistencia entre 0,5 a 2 $\mu\text{g/mL}$. Estos valores cercanos al punto de corte y denominados *border line* según su nivel de resistencia (llamadas cepas BORSA en *S. aureus*, por sus siglas en inglés) pueden indicar resistencia por hiperproducción de betalactamasa, enzima que ejerce acción hidrolítica sobre antibióticos betalactámicos, en ausencia de la proteína PBP2a (Peacock y Paterson, 2015). También podría deberse a alguna modificación de las PBP (referido en inglés como cepas MOD-SA), con la diferencia de que en el caso de la hiperproducción de betalactamasa, una asociación de fármacos con ácido clavulánico o sulbactam disminuye los valores de CIM (Peacock y Paterson, 2015). El problema de las cepas *border line* no solo es que el método de K-B no logra detectarlas, sino que hay autores que no las consideran como meticilino resistentes en ausencia del gen *mecA* (Bean y Wigmore, 2016; Hryniewicz y Garbacz, 2017; Saputra *et al.*, 2017). Se han propuesto otros mecanismos sugerentes de la determinación de este tipo de cepas, los que incluyen la síntesis de nuevas β -lactamasas codificadas por plásmidos o modificación de los genes de PBP por mutaciones espontáneas que afectan a los aminoácidos en el dominio transpeptidasa. En estos, se ven involucradas otras proteínas ligadoras de penicilina, las PBP3 y/o PBP4, que se asocian a la presión selectiva del uso de antibióticos β -lactámicos (Hryniewicz y Garbacz, 2017). El hecho de que en este estudio el 71,9% del total de cepas resistentes a meticilina hayan presentado valores *border line* (0,5 – 2 $\mu\text{g/mL}$) constituye una amenaza tanto desde la perspectiva epidemiológica como terapéutica, ya que este tipo de cepas puede producir las mismas patologías que las generadas por SRM con elevados valores de CIM, incluso en infecciones severas es conocido que tampoco son efectivos los tratamientos con penicilinas resistentes a penicilinasas. Además, estas cepas *border line* también suelen ser multirresistentes (Peacock y Paterson, 2015; Hryniewicz y Garbacz, 2017), sin embargo, este hecho solo fue

evidenciado en una de las 23 cepas en estudio (Anexo 2). Es interesante destacar que en este estudio, una de las cepas *border line* presentó el gen *mecA* (dato no mostrado en Tabla 5). Similarmente, un estudio en Polonia determinó que de 132 cepas de *S. aureus* aisladas de alimentos de origen animal, ocho resultaron ser BORSA, y una cepa con valor de 4 µg/mL presentó el gen *mecA*. A esto se lo relacionó con la expresión fenotípica de heterorresistencia (Bystron *et al.*, 2010), es decir, en una población bacteriana se pueden generar subpoblaciones con diferentes grados de resistencia elevada. Las prevalencias de cepas BORSA son difíciles de estimar y suelen encontrarse más estudios en cepas aisladas desde animales destinados a la producción de alimentos que en perros (Bystron *et al.* 2010; Sieber *et al.* 2011). Estudios en medicina humana señalan que los pacientes de unidades dermatológicas que habían cursado una infección con este tipo de cepas presentaban síntomas más graves y con mayor frecuencia de rehospitalización comparado con aquellos infectados por cepas sensibles a meticilina (Hryniewicz y Garbacz, 2017). Así, no hay razón para pensar que estas cepas se comporten de manera diferente en mascotas que a lo observado en medicina humana y en animales de producción.

Tanto en las cepas *border line* como en las cepas de alto nivel de resistencia (≥ 8 µg/mL) se observaron diferencias entre la susceptibilidad a meticilina detectada por la CIM y por el método de K-B. De las 32 cepas resistentes por CIM, 24 de ellas no fueron pesquisadas por K-B. Estas diferencias podrían ser explicadas, en primer lugar, porque se ha demostrado que esta prueba no discrimina meticilino resistencia en aislados del grupo de *Staphylococcus intermedius* (SIG) (CLSI, 2015; Wu *et al.*, 2016), y como se señaló anteriormente, la mayoría de las cepas en estudio pertenecen a este grupo. Por otro lado, la técnica de K-B no es capaz de caracterizar las cepas BORSA, MOD-SA y diferenciarlas de las SRM, es decir, no presenta la sensibilidad necesaria para pesquisar las cepas de bajo nivel de resistencia, considerando que en este estudio, la mayoría de las cepas meticilino resistentes correspondieron a cepas *border line*. De esta forma, se puede concluir que el método de difusión en disco es insuficiente para detectar resistencia a meticilina en cepas de SCP aisladas de origen animal (Wu *et al.*, 2016; Huse *et al.*, 2018). Por lo anterior, la CIM continúa siendo el método de elección. Además, el poder cuantificar el nivel de resistencia a meticilina, permite la predicción del determinante génico de resistencia asociado, siendo lo

más frecuente para meticilina la presencia del gen *mecA*. No obstante, si bien es cierto que las pruebas genéticas pueden confirmar la presencia de un gen, estas presentan limitaciones en cuanto a recursos y solo pueden emplearse en laboratorios más especializados (Smith *et al.*, 2018), constituyendo así la CIM una herramienta óptima.

El análisis de concordancia realizado en este estudio nuevamente demuestra la sensibilidad de la CIM respecto del método de K-B. Llama la atención que el índice kappa en el grupo de cepas provenientes de perros sanos se interpretó como “acuerdo moderado”, mientras que en cepas provenientes de perros dermatopatas su interpretación fue solo “aceptable”, incluso con un valor que se acerca a la interpretación de “acuerdo leve” (Anexo 5). Estas observaciones permiten dilucidar que cuando el perro presenta una patología dermatológica, es más probable que el método de K-B no sea capaz de detectar que la cepa sea sensible o resistente a meticilina ya que, dentro de este mismo grupo, los mayores desacuerdos ocurren en las cepas *border line*. Este fenómeno es esperado, ya que la mayor parte de los perros que cursan patologías dermatológicas se encuentran sometidos a mayor presión de selección antimicrobiana que los perros sanos (Beck *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2016).

Los resultados de concordancia permiten sugerir que en perros dermatopatas se solicite un estudio de CIM y no de K-B, de tal manera de no falsear los resultados de susceptibilidad frente a drogas β -lactámicas. Al respecto, pese a que la meticilina/oxacilina es una droga que no se emplea en animales, la resistencia a ella sugiere la resistencia a todos los fármacos β -lactámicos, con excepción de cefalosporinas de última generación (Berger-Bachi y Rohrer, 2002).

A título complementario, al analizar la condición clínica de los perros en estudio, el 50% de los perros con patología dermatológica (19) presentaron cepas meticilino resistentes por el método de CIM, valor elevado y similar a lo encontrado por Beck *et al.*, (2012), en Canadá, donde de 173 perros, el 45,1% presentó cepas de SRM. El hecho de presentar una enfermedad dérmica suele relacionarse con un historial de repetidos tratamientos antimicrobianos, como lo indica el estudio de Beck *et al.* (2012), donde el 89% de los perros había recibido anteriormente un antimicrobiano, particularmente fluoroquinolonas, los cuales pueden inducir co-selección. De hecho, Saputra *et al.* (2017) revelaron en su estudio que las cepas

de *S. pseudointermedius* aisladas desde infecciones de sitios quirúrgicos, de piel o de tejidos blandos, presentaban tres veces más probabilidades de ser cepas meticilino resistentes en los casos que los perros hubiesen recibido previamente un tratamiento antimicrobiano, lo que representa un gran desafío debido a la limitada opción de drogas disponibles actualmente para la medicina veterinaria y más aún, que logren una buena distribución en piel (Beck *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2017). Por otro lado, en cuanto a los perros sanos, el 18,8% de ellos (9) albergaron una cepa SRM, valor que se encuentra dentro de los rangos señalados en la literatura, que van de un 2% a 73% (Mouney *et al.*, 2015; Bean y Wigmore, 2016; Han *et al.*, 2016). Esta alta variación en las frecuencias de resistencia a meticilina en perros sanos puede atribuirse a un factor geográfico (Ríos *et al.*, 2015), a la convivencia con más animales (Han *et al.*, 2016), entre otros.

Históricamente, SARM ha sido más frecuentemente estudiado por su importancia en medicina humana humana (WHO, 2017), razón por la que los estudios en medicina veterinaria siempre se enfocaron en *S. aureus*, que tiene a las mascotas como potenciales reservorios (Morris *et al.*, 2012). Sin embargo, según los resultados del presente estudio y de otros recientes (Walther *et al.*, 2012; Moodley *et al.*, 2014; Morris *et al.*, 2017), las cepas que están predominando en perros corresponden a SPRM. Se cree que este agente ha sido subestimado por la dificultad en los laboratorios veterinarios y humanos para discriminar fenotípicamente a esta especie dentro del grupo SIG (Weese *et al.*, 2010). Actualmente existen estudios que señalan la futura emergencia de SPRM como patógeno zoonótico en medicina humana (Kmieciak y Szewczyk, 2018; Febler *et al.*, 2018). Por otro lado, existe el riesgo sanitario para los médicos veterinarios y personal asociado, como lo refleja el estudio de Drougka *et al.* (2016) que detectaron marcadores genéticos idénticos o similares en cepas de *Staphylococcus* spp. entre estas personas y los animales, concluyendo su carácter zoonótico.

Finalmente, con el presente estudio se revela la importancia de cuantificar la resistencia a meticilina en cepas SCP aisladas desde perros, que permitan pesquisar eficazmente los distintos niveles de resistencia y sus implicancias tanto para la salud animal como la salud pública. Si bien la CIM presenta desventajas económicas sobre un método de *screening*, la relación costo-beneficio se torna evidente al considerar la sensibilidad analítica. No detectar

cepas SRM podría significar una mayor reincidencia en las infecciones, aumento en los costos terapéuticos, por hospitalización, y lo que es más grave aún, continuar contribuyendo al problema de la multirresistencia antimicrobiana en estas bacterias. Por lo anterior, se sugiere incorporar a los SCP provenientes de mascotas en los sistemas de vigilancia de patógenos que representen un riesgo para la salud pública, y así monitorear tendencias para guiar políticas públicas locales de uso de antibióticos a nivel nacional.

CONCLUSIONES

- Tanto los perros sanos como dermatopatías analizados en este estudio son portadores de diferentes especies de *Staphylococcus* coagulasa positiva resistentes a meticilina en la piel, con cepas cuyo nivel de resistencia es elevado y *border line*.
- El método de Kirby-Bauer presenta baja concordancia con los resultados obtenidos por el método de CIM para meticilina, por lo cual no se recomienda el empleo del método de *screening*.

BIBLIOGRAFÍA

- **BEAN, D.; WIGMORE, S.** 2016. Carriage rate and antibiotic susceptibility of coagulase-positive Staphylococci isolated from healthy dogs in Victoria, Australia. *Aust. Vet. J.* 94(12):456-460.
- **BECK, K.; WAISGLASS, S.; DICK, H.; WEESE, J.** 2012. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and carriage sites of dogs after treatment of their methicillin-resistant or methicillin-sensitive staphylococcal pyoderma. *Vet. Dermatol.* 23:369–e67.
- **BERGER-BACHI, B.; ROHRER, S.** 2002. Factors influencing methicillin resistance in Staphylococci. *Arch. Microbiol.* 178:165-171.
- **BEMIS, A.; JONES, R.; FRANK, A.; KANIA, S.** 2009. Evaluation of susceptibility test breakpoint used to predict *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus pseudointermedius* isolated from dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21:53-58.
- **BYSTRON, J.; PODKOWIK, M.; KORZEKWA, K.; LIS, E.; MOLENDNA, J.; BANIA, J.** 2010. Characterization of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from food of animal origin. *J. Food Prot.* 73(7):1325–1327.
- **CAIN, C.; MORRIS, D.; RANKIN, S.** 2011. Epidemiological characterization of *Staphylococcus schleiferi* infections in dogs and identification of clinical risk factors for oxacillin resistance. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1:573.
- **CLSI CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.** 2015. VET01S Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. CLSI. USA. 128p.
- **CONICYT COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLOGÍA.** 2008. Manual de normas de bioseguridad. [en línea] <http://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2009/05/articles-31430_manual.pdf> [Consulta: 15-05-2018].

- **DA COSTA, R.** 2018. Portación nasal de cepas de *Staphylococcus* meticilino resistentes en personal de la Red de Atención Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Tesis Magíster en Ciencias Veterinarias. Santiago, Chile. U. Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 75p.

- **DEVRIESE, L.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A., HAESEBROUCK, F.** 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55(4):1569-73.

- **DÍAZ, R.; RAMALHEIRA, E.; AFREIXO, V.; GAGO, B.** 2016. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the new *mecC* gene-a meta-analysis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 84:135-140.

- **DIEN BARD, J.; HINDLER, J.; GOLD, J.; LIMBAGO, B.** 2014. Rationale for eliminating *Staphylococcus* breakpoints for β -lactam agents other than penicillin, oxacillin or ceftazidime, and ceftaroline. Clin. Infect. Dis. 58(9):1287–1296.

- **DIUM, B.; VERSTAPPEN, K.; BROENS, E.; LAARHOVEN, L.; VAN DUIJKEREN, E.; HORDIJK, J.; HEUS, P.; SPANINKS, M.; TIMMERMAN, A.; WAGENAARA, J.** 2016. Changes in the population of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and dissemination of antimicrobial-resistant phenotypes in the Netherlands. J. Clin. Microbiol. 54:283–288.

- **DROUGKA, E.; FOKA, A.; KOUTINAS, C.; JELASTOPULU, E.; GIORMEZIS, N.; FARMAKI, O.; SARROU, S.; ANASTASSIOU, E.; PETINAKI, E.; SPILIOPOULOU, I.** 2016. Interspecies spread of *Staphylococcus aureus* clones among companion animals and human close contacts in a veterinary teaching hospital. A cross-sectional study in Greece. Prev. Vet. Med. 126:190–198.

- **FAIRES, M.; TRAVERSE, M.; TATER, K.; PEARL, D.; WEESE, J.** 2010. Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* infections in dogs. *Emerg. Infect. Dis.* 16(1):69–75.
- **FEBLER, A.; SCHÜNEMANN, R.; KADLEC, K.; HENSEL, V.; BROMBACH, J.; MURUGAIYAN, J.; OECHTERING, G.; BURGNER, I.; 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. *Vet. Microbiol.* 221:153-158.
- **GALARCE, N.; MUÑOZ, L.; JARA, M.; LUBÍ, P.; SEPÚLVEDA, A. ANTICEVIC, S.** 2016. Detección del gen *mecA* en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positiva aisladas desde gatos. *Rev. Chil. Infectol.* 33(4):410-418.
- **GRIFFETH, G.; MORRIS, D.; ABRAHAM, J.** 2008. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Vet. Dermatol.* 19:142-149.
- **HAN, J.; YANG, C.; PARK, J.** 2016. Prevalence and risk factors of *Staphylococcus* spp. carriage among dogs and their owners: A cross-sectional study. *The Vet. J.* 212:15-21.
- **HERMANS, K.; DEVRIESE, L.; HAESBROUCK, F.** 2010. *Staphylococcus*. **In:** Gyles, C., Prescott, J., Songer, G., Thoen, C. (Eds.). Pathogenesis of bacterial infections in animals. Cuarta edición. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. pp. 75-85.
- **HRYNIEWICZ, M.; GARBACZ, K.** 2017. Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) – a more common problem than expected? *J. Med. Microbiol.* 66:1367–1373.
- **HUSE, H.; MILLER, S.; CHANDRASEKARAN, S.; HINDLER, J.; LAWHON, S.; BEMIS, D.; WESTBLADE, L.; HUMPHRIES, R.** 2018. Evaluation of oxacillin and ceftiofur disk diffusion and MIC breakpoints established by the clinical and

laboratory standards institute for detection of *mecA*-mediated oxacillin resistance in *Staphylococcus schleiferi*. J. Clin. Microbiol. 56(2):e01653-17.

- **IVERSON, S.; BRAZIL, A.; FERGUSON, J.** 2015. Anatomical patterns of colonization of pets with staphylococcal species in homes of people with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) skin or soft tissue infection (SSTI). Vet. Microbiol. 176:202-208.
- **KANG, J.; CHUNG, T.; HWANG, C.** 2017. Clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from skin infection of dogs in Korea. Vet. Microbiol. 210:32-37.
- **KASAI, T.; SAEGUSA, S.; SHIRAI, M.; MURAKAMI, M.; KATO, Y.** 2016. New categories designated as healthcare-associated and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs. Microbiol. Immunol. 60: 540–551.
- **KAWAKAMI, T.; SHIBATA, S.; MURAYAMA, N.** 2010. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. J. Vet. Med. Sci. 72:1615-9.
- **KIM, C.; MWANG, M.; CHUNG, M.; MILHERICO, C.; LENCASTRE, H.; TOMASZ, A.** 2013. The mechanism of heterogeneous beta-lactam resistance in MRSA: key role of the stringent stress response. PLoS ONE 8(12):e82814.
- **KMIECIAK, W.; SZEWCZYK, E.** 2018. Are zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* strains a growing threat for humans? Folia Microbiol. 63:743–747.
- **KUMAR, D.; CAWLEY, J.; IRIZARRY-ALVARADO, J.; ALVAREZ, A.; ALVAREZ, S.** 2007. Case of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* endocarditis and metastatic infection in an immune compromised host. Transp. Infect. Dis. 9:336-338.

- **LUBÍ, P.** 2011. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivo de gatos con lesiones dermatológicas. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 68 p.
- **McCARTHY, A.; LINDSAY, J.; LOEFFER, A.** 2012. Are all methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) equal in all hosts? Epidemiological and genetic comparison between animal and human MRSA. *Vet. Dermatol.* 23:267-275.
- **MOLINA, M.** 2011. Caracterización molecular de resistencia a antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas de pioderma y otitis en caninos. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 55 p.
- **MOODLEY, A.; DAMBORG, P.; SAXMOSE, S.** 2014. Antimicrobial resistance in methicillin resistant *Staphylococcus pseudointermedius* of canine origin: Literature review from 1980 to 2013. *Vet. Microbiol.* 171:337-341.
- **MORRIS, D.; MAULDIN, E.; O'SHEA, K.; SHOFER, F.; RANKIN, S.** 2006. Clinical, microbiological, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections of cats. *AJVR* 67:1421-1425.
- **MORRIS, D.; LAUTENBACH, E.; ZAOUTIS, T.; LECKERMAN, K.; EDELSTEIN, P.; RANKIN, S.** 2012. Potential for pet animals to harbour methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* when residing with human MRSA patients. *Zoonoses Public Health* 59(4):286-93.
- **MORRIS, D., LOEFFLER, A., DAVIS, M., GUARDABASSI, L., WEESE, J.** 2017. Recommendations for approaches to methicillin-resistant Staphylococcal infections of small animals: diagnosis, therapeutic considerations and preventative measures. *Vet, Dermatol*, 28:304-331.

- **MOUNEY, M.; STILES, J.; TOWNSEND, W.; GUPTILL, L.; WEESE, J.** 2015. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. in the conjunctival sac of healthy dogs. *Vet. Ophthalmol.* 18(2):123-6.
- **MUÑOZ, L.; MOLINA, M.; HERESMANN, M.; ABUSLEME, F.; ULLOA, MT.; BORIE, C.; SAN MARTÍN, B.; SILVA, V.; ANTICEVIC, S.** 2012. Primer reporte de aislamiento de *Staphylococcus schleiferi* subespecie *coagulans* en perros con pioderma y otitis externa en Chile. *Arch. Med. Vet.* 44(3):261-265.
- **MUSTAPHA, M.; BUKAR-KOLO, Y.; GEIDAM, Y.; GULANI I.** 2016. Phenotypic and genotypic detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hunting dogs in Maiduguri metropolitan, Borno State, Nigeria. *Vet. World* 9(5):501-506.
- **NÚÑEZ, A.; DA COSTA, R.; GALARCE, N.; BORIE, C.; ANTICEVIC, S.** 2017. Resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus coagulasa* positiva aisladas desde piel de perros sanos y con pioderma. Poster presentado en las XIII Jornadas Científicas del Instituto de Salud Pública de Chile. Santiago, Chile.
- **PEACOCK, S.; PATERSON, G.** 2015. Mechanism of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Biochem.* 84:577-601.
- **RÍOS, A.; BAQUERO, M.; ORTIZ, G.; SMIT, L.; RODRÍGUEZ-DOMÍNGUEZ, M.; SÁNCHEZ-DÍAZ, A.** 2015. *Staphylococcus* multirresistentes a los antibióticos y su importancia en medicina veterinaria. *Clin. Vet. Peq. Anim.* 35(3):149-161.
- **REDDY, S.; KUMARI, N.; SIVAJOTHI, S.** 2016. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from dogs with recurrent pyoderma. *J. Dairy Vet. Anim. Res.* 3(2): 00073.
- **SAPUTRA, S.; JORDAN, D.; WORTHING, K.; NORRIS, J.; WONG, J.; ABRAHAM, R.; TROTT, D.; ABRAHAM, S.** 2017. Antimicrobial resistance in coagulase-positive *Staphylococci* isolated from companion animals in Australia: A one year study. *PLoS ONE* 12(4):e0176379.

- **SIEBER, S.; GERBER, V.; JANDOVA, V.; ROSSANO, A.; EVISON, J.; PERRETEN, V.** 2011. Evolution of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* infections in horses and colonized personnel in an equine clinic between 2005 and 2010. *Microb. Drug Resist.* 17(3):471-8.
- **SMITH, P.; FINNEGAN, W.; NGO, T.; KRONVALL, G.** 2018. Influence of incubation temperature and time on the precision of MIC and disc diffusion antimicrobial susceptibility test data. *Aquac.* 490:19-24.
- **VENTRELLA, G.; MOODLEYB, A.; GRANDOLFOA E.; PARISIC, A.; CORRENTEA, M.; BUONAVOGLIAA, D.; GUARDABASSID L.** 2017. 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. *Vet. Microbiol.* 211:103-106.
- **VIERA, A.; GARRET, J.** 2005. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam. Med.* 37(5):360-3.
- **VINCZE, S.; STAMM, I.; KOPP, P.; HERMES, J.; ADLHOCH, C.; SEMMLER, T.; WIELER, L.; LÜBCKE-BECKER, A.; WALTHER, B.** 2014. Alarming proportions of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in wound samples from companion animals, Germany 2010-2012. *PLoS ONE* 9:e85656.
- **WALTHER, B.; HERMES, J.; CUNY, C.; WIELER, L.; VINCZE, S.; ELNAGA, Y.; STAMM, I.; KOPP, P.; KOHN, B.; WITTE, W.; JANSEN, A.; CONRATHS, F.; SEMMLER, T.; ECKMANNS, T.; LÜBKE-BECKER, A.** 2012. Sharing more than friendship — nasal colonization with coagulase-positive Staphylococci (CPS) and co-habitation aspects of dogs and their owners. *PLoS ONE* 7(4):e35197.
- **WALTHER, B.; TEDIN, K.; LÜBKE-BECKER, A.** 2017. Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. *Vet. Microbiol.* 200:71-78.

- **WEESE, J.; VAN DUIJKEREN, E.** 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudointermedius* in veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* 140:418-429.

- **WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2015. Global action plan on antimicrobial resistance. [en línea] <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf?sequence=1> [consulta: 30-07-18].

- **WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. [en línea] <http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1> [consulta: 30-04-18].

- **WU, M.; BURNHAM, C.; WESTBLADE, L.; DIEN BARD, J.; LAWHON, S.; WALLACE, M.; STANLEY, T.; BURD, E.; HINDLER, J.; HUMPHRIES, R.** 2016. Evaluation of oxacillin and cefoxitin disk and MIC breakpoints for prediction of methicillin resistance in human and veterinary isolates of *Staphylococcus intermedius* group. *J. Clin. Microbiol.* 54(3): 535-542.

PLANIFICACIÓN

Carta Gantt																													
	Actividades	agosto				septiembre				octubre				noviembre				diciembre				enero				marzo			
		Meses																				Semanas							
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Entrega de Proyecto																												
2	Presentación Proyecto																												
3	Inducción																												
4	Control de pureza cepas																												
5	Determinación coagulasa																												
6	Replicación de cepario																												
7	Realización Kirby-Bauer																												
8	Implementación CIM																												
9	CIM																												
10	Presentación de avance																												
11	Análisis resultados																												
12	Redacción Proyecto																												
13	Presentación Final																												

ANEXOS

Anexo 1.

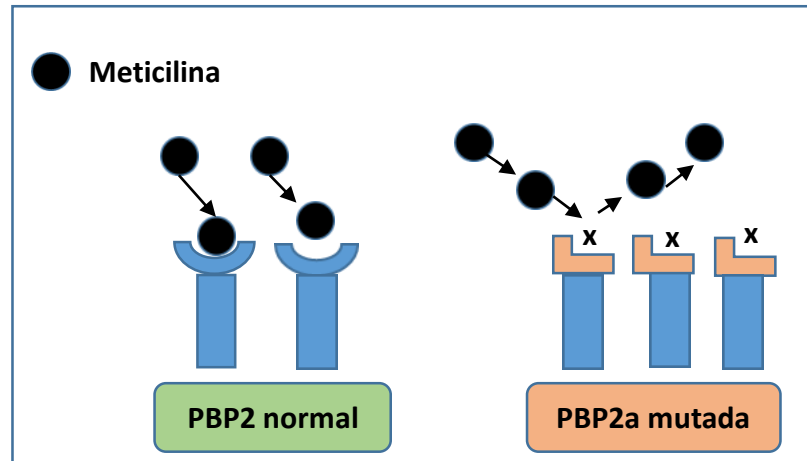


Figura 1: Mutación del sitio blanco bacteriano de unión a β -lactámicos. La alteración de la proteína PBP2 a PBP2a resulta en una pérdida de afinidad del sitio blanco por los β -lactámicos, incluyendo a meticilina. **Fuente:** elaboración propia.

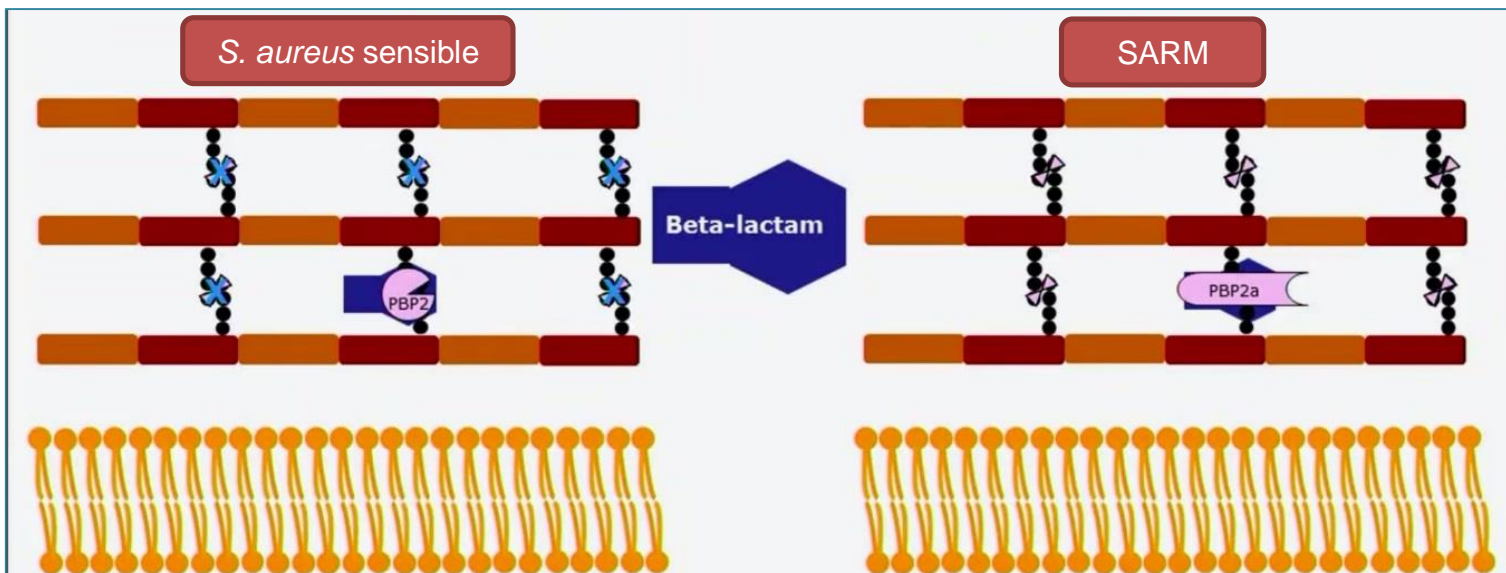


Figura 2: Diferencia estructural de la pared celular entre una cepa sensible de *S. aureus* y una cepa SARM. Al no permitirse la unión de β -lactámicos a las PBP2a mutadas, SARM puede continuar la transpeptidación para entrelazar las capas de la pared bacteriana y continuar su desarrollo en presencia del antimicrobiano. **Fuente:** elaboración propia.

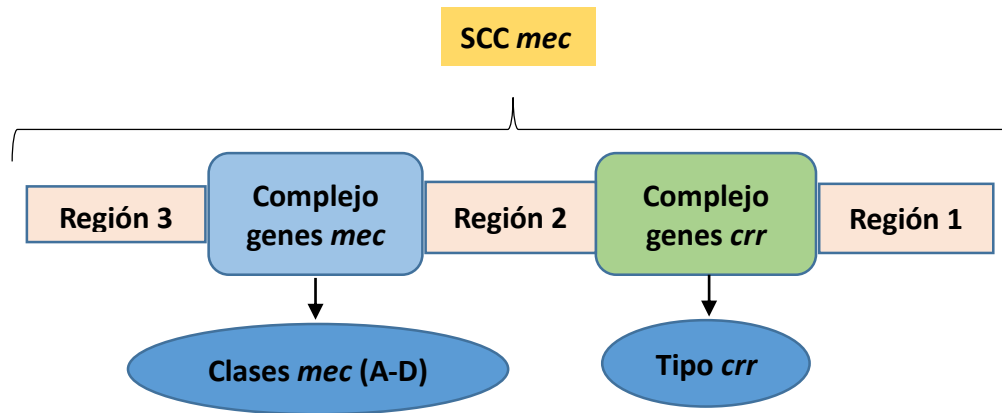


Figura 3: Fragmento genético que contiene el *cassette* cromosómico estafilocócico *mec* (SCC_{mec}), del cual el gen *mecA* es parte. Este complejo es responsable del movimiento de la región genética completa, hacia o desde el cromosoma estafilocócico. **Fuente:** elaboración propia.

Anexo 2.

Tabla 1: Susceptibilidad antimicrobiana según el método de Kirby-Bauer en 106 cepas de *Staphylococcus coagulasa* positiva aisladas desde perros sanos y con patología dermatológica.

N° Cepa	Origen	OX	AMC	AML	DA	CDX	DXT	TE	SXT	AK	C	ENR	MUP	N° R a AB por cepa	N° I a AB por cepa	N° R+I a AB por cepa
1	1ACs	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S	S	4	0	4
2	2ACs	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	2	0	2
3	3ACs	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	3	0	3
4	5ACs	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	0	1
5	6ACs	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2	0	2
6	7ACs	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	0	1
7	8ACs	S	S	R	I	S	R	R	R	S	S	S	S	4	1	5
8	9ACs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
9	10ACs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
10	15ACs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
11	16ACs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
12	18ACs	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	6	0	6
13	20ACs	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	2	0	2
14	23ACs	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	6	0	6
15	24ACs	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	5	0	5
16	25ACs	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	0	1
17	26ACs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
18	28ACs	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	I	S	2	1	3
19	28BCs	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	0	1
20	30ACs	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	0	1
21	30BCs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
22	31ACs	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	2	0	2
23	32ACs	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	0	1
24	35ACs	R	S	R	R	I	R	R	R	S	R	R	S	8	1	9
25	40ACs	S	S	R	I	S	S	S	R	S	S	R	S	3	1	4
26	3As	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	0	1	1
27	3Bs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
28	4As	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
29	5A1s	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
30	7A1s	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
31	15Bs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
32	18As	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
33	19As	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	1	0	1
34	20As	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
35	22A2s	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	1	1	2
36	22A3s	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	1	1	2
37	26As	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
38	26Cs	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	1	1
39	27As	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
40	27Cs	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	0	1	1
41	30A1s	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0

N° Cepa	Origen	OX	AMC	AML	DA	CDX	DXT	TE	SXT	AK	C	ENR	MUP	N° R a AB por cepa	N° I a AB por cepa	N° R+I a AB por cepa
42	31A1s	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
43	31B2s	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	1	1	2
44	31Cs	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	0	1	1
45	32C1s	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
46	34A1s	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	0	1	1
47	34A2s	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
48	34C1s	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
49	35A1s	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
50	35A3s	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	0	1	1
51	36Cs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
52	37A1s	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	0	1
53	38B2s	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
54	39Bs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
55	40C2s	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	1	1
56	41A3s	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
57	43Cs	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	1	0	1
58	1Ae	R	S	I	R	S	S	S	R	S	S	R	S	4	1	5
59	1Be	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	2	0	2
60	2A1e	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	1	0	1
61	2A2e	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	1	1	2
62	2Be	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	1	1	2
63	3Be	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
64	4Be	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
65	5e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
66	6Ae	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
67	6Be	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	1	1
68	7Ae	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	1	1
69	8Ae	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	7	0	7
70	9e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
71	10e	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	1	1
72	11Be	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
73	12Ae	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	1	0	1
74	12De	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
75	13Be	S	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	1	1	2
76	14e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
77	16e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	1	0	1
78	18e	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	S	S	5	0	5
79	19B1e	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	2	0	2
80	19B2e	S	S	S	S	S	R	R	I	S	S	S	S	2	1	3
81	20Ae	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	2	0	2
82	21Be	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	2	0	2
83	22Be	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
84	23e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
85	25e	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	2	0	2
86	27Ae	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0

N° Cepa	Origen	OX	AMC	AML	DA	CDX	DXT	TE	SXT	AK	C	ENR	MUP	N° R a AB por cepa	N° I a AB por cepa	N° R+I a AB por cepa
87	27Be	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	6	0	6
88	28e	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	2	0	2
89	29e	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	0	1
90	29Be	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	2	0	2
91	30e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
92	31e	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	1	0	1
93	32Ae	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
94	32Be	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	1	0	1
95	35e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
96	36Ae	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	2	0	2
97	36Be	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
98	37e	S	S	I	S	S	R	R	S	I	S	S	S	2	2	4
99	38e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
100	39Ae	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
101	40Ae	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	1	0	1
102	41Ae	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	1	1
103	41Ce	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
104	42e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
105	43e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	0	0
106	44e	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	7	0	7

OX: Oxacilina; **AMC:** Amoxicilina+ácido clavulánico; **AML:** amoxicilina; **DA:** clindamicina; **CDX:** cefadroxilo; **DXT:** doxiciclina; **TE:** tetraciclina; **SXT:** sulfa+trimetoprin; **AK:** amikacina; **C:** cloranfenicol; **ENR:** enrofloxacino; **MUP:** mupirocina. **R:** resistente; **I:** sensibilidad intermedia; **S:** sensible. **Fuente:** Núñez *et al.*, 2017.

Fuente: Núñez *et al.*, 2017.

Anexo 3.

Tabla 1: Puntos de corte de la prueba de difusión en disco por método de Kirby-Bauer para cepas de SCP.

Antimicrobiano	Organismo	Diámetro de la zona más cercana (mm)		
		R	I	S
Oxacilina (1µg)	SCP	≤ 17	-	≥ 18

R = resistente, I = intermedio, S = sensible.

Fuente: CLSI, 2015.

Anexo 4.

Tabla 1: Puntos de corte para la concentración mínima inhibitoria de meticilina en cepas de SCP.

Antimicrobiano	Especies	Criterio para la interpretación de CIM (µg/mL)		
		S	I	R
Oxacilina	<i>S. aureus</i>	≤ 2	-	≥ 4
	<i>S. pseudointermedius</i>	≤ 0,25	-	≥ 0,5
	<i>S. shcleiferi</i>	≤ 0,25	-	≥ 0,5

R = resistente, I = intermedio, S = sensible.

Fuente: CLSI, 2015.

Anexo 5.

Tabla 1: Interpretación de valores de kappa.

Valor de kappa	Interpretación
< 0	Acuerdo menor que al azar
0,01 - 0,20	Acuerdo leve
0,21 - 0,40	Acuerdo aceptable
0,41 - 0,60	Acuerdo moderado
0,61 - 0,80	Acuerdo substancial
0,81 - 0,99	Acuerdo casi perfecto

Fuente: Viera y Garret, 2005.