

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“ESTUDIO DE RESISTENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE
CEPAS DE *Staphylococcus* COAGULASA POSITIVOS AISLADOS
DESDE PERROS, TUTORES, VETERINARIOS Y SUPERFICIES
DEL HOSPITAL CLÍNICO VETERINARIO DE LA
UNIVERSIDAD DE CHILE”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctor en Farmacología por:**

Francisco Javier Abusleme Garay

**Director de Tesis: Dr. Gerardo González-Rocha
Co-Directora de Tesis: Dra. Daniela Iragüen**

Santiago-CHILE

Diciembre-2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Francisco Javier Abusleme Garay

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctorado en Farmacología, en el examen público rendido el día viernes 31 de marzo del 2023.

Director de Tesis:

Dr. Gerardo González-Rocha

Co-directora de Tesis:

Dra. Daniela Iragüen

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Juan Diego Maya

Dra. Cecilia Toro

Dr. Sergio Álvarez

Dr. Alfredo Molina

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi hijo Faruk, que sea una herramienta para enseñarle que con esfuerzo todo es posible. A mi compañera Lidise, por apoyar cada uno de los pasos de este proceso, y a todos aquellos que de una u otra manera aportaron para lograr realizar este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A los equipos del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y del Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos de la Universidad de Concepción, sin ellos este trabajo no existiría.

A los doctores Manuel Estrada y Sonia Anticevic, porque gracias a ellos elegí este programa.

A CONICYT (Beca 21141033-214); a Núcleo Milenio para la Investigación Colaborativa en Resistencia Antimicrobiana (NCN17 081-2020) y a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas (beca arancel) por financiar parte de este trabajo.

A mi comisión de grado, porque hicieron de éste un mejor trabajo.

A la Dra. Daniela Iragüen quien ayudó con sus conocimientos y experiencia.

Al Dr. Gerardo González-Rocha, por su colaboración invaluable, consistente palabra de apoyo y vocación docente a toda prueba.

A mis padres y hermanos por su apoyo permanente.

A mi “Lichi”, porque simplemente sin ti no puedo.

TABLA DE CONTENIDOS	Pág.
RESUMEN	1
SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Género <i>Staphylococcus</i>	6
1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.3 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	10
1.4 Resistencia a meticilina en <i>Staphylococcus</i>	13
1.5 Factores de riesgo que contribuyen a la infección por SMR	23
1.6 Transmisión entre humanos y mascotas	25
1.7 Terapia frente a infecciones por <i>Staphylococcus</i>	29
2. HIPÓTESIS	33
3. OBJETIVO GENERAL	34
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS	35
5.1 Identificación de cepas de SCP	35
5.1.1 Toma de muestras cronología de muestreo	36
5.1.2 Identificación molecular de la especie de <i>Staphylococcus</i>	37
5.2 Determinación de resistencia	39
5.2.1 Determinación del perfil de resistencia fenotípica a los antibióticos	39
5.2.2 Determinación del nivel de resistencia por CMI	39
5.3 Evaluación de resistencia a meticilina	40
5.3.1 Detección del gen <i>mecA</i> y sus variantes	40
5.4 Tipificación molecular de las cepas (PFGE)	41
5.5 Comparación con resultados históricos del hospital	43
6. RESULTADOS	44
6.1 Identificación de las cepas	44
6.2 Determinación de resistencia	46
6.3 Resistencia a meticilina	48
6.4 PFGE	50
6.5 Comparación con resultados históricos del hospital	52
7. DISCUSIÓN	55
7.1 Identificación de las cepas	56
7.2 Resistencia de las cepas aisladas	60
7.3 Resistencia a meticilina	73
7.4 Tipificación molecular de las cepas aisladas	78
7.5 Comparación con resultados históricos del Hospital	79
8. CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES DE LA INVESTIGACIÓN	82
9. REFERENCIAS	84
10. PRODUCTOS	100
11. ANEXOS	101

ÍNDICE DE TABLAS	Pág.
Tabla 1: Aislamiento de SAMR y SPMR en diversos países.	22
Tabla 2: Características epidemiológicas de los pacientes caninos incluidos en el estudio.	45
Tabla 3: Nivel de resistencia y categorización de las cepas que presentaron al menos una resistencia.	49
Tabla 4: CMI 50 y CMI 90 según especie bacteriana	50
Tabla 5: Presencia del gen <i>mecA</i> en cepas según su origen e identificación.	51
Tabla 6: Características de las cepas meticilino resistentes aisladas en el presente estudio	52
Tabla 7: Porcentaje de resistencia entre los años 2004-2009 y 2010-2014.	54

ÍNDICE DE FIGURAS:	Pág.
Figura 1: Porcentajes de resistencia según origen de la muestra.	47
Figura 2: Porcentaje de resistencia según susceptibilidad a meticilina y especie	47
Figura 3: Dendograma de cepas de <i>S. aureus</i> .	53
Figura 4: Dendograma de cepas de <i>S. pseudintermedius</i> .	53

RESUMEN

Existe limitada información en nuestro medio respecto de la prevalencia y susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus coagulasa positivo* (SCP) en ambientes veterinarios. El propósito del presente estudio observacional fue identificar y caracterizar cepas de SCP obtenidas desde perros, tutores, veterinarios y superficies del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile, evaluar su comportamiento frente a diferentes antimicrobianos, determinar la portación de cepas resistentes a meticilina y evaluar la relación genética entre las cepas. Veterinarios (n=24), superficies (n=10), y perros sanos (n=40) con sus respectivos tutores (n=40) fueron muestreados en busca de cepas de SCP. Los humanos tomaron su propia muestra desde la mucosa nasal y los perros fueron muestreados desde la mucosa nasal y perianal. La susceptibilidad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en disco y por determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria. La presencia del gen *mecA* se detectó mediante reacción en cadena de la polimerasa y la relación genética de las cepas se estableció mediante macrorestricción con *SmaI* y electroforesis de campo pulsante (PFGE). Se obtuvo un total de 45 cepas de SCP, ocho desde veterinarios, tres de superficies del hospital, ocho desde tutores y 26 cepas desde perros. Nueve de las cepas (20%) fueron resistentes a meticilina, seis de ellas aisladas desde médicos veterinarios, todas ellas portadoras del gen *mecA*. La mayoría de las cepas (73,3%) fueron resistentes a ampicilina, y una menor proporción de ellas fue resistente a gentamicina (2,2%), cefoxitina (13,3%), tetraciclina (15,6%), amoxicilina con ácido clavulánico (17,8%), cefadroxilo y ceftriaxona (20%), ciprofloxacino y enrofloxacino (24,4%). Por otra parte, un porcentaje importante de las cepas fue

resistente a clindamicina (33,3%) y a eritromicina (37,8%). Las cepas mostraron gran diversidad genética. Este estudio sugiere que los Médicos Veterinarios tienen un mayor riesgo de portar cepas de *Staphylococcus* meticilino-resistentes, portando porcentajes estadísticamente mayores a los tutores. Además, estos resultados proporcionan evidencia que clindamicina no es una buena alternativa empírica para SCP en el Hospital analizado. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio de cepas de SCP en ambientes veterinarios en Chile, considerando humanos, mascotas y superficies, lo que es particularmente importante en el contexto actual de UNA SALUD.

CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF COAGULASE-POSITIVE STRAINS OF *Staphylococcus* ISOLATED FROM DOGS, OWNERS, VETERINARIANS AND SURFACES IN A VETERINARY TEACHING HOSPITAL IN CHILE

SUMMARY

There is limited information about prevalence and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococcus* (CoPS) strains in veterinary settings in Chile. The aim of this observational study was to identify and characterize CoPS strains from dogs, owners, veterinary professionals and surfaces from Universidad de Chile veterinary teaching's hospital, assess their antimicrobial susceptibility, determine the presence of methicillin-resistant strains and to evaluate the genetic relationship among the strains. Veterinarians (n=24), surfaces (n=10), and healthy dogs (n=40) and their respective owners (n=40) were sampled for CoPS. Humans took their own sample from the nares, and dogs were sampled from nares and perianal mucosa. Isolates were identified by PCR, antimicrobial susceptibility was assessed by disk diffusion method and MIC. The presence of *mecA* gene was evaluated by polymerase chain reaction, and the genetic relationship among the strains was established by macrorestriction with *SmaI* and PFGE. A total of 45 strains of CoPS were obtained, eight from veterinary professionals, three from hospital surfaces, eight from owners and 26 from dogs. Nine of the strains were resistant to methicillin (20%), six of them isolated from veterinarians and all of them carry the *mecA* gene. Most of the strains (73.3%) were resistant to ampicillin, but a minor proportion of them was resistant to gentamicin (2.2%), cefoxitin (13.3%), to tetracycline (15.6%), to amoxicillin/clavulanic acid (17.8%), to cefadroxil and ceftriaxone (20.0%) and to ciprofloxacin and enrofloxacin

(24.4%). However, an important percentage of the strains was resistant to clindamycin (33.3%) and to erythromycin (37.8%). Additionally, the CoPS isolated showed a high genetic diversity. This study suggest that veterinarians are in high risk of harboring methicillin-resistant CoPS, carrying statistically higher proportions than the owners, and our results provide evidence that clindamycin could be not an empiric alternative for CoPS in the analyzed hospital. To our knowledge, this is the first report of CoPS in veterinary settings in Chile, considering humans, pets and surfaces, particularly important in a ONE HEALTH context.

INTRODUCCIÓN

Para alimentar a la creciente población humana, existe una aumentada demanda por crianza animal intensiva, involucrando gran número de animales, diferentes especies en la misma área y el uso de promotores del crecimiento y antibióticos. Estas prácticas pueden facilitar la aparición de nuevos patógenos, incluyendo organismos resistentes a los antibióticos y su transmisión a los humanos y mascotas (Pantosti, 2012). En nuestra sociedad, el número de mascotas se incrementa substancialmente y la relación entre las personas y sus mascotas ha cambiado dramáticamente durante las últimas décadas, de ser en el pasado animales de trabajo, han pasado hoy en día a ser parte integral de las familias en ambientes urbanos (Pomba *et al.*, 2016). Esta situación lleva a que se genere un estrecho contacto entre humanos y animales de compañía, contacto íntimo que podría crear condiciones favorables para transmisión bidireccional de bacterias entre ellos (Rana *et al.*, 2022; Roken *et al.*, 2022; Kmiecik y Szewczyk, 2018; Kaspar *et al.*, 2018). Por su parte, la medicina ha respondido a este fenómeno aumentando su capacidad diagnóstica y terapéutica, lo que lamentablemente se ha traducido en un aumento sostenido en el uso de antibióticos en humanos y mascotas para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas (Lloyd y Page, 2018), siendo la razón principal de uso de antibióticos infecciones de la piel, tanto en medicina veterinaria (Galarce *et al.*, 2021; Larsen *et al.*, 2018), como en medicina humana (Barbieri *et al.*, 2018). La relación entre el uso de antibióticos y la aparición de resistencia está bien documentada (Galarce *et al.*, 2021; Bell *et al.*, 2014), por lo que vigilar la evolución de la resistencia es fundamental. Un detallado entendimiento del proceso evolutivo detrás de la resistencia es esencial para anticipar la ocurrencia y

eventualmente detener la diseminación de ésta (Miragaia, 2018). La resistencia a los antimicrobianos es un problema ecológico que se caracteriza por interacciones complejas que involucran a diversas poblaciones microbianas que afectan la salud de los humanos, los animales y el medio ambiente, por lo que tiene sentido abordar el problema de la resistencia teniendo en cuenta esta complejidad y naturaleza ecológica utilizando un enfoque coordinado y multisectorial, como UNA SALUD (Mcewen y Collignon, 2018), definido como un enfoque integrado y unificador que tiene como objetivo equilibrar y optimizar de manera sostenible la salud de las personas, los animales y los ecosistemas. Reconoce que la salud de los seres humanos, los animales domésticos y salvajes, las plantas y el medio ambiente más amplio (incluidos los ecosistemas) están estrechamente vinculados y son interdependientes (OHHLEP, 2022).

Por otra parte, el cuerpo de los mamíferos es colonizado por un gran número de microorganismos que en su conjunto se conocen como microbiota normal, entre ellos destacan diversas especies del género *Staphylococcus* (Vincze *et al.*, 2014). Normalmente se consideran inofensivos, pero pueden presentar una amenaza para la salud de sus hospederos al actuar como patógenos oportunistas y ser reservorios de genes de resistencia, aumentando el potencial de resistencia a la terapia antibiótica (Rossi *et al.*, 2019).

Género *Staphylococcus*

Corresponde a bacterias Gram-positivas, cocáceas, que miden alrededor de 1 μm de diámetro, inmóviles, anaerobias facultativas y fermentadoras de glucosa. El género

está compuesto por 85 especies y 30 subespecies, la mitad de las cuales son naturales de humanos (Parte *et al.*, 2020). Entre las especies de estafilococos secuenciadas hasta la fecha, se ha observado una organización del genoma fuertemente conservado, lo que sugiere que los eventos de recombinación a gran escala juegan un papel limitado en comparación a otros géneros bacterianos, de hecho, análisis genómicos comparativos entre dos especies cualquiera de estafilococos revelan hasta un 78% de genes conservados (Zakour *et al.*, 2008). El género *Staphylococcus* está constituido por una variedad de especies comúnmente habitantes de las superficies mucosas de humanos y animales, pero también oportunistas de variable relevancia en medicina veterinaria y humana (Wedley *et al.*, 2014; Weese y van Duijkeren, 2010). Aunque durante la mayoría de su existencia se encuentran como meros colonizadores, cuando la piel o membranas mucosas del hospedero está deteriorada, o el hospedero está inmunocomprometido, pueden surgir como patógenos relevantes (Miragaia, 2018), por lo que evaluar su comportamiento frente a antimicrobianos de manera habitual es una estrategia central para el éxito en el manejo de las patologías que pueden producir (Adiguzel *et al.*, 2022).

Los estafilococos con mayor relevancia clínica son los productores de coagulasa, denominados *Staphylococcus* coagulasa positivos (SCP) (Rodrigues *et al.*, 2017), principalmente *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Staphylococcus* del grupo *intermedius* (SIG, de su sigla en inglés *Staphylococcus intermedius group*), particularmente *S. pseudintermedius* (Weese y van Duijkeren, 2010), siendo común aislar *S. aureus* desde humanos (Pantosti, 2012) y *S. pseudintermedius* desde perros

(Adiguzel *et al.*, 2022); no obstante, se ha documentado la portación de ambas especies desde ambos hospederos (Yarbrough *et al.*, 2018; Gómez-Sanz *et al.*, 2013 b).

La adaptación de las especies de *Staphylococcus* a diferentes nichos, está dada, entre otros factores, por proteínas de superficie, expresadas por genes contenidos en la zona variable del genoma, determinando la capacidad de diferentes especies para adaptarse a diferentes hospederos (humanos y animales) (Zakour *et al.*, 2008). Por ejemplo, la proteína ClfB (proteína de superficie de unión a fibrinógeno) producida por *S. aureus* es un factor determinante en la portación de dicha bacteria en la nasofaringe de humanos. (Wertheim *et al.*, 2008). Se podría considerar que *S. pseudintermedius* no es una amenaza en particular para los humanos, pero existen estudios que demuestran la presencia de genes que le permitirían a esta especie adaptarse al entorno ecológico de la piel humana (Kmieciak y Szewczyk, 2018).

Staphylococcus aureus

S. aureus es el SCP más frecuentemente aislado de la piel y mucosa de humanos y primates, siendo a su vez, capaz de generar una gran variedad de infecciones (Pantosti, 2012). Se describe que una propiedad biológica fundamental de esta especie es su capacidad de colonizar asintómicamente a individuos sanos (Bien *et al.*, 2011), y que los portadores tienen mayor probabilidad de presentar infecciones, siendo además una presunta fuente de diseminación entre las personas (Chambers y DeLeo, 2009). Las afecciones que puede producir se dividen en 3 tipos: 1) infecciones superficiales de heridas y tejidos blandos; 2) intoxicaciones como síndrome de shock tóxico o intoxicaciones alimentarias; y 3) infecciones sistémicas como endocarditis,

osteomielitis, neumonía, meningitis y bacteriemia, las que pueden generar riesgo vital (Bien *et al.*, 2011).

Existe discrepancia sobre cuál es el porcentaje de portación nasal de *S. aureus* en humanos, encontrándose porcentajes desde 18,5% a 27,7% en diferentes trabajos (Kaspar *et al.*, 2018; Hanselman *et al.*, 2009; Boost *et al.*, 2007), en publicaciones nacionales este porcentaje varía entre 22,7% y 27,1% (Aravena *et al.*, 2021; Platzer *et al.*, 2010; Ortega *et al.*, 2001). Se describe que los porcentajes de portación tienden a disminuir con la edad, siendo aproximadamente 45% en lactantes y 30% en jóvenes y adultos (Esposito *et al.*, 2019).

Por otra parte, desde perros es aislado de 1,8% a 14%, pero su presencia parece estar asociada a contacto con humanos (antropozoonosis) (Kaspar *et al.*, 2018; Gómez-Sanz *et al.*, 2013 a). Si bien *S. aureus* genera infecciones en el perro, se estima que dichas infecciones son probablemente exógenas (Sasaki *et al.*, 2012), ya que aunque existen estudios de tipificación multilocus de secuencia (*multilocus sequence type*, MLST) que demuestran evolución específica para adaptarse a bovinos, cerdos y gatos, este fenómeno no se ha documentado en el perro, demostrando que *S. aureus* no es comensal naturalmente predominante en el canino, ya que no se conoce un clon de *S. aureus* con tropismo para perros domésticos sanos (McCarthy *et al.*, 2012; Sasaki *et al.*, 2012; Weese y van Duijkeren, 2010). Así entonces, a través de diversos estudios moleculares, se logra determinar que por un proceso adaptativo profundo se determinan cambios de ciertas cepas de *S. aureus* para adaptarse a ciertos animales. Por ejemplo, los secuenciotipos ST398, ST433 y ST9 colonizan prácticamente sólo cerdos y humanos que trabajan en planteles de cerdos (Nandhini *et al.*, 2022; Pantosti,

2012; Sasaki *et al.*, 2012). Otros secuenciotipos logran adaptarse a un amplio rango de hospederos sin grandes cambios genéticos, lo que sugiere que un amplio rango de hospederos podría ser una característica común de los linajes exitosos de *S. aureus* y ser característico de su historia evolutiva común a largo plazo (Harrison *et al.*, 2014).

Una de las características clave de *S. aureus* ha sido su capacidad de adquirir fácilmente resistencia a virtualmente cualquier antibiótico de uso clínico, a menudo a través de transferencia horizontal de genes (Zakour *et al.*, 2008). Publicaciones sobre la resistencia de cepas de *S. aureus* datan al menos desde 1945, donde Demerec demuestra que la resistencia de las cepas de *S. aureus* a ciertas concentraciones de penicilina surge de forma independiente del contacto con penicilina y es más bien explicada por mutaciones (Demerec, 1945). Hoy en día, la resistencia a meticilina lo convierte en un patógeno prioritario para la Organización Mundial de Salud (OMS).

Staphylococcus pseudintermedius

Desde su descripción, en 1976 por Hájek, *S. intermedius* fue considerada la principal especie de *Staphylococcus* del perro, tanto en pacientes sanos como afectados por pioderma (Bannoehr *et al.*, 2007), siendo también aislado desde caballos, cabras, visones, zorros, mapaches y palomas (Weese y van Duijkeren, 2010). Sin embargo, posteriormente a través de técnicas de identificación molecular se logró determinar que las cepas antes identificadas como *S. intermedius* consistían en tres especies diferentes: *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. delphini*; que en conjunto representan el grupo SIG (Sasaki *et al.*, 2007). Posteriormente, fue descrita una cuarta especie perteneciente a este grupo denominada *Staphylococcus cornubiensis* (Murray

et al., 2018) y recientemente fue incorporada una quinta especie, *Staphylococcus ursi* (Perreten *et al.*, 2020). Cabe destacar que hoy en día se considera a *S. pseudintermedius* y no a *S. intermedius* como el principal colonizador de la piel de perros y gatos, así como el principal patógeno en infecciones de la piel (Rana *et al.*, 2022; Pomba *et al.*, 2016; Bannoehr *et al.*, 2009). Por lo anterior, existe cierta confusión en la literatura desde la descripción en 2005 de *S. pseudintermedius* por Devriese *et al.*, y en general se tiende a considerar como *S. pseudintermedius* lo antes clasificado como *S. intermedius* en estudios asociados a caninos (Beever *et al.*, 2014; Weese y van Duijkeren, 2010). La diferenciación de estas especies de *Staphylococcus* requieren necesariamente análisis moleculares; aunque cabe considerar que hoy en día, se acepta que las cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivos aislados desde perros a nivel clínico pueden asumirse como *S. pseudintermedius*, sin ser necesaria la caracterización molecular de las cepas (Beever *et al.*, 2014). Los clones de *S. pseudintermedius* son transmitidos desde la perra a los cachorros alrededor del nacimiento y pueden persistir en la descendencia por largos periodos de tiempo (Narayan *et al.*, 2014).

A pesar que *S. pseudintermedius* raramente causa enfermedad en el humano, con informes que van desde infecciones de tejidos blandos hasta bacteriemia, su prevalencia podría estar subestimada, ya que *S. pseudintermedius* puede estar erróneamente identificado como *S. aureus* por sus similares características bioquímicas y es identificado cada vez con más frecuencia asociado a muestras clínicas obtenidas desde humanos (Adiguzel *et al.*, 2022; Yarbrough *et al.*, 2018; Börjesson *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013; van Duijkeren, 2008). No existe una prueba bioquímica completamente certera para diferenciar estas especies, aunque se considera que *S.*

aureus fermenta la maltosa y carece de la enzima pirronidonil arilamidasa a diferencia de *S. pseudintermedius* (Börjesson *et al.*, 2014, Devriese *et al.*, 2005). Se establece que el *gold standard* en la identificación de especie son pruebas moleculares, particularmente PCR amplificando zonas del gen *nuc* (termonucleasa) de las diferentes especies (Sasaki *et al.*, 2010). Establecer la diferencia entre las especies pasa a ser particularmente relevante a la hora de evaluar el comportamiento frente a los antimicrobianos, ya que los puntos de corte para definir resistencia varían de acuerdo a la especie (CLSI, 2018; Börjesson *et al.*, 2014), por lo que considerar estrategias como la descrita por Lee *et al.*, (2015) que proponen un algoritmo para detectar especies pertenecientes al grupo SIG parece cada vez más necesario. En este caso, sólo después de la aplicación de este algoritmo se identificó especies pertenecientes al grupo SIG en aislados humanos, lo que no se había descrito en ese laboratorio con anterioridad, por lo que concluyen que previamente fueron cepas mal identificadas como *S. aureus*, incluso considerando la posibilidad de que aún con el protocolo pueden estar dejando de identificar algunas especies del grupo. Si bien los humanos no suelen ser colonizados de manera permanente por *S. pseudintermedius*, siendo más bien portaciones transitorias asociadas a contacto estrecho con caninos (Rana *et al.*, 2022), se cree que el contacto directo con perros puede ser un factor de riesgo para contraer la bacteria, siendo veterinarios y tutores de estas mascotas los más afectados (Viegas *et al.*, 2022).

Históricamente se consideró que el perfil de resistencia de *S. pseudintermedius* era bastante estable y en consecuencia predecible; sin embargo, con la aparición de cepas meticilino-resistentes, la selección de terapia empírica antimicrobiana se considera

hoy en día inapropiada (Adiguzel *et al.*, 2022; Beever *et al.*, 2014), ya que presentan niveles de resistencia a meticilina y otros antibióticos en aumento a través del tiempo (Rana *et al.*, 2022).

Resistencia a meticilina en *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus meticilino resistentes (SMR) corresponde a patógenos zoonóticos importantes, que causan serios problemas de salud pública ya sea incrementando la tasa de falla terapéutica como las tasas de morbilidad y mortalidad en humanos y animales (Brown *et al.*, 2021; Zakour *et al.*, 2008). La resistencia a meticilina mediada por el gen *mecA*, que confiere resistencia a todos los β -lactámicos, se propaga a nivel mundial incluidos hospitales, granjas y ambientes comunitarios, convirtiendo en ineficaz la clase de antibióticos más utilizada y eficiente para tratar infecciones estafilocócicas (Miragaia, 2018). Según describe la literatura el problema de cepas de SMR aumenta globalmente, tanto asociado a animales de compañía (Adiguzel *et al.*, 2022), como en medicina humana (Nandhini *et al.*, 2022).

Lo que se describe hasta ahora es que más del 99% de los aislados SMR poseen el gen *mecA* como origen genético de dicha resistencia, a pesar de existir un homólogo llamado *mecC*, descrito en diversas especies de *Staphylococcus* incluidos *S. sciuri*, *S. stepanovicii* y *S. xylosus* (Ngassam *et al.*, 2021; Becker *et al.*, 2014). El gen *mecC* fue descrito en 2011, asociado a humanos y vacas (García-Alvarez *et al.*, 2011), pero actualmente, cepas portadoras de este gen han sido aisladas desde diferentes especies animales como perros, gatos, ovinos, ratas, conejos, liebres, cobayos y pequeños mamíferos silvestres (Paterson *et al.*, 2014; Gómez *et al.*, 2014) y otorga en general,

menores niveles de resistencia frente a β -lactámicos como cefoxitina y oxacilina (Milheirico *et al.*, 2016). El gen *mecC* entonces, se considera ampliamente distribuido en animales, pero es considerado esporádico y no una amenaza para humanos (Aires de Souza, 2017; Couto *et al.*, 2016). Los genes *mecB* y *mecD* son los más distantes del gen *mecA* de *S. aureus*, representando una identidad nucleotídica $\leq 62\%$, versus el 69% de *mecC* (Miragaia, 2018). No se consideran importantes, aunque cabe destacar que recientemente ha sido descrita una cepa de *Staphylococcus aureus* portadora de *mecB* en un plásmido aislada desde un paciente humano (Ngassam *et al.*, 2021).

El gen *mecA* codifica para la producción de una proteína de unión a penicilina (*penicillin binding protein*-PBP) adicional y modificada (PBP 2a), que tiene disminuida afinidad por los β -lactámicos, confiriéndole resistencia a todo el grupo (Nandhini *et al.*, 2022; Jang *et al.*, 2014; Wedley *et al.*, 2014). Epidemiológicamente, la significancia de estafilococos que presentan meticilino resistencia es cada vez mayor en el contexto de enfermedades nosocomiales, ya que típicamente están asociados a multi-resistencia (Lehner *et al.*, 2014). El gen *mecA* se ubica en el cromosoma de la bacteria en un elemento móvil denominado *SCCmec*, casete cromosomal estafilocócico (*staphylococcal chromosomal cassette*) (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018; van Duijkeren *et al.*, 2011), siendo posible caracterizar diferentes tipos de *SCCmec* basados en la presencia de diferentes elementos clave como son: el complejo genético *mec*, que comprende *mecA* y sus genes regulatorios *mecI* y *mecRI*, y el complejo genético *ccr* que comprende tres recombinasas CCR diferentes, que son responsables de la movilidad del complejo genético, existiendo hasta ahora diferentes tipos de elementos *SCCmec*, originados por la combinación de ocho complejos genéticos *ccr* y

seis complejos genéticos *mec* diferentes (Liu *et al.*, 2016; Pantosti, 2012). Hoy en día, se han caracterizado 13 diferentes complejos *SCCmec* (Nagasundaram y Sistla, 2019; Baig *et al.*, 2018). Otros componentes no esenciales del *cassette* son diversos determinantes de resistencia a metales y antimicrobianos, así como genes de función desconocida que se denominan regiones J (Miragaia, 2018). La comprensión de la prevalencia y ocurrencia de los diferentes tipos de *SCCmec* puede ayudar en la identificación, control, prevención y terapia de enfermedades mediadas por estafilococos (Liu *et al.*, 2016).

El origen del gen *mecA* sería *S. fleurettii*, que pertenece al grupo *S. sciuri*, ya que esta especie contiene el gen *mecA* y los loci cromosomales adyacentes casi idénticos a la secuencia correspondiente de *SCCmec* (Tsubakishita *et al.*, 2010). Esto indicaría que los estafilococos animales son el más probable origen y reservorio de *mecA* (Pantosti, 2012). Aunque la función principal de los precursores de este gen estaba probablemente relacionada sólo a la síntesis de pared, y no a la resistencia, la evolución completa de una PBP nativa al determinante de resistencia PBP 2a parece haber sido un proceso gradual que ocurrió dentro de este grupo de especies. Así, la forma más ancestral de *mecA* que porta *S. sciuri* (*mecA1*) tiene un 85% de identidad nucleotídica con *mecA* de *S. aureus*; en cambio, *S. vitulinus* porta una forma intermedia de *mecA* (*mecA2*) con 94% de identidad nucleotídica y todos los *S. fleurettii* y algunos *S. vitulinus* contienen una forma de *mecA* casi idéntica al de *S. aureus* (99% de identidad) (Miragaia, 2018).

Cabe destacar, que la sola presencia del gen *mecA* no necesariamente implica resistencia a meticilina, ya que, por la falta del promotor o de otras secuencias que

permitan la expresión del gen, la bacteria podría comportarse fenotípicamente como susceptible (Wedley *et al.*, 2014). Estas cepas actualmente se denominan OS-MRS (de su sigla en inglés *Oxacillin susceptible-Methicillin resistant Staphylococcus*), descritas en literatura cada vez con mayor frecuencia (Fabri *et al.*, 2021; Duarte *et al.*, 2018; Hososaka *et al.*, 2007). Por otra parte, la producción de PBP 2a no es el único mecanismo de resistencia a β -lactámicos, pudiendo, por ejemplo, ser hiperproductoras de β -lactamasas (García-Alvarez *et al.*, 2011). De hecho, en el estudio sistemático realizado por Moodley *et al.* (2014), cepas que fuesen fenotípicamente resistentes a oxacilina, pero que no portaran el gen *mecA* se incluyeron en el grupo de meticilino-susceptibles, similar situación se describe en el estudio de Saputra *et al.* (2017), en ambos estudios las cepas son sensibles a amoxicilina asociada con el inhibidor de β -lactamasas ácido clavulánico.

En general, la prevalencia de cepas resistentes a meticilina ha aumentado rápidamente en el tiempo, dando lugar a importantes problemas en la salud de humanos y animales, especialmente en los ambientes hospitalarios (Rana *et al.*, 2022; Neradova *et al.*, 2020; Kaspar *et al.*, 2018; Couto *et al.*, 2016). Diversos estudios demuestran que las cepas meticilino-resistentes presentan mayores niveles de resistencia frente a otras clases de antibióticos, además de β -lactámicos, comparados con cepas meticilino-susceptibles (Viegas *et al.*, 2022; Gröntal *et al.*, 2017; Ventrella *et al.*, 2017; Drougka *et al.*, 2016; Tarazi *et al.*, 2015).

S. aureus meticilino-resistente (SAMR) es uno de los patógenos hospitalarios más renombrados en medicina humana y es cada vez más común en medicina veterinaria (Sasaki *et al.*, 2012), siendo endémico en la mayoría de los hospitales del mundo

(Nandhini *et al.*, 2022) y actualmente es uno de los patógenos con resistencia bacteriana más importantes de humanos y diferentes especies animales (Gómez *et al.*, 2014). Se calcula que de los 2 billones de personas portadoras de *S. aureus* en el mundo, 53 millones de ellas (2,7%) son portadoras de SAMR (Rahman *et al.*, 2018). Esta bacteria ha sido por largo tiempo considerada el patógeno prototipo multi-resistente intrahospitalario, causando infecciones en hospitales y centros de salud (Pantosti, 2012), siendo la causa más común de infección asociada a la atención de salud (IAAS) reportada (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018) por lo que se denomina tradicionalmente SAMR asociado a ambiente hospitalario (SAMR-HA). La portación de estas cepas por trabajadores de la salud es una causa conocida de brotes mortales por infecciones de SAMR (Jayakumar *et al.*, 2020), y se diferencia de infecciones adquiridas por cepas de SAMR independientes de factores de riesgo conocidos, los que se denominan SAMR asociados a la comunidad (SAMR-CA) y que se caracterizan por presentar algunas diferencias moleculares como poseer el gen *pyl*, que codifica el factor de virulencia llamado leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), que destruye leucocitos y causa necrosis tisular, lo que le confiere mayor virulencia; a su vez, presentan resistencia heterogénea a meticilina, lo que determina alguna dificultad en el diagnóstico *in vitro*; presentan susceptibilidad a múltiples antibióticos no β -lactámicos y finalmente; se caracterizan por presentar gran diversidad clonal, dada por el gen *mecA* en elemento genético móvil (SCC*mec*) diferente al que poseen las cepas de SAMR-HA (Platzer *et al.*, 2010). Estas cepas son capaces de causar infecciones en individuos sanos, mostrando una virulencia y capacidad de diseminación inusual, lo que restringe las alternativas de tratamiento y se presentan con mayor frecuencia en

personas mayores, con sistema inmunológico alterado o en condiciones de hacinamiento (Nandhini *et al.*, 2022; Chambers y DeLeo, 2009). Actualmente, algunos clones de SAMR-CA han sido particularmente exitosos como patógenos hospitalarios, y por otra parte algunas cepas tradicionalmente descritas como SAMR-HA han sido identificadas en la comunidad, por lo que existe cierta confusión entre los límites de hospitalario y asociado a la comunidad (Aires de Souza, 2017), lo que ha generado que la separación de las denominaciones de dichas cepas está poco a poco perdiendo validez, al menos en países con alta prevalencia de ambos tipos de SAMR (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018). Existe un tercer tipo de SAMR asociado a producción animal (SAMR-LA), descrito en diversas especies animales, no sólo asociados a producción como bovinos, sino también equinos, animales de compañía y algunas especies silvestres (Ngassam *et al.*, 2021). Los porcinos son su principal reservorio (Sorensen *et al.*, 2017) y contribuyen sólo en una pequeña porción de los SAMR en humanos, estando limitado sólo a exposición profesional (Aires de Souza, 2017), generando más bien una portación temporal que colonización permanente (Rodrigues *et al.*, 2017).

Respecto de *S. pseudintermedius* meticilino resistentes (SPMR), se cree que en la actualidad es necesario considerarlos como uno de los patógenos zoonóticos más importantes en la clínica de animales pequeños, por lo que son requeridas medidas rigurosas en el control de las infecciones para prevenir la diseminación epidémica observada con SAMR en establecimientos de salud humana (Saputra *et al.*, 2017; Beever *et al.*, 2014). Los portadores caninos sanos no sintomáticos de SPMR pueden actuar como reservorio y contribuir a una mayor propagación a otros perros, ambiente y sus tutores (Roken *et al.*, 2022; Kjellman *et al.*, 2015), siendo fundamental su

pesquisa como estrategia de control de la diseminación. Las infecciones debidas a cepas de SPMR aumentan en gravedad en mascotas y pueden aumentar la preocupación sobre su posible transmisión a los humanos, especialmente a veterinarios y tutores de mascotas (Viegas *et al.*, 2022; Menandro *et al.*, 2019; Pomba *et al.*, 2016). En humanos la portación persistente de SAMR es un factor predisponente para infección, es razonable creer que los portadores persistentes de SPMR pueden tener mayor riesgo de contraer infecciones, aunque no está completamente documentado (Kjellman *et al.*, 2015). Si bien SPMR parece estar menos adaptado al humano, describiéndose más bien portaciones temporales y no persistentes (Roken *et al.*, 2022), existen publicaciones que lo describen como colonizador permanente (Rodrigues *et al.*, 2017), por lo que se podría estar adaptando al humano como hospedero. Independiente de lo anterior, es importante recalcar el posible rol de SPMR como potencial reservorio de resistencia a meticilina por la capacidad de transmitir dicha resistencia a otras especies de *Staphylococcus*, a través de transmisión horizontal del gen *mecA* (Viegas *et al.*, 2022; Pomba *et al.*, 2016). Cabe destacar que infecciones por SPMR pueden ser difíciles, incluso imposibles, de tratar con medicamentos registrados para uso veterinario (Pires dos Santos *et al.*, 2016), por lo que evaluar su prevalencia es fundamental para generar estrategias de tratamiento basadas en evidencia y disminuir su potencial impacto.

Los estudios enfocados a determinar la prevalencia de cepas de SMR en animales en nuestra región son escasos, destacando un estudio realizado en Brasil donde se logra determinar la presencia de un SAMR en un gato y un SPMR en un perro (Quitoco *et al.*, 2013); por otra parte, en un estudio realizado en Chile se describe 10 cepas de SCP

portadoras del gen *mecA* en gatos (Galarce *et al.*, 2016) y dos estudios en Argentina que caracterizan 3 y 10 cepas de SPMR aisladas desde especímenes clínicos caninos (Vigo *et al.*, 2015; Galletti *et al.*, 2019; respectivamente). Un estudio reciente, también en Brasil, describe 24,5% de cepas de SPMR aisladas desde pacientes caninos enfermos (Viegas *et al.*, 2022).

Desde el punto de vista diagnóstico, se establece que el mejor predictor de la presencia del gen *mecA* en cepas de *S. aureus* es actualmente la cefoxitina, a diferencia de lo descrito para cepas de *S. pseudintermedius*, en que el mejor predictor de la presencia de este gen sigue siendo la oxacilina (CLSI, 2018; Wu *et al.*, 2016). Esto adquiere gran relevancia al considerar que de manera frecuente se confunde ambas especies por su similitud al identificarlo por pruebas bioquímicas (Adiguzel *et al.*, 2022; Börjesson *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013; van Duijkeren *et al.*, 2011). Lo anterior puede llevar a determinar cepas como meticilino-susceptibles, siendo meticilino-resistentes, lo que es particularmente significativo al considerar que las penicilinas y cefalosporinas son los antimicrobianos de elección para patologías producidas por cepas de *S. aureus* susceptibles a la penicilina (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018) y por patologías caninas producidas por *S. pseudintermedius* (Yarbrough *et al.*, 2018; Vigo *et al.*, 2015; Hillier *et al.*, 2014). Es probable que a medida que nuestra comprensión de la importancia de muchas otras especies de *Staphylococcus* continúe mejorando, la necesidad de puntos de corte adicionales específicos de especies puede ser necesaria (Yarbrough *et al.*, 2018).

Existen diversos estudios orientados a definir el porcentaje de SAMR y/o SPMR, tanto de humanos como animales, enfermos o sanos. En la Tabla 1 se resume algunos

de los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación. La variabilidad en los porcentajes encontrados se debe a varios factores, siendo uno de los principales las diferencias geográficas, pero también el tipo de muestra, la población estudiada, frecuencia de contacto con animales y la metodología del estudio (Viegas *et al.*, 2022; Neradova *et al.*, 2020). Lo anterior, enfatiza la importancia de contar con estudios locales orientados a dilucidar la situación actual de nuestro medio. En este sentido, destaca el estudio Sato *et al.* (2018) en el que se demuestra el impacto de medidas orientadas a disminuir la prevalencia de cepas de SAMR en ambientes veterinarios en Sapporo, Japón; si bien se logra disminuir la prevalencia, estiman que los porcentajes siguen siendo superiores a otras ciudades de Japón, por lo que concluyen que el monitoreo regular y la educación respecto a la higiene en los ambientes hospitalarios es fundamental para el control de la diseminación de la resistencia a la meticilina.

Tabla 1: Aislamiento de SAMR y SPMR en diversos países

Población estudiada	País	Especie	Prevalencia (%)	Referencia
Perros y tutores	China (Hong Kong)	SAMR	8,2 (P) 2,3 (T)	Boost <i>et al.</i> , 2007
Asistentes a conferencia equina	Internacional	SAMR	10,1	Anderson <i>et al.</i> , 2008
Población sana (humanos)	Chile	SAMR	0,97	Platzer <i>et al.</i> , 2010
Veterinarios, animales y superficies.	Japón	SAMR SPMR	8,2 V; 0 A; 5,1 S 5 V; 60 A; 6,4 S	Ishihara <i>et al.</i> , 2010
Veterinarios, animales y superficies.	Corea del sur	SAMR SPMR	2 V; 2 A; 4 S 6 V; 0 A; 9 S	Moon <i>et al.</i> , 2012
Perros enfermos	Chile	SAMR SPMR SSMR*	0 0 0	Muñoz <i>et al.</i> , 2012
Perros y gatos sanos	Brasil	SAMR SPMR	1,6 G; 0 P 0 G; 1,4 P	Quitoco <i>et al.</i> , 2013
Perros que asisten a hospital	Reino Unido	SAMR SPMR	1 0	Wedley <i>et al.</i> , 2014
Perros y gatos enfermos y sanos**	Reino Unido	SPMR	2,6	Beever <i>et al.</i> , 2014
Perros enfermos	Francia	SPMR	16,9	Haenni <i>et al.</i> , 2014
Perros ***	Corea	SAMR	0,8	Jang <i>et al.</i> , 2014
Perros enfermos	Argentina	SPMR	10,7	Vigo <i>et al.</i> , 2015
Perros y tutores en estrecho contacto	Jordania	SAMR	5,3 P; 5 T	Tarazi <i>et al.</i> , 2015
Perros sanos	Noruega	SPMR	2,6	Kjellman <i>et al.</i> , 2015
Perros y gatos enfermos	Tailandia	SPMR	28 P 42,3 G	Kadlec <i>et al.</i> , 2016
Perros sanos (Pertenecientes a veterinarios)	Grecia	SAMR	32,4	Drougka <i>et al.</i> , 2016
Perros y gatos enfermos y sanos	Finlandia	SPMR	14	Gröntal <i>et al.</i> , 2017
Perros enfermos	Australia	SPMR SAMR	11,8 12,8	Saputra <i>et al.</i> , 2017
Perros y tutores enfermos	Bangladesh	SAMR	11,1 P; 22,6 T	Rahman <i>et al.</i> , 2018
Personal veterinario	Alemania	SAMR SPMR	9 3,6	Febler <i>et al.</i> , 2018
Personal veterinario	Japón	SAMR	15	Sato <i>et al.</i> , 2018
Personal veterinario	Rep. Checa	SAMR	6,7	Neradova <i>et al.</i> , 2020
Perros, gatos y caballos enfermos	USA	SAMR SPMR	29,7 31,4	Adiguzel <i>et al.</i> , 2022
Perros sanos y enfermos	India	SAMR SPMR	8,7 6,0	Rana <i>et al.</i> , 2022
Perros enfermos	Brasil	SPMR	24,5	Viegas <i>et al.</i> , 2022

P: Perros; T: Tutores; A: Animales; V: Veterinarios; G: Gato.

Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* meticilino resistentes; ** Datos desde 2 laboratorios clínicos en un periodo de 10 años; * Muestras obtenidas desde un hospital, un refugio y una exposición de mascotas.

Factores de riesgo que contribuyen a la infección por cepas de SMR

El conocimiento de los factores de riesgo que contribuyen a la infección por cepas de SMR es altamente relevante, ya que la identificación temprana de pacientes con predisposición puede facilitar la implementación de estrategias de prevención y el control de la infección (Lehner *et al.*, 2014).

Existen diversos estudios orientados a evaluar los factores de riesgo asociados tanto a la portación como infección por cepas de SMR. Del estudio de Anderson *et al.* (2008) se puede concluir que el personal veterinario tiende a tener mayores porcentajes de positividad frente al aislamiento de cepas de SAMR, aumentando el riesgo de colonización al haber tratado a un paciente diagnosticado con colonización o infección por SAMR en el último año, siendo un factor protector el lavado de manos entre pacientes infecciosos y entre diferentes establecimientos de salud. Por otra parte, Weese y Lefebvre (2007), describen que en equinos la colonización previa, la determinación de colonización previa de animales del mismo predio, la administración de antibióticos en los 30 días previos, la admisión a centros de cuidados intensivos de neonatos y la admisión a un centro de atención veterinaria diferentes a cirugía son factores de riesgo asociados a colonización. Otro estudio en animales de compañía (perros, gatos y caballos), determina que el número de empleados trabajando en el centro de salud (>10) y terapia antibiótica previa, tanto sistémica como tópica e infecciones quirúrgicas, son factores de riesgo de infección por SAMR, y que las cepas aisladas desde animales de compañía son las cepas aisladas endémicamente en hospitales humanos de Alemania. (Vincze *et al.*, 2014). En otra publicación, Ishihara *et al.* (2010), reportan como factores de riesgo el contacto con paciente animal

diagnosticado con SAMR y trabajar en un hospital veterinario, lo mismo descrito por Rodrigues *et al.* (2017), quienes describen que los profesionales veterinarios y el contacto previo con cepas de SMR son factores de riesgo para la portación nasal. La transmisibilidad de clones de SAMR en hospitales veterinarios de la misma manera a lo descrito en hospitales humanos demuestra que las prácticas de prevención de SAMR utilizadas en medicina humana, como buscar y destruir o descolonización general, también pueden ser apropiadas en la práctica veterinaria (Harrison *et al.*, 2014). Por último, Rana *et al.* (2022) describen que el uso de antibióticos y la presencia de dermatitis son factores de riesgo para la portación de cepas de SAMR en perros.

Con respecto a *S. pseudintermedius*, Lehner *et al.* (2014) determinaron que en Alemania existe una asociación entre infecciones por SPMR en perros con ambientes hospitalarios o clínicas veterinarias y posiblemente con enfermedades crónicas de la piel, y describen una inesperada falta de asociación con terapias antimicrobianas previas (que puede indicar que el SPMR está bien adaptado al perro con una escasa necesidad de presión de selección). Lo mismo fue descrito en el estudio de Rana *et al.* (2022) y Loncaric *et al.* (2019), en este último, si bien determinan que animales que han sido expuestos a terapia antibiótica tienen 2,5 veces mayor probabilidad de portar cepas meticilino-resistentes, la diferencia no fue estadísticamente significativa; y sí describen a la hospitalización en clínicas veterinarias como factor de riesgo. Lo anterior se contrapone por lo descrito por Viegas *et al.* (2022), Gröntal *et al.* (2017); Saputra *et al.* (2017) y Weese *et al.* (2012) que documentan que la administración previa de antimicrobianos es factor de riesgo para la infección por SPMR de perros en Brasil, Finlandia, Australia y Estados Unidos, respectivamente; enfatizando, una vez

más, la importancia de estudios a nivel local para confirmar posibles diferencias geográficas, y establecer estrategias específicas a cada realidad.

Transmisión entre humanos y mascotas

Debido a las escasas estrategias de vigilancia y al insuficiente conocimiento de la transmisión zoonótica de la resistencia a los antimicrobianos entre humanos y animales de compañía, el alcance de dicha transmisión y la importancia para la salud pública es, hasta hoy, poco entendida (Pomba *et al.*, 2016). Las investigaciones sobre las enfermedades zoonóticas a menudo se centran en las enfermedades infecciosas que los animales pueden transmitir a los seres humanos; sin embargo, un número creciente de estudios indican que los seres humanos transmiten agentes patógenos a los animales; ejemplos recientes incluyen SAMR, virus de influenza A, *Cryptosporidium parvum* y *Ascaris lumbricoides* (Messenger *et al.*, 2014). Revisiones como la de Bramble *et al.* (2011) enfatizan en que los estudios deben estar orientados a dilucidar más claramente la prevalencia de cepas de SAMR en mascotas y caracterizar las dinámicas de transmisión entre mascotas y humanos.

Existe una creciente preocupación sobre la diseminación de SMR entre humanos y animales de compañía a través del contacto directo y de la aparición de nuevas cepas de SMR resultado de la transferencia de *SCCmec* entre diferentes especies de *Staphylococcus* (Viegas *et al.*, 2022; Anderson *et al.*, 2008; van Duijkeren, 2008). De hecho, se sugiere que la aparición de nuevas cepas de SMR, tanto asociados a la comunidad como a ambiente intrahospitalario serán un creciente problema de salud pública en un futuro cercano (Jang *et al.*, 2014). Estudios como el de Rossi *et al.*

(2019), refuerzan que el contacto íntimo entre humanos y sus mascotas son una posible fuente de intercambio y transporte de microbiota y su material genético. La detección de cepas de SMR, principalmente *S. aureus* y *S. pseudintermedius*, en animales sanos es importante, ya que está descrita la transmisión de dichas cepas entre animales de compañía y humanos y, por lo tanto, se requiere de un uso prudente de antibióticos en entornos veterinarios para evitar la portación de cepas resistentes en animales (Loncaric *et al.*, 2019) y disminuir su impacto en medicina humana y veterinaria. Cabe destacar que la direccionalidad de la transmisión es muy difícil de documentar (Pomba *et al.*, 2016). De todas maneras, existe claridad de que los animales de compañía pueden actuar como reservorios de importantes clones humanos, perpetuando el ciclo de transmisión de SMR entre humanos y animales de compañía (Couto *et al.*, 2016).

En general, las cepas de SAMR aisladas desde animales de compañía son similares a las aisladas desde humanos desde ambientes hospitalarios en las diferentes áreas geográficas (Hogan *et al.*, 2018; Vincze *et al.*, 2014; Harrison *et al.*, 2014). Los reportes de SAMR aislados desde mascotas fueron esporádicos hasta la última parte de la década de los 90 y más que nada asociados a infecciones clínicas. La aparición de SAMR-CA en las últimas décadas y la importancia del seguimiento de la resistencia a antibióticos de estos microorganismos también en la comunidad, ha estimulado varios estudios en mascotas y proponen la posible transmisión de estos microorganismos desde mascotas a sus tutores (Carroll *et al.*, 2021; Drougka *et al.*, 2016; Tarazi *et al.*, 2015; Pantosi, 2012).

En la literatura se describen aislamientos de cepas con perfiles de electroforesis de campos pulsantes (PFGE) idénticos aislados desde pacientes humanos enfermos y de

sus mascotas desde hace bastante tiempo. Van Duijkeren *et al.* (2004) describen que una cepa de SAMR aislada desde lesiones psoriásicas de una mujer de 31 años fue idéntica en términos de perfil de PFGE a la aislada desde la nariz de su perro, es más, a pesar de la terapia, la mujer seguía portando la cepa de SAMR, situación que se revirtió sólo con el tratamiento de su mascota. Por otra parte, Manian (2003) describe el aislamiento de SAMR desde heridas de una pareja de humanos diabéticos y desde la nariz de su mascota canina asintomática, también con pulsotipos de PFGE idénticos. Entre las cepas analizadas en el estudio de Zhang *et al.* (2011) se caracteriza 2 cepas de SAMR aisladas de perro y una de un humano trabajador de una clínica veterinaria con el mismo perfil de resistencia y perfiles de PFGE muy similares, implicando su relación genética y por lo tanto la transmisión de esa cepa en dicho hospital. Por último, en el estudio de Kottler *et al.* (2012) se describe el aislamiento de cepas con pulsotipos de PFGE indistinguibles en 4 de 586 hogares analizados (tutores y mascotas) concluyendo que la colonización simultánea de tutores y mascotas con la misma cepa es rara, pero posible.

Estudios realizados en diferentes países han demostrado que los animales de compañía en estrecho contacto con humanos portan cepas de SAMR de origen humano, siendo en general una portación transiente (Petinaki y Spiliopoulou, 2015). Si bien la dinámica de transmisión no está completamente entendida, es claro que el ambiente juega un rol fundamental en esta transmisión, siendo la ropa de cama, controles remotos de televisores y manillas de refrigerador, lugares desde los que frecuentemente se puede aislar cepas de SAMR (Hogan *et al.*, 2018). Los reportes descritos coinciden con lo sugerido en la revisión de Knox *et al.* (2015), que resalta la

importancia de considerar la contaminación ambiental por parte de cepas de *Staphylococcus*, que podrían aumentar el riesgo de infecciones recurrentes. La capacidad de los estafilococos para sobrevivir sin un hospedero de semanas a meses en ambientes secos aumenta la probabilidad de exposición y permite la recolonización de los hospederos después del tratamiento antimicrobiano exitoso de la infección primaria (Roken *et al.*, 2022). En animales de compañía, la transmisión de SAMR desde humanos continúa jugando un rol importante en el éxito de SAMR como patógeno oportunista (McCarthy *et al.* 2012).

Existe evidencia de la transmisión antrozo-zoonótica de *S. pseudintermedius* y otros estafilococos entre animales de compañía y humanos, siendo *S. pseudintermedius* una zoonosis emergente potencialmente importante porque el organismo comúnmente coloniza perros y comparte factores de virulencia similares con *S. aureus* (Adiguzel *et al.*, 2022). Por ejemplo, la publicación de van Duijkeren (2008) describe el aislamiento de una misma cepa desde 6 pacientes atendidos en una clínica veterinaria, 4 trabajadores de la clínica y un canino sano que vivía en el recinto (todas con un perfil de PFGE indistinguible); es más, se obtiene la misma cepa desde un armario de la sala de cirugía, en un estante de la sala de espera y la sala de estar de los médicos de la clínica. En este caso, se presume que la transmisión se generó desde los animales a los humanos, ya que es una especie normalmente comensal en perros y realza la importancia de las superficies como factor para la diseminación. Wang *et al.* (2013) reportan una infección en el codo de una anciana, que vivía en estrecho contacto con su perro, cuyo cultivo resultó positivo para *S. intermedius*, por lo que los autores

sugieren que la cepa se adquirió desde el perro, aunque no realizan pruebas moleculares de identificación en este caso.

A pesar de la existencia de diversos estudios, aún no está claro hasta qué punto el perro es potencial reservorio para la transmisión de SMR a humanos o los humanos contribuyen a la portación de SMR en perros. (Wedley *et al.*, 2014), por lo que observar este fenómeno desde la óptica de UNA SALUD parece relevante para mejorar las posibilidades de éxito frente a el control de la meticilino-resistencia.

Terapia frente a infecciones por *Staphylococcus*

Los estafilococos son un grupo de bacterias con importancia en clínica humana y veterinaria, agrícola y económica debido a su amplia gama de factores de virulencia y capacidad de adquirir resistencia a los antimicrobianos (Couto *et al.*, 2016). En este sentido, para el tratamiento de las infecciones que ellos causan, actualmente se considera que β -lactámicos de espectro extendido y cefalosporinas de primera y segunda generación son las piedras angulares del tratamiento de infecciones estafilocócicas (Miragaia 2018; Becker *et al.*, 2014). En general se puede establecer que la mayoría de las infecciones pueden ser fácilmente controladas con antibióticos; sin embargo, en los últimos años cepas de *Staphylococcus* han emergido como bacterias resistentes a los antibióticos más comúnmente utilizados como son macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas, gentamicina, cefalosporinas y penicilinas (Nandhini *et al.*, 2022; Juayang *et al.*, 2014).

Así como lo describe la literatura internacional es llamativa la escasez de evidencia científica publicada en esta área, particularmente en cepas resistentes a meticilina.

(Brown *et al.*, 2021). El tratamiento de infecciones generadas por *Staphylococcus* depende largamente del tipo de infección, que van desde infecciones menores de la piel hasta septicemias potencialmente mortales y de la presencia/ausencia de cepas resistentes (Nandhini *et al.*, 2022; Taylor y Unakal, 2022). En general, como se mencionó previamente, penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación siguen siendo alternativa para cepas meticilino-sensibles (Miragaia, 2018; Becker *et al.*, 2014), y vancomicina para cepas meticilino-resistentes (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018), pero existe descripción de cepas resistentes en ambos escenarios (Cong *et al.*, 2020; Garcia-Alvarez *et al.*, 2011) por lo que analizar la situación a nivel local parece fundamental considerando el aumento en la prevalencia de cepas resistentes a meticilina en diferentes partes del mundo.

La característica clave del tratamiento es detectar la presencia o ausencia de cepas resistentes los medicamentos (Taylor y Unakal, 2022), y en este sentido, tener una visión de UNA SALUD de la medicina se hace fundamental para el éxito en el control de la diseminación de resistencia. Como se mencionó previamente, en medicina humana se tiende a desconocer la posibilidad de cepas coagulasa positiva diferentes de *S. aureus* (Yarbrough *et al.*, 2018), pudiendo caracterizar cepas como *S. aureus* meticilino-sensibles, siendo realmente cepas de SPMR. Mientras hay guías de tratamiento para infecciones por *S. pseudintermedius* en perros (Hillier *et al.*, 2014), no hay guías para el manejo de la infección por esta especie en humanos (Carroll *et al.*, 2021). El trabajo intersectorial entre clínicos humanos, veterinarios, farmacólogos y enfermería entonces, parece una estrategia central en el correcto abordaje de

enfermedades producidas por cepas de *Staphylococcus*, situación particularmente relevante en ambientes veterinarios.

Por lo anterior, es que se hace necesario contar con estudios nacionales enfocados a evaluar la situación a nivel local, porque si bien el fenómeno de la transmisión de SCP entre animales de compañía y humanos está descrito en diferentes países (Roken *et al.*, 2022; Haenni *et al.*, 2014; Vincze *et al.*, 2014; Wedley *et al.* 2014; Moon *et al.*, 2012), la situación puede variar geográficamente (Kaspar *et al.*, 2018; Frank y Loeffler, 2012). En Chile existe escasa literatura respecto a este tema, principalmente orientados a búsqueda de portadores humanos de cepas de SMR, encontrándose en general bajos niveles de portación en ausencia de factores de riesgo asociados a cepas intrahospitalarias. Ortega *et al.*, (2001) describen que en una población de estudiantes de medicina sólo 2 estudiantes (de 103 muestreados) portaban cepas resistentes a cloxacilina; posteriormente Noriega *et al.* (2008), describen cinco casos clínicos de infecciones por SAMR-CA en adultos, cuatro de ellos probablemente contraídos en el extranjero, pero uno adquirido en la comunidad chilena, siendo los primeros casos clínicos reportados en Chile asociados a la comunidad. Posteriormente, Platzer *et al.*, (2010) logran aislar sólo una cepa metilino-resistente (0,24%) desde población sana y finalmente Acuña *et al.* (2015) describen cuatro casos clínicos de niños afectados por SAMR-CA, siendo la primera descripción de casos pediátricos en Chile de SAMR-CA. Otros estudios nacionales, están orientados a determinar la presencia de cepas intrahospitalarias de SAMR, entre ellos destacan las publicaciones de Wilson *et al.* (2007) que caracterizan 53 cepas de SAMR aisladas desde el Hospital Regional de Valdivia; Montoya *et al.* (2009), que describen un alto porcentaje de resistencia

inducible a clindamicina (43,8%) en las 220 cepas de SAMR analizadas; Medina *et al.* (2013) que describe 100 cepas de SAMR aisladas desde el Hospital Regional de Valdivia y Vega *et al.* (2015) que describen la primera cepa SAMR con heteroresistencia a vancomicina en el Hospital Regional de Concepción. La epidemiología molecular sobre SAMR en nuestro país es incipiente y, en general, se limita a la evidencia del predominio del denominado clon chileno/cordobés, cuya estructura y características están en creciente descripción junto con el aislamiento de variantes comunitarias resistentes a meticilina (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018). Por lo tanto, observar el comportamiento de cepas de *Staphylococcus* aislados en ambientes veterinarios frente a antimicrobianos es fundamental para tomar medidas adecuadas y evitar aumentos sostenidos en los porcentajes de resistencia, ya que, al existir reportes de resistencia frente a la mayoría de las clases de antibióticos existentes, existe una necesidad crítica por desarrollar alternativas terapéuticas para tratar cepas de *Staphylococcus* (Jayakumar *et al.*, 2020).

Por otra parte, en medicina veterinaria las publicaciones a nivel nacional son aún más escasas, destacando un estudio que analiza cepas de SCP aisladas desde perros con pioderma y otitis externa, que no encuentra cepas de SMR (Muñoz *et al.*, 2012) y una publicación de Galarce *et al.* (2016) que describe el aislamiento de 11 cepas de SMR desde gatos, donde las cepas meticilino-resistentes correspondieron a *S. pseudintermedius* y *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (actualmente *Staphylococcus coagulans*) (Carroll *et al.*, 2021).

En base a los antecedentes previamente discutidos en esta tesis doctoral se busca abordar la realidad actual del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile,

respecto de la prevalencia de aislamiento y diversidad de especies de SCP, cómo se comportan frente a antimicrobianos y cuál es la realidad respecto de la meticilino-resistencia, esto analizado desde una perspectiva de UNA SALUD, considerando caninos junto a sus tutores, médicos veterinarios y superficies del Hospital, y para esto se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo y objetivos:

Hipótesis 1

Los perros, sus tutores, médicos veterinarios y superficies del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile comparten diferentes especies de *Staphylococcus* productores de coagulasa (SCP) y algunas de ellas son resistentes a meticilina.

Hipótesis 2

Las cepas de SCP aisladas desde perros están genéticamente relacionadas con aquellas cepas que son aisladas desde sus tutores, médicos veterinarios y superficies del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile, implicando que existe transmisión zoonótica entre los perros y humanos.

Objetivo general

Caracterizar la diversidad específica, demostrar la relación genética de cepas de diferentes especies de SCP aislados desde perros, sus tutores, médicos veterinarios y superficies del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile e investigar su comportamiento frente a los antibióticos.

Objetivos específicos

1. Identificar las especies de SCP aisladas desde perros, tutores, médicos veterinarios y superficies del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile.
2. Determinar los perfiles de resistencia fenotípica y el nivel de resistencia a antibióticos de las cepas de SCP aisladas.
3. Pesquisar el gen *mecA* y sus variantes en cepas meticilino resistentes.
4. Determinar la relación genética entre las cepas de las diferentes especies de SCP aisladas.
5. Comparar los resultados con los cultivos históricos del Hospital Clínico Veterinario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Objetivo 1. Identificar las especies de SCP aisladas desde perros, tutores, médicos veterinarios y superficies del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile.

A) Toma de muestras y cronología del muestreo:

Se tomaron muestras a perros y sus respectivos tutores, médicos veterinarios y superficies del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Se consideró como factor excluyente el uso de antibióticos y/o corticoides 15 días antes de la toma de muestra, tanto en los perros como en los tutores y médicos veterinarios. En el caso de los perros, se muestreó pacientes sanos, de cualquier raza, edad y sexo, que asistieron al hospital para controles sanos, vacunaciones o procedimientos quirúrgicos electivos. Fueron evaluados clínicamente por un médico veterinario internista del hospital, el que acreditó el estado de salud del paciente al momento de la toma de muestra.

Se proyectó trabajar con aproximadamente 50 cepas de SCP, por lo que, asumiendo promedios de los porcentajes de aislamiento publicados en literatura desde seres humanos y perros, se decidió muestrear a 40 tutores junto a sus mascotas, 24 Médicos Veterinarios y 10 superficies del hospital. En marzo de 2016 se procedió a la compra de todos los materiales y reactivos para procesar las muestras. Se inició el muestreo de pacientes y tutores, y de médicos veterinarios y equipos del hospital en abril de 2016. El muestreo de superficies y veterinarios se llevó a cabo sin inconvenientes; sin embargo, el muestreo de tutores y sus mascotas fue un poco más complejo de lo que se planificó en un inicio y concluyó en agosto de 2016. Previo al muestreo, el tutor

firmó un consentimiento informado desarrollado bajo las recomendaciones de la OMS (Anexo 1), autorizando la toma de muestra de la mascota y la propia. Además, el presente estudio fue aprobado por el Comité de ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Código de autorización 07-2016) (Anexo 2). A los tutores y los médicos veterinarios se les enseñó a tomar su propia muestra de mucosa nasal según lo descrito previamente (Platzer *et al.*, 2010), las que fueron almacenadas a 4°C por no más de 6 horas antes de su procesamiento. Con respecto a las superficies del hospital, se muestreó con hisopo estéril 5 jaulas de hospitalización, las mesas quirúrgicas de los 2 pabellones, una mesa de atención de la sala de procedimientos y los mesones de atención de las consultas 1 y 2 del hospital, se seleccionó un cuadrante de 4 por 4 cm en los que se deslizó el hisopo por 30 segundos. La muestra se tomó 3 horas después de limpiar con amonio cuaternario (cloruro de benzalconio) cada una de las superficies, siguiendo el protocolo de limpieza diario del hospital. Las muestras fueron almacenadas a 4°C por un tiempo menor a 6 horas hasta su procesamiento en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Todas las muestras fueron sembradas en agar manitol sal (Becton Dickinson GmbH), según lo descrito por Moon *et al.* (2012). La incorporación de NaCl al medio de cultivo permite inhibir el crecimiento de microbiota comensal (Febler *et al.*, 2018). De cada placa se seleccionó un máximo de 3 colonias con morfología compatible con *Staphylococcus* spp. para realizar la prueba de catalasa, tinción de Gram y coagulasa (Muñoz *et al.*, 2012). Las cepas positivas a catalasa y coagulasa, y cuya tinción Gram demostró cocáceas Gram positivo fueron mantenidas en cepario a -80°C, en una

mezcla 2:1 de caldo tripticasa y glicerol 50% (v/v), para posterior caracterización de especie.

B) Identificación molecular de la especie de *Staphylococcus*:

Para la identificación de las cepas se procedió a realizar el método de identificación molecular por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando un protocolo de PCR múltiple previamente descrito por Sasaki *et. al.* (2010), que caracteriza el gen *nuc* de las diferentes especies. Se utilizó como controles positivos las cepas *S. aureus* ATCC 25923 y *S. pseudintermedius* ATCC 49444. Lamentablemente, luego de varios intentos no fue posible replicar el resultado del método descrito, por lo que se decidió identificar las cepas a través de otro protocolo de PCR simple, utilizando los mismos partidores descritos para las especies más frecuentemente descritas para humanos y caninos. Los partidores fueron generados por la empresa IDT (Fermelo SA).

Los partidores para la identificación de *S. aureus* fueron: au-F3 5'-TCGCTTGCTATGATTGTGG-3' y au-nucR 5'-GCCAATGTTCTACCATAGC-3', y los utilizados para identificar *S. pseudintermedius* fueron: pse-F2 5'-TGGGCAGTAGGATTCGTTAA-3' y pse-R5 5'-CTTTTGTGCTTCCTTTTGG-3'. Adicionalmente, se incluyó partidores descritos para *S. schleiferi*: schF 5'-AATGGCTACAATGATAATCACTAA-3' y sch-R 5'-CATATCTGTCTTTTCGGCGCG-3'. Los partidores para todas las especies se encuentran en el Anexo 3.

Los templados de ADN se obtuvieron por temperatura de ebullición (100°C) por 15 min de 5 colonias frescas crecidas en agar manitol sal (Becton Dickinson GmbH) y

suspendidas en 500 μ l agua destilada estéril. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 14.000 rpm por 5 min. Replicando las condiciones descritas por Sasaki *et al.* (2010), se logró obtener la banda del tamaño esperado para *S. aureus* (359 pb), pero no se lograba obtener la banda esperada para la cepa control de *S. pseudintermedius* (926 pb). Luego de realizar una gradiente de temperatura, se logró determinar que la temperatura ideal de alineamiento era distinta a la descrita en el método original (55°C) por lo que finalmente se utilizó el siguiente programa de amplificación modificado: desnaturalización del templado de ADN a 98°C por 2 min; seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 s, 57°C por 30 s y 72°C por 30 s; para finalizar con una extensión final de 2 min a 72°C. Los productos fueron separados en un gel de agarosa al 1,5% en búfer tris-acetato-EDTA (TAE) 1x y llevados a cámara de electroforesis en búfer TAE 1x a 90 V por 60 min. La visualización del ADN, posterior a la electroforesis, se realizó utilizando un transiluminador de luz ultravioleta (UVP transilluminator M-20V), luego de teñir los geles por 40 min en bromuro de etidio (0,5 mg/mL). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Multigene Gradient (Labnet International Inc.) utilizando 15 μ l de master mix (GoTaq Green Master Mix, Promega) 5 μ l de cada partidor y 5 μ l de templado de ADN, para un volumen final de 25 μ l.

Objetivo 2. Determinar los perfiles de resistencia fenotípica y el nivel de resistencia a antibióticos de las cepas de SCP aisladas.

A) Determinación del perfil de resistencia fenotípica a los antibióticos:

A todas las cepas de SCP aisladas se les determinó la resistencia fenotípica a través del método difusión en agar (antibiograma), según las recomendaciones y puntos de corte del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018; CLSI 2013). Se utilizó el siguiente panel de antimicrobianos: oxacilina (1 µg), ampicilina (10 µg), cefadroxilo (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefoxitina (30 µg), amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg), gentamicina (10 µg), amikacina (30 µg), tetraciclina (30 µg), doxiciclina (30 µg), enrofloxacino (5 µg), ciprofloxacino (5 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg) y vancomicina (30 µg). Los discos de clindamicina y eritromicina se situaron en proximidad para definir resistencia inducida a clindamicina. Como control se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC 25923.

B) Determinación del nivel de resistencia:

Para determinar el nivel de resistencia se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) también según el método estandarizado por el CLSI (2018). Se testeó los siguientes antimicrobianos: oxacilina, cefoxitina, enrofloxacino, clindamicina y vancomicina. La elección de estos antibacterianos se basó en la importancia relativa de cada uno de estos antimicrobianos para el tratamiento de infecciones por cepas de SCP y en los resultados de las pruebas de difusión. Como control se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC 29213. Con los resultados de CMI se calculó la CMI 50 y 90 de cada uno de los antimicrobianos testeados.

Objetivo 3. Pesquisar el gen *mecA* y sus variantes en las cepas aisladas

A) Determinación de la presencia del gen *mecA* o sus variantes:

La presencia del gen *mecA* se determinó a través de la amplificación de un fragmento intragénico del gen por PCR. Se utilizó como control la cepa *S. aureus* ATCC 43300 (SAMR). Se inició utilizando el protocolo descrito por el grupo de Ishihara *et al.* (2010), pero, así como el programa de identificación de especie, tampoco se obtuvo el amplicón esperado con las condiciones descritas. Posteriormente se utilizó el siguiente programa: desnaturalización inicial de 98°C por 2 min; seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 s, 57°C por 30 s y 72°C por 30 s; para finalizar con 2 min a 72°C, obteniéndose la banda esperada para la cepa control (519 pb). Los partidores utilizados fueron los descritos por Ishihara *et al.* (2010): *mecA1* 5'-TGTCGTAACCTGAATCAGC-3' y *mecA2* 5'-TGCTATCCACCCTCAAACAG-3. Los productos fueron cargados en un gel de agarosa al 1,5% en búfer TAE 1X y separados mediante cámara de electroforesis en búfer TAE 1X a 90 V por 60 min. La visualización del ADN se llevó a cabo en un transiluminador de luz UV, luego de teñir los geles por 40 min en bromuro de etidio (0,5 mg/mL). Las reacciones se llevaron a cabo en termociclador Multigene Gradient (Labnet International Inc.) utilizando 15 µl de master mix (GoTaq Green Master Mix, Promega) 5 µl de cada partidor y 5 µl de templado de ADN, para un volumen final de 25 µl.

Objetivo 4. Determinar la relación genética entre las cepas de las diferentes especies de SCP aisladas.

A) Tipificación molecular de las cepas de SCP:

La relación genética entre cepas de *Staphylococcus* aisladas se evaluó a través de macrorestricción enzimática con la enzima *SmaI* y electroforesis de campo pulsante (PFGE) (Haenni *et al.*, 2014; Moon *et al.*, 2012), la que se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA) de la Universidad de Concepción, dirigido por el Dr. Gerardo González-Rocha. Para la genotipificación de las cepas se utilizó la metodología de Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE) descrita por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) y basada en protocolo estandarizado por el CDC Canadá para PFGE de SAMR (McDougal *et al.*, 2003).

Para preparar los *plugs*, las cepas se cultivaron en placas de agar tripticasa soya a 35°C por 24 h. Luego se preparó una suspensión bacteriana de 1 asada de cultivo puto en 5 mL de suero fisiológico estéril y se ajustó la densidad óptica entre 1,7 y 2 a 600 nm. Luego se transfirieron 300 µL a un tubo Eppendorf y se le agregó 5 µL de lisostafina 1mg/mL y se incubó a 37°C por 10 minutos. Se preparó agarosa para campo pulsado 1% en búfer TE y se mantuvo a 54°C en baño termorregulado, luego se agregó 300 µL de agarosa a cada tubo Eppendorf, se mezcló y se transfirió 300 µL a los moldes, dejando solidificar por 5 minutos a temperatura ambiente.

Para la lisis celular se transfirieron los *plugs* a tubos centrífuga de 50 mL que contenían 2 mL de búfer de lisis ST (Sorbitol/TRIS HCL) más 15 µL de lisozima 10mg/mL) y se incubaron por 2 h a 37°C. Luego de un lavado con agua destilada

precalentada a 54°C se agregó 2,5 mL de búfer CLB (*cell lysis buffer*) más 24 µL de proteinasa K (100 µg/mL) y se incubó a 54°C por 2 h con agitación constante. Posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril para eliminar el búfer de lisis con 15 mL de agua destilada desionizada precalentada a 54°C en cada tubo, manteniendo en agitación constante por 15 minutos. Posteriormente se agregó a cada tubo 15 mL de búfer TE 1X precalentado a 54°C, manteniéndose en agitación por 15 min, este procedimiento se repitió 3 veces para finalmente mantener los *plugs* refrigerados a 4°C en 1 mL de búfer TE 1x.

Para la digestión enzimática se incubó un fragmento de 2 mm del *plug* en búfer de ambientación (búfer de la enzima diluido 1:10) por 15 minutos a 37°C. Luego se eliminó el búfer y se agregó 100 µL del búfer con la enzima de restricción *SmaI* en cada tubo. Los *plugs* correspondientes a las muestras fueron incubadas a 25°C por 4 h. La cepa control (*Salmonella braenderup*) fue incubada a 37°C por 2,5 h, con la enzima *XbaI*.

La electroforesis de campo pulsado se realizó en equipo CHEF DR II (BioRad), los *plugs* fueron depositados en un gel de agarosa SeaKem® Gold (Lonza, USA) para campo pulsado al 1% en búfer TBE 0,5X. La corrida electroforética se realizó durante 19 h, con un pulso inicial de 5,3 s, un pulso final de 34,9 s, a 6 V/cm con un ángulo de 120° y una temperatura de 14°C. Luego de la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) por 30 minutos, para posteriormente ser visualizado en transiluminador ultravioleta y documentado con el sistema *Electrophoresis Documentation and Analysis System* de 120 Kodak.

Objetivo 5. Comparar los resultados con los cultivos históricos del Hospital Clínico Veterinario.

En el contexto de una práctica tutorial realizada en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, se cuenta con los datos de los cultivos obtenidos por el hospital Clínico Veterinario desde el año 2004 hasta el año 2014. De esta base de datos se incluyeron todos los cultivos compatibles con *Staphylococcus* coagulasa positivo, y se separaron los resultados en 2 *clusters*: desde el 2004 al 2009 y desde el 2010 al 2014, para evidenciar si existe diferencias en los porcentajes de resistencia obtenidos para diferentes antimicrobianos, con la finalidad de comparar con los resultados obtenidos en la presente tesis. El propósito de dicha comparación tuvo como objetivo contrastar los datos obtenidos en el trabajo de laboratorio, corroborando si ciertos elevados niveles de resistencia se condicen con aumento de dichas resistencias en el tiempo, teniendo como objetivo establecer una recomendación terapéutica hacia el comportamiento del clínico frente a infecciones por SCP.

RESULTADOS

Objetivo 1. Identificar las especies de SCP aisladas desde perros, tutores, médicos veterinarios y superficies del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile.

De los 24 médicos veterinarios muestreados se obtuvo ocho cepas SCP, tres cepas de SCP fueron aisladas de las superficies del hospital, ocho cepas de SCP desde mucosa nasal de los 40 tutores muestreados y 26 cepas de SCP desde los 40 pacientes caninos muestreados desde mucosa nasal y zona perianal (dos cultivos fueron positivos para ambas muestras); totalizando 45 cepas de SCP. La raza y edad de los pacientes muestreados se resume en la Tabla 2.

De las 45 cepas identificadas, 18 de ellas corresponden a la especie *S. aureus* y 27 a la especie *S. pseudintermedius*. Ninguna de las cepas analizadas fue identificada como *S. schleiferi*. De las cepas aisladas desde médicos veterinarios siete corresponden a *S. aureus* y una a *S. pseudintermedius*; las tres cepas identificadas desde las superficies corresponden a *S. pseudintermedius*; de las aisladas desde tutores siete son *S. aureus* y una *S. pseudintermedius* y finalmente, de las cepas aisladas desde caninos, cuatro fueron identificadas como *S. aureus* y 22 como *S. pseudintermedius*.

Tabla 2: Características epidemiológicas de los pacientes caninos incluidos en el estudio.

Paciente	Raza	Edad (años)	Paciente	Raza	Edad (años)
CAN 1	Mestizo	14	CAN 21	Poodle	2
CAN 2	WHWT	2	CAN 22	Poodle	15
CAN 3	Poodle	12	CAN 23	Dachshund	13
CAN 4	Mestizo	16	CAN 24	Mestizo	2
CAN 5	WHWT	3	CAN 25	Cocker	14
CAN 6	Mestizo	5	CAN 26	Mestizo	4
CAN 7	Mestizo	12	CAN 27	Dálmata	3
CAN 8	Foxterrier	8	CAN 28	Mestizo	3
CAN 9	Mestizo	5	CAN 29	Mestizo	12
CAN 10	Braco Alemán	4	CAN 30	Pastor Alemán	11
CAN 11	Mestizo	1	CAN 31	Yorkshire	5
CAN 12	Mestizo	5	CAN 32	P. Alemán	9
CAN 13	Mestizo	7	CAN 33	Jack Russell	3
CAN 14	Mestizo	12	CAN 34	Bulldog Francés	8
CAN 15	Mestizo	15	CAN 35	Mestizo	6
CAN 16	Boxer	12	CAN 36	Mestizo	1
CAN 17	Boxer	6	CAN 37	Mestizo	1
CAN 18	Bulldog Inglés	2	CAN 38	Mestizo	7
CAN 19	Bulldog Inglés	5	CAN 39	Dachshund	6
CAN 20	Dachshund	2	CAN 40	Dachshund	12

WHWT: West Highland White Terrier

Objetivo 2. Determinar los perfiles de resistencia fenotípica y el nivel de resistencia a antibióticos de las cepas de SCP aisladas.

A) Determinación del perfil de resistencia fenotípica a los antibióticos:

De las 45 cepas analizadas nueve fueron resistentes a oxacilina (20%), por lo que se consideraron meticilino-resistentes; seis de ellas fueron obtenidas desde médicos veterinarios; dos desde jaulas de hospitalización y una desde un tutor. Sólo una cepa (aislada desde un canino) fue resistente a gentamicina, ocho cepas fueron resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico, 11 cepas fueron resistentes a enrofloxacino y ciprofloxacino, 33 cepas fueron resistentes a ampicilina, nueve cepas fueron resistentes a cefadroxilo, 15 cepas fueron resistentes a clindamicina (ninguna de las cepas presentó resistencia inducida por eritromicina), 17 cepas fueron resistentes a eritromicina, siete cepas fueron resistentes a tetraciclina, seis fueron resistentes a cefoxitina y nueve fueron resistentes a ceftriaxona. No hubo cepas resistentes a amikacina, doxiciclina y vancomicina por la prueba de difusión en disco, aunque cabe destacar que el CLSI actualmente no considera válida la prueba de difusión en agar para vancomicina (CLSI, 2018). De las cepas analizadas 8 (17,8%) fueron sensibles a todos los antimicrobianos, así como 15 (33,3%) de ellas fueron caracterizadas como multi-resistentes al presentar resistencia a tres o más grupos de antibióticos diferentes. En las figuras 1 y 2 se muestra el porcentaje de cepas resistentes según el origen de la muestra; según la sensibilidad a meticilina; y, finalmente, el porcentaje de cepas resistentes separados por especie bacteriana.

Figura 1: Porcentaje de cepas resistentes según el origen de la muestra.

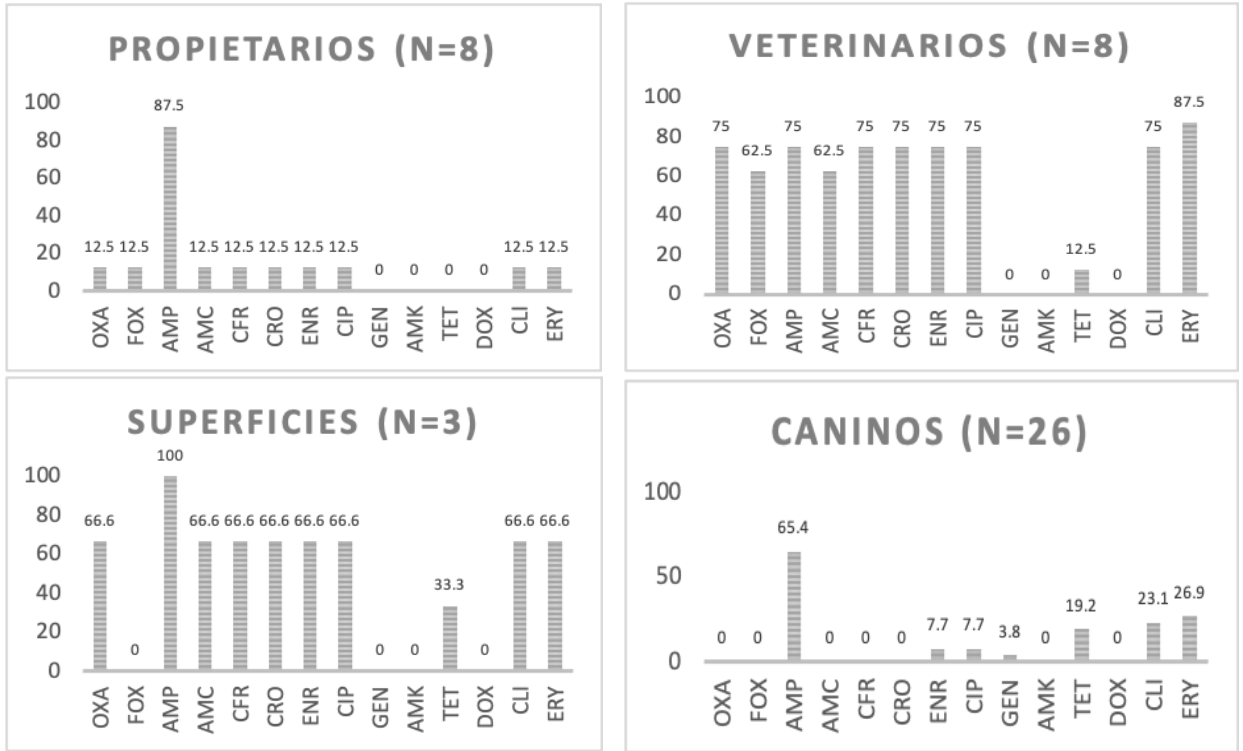
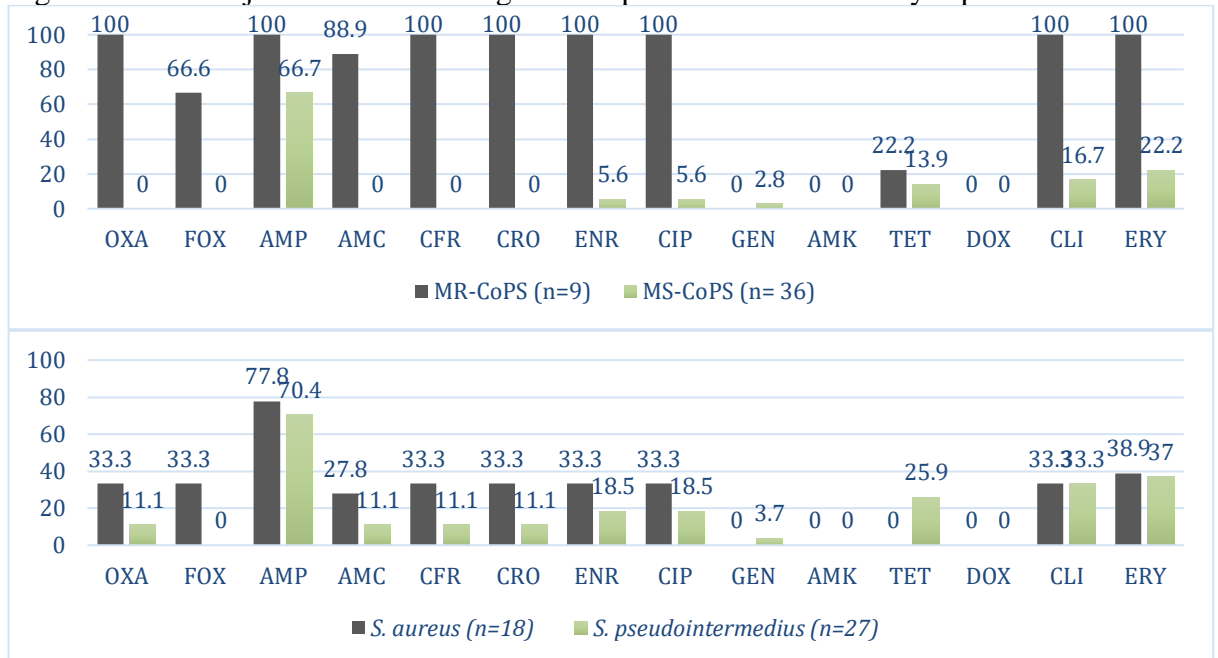


Figura 2: Porcentajes de resistencia según susceptibilidad a meticilina y especie.



MR-CoPS: *Staphylococcus* meticilino resistente. MS-CoPS: *Staphylococcus* meticilino sensible. OXA: Oxacilina; FOX: Cefoxitina; AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina con ácido clavulánico; CFR: Cefadroxilo; CRO: Ceftriaxona; ENR: Enrofloxacino; CIP: Ciprofloxacino; GEN: Gentamicina; AMK: Amikacina; TET: Tetraciclina; DOX: Doxiciclina; CLI: Clindamicina; ERY: Eritromicina.

B) Determinación del nivel de resistencia:

Once cepas fueron resistentes a oxacilina según su CMI ($\geq 4 \mu\text{g/mL}$ y $\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* y *S. pseudintermedius*, respectivamente) y 6 de ellas correspondieron a cepas aisladas desde médicos veterinarios, 2 desde jaulas de hospitalización, 1 desde un tutor y 2 desde caninos. Cabe destacar que las 2 cepas que fueron caracterizadas como oxacilina-resistentes desde caninos por CMI ($\geq 16 \mu\text{g/mL}$), habían resultado susceptibles por la prueba de difusión en agar.

Frente a cefoxitina, ocho cepas fueron resistentes según la CMI ($\geq 8 \mu\text{g/mL}$), cinco de ellas aisladas desde médicos veterinarios, dos desde tutores y una desde un canino. Respecto a enrofloxacino 14 cepas fueron resistentes (CMI $\geq 4 \mu\text{g/mL}$); de las cuales seis fueron aisladas desde médicos veterinarios, dos desde jaulas de hospitalización, dos desde tutores y cuatro cepas aisladas desde caninos. Frente a clindamicina 21 cepas fueron resistentes (CMI $\geq 4 \mu\text{g/mL}$), de las cuales seis fueron aisladas desde médicos veterinarios, dos desde jaulas de hospitalización, tres desde tutores y 10 cepas desde caninos; mientras dos cepas presentaron sensibilidad intermedia (CMI 1-2 $\mu\text{g/mL}$). Finalmente, dos cepas fueron resistentes a vancomicina (CMI $\geq 16 \mu\text{g/mL}$), ambas aisladas desde jaulas de hospitalización, mientras cuatro cepas presentaron susceptibilidad intermedia (CMI 4-8 $\mu\text{g/mL}$), dos desde tutores y dos desde caninos. En la Tabla 3 se presentan los valores de CMI de todas las cepas que se caracterizaron con al menos una resistencia.

Tabla 3: Nivel de resistencia y categorización de las cepas que se caracterizaron con al menos una resistencia

Cepas	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL) y categorización de la cepa									
	OXA		FOX		ENR		CLI		VAN	
MV 1	64	R	16	R	16	R	32	R	2	S
MV 2	64	R	32	R	16	R	32	R	2	S
MV 3	>64	R	4	S	32	R	32	R	2	S
MV 7	0,25	S	2	S	2	S	2	I	2	S
MV 9	64	R	32	R	16	R	32	R	2	S
MV 18	64	R	32	R	8	R	32	R	2	S
MV 21	32	R	16	R	16	R	32	R	2	S
EQUI 9	>64	R	4	S	64	R	32	R	4	I
EQUI 10	>64	R	4	S	64	R	16	R	4	I
PROP 3	0,5	S	4	S	0,25	S	16	R	>64	R
PROP 26	1	S	8	R	0,25	S	0,25	S	32	R
PROP 28	1	S	4	S	64	R	32	R	2	S
PROP 36	32	R	16	R	16	R	32	R	2	S
CAN 1	0,25	S	0,5	S	0,25	S	32	R	2	S
CAN 2`	0,25	S	0,5	S	32	R	0,25	S	4	I
CAN 5`	0,25	S	0,5	S	1	S	32	R	2	S
CAN 6	0,25	S	4	S	0,25	S	0,25	S	4	I
CAN 8`	0,25	S	0,5	S	1	S	32	R	2	S
CAN 15`	16	R	16	R	8	R	16	R	2	S
CAN 18	0,25	S	2	S	0,25	S	32	R	2	S
CAN 20`	0,25	S	0,5	S	0,25	S	32	R	2	S
CAN 23`	0,25	S	0,5	S	0,25	S	32	R	2	S
CAN 24`	0,25	S	0,5	S	0,25	S	32	R	2	S
CAN 30`	0,25	S	0,5	S	0,25	S	2	I	2	S
CAN 35´	64	R	4	S	64	R	32	R	2	S
CAN 40	0,25	S	0,5	S	64	R	4	R	2	S

R: Resistente S: Susceptible I: Susceptibilidad intermedia; OXA: oxacilina; FOX: cefoxitina; ENR: enrofloxacino; DAP: clindamicina; VAN: vancomicina.

Con los resultados anteriores se calculó la CMI 50 y 90 de los antimicrobianos testados para cada especie bacteriana, los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: CMI 50 y 90 según especie.

	OXA	FOX	ENR	CLI	VAN
<i>S. aureus</i> (N 18)					
CMI 50	0,5	4	0,5	0,25	2
CMI 90	64	32	16	32	4
<i>S. pseudintermedius</i> (N 27)					
CMI 50	0,25	0,5	0,5	2	2
CMI 90	64	4	64	32	2

OXA: Oxacilina; FOX: Cefoxitina; ENR: Enrofloxacino; CLI: Clindamicina; VAN: Vancomicina

Objetivo 3. Pesquisar el gen *mecA* y sus variantes en las cepas aisladas.

Se sometieron al programa la totalidad de las cepas. Se determinó que 11 de ellas portan el gen *mecA*. De ellas, seis son cepas que fueron obtenidas desde médicos veterinarios, dos de ellas desde equipamientos del hospital, dos cepas obtenidas desde tutores y una obtenida desde un canino. De las nueve cepas meticilino-resistentes, todas resultaron portadoras del gen, por lo tanto, dos cepas que fueron determinadas por pruebas de susceptibilidad en disco como meticilino-susceptibles también poseen el gen *mecA*. En la Tabla 5 se muestran las cepas identificadas y la presencia/ausencia del gen *mecA*.

Tabla 5: Presencia del gen *mecA* en cepas según su origen e identificación.

Cepa	Especie	PCR <i>mecA</i>	Cepa	Especie	PCR <i>mecA</i>
MV 1	<i>S. aureus</i>	Positivo	CAN 6	<i>S. aureus</i>	Negativo
MV 2	<i>S. aureus</i>	Positivo	CAN 7`	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
MV 3	<i>S. pseudintermedius</i>	Positivo	CAN 8`	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
MV 7	<i>S. aureus</i>	Negativo	CAN 9`	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
MV 9	<i>S. aureus</i>	Positivo	CAN 10`	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
MV 18	<i>S. aureus</i>	Positivo	CAN 15`	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
MV 21	<i>S. aureus</i>	Positivo	CAN 16`	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
MV 24	<i>S. aureus</i>	Negativo	CAN 18	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
EQUI 7	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo	CAN 20`	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
EQUI 9	<i>S. pseudintermedius</i>	Positivo	CAN 23`	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
EQUI 10	<i>S. pseudintermedius</i>	Positivo	CAN 24`	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
PROP 3	<i>S. aureus</i>	Negativo	CAN 25	<i>S. aureus</i>	Negativo
PROP 4	<i>S. aureus</i>	Negativo	CAN 26`	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
PROP 9	<i>S. aureus</i>	Negativo	CAN 28	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
PROP 24	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo	CAN 28`	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
PROP 26	<i>S. aureus</i>	Positivo	CAN 30	<i>S. aureus</i>	Negativo
PROP 28	<i>S. aureus</i>	Negativo	CAN 30`	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
PROP 36	<i>S. aureus</i>	Positivo	CAN 31	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
PROP 38	<i>S. aureus</i>	Negativo	CAN 32	<i>S. aureus</i>	Negativo
CAN 1	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo	CAN 35`	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
CAN 2`	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo	CAN 38	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
CAN 3`	<i>S. pseudintermedius</i>	Positivo	CAN 40	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo
CAN 5`	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo			

La caracterización de las nueve cepas meticilino resistente se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6: Características de las cepas meticilino resistentes aisladas en el presente estudio.

ID	Origen	Especie	mecA	Perfil de resistencia	Oxacilina		Cefoxitina	
					KB (mm)	CIM (µg/mL)	KB (mm)	CIM (µg/mL)
MV 1	V	<i>S. aureus</i>	Sí	OXA ENR CIP CRO ERI FOX AMC CLI	6 / R	64 / R	16 / R	16 / R
MV 2	V	<i>S. aureus</i>	Sí	OXA ENR CIP CRO ERI FOX CLI	6 / R	64 / R	16 / R	32 / R
MV 3	V	<i>S. pseudintermedius</i>	Sí	OXA ENR CIP CRO ERI FOX AMC CLI TET	6 / R	>64 / R	26 / S	4 / S
MV 9	V	<i>S. aureus</i>	Sí	OXA ENR CIP CRO ERI FOX AMC CLI	6 / R	64 / R	16 / R	32 / R
MV 18	V	<i>S. aureus</i>	Sí	OXA ENR CIP CRO ERI FOX AMC CLI	6 / R	64 / R	15 / R	32 / R
MV 21	V	<i>S. aureus</i>	Sí	OXA ENR CIP CRO ERI FOX AMC CLI	6 / R	32 / R	16 / R	16 / R
Equi 9	S	<i>S. pseudintermedius</i>	Sí	OXA ENR CIP CRO ERI AMC CLI	6 / R	> 64 / R	28 / S	4 / S
Equi 10	S	<i>S. pseudintermedius</i>	Sí	OXA ENR CIP CRO ERI FOX AMC CLI TET	6 / R	> 64 / R	26 / S	4 / S
Prop 36	T	<i>S. aureus</i>	Sí	OXA ENR CIP CRO ERI FOX AMC CLI	6 / R	32 / R	15 / R	16 / R

V: Veterinario, S: Superficie, T: Tutor, OXA: Oxacilina, ENR: Enrofloxacino, CIP: Ciprofloxacino, CRO: Ceftriaxona, ERI: Eritromicina, FOX: Cefoxitina, AMC: Amoxicilina/clavulánico, CLI: Clindamicina, TET: Tetraciclina, KB: Kirby-bauer, CIM: Concentración mínima inhibitoria.

Objetivo 4. Determinar la relación genética entre las cepas de las diferentes especies de SCP aisladas.

Se logró identificar los pulsotipos de electroforesis de campo pulsado en 41 de las 45 cepas. No se logró determinar el pulsotipo en una cepa de *S. aureus* y tres cepas de *S. pseudintermedius*. Entre los pulsotipos identificados se encuentra una gran diversidad clonal, el dendograma de las cepas de *S. aureus* y *S. pseudintermedius* se presenta en las figuras 3 y 4 respectivamente.

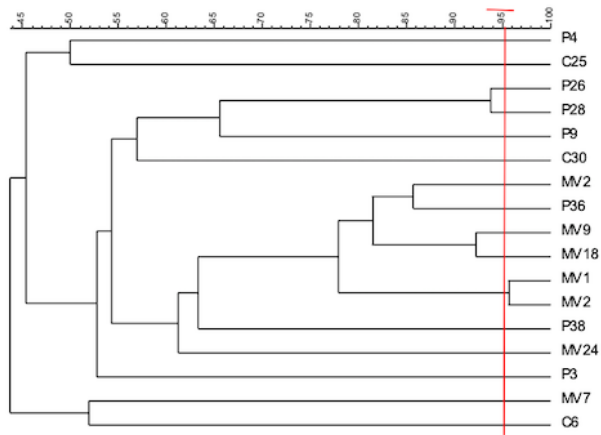


Figura 3: Dendrograma de cepas de *S. aureus*. La línea roja indica un 95% de similitud.

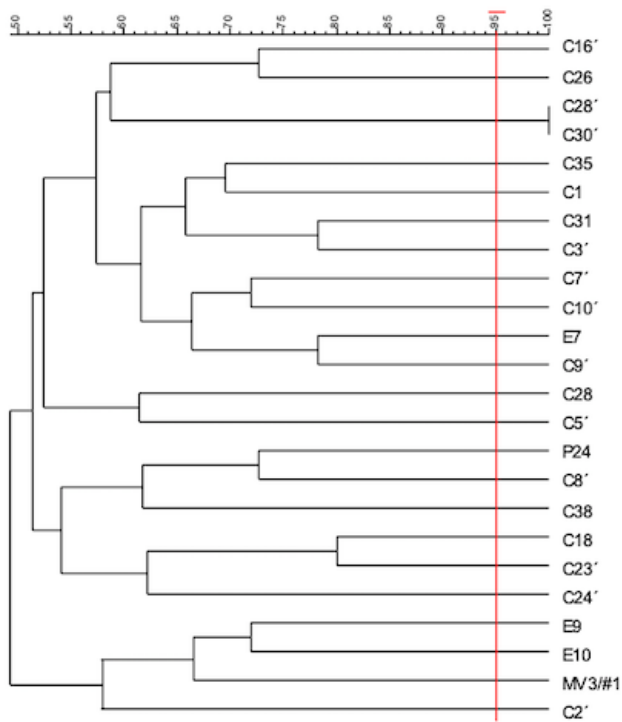


Figura 4: Dendrograma de cepas de *S. pseudintermedius*. La línea roja indica un 95% de similitud.

Objetivo 5. Comparar los resultados con los cultivos históricos del Hospital Clínico Veterinario.

Los porcentajes de resistencia frente a antimicrobianos en ambos *clusters* (2005-2009 y 2010-2014) se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: Porcentajes de resistencia entre los años 2004-2009; 2010-2014.

		AMP	CFR	AMX/CLA	CLI	GEN	ENR
2005-2009 N=28	%R	28,6	16	5,6	28,6	11,1	17,9
	R/T	2/7	4/25	1/18	6/21	3/27	5/28
2010-2014 N=33	%R	50	44,4	18,8	100	12,1	19,4
	R/T	2/4	12/27	6/32	23/23	4/33	6/31

AMP: ampicilina; CFR: cefadroxilo; AMX/CLA: Amoxicilina con ácido clavulánico; CLI: clindamicina; GEN: Gentamicina; ENR: enrofloxacino. R/T: N° cepas resistentes/N° de cepas testeadas.

No todas las cepas fueron testeadas con todos los antimicrobianos y los resultados provienen de diversos laboratorios, lo que dificulta obtener conclusiones definitivas, sin embargo, en la tabla anterior se evidencia un aumento en el tiempo del porcentaje de cepas resistentes a lactámicos, tanto en solitario como potenciados por inhibidores de β -lactamasas, así como un considerable aumento en la resistencia frente a clindamicina. Se observa un moderado aumento de la resistencia frente a quinolonas y una resistencia prácticamente estable frente a aminoglucósidos.

DISCUSIÓN

La mayoría de las clases de antimicrobianos son usados tanto en medicina humana como veterinaria (Mcewen y Collignon, 2018), por lo que observar los fenómenos de resistencia desde el enfoque de UNA SALUD es fundamental para una correcta perspectiva del problema. Este enfoque reconoce que la salud de los seres humanos, los animales domésticos y salvajes, las plantas y el medio ambiente (incluidos los ecosistemas) están estrechamente vinculados y son interdependientes (OHHLEP, 2022). Las consecuencias del uso (o mal uso) de antimicrobianos en medicina veterinaria no difieren de lo observado en medicina humana y animales de producción (Rumi *et al.*, 2022). La información respecto del uso de antimicrobianos en medicina de pequeños animales en Asia, África y América latina es muy precaria, lo que genera un riesgo para la salud humana y animal ya que la resistencia bacteriana puede diseminarse rápido a otros hospederos y regiones (Galarce *et al.*, 2021).

Además de ser comensales, las bacterias del género *Staphylococcus* pueden ser patógenas potencialmente mortales, particularmente las cepas coagulasa positivas (Rodrigues *et al.*, 2017). Esta situación es mucho más compleja cuando está asociada a meticilino-resistencia, generando una amenaza creciente en todo el mundo, tanto en medicina humana como veterinaria (Roken *et al.*, 2022). Además, diversos estudios demuestran que el ambiente veterinario es particularmente propenso a estar asociado a la presencia de SMR (Adiguzel *et al.*, 2022).

Por lo anterior se analizó la prevalencia de aislamiento y la diversidad de especies de SCP; su susceptibilidad antimicrobiana, con particular énfasis en la búsqueda de cepas meticilino-resistentes; y se analizó la relación genética entre las cepas aisladas.

Objetivo 1. Identificar las especies de SCP aisladas desde perros, tutores, médicos veterinarios y superficies del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile.

La portación nasal de *S. aureus* en humanos ha sido reportada en porcentajes que varían desde 18,5 a 30,0% (Cong *et al.*, 2019; Kaspar *et al.*, 2018; Boost *et al.*, 2007), Un reciente estudio nacional, reporta 27,1% de portación de *S. aureus* en estudiantes de medicina y enfermería, sin encontrar diferencias al comparar con la población general (Aravena *et al.*, 2021). De las 64 muestras tomadas desde humanos en el presente trabajo se obtuvo un total de 20 cepas de SCP, lo que corresponde a un 31,3%, cercano a lo descrito en la literatura. Cabe destacar que al separar los porcentajes obtenidos desde tutores y médicos veterinarios existe una gran diferencia, siendo mucho menor el porcentaje de aislamiento obtenido desde tutores (20% versus 50%), lo que concuerda con lo descrito en la literatura, que describe que los médicos veterinarios tienen mayor probabilidad de portar cepas de SCP en su nariz (Anderson *et al.*, 2008), encontrándose porcentajes de aislamiento de hasta un 61,2 % en el estudio de Rodrigues *et al.* (2017). Esta mayor probabilidad de encontrar cepas de *Staphylococcus* en profesionales veterinarios se puede deber a la frecuencia y cercanía de contacto con pacientes animales.

Respecto de *Staphylococcus pseudintermedius* se encontró dos portadores humanos en el presente estudio, uno correspondió a un médico veterinario y el otro a un tutor; siendo a nuestro conocimiento el primer estudio a nivel nacional que documente la portación de esta especie de *Staphylococcus* en humanos. Si bien esta bacteria está

adaptada para vivir en caninos y no en humanos, está documentado que *S. pseudintermedius* tiene un conjunto de características que le permiten encontrar un lugar entre los microorganismos en la piel de los humanos al inhibir el crecimiento de bacterias típicas de este sitio (Kmieciak y Szewczyk, 2018). De hecho, en el estudio de Latronico *et al.* (2014) se demuestra que la mayoría de los *S. pseudintermedius* tienen mayor adherencia por corneocitos caninos, pero describen un secuencia-tipo en particular (ST-71) que se adhiere al corneocito humano con la misma facilidad que al corneocito canino. En general los porcentajes de aislamiento de esta especie en humanos es baja, pero los métodos de identificación más modernos probablemente van a generar un aumento en el número de casos de cepas aisladas desde humanos (Adiguzel *et al.*, 2022; Samoyaji *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2015), ya que por su similitud bioquímica puede ser mal identificado como *S. aureus* (Borjesson *et al.*, 2014). Aunque los porcentajes de aislamiento en humanos sean bajos, la transmisión de elementos como *SCCmec* u otros determinantes de resistencia desde *S. pseudintermedius* a otras especies de *Staphylococcus*, como *S. aureus* es posible (Pomba *et al.*, 2016), por lo que la posible portación de esta especie en humanos debe ser analizada continuamente. El porcentaje de aislamiento de esta cepa en humanos en la presente tesis es 3,1% (2/64), similar a lo descrito en diferentes estudios que reportan porcentajes de aislamiento desde 3,9 a 5,6% (Gómez-Sanz *et al.*, 2013 a; Walther *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2011; Hanselman *et al.*, 2009; Boost *et al.*, 2009), y considerablemente menor a lo descrito por Moon *et al.* (2012), que reportan un 33,7% de aislamiento de *S. pseudintermedius* desde los humanos estudiados. Cabe destacar, que aunque en porcentajes menores que *S. aureus*, en todos los estudios en los que se

hace búsqueda activa de esta especie en humanos se logra identificar. Las diferencias en los porcentajes de aislamiento radican, entre otros, en el número de individuos muestreados, diferencias geográficas y las poblaciones estudiadas. En general los porcentajes tienden a ser más altos cuando la población muestreada está en directa relación con la medicina veterinaria en comparación a la población general, sin embargo, existen publicaciones como la de Bhooshan *et al.* (2020) en la que no se describen diferencias entre la población general y las personas asociadas a carreras de la salud en términos de porcentaje de aislamiento de cepas de *S. pseudintermedius*. El escaso número de cepas de esta especie aisladas desde humanos en el presente estudio no permite verificar diferencias entre los veterinarios muestreados y los tutores, por lo que se hace necesario estudios a mayor escala para evaluar si este fenómeno se evidencia o no en nuestro medio.

En esta tesis se obtiene cepas de SCP desde 24 de los 40 pacientes caninos muestreados, lo que corresponde a un 60%, menor al porcentaje descrito por Muñoz *et al.* (2012), que fue de un 71,3%; la diferencia es que en dicho estudio sólo se consideró animales con otitis y pioderma, a diferencia de los animales sanos incluidos en el presente trabajo. Otros estudios encuentran menores porcentaje de positividad para SCP (Rana *et al.*, 2022; Drougka *et al.*, 2016; Wedley *et al.*, 2014; Walther *et al.*, 2012). Estas diferencias pueden ser explicadas por diversos factores como la población objetivo estudiada, la metodología del cultivo o diferencias geográficas. En total se obtuvo 26 cepas, 10 desde cultivos nasales (38,5%) y 16 desde la zona perianal (61,5%), a pesar de que en la literatura se describe que los porcentajes de aislamiento son similares desde mucosa nasal versus perianal (Boost *et al.*, 2007), la presente tesis

obtiene mayor porcentaje de cepas desde la zona perianal, lo que también difiere de lo publicado por Kottler *et al.* (2012) quienes aíslan cepas de SCP más frecuentemente desde la mucosa nasal que perianal y concuerda con lo publicado por Hanselman *et al.* (2009) quienes reportan mayor frecuencia de aislamiento desde mucosa perianal. De las cepas aisladas desde caninos 22 (84,6%) correspondieron a *S. pseudintermedius* y 4 (15,4%) a *S. aureus*. En general en todos los estudios que se busca identificar diferentes especies de SCP desde caninos se observa que *S. pseudintermedius* es la especie más comúnmente aislada, seguida por *S. aureus* (Rana *et al.*, 2022; Couto *et al.*, 2016; Beca *et al.*, 2015; Wedley *et al.*, 2014; Walther *et al.*, 2012; Moon *et al.*, 2012). Por otra parte, Esposito *et al.*, (2019) destacan que un número no menor de individuos podría ser portador de cepas de *S. aureus* en la orofaringe, pero este tipo de toma de muestra probablemente sería una complicación adicional para el individuo muestreado, lo que pudo afectar la decisión de incorporarse al estudio, por lo que no se consideró este lugar de aislamiento en la presente tesis.

Con respecto a la identificación de las cepas estos hallazgos refuerzan lo descrito previamente en diversas publicaciones, humanos y mascotas comparten diferentes especies del género *Staphylococcus*, ya que si bien la especie más común de encontrar es *S. aureus*, fueron identificadas dos cepas de *S. pseudintermedius* desde humanos. Así como de las cepas aisladas desde caninos, siendo más común aislar *S. pseudintermedius*, cuatro de las cepas fueron identificadas como *S. aureus*. Esto permite aceptar como cierta la primera hipótesis de esta tesis.

Objetivo 2. Determinar los perfiles de resistencia fenotípica y el nivel de resistencia a antibióticos de las cepas de SCP aisladas.

Como se esperaba se describe un porcentaje importante de las cepas de SCP resistentes a ampicilina (73,3%), ya que gran parte de las cepas de *Staphylococcus* son portadoras de β -lactamasas (Algammal *et al.*, 2020). Esto se evidencia al compararlo con un porcentaje considerablemente menor de resistencia frente a amoxicilina con ácido clavulánico (17,8%). Estos resultados son similares a los descritos por Couto *et al.* (2016), quienes encuentran un alto porcentaje de resistencia frente a ampicilina (77,8% para *S. aureus* y 64,6% en *S. pseudintermedius*) y un consistente menor porcentaje de resistencia frente a amoxicilina con ácido clavulánico (37% para *S. aureus* y 7,6% para *S. pseudintermedius*), cabe destacar que en dicho estudio sólo se considera cepas de SCP aislados desde animales. Asimismo, altos niveles de resistencia a ampicilina se reportan en el trabajo de Gómez-Sanz *et al.* 2013 (b); tanto en cepas aisladas desde perros como en sus tutores. A su vez, en un reciente estudio nacional, Aravena *et al.* (2021) describen un 75,4% de resistencia a ampicilina en cepas aisladas desde estudiantes de medicina y enfermería.

Los β -lactámicos, al igual que otras clases de antimicrobianos, han sufrido un continuo desarrollo desde su descubrimiento con el fin de mejorar propiedades como la potencia, el espectro de acción, los perfiles farmacocinéticos y de seguridad y contrarrestar la aparición de resistencia (Tooke *et al.*, 2019). Rápidamente, luego del descubrimiento de la penicilina por parte de Alexander Fleming se describió la presencia de cepas portadoras de penicilinasas. Esto llevó a la producción de una

molécula semisintética capaz de resistir el efecto de estas penicilinasas y en 1959 se comienza a usar de forma masiva: la metilina (Guo *et al.*, 2020). Fue la primera del grupo posteriormente denominado penicilinas anti estafilocócicas, pero carecía de absorción oral y provocó eventos adversos severos, incluyendo nefritis intersticial (Ditlove *et al.*, 1977), lo que llevó a discontinuar su uso. La búsqueda de mejores características de seguridad y absorción oral llevó al descubrimiento de la oxacilina y sus análogos clorados, cloxacilina (adición de una molécula de cloro) y dicloxacilina (adición de dos moléculas de cloro), denominadas isoxazolilpenicilinas (Marcy y Klein, 1970). La adición de las moléculas de cloro genera ventajas farmacocinéticas, tanto disminuyendo la metabolización hepática, como disminuyendo su eliminación renal (Rosenblatt *et al.*, 1968).

El mecanismo de acción de los β -lactámicos se basa en la inhibición de la producción de peptidoglicanos (PG), que son componentes hetero poliméricos en estructura de enrejado muy entrelazado, que le otorgan estabilidad mecánica rígida a la pared de la bacteria, confiriéndole la capacidad de resistir la presión osmótica intracelular (Singh *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2020). El último paso en la formación del PG es una reacción de transpeptidación catalizada por las transpeptidasas (las ya mencionadas PBP) que ocurre en el espacio periplásmico. Las PBPs restablecen los enlaces peptídicos utilizando un residuo de serina en el sitio activo, interactuando con el dipéptido D-Ala-D-Ala que se encuentra en un pentapéptido que se une al ácido N-acetil murámico del polímero de PG para formar un intermediario acil-enzima (Palskill, 2013), más específicamente con el carboxilo del cuarto residuo (D-Ala), a través de un enlace covalente transitorio (Lima *et al.*, 2020). El anillo β -lactámico

posee gran analogía estructural con el dipéptido (Li *et al.*, 2018), entonces, la actividad surge de la reacción del anillo β -lactámico con la serina nucleofílica de las PBP diana, lo que conduce a la apertura del anillo y la acilación irreversible de la PBP (Tooke *et al.*, 2019) con la consiguiente inhibición de la producción de la pared y probable lisis de la bacteria.

La resistencia a β -lactámicos puede ocurrir por diversos mecanismos, como modificación de la diana farmacológica (por ejemplo, SMR), disminución de la permeabilidad celular por disminución de transcripción de porinas, sobreexpresión de bombas de expulsión o enzimas inactivadoras (β -lactamasas). Las β -lactamasas se producen en bacterias Gram-positivas y negativas y son capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico (Tooke *et al.*, 2019). Debido al cambio estructural del anillo, el antimicrobiano pierde analogía estructural y deja de competir por las PBPs. Las β -lactamasas son una familia de enzimas versátiles con un rango limitado de estructuras moleculares que se encuentran en una diversidad de fuentes bacterianas (Bush, 2018). Se describen cientos de β -lactamasas diferentes, las que se clasifican, de acuerdo a su estructura, en diferentes grupos (Palskill, 2013). Se han clasificado bioquímicamente en dos amplias divisiones según el mecanismo por el cual realizan la hidrólisis, ya sea a través de la formación de una enzima acilo con un sitio activo de serina (serinoproteasas) o a través de una reacción hidrolítica facilitada por uno o dos iones de zinc esenciales en los sitios activos de las metalo β -lactamasas (Bush, 2018). Las serinoproteasas presentan diferencias substanciales en su secuencia, pero todas emplean un mecanismo de acilación-desacilación, en el que la serina nucleófila es activada por una base general, ataca el carbono carbonilo del enlace amida β -lactama

escindible y genera la ruptura del anillo (Tooke *et al.*, 2019). Por otra parte, las metaloproteasas no proceden a través de un intermediario covalente sino más bien a través del ataque directo de un ion hidróxido que es estabilizado por el zinc en el sitio activo (Palskill, 2013).

Desde la aparición de la meticilina para combatir β -lactamasas se inicia una verdadera “carrera armamentista” entre los químicos farmacéuticos y la medicina versus la evolución bacteriana, que se mantiene hasta hoy (Tooke *et al.*, 2019). Si bien en bacterias Gram-negativas las enzimas inactivadoras son el mecanismo principal de resistencia, la aparición de cepas portadoras de PBP alteradas ha reemplazado en gran medida a la producción de β -lactamasas como mecanismo principal de resistencia a los β -lactámicos en Gram-positivas (Fisher y Mobashery, 2016; Palskill, 2013). Aunque la base evolutiva para la selección de la modificación del objetivo como el principal mecanismo de resistencia para las bacterias Gram-positivas es incierta, la ausencia de una membrana exterior (y, por tanto, la ausencia de un mecanismo de control para la exposición a los antibióticos) en las bacterias Gram-positivas seguramente contribuyen a este mecanismo. (Fisher y Mobashery, 2016).

Por otra parte, frente a eritromicina también se detectó un alto porcentaje de resistencia (37,8%), levemente mayor a lo reportado por Boost *et al.* (2009) quienes describen un porcentaje de resistencia de SCP de un 31,8%. Considerando sólo cepas de *S. aureus* la resistencia es levemente mayor (38,9%), similar a lo descrito por Rahman *et al.* (2018), con la diferencia que estos últimos sólo consideran cepas meticilino-resistentes, que tienden a tener mayores niveles de resistencia al ser comparados con cepas meticilino-sensibles. Considerando sólo cepas de *S.*

pseudintermedius la resistencia se presentó en el 37% de las cepas, similar a lo descrito por Vigo *et al.* (2015) y Gröntal *et al.* (2017) que describen un 39,3 y un 30,5 % de resistencia respectivamente. Este mayor porcentaje de resistencia de *S. aureus* puede ser explicado por el menor uso de este antimicrobiano en medicina veterinaria. De hecho, Awosile *et al.* (2018) describen que la resistencia a eritromicina ha ido disminuyendo con el tiempo en SCP aislados desde perros, así como una publicación nacional documenta que los macrólidos no están dentro de las preferencias de antimicrobianos en veterinarios dedicados a la medicina de pequeños animales (Galarce *et al.*, 2021).

Frente a clindamicina 33,3% de las cepas fueron resistentes. Clindamicina es un inhibidor de la síntesis proteica, uniéndose al receptor 23S de la subunidad 50S de ribosomas de bacterias susceptibles (Greenberg *et al.*, 2020; Majhi *et al.*, 2016), es parte del grupo de las lincosamidas, que a su vez se consideran parte del grupo MLSB (*macrolide-lincosamide-streptogramin-B*), con los que comparte mecanismos de acción y de resistencia. Es un antibiótico elegido debido a su disponibilidad en formulaciones intravenosas y orales, con 90% de biodisponibilidad oral, bajo costo (en comparación a otros más nuevos), buena llegada a tejidos, acumulación en abscesos profundos y capacidad para inhibir la generación de toxinas en *S. aureus* (Majhi *et al.*, 2016). Este considerable porcentaje de resistencia adquiere gran relevancia al considerar publicaciones como la de Hillier *et al.* (2014) que considera a la clindamicina como uno de los antibióticos de primera línea para el tratamiento de piodermas caninos. La publicación anteriormente mencionada es la guía clínica de tratamiento de foliculitis bacterianas, cuya etiología en la gran mayoría de los casos

son cepas de *S. pseudintermedius* (Loeffler y Lloyd, 2018), lo que demuestra la importancia del análisis del comportamiento de estas cepas a nivel local, para establecer la mejor estrategia de tratamiento, de hecho, en la publicación de Vigo *et al.* (2015) de Argentina, se afirma que la clindamicina debería evitarse de manera empírica, así como Rumi *et al.* (2021) describen un aumento de la resistencia a clindamicina en el tiempo frente a cepas de *Staphylococcus*. A su vez, Galarce *et al.* (2021) describen que la causa más común de uso de antimicrobianos en la práctica de pequeños animales en nuestro medio son cuadros de pioderma. Se hace necesario entonces considerar otras alternativas de tratamiento, como terapias tópicas con clorhexidina, para evitar la terapia sistémica con antimicrobianos y disminuir la aparición de cepas meticilino-resistentes que alarguen innecesariamente la terapia (Borio *et al.*, 2015). Este 33,3% de resistencia a clindamicina es ampliamente superior a lo descrito por Couto *et al.* (2016), quienes reportan un 17,1% de resistencia, con la diferencia que sólo analizan cepas obtenidas desde animales. El porcentaje de resistencia de cepas obtenidas desde caninos en el presente trabajo que llega a 23,1%, por lo que sigue siendo superior a lo descrito en dicho estudio; y suficiente para no ser considerada una buena alternativa empírica.

Se evaluó también el comportamiento de las cepas frente a fluoroquinolonas, 11 cepas (24,4%) fueron resistentes a enrofloxacino y ciprofloxacino por pruebas de difusión. Una cepa presentó sensibilidad intermedia para ambos y otra cepa presentó sensibilidad intermedia sólo frente a enrofloxacino y no ciprofloxacino, esta diferencia podría ser explicada por diferente afinidad de ciertas bombas de expulsión frente a diferentes quinolonas (Wildermuth *et al.*, 2007). Al realizar la CMI frente a

enrofloxacino se detecta 14 cepas resistentes (31,1%). Al considerar la resistencia según especie, se encuentra mayor porcentaje de resistencia en cepas de *S. aureus* (33,3% frente a enrofloxacino y ciprofloxacino) versus cepas de *S. pseudintermedius* (18,5%). No está claro porque se produce esta diferencia, ya que tanto en medicina humana como veterinaria las quinolonas son ampliamente utilizadas (Galarce *et al.*, 2021; Barbieri *et al.*, 2018), pero coincide con lo descrito por Couto *et al.* (2016), quienes reportan resistencias de 40,7% en cepas de *S. aureus* y un 9,2% de resistencia en cepas de *S. pseudintermedius*. Por otra parte, tanto para enrofloxacino como para ciprofloxacino se reporta un aumento de los porcentajes de resistencia en el tiempo frente a cepas de *Staphylococcus* en Argentina (Rumi *et al.*, 2021). Además de no estar indicadas como primera línea para el tratamiento de foliculitis en el perro (Hillier *et al.*, 2014) y ser un grupo de antimicrobianos caracterizado como crítico por la OMS, se hace recomendable evitar la terapia empírica en nuestro medio, al menos para alternaciones producidas por este género.

Con respecto a las cefalosporinas se evaluó el comportamiento frente representantes de diferentes generaciones encontrándose un 20,0% de las cepas resistentes a cefadroxilo (primera generación) y ceftriaxona (tercera generación) y un 13,3% de las cepas resistentes a cefoxitina (segunda generación). Esta discrepancia (susceptibilidad a cefalosporina de segunda generación y resistencia a cefalosporina de tercera generación) radica en la susceptibilidad fenotípica que presentan las cepas SPMR a cefoxitina. Cabe destacar que ninguna de las cepas aisladas desde caninos presentaron resistencia, por lo que aún podría considerarse una buena alternativa de tratamiento frente a infecciones producidas por cepas de SCP en el hospital analizado,

lo que difiere de lo reportado por Saputra *et al.* (2017), quienes reportan 12% de resistencia frente a cefoxitina y ceftriaxona, esta diferencia puede ser explicada por el número de cepas analizadas en ese estudio, que fue inmensamente superior a la presente tesis (888 cepas versus 45), por lo que es probable que si se aumenta el número de cepas estudiadas cambien los porcentajes de resistencia obtenidos en el presente trabajo, ya que las cefalosporinas, en particular de primera generación, son ampliamente utilizadas en medicina de animales pequeños en Chile (Galarce *et al.*, 2021). Dentro de los β -lactámicos, la única molécula con actividad frente a cepas de SMR es una cefalosporina de quinta generación denominada ceftarolina. En la revisión sistemática realizada por Cosimi *et al.* (2017) concluyen que generalmente es bien tolerada, con un perfil de toxicidad como el de otras cefalosporinas, pero con una tasa notablemente alta de neutropenia durante tratamientos más prolongados.

Frente a tetraciclinas 15,6% de las cepas de SCP fueron resistentes, pero al separar la resistencia por especie se destaca que ninguna cepa de *S. aureus* presentó resistencia, a diferencia del 25,9% de las cepas de *S. pseudintermedius* que fueron resistentes. También Saputra *et al.* (2017) y Lee *et al.* (2015) reportan mayor porcentaje de resistencia de *S. pseudintermedius* versus *S. aureus* (22,7 versus 10,6% y 15% versus 4,7%; respectivamente), a su vez, este resultado es similar a lo descrito por Gröntal *et al.* (2017), quienes reportan un 38,8% de cepas de *S. pseudintermedius* resistentes a tetraciclina, y mayor al 17,8% de resistencia descrito por Vigo *et al.* (2015) en la misma especie. Posiblemente esta diferencia se deba al mayor uso de este antimicrobiano en medicina veterinaria comparado con la medicina humana. (Bean y Wigmore, 2016).

Menores porcentajes de resistencia se encontraron frente a gentamicina (2,2%), sin encontrar cepas resistentes frente a doxiciclina y amikacina, lo que coincide con lo descrito por Gröntal *et al.* (2017) quienes reportan también bajos porcentajes de resistencia frente a doxiciclina (6,1%), amikacina (0%) y gentamicina (6,6%). Este bajo porcentaje de resistencia frente a gentamicina es reportado también por Ventrella *et al.* (2017), quienes lo explican por la baja utilización de este antimicrobiano por su alta toxicidad, lo que también podría considerarse válido para doxiciclina y amikacina, de hecho, ninguno de estos antimicrobianos están dentro de las primeras preferencias de veterinarios de pequeños animales en Chile (Galarce *et al.*, 2021), aunque cabe mencionar que tanto frente a gentamicina, como amikacina se describe un aumento de la resistencia en el tiempo frente a cepas de *Staphylococcus* en Argentina (Rumi *et al.*, 2021).

CLSI no considera válida la prueba de sensibilidad en disco para vancomicina, por lo que fue necesario evaluar la CMI de las cepas frente a este antimicrobiano. Vancomicina es considerada la principal alternativa de tratamiento en Chile para infecciones por SAMR (Acuña *et al.*, 2015), ya que por su mecanismo de acción no se ve afectada por β -lactamasas ni alteraciones de la PBP (Nandhini *et al.*, 2022), por eso la particular relevancia de evaluar el comportamiento de las cepas aisladas frente a este antimicrobiano. Las cepas de *Staphylococcus aureus* con susceptibilidad reducida a vancomicina son clasificadas en tres grupos por el CLSI. El primer grupo son cepas sensibles (VSSA, de su sigla en inglés *Vancomycin-susceptible S. aureus*) con CMI \leq a 2 $\mu\text{g/mL}$, luego se definen las cepas con sensibilidad intermedia con CMI entre 4 y 8 $\mu\text{g/mL}$ (VISA, de su sigla en inglés *Vancomycin-intermediate S. aureus*), y

finalmente, cepas resistentes (VRSA, de su sigla en inglés *Vancomycin-resistant S. aureus*) con valores de CMI \geq a 16 $\mu\text{g/mL}$, siendo necesario caracterizar por medios moleculares la presencia del gen *vanA* u otros determinantes de resistencia para confirmar este hecho. El presente estudio caracteriza 2 cepas de *S. aureus* con CMI $>$ a 16 $\mu\text{g/mL}$ (32 y 64 $\mu\text{g/mL}$), por lo que es importante buscar el origen de dichas resistencias, que probablemente sea el gen *van A* ya que aunque se ha descrito que 11 grupos de genes *van* confieren resistencia a vancomicina, sólo el grupo de genes *vanA* es responsable de las resistencia en cepas de VRSA (Cong *et al.*, 2020). Este es el primer reporte de resistencia de cepas de SCP en nuestro país frente a vancomicina, por lo que por el momento continúa siendo la primera alternativa de tratamiento en casos de SMR en medicina humana (Acuña *et al.*, 2015); aunque cabe destacar estudios como el de Vega *et al.* (2015) que describen el aislamiento de una cepa con heteroresistencia a vancomicina en Chile. Otras cuatro cepas descritas en la presente tesis presentan un fenotipo de VISA, situación tampoco descrita previamente. Se propone en un trabajo futuro detectar la presencia de genes de resistencia frente a vancomicina en estas cepas, pero está fuera de los objetivos de la presente tesis, por lo que se propone dentro de las proyecciones de la investigación. Como se ha mencionado previamente, la alternativa farmacológica para tratar infecciones por SMR en Chile es la vancomicina (glucopéptido), que a diferencia de afectar la transpeptidación (como los β -lactámicos), altera un paso enzimático previo, por lo que son efectivos contra estas bacterias independiente de la presencia de β -lactamasas. Específicamente forma un fuerte puente de hidrógeno con el dipéptido D-Ala-D-Ala (Nandhini *et al.*, 2022), lo que conduce a una alteración conformacional que impide la incorporación del

precursor a la cadena de peptidoglicano en crecimiento y la subsiguiente transpeptidación, lo que conduce a la descomposición de la pared celular (Cong *et al.*, 2019). Según algunos autores, debido a su perfil principalmente bacteriostático, la vancomicina debe utilizarse como fármaco de segunda línea frente a los antibióticos β -lactámicos bactericidas en infecciones graves por Gram-positivas sensibles, como las bacteriemias por *S. aureus* meticilino-sensible, aunque se mantiene como una alternativa de primera línea contra SAMR (Eyler y Shvets, 2019). Es uno de los antimicrobianos más antiguos, y se ha mantenido en uso clínico por cerca de 60 años (Cong *et al.*, 2019). La resistencia la confieren un *cluster* de genes denominados *van*, que reemplazan la última D-Alanina de la cadena lateral por un D-Lactato o una D-serina, no es reconocido por la vancomicina. (Werner *et al.*, 2008). La teicoplanina es otro glucopéptido que se usa para tratar la infección por MRSA; su estructura molecular, espectro y actividad antibacteriana son similares a la vancomicina y es clínicamente aplicable a infecciones causadas por bacterias Gram-positivas resistentes a penicilinas y cefalosporinas, o infecciones graves en pacientes alérgicos a antibióticos β -lactámicos (Ramos-Martín *et al.*, 2017).

Además de la ceftarolina, daptomicina y linezolid son nuevos fármacos antibacterianos para el tratamiento de las infecciones producidas por SAMR (Nandhini *et al.*, 2022).

La daptomicina es un polipéptido cíclico que actúa insertándose en la membrana celular de manera dependiente de calcio, donde se polimerizan y se disponen en la superficie formando canales iónicos, lo que resulta en una despolarización de la membrana y posterior pérdida de componentes intracelulares como potasio, magnesio

y ATP (Heidary *et al.*, 2018; Araos *et al.*, 2012). Estudios *in vitro* han demostrado que la daptomicina tiene una actividad bacteriana equivalente o superior a vancomicina y linezolid frente a cepas de *Staphylococcus* (Nandhini *et al.*, 2022). Este antimicrobiano no tiene resistencia cruzada con otros antimicrobianos por su exclusivo mecanismo de acción, por lo que está indicado para el tratamiento de SAMR, con excepción de cuadros neumónicos porque su actividad puede ser suprimida por el surfactante alveolar (Guo *et al.*, 2020). La resistencia a daptomicina es un hecho poco frecuente, aunque se han descrito cepas de *Staphylococcus* resistentes (Araos *et al.*, 2012). Un mecanismo propuesto es la inactivación por ruptura hidrolítica del enlace éster entre los residuos de treonina y quinurenina, lo que da como resultado la inactivación por apertura del anillo (Heidary *et al.*, 2018). Además, existe evidencia de desarrollo de resistencia intratratamiento con daptomicina, no existiendo una explicación hasta el momento para este fenómeno (Heidary *et al.*, 2018; Araos *et al.*, 2012). Frente a infecciones por SAMR, ha mostrado efecto sinérgico con rifampicina, gentamicina y oxacilina (Guo *et al.*, 2020). La combinación de daptomicina y fosfomicina exhibe mejor efecto sinérgico contra las cepas de SAMR que linezolid y fosmomicina (Nandhini *et al.*, 2022). Su alto porcentaje de unión a proteínas plasmáticas y bajo volumen de distribución lo convierten en un agente ideal para tratar septicemias (Eyler y Shvets, 2019).

Por otra parte, linezolid, del grupo de las oxazolidinonas, también indicado frente a infecciones por SAMR, se une al sitio 23S del ARN ribosómico en la subunidad 50S en bacterias, inhibiendo las subunidades ribosómicas 50S y 30S y previniendo la formación del complejo de iniciación 70S, lo que interfiere con la síntesis de proteínas

(Guo *et al.*, 2020). También inhibe la formación del complejo de iniciación durante la síntesis proteica, lo que puede reducir la longitud de las cadenas peptídicas desarrolladas y disminuir la tasa de reacción de elongación de la traducción (Hashemian *et al.*, 2018). Uno de los mecanismos descritos de resistencia se asocia a mutaciones del sitio de unión al ARN. Las mutaciones en regiones particulares de las proteínas ribosómicas uL3 y uL4 se asocian cada vez más con la resistencia a la linezolid (Hashemian *et al.*, 2018). Esta información precisa del sitio de unión de linezolid ha permitido el diseño de una nueva generación de oxazolidinonas que muestran características mejoradas frente a los mecanismos de resistencia identificados (Sharkey *et al.*, 2016). Se absorbe 100% por vía oral sin cambios por presencia de alimentos, lo que permite cambiar la vía de administración de endovenosa a oral en pacientes estables (Hashemian *et al.*, 2018). Se describe un excelente efecto sinérgico con carbapenémicos frente a SAMR (Nandhini *et al.*, 2022). Se reporta que la tasa de supervivencia y cura clínica en pacientes con infección por SAMR tratados con linezolid fueron significativamente más altas que los tratados con vancomicina (Guo *et al.*, 2020).

Tanto Linezolid, como Daptomicina solo están disponibles para uso en medicina humana, y no en medicina veterinaria (Galarce *et al.*, 2021).

Recientemente ha sido descrita una nueva clase de antibacterianos llamados quinazolinonas, biodisponibles por vía oral con actividad *in vivo* específica anti-SAMR (Bouley *et al.*, 2015). En mono terapia *in vitro* han demostrado ser bacteriostáticas, pero al asociarlo a piperacilina-tazobactam demuestra recuperar sensibilidad en cepas de SAMR, además de mostrar un efecto sinérgico (Janardhanan

et al., 2019). El mecanismo propuesto, es la unión a un sitio alostérico de la PBP 2a, cambiando su conformación, devolviendo la sensibilidad a la piperacilina.

Objetivo 3. Pesquisar el gen *mecA* y sus variantes en las cepas aisladas.

El *gold standard* para la identificación de meticilino-resistencia es la detección del gen *mecA* por PCR (Adiguzel *et al.*, 2022), método utilizado en el presente trabajo. Algunos autores describen que la producción de PBP 2a ha reemplazado en gran medida a la producción de β -lactamasas como mecanismo principal de resistencia a los β -lactámicos en Gram-positivas (Fisher y Mobashery, 2016; Palskill, 2013). Respecto a la susceptibilidad fenotípica frente a oxacilina, se evidenció nueve cepas meticilino-resistentes (20% de las cepas analizadas), muy similar al 20,4% de cepas meticilino resistentes publicadas por Rahman *et al.* (2018), todas ellas portadoras del gen *mecA*. Otras 2 cepas, que mostraron sensibilidad fenotípica a la oxacilina resultaron portadoras del gen *mecA*, lo que se podría explicar por la falta del promotor o de otras secuencias que permitan la expresión del gen lo que se puede traducir en susceptibilidad fenotípica (Wedley *et al.*, 2014). Este fenómeno de cepas positivas al gen y susceptibilidad a oxacilina fue descrito en nuestro medio en felinos, en la publicación de Galarce *et al.*, el 2016. Cepas oxacilino-sensibles portadoras del gen *mecA* fueron descritas por primera vez el 2007 (Hososaka *et al.*, 2007) y por sus siglas en inglés se denominan OS-SAMR (*oxacillin-susceptible SAMR*), estas cepas son cada vez más descritas en la literatura, aisladas tanto desde humanos como desde

perros (Fabri *et al.*, 2021), con una significancia clínica en estudio, aunque cabe destacar la descripción de una sepsis mortal asociada a una cepa OS-SAMR en Brasil. (Duarte *et al.*, 2018).

No se encontró cepas portadoras del gen *mecC*, lo que parece esperable al considerar que mas del 99% de los aislados de SMR poseen el gen *mecA* como origen genético de la resistencia a meticilina (Becker *et al.*, 2014).

De las ocho cepas aisladas desde médicos veterinarios, seis de ellas fueron meticilino resistentes (75%), porcentaje ampliamente superior a lo publicado por Boost *et al.* (2009), quienes describen un 4,5% de cepas meticilino-resistentes aisladas desde personal veterinario. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Pomba *et al.* (2016), quienes establecen que la portación de cepas meticilino-resistentes podría ser considerado un riesgo ocupacional, así como lo descrito por Rodrigues *et al.* (2017) quienes establecen que ser médico veterinario es factor de riesgo para la portación de SMR en la nariz. También Kottler *et al.* (2012) establecen que los veterinarios tienden a portar mayor porcentaje de cepas de SAMR versus la población general que porta estas cepas en porcentajes que van desde 0,8 a 3,5% en diferentes publicaciones (Adiguzel *et al.*, 2022). Si se considera sólo tutores, el porcentaje de portación llega a 2,5% de los 40 tutores muestreados, lo que está en concordancia con lo reportado por Gómez-Sanz (2013 b) los que también aislaron sólo una cepa de SAMR desde 67 tutores (1,4%). Esta diferencia en los porcentajes de portación de médicos veterinarios y tutores es estadísticamente significativa ($p < 0,001$), por lo que se debe considerar la portación de cepas de SMR un riesgo ocupacional en médicos veterinarios.

Respecto de *S. pseudintermedius*, se describió un médico veterinario portando una cepa meticilino-resistente, lo que significa un 4,1% de todos los médicos veterinarios muestreados, similar a lo reportado por Febler *et al.* (2018), que describen un 3,6% de personal veterinario portando cepas de SPMR y por Paul *et al.* (2011), quienes reportan un 3,9% de cepas de SPMR desde 128 veterinarios y es mayor a lo publicado por Rodrigues *et al.* (2017) que reportan un 1,6% de personal veterinario portando cepas de SPMR. De las cepas aisladas desde tutores no se describe ninguna cepa de SPMR, así como con lo descrito por Gómez-Sanz *et al.* (2013 b) que no encuentran ninguna cepa de SPMR desde 67 tutores, por lo que se corrobora a SPMR como una cepa en general menos probable de encontrar en humanos no asociados al ambiente veterinario, en concordancia a la revisión publicada por Pomba *et al.* (2016) quienes describen que la colonización de SPMR en humanos parece ser poco común y transiente. En la misma línea, Roken *et al.* (2022) describen presencia permanente de cepas de SPMR en pacientes caninos y ambiente, sin lograr aislarlo desde sus tutores, lo que describen como una barrera de especie, ya que no lo contraen a pesar de demostrar exposición permanente.

De las 10 superficies muestreadas en el presente estudio se encontró dos cepas (20%) meticilino-resistentes (*S. pseudintermedius*), ambas desde jaulas de hospitalización, porcentaje ampliamente mayor a lo descrito por Sato *et al.* (2018) quienes aislaron cepas de SMR en 5 y 8% de las superficies muestreadas en los años 2008 y 2016 respectivamente; en dicho estudio, algunas de las cepas aisladas mostraban perfiles de electroforesis de campos pulsantes idénticos a los aislados desde animales y personal veterinario, realizando la importancia del ambiente en la

transmisión de estas cepas entre humanos y mascotas. De hecho, Hogan *et al.* (2018) aseveran que la búsqueda de cepas de SMR exclusivamente en el humano es inadecuado, ya que el ambiente es cada vez mas reconocido como reservorio de cepas meticilino resistentes.

No se aísla cepas meticilino-resistentes desde mascotas en el presente estudio, así como lo describe Katakweba *et al.* (2016). Esto difiere del 2,6 % descrito por Kjellman *et al.* (2015) en Noruega, al 6,5% descrito por Menandro *et al.* (2019) en Italia y al 11,7% descrito por Couto *et al.* (2016) en Portugal, lo que se podría explicar por diferencias geográficas o criterios de inclusión. Sin embargo, hay que considerar que estos últimos tres trabajos consideran un número ampliamente mayor a los 40 pacientes analizados en el presente estudio, lo que genera la preocupación de realizar este tipo de estudios a mayor escala. Otro factor importante es que el presente estudio incluye sólo perros sanos, y el porcentaje de portación de meticilino-resistencia es mayor en pacientes que cursan con patologías crónicas de piel (Pomba *et al.*, 2016), por lo que es relevante considerar animales enfermos en futuros estudios. De hecho, de los estudios anteriormente mencionados, Kjellman *et al.* (2015), que sólo consideran animales sanos, describen un menor porcentaje de aislamiento de SMR comparado con los estudios de Menandro *et al.* (2019) y Couto *et al.* (2016), que sólo consideran animales enfermos.

Actualmente, se considera al disco de cefoxitina como mejor predictor de la presencia del gen *mecA* en cepas de *S. aureus* (CLSI, 2018). Los resultados obtenidos demuestran que el disco de cefoxitina no es buen predictor de la presencia del gen en cepas de *S. pseudintermedius*. Las 3 cepas de *S. pseudintermedius* que portan el gen

mecA y que son fenotípicamente resistentes a oxacilina, son sensibles a cefoxitina, lo que ha sido ampliamente descrito en la literatura, y adquiere mayor relevancia al considerar que en medicina humana se tiende a caracterizar como *S. aureus* a todas las cepas de SCP. Lo anterior, lleva a caracterizar cepas como meticilino-sensibles siendo meticilino-resistentes (Börjesson *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013; van Duijkeren, 2008). Es recomendable establecer programas de identificación de cepas de grupo SIG como el descrito por Lee *et al.* (2015), quienes reportan que se encuentran asociadas a humanos incluso no habiendo un historial declarado de contacto con mascotas.

Respecto a los porcentajes de resistencia de cepas de SCP, estos son mucho mayores en cepas meticilino-resistentes versus cepas meticilino-sensibles, así como lo reportan Gröntal *et al.* (2017) y Ventrella *et al.* (2017), destacando un 100% de resistencia en el presente estudio frente a ampicilina, enrofloxacino, ciprofloxacino, clindamicina y eritromicina. Cabe destacar que todas las cepas meticilino resistentes analizadas en el presente trabajo fueron sensibles a amikacina, así como lo reportado por Gröntal *et al.* (2017).

Objetivo 4. Determinar la relación genética entre las cepas de las diferentes especies de SCP aisladas.

De las 45 cepas aisladas en el presente estudio se logró tipificar a 41 de ellas. No fue posible una buena identificación de cuatro de las 45 cepas a pesar del uso de tiourea, recomendado en la literatura para mejorar los perfiles de los pulsotipos

(O'Reilly, 2011). Las cepas no caracterizadas correspondieron a una cepa de *S. aureus* y tres cepas de *S. pseudintermedius*, todas ellas aisladas desde caninos. Así como en el presente estudio, en la publicación de Kadlec *et al.* (2016) no se pudo determinar los pulsotipos de electroforesis de campos pulsados de diversas cepas de *S. pseudintermedius*; sin embargo, en dicho estudio se hace un cambio a la enzima *ApaI*, logrando tipificación de las cepas, lo que no se realizó por razones principalmente asociadas a restricciones de presupuesto.

Las cepas tipificadas presentaron una gran diversidad de pulsotipos, encontrándose dos cepas clonales de SAMR, aisladas desde médicos veterinarios, y dos cepas de *S. pseudintermedius* meticilino-susceptibles, aisladas desde caninos. Este fenómeno de diversidad en los pulsotipos está en concordancia con lo publicado por Gagetti *et al.* (2019), quienes analizan 10 cepas de SPMR aisladas en Argentina, tanto por PFGE como por MLST y describen una alta diversidad genética en dicho país. También Damborg *et al.* (2016) describen alta diversidad genotípica en las cepas de *S. pseudintermedius* aisladas desde caninos enfermos en Dinamarca y Kjellman *et al.* (2015) en cepas de *S. pseudintermedius* desde pacientes caninos sanos en Holanda. Debido a la mencionada diversidad, estos resultados no permiten inferir transmisión de estas cepas entre humanos y mascotas, pero es razonable esperar encontrar clones aumentando el número de cepas analizadas, así como lo describe Kotler *et al.* (2012), quienes analizaron 586 cepas de *S. aureus* y describen cepas de SAMR con pulsotipos de electroforesis indistinguibles en cuatro tutores y sus mascotas. Por lo anterior, es que recomendaciones como las de Damborg *et al.* (2016) referidas a concentrar medidas de higiene como lavado de manos entre pacientes y uso prudente de

antibióticos para prevenir la diseminación de cepas meticilino-resistentes entre pacientes son fundamentales tanto en nuestro medio como en cualquier escenario de atención veterinaria de pequeños animales.

Objetivo 5. Comparar los resultados con los cultivos históricos del Hospital Clínico Veterinario.

En los datos de cultivos históricos del hospital se observa un considerable aumento de resistencia en el tiempo para clindamicina, desde un 28,6% de resistencia en el primer periodo (2005-2009) pasando a ser resistentes todas las cepas estudiadas en el segundo periodo analizado (2010-2014). Este hecho, asociado al 33,3% de resistencia frente a este antimicrobiano en la presente tesis, es un resultado consistente con la recomendación de evitar el uso de este antibiótico de manera empírica frente a patologías en las que el principal germen responsable son cepas de *Staphylococcus*. El pioderma en el perro es una patología particularmente frecuente, y así como lo describe Loeffler y Lloyd (2018), el principal responsable son cepas de *S. pseudintermedius*, por lo que se considera inadecuado el uso empírico de clindamicina en estos casos, lo que se contrapone con las recomendaciones internacionales publicadas por Hillier *et al.* (2014).

En los resultados históricos del hospital, la mayoría de las veces no fue analizado el comportamiento frente a oxacilina, por lo que no es posible establecer claramente

un aumento de cepas meticilino-resistentes en el tiempo, pero al considerar el aumento de resistencia frente a β -lactámicos, tanto solos como potenciados con inhibidores de β -lactamasas, se podría estimar que en efecto existe un aumento de estas cepas en el tiempo, por lo que el cultivo previo a la terapia sistémica con antimicrobianos en casos de cepas de *Staphylococcus* es ampliamente recomendado. El aumento de aislamiento de cepas meticilino-resistentes en el tiempo ha sido documentado ampliamente en la literatura en diferentes lugares del mundo (Saputra *et al.*, 2017; Rahman *et al.*, 2018), así como en Chile, según lo reportado por el Ministerio de Salud para cepas de *S. aureus* (Medina *et al.*, 2013). Como la meticilino-resistencia se suele acompañar de otros determinantes genéticos de resistencia frente a diversos grupos de antimicrobianos, el eventual aumento de cepas meticilino-resistentes en el tiempo podría explicar también el leve aumento de la resistencia observada frente a quinolonas, aunque probablemente también juegue un papel importante la frecuencia de uso de este grupo de antimicrobianos, ya que es la segunda clase más prescrita por veterinarios de pequeños animales en Chile (Galarce *et al.*, 2021). Desafortunadamente, no existe datos oficiales sobre la utilización de antimicrobianos como en áreas de producción, aunque en esta línea, cabe destacar la formación de una mesa de trabajo de resistencia antimicrobiana en pequeños animales, de las que el autor y la co-tutora de esta tesis son parte (Galarce *et al.*, 2019). El objetivo de dicha mesa de trabajo es, entre otros, cautelar un uso prudente de antimicrobianos en la clínica de pequeños animales. En este sentido, es importante relevar que si bien existen varias alternativas de antimicrobianos para tratar infecciones por SMR, muchos de ellos no están autorizados para su uso en medicina veterinaria, como ceftarolina, vancomicina,

daptomicina o linezolid (Galarce *et al.*, 2021). Una diferencia importante entre la medicina humana y el abordaje veterinario es la duración de la terapia, que en humanos se recomienda por siete a 10 días para infecciones por *S. aureus* en la piel (Tylor y Unakal, 2022), mientras en medicina veterinaria se indica por al menos tres semanas la terapia frente a foliculitis por *S. pseudintermedius* (Hillier *et al.*, 2014), no habiendo evidencia científica clara respecto de cuál estrategia podría generar el mayor beneficio para el paciente. Independiente de lo anterior, evitar la terapia empírica a través de pruebas de susceptibilidad nunca está contraindicado (Hillier *et al.*, 2014), y se debe realizar toda vez que sea posible, ya que el manejo exitoso de la infección por SMR implica la identificación rápida del sitio infectado, el cultivo y las pruebas de susceptibilidad, el tratamiento basado en la evidencia y los protocolos preventivos apropiados (Nandhini *et al.*, 2022). Esta tesis pretende ser un aporte desde la medicina basada en la evidencia para el manejo de infecciones por *Staphylococcus* en el Hospital estudiado, buscando generar protocolos en el manejo de estas infecciones. El alto perfil de resistencia a los antibióticos de cepas de SAMR indica la necesidad de nuevas intervenciones, como vacunas y nuevos antibióticos (Nandhini *et al.*, 2022), mientras se desarrollan nuevas alternativas, el estudio del comportamiento local de las cepas de *Staphylococcus* es fundamental para lograr estrategias efectivas de tratamiento. Estrategias futuras incluyen el uso de nano moléculas con liberación controlada de antimicrobianos, considerar agentes biológicos basados en anticuerpos para infecciones graves, combinar tratamientos (considerando drogas sintéticas, naturales y medicinas naturales y buscar romper la biopelícula que generan algunas de estas especies (Nandhini *et al.*, 2022).

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES DE LA INVESTIGACIÓN

Luego del análisis de los resultados y de la literatura al respecto, se puede concluir lo siguiente:

1.- Se confirma la primera hipótesis, ya que los tutores, pacientes caninos, médicos veterinarios y superficies del hospital comparten diferentes especies de SCP, y algunas de ellas son resistentes a la metilina.

2.- Alto porcentaje de las cepas aisladas presenta resistencia a ampicilina, y un considerable número presenta resistencia a clindamicina.

3.- Todas las cepas metilino resistentes aisladas en el presente estudio portan el gen *mecA* como origen genético de dicha resistencia.

4.- Existe gran diversidad clonal entre las cepas de SCP aisladas en el presente estudio.

5.- No hay evidencia que sustente el uso de clindamicina como antimicrobiano de primera línea para patologías causadas por cepas de SCP en el hospital analizado.

Considerando los resultados expuestos se abre una línea de investigación hasta ahora inexplorada, posibilitando una serie de estudios futuros en este ámbito. Es fundamental seguir trabajando esta línea de investigación, preferentemente con un mayor número de individuos analizados, así como un análisis más profundo en la sensibilidad de estas cepas frente a vancomicina, considerada actualmente la alternativa más utilizada frente a cepas metilino resistentes en nuestro país en medicina humana.

Esta tesis pretende ser un insumo que aporte al uso responsable y consciente de antimicrobianos, tanto en medicina humana como veterinaria, adicionando información sobre el comportamiento y características de las cepas bacterianas circulantes en nuestro medio, específicamente a lo relacionado con el género *Staphylococcus*, que como ha sido descrito previamente, es el género bacteriano más común de encontrar en la piel de humanos y mascotas, tanto sanas como enfermas y los problemas de piel son la principal causa de uso de antimicrobianos. En esta línea, y en conjunto con otros esfuerzos (Galarce *et al.*, 2019) se busca brindar una línea de base para establecer futuras regulaciones y orientar el uso correcto de estos medicamentos en Chile, con la finalidad de controlar la aparición y propagación de bacterias resistentes a los antimicrobianos.

REFERENCIAS:

Acuña, M., Benadof, D., Jadue, C., Hormazabal, J., Alarcón, P., Contreras, J. y otros. (2015). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad (SARM-AC): Comunicación de los primeros 4 casos pediátricos descritos en Hospital de niños Roberto del Río. *Revista Chilena de Infectología* 32, 350-356.

Adiguzel, M., Schaefer, K., Rodriguez, T., Ortiz, J. y Sahin, J. (2022). Prevalence, mechanism, genetic diversity, and cross-resistance patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus* isolated from companion animal clinical samples submitted to a veterinary diagnostic laboratory in the midwestern United States. *Antibiotics* 11, 609-629.

Aguayo-Reyes, A., Quezada-Aguiluz, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo-Capurro, A., Bello-Toledo, H. y otros. (2018). Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Revista Chilena de Infectología* 35, 7-14.

Aires de Souza, M. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clinical Microbiology and Infection*. 23, 373-380.

Algammal, A., Hetta, H., Elkelish, A., Alkhalifah, D., Hozzein, W., Batiha, G. y otros. (2020). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infection and Drug Resistance*. 13, 3255-3265.

Anderson, M., Lefebvre, S. y Weese, S. (2008). Evaluation of prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel attending an international equine veterinary conference. *Veterinary Microbiology* 129, 410-417.

Araos, R., García, P., Chanqueo, L. y Labarca J. (2012). Daptomicina: características farmacológicas y aporte en el tratamiento de infecciones por cocáceas gram positivas. *Revista Chilena de Infectología*. 29, 127-131.

Aravena, C., Cáceres, J., Bastías, A., Opazo, J.F., Magna, Y., Saralegui, C. y otros (2021). Portación nasal, antibiograma y genotipo de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en estudiantes de Medicina y de Enfermería Campus San Felipe, Universidad de Valparaíso, Chile, durante el año 2017. *Revista Chilena de Infectología*. 38, 774-782.

Awosile, B., McClure, T., Saab, M. y Heider, L. (2018). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from cats and dogs from the Atlantic Provinces, Canada from 1994-2013. *Canadian Veterinary Journal*. 59, 885-893.

- Baig, S., Johannesen, T., Overballe-Petersen, S., Larsen, J., Larsen, A. y Stegger, M. (2018). Novel *SCCmec* type XIII (9^a) identified in an ST152 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*. 61, 74-76.
- Bannoehr, J., Franco, A., Iurescia, M., Battisti, A., y Fitzgerald, R. (2009). Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*. 47, 469-471.
- Bannoehr, J., Zakour, B., Waller, A., Guardabassi, L., Thoday, K., van den Broek, A. y otros. (2007). Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *Journal of Bacteriology*. 189, 8685-8692.
- Barbieri, J., Bhate, K., Hartnett, K., Fleming-Dutra, K., Margolis, D. (2018). Trends in oral antibiotic prescription in dermatology, 2008 to 2016. *JAMA Dermatology*. 155, 290-297.
- Bean, D. y Wigmore S. (2016). Carriage rate and antibiotic susceptibility of coagulase-positive staphylococci isolated from healthy dogs in Victoria, Australia. *Australian Veterinary Journal*. 94, 456-460.
- Beca, N., Bessa, L., Mendes, A., Santos, J., Leite-Martins, L., Matos, A. y otros. (2015). Coagulase-positive *Staphylococcus*: Prevalence and antimicrobial resistance. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 51, 365-371.
- Becker, K., Ballhausen, B., Köck, R. y Kriegeskorte, A. (2014). Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: The "mec alphabet" with specific consideration of *mecC*, a homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *International Journal of Medical Microbiology*. 304, 794-804.
- Beever, L., Bond, R., Graham, P., Jackson, B., Lloyd, D. y Loeffler, A. (2014). Increasing antimicrobial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* group bacteria and emergence of MRSP in the UK. *Veterinary Record*. 176, 172-179.
- Bell, B., Schellevis, F., Stobberingh, E., Goossens, H. y Pringle, M. (2014). A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infectious Diseases*. 14, 1-25.
- Bhooshan, S., Negi, V. y Khatri, P. (2020). *Staphylococcus pseudintermedius*: an undocumented, emerging pathogen in humans. *GMS Hygiene and infection control*. 15, 1-11.
- Bien, J., Sokoloba O. y Bozko P. (2011). Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: Novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. *Journal of Pathogens*. 2011, 1-14.

Börjesson, S., Gómez-Sanz, E., Ekström, K., Torres, C. y Grönlund, U. (2014). *Staphylococcus pseudintermedius* can be misdiagnosed as *Staphylococcus aureus* in humans with dog bite wounds. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease*. 34, 839-844.

Boost, M., O`donoghue, M. y James, A. (2007). Prevalence of *Staphylococcus aureus* carriage among dogs and their owners. *Epidemiology and Infection*. 136, 953-964.

Boost, M., So, S. y Perreten, V. (2009). Low rate of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococcal colonization of veterinary personnel in Hong Kong. *Zoonoses and Public Health*. 58, 36-40.

Borio, S., Colombo, S., La-Rosa, G., De Lucia, M., Damborg, P. y Guardabassi, L. (2015). Effectiveness of a combined (4% chlorhexidine digluconate shampoo and solution) protocol in MRS and non-MRS canine superficial pyoderma: a randomized, blinded, antibiotic-controlled study. *Veterinary Dermatology*. 26, 339-344.

Bouley, R., Kumarasiri, M., Peng, Z., Otero, L., Song, W., Suckow, M. y otros. (2015). Discovery of antibiotic €-3-(3-Carboxyphenyl)-2-(4-cyanostyryl)quinazolin-4(3H)-one. *Journal of American Chemical Society*. 137, 1738-1741.

Boye, K., Bartels, M., Andersen, I., Moller, J. y Westh, H. (2007). A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I-V. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 13, 725-727.

Bramble, M., Morris, D., Tolomeo, P. y Lautenbach, E. (2011). Potencial rol of pet animals in household transmission of methicillin-resistant *Saphylococcus aureus*: A narrative review. *Bector-Borne and Zoonotic Diseases*. 11, 617-620.

Brown, N., Goodman, A., Horner, C., Jenkins, A. y Brown, E. (2021). Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): updated guidelines from the UK. *JAC Antimicrobial Resistance*. 3, d1aa 114.

Bush, K. (2018). Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 62, e01076-18.

Carroll, K., Burnham, C. y Westblade, L. (2021). From canines to humans: Clinical importance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *PLoS Pathogens*. 17, e1009961.

Chambers H. y DeLeo F. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*. 7, 629–641.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2013). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; Approved Standards – Fourth Edition. VET01-A4.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; CLSI standard M02. 13th Edition.

Cong, Y., Yang, S. y Rao, X. (2020). Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *Journal of Advance Research*. 21, 169-176.

Cosimi, R., Beik, N., Kubiak, D. y Johnson, J. (2017). Ceftaroline for severe methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A systematic review. *Open Forum Infectious Diseases*. 4, ofs084.

Couto, N., Monchique, C., Belas, A., Marques, C., Gama, L. y Pomba, C. (2016). Trends and molecular mechanisms of antimicrobial resistance in clinical staphylococci isolated from companion animals over a 16-year period. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 71, 1479-1487.

Danborg, P., Moodley, A., Albaek, B., Ventrella, G., Pires do Santos, T. y Guardabassi, L. (2016). High genotypic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine infections in Denmark. *BMC Veterinary Research*. 12, 131-136.

Demerec, M. (1945). Production of *Staphylococcus* strains resistant to various concentrations of penicillin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 31, 16-24.

Devriese, L., Vancanneit, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C. y otros. (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase positive species from animal. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, 1569-1573.

Ditlove, J., Weidmann, P., Bernstein, M. y Massry, S. (1977). Methicillin nephritis. *Medicine*. 55, 483-491.

Drougka, E., Foka, A., Koutinas, C., Jelastopulu E., Giormezis, N., Farmaki, O. y otros. (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. *Preventive Veterinary Medicine*. 126, 190-198.

Duarte, F., Danelli, T., Tavares, E., Beltto, A., Kerbauy, G., Carvalho, C. y otros. (2018). Fatal sepsis caused by *mecA*-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: first report in a tertiary hospital of southern Brazil. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 25, 293-297.

- Esposito, S., Pennoni, G., Mencarini, V., Palladino N. Peccini, L. y Principi, N. (2019). Antimicrobial treatment of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*. 10, 849-859.
- Eyler, R. y Shvets, K. (2019). Clinical pharmacology of antibiotics. *Nephro pharmacology for the Clinician*. 14, 1080-1090.
- Fabri, F., Pinto, N., Ferreira, M., Rodrigues, R., Shinohara, D., Pereira, P. y otros. (2021). First report of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* in healthy dogs and their owners in southern Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*. 189, 105286.
- Febler, A., Schünemann, R., Kadlec, K., Hensel, V., Brombach, J., Murugaiyan, J. y otros. (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.
- Fisher, J. y Mobashery, S. (2016). β -lactam resistance mechanisms: Gram-positive bacteria and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 6: a025221.
- Frank, L. y Loeffler A. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. *Veterinary Dermatology*. 23, 283-291.
- Gagetti, P., Wattam, A., Giacoboni, G., De Paulis, A., Bertona, E., Corso A. y otra. (2019). Identification and molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from canine clinical samples in Argentina. *BMC Veterinary Research*. 15, 264-276.
- Galarce, N., Arriagada, G., Sánchez, F., Venegas, V., Cornejo, J. y Pincheira, D. (2021). Antimicrobial use in companion animals: Assessing veterinarian's prescription patterns through the first national survey in Chile. *Animals*. 11, 348.
- Galarce, N., Muñoz, L., Jara, M., Lubí, P., Sepúlveda, A. y Anticevic, S. (2016). Detección del gen *mecA* en cepas de *Staphylococcus coagulans* positiva aisladas desde gatos. *Revista Chilena de Infectología*. 33, 410-418.
- Galarce, N., Pavez, D. y Pinto, E. (2019). Intersectoral task force is established to face bacterial resistance in small animals. *Revista Chilena de Infectología*. 36, 245-246.
- García-Alvarez, L., Holden, M., Lindsay, H., Webb, C., Brown, D., Curran, M. y otros. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infectious Diseases*. 11, 595-603.

- Gómez-Sanz, E., Torres, C., Benito, D., Lozano, C. y Zarazaga, M. (2013 a). Animal and human *Staphylococcus aureus* associated clonal lineages and high rate of *Staphylococcus pseudintermedius* novel lineages in spanish kennel dogs: Predominance of *S. aureus* ST398. *Veterinary Microbiology*. 166, 580-589.
- Gómez-Sanz, E., Torres, C., Lozano, C. y Zarazaga, M. (2013 b) High diversity of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* lineages and toxigenic traits in healthy pet-owning household members. Underestimating normal household contact? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease*. 36, 83-94.
- Gómez, P., González-Barrio, D., Benito, D., García, J., Viñuela, J., Zaragoza, M. y otros. (2014). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying the *mecC* gene in wild small mammals in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69, 2061-2064.
- Greenberg, R., Wu, H., Maharaj, A., Cohen-Wolkowicz, M., Tomashek, K., Osborn, B. y otros. (2020). A pharmacoepidemiologic study of the safety and effectiveness of clindamycin in infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 39, 204-210.
- Gröntal, T., Eklund, M., Thomsom, K., Piiparinen, H., Sironen, T. y Rantala, M. (2017). Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and the molecular epidemiology of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in small animals in Finland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72, 1021-1030.
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J. y Wang Y. (2020). Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10, 107-118.
- Haenni, M., Alves de Moraes, N., Châtre, P., Médaille, C., Moodley, A. y Madec, J. (2014). Characterization of clinical canine methicillin-resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* in France. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2, 119-123.
- Hájek, V. (1976). *Staphylococcus intermedius*: a new species isolated from animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 26, 401-408.
- Hanselman, B., Kruth, S., Rousseau, J. y Wesse S. (2009). Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *Canadian Veterinary Journal*. 50, 954-958.
- Harrison, E., Weinert, L., Holden, M., Welch, J., Wilson, K., Morgan, F. y otros. (2014). A shared population of epidemic methicillin resistant *Staphylococcus aureus* 15 circulates in human and companion animals. *mBio*. 5, e00985-13.

- Hashemian, S., Ferhadi, T. y Ganjparvar, M. (2018). Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Design, Development and Therapy*. 12, 1759-1767.
- Heidary, M., Dohkt, A., Khoshnood, S., Javad, M., Soleimani, S. y Goudarzi, M. (2018). Daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 73, 1-11.
- Hillier, A., Lloyd, D., Weese, J., Blondeau, J., Boothe, D., Breitschwerdt, E. y otros. (2014). Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial guidelines working group of the international society for companion animal infectious diseases). *Veterinary Dermatology*. 25, 163-175.
- Hogan, P., Mork, R., Boyle, M., Muenks, C., Morelli, J., Thompson, R. y otros. (2018). Interplay of personal, pet, and environmental colonization in households affected by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infection*. 78, 200-207.
- Hososaka, Y., Hnaki, H., Endo, H., Suzuki, Y., Nagasawa, Z., Otsuka, Y. y otros. (2007). Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 13, 79-86.
- Ishihara, K., Shimokubo, N., Sakagami, A., Ueno, H., Muratsu, Y., Kadosawa, T. y otros. (2010). Occurrence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in an academic veterinary hospital. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 76, 5165-5174.
- Janardhanan, J., Bouley, R., Martinez-Caballero, S., Peng, Z., Batuecas-Mordillo, M., Meisel, J. y otros (2019). The quinazolinone allosteric inhibitor of PBP 2a synergizes with piperacillin and tazobactam against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 63, e02637-18.
- Jang, Y., Bae, D., Cho, JK., Bahk, G., Lim, S. y Lee, Y. (2014). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from dogs in Korea. *Japanese Journal of Veterinary Research*. 62, 163-170.
- Jayakumar, J., Kumar, V., Biswas, L. y Biswas, R. (2020). Therapeutic applications of lysostaphin against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. 131, 1072-1082.
- Juayang, A., de los Reyes, G., de la Rama, A. y Gallego, C. (2014). Antibiotic resistance profiling of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens in a tertiary hospital from 2010-2012. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Disease*. 2014, 1-4.

- Kadlec, K., Weib, S., Wendlandt, S., Schwartz, S. y Tonpitak, W. (2016). Characterization of canine and feline methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from Thailand. *Veterinary Microbiology*. 194, 93-97.
- Kaspar, U., Lützu, A., Schlattmann, A., Roesler, U., Köck, R., y Becker, K. (2018). Zoonotic multidrug-resistant microorganisms among small companion animals in Germany. *PLoS ONE*. 13, e0208364.
- Katakweba, A., Muhairwa, A., Espinosa-Gongora, C., Guardabassi, L., Mtambo, M. y Olsen, J. (2016). *spa* typing and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* from healthy humans, pigs and dogs in Tanzania. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 10, 143-148.
- Kjellman, E., Slettemeas, J., Small, H. y Sunde, M. (2015). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from healthy dogs in Norway – occurrence, genotypes and comparison to clinical MRSP. *Microbiology Open*. 4, 857-866.
- Kmieciak, W. y Scewczyk, E. (2018). Are zoonotic *Staphylococcus pseudintermedius* strains a growing threat for humans? *Folia Microbiologica*. 63, 743-747.
- Knox, J., Uhlemann, A.-C. y Lowy, F. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Transmission within households and the community. *Trends in Microbiology*. 23, 437-444.
- Kottler, S., Middleton, J.R, Perry, J., Weese J. y Cohn, L. (2012). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in three populations. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 24, 132-139.
- Larsen, R., Boysen, L., Jessen, L., Guardabassi, L. y Damborg, P. (2018). Diversity of *Staphylococcus pseudintermedius* in carriage sites and skin lesions of dogs with superficial bacterial folliculitis: potential implications for diagnostic testing therapy. *Veterinary Dermatology*. 29, 291-297.
- Latronico, F., Moodley, A., Nielsen, S. y Guardabassi, L. (2014). Enhanced adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* sequence type 71 to canine and human corneocytes. *Veterinary Research*. 45, 70-77.
- Lee, J., Murray, A., Bendall, R., Gaze, W., Zhang, L. y Vos, M. (2015). Improved detection of *Staphylococcus intermedius* group in a routine diagnostic laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 53, 961-963.
- Lehner, G., Linek, M., Bond, R., Lloyd, D., Prenger-Berninghoff, E., Thom, N. y otros. (2014). Case-control risk factor study of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) infection in dogs and cats in Germany. *Veterinary Microbiology*. 168, 154-160.

- Li, L., Ge, H., Gu, D., Meng, H., Li, Y., Jia, M. Y otros. (2018). The role of two-component regulatory system in β -lactam antibiotics resistance. *Microbiological Research*. 215, 126-129.
- Lima, L., Monteiro, B., Barbosa, G. y Barreiro, E. (2021). B-Lactam antibiotics: an overview from a medicinal chemistry perspective. *Medicinal Chemistry*. 208, 112829.
- Liu, J., Chen, D., Peters, B., Li, L., Li, B., Xu, Z. y otro. (2016). Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (*SCCmec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*. 101, 56-67.
- Loeffler, A. y Lloyd, D.H. (2018). What has changed in canine pyoderma? A narrative review. *The Veterinary Journal*. 235, 73-82.
- Loncaric, I., Tichy, A., Handler, S., Szostak, M., Tickert, M., Diab-Elschahawi, M. y otros. (2019). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus* sp. (MRS) in different companion animals and determination of risk factors for colonization with MRS. *Antibiotics*. 8, 1-9.
- Lloyd, D. y Page, S. (2018). Antimicrobial stewardship in veterinary medicine. *Microbiology Spectrum*. 6, 23-25.
- Majhi, S., Dash, M., Mohapatra, D., Mohapatra, A. y Chayani, N. (2016). Detection of inducible and constitutive clindamycin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates in a tertiary care hospital, Eastern India. *Avicenna Journal of Medicine*. 6, 75-80.
- Manian, F. (2003). Asymptomatic nasal carriage of mupirocin resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in a households contacts. *Clinical Infectious Diseases*. 36, 26-28.
- Marcy, M. y Klein, J. (1970). The isoxazolyl penicillins: Oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin. *Medical Clinics of North America*. 54, 1127-1143.
- McCarthy, A., Lindsay, J. y Loeffler, A. (2012). Are all methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) equal in all hosts? Epidemiological and genetic comparison between animal and human MRSA. *Veterinary Dermatology*. 23, 267-275.
- McDougal, L., Steward, C., Killgore, G., Chaitram, J., McAllister, S. y Tenover, F. (2003). Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: Establishing a national database. *Journal of Clinical Microbiology*. 41, 5113-5120.
- McEwen, S. y Collignon, P. (2018). Antimicrobial Resistances: a One Health perspective. *Microbiology Spectrum*. 6, 0009-2017.

Medina, G., Egea, A.L., Otth, C., Otth, L., Fernandez, H., Bocco, L. y otros. (2013). Molecular epidemiology of hospital-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in southern Chile. *European Journal of Clinical Microbiological Infections Diseases*. 32, 1533-1540.

Menandro, M.L., Dotto, G., Mondin, A., Martini, M., Ceglie, L. y Pasotto, D. (2019). Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from symptomatic companion animals in northern Italy: Clonal diversity and novel sequence types. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 66, 101331.

Messenger, A., Barnes, A. y Gray, G. (2014). Reverse zoonotic disease transmission (zooanthroposis): A systematic review of seldom-documented human biological threats to animals. *PLoS ONE*. 9, 1-9.

Milheirico, C., de Lencastre, H. y Tomasz, A. (2016). Full-genome sequencing identifies in the genetic background several determinants that modulate the resistance phenotype in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying the novel *mecC* gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 6, e02500-16.

Miragaia, M. (2018). Factors contributing to the evolution of *mecA*-mediated β -lactam resistance in staphylococci: Update and new insights from whole genome sequencing (WGS). *Frontiers in Microbiology*. 9, 2723-2739.

Montoya C, I., Mira O, M., Alvarez A, I., Cofre G, J., Cohen V, J., Donoso W, G. y otros. (2009). Resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus aureus* metilino resistente. *Revista Chilena de Pediatría*. 80, 48-53.

Moodley, A., Damborg, P. y Nielsen, S. (2014). Antimicrobial resistance in methicillin susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of canine origin: Literature review from 1980 to 2013. *Veterinary Microbiology*. 171, 337-341.

Moon, B., Youn-Hoo, J., Shin, S., Hwang, S. y Park, Y. (2012). Genetic and phenotypic characterization of methicillin-resistant staphylococci isolated from veterinary hospitals in South Korea. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 24, 489-498.

Muñoz, L., Molina, M., Heresmann, M., Abusleme, F., Ulloa, M., Borie, C. y otros. (2012). Primer reporte de aislamiento de *Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans* en perros con pioderma y otitis externa en Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 44, 261-265.

Murray, A., Lee, J., Bendall, R., Zhang, L., Sunde, M., Slettemeas, J. y otros. (2018). *Staphylococcus cornubiensis* sp. Nov., a member of the *Staphylococcus intermedius*

group (SIG). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 68, 3404-3408.

Nagasundaram, N. y Sistla, S. (2019). Existence of multiple *SCCmec* elements in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*. 68, 720-727.

Nandhini, P., Kumar, P., Mickymaray, S., Aothaim, A., Somasundaram, J. y Rajan, M. (2022) Recent developments in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) treatment: A review. *Antibiotics*. 11, 606-627.

Narayan, P., Damborg, P. y Guardabassi, L. (2014). Dam-to-offspring transmission of persistence of *Staphylococcus pseudintermedius* clones with dogs families. *Veterinary Dermatology*. 25, 3-9.

Neradova, K., Jakubu, V., Pomorska, K. y Zemlickova, H. (2020). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in veterinary professionals in 2017 in the Czech Republic. *BMC Veterinary Research*. 16, 4-10.

Ngassam, C., Duprez, J., Lucas, P., Blanchard, Y., Boyen, F., Haesebrouck, F. y otros. (2021). Comparison of the staphylococcal chromosome cassette (SCC) *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and non-*aureus* staphylococci (MRNAS) from animals and humans. *Antibiotics*. 10, 256-266.

Noriega , L., Gonzalez, P., Hormazabal, J., Pinto , C., Canals, M., Munita, J. y otros. (2008). *Staphylococcus aureus* comunitario resistente a cloxacilina: Comunicación de los primeros 5 casos descritos en Chile. *Revista Médica de Chile*. 136, 885-891.

O'Reilly, L. (2011). A method for overcoming DNA degradation during PFGE for *Serratia marcescens*. *Journal of Microbiological Methods*. 85, 173-174.

One Health High Level Expert Panel (OHHLEP): Adisasmito, W., Almuhairi, S., Behravesh, C., Bilivogui, P., Bukachi, S. y otros (2022): One Health: A new definition for a sustainable and healthy future. *PLoS Pathogens*. 18: e1010537.

Ortega, C., Gonzalez , L., Yaquich, P., Alfaro, M., Cares, C., Navia, M. y otros. (2001). Estudio de portación nasal de *Staphylococcus aureus* en estudiantes de medicina de la Universidad de Santiago de Chile. *Clínica y Ciencia*. 1, 1-5.

Palskill, T. (2013). Metallo- β -lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Science*. 1277, 91-104.

Pantosti, A. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. *Frontiers in Microbiology*. 3, 1-12.

- Parte, A., Sardà-Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J., Reimer, L. y Göker, M. (2020). List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70, 5607-5612.
- Paterson, G., Harrison, E. y Holmes M. (2014). The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*. 22, 42-47.
- Paul, N., Moodley, A., Ghibaud, G. y Guardabassi, L. (2011). Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: Indirect evidence of zoonotic transmission. *Zoonoses and Public Health*. 58, 533-539.
- Perreten, V., Kania, S. y Bemis D. (2020). *Staphylococcus ursi* sp. Nov., a new member of the *Staphylococcus intermedius* group` isolated from healthy black bears. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70, 4637-4645.
- Petinaki, E. y Spiliopoulou, I. (2015). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection risks from companion animals: current perspectives. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 6, 373-382.
- Pires dos Santos, T., Damborg, P., Moodley, A. y Guardabassi, L. (2016). Systematic review on global epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: Inference of population structure from multilocus sequence typing data. *Frontiers in Microbiology*. 7, 1599-1611.
- Platzer, L., Aranís, C., Beltrán, C., Fonseca, X. y García, P. (2010). Colonización nasal bacteriana en población sana de la ciudad de Santiago de Chile: ¿Existe portación de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente comunitario? *Revista de Otorrinolaringología*. 70, 109-116.
- Pomba, C., Rantala, M., Greko, C., Baptiste, K., Catry, B., van Duilkeren, E. y otros. (2016). Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72, 957-968.
- Quitoco, I., Ramundo, M., Silva-carvalho, M., Souza, R., Beltrame, C., de Oliveira, T. y otros. (2013). First report in South America of companion animal colonization by the USA1100 clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ST30) and by the European clone of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (ST71). *BMC Research Notes*. 6, 336-342.
- Rahman, M., Amin, K., Rahman, S., Khair, A., Rahman, M., Hossain, A. y otros. (2018). Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among clinical isolates from humans and animals by culture methods and multiplex PCR. *BMC Veterinary Research*. 14, 300-306.

Ramos-Martín, V., Johnson, A., McEntee, L., Farrington, N., Padmore, K., Cojutti, P. y otros. (2017). Pharmacodynamics of teicoplanin against MRSA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72, 3382-3389.

Rana, E., Islam, M., Das, T., Dutta, A., Ahad, A., Biswas P. y otro. (2022). Prevalence of coagulase-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs in Bangladesh. *Veterinary Medicine and Science*. 8, 498-508.

Rodrigues, A., Belas, A., Marques, C., Cruz, L., Gama, L. y Pomba, C. (2017). Risk factors for nasal colonization by methicillin-resistant staphylococci in healthy humans in professional daily contact with companion animals in Portugal. *Microbial Drug Resistance*. 24, 434-446.

Roken, M., Iakhno, S., Haaland, A., Wasteson, Y. y Bjelland, A. (2022). Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. from infected dogs to the home environment and owners. *Antibiotics*. 11, 637-650.

Rosenblatt, J., Kind, A., Brodie, J., Kirby, W. (1968). Mechanisms responsible for the blood level differences of isoxazolyl penicillins. *Archives of Internal Medicine*. 121, 345-348.

Rossi, C., Oliveira, A. y Giambiagi-deMarval, M. (2019). CRISPR tracking reveals global spreading of antimicrobial resistance genes by *Staphylococcus* of canine origin. *Veterinary Microbiology*. 232, 65-69.

Saputra, S., Jordan, D., Worthing, K., Norris, J., Wong, H., Abraham, R. y otros. (2017). Antimicrobial resistance in coagulase-positive staphylococci isolated from companion animals in Australia: A one year study. *PLoS ONE* 12, e01763709.

Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S. y Hiramatsu, K. (2007). Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 45, 2770-2778.

Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirota, S. y otros. (2010). Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 48, 765-769.

Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Ohtsuka, M., Isamu, H., Fukata, T. y otros. (2012). Population genetic structures of *Staphylococcus aureus* isolates from cats and dogs in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 50, 2152-2155.

Sato, T., Usui, M., Maetani, S. y Tamura, Y. (2018). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinary staff in small animal hospitals in Sapporo, Japan, between 2008 and 2016: A follow up study. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 24, 588-591.

Sharkey, L., Edwards, T. y O'Neill, A. (2016). ABC-F proteins mediate antibiotic resistance through ribosomal protection. *American Society for Microbiology*. 7, e01975-15.

Singh, S., Qureshi, A. y Hassan, W. (2021). Mechanisms of action by antimicrobial agents: A review. *McGill Journal of Medicine*. 19, 4.

Somayaji, R., Priyantha, M., Rubin, J. y Church, D. (2016). Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonoses of canine origin: report of 24 cases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 85, 471-476.

Sorensen, A., Toft, N., Boklund, A., Espinosa-Gongora, C., Graesboll, K., Larsen, J. y otro. (2017). A mechanistic model for spread of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) within a pig herd. *PLoS ONE*. 12, e0188429.

Tarazi, Y., Almajali, A., Ababneh, M., Ahmed, H. y Jaran, A. (2015). Molecular study on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from dogs and associates personnel in Jordan. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5, 902-908.

Taylor, T. y Unakal, C. (2022). *Staphylococcus aureus*. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. [Updated 2022 Jul 18].

Tooke, C., Hinchliffe, P., Bragginton, E., Colenso, C., Hirvonen, V., Takebayashi, Y. y otro. (2019). β -lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st century. *Journal of Molecular Biology*. 431, 3472-3500.

Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T. y Hiramatsu, K. (2010). Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin-resistant in staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54, 4352-4359.

Van Duijkeren, E., Wolfhagen, M., Box, A., Heck, M., Wannet, W. y Fluit, A. (2004). Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*. 10, 2235-2237.

Van Duijkeren, E. (2008). Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* between humans and animals. *Veterinary Microbiology*. 128, 213-215.

Van Duijkeren, E., Catry, B., Greko, C., Moreno, M., Pomba, C., Pyörälä, S. y otros. (2011). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66, 2705-2714.

- Vega, F., Alarcón, P., Dominguez, M., Bello, H., Riedel, G., Mella, S. y otros (2015). Aislamiento de *Staphylococcus aureus* hetero-resistente a vancomicina en Hospital Clínico Regional de Concepción, Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 32, 588-590.
- Ventrella, G., Moodley, A., Grandolfo, E., Parisi, A., Corrente, M., Bounavoglia, D. y otro. (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. *Veterinary Microbiology*. 211, 103-106.
- Viegas, F., Santana, J., Silva, B., Clark, R., Bonisson, C., Sette, J. y otros (2022). Occurrence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. in diseased dogs in Brazil. *PLoS ONE*. 17, e0269422.
- Vigo, G., Giacoboni, G., Gagetti, P., Pasterán, F. y Corso, A. (2015). Resistencia antimicrobiana y epidemiología molecular de aislamientos de *Staphylococcus pseudintermedius* de muestras clínicas de caninos. *Revista Argentina de Microbiología*. 47, 206-211.
- Vincze, S., Brandenburg, A., Espelage, W., Stamm, I., Wieler, L., Kopp, P. y otros. (2014). Risk factors for MRSA infection in companion animals: Results from a case-control study within Germany. *International Journal of Medical Microbiology*. 304, 787-793.
- Walther B., Hermes, J., Cuny, C., Wieler, L., Vincze, S., Elnaga, Y. y otros. (2012). Sharing more than friendship - nasal colonization with coagulase-positive staphylococci (CPS) and co-habitation aspects of dogs and their owners. *PLoS ONE*. 7, e35197.
- Wang, N., Neilan, A. y Klompas, M. (2013). *Staphylococcus intermedius* infections: Case report and literature review. *Infectious Disease Reports*. 5, 6-11.
- Wedley, A., Dawson, S., Maddox, T., Coyne, K., Pinchbeck, G., Clegg, P. y otros. (2014). Carriage of *Staphylococcus* species in the veterinary visiting dog population in mainland UK: Molecular characterization of resistance and virulence. *Veterinary Microbiology*. 170, 81-88.
- Werner, G., Strommenger, B. y Witte, W. (2008). Acquired vancomycin resistance in clinically relevant pathogens. *Future Medicine*. 3, 547-562.
- Wertheim, H., Walsh, E., Choudhury, R., Melles, D., Boelens, H., Miajlovic, H. y otros. (2008). Key rol of clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans. *PLoS Medicine*. 5, 104-112.
- Weese, S., Faires, M., Frank, L., Reynolds, L. y Battisti, A. (2012). Factors associated with methicillin-resistant versus methicillin susceptible *Staphylococcus*

pseudintermedius infection in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 240, 1450-1455.

Weese, S. y Lefebvre, S. (2007). Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in horses admitted to a veterinary teaching hospital. *Canadian Veterinary Journal*. 48, 921-926.

Weese, S. y van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. 140, 418-429.

Wildermuth, B., Griffin, C., Rosenkrantz, W. y Boord, M. (2007). Susceptibility of *Pseudomonas* isolates from the ears and skin of dogs to enrofloxacin, marbofloxacin, and ciprofloxacin. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 43, 337-341.

Wilson, M., Otth, C., Medina, G., Otth, L., Fernández, H., Arce, M. y otros. (2007). Genotipos de *Staphylococcus aureus* con fenotipo metilino resistente, aislados de pacientes del hospital base de Valdivia. *Revista Médica de Chile*. 135, 596-601.

Wu, M., Burnham, A., Westblade, F., Dien Bard, J., Lawhon, D., Wallace, M. y otros. (2016). Evaluation of oxacillin and cefoxitin disk and MIC breakpoints for prediction of methicillin resistance in human and veterinary isolates of *Staphylococcus intermedius* group. *Journal of Clinical Microbiology*. 54, 535-542.

Yarbrough, M., Lainhart, W. y Burnham, C. (2018). Epidemiology, clinical characteristics, and antimicrobial susceptibility profiles of human clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* group. *Journal of Clinical Microbiology*. 56, e01788-17.

Zakour, B., Guinane, C. y Fitzgerald, R. (2008). Pathogenomics of the staphylococci: insights into niche adaptation and the emergence of new virulent strains. *Federation of European Microbiological Societies*. 289, 1-12.

Zhang, W., Hao, Z., Wang, Y., Cao, X., Logue, C., Wang, B. y otros. (2011). Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and veterinary staff in China. *The Veterinary Journal*. 190, e125-129.

PRODUCTOS:

Esta tesis generó una publicación en la Revista Argentina de Microbiología, denominada “*Characterization and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive Staphylococcus isolated in a veterinary teaching hospital in Chile*” publicada en el volumen 54 entre las páginas 192 y 202.

Además, con los resultados de este trabajo se generó un Protocolo de abordaje de foliculitis superficial en pacientes caninos para el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, sede Bilbao (Anexo 4). El protocolo integra indicaciones para los laboratorios que realizan los cultivos como para los clínicos del Hospital.

Anexo 1: Consentimiento Informado

Este consentimiento informado se dirige a propietarios/tutores de perros que son atendidos en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile, y que se les invita a participar en la investigación: **“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Staphylococcus* COAGULASA POSITIVOS AISLADOS DESDE PERROS, PROPIETARIOS, VETERINARIOS Y EQUIPOS DEL HOSPITAL CLINICO VETERINARIO DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE”**, que dará el título de Doctorado en Farmacología de la Universidad de Chile a su investigador principal, el Médico Veterinario Francisco Abusleme Garay.

Parte 1: Información.

Yo soy Francisco Abusleme, y trabajo en dermatología en este hospital. Estamos investigando si existe transmisión de las bacterias de la piel del perro a propietarios y/o Médicos Veterinarios. Le voy a dar la información y lo voy a invitar a participar de esta investigación. Antes de tomar la decisión, puede hablar con alguien con quien se sienta cómodo sobre la investigación. Puede que haya algunas palabras que no entienda, por favor me para según le informo para darme el tiempo de explicarle. Si tiene preguntas en cualquier momento puede preguntarme.

En la piel del perro normalmente viven bacterias, así como en nuestra piel. El presente estudio busca averiguar si el contacto frecuente con mascotas hace que esas bacterias pasen del perro al humano o viceversa.

Estamos invitando a todos los propietarios de perros sanos que asistan al Hospital, para participar en la presente investigación. Esta investigación incluirá una única toma de muestra desde su nariz, y 2 tomas de muestra desde su perro, una del oído y otra desde la zona perianal.

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo. Tanto si elige participar o no, continuarán todos los servicios a los que tiene derecho en el Hospital, no cambiará nada.

Extraeré una muestra con una tórula desde su nariz, si se siente incómodo, le puedo explicar como hacerlo para que lo realice usted. Luego tomaré 2 muestras desde su perro, una de la nariz y la otra de la zona perianal, las muestras serán llevadas al Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias para su procesamiento.

La investigación durará aproximadamente 24 meses. Durante este tiempo usted no necesita asistir al Hospital, solo necesitamos la primera muestra.

No existe efectos secundarios, riesgos ni molestias asociadas a la participación. Puede que no halla beneficio para usted, pero es probable que su participación nos ayude a encontrar una respuesta a la pregunta de investigación. No existe incentivos por la participación (dinero ni regalos).

No compartiré la identidad de las personas que participen en la investigación. La información se mantendrá confidencial. La información sobre usted tendrá un número en vez de su nombre. Solo los investigadores sabrán cuál es su número y se mantendrá la información en forma segura.

Los resultados obtenidos de esta investigación serán publicados en revistas científicas para que personas interesadas puedan aprender de nuestra investigación.

Usted no tiene porque participar en esta investigación, si no desea hacerlo el negarse a participar no le afectará en ninguna forma, usted tendrá todos los beneficios y derechos en el Hospital.

Si tiene cualquier pregunta puede hacerlas ahora o más tarde, incluso después de haberse iniciado el estudio. Si desea hacer preguntas mas tarde me puede contactar por correo electrónico o personalmente en el Hospital.

Parte 2: Formulario de Consentimiento

He sido invitado a participar en la investigación sobre transmisión de bacterias entre perros y humanos.

Entiendo que se me tomará una muestra desde la nariz y se le tomarán 2 muestras a mi perro, y he sido informado que no existe riesgos. Sé que puede que no haya beneficios para mi persona y que no se me compensará de ninguna manera.

Se me ha proporcionado el nombre del investigador, que puede ser fácilmente contactado al correo: fabusleme@gmail.com , o en este Hospital. (Av. Francisco Bilbao 2854, Providencia, Santiago).

Me leyeron la información y he tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado todas las preguntas satisfactoriamente.

Consiento voluntariamente participar en esta investigación como participante y entiendo que tengo derecho a no participar si no quiero.

Nombre del Participante _____

Mascota: _____

Firma del Participante _____

Fecha _____

He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas.

Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del Investigador _____

Firma del Investigador _____

Fecha _____

Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de Consentimiento Informado

Anexo 2:



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Comité de Bioética Animal

Santiago, 12 de abril de 2016

CERTIFICADO N° 07-2016

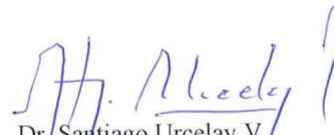
En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, y teniendo a la vista la metodología del Proyecto de Tesis Doctoral: **“Caracterización molecular de cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivo aislados desde perros, propietarios, veterinarios y equipos del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile”**. Este comité extiende el presente certificado para ser presentado a CONICYT por el Sr. Francisco Abusleme, estudiante de Doctorado y patrocinado por el Dr. Gerardo González-Rocha.

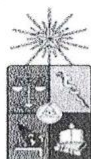
De acuerdo a los detalles contenidos en el Formulario para obtención de certificado de Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, este Comité certifica que el Proyecto satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité, y se ajusta a la legislación chilena vigente sobre la materia, incluida la Norma NCh 324-2011.

A este respecto el Comité entiende que se tomarán muestras de caninos, previo consentimiento de sus dueños, los cuales continuarán dentro su manejo normal una vez terminado el procedimiento y de acuerdo a lo estipulado en el formulario.


Dra. Tamara Tadich G.
Director
Comité de Bioética Animal




Dr. Santiago Urcelay V.
Presidente
Comité de Bioética Animal



UNIVERSIDAD DE CHILE
COMITÉ INSTITUCIONAL de CUIDADO y USO de ANIMALES (CICUA)

PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES
(Debe ser presentado en español)

Uso Interno
Investigador: Francisco Abusleme
Código CICUA: 07-2016

A. ANTECEDENTES ADMINISTRATIVOS

A.1. Título y tiempo de ejecución del proyecto presentado (mes y año de inicio y término).
Caracterización molecular de cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivo aislados desde perros, propietarios, veterinarios y equipos del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile.
Marzo 2016-Diciembre 2017.

A.2. Tipo de proyecto y actividad (marque con una cruz)

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:	DOCENCIA:	TESIS: X	OTRO:
Fuente Financiamiento (Nombre y n°):	Programa Doctorado nacional Conicyt 21141033 Farmavet		

A.3. Nombre del Investigador Responsable: Gerardo González-Rocha
Nombre Patrocinado, si existiese (Investigador externo, Postdoctorante, Tesista): Francisco Abusleme G.

A.4. Teléfono(s) de contacto: 99182533 **Fax:**
e-mail: fabusleme@gmail.com

A.5. Mencione el Laboratorio y Departamento de la Facultad en la que se desarrollará el trabajo con animales (si el trabajo lo realizará en más de un Laboratorio o Unidad debe especificarlo)
Hospital Clínico Veterinario, Universidad de Chile, sede Bilbao

A.6. Contacto en caso de una emergencia con los animales en horario no laboral.
Nombre: Francisco Abusleme **Teléfono:** 99182533

A.7. Listado de personas autorizadas para el manejo de los animales. Indique su capacitación (técnico, bioterista, tesista, postdoctorante, investigador, académico, etc.) y la función directa que realizará en el manejo de los animales (ej. Aseo, inoculación de animales, cirugías, etc) y vínculo con el Laboratorio. Incorpore las filas que sean necesarias. **NO OLVIDE** que debe comunicar oportunamente si se produce un cambio en el listado presentado a continuación (agregue cuantas filas sean necesarias).

NOMBRE	CAPACITACIÓN	FUNCIÓN	FILIACIÓN	VÍNCULO
Francisco Abusleme	Médico Veterinario	Toma de muestras	Hospital Clínico Veterinario, Universidad de Chile, sede Bilbao	Investigador Médico Veterinario especialista en dermatología



B. ANTECEDENTES DE LOS ANIMALES A UTILIZAR

B.1. Especie(s), raza, cepa, y línea transgénica (si aplica) utilizada(s):
Pacientes caninos

B.2. Edad/Estado de desarrollo
Cualquiera

B.3. Peso:
Cualquiera

B.4. Sexo:
Ambos sexos

B.5. Indique el origen de los animales (lugar de procedencia)
Pacientes que asisten al Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile, sede Bilbao

B.6. Indique el lugar de los procedimientos y la superficie disponible para animales vivos (ya sea en el bioterio o fuera de él):
Consultas de atención clínica del Hospital

B.7. Señale el número total de animales a utilizar en el proyecto (Señale además si se compartirán animales con otro proyecto. El desglose por objetivos se debe incluir en la sección C.5):
40 pacientes

B.8. Señale el método(s) de identificación de él o los animale(s)
Ficha clínica del Hospital

B.9. Si procede, remita el certificado de SAG o institución que autoriza el uso y/o traslado de los animales si es que el lugar de obtención de los animales es distinto del lugar de mantención. Describa detalladamente las condiciones de traslado de los animales y la(s) persona(s) responsable(s) del traslado.

No aplica



C. PROPÓSITOS DE LA INVESTIGACIÓN

C.1. Señale el o los propósito(s) principal(es) del Proyecto en un párrafo no superior a 12 líneas. Éstos deben ser explicados de manera que sean comprensibles para el ciudadano común. Además, la relevancia del proyecto debe quedar claramente señalada para cualquier evaluador éticista.

El proyecto pretende hacer un análisis de las cepas bacterianas presentes en la piel de los perros sanos correspondientes al género *Staphylococcus*, analizando su especie, comportamiento frente a antibióticos y características moleculares. El mismo análisis se realizará a cepas aisladas desde los veterinarios del Hospital y propietarios de las mascotas, así como de diversos equipos médicos del Hospital (jaulas, mesas quirúrgicas y consultas). De éste análisis se pretende investigar si existe cepas de diferentes hospederos que sean clones, es decir, que tienen un origen común, para determinar si existe transmisión de éstas cepas entre humanos, mascotas y equipos. A su vez, con la información obtenida se pretende averiguar si el criterio terapéutico actual para tratar a pacientes con infecciones por éstas cepas es correcto, toda vez que se analiza su comportamiento frente a diversos antibióticos y las cepas de pacientes sanos son los más probables causantes de enfermedad. Finalmente se pretende averiguar si los pacientes sanos están portando cepas de *Staphylococcus* meticilino resistentes, característica que les otorga resistencia a una diversidad de antibióticos. Esta información es de vital importancia para tener una visión de la situación actual en nuestro Hospital.

C.2. Justifique el uso de ANIMALES, en vez de usar modelos alternativos.

Por modelos alternativos se entienden aquellos que reemplacen la utilización de animales vertebrados. Indique los motivos por los cuales no se plantea aplicar un método alternativo al procedimiento propuesto.

No existen modelos que permitan obtener la información que se busca determinar con el presente proyecto.



**C.3. Explique las características que justifiquen el uso de esta(s) ESPECIE(s).
Indique la especie y raza (o cepa) que se propone utilizar y los motivos de esta selección.**

El presente proyecto busca evaluar si existe transmisión entre cepas de caninos y sus propietarios y/o médicos veterinarios, por lo que necesariamente se debe muestrear pacientes caninos.

C.4. Justifique estadística y/o bibliográficamente el número de animales a utilizar por cada uno de los objetivos del estudio. Recuerde que de acuerdo a las normas internacionales de bioética animal, se debe utilizar el mínimo de animales necesario para obtener resultados válidos Aplicar el principio de las 3 Rs: Reemplazar animales por otro sistema (ej. in vitro); Reducir número de animales; Refinar los procedimientos realizados.

El presente estudio es un estudio descriptivo. Se pretende trabajar con 50 cepas, 20 de ellas obtenidas desde caninos. Diversos estudios orientados a caracterizar la prevalencia de *Staphylococcus* en la piel del perro concluyen que alrededor de 50% de ellos lo portan en la piel, por lo que se pretende muestrear 40 pacientes caninos.



D. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL EXPERIMENTO

D.1. Enumere la secuencia de TODOS los procedimientos a seguir con los animales. Explique el curso temporal en los procedimientos crónicos. El detalle de procedimientos no quirúrgicos (manipulación y administración de sustancias) debe incluirse en la Sección E. El detalle de los procedimientos quirúrgicos debe incluirse en la Sección F.

A los pacientes caninos que asistan al Hospital clínico veterinario de la Universidad de Chile, sede Bilbao, que se encuentren sanos (vacunas y controles sanos) se les tomará 2 muestras previo consentimiento de su dueño. Una de ellas de la nariz y otra de la mucosa perianal. El estado de salud de los pacientes será evaluado por un Médico Veterinario del Hospital, y la muestra se tomará posterior a la firma de un consentimiento informado por parte del propietario.

No se requiere una segunda toma de muestra ni seguimiento del paciente, por lo que solo se necesita una visita del paciente al Hospital para paerticipar del estudio.

D.2. Describa el o los criterios de interrupción del trabajo con los animales durante el experimento. (Incluya en su descripción el procedimiento esperado de finalización y las circunstancias en que el experimento será interrumpido para evitar sufrimientos innecesarios al animal. Si su protocolo incluye experimentos crónicos con inducción de patologías, indique explícitamente en qué momento se eutanasiarán los animales y el grado de compromiso de bienestar general, que se espera en esas condiciones).

En esta sección usted debe usar como guía los **protocolos de supervisión modificados** de Morton y Griffiths (Veterinary Record, 116: 431-36, 1985) según corresponda, establecidos en los **Anexos II y III**. Puede modificarlo según las condiciones del estudio y las características de su modelo animal.

No aplica



**E. PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS
(MANIPULACIÓN DEL ANIMAL Y ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS)**

E.1. Identifique y describa el o los procedimiento(s) no quirúrgicos(s) a realizar. Incluya en su descripción: administración de sustancias, vía, sitio y forma de administración, volumen y frecuencia de administración, métodos de sujeción o inmovilización del animal, uso de radiación (dosis y frecuencia), otros procedimientos: estudios de supervivencia, biopsias, entre otros).

El único manejo que se realiza sobre el paciente es la toma de muestra, que se lleva a cabo con una tórula estéril sobre la nariz y la mucosa perianal.

E.2. Indique el nombre y experiencia de la(s) personas que efectuará(n) los procedimientos no quirúrgicos.

Las muestras serán tomadas por el investigador, Francisco Abusleme, quien es médico veterinario, diplomado en medicina de animales menores. En su práctica diaria es común la toma de muestra de diversos pacientes.

E.3. Indique las condiciones en que se mantendrán los animales en los periodos de tiempo entre las distintas intervenciones.

No aplica



F. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

F.1. Identifique y describa el o los procedimiento(s) quirúrgico(s) a realizar. Incluya métodos de asepsia que utilizará.

No aplica

F.2. Indique nombre y experiencia de la(s) persona(s) que efectuará(n) procedimientos quirúrgicos.

No aplica

F.3. Condiciones e infraestructura del lugar donde se efectuarán los procedimientos quirúrgicos.

No aplica



F.4. Si el o los procedimiento(s) quirúrgico(s) incluyen supervivencia del animal, señale el cuidado postoperatorio requerido e identifique a la persona responsable.

No aplica

F.5. Si corresponde justifique si un mismo animal será sometido a procedimientos quirúrgicos más de una vez e indique el procedimiento previo.

No aplica



G. DOLOR Y AFLICCIÓN

Es imperativo observar el principio fundamental de evitar todo dolor y sufrimiento innecesario en cada animal que participa en un estudio científico. Toda manipulación que provoque dolor o aflicción del o de los animal(es), debe justificarse en forma sólida y detallada.

G.1. Indique en la siguiente Tabla, el nivel de dolor según el grado de estrés o discomfort producido en los animales a manipular cada año. Los diferentes niveles de dolor o aflicción en el manejo de animales se explican en el Anexo IV. * Es obligatorio completar esta Tabla.

Nivel de Dolor	Indique Número de Animales por Año				
	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
A. Mínimo dolor y estrés	40				
B. Dolor asistido por medidas apropiadas (analgésico u otro)					
C. Dolor no asistido por medidas apropiadas					

G.2. Anestesia, Analgesia y Tranquilizantes. Para los animales indicados en la Tabla anterior (G1), categorías B, especifique los anestésicos, analgésicos, sedantes o tranquilizantes que serán utilizados. Indique el o los nombre(s) de(los) agente(s) usado(s), la dosis, ruta, frecuencia y duración de administración, así como la(s) persona(s) encargada(s) del tratamiento y supervisar su efecto.

No aplica

G.3. Si hay animales indicados en la categoría C de la Tabla G.1., se debe justificar por qué está contraindicado el uso de anestésicos, analgésicos, sedantes o tranquilizantes durante, o después de los procedimientos que causan dolor o aflicción (incluya referencias).

No aplica



H. DISPOSICIÓN FINAL DE LOS ANIMALES

H.1. Eutanasia. Describa detalladamente el método de eutanasia. Si se usa un agente químico, especifique, dosis y ruta de administración. Si su método es físico o mecánico, describa y justifique el método a utilizar. Indique la(s) persona(s) encargada(s) de esta función (Se sugiere revisar *The AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition, American Veterinary Medical Association, USA*).

No aplica

H.2. Eliminación de desechos. Describa brevemente el proceso de eliminación de los cadáveres de acuerdo con las normas de Bioseguridad de su Unidad. Si la eliminación es diferente a lo establecido, debe explicar el procedimiento en detalle y justificarlo.

No aplica

H.3. Mantenimiento de especímenes muertos. Describa la finalidad y las normas establecidas en cada caso (conservación en museos, docencia, otros).

No aplica

H.4. Supervivencia. Describa y justifique la disposición y destino de los animales en caso de experimentos o actividades docentes en que los animales no son eutanasiados al término del procedimiento.

Los pacientes siguen viviendo con sus propietarios, en las mismas condiciones previas a la toma de muestras.



I. SUSTANCIAS ADMINISTRADAS A LOS ANIMALES QUE REQUIERAN CERTIFICACIÓN ESPECIAL

I.1. El uso de fármacos o sustancias peligrosas en la investigación con animales requiere de una aprobación separada. Es su responsabilidad contar con la(s) autorización(es) correspondiente(s). Si es relevante, adjunte las autorizaciones a este documento.

Nota: Si en su proyecto considera la utilización de agentes psicotrópicos, debe llevar un control y registro del uso de éstos. Además, todo excedente deberá ser comunicado a Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de su unidad para su resguardo o eliminación.

Señale a continuación en las siguientes Tablas aquellas sustancias que utilizará.

SUSTANCIAS QUE NO REQUIEREN APROBACIÓN	Lista de sustancias
Agentes Biológicos	
Fármacos	
Otros	

SUSTANCIAS DAÑINAS PARA LOS ANIMALES O HUMANOS QUE REQUIEREN APROBACIÓN	Lista de sustancias y documentación, si corresponde
Radionúclidos	
Agentes Biológicos	
Drogas o químicos peligrosos	
ADN Recombinante	
Fármacos	
Otros	



J. CERTIFICACIONES DEL ACADÉMICO Y/O INVESTIGADOR RESPONSABLE DE LOS PROCEDIMIENTOS DESCRITOS EN ESTE PROTOCOLO

- J.1. **Certifico** que, a mi juicio, la investigación propuesta no constituye una duplicación innecesaria de investigaciones previas.
- J.2. **Certifico** que todas las personas bajo mi supervisión y responsabilidad que participan en los procedimientos con los animales, trabajarán de acuerdo con las normas y reglas éticas vigentes nacionales e internacionales.
- J.3. **Certifico** que he revisado la literatura científica y base de datos pertinentes sin encontrar procedimientos válidos alternativos, o no estoy en condiciones de desarrollarlos.
- J.4. **Confirmando** que he completado la Tabla en el ítem G.1
- J.5. **Certifico** que los antecedentes presentados en este Protocolo **incluyen la totalidad** de los procedimientos con animales propuestos en el Proyecto.
- J.6. Me comprometo a solicitar y obtener la aprobación del CICUA de la Universidad de Chile antes de iniciar **CUALQUIER** cambio al Protocolo aprobado, **sea de procedimientos como de personal**.
- J.7. **Certifico** que el personal que estará a cargo del manejo y o manipulación de los animales cuenta con experiencia, certificación o algún tipo de calificación que evite exponer a los animales a situaciones que ponen en riesgo su bienestar.
- J.8. **Declaro** estar en conocimiento que se realizará **SEGUIMIENTO** por parte del CICUA para confirmar el cumplimiento de este Protocolo.
- J.9. **Certifico** que las personas involucradas en este protocolo han leído y aprobado la versión definitiva de este documento.

J.10. Investigador Patrocinado del protocolo (si lo hubiese):

Firma:

J.11. Académico Responsable del Protocolo y los procedimientos planteados:

Firma:

J.12. VºBº Director de la Unidad Académica:

Firma:

(Importante: la firma del Director de la Unidad debe ir sólo en el protocolo final aprobado, no es necesario que el director firme las enmiendas si las hubiere)

Fecha envío del protocolo:

Check List

Señor Académico: Con el fin de evitar rechazo por parte del CICUA de su Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio por razones formales, por favor verifique que:

- 1 Cuenta con las respectivas firmas del Investigador, Director de la unidad y Académico responsable de los procedimientos (éste último si corresponde según el punto M)
 - 2 Respondió el B5 y B6 (indicar bioterio y lugar de los procedimientos con los animales)
 - 3 Ha especificado el cálculo del número total de animales a utilizar (punto B.7)
 - 4 Se ajustó a las indicaciones del punto C1 (descripción breve y comprensible para el ciudadano común de los propósitos de la investigación).
 - 5 Ha justificado y especificado el cálculo del número de animales a utilizar por objetivo (punto C.4)
 - 6 Indicó **“no aplica”** en todos los items en que no corresponde responder
-

Consentimiento Informado

Este consentimiento informado se dirige a propietarios/tutores de perros que son atendidos en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Chile, y que se les invita a participar en la investigación: **“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Staphylococcus* COAGULASA POSITIVOS AISLADOS DESDE PERROS, PROPIETARIOS, VETERINARIOS Y EQUIPOS DEL HOSPITAL CLINICO VETERINARIO DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE”**, que dará el título de Doctorado en Farmacología de la Universidad de Chile a su investigador principal, el Médico Veterinario Francisco Abusleme Garay.

Parte 1: Información.

Yo soy Francisco Abusleme, y trabajo en dermatología en este hospital. Estamos investigando si existe transmisión de las bacterias de la piel del perro a propietarios y/o Médicos Veterinarios. Le voy a dar la información y lo voy a invitar a participar de esta investigación. Antes de tomar la decisión, puede hablar con alguien con quien se sienta cómodo sobre la investigación. Puede que haya algunas palabras que no entienda, por favor detiene según le informo para darme el tiempo de explicarle. Si tiene preguntas en cualquier momento puede preguntarme.

En la piel del perro normalmente viven bacterias, así como en nuestra piel. El presente estudio busca averiguar si el contacto frecuente con mascotas hace que esas bacterias pasen del perro al humano o viceversa.

Estamos invitando a todos los propietarios de perros sanos que asistan al Hospital, para participar en la presente investigación. Esta investigación incluirá una única toma de muestra desde su nariz, y 2 tomas de muestra desde su perro, una del oído y otra desde la zona perianal.

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo. Tanto si elige participar o no, continuarán todos los servicios a los que tiene derecho en el Hospital, no cambiará nada.

Extraeré una muestra con una tórula desde su nariz, si se siente incómodo, le puedo explicar como hacerlo para que lo realice usted. Luego tomaré 2 muestras desde su perro, una de la nariz y la otra de la zona perianal, las muestras serán llevadas al Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias para su procesamiento.

La investigación durará aproximadamente 24 meses. Durante este tiempo usted no necesita asistir al Hospital, solo necesitamos la primera muestra.

No existe efectos secundarios, riesgos ni molestias asociadas a la participación. Puede que no halla beneficio para usted, pero es probable que su participación nos ayude a encontrar una respuesta a la pregunta de investigación. No existe incentivos por la participación (dinero ni regalos).



No compartiré la identidad de las personas que participen en la investigación. La información se mantendrá confidencial. La información sobre usted tendrá un número en vez de su nombre. Solo los investigadores sabrán cuál es su número y se mantendrá la información en forma segura.

Los resultados obtenidos de esta investigación serán publicados en revistas científicas para que personas interesadas puedan aprender de nuestra investigación.

Usted no tiene porque participar en esta investigación, si no desea hacerlo el negarse a participar no le afectará en ninguna forma, usted tendrá todos los beneficios y derechos en el Hospital.

Si tiene cualquier pregunta puede hacerlas ahora o más tarde, incluso después de haberse iniciado el estudio. Si desea hacer preguntas mas tarde puede contactar por correo electrónico o personalmente en el Hospital.



Parte 2: Formulario de Consentimiento

He sido invitado a participar en la investigación sobre transmisión de bacterias entre perros y humanos.

Entiendo que se me tomará una muestra desde la nariz y se le tomarán 2 muestras a mi perro, y he sido informado que no existe riesgos. Sé que puede que no haya beneficios para mi persona y que no se me compensará de ninguna manera.

Se me ha proporcionado el nombre del investigador, que puede ser fácilmente contactado al correo: fabusleme@gmail.com , o en este Hospital. (Av. Francisco Bilbao 2854, Providencia, Santiago).

Me leyeron la información y he tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado todas las preguntas satisfactoriamente.

Consiento voluntariamente participar en esta investigación como participante y entiendo que tengo derecho a no participar si no quiero.

Nombre del Participante _____ Mascota: _____
Firma del Participante _____
Fecha _____

He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas.

Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del Investigador _____
Firma del Investigador _____
Fecha _____

Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de Consentimiento Informado



Anexo 3: Tabla de Partidores descritos para PCR múltiple para la identificación de la especie de SCP (Sasaki *et al.*, 2010).

Primer (gen)	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplificado (pb)	Especie
au-F3	TCGCTTGCTATGATTGTGG	359	<i>S. aureus</i>
au-nucR	GCCAATGTTCTACCATAGC		
in-F	CATGTCATATTATTGCGAATGA	430	<i>S. intermedius</i>
in-R3	AGGACCATCACCATTGACATATTGAAACC		
sch-F	AATGGCTACAATGATAATCACTAA	526	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>
sch-R	CATATCTGTCTTTCGGCGCG		
dea-F	TGAAGGCATATTGTAGAACAA	661	<i>S. delphini</i> Grupo A
dea-R	CGRTACTTTTCGTTAGGTTCG		
hy-F1	CATTATATGATTTGAACGTG	793	<i>S. hyicus</i>
hy-R1	GAATCAATATCGTAAAGTTGC		
pse-F2	TRGGCAGTAGGATTCGTTAA	926	<i>S. pseudointermedius</i>
pse-R5	CTTTTGTGCTYCMTTTTGG		
deb-F	GGAAGRITTCGTTTTTCCTAGAC	1135	<i>S. delphini</i> Grupo B
deb-R4	TATGCGATTCAAGAACTGA		

Anexo 4: Protocolo abordaje foliculitis superficial en pacientes caninos.

PROTOCOLO DE ABORDAJE DE LA FOLICULITIS SUPERFICIAL CANINA RAV, SEDE BILBAO

Introducción:

En el marco de los datos obtenidos por una tesis doctoral desarrollada en nuestro hospital, se hace necesario considerar algunas variaciones en la manera de abordar la foliculitis superficial canina para asegurar el prudente uso de los antimicrobianos en nuestras mascotas y evitar en lo posible la presentación de resistencia bacteriana.

Debido a que la gran mayoría de los cuadros de foliculitis superficial bacteriana son generados por *Staphylococcus pseudintermedius*, seguido por la especie *Staphylococcus aureus* (Loeffler y Loyd, 2018) y que se reporta de manera frecuente el aumento de meticilino resistencia asociado a estas especies (Menadro y cols., 2019), es que se hace necesario mirar este fenómeno de cerca, y solicitar un cultivo y antibiograma antes de una terapia sistémica con antimicrobianos es ampliamente recomendado, sin embargo, muchas veces por diversas razones logísticas o económicas no se puede contar con esta información. Este protocolo esta orientado a otorgar herramientas de juicio basadas en evidencia para controlar los niveles de resistencia descritos en nuestro hospital. (Datos no publicados). Tomar medidas en este sentido ha demostrado disminuir la incidencia de meticilino-resistencia en médicos veterinarios. (Sato y cols., 2018).

Laboratorios clínicos:

Frente a la imposibilidad de realizar diagnóstico molecular de especie de *Staphylococcus*, se solicita que todas las cepas de *Staphylococcus* coagulasa positiva aisladas desde especímenes caninos sean considerados e informados como *Staphylococcus pseudintermedius*, que es la cepa que mas frecuentemente genera el cuadro de pioderma superficial canina (Beever y cols., 2014).

Todas las cepas de *Staphylococcus coagulasa* positiva DEBEN ser testeadas frente a oxacilina y cefoxitina para detectar la presencia de cepas meticilino-resistentes.

Las cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivo que presenten resistencia a oxacilina (según los puntos de corte para *Staphylococcus pseudintermedius*) DEBEN ser informadas como meticilino resistentes, indicando resistencia a todos los beta-lactámicos y cefalosporinas indicadas en el informe (CLSI Vet04, 2013 y CLSI, 2018).

Médicos Veterinarios:

Frente a la sospecha de un cuadro de foliculitis superficial bacteriana, este diagnóstico debe ser corroborado por **citología**, tomada por impronta a pústulas o lesiones húmedas o con cinta de acetato frente a lesiones no secretoras, teñidas con Diff-quick o tinciones similares, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La presencia de polimorfos nucleares neutrófilos fagocitando bacterias se considera diagnóstico definitivo de foliculitis bacteriana superficial (fig.1). La presencia de bacterias no fagocitadas implica síndrome de sobrecrecimiento bacteriano superficial, lo que debe ser manejado con terapia tópica en base a clorhexidina 2-4%, idealmente con 2 baños semanales (fig. 2).

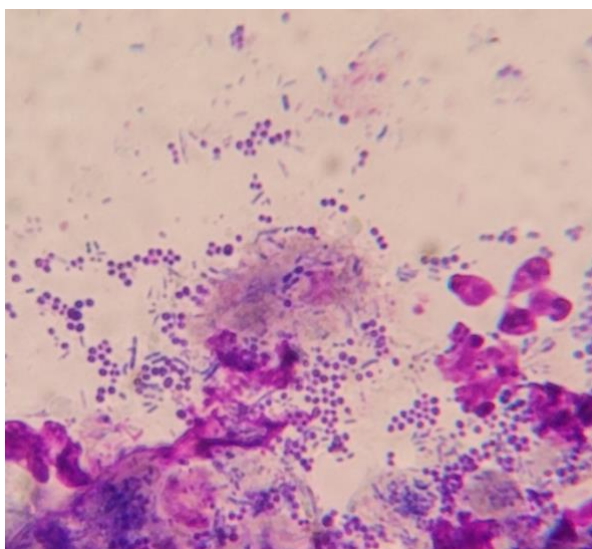


Figura 1: Fagocitosis

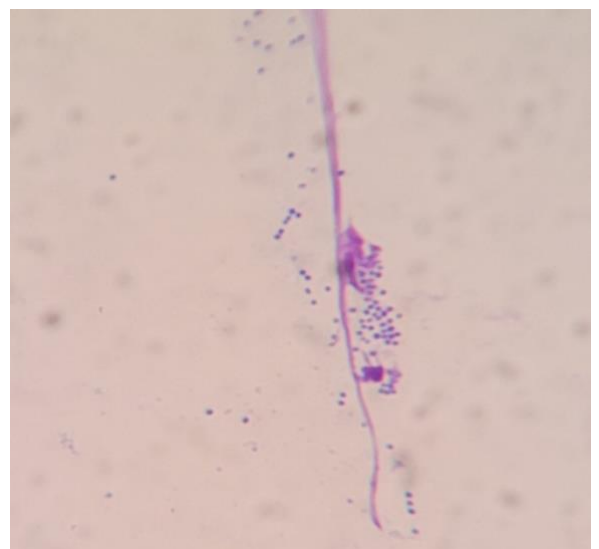


Figura 2: Cocáceas libres

La presencia de bacilos (fig. 3) obliga al estudio de resistencia, ya que no es predecible el comportamiento de cepas de *Pseudomona aeruginosa*, siendo el causal mas frecuente de infección por bacilos en la piel del perro (Loeffler y Loyd, 2018).

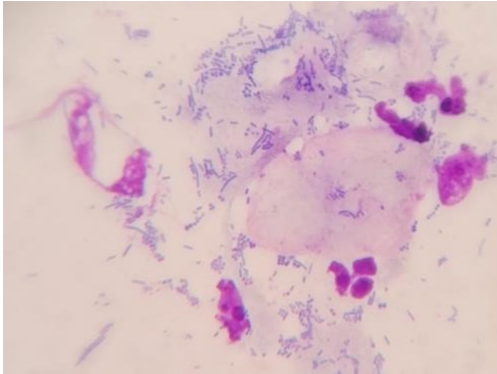


Figura 3: Bacilos

Frente a la confirmación diagnóstica de foliculitis superficial bacteriana por bacterias del tipo cocáceas y frente a la imposibilidad de realizar pruebas de susceptibilidad, los antimicrobianos de primera línea son:

- Amoxicilina con ácido clavulánico: 25mg/kg BID por al menos 7 días.
- Cefalosporinas de primera generación (cefalexina/cefdroxilo): 25 mg/kg BID por al menos 7 días.
- No utilizar quinolonas (enrofloxacino) ni lincosamidas (clindamicina).

El paciente debe ser citado a control en una semana para un control citológico, en el que se busca evidencia de respuesta a la terapia. Si no hay diferencias con la citología inicial es mandatorio realizar cultivo de esa cepa por sospecha de meticilino resistencia.

Referencias.

Beever, L., Bond, R., Graham, P., Jackson, B., Lloyd, D. y Loeffler, A. (2014). Increasing Antimicrobial Resistance in Clinical Isolates of *Staphylococcus intermedius* Group Bacteria and Emergence of MRSP in the UK. *Veterinary Record*. 176, 172-179.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2013). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; Approved Standards – Fourth Edition. VET01-A4.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; CLSI standard M02. 13th Edition.

Loeffler, A. y Lloyd, D.H. (2018). What has changed in canine pyoderma? A narrative review. *The Veterinary Journal*. 235, 73-82.

Menandro, M.L., Dotto, G., Mondin, A., Martini, M., Ceglie, L. y Pasotto, D. (2019). Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from symptomatic companion animals in Northern Italy: Clonal diversity and novel sequence types. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 66, 101331.

Sato, T., Usui, M., Maetani, S. y Tamura, Y. (2018). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinary staff in small animal hospitals in Sapporo, Japan, between 2008 and 2016: A follow up study. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 24, 588-591.

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y
FARMACÉUTICAS



**“ESTUDIO DE RESISTENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE
CEPAS DE *Staphylococcus* COAGULASA POSITIVOS AISLADOS
DESDE PERROS, TUTORES, VETERINARIOS Y SUPERFICIES
DEL HOSPITAL CLÍNICO VETERINARIO DE LA
UNIVERSIDAD DE CHILE”**

**Tesis Presentada a la Universidad de Chile Para Optar al Grado de Doctor en
Farmacología**

**Por:
Francisco Javier Abusleme Garay**

**Director de tesis
Dr. Gerardo González-Rocha**

**Co-directora de tesis
Dra. Daniela Iragüen**

Universidad de Chile

Santiago-Chile
2022