



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

Caracterización fenotípica de la resistencia a antibióticos críticos en cepas de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* aisladas desde perros con dueño de la Región Metropolitana

Sofía Matus Ramírez

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

PROFESOR GUÍA: Nicolás Galarce Gálvez
Universidad de Chile

Financiamiento FONDECYT N°1210692

SANTIAGO, CHILE
2023



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

Caracterización fenotípica de la resistencia a antibióticos críticos en cepas de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* aisladas desde perros con dueño de la Región Metropolitana

Sofía Matus Ramírez

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

Nota final: _____

Firma

Profesor Guía: Dr. Nicolás Galarce

Profesor Corrector: Dra. Lisette Lapierre

Profesor Corrector: Dra. Alicia Valdés

SANTIAGO, CHILE

2023

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Nicolás Galarce y a la Dra. Lissette Lapierre por la invitación a participar del proyecto de investigación, siendo una gran oportunidad de aprendizaje como futura profesional.

Al departamento de Medicina Preventiva Animal y todo el personal de apoyo que permiten que las investigaciones se lleven a cabo, a pesar de las dificultades, como lo fue realizar esta investigación durante periodos de pandemia del COVID-19.

DEDICATORIA

A mis papás y hermana, Antonia, por todo el apoyo y cariño brindado durante esta etapa final de aprendizaje.

A Sergio, por todo el apoyo y compañía durante la carrera, tanto en los momentos buenos y malos, siempre animándome a continuar.

A mis queridas Jesu, Nati, Cata y Mandi, sin ellas, todo este periodo hubiera sido mucho más difícil. Las quiero con todo mi corazón.

Se hace corto el espacio para poder dedicarles a todos los que saben que son un pilar fundamental en todo lo que fue esta Memoria de Título, ustedes saben quiénes son, a todos, los quiero infinito y gracias por todo el apoyo y cariño durante este periodo.

ÍNDICE

RESUMEN	iv
SUMMARY	v
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
a. <i>Resistencia bacteriana a los antimicrobianos</i>	3
b. <i>Programas de vigilancia de RAM</i>	4
c. <i>Género Enterococcus</i>	5
d. <i>Estudios de RAM en Enterococcus spp. en animales de compañía</i>	6
e. <i>Situación nacional</i>	6
HIPÓTESIS	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
i. <i>Diseño</i>	9
ii. <i>Tamaño muestral</i>	9
iii. <i>Obtención de las muestras</i>	9
iv. <i>Detección de E. faecalis y E. faecium resistentes a ampicilina y/o vancomicina</i>	10
v. <i>Identificación molecular de E. faecalis y E. faecium</i>	10
vi. <i>Cuantificación de la concentración mínima inhibitoria y evaluación de multirresistencia en las cepas de E. faecalis y E. faecium resistentes a ampicilina y/o vancomicina</i>	11
vii. <i>Expresión y análisis de resultados</i>	12
viii. <i>Normas de Bioseguridad</i>	12
RESULTADOS	13
1. <i>Obtención de muestras desde las macrozonas de la Región Metropolitana</i>	13
2. <i>Desarrollo de colonias a la prueba de screening</i>	13
3. <i>Identificación molecular de cepas aisladas al screening</i>	13

4. <i>Cuantificación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a ampicilina y vancomicina.....</i>	14
5. <i>Cuantificación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a otros antibióticos....</i>	14
6. <i>Perfiles de resistencia y evaluación de multirresistencia en las cepas de E. faecalis y E. faecium obtenidas</i>	15
CONCLUSIÓN.....	24
BIBLIOGRAFIA	25
<i>ANEXO 1. Consentimiento informado para el proyecto de investigación.....</i>	32
<i>ANEXO 2. Certificado de Bioética para el proyecto de investigación.....</i>	33
<i>ANEXO 3. Certificado Bioseguridad para el proyecto de investigación.....</i>	34
<i>ANEXO 4. Resultados cepas analizadas por sistema automatizado SENSITITRE.....</i>	35

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla Nro. 1: Secuencia de los partidores para la detección de los genes <i>ddl</i> y <i>recG</i>, tamaño del amplicón esperado, y condiciones del PCR.....</i>	<i>11</i>
<i>Tabla Nro. 2: CMI₅₀ y CMI₉₀ de los antimicrobianos analizados contra <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> aisladas de perros.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabla Nro. 3: Resistencia fenotípica de 69 cepas de <i>E. faecalis</i> y 181 de <i>E. faecium</i> a siete antimicrobianos.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabla Nro. 4: Perfiles de resistencia de cepas analizadas por medio del sistema automatizado VITEK2 con la tarjeta AST-GP80, en base al total de cepas aisladas.....</i>	<i>16</i>
<i>Tabla Nro. 5: Resistencia fenotípica de 8 cepas de <i>E. faecalis</i>, 56 cepas de <i>E. faecium</i> a 16 antimicrobianos evaluados por SENSITITRE (Anexo 4).....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla Nro. 6: CMI₅₀ y CMI₉₀ de los antimicrobianos analizados por SENSITITRE contra <i>E. faecalis</i> (8) y <i>E. faecium</i> (56) aisladas de perros (Anexo 4).....</i>	<i>36</i>
<i>Tabla Nro. 7: Perfiles de resistencia de cepas analizadas por medio del sistema automatizado SENSITIRE con el plato GPALLIF, en base las cepas analizadas por este método (Anexo4).....</i>	<i>37</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura Nro. 1: Muestras obtenidas de las diferentes macrozonas de la Región Metropolitana. N-O, nororiente 84; N, norte 89; N-P, norponiente 85; C, centro 86; S-O, suroriente 84; S, sur 94; S-P, surponiente 96; RM, Región Metropolitana.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura Nro. 2: Porcentaje (%) de cepas de <i>Enterococcus</i> según especie aisladas desde placas suplementadas con ampicilina.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura Nro. 3: Porcentaje (%) de cepas <i>Enterococcus</i> según especie aisladas desde placas suplementadas con vancomicina.....</i>	<i>14</i>

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana constituye un desafío de salud pública, por lo cual se han generado programas de vigilancia, donde se incluyen bacterias indicadoras, y se han clasificado los antimicrobianos según su importancia en función a su prescripción. Entre las bacterias indicadoras, son relevantes las del género *Enterococcus*, que forman parte de la microbiota intestinal en diversas especies animales. De este género, las especies *E. faecalis* y *E. faecium*, tienen relevancia clínica, pues presentan resistencia a diversos antimicrobianos de importancia crítica, como vancomicina y ampicilina, y tienen carácter zoonótico, dado que los perros y otros animales domésticos pueden actuar como su reservorio.

En este estudio, inserto en el Proyecto FONDECYT Nro. 1210692, se caracterizó la resistencia fenotípica en cepas de *E. faecalis* y *E. faecium*, bajo la hipótesis de que los perros con dueño de la Región Metropolitana son reservorios de cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a ampicilina y vancomicina. Para estos efectos, mediante un muestreo aleatorio realizado durante los años 2021-2022, se obtuvieron 618 muestras rectales de perros sin patologías gastrointestinales ni consumo de antibióticos cuatro semanas previo a la obtención. Su análisis, mediante una prueba de screening, arrojó como resultado que 32,8% de los aislados fueron compatibles con *Enterococcus* spp. Mediante PCR el 72% correspondieron a *E. faecium* y el 28% a *E. faecalis*. Por medio de cuantificación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), se obtuvo que el 60% de las cepas analizadas presentaron resistencia a ampicilina, con una CMI₅₀ de 4 µg/mL para *E. faecalis* y ≥64 µg/mL para *E. faecium* para dicho antibiótico. En el caso de vancomicina, no se registraron cepas resistentes. Por otra parte, se registraron 34 perfiles de resistencia antimicrobiana, donde el 61% de las cepas analizadas exhibieron multiresistencia.

Como conclusión, se reporta la presencia de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a diversos agentes antimicrobianos en perros con dueño de la Región Metropolitana, lo cual constituye un riesgo potencial para la Salud Pública, siendo necesario estudiarlo con mayor profundidad para determinar el rol de los animales de compañía como reservorios de bacterias de relevancia para la salud animal y pública nacional e internacional.

Palabras claves: Resistencia antimicrobiana, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, ampicilina, vancomicina, perros.

SUMMARY

Antimicrobial resistance constitutes a public health challenge which has led to the development of surveillance programs that includes indicator bacteria and the classification of antimicrobials based on their importance and prescription.

Among the indicator bacteria, those of the *Enterococcus* genus are relevant as they are part of the intestinal microbiota in various animal species. Within this genus, the species *E. faecalis* and *E. faecium* are clinically significant as they exhibit resistance to several critically important antimicrobials such as vancomycin and ampicillin, and they have a zoonotic character, as dogs and other domestic animals can act as reservoirs.

In this study, conducted as part of Project FONDECYT No. 1210692, the phenotypic resistance of *E. faecalis* and *E. faecium* strains were characterized by the hypothesis that dogs owned by individuals in the city of Santiago, Metropolitan region, are reservoirs of ampicillin- and vancomycin-resistant strains of *E. faecium* and *E. faecalis*. For this purpose, a random sampling was conducted between 2021 and 2022, obtaining 618 rectal samples from dogs without gastrointestinal pathologies or antibiotic consumption in the four weeks prior to sampling. Analysis using a screening test revealed that 32.8% of isolates were compatible with *Enterococcus* spp. by PCR, 72% corresponded to *E. faecium* and 28% to *E. faecalis*. Quantification of the minimum inhibitory concentration (MIC) revealed that 60% of the strains analyzed were resistant to ampicillin, with an MIC₅₀ of 4 µg/mL for *E. faecalis* and ≥64 µg/mL for *E. faecium* against this antibiotic. No vancomycin-resistant strains were recorded. Additionally, 34 antimicrobial resistance profiles were identified, with 61% of the analyzed strains exhibiting multidrug resistance.

In conclusion, the presence of *E. faecium* and *E. faecalis* strains resistant to several antimicrobial agents in dogs owned by individuals in the city of Santiago, Metropolitan region, are reported and represents a potential public health risk. Further in-depth study is necessary to determine the role of companion animals as reservoirs of bacteria relevant to animal and public health, both nationally and internationally.

Keywords: Antimicrobial resistance, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, ampicillin, vancomycin, dogs.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un problema relevante de salud pública a nivel mundial. Esta se ha incrementando con el uso, muchas veces inadecuado, de estas drogas, permitiendo la generación y diseminación de bacterias resistentes y multirresistentes a los antimicrobianos.

Debido al impacto de la RAM, la Organización Mundial de la Salud y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) han establecido jerarquías de importancia de los antimicrobianos, de acuerdo con la disponibilidad de alternativas para el tratamiento de bacterias resistentes en humanos y animales, respectivamente. Así, esta categorización busca contribuir a gestionar el control de la RAM y garantizar que los antibióticos sean usados de manera prudente en medicina humana y veterinaria. Sin embargo, a la fecha la lista de OMSA no consideran el uso de antibióticos en animales de compañía.

Existen diversos programas de vigilancia contra la RAM a nivel internacional tanto a nivel de medicina humana como en medicina veterinaria, donde se incluyen bacterias indicadoras como las del género *Enterococcus*, debido a su presencia como comensales en la microbiota normal de animales y humanos, su capacidad de adquirir genes de resistencia y, además, de ser causantes de enfermedades en diferentes especies. En Europa existe un seguimiento armonizado contra la RAM que sugiere el muestreo de *Enterococcus* spp. de ciertos animales de producción y en humanos. Sin embargo, no se especifica el monitoreo en animales de compañía. A pesar de esto, se encuentran disponibles estudios sobre la presencia de cepas multirresistentes de este género bacteriano en diferentes países.

En Chile existe el “Plan Nacional contra la Resistencia Antimicrobiana”, donde se ha incluido el uso de antimicrobianos en mascotas como un tema de preocupación. Sumado a lo anterior, de acuerdo con datos nacionales, la mayoría de los antibióticos que se utilizan en la práctica clínica de pequeños animales son de importancia crítica, siendo utilizados como primera línea terapéutica de forma empírica, lo que constituye un riesgo para la efectividad de estas drogas y un aumento de la RAM. Sin embargo, a nivel nacional no se encuentra información disponible sobre RAM en *E. faecium* y *E. faecalis* aislados desde animales de compañía.

Las deficiencias antes señaladas son objeto de creciente preocupación debido a las implicancias en materia de salud pública, teniendo la presencia de RAM un impacto directo sobre la salud humana, animal y ambiental. Adicionalmente, debido a la escasez de información registrada y sistematizada a nivel nacional se estimó enfocar esta Memoria de Título en la caracterización de la RAM fenotípica a antibióticos de importancia crítica en cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* aisladas de perros con dueño de las diversas comunas de la Región Metropolitana, contribuyendo con información actualizada para el desarrollo de nuevas estrategias de control y mitigación de este preocupante fenómeno.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

a. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos

El sostenido aumento en el tiempo de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) representa un riesgo para la salud pública, dificultando el tratamiento de enfermedades y aumentando el riesgo de intervenciones médicas y quirúrgicas. Así, todo uso de antibióticos ya sea apropiado y conservador, contribuye al desarrollo de RAM. Más aún, el uso inadecuado y excesivo acelera este proceso, permitiendo la generación y diseminación de bacterias resistentes y multirresistentes (MDR). Además, el aumento de viajes y comercio intercontinental ha favorecido esta diseminación a nivel global, lo cual señala que los países no deben actuar de manera aislada para combatir la RAM (O’Neill, 2014).

Debido al gran impacto de la RAM, en el año 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS) puso en marcha el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia y Uso de los Antimicrobianos (GLASS, por sus siglas en inglés). La vigilancia epidemiológica de la RAM es una herramienta esencial para generar políticas públicas, prevenir infecciones y controlar las respuestas, siendo el pilar fundamental para evaluar la propagación de la RAM y supervisar el impacto de las estrategias empleadas a nivel local, nacional y mundial (OMS, 2022).

Adicionalmente, con la información recopilada por el GLASS, la OMS y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) han establecido jerarquías de importancia de los antimicrobianos, de acuerdo con la disponibilidad de alternativas para el tratamiento de bacterias resistentes. Así, podemos destacar que para ambas entidades los antibióticos de importancia crítica son los glicopéptidos, aminoglucósidos y penicilinas, entre otros (OMS, 2017a; OMSA, 2019). Sólo la OMSA señala los antimicrobianos relevantes para la medicina veterinaria; sin embargo, únicamente hace referencia a aquellos utilizados en animales destinados a la producción de alimentos, sin considerar a los animales de compañía (OMSA, 2019).

En paralelo a lo anterior, la OMS generó una lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos tratamientos, donde se incluyen doce patógenos bacterianos considerados como los más peligrosos para la salud humana, dividiendo la lista en prioridad crítica, alta y media en base a la urgencia en que se necesitan nuevos antibióticos.

b. Programas de vigilancia de RAM

Es importante señalar que los programas de vigilancia de RAM están en continua evolución para mejorar la calidad y representatividad de los datos de las RAM, para de esta forma combatir los desafíos futuros. Estos programas incorporan datos y seguimiento de la vigilancia de la RAM y uso de los antimicrobianos en los seres humanos, cadena alimentaria y medio ambiente (OMS, s/f). Se suelen incorporar a los doce patógenos bacterianos de la lista de patógenos prioritarios de la OMS dentro de los programas de vigilancia, y también bacterias indicadoras fecales (OMS, 2022).

Las bacterias indicadoras fecales o indicadores de contaminación fecal se utilizan debido a que su hábitat de preferencia es el intestino, la facilidad de cultivarlas en laboratorio, su amplia distribución y la capacidad de resistir a diversos ambientes, incluso extraintestinales (Byappanahalli *et al.*, 2012; Werner *et al.*, 2013). *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. son parte de las bacterias indicadoras y se evalúa su RAM tanto en humanos como en animales productores de alimentos. La evaluación de estas bacterias a lo largo de la cadena alimentaria se incluye por las siguientes razones: i) se presentan como comensales en la microbiota intestinal de animales y humanos sanos, ii) son capaces de adquirir genes de resistencia a través de mutaciones cromosomales y por transferencia horizontal de genes, y iii) tienen el potencial de generar infecciones clínicas en animales y humanos, además de transferir genes de resistencia a bacterias patógenas de la misma u otra especie. En el caso particular de los perros se suele evaluar *E. coli* y otros patógenos, pero sin incorporar a *Enterococcus* spp. dentro de los programas de vigilancia (DANMAP, 2019; Swedres-Svarm, 2019; NARMS, 2022).

En Europa existe un seguimiento armonizado de la RAM, donde se sugiere la incorporación de cepas *Enterococcus* spp. en los programas de vigilancia (Decisión 2013/653/EU). Esta red europea de vigilancia colabora activamente con el GLASS (OMS, s/f). Así, Dinamarca presenta su programa llamado “Programa danés para la vigilancia del consumo de antimicrobianos y la resistencia en bacterias de animales destinados a la alimentación, alimentos y seres humanos” (DANMAP) como parte de este seguimiento armonizado. Allí, durante el año 2019 obtuvieron muestras de cerdos, donde el 60% de las cepas aisladas de *E. faecium* presentaron RAM, detectando un 12% de resistencia a

ampicilina, pero sin detectar resistencia a vancomicina. Por otro lado, en las cepas de *E. faecalis* no se detectó resistencia a ampicilina ni vancomicina, pero sí patrones de RAM a otros antibióticos como cloranfenicol, ciprofloxacino, daptomicina, eritromicina, gentamicina y tetraciclina (DANMAP, 2019).

En Latinoamérica existe una estrecha colaboración con el GLASS por parte de la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLARVA+), el cual es una de las redes regionales más antiguas sobre la vigilancia de RAM, donde se incluye Chile dentro de sus veinte países miembros. Cada país es representado por un laboratorio de referencia nacional y reportan siete patógenos nosocomiales, incluido *Enterococcus* spp., y cinco otros patógenos comúnmente adquiridos (PAHO, s/f).

c. Género *Enterococcus*

El género *Enterococcus* está compuesto por cocáceas Gram positivas, anaerobias facultativas, presentes en el intestino de distintos animales, incluyendo humanos y animales de compañía. Diversas especies dentro del género se comportan generalmente como apatógenas; sin embargo, *E. faecalis* y *E. faecium* tienen gran importancia clínica. Estas bacterias están asociadas a infecciones nosocomiales como bacteremias, endocarditis, peritonitis, infecciones del tracto urinario y de heridas; considerándose como factores de riesgo la presencia de catéteres urinarios o intravasculares, hospitalizaciones prolongadas y el uso de antibióticos de amplio espectro (Murray *et al.*, 2013).

Es importante señalar que los aislados de *E. faecalis* y *E. faecium* corresponden a los patógenos entre el tercer y cuarto lugar más prevalentes en enfermedades nosocomiales a nivel mundial (Byappanahalli *et al.*, 2012). Estas patologías suelen ser tratadas con una sinergia de antibióticos, donde generalmente se combina el uso de aminoglucósidos con antibióticos de acción en la pared celular, incluyendo β -lactámicos como la ampicilina o glicopéptidos como la vancomicina (Murray *et al.*, 2013). No obstante, se describen niveles de resistencia adquirida, especialmente a penicilina/ampicilina, aminoglucósidos y glicopéptidos, lo que limita las opciones terapéuticas contra cepas MDR o *Enterococcus* resistentes a vancomicina; obligando a usar antibióticos de último recurso, como linezolid, daptomicina y/o tigeciclina (Werner *et al.*, 2013).

d. Estudios de RAM en *Enterococcus* spp. en animales de compañía

A nivel internacional existen diversas investigaciones sobre RAM en animales de compañía, donde señalan que los perros pueden actuar como reservorios de bacterias resistentes y de sus determinantes genéticos de RAM, pudiendo transferirlos a los humanos (Oliveira *et al.*, 2016; Abdel-Moein *et al.*, 2017; Ben Said *et al.*, 2017; van den Bunt *et al.*, 2018). En este contexto, en Países Bajos se realizó un estudio donde aislaron 71 (25,6%) cepas de *E. faecium* resistentes a ampicilina obtenidas desde muestras rectales de perros y un aislado (0,4%) de *E. faecium* resistente a vancomicina (van den Bunt *et al.*, 2018). En Portugal, se reportó el aislamiento de 17 (54,8%) cepas de *E. faecalis* desde torulados orales de perros con enfermedad periodontal, registrando resistencia a cloranfenicol (10%), eritromicina (20%), estreptomina (35%) y tetraciclina (94%). Además, se obtuvieron tres (9,7%) aislados de *E. faecium*, mostrando el 100% de ellos resistencia fenotípica a tetraciclinas. Ninguna de estas cepas presentó resistencia a ampicilina o vancomicina (Oliveira *et al.*, 2016). Por otro lado, en Túnez se aisló una cepa (2,7%) de *E. faecium* resistente a ampicilina obtenida de muestras fecales de perros. Además, varios de los aislados presentaron patrones de MDR (Ben Said *et al.*, 2017).

e. Situación nacional

En Chile las investigaciones publicadas sobre RAM en mascotas son escasas. Sin embargo, se señala la detección de cepas MDR de *E. coli* aisladas desde animales de compañía tratados con enrofloxacino (Moreno *et al.*, 2008). En un estudio diferente, se encontró la presencia del gen *mecA* en cepas de *Staphylococcus* coagulasa positiva con resistencia fenotípica a metilina aisladas desde gatos (Galarce *et al.*, 2016). Sin embargo, a la fecha no se han publicado estudios sobre RAM en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas desde animales de compañía, lo que recalca la necesidad de realizar mayores estudios respecto al tema.

En cuanto a políticas públicas sobre el tema, a nivel nacional existe el “Plan Nacional Contra la Resistencia a los antimicrobianos”, el cual en su segunda versión cuenta con un enfoque de “Una Salud”. Este programa, bajo el nuevo enfoque, busca principalmente prevenir y controlar las infecciones y monitorizar el uso de antimicrobianos en animales de compañía. Además, colabora activamente con diversas otras organizaciones, siendo una de

ellas la Mesa Intersectorial para el Control de Resistencia a los Antimicrobianos en Animales Pequeños del Colegio Médico Veterinario de Chile (Vergara, 2021). Dicha mesa, en colaboración con investigadores de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, generó una primera aproximación a los patrones de uso de antibióticos en pequeños animales, registrando que los primeros tres antibióticos mayormente prescritos como primera opción fueron amoxicilina-ácido clavulánico, enrofloxacino y doxiciclina; siendo en su mayoría tratamientos empíricos sin la existencia de pruebas de laboratorio que respalden su uso, a pesar de ser considerados antibióticos de importancia clínica (Galarce *et al.*, 2021).

Debido a lo expuesto anteriormente, en esta Memoria de Título se caracterizó la presencia de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a antibióticos de críticos aislados de perros con dueño de la Región Metropolitana y de esta forma establecer su posible rol como reservorios de bacterias resistentes que amenacen la salud animal y pública nacional.

HIPÓTESIS

Los perros con dueño de la Región Metropolitana son reservorios de cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a ampicilina y vancomicina.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la resistencia fenotípica a ampicilina y vancomicina en cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* aisladas desde perros con dueño en la Región Metropolitana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar los niveles de resistencia a ampicilina y vancomicina en cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* aisladas desde perros.
2. Determinar la multirresistencia de las cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a ampicilina y vancomicina aisladas desde perros.

MATERIALES Y MÉTODOS

i. Diseño

Se realizó un estudio observacional descriptivo sobre la detección de cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a ampicilina y vancomicina en perros con dueños de diferentes comunas de la Región Metropolitana. El estudio se ejecutó en el Laboratorio de Diagnóstico de Agentes Infecciosos, perteneciente al Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET), financiado por el Proyecto FONDECYT Regular n°1210692.

Se realizó un muestreo multi-etapa en diferentes macrozonas de la Región Metropolitana con las clínicas veterinarias como unidad de muestreo primaria. Así, se obtuvieron muestras rectales de perros con dueño en las comunas de Santiago, La Reina, Las Condes, Lo Barnechea, Ñuñoa, Providencia, Vitacura, La Florida, Peñalolén, Puente Alto, Macul, La Granja, La Cisterna, El Bosque, San Joaquín, San Miguel, Pedro Aguirre Cerda, San Bernardo, La Pintana, Lo Espejo, San Ramón, Maipú, Cerrillos, Padre Hurtado, Peñaflor, Estación Central, Cerro Navia, Lo Prado, Pudahuel, Quinta Normal, Renca, Conchalí, Huechuraba, Independencia, Recoleta, Quilicura, Lampa y Colina, previa autorización de sus propietarios mediante un consentimiento informado (Anexo 1). Al momento de la obtención de las muestras, los perros debían encontrarse sin patologías infecciosas ni terapia con antimicrobianos en las últimas cuatro semanas, no existiendo requisitos de sexo ni edad para su inclusión en el estudio.

ii. Tamaño muestral

El tamaño muestral se calculó considerando una confianza del 95%, un error α del 5%, una precisión del 4%, y una prevalencia esperada de 50%, obteniendo un tamaño de 597 muestras. Cabe destacar que se utilizó esta prevalencia debido a la falta de estudios en Chile y así obtener un mayor tamaño muestral.

iii. Obtención de las muestras

La obtención de muestras se realizó por medio de tómulas estériles con medio de transporte Cary Blair (T'nT'-SS®). La tómula fue introducida 2 cm aproximadamente en el recto del animal y girada suavemente durante 10 s. Para este muestreo, el proyecto contó con

un certificado de bioética emitido por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile (Anexo 2). Una vez obtenidas las muestras, las tómulas fueron mantenidas en cajas aislantes a temperatura de refrigeración (4-6 °C) para su transporte al laboratorio. En caso de no haber podido ser llevadas directamente al laboratorio, fueron guardadas en refrigeración hasta por 48 h hasta su transporte.

iv. Detección de *E. faecalis* y *E. faecium* resistentes a ampicilina y/o vancomicina

En el laboratorio, las tómulas fueron enriquecidas en 9 mL de caldo de tripticasa de soya (TS, BD®), homogenizadas en vórtex e incubadas a 37 °C por 18-24 h. Después de la incubación, y a modo de screening, se inocularon 50 µL del cultivo en caldo en tres placas de agar Enterococcosel (BD®). Estas tres placas incluyeron una suplementada con ampicilina (16 µg/mL, Sigma-Aldrich®), otra con vancomicina (4 µg/mL, Dr. Ehrenstorfer®), y la tercera sin antibióticos como control de crecimiento. Todas las placas fueron incubadas a 37 °C por 18-24 h. Las cepas que crecieron en cualquiera de las placas suplementadas con antibióticos se consideraron resistentes, mientras que aquellas que no crecieron en estas placas, pero sí en la de control se consideraron susceptibles.

Luego de la incubación en dichas placas, una colonia sospechosa obtenida desde las placas suplementadas fue sembrada en una placa de agar Enterococcosel (BD®) sin antibióticos e incubada en las condiciones antes mencionadas. Posteriormente, se tomó un inóculo desde el área confluyente de crecimiento bacteriano para confirmar la presencia *E. faecium* y *E. faecalis* mediante PCR.

v. Identificación molecular de *E. faecalis* y *E. faecium*

Para la identificación molecular de *E. faecium* y *E. faecalis* se seleccionaron las colonias sospechosas previamente obtenidas en las placas suplementadas con antibióticos, y su ADN se extrajo utilizando el kit Wizard Genomic DNA purification (Promega®), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se realizó el PCR en un termociclador LifeECO®, de acuerdo con el protocolo de Kariyama *et al.* (2000). La Tabla Nro. 1 muestra la secuencia de los primarios utilizados para cada una de las especies de *Enterococcus*, el tamaño esperado del amplicón y las condiciones de reacción del PCR. Como control positivo se utilizó la cepa *E. faecalis* ATCC 29212 y la cepa *E. faecium* EFM13 resistente a vancomicina donada gentilmente por la Dra. María Teresa Ulloa (Programa de

Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile), y como control negativo la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Tabla Nro. 1: Secuencia de los partidores para la detección de los genes *ddl* y *recG*, tamaño del amplicón esperado y condiciones del PCR.

Especie	Gen	Secuencias de los partidores (5'-3')	Tamaño esperado del amplicón (pb)	Condiciones de la reacción de PCR
<i>E. faecalis</i>	<i>ddl</i>	F: ATCAAGTACAGTTAGTCT R: ACGATTCAAAGCTAACTG	941	Predeinaturación: 5 min a 94 °C. Luego considerará 30 ciclos de amplificación:
<i>E. faecium</i>	<i>recG</i>	F: TTGAGGCAGACCAGATTGACG R: TATGACAGCGACTCCGATTCC	658	Denaturación: 1 min a 94 °C. Hibridación: 1 min a 54°C. Elongación: 10 min a 72 °C.

F: forward; R: reverse.

vi. Cuantificación de la concentración mínima inhibitoria y evaluación de multirresistencia en las cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* resistentes a ampicilina y/o vancomicina

La susceptibilidad las cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a ampicilina y/o vancomicina aisladas se cuantificó mediante una prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante el sistema automatizado VITEK2 (bioMérieux), utilizando la tarjeta AST-GP80, según las instrucciones del fabricante, y aplicando valores de corte clínicos de acuerdo con las directrices del CLSI (CLSI, 2020; CLSI, 2022). Los antibióticos analizados en la tarjeta AST-GP80 incluyen: bencilpenicilina, enrofloxacino, marbofloxacino, eritromicina, doxiciclina, tetraciclina, nitrofurantoina y cloranfenicol. Para la CMI de la ampicilina, se utilizó bencilpenicilina (BPEN) como predictor, como lo establece el CLSI (2020). La CMI de vancomicina se determinó mediante el sistema automatizado Sensititre (ThermoFisher), utilizando el plato GPALL1F, aplicando los valores de corte clínicos de acuerdo con las directrices del CLSI (CLSI, 2020; CLSI, 2022), en las dependencias del Instituto de Salud Pública de Chile. De esta manera se pudo obtener un perfil de susceptibilidad con drogas relevantes para medicina veterinaria y medicina humana. Se utilizaron como controles las cepas *E. faecalis* ATCC 29212 y *S. aureus* ATCC 25923. Todas las cepas se clasificaron como sensibles y resistentes, en base a los puntos de corte de resistencia establecidos para

cada antibiótico por el CLSI, por lo que las cepas de sensibilidad intermedia se clasificaron como sensibles para este estudio (CLSI, 2020; CLSI, 2022). La MDR se confirmó cuando una cepa presentó resistencia a tres o más antibióticos de diferentes clases (Magiorakos *et al.*, 2012).

vii. Expresión y análisis de resultados

Los resultados se colectaron en una tabla de Microsoft Excel®, donde se registraron todas las muestras. Estas muestras fueron catalogadas como positivas o negativas según la presencia de cepas resistentes a ampicilina y/o vancomicina. A las muestras positivas, se les determinó el perfil de MDR. Con estos datos, se realizó un análisis estadístico descriptivo, en el cual se expresaron los resultados en porcentaje.

viii. Normas de Bioseguridad

Para la correcta realización del estudio se trabajó en un laboratorio con un nivel 2 de bioseguridad y siguiendo las recomendaciones del Manual de Normas de Bioseguridad de CONICYT (Chiong *et al.*, 2018). Además, se debieron seguir una serie de medidas de bioseguridad que incluyeron el uso de delantal dentro del laboratorio, lavado de manos, uso de guantes y correcta manipulación los instrumentos que fueron utilizados, entre otros. Todos los residuos sólidos contaminados fueron autoclavados y los residuos líquidos fueron clorados antes de la descarga. La eliminación de todos los desechos tóxicos, líquidos o sólidos fue realizada por una empresa externa. Igualmente, este proyecto contó con un certificado de bioseguridad emitido por el Comité de Bioseguridad de FAVET (Anexo 3).

RESULTADOS

1. Obtención de muestras desde las macrozonas de la Región Metropolitana

Se obtuvo un total de 618 muestras rectales de perros sin antibióticos ni patologías infecciosas de diversas comunas de la Región Metropolitana. La distribución de muestras por macrozona se observa en la Figura Nro. 1.

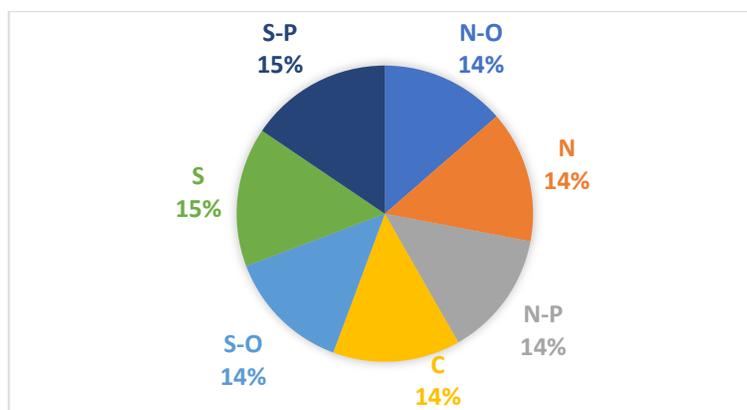


Figura Nro. 1: Muestras obtenidas de las diferentes macrozonas de la Región Metropolitana. N-O, nororiente = 84; N, norte = 89; N-P, norponiente = 85; C, centro = 86; S-O, suroriente = 84; S, sur = 94; S-P, surponiente = 96.

2. Desarrollo de colonias a la prueba de screening

En las placas sin suplementar, utilizadas como control de crecimiento, se identificaron 616/618 (99,7%) muestras con desarrollo compatible con *Enterococcus* spp. En cuanto a las placas suplementadas con antibióticos, se observaron 201/618 (32,5%) aislados desde placas suplementada con ampicilina y 205/618 (33,2%) desde placas suplementada con vancomicina. Finalmente, se recuperaron 406 aislados compatibles con *Enterococcus* spp. resistentes a ampicilina y/o vancomicina, para realizar la identificación molecular.

3. Identificación molecular de cepas aisladas al screening

Mediante PCR, 250/406 (62%) aislados correspondieron a *E. faecalis* o *E. faecium*. Entre estas cepas, 69/250 (28%) correspondieron a *E. faecalis* y 181/250 (72%) a *E. faecium*. En la Figura Nro. 2 y Nro. 3 se puede ver la distribución de especie aislada según la placa suplementada en la prueba de screening.

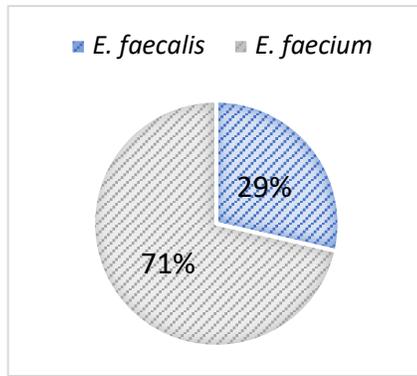


Figura Nro. 2: Porcentaje (%) de cepas de *Enterococcus* según especie aisladas desde placas suplementadas con ampicilina. n = 168.

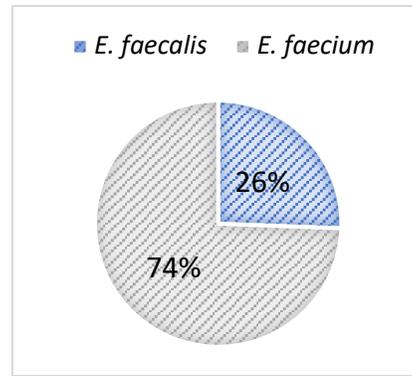


Figura Nro. 3: Porcentaje (%) de cepas *Enterococcus* según especie aisladas desde placas suplementadas con vancomicina. n = 82.

4. Cuantificación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a ampicilina y vancomicina

Se observó que 60% de las cepas analizadas fueron resistentes a bencilpenicilina. En el caso de vancomicina, todas las cepas analizadas fueron sensibles. En base a los resultados de CMI se calculó la CMI₅₀ y CMI₉₀ para bencilpenicilina y vancomicina, los cuales se observan en la Tabla Nro 2.

5. Cuantificación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a otros antibióticos

Del total de cepas analizadas, se obtuvieron 246 cepas con resistencia a al menos un antibiótico. En base a los antibióticos analizados, se observó que 200 (80%) cepas fueron resistentes a enrofloxacino, 213 (85%) a marbofloxacino, 184 (74%) a eritromicina, 130 (52%) a doxiciclina, 148 (59%) tetraciclina, y 142 (56%) a nitrofurantoina. En la Tabla Nro. 2 se puede observar la CMI₅₀ y CMI₉₀ para estos antibióticos; mientras que en la Tabla Nro. 3, se observa el porcentaje de resistencia a estos antibióticos de acuerdo a la especie bacteriana. Los resultados obtenidos por SENSITITRE se encuentran en las Tablas Nro. 5, Nro. 6 y Nro. 7 en el Anexo 4.

Tabla Nro. 2: CMI₅₀ y CMI₉₀ de los antimicrobianos analizados contra *E. faecalis* y *E. faecium* aisladas de perros.

Clase Antimicrobiana	AB	% de cepas resistentes	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		Punto de Corte CLSI(µg/mL)
			CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)	
β-lactámicos^a	BPEN	60	4	≥64	≥64	≥64	S: ≤8 R: ≥16
Glucopéptidos^b	VAN	0	1	2	0,5	2	S: ≤4 I: 8 - 16 R: ≥32
Fluoroquinolonas^c	ENR	80	1	≥4	≥4	≥4	S: 1 I: 2 R: ≥4
	MAR	85	2	≥4	≥4	≥4	S: 1 I: 2 R: ≥4
Macrólidos^c	ERI	74	2	≥8	1	≥8	S: ≤0,5 I: 1 - 4 R: ≥8
Tetraciclinas^c	DOX	52	≤0,5	≥16	8	≥16	S: ≤4 I: 8 R: ≥16
	TET	59	≤1	≥16	≥16	≥16	S: ≤4 I: 8 R: ≥16
Nitrofuranos^c	NIT	57	≤16	64	64	64	S: ≤32 I: 64 R: ≥128

^aSe analizó el 100% de cepas recuperadas e identificadas de las placas suplementadas con ampicilina al screening, por medio del sistema automatizado VITEK2. ^bSe analizó el 25,6% de las cepas recuperadas e identificadas de las placas suplementadas con vancomicina al screening, por medio del sistema automatizado SENSITITRE. ^cSe analizó el 100% de cepas recuperadas e identificadas de ambas placas suplementadas al screening, por medio del sistema automatizado VITEK2. BPEN, bencilpenicilina; VAN, vancomicina; ENR, enrofloxacino; MAR, marbofloxacino; ERI, eritromicina; DOX, doxiciclina; TET, tetraciclina; NIT, nitrofurantoina. Puntos de corte obtenidos del CLSI, 2020 y CLSI, 2022.

Tabla Nro. 3: Resistencia fenotípica de 69 cepas de *E. faecalis* y 181 de *E. faecium* a siete antimicrobianos.

	BPEN		ENR		MAR		ERI		DOX		TET		NIT	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>E. faecalis</i>	13	19	36	52	45	65	53	77	32	46	34	49	13	19
<i>E. faecium</i>	90	50	164	91	168	93	131	72	98	54	114	63	129	71

BPEN, bencilpenicilina; ENR, enrofloxacino; MAR, marbofloxacino; ERI, eritromicina; DOX, doxiciclina; TET, tetraciclina; NIT, nitrofurantoina. Puntos de corte obtenidos del CLSI, 2020 y CLSI, 2022.

6. Perfiles de resistencia y evaluación de multirresistencia en las cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* obtenidas

En las cepas analizadas se describieron 34 perfiles de resistencia a los antimicrobianos. En la Tabla Nro. 4 se encuentra el detalle de los perfiles de resistencia. Se

puede observar que 152 (61%) de las cepas analizadas exhibieron MDR. De éstas, 24 cepas (16%) de *E. faecalis* presentaron MDR, en comparación a las 128 cepas (84%) de *E. faecium*.

Tabla Nro. 4. Perfiles de resistencia de cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* analizadas.

	N° cepas	%	Perfil de resistencia	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
250	1	0,4	BPEN	1	0
	1	0,4	BPEN + ENR + MAR	0	1
	1	0,4	BPEN + ENR + MAR + ERI	0	1
	1	0,4	BPEN + ENR + MAR + ERI + TET	0	1
	6	2,4	BPEN + ENR + MAR + ERI + NIT	0	6
	1	0,4	BPEN + ENR + MAR + DOX + TET	0	1
	1	0,4	BPEN + ENR + MAR + ERI + CHL	0	1
	1	0,4	BPEN + ENR + MAR + ERI + DOX + TET	0	1
	18	7,2	BPEN + ENR + MAR + DOX + TET + NIT	3	15
	15	6	BPEN + ENR + MAR + ERI + TET + NIT	1	14
	64	21,6	BPEN + ENR + MAR + ERI + DOX + TET + NIT	8	56
	1	0,4	BPEN + ENR + MAR + ERI + DOX + TET + CHL	0	1
	2	0,8	BPEN + ENR + MAR + ERI + DOX + TET + NIT + CHL	0	2
	13	5,2	ENR + MAR	3	10
	27	10,8	ENR + MAR + ERI	12	15
	2	0,8	ENR + MAR + TET	1	1
	8	3,2	ENR + MAR + NIT	0	8
	1	0,4	ENR + DOX + TET	0	1
	1	0,4	ENR + MAR + DOX + TET	0	1
	15	6	ENR + MAR + ERI + NIT	0	15
	8	3,2	ENR + MAR + ERI + DOX + TET	4	4
	7	2,8	ENR + MAR + DOX + TET + NIT	0	7
	4	1,6	ENR + MAR + ERI + DOX + TET + CHL	4	0
	12	4,8	ENR + MAR + ERI + DOX + TET + NIT	0	12
	1	0,4	MAR	1	0
	6	2,4	MAR + ERI	4	2
	1	0,4	MAR + DOX + TET	0	1
	1	0,4	MAR + ERI + NIT	0	1
	5	2	MAR + ERI + DOX + TET	4	1
	13	5,2	ERI	9	4
	1	0,4	ERI + NIT	0	1
	10	4	ERI + DOX + TET	7	3
4	1,6	DOX + TET	2	2	
3	1,2	NIT	1	2	
4	1,6	SENSIBLES	4	0	

BPEN, bencilpenicilina; ENR, enrofloxacino; MAR, marbofloxacino; ERI, eritromicina; TET, tetraciclina; NIT, nitrofurantoína; DOX, doxiciclina; CHL, cloranfenicol.

DISCUSIÓN

En esta Memoria de Título se describe la presencia de cepas de *Enterococcus* spp. resistentes a ampicilina en perros en la Región Metropolitana, y también entrega los perfiles de resistencia de dichas cepas. No se registraron cepas resistentes a vancomicina en esta investigación. Sin embargo, se debe considerar que los estudios realizados sobre la materia a nivel internacional no utilizan la misma metodología para la ejecución de las investigaciones, por lo que las comparaciones que se realizan en este apartado son fundamentalmente para entender el fenómeno en sí.

En base a la metodología planteada, se superó el tamaño muestral esperado de 597 muestras, recolectando un total de 618 muestras desde distintas comunas de la Región Metropolitana. Desde estas muestras, se observó crecimiento compatible con *Enterococcus* spp. en un 99,7% de ellas. En este sentido, las bacterias del género *Enterococcus* son comensales y parte de la microbiota intestinal de los animales domésticos (Murray *et al.*, 2013), por lo que el porcentaje de detección de este género bacteriano suele ser elevado, incluso alcanzando un 100% (Kataoka *et al.*, 2013; Bertelloni *et al.*, 2016; Bang *et al.*, 2017; Ben Said *et al.*, 2017; Kubašová *et al.*, 2017). Así, el resultado obtenido en este estudio era esperable, considerando que los perros que participaron debían encontrarse sin terapia antimicrobiana durante el último mes, identificando de esta forma la microbiota normal del intestino de los individuos en estudio.

Al screening en las placas suplementadas con antibióticos, se obtuvo en total 406 aislados compatibles con *Enterococcus* spp., los cuales fueron seleccionados para su posterior identificación molecular. De esta prueba de screening, 201 (32,5%) aislados correspondieron a placas suplementadas con ampicilina y 205 (33,2%) a placas suplementadas con vancomicina, siendo una primera aproximación a la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas en estudio. En la literatura no se encuentran estudios con metodología similar a la utilizada en este estudio; sin embargo, el CLSI recomienda realizar una prueba de screening en placa para evaluar la resistencia de vancomicina para poder identificar las especies de *Enterococcus* spp. previo a la CMI, ya que algunas especies como *E. gallinarum* y *E. caddeliflavus* presentan resistencia intrínseca a vancomicina (CLSI, 2023).

En cuanto a la identificación molecular, correspondieron en total a 250 cepas de *E. faecalis* o *E. faecium*, lo que equivale a un 62% de los aislados procesados. De estas 250 cepas, el 72,4% fueron identificadas como *E. faecium*, mientras que el 27,6% restante a *E. faecalis*, lo cual concuerda con lo descrito por otros autores occidentales, donde la especie más prevalente obtenida desde muestras fecales de perros es *E. faecium* (Cinquelpalmi *et al.*, 2013; Iseppi *et al.*, 2015; Bertelloni *et al.* 2016; Ben Said *et al.* 2017; Kubašová *et al.*, 2017; Stępień-Pyśniak *et al.*, 2021). Por otro lado, algunos autores asiáticos (Kataoka, *et al.*, 2013; Bang, *et al.*, 2017) han reportado que la especie de *Enterococcus* identificada en mayor frecuencia es *E. faecalis*, mostrando una similitud epidemiológica en la distribución de las especies del género (60% *E. faecalis* vs 40% *E. faecium*). La distribución de las especies de *Enterococcus* varía en base a diversos factores, tanto ambientales, ubicación geográfica, alimento consumido e incluso la estación del año; como también factores del individuo donde se incluye la edad y sexo. Las especies que se identifican con mayor frecuencia en perros son *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* y *E. durans* (Torres *et al.*, 2018). Sin embargo, también se encuentran *E. gallinarum* y *E. caddeliflavus* (Murray *et al.*, 2013), que como se mencionó anteriormente, presentan resistencia intrínseca a vancomicina.

Al momento de analizar la CMI de las cepas de *Enterococcus* spp, se pudo observar que el 60% de los aislados obtenidos de las placas suplementadas con ampicilina, presentaron resistencia a bencilpenicilina, siendo *E. faecium* mayormente resistente con una CMI₅₀ ≥64 µg/mL, en comparación a *E. faecalis* con una CMI₅₀ de 4 µg/mL. En este contexto, y similar a lo reportado en esta Memoria de Título, Jackson *et al.* (2009) describieron el 63% de las cepas aisladas desde perros correspondientes a *E. faecium* resistentes a bencilpenicilina y todas las cepas de *E. faecalis* analizadas fueron susceptibles a este antibiótico, observando mayor resistencia en las cepas de *E. faecium*. Por otra parte, Iseppi *et al.* (2015) obtuvieron cepas de *Enterococcus* spp. aisladas desde heces de perros y gatos, donde describieron un 56,5% de las cepas analizadas fueron resistentes a ampicilina. Se señala en la literatura que *E. faecalis* normalmente exhibe niveles más bajos de CMI en comparación a *E. faecium*, lo cual se atribuye a que *E. faecalis* presenta menores mecanismos de resistencia antimicrobiana, y dentro de los que presenta, suelen expresarse en muy baja cantidad (Torres *et al.*, 2018), lo cual fue observado en la presente Memoria de Título.

Por otra parte, este género bacteriano es intrínsecamente resistente en distintos niveles a diferentes β -lactámicos, ya que cuentan con PBPs (proteínas de unión a penicilina) de baja afinidad a los antibióticos de esta clase. Estas bacterias son completamente resistentes a cefalosporinas, sin embargo, se describe cierta sensibilidad a penicilina y ampicilina. Esta sensibilidad se puede ver modificada por una sobreproducción de las PBPs de baja afinidad o por una mutación en dichas proteínas, generando resistencia a altos niveles de penicilina, principalmente registrado en *E. faecium* (Torres *et al.*, 2018; Kakoullis *et al.*, 2021). En el caso de *E. faecalis*, es menos común encontrar mutaciones de las PBPs; sin embargo, se describe la presencia del gen plasmidial *blaZ* que codifica para β -lactamasas, la cual *in vitro* se expresa en bajas cantidades, pudiendo mostrarse como susceptible a ampicilina cuando se realizan las pruebas de CMI (Torres *et al.*, 2018). Es por esto que es importante determinar la base genética de la resistencia de las cepas aisladas y, eventualmente, poder evaluar la presencia del gen *blaZ* en aquellas cepas que aparentemente resultaron susceptibles a la prueba CMI pero resistentes a la prueba de screening.

En cuanto a la presencia de cepas resistente a vancomicina, en un inicio se registró un 33% de resistencia al screening, pero posteriormente al determinar la CMI de dichas cepas se observó que todas eran sensibles, concordando con lo descrito por diversos autores (Iseppi *et al.*, 2015; Bang *et al.*, 2017; Ben Said *et al.*, 2017; Trościańczyk *et al.*, 2021). Se debe tener en cuenta que la vancomicina es un antibiótico de uso exclusivamente intrahospitalario en medicina humana (Vandecasteele y De Vriese, 2010); sin embargo, es de conocimiento común dentro de los médicos veterinarios la utilización de este antibiótico de forma extra-etiqueta en la práctica clínica de pequeños animales, por lo cual fue importante incorporarlo dentro del estudio. Además, la resistencia adquirida a glicopéptidos en *E. faecalis* y *E. faecium* está mediada por los genes *vanA* y *vanB*, los cuales se encuentran en distintos transposones y han sido identificados tanto a nivel cromosomal como plasmidial (Murray *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2018), por lo que se debe tener en consideración la transmisión de dichos determinantes de resistencia a otras bacterias e incluso entre los dueños y sus perros o viceversa. El CLSI cuenta con un protocolo para realizar la prueba de screening en agar suplementado con vancomicina, la cual utiliza una concentración de 6 $\mu\text{g/mL}$, por lo cual se puede presentar desarrollo de bacterias sensibles, con sensibilidad intermedia y resistentes (CLSI, 2022), por lo cual se utilizó las bases de dicho protocolo con

modificaciones para solamente observar el crecimiento de las bacterias resistentes en este estudio. Adicionalmente, se sabe que la vancomicina es un antibiótico bastante lábil a los cambios de temperatura, por lo cual una preparación inadecuada del medio suplementado o una mala preservación del antibiótico puede llevar a falsos positivos (Thermofisher, s/f). Por ello, es importante considerar que esta diferencia se pudo deber a distintos aspectos metodológicos al momento de realizar el proceso en el laboratorio del estudio.

El 61% de las cepas analizadas se consideró MDR, y de éstas el 84% correspondieron a *E. faecium*. Asimismo, se puede encontrar en la literatura que la presencia de cepas de *Enterococcus* spp. MDR aisladas desde animales de compañía, principalmente perros, varía desde un 22% a un 97%, estando en su mayoría sobre el 50%. Además, se destaca que en todos estos estudios predomina *E. faecium* con porcentajes mayores de MDR (Cinquelpalmi *et al.*, 2013; Bertelloni *et al.*, 2016; Ben Said *et al.*, 2017; Oguttu *et al.*, 2021; Stępień-Pyśniak *et al.*, 2021; Trościańczyk *et al.*, 2021). En este contexto, Bertelloni *et al.* (2016) registraron un 64% de cepas de *Enterococcus* spp. con MDR aisladas de muestras fecales de perros clínicamente sanos, obteniendo un valor bastante similar al obtenido en esta Memoria de Título. Los autores analizados en este apartado definieron la MDR en base a los criterios de Magiarakos *et al.* (2012), al igual que en el presente estudio; sin embargo, se debe considerar que el género *Enterococcus* spp. presenta resistencia intrínseca a diversos antibióticos, como lo son algunas penicilinas semisintéticas, cefalosporinas, bajos niveles a aminoglucósidos, clindamicina y sulfametoxazol-trimetoprim. Además, *E. faecalis* presenta resistencia intrínseca también a polimixinas, estreptogramneas y quinopristin/dalfopristin (Murray *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2018; CLSI, 2023), lo cual se debe tener en consideración al momento de realizar las pruebas de susceptibilidad, pero fundamentalmente en la evaluación de la MDR para no incluirlos; sin embargo, varios estudios los incluyen en sus determinaciones. En esta Memoria de Título no fueron considerados los antibióticos a los cuales *Enterococcus* spp. presenta resistencia intrínseca, ni aquellos que no tienen efectividad clínica, aún cuando se muestren susceptibles *in vitro*, para evaluar esta MDR.

En este estudio se registraron 34 perfiles de resistencia en las 250 cepas analizadas, siendo los más frecuentes de encontrar: bencilpenicilina + enrofloxacino + marbofloxacino + eritromicina + doxiciclina + tetraciclina + nitrofurantoína (22%), enrofloxacino + marbofloxacino + eritromicina (11%) y bencilpenicilina + enrofloxacino + marbofloxacino

+ doxiciclina + tetraciclina + nitrofurantoína (7%). En estos tres perfiles se observa resistencia, además de a β -lactámicos, a enrofloxacino y marbofloxacino, ambos pertenecientes a la clase de las fluoroquinolonas. La resistencia a fluoroquinolonas en *Enterococcus* spp. está asociada a una mutación en las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (Kakoullis *et al.*, 2021), la cual podría estar presente en las cepas estudiadas. La RAM a fluoroquinolonas es importante de tener en cuenta en *Enterococcus* spp., ya que *E. faecium* es causante de infecciones urinarias en perros (ITUs) (Damborg *et al.*, 2008), y, además, se estima que en Chile el enrofloxacino es el antimicrobiano de elección en cuanto se trata de infecciones genitourinarias (Galarce *et al.*, 2021), lo cual puede estar ejerciendo una presión en la selección de bacterias que presenten dicha resistencia. Las cepas de *E. faecium* resistente a ampicilina complejo clonal 17 (AREF CC17) son usualmente resistentes a varios β -lactámicos y fluoroquinolonas y se han encontrado en infecciones urinarias en perros (Damborg *et al.*, 2008). Se requiere mayor investigación genética de los aislados para saber si las cepas aisladas corresponden o no a AREF CC17, considerando que el 45% de las cepas analizadas presentaron resistencia a bencilpenicilina y enrofloxacino.

En cuanto a la presencia de eritromicina en los dos perfiles de resistencia más frecuentes, se debe señalar que los enterococos son frecuentemente resistentes a los macrólidos, generalmente mediado por el gen *ermB*, reduciendo la unión al ribosoma de eritromicina, lincosamidas y estreptograminas B, además de presentar resistencia intrínseca a clindamicina. Por ésto, no se utilizan como drogas de elección para infecciones causadas por *Enterococcus* (Cercenado, 2011). Es altamente probable que este gen esté presente en las cepas analizadas, considerando que el 74% de las cepas analizadas resultaron resistentes a eritromicina.

En relación a la presencia de cepas resistentes a doxiciclina y tetraciclina, se puede mencionar que la resistencia a tetraciclinas está asociada a la presencia de bombas de eflujo y la presencia de proteínas de protección ribosomal, ligado a la presencia de los genes *tetL* y *tetM*, los cuales suelen encontrarse en transposones de la familia Tn916, permitiendo que esta resistencia sea transferida a otras bacterias (Wilcks *et al.*, 2005; Kakoullis *et al.*, 2021). Se debería investigar la presencia de dicho transposón en los aislados resistentes y la presencia de dicho transposón en humanos, de esta forma poder evaluar el riesgo zoonótico de la resistencia encontrada en este estudio.

La presencia de resistencia a nitrofurantoína dentro de los perfiles de RAM más frecuentes llama la atención, ya que la adquisición de esta resistencia es infrecuente debido a su complejo mecanismo de acción. A pesar de esto, se ha registrado un aumento en la resistencia a esta droga en *E. faecium*, debido a que se está utilizando con mayor frecuencia, sobre todo en ITUs no complicadas (Meena *et al.*, 2017). En este contexto, Zhang *et al.* (2022) describieron como principal mecanismo de resistencia en *Enterococcus* spp. la mutación en los genes *ef040* y *ef0648*, los cuales codificarían enzimas nitroreductasas. Sin embargo, no se encuentran completamente descritos los mecanismos de esta resistencia. Adicionalmente, los mismos autores señalaron la presencia de resistencia a ampicilina, fluoroquinolonas y tetraciclinas en aquellas cepas que presentaron resistencia a nitrofurantoína. En esta Memoria, el 42% de los aislados presentaron resistencia a estos cuatro antibióticos en simultáneo, por lo cual, sería necesario desarrollar un estudio genético para detectar la presencia de dicha mutación y determinar el riesgo que puede significar para la salud pública bajo el enfoque de “Una Salud”.

En un estudio realizado en un perro con colangitis/coleosistitis, se obtuvieron dos cepas de *Enterococcus* spp. Así, desde el sitio de infección se aisló una cepa de *E. faecium* y desde torulado rectal una cepa de *E. faecalis*. La importancia de este estudio radica en que ambas cepas compartían el mismo perfil de resistencia a penicilinas, fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos y aminoglucósidos (Sposato *et al.*, 2022), un perfil bastante similar a los obtenidos en esta Memoria de Título. Como se mencionó anteriormente, el riesgo de transmisión de los determinantes de resistencia antimicrobiana es alta y queda ejemplificado en el estudio de Sposato *et al.* (2022), donde, a pesar de ser dos especies diferentes, presentaron el mismo perfil de resistencia.

Por último, con el presente estudio se reporta la presencia de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a diversos agentes antimicrobianos en perros sanos con dueño en la Región Metropolitana, lo cual constituye un riesgo potencial para la salud pública al ser un agente con potencial zoonótico, además de ser un riesgo para la salud individual de estos animales, ya que puede comprender un desafío terapéutico en una futura infección. Estos resultados sugieren la importancia de abordar con el enfoque de “Una Salud” estas temáticas, ya que no sólo los animales de compañía pudieran actuar como reservorios, necesitando más investigaciones al respecto. Adicionalmente, los resultados obtenidos por esta investigación

sugieren la importancia de incorporar otras aristas dentro del “Plan Nacional Contra la Resistencia a los Antimicrobianos” en cuanto al enfoque de pequeños animales, ya que de momento no se incluye propiamente tal la vigilancia de la RAM en pequeños animales, sino más bien la vigilancia y control del uso de antimicrobianos por parte de los médicos veterinarios.

CONCLUSIÓN

Se obtuvieron 41% de cepas resistentes a ampicilina, mientras que no se registraron cepas resistentes a vancomicina. Por ello, se rechaza la hipótesis planteada.

El 61% de las cepas analizadas presentaron MDR a antibióticos de uso común en la práctica clínica veterinaria, por lo cual es necesario aumentar las investigaciones sobre la resistencia antimicrobiana en animales de compañía, tanto a nivel nacional como internacional, para poder tener un apropiado manejo de estas drogas y ralentizar la aparición de nuevas cepas MDR generando desafíos terapéuticos en enfermedades consideradas comunes.

BIBLIOGRAFIA

- **ABDEL-MOEIN, K. A.; EL-HARIRI, M. D.; WASFY, M. O.; SAMIR, A.** 2017. Occurrence of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* carrying *esp* gene in pet animals: An upcoming threat for pet lovers. [en línea]. J Glob Antimicrob Resist. 9:115-117. <<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.02.011>> [consulta 20-07-2021].
- **BANG, K.; AN, J.; KIM, W.; DONG, H.; KIM, J.; CHO, S.** 2017. Antibiotic resistance patterns and genetic relatedness of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from military working dogs in Korea. [en línea]. J Vet Sci. 18(2):229-236. <<https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.2.229>> [consulta 26-10-2022].
- **BEN SAID, L.; DZIRI, R.; SASSI, N.; LOZANO, C.; BEN SLAMA, K.; OUZARI, I.; TORRES, C.; KLIBI, N.** 2017. Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in canine and feline enterococci in Tunisia. [en línea]. Acta Vet Hung. 65(2):173-184. <<https://doi.org/10.1556/004.2017.018>> [consulta 20-07-2021].
- **BERTELLONI, F.; SALVADORI, C.; LOTTI, G.; CERRI, D.; EBANI, V.** 2016. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* strains isolated from healthy domestic dogs. [en línea]. Acta Microbiol Immunol Hung. 64(3):301-312. <<https://doi.org/10.1556/030.63.2016.021>> [consulta 27-10-2022].
- **BYAPPANAHALLI, M. N.; NEVERS, M. B.; KORAJKIC, A.; STALEY, Z. R.; HARWOOD, V. J.** 2012. Enterococci in the Environment. [en línea]. Microbiol Mol Biol Rev. 76(4):685-706. <<https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>> [consulta 23-07-2021].
- **CERCENADO, E.** 2011. *Enterococcus*: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. [en línea]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 29(5):59-65. <<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/ccs-2010-bacteriologia.pdf>> [consulta 26-02-2023].
- **CHIONG, M.; LEISEWITZ, A.; MÁRQUEZ, F.; VIRONNEAU, L.; ÁLVAREZ, M.; TISCHLER, N.; PIÑONES, O.; MORENO, R.** 2018. *Manual de normas de bioseguridad y riesgos asociados.* [en línea]. Fondecyt—CONICYT. pp 11-56. <<https://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2018/06/Manual- Bioseguridad- junio 2018.pdf>> [consulta 23-07-2021].

- **CINQUEPALMI, V.; MONNO, R.; FUMAROLA, L.; VENTRELLA, G.; CALIA, C.; GRECO, M.; VITO, D.; SOLEO, L.** 2013. Environmental contamination by dog's faeces: a public health problem?. [en línea]. *Int J Environ Res Public Health*. 10:72-84. <<https://doi.org/10.3390/ijerph100010072>> [consulta 26-10-2022].
- **CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.** 2022. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. [en línea]. 32th ed. CLSI M100. <<http://em100.edaptivedocs.net/Login.aspx>> [consulta 16-05-2023].
- **CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.** 2020. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals. [en línea]. 5th ed. CLSI VET01S. <<http://clsivet.org/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20VET01S%20ED5:2020&scope=user>> [consulta 09-09-2022].
- **DAMBORG, P.; SORENSEN, A.; GUARDABASSI, L.** 2008. Monitoring of antimicrobial resistance in healthy dogs: First report of canine ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clonal complex 17. [en línea]. *Vet Microbiol* 132(1-2):190-196. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.04.026>> [consulta 20-02-2023].
- **DANMAP. DANISH PROGRAMME FOR SURVEILLANCE OF ANTIMICROBIAL CONSUMPTION AND RESISTANCE IN BACTERIA FROM FOOD ANIMALS, FOOD AND HUMANS.** 2019. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. [en línea] <<https://www.danmap.org/reports/2019>> [consulta 23-07-2021].
- **GALARCE, N.; ARRIAGADA, G.; SÁNCHEZ, F.; VENEGAS, V.; CORNEJO, J.; LAPIERRE, L.** 2021. Antimicrobial Use in Companion Animals: Assessing Veterinarians' Prescription Patterns through the First National Survey in Chile. [en línea]. *Animals*. 11(2):348. <<https://doi.org/10.3390/ani11020348>> [consulta 23-07-2021].
- **GALARCE, N.; MUÑOZ, L.; JARA, M. A.; LUBÍ, P.; SEPÚLVEDA, A.; ANTICEVIC, S.** 2016. Detección del gen *mecA* en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positiva aisladas desde gatos. [en línea]. *Rev Chilena Infectol*. 38(8):3092-3095. <<https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000400005>> [consulta 23-07-2021].

- **ISEPPI, R.; MESSI, P.; ANACARSO, I.; BONDI, M.; SABIA, C.; CONDÒ, C.; NIEDERHAUSERN, S.** 2015. Antimicrobial resistance and virulence traits in *Enterococcus* strains isolated from dogs and cats. [en línea]. *New Microbiol.* 38:369-378. <<https://iris.unimore.it/retrieve/e31e124b-aa53-987f-e053-3705fe0a095a/369.pdf>> [consulta 27-10-2022].
- **JACKSON, C.; FEDORKA-CRAY, P.; DAVIS, J.; BARRET, J.; FRYE, J.** 2009. Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from dogs and cats in the United States. [en línea]. *J Appl Microbiol.* 107:1269-1278. <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04310.x>> [consulta 28-10-2022].
- **KAKOULLIS, L.; PAPACHRISTODOULOU, E.; CHRA, P.; PANOS, G.** 2021. Mechanisms of Antibiotic Resistance in Important Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens and Novel Antibiotic Solutions. [en línea]. *Antibiotics.* 10(4):415. <<https://doi.org/10.3390/antibiotics10040415>> [consulta 03-02-2023].
- **KARIYAMA, R.; MUTSUHATA, R.; CHOW, J.W.; CLEWELL, D.B.; KUMON, H.** 2000. Simple and Reliable Multiplex PCR Assay for Surveillance Isolates of Vancomycin-Resistant Enterococci. [en línea]. *J Clin Microbiol.* 38(6):476-482. <<https://doi.org/10.1128/JCM.38.8.3092-3095.2000>> [consulta 09-06-2021].
- **KATAOKA, Y.; ITO, C.; KAWASHIMA, A.; ISHII, M.; YAMASHIRO, S.; HARADA, K.; OCHI, H.; SAWADA, T.** 2013. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from dogs and cats subjected to differing antibiotic pressures. [en línea]. *J Vet Med Sci.* 75(6):749-753. <<https://doi.org/10.1292/jvms.12-0243>> [consulta 27-10-2022].
- **KUBAŠOVÁ, I.; STROMPFOVÁ, V.; LAUKOVÁ, A.** 2017. Safety assessment of commensal enterococci from dogs. [en línea]. *Folia Microbiol.* 62:491-498. <<https://doi.org/10.1007/s12223-017-0521-z>> [consulta 19-10-2022].
- **MAGIORAKOS, A.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.; GISKE, C.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LIJEQUIST, B.; PATERSON, D.; RICE, L.; STELLING, J.; STRUELENS, M.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.; MONNET, D.** 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. [en línea]. *Clin Microbiol Infect.* 18(3):268-281.

<<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>> [consulta 09-06-2021].

- **MORENO, A.; BELLO, H.; GUGGIANA, D.; DOMÍNGUEZ, M.; GONZÁLEZ, G.** 2008. Extended-spectrum β -lactamases belonging to CTX-M group produced by *Escherichia coli* strains isolated from companion animals treated with enrofloxacin. [en línea]. *Vet Microbiol*, 129(1-2):203-208. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.011>> [consulta 09-06-2021].
- **MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A.** 2013. *Enterococcus* and other Gram positive cocci. **In:** *Medical Microbiology*. 7th ed. Elsevier Saunders. Philadelphia, United States. pp. 205-208.
- **NARMS. NATIONAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING SYSTEM FOR ENTERIC BACTERIA.** 2022. Antibiotic Resistance and NARMS Surveillance. [en línea] <<https://www.cdc.gov/narms/faq.html>> [consulta 23-05-2023].
- **OGUTTU, J.; QEKWANA, D.; ODOIM A.** 2021. Prevalence and Predictors of Antimicrobial Resistance Among *Enterococcus* spp. from Dogs presented at a Veterinary Teaching Hospital, South Africa. [en línea]. *Front Vet Sci*. 7:589439. <<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.589439>> [consulta 26-10-2021].
- **OLIVEIRA, M.; TAVARES, M.; GOMES, D.; TOURET, T.; SÃO BRAZ, B.; TAVARES, L.; SEMEDO-LEMSADDEK, T.** 2016. Virulence traits and antibiotic resistance among enterococci isolated from dogs with periodontal disease. [en línea]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 46, 27-31. <<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.04.002>> [consulta 26-10-2021].
- **O'NEILL, J.** 2014. Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations/the Review on Antimicrobial Resistance. [en línea]. <<https://wellcomecollection.org/works/rdpck35v>> [consulta 03-06-2021].
- **OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** s/f. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS). [en línea]. <<https://www.who.int/initiatives/glass>> [consulta 23-05-2023].
- **OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2017a. Lista OMS de Antimicrobianos de Importancia Crítica para la Medicina Humana 5ta Revision. [en línea] <<https://www.who.int/foodsafety/publications/cia2017es.pdf>> [consulta 06-06-2021].

- **OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2017b. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. [en línea]. <https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf> [consulta 06-06-2021].
- **OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2021. 2020 Antibacterial agents in clinical and preclinical development an overview and analysis. [en línea]. <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/340694/9789240021303-eng.pdf>> [consulta 29-10-2022].
- **OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 2022. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. ISBN: 9789240062702. [en línea]. <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702>> [consulta 23-05-2022].
- **OMSA. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL.** 2019. Lista de agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria. [en línea]. <https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/E_OIE_Lista_antimicrobianos_Julio2019.pdf> [consulta 06-06-2021].
- **PAHO. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION.** s/f. Latin American and Caribbean Network for Antimicrobial Resistance Surveillance – ReLARVA+. [en línea]. <<https://www.paho.org/en/topics/antimicrobial-resistance/latin-american-and-caribbean-network-antimicrobial-resistance>> [consulta 23-05-2023].
- **SPOSATO, A.; CORDISCO, M.; RUVO, G.; FERRO, S.; RAINERI, R.; TROTTA, A.; BUONAVOGLIA, D.; CORRENTE, M.** 2022. Multidrug resistant *Enterococcus faecium* isolate from cholangitis/cholecystitis in a Dog. [en línea]. Vet Med Sci. 8:1366-1372. <<https://doi.org/10.1002/vms3.826>> [consulta 18-10-2022].
- **STĘPIEŃ-PYŚNIAK, D.; BERTELLONI, F.; DEC, M.; CAGNOLI, G.; PIETRAS-OZGA, D.; URBAN-CHMIEL, R.; EBANI, V.** 2021. Characterization and comparison of *Enterococcus* spp. isolates from feces of healthy dogs and urine of dogs with UTIs. [en línea]. Animals. 11:2845. <<https://doi.org/10.3390/ani11102845>> [consulta 24-10-2022].
- **SWEDRES-SVARM.** 2019. Sales of antibiotics and occurrence of resistance in Sweden.

Solna/Uppsala. [en línea]. <<https://www.sva.se/media/0hihej1c/swedres-svarm-2019.pdf>> [consulta 23-07-2021].

- **THERMOFISHER.** s/f. Selective media for the isolation of Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) and High Level Aminoglycoside Resistant Enterococci (HLARE) from clinical samples. [en línea]. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SR0247E?SID=srch-srp-SR0247E>> [consulta 10-10-2021].
- **TORRES, C.; ALONSO, C.; RUIZ-RIPA, L.; LEON-SAMPEDRO, R.; DEL CAMPO, R.; COQUE, M.** 2018. Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. [en línea]. Microbiol Spectr. 6(4) < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30051804/>> [consulta 25-04-2023].
- **TROŚCIAŃCZYK, A.; NOWAKIEWICZ, A.; GNAT, S.; LAGOWSKI, D.; OSIŃSKA, M.** 2021. Are dogs and cats a reservoir of resistant and virulent *Enterococcus faecalis* strains and a potential threat to public health?. [en línea]. J Appl Microbiol. 131:2061-2071. <<https://doi.org/10.1111/jam.15074>> [consulta 26-10-2022].
- **UNION EUROPEA.** 2013. Commission Implementing Decision of 12 November 2013 on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria. [en línea]. <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32013D0652>> [consulta 23-07-2021].
- **VANDECASTEELE, S.; DE VRIESE, A.** 2010. Recent changes in vancomycin use in renal failure. [en línea]. Kidney Int. 77(9):760-764. <[https://www.kidney-international.org/article/S0085-2538\(15\)54367-6/fulltext](https://www.kidney-international.org/article/S0085-2538(15)54367-6/fulltext)> [consulta 25-02-2023].
- **VAN DEN BUNT, G.; TOP, J.; HORDIJK, J.; DE GREEFF, S.; MUGHINI-GRAS, L.; CORANDER, J.; VAN PELT, W.; BONTEN, M.; FLUIT, A.; WILLEMS, R.** 2018. Intestinal carriage of ampicillin- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in humans, dogs and cats in the Netherlands. [en línea]. J of Antimicrob Chemother, 73(3):607-614. <<https://doi.org/10.1093/jac/dkx455>> [consulta 30-07-2021].
- **VERGARA, C.** 2021. Normativa en el uso y registro de antibioticos en Chile y el mundo. In: Curso de Actualización: claves para el uso adecuado de antibióticos en Medicina Veterinaria.

Santiago, Chile. 15 junio 2021. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias.

- **WERNER, G.; COQUE, T.; FRANZ, C.; GROHMANN, E.; HEGSTAD, K.; JENSEN, L.; VAN SCHAİK, W.; WEAVER, K.** 2013. Antibiotic resistant enterococci—Tales of a drug resistance gene trafficker. [en línea] *Int J of Med Microbiol*, 303(6-7):360-379. <<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.03.001>> [consulta 23-07-2021].
- **WILCKS, A.; ANDERSEN, S.; LICHT, T.** 2005. Characterization of transferable tetracycline resistance genes in *Enterococcus faecalis* isolated from raw food. [en línea]. *FEMS Microbiol Lett*. 243(1):15-19. <<https://academic.oup.com/femsle/article/243/1/15/434653>> [consulta 03-02-2023].
- **ZHANG, Y.; WANG, L.; ZHOU, C.; LIN, Y.; LIU, S.; ZENG, W.; YU, K.; ZHOU, T.; CAO, J.** 2022. Unraveling Mechanisms and Epidemic Characteristics of Nitrofurantoin Resistance in Uropathogenic *Enterococcus faecium* Clinical Isolates. [en línea]. *Infect Drug Resist* 14:1601-1611. <<https://www.dovepress.com/unraveling-mechanisms-and-epidemic-characteristics-of-nitrofurantoin-r-peer-reviewed-fulltext-article-IDR>> [consulta 21-02-2023].

ANEXO 1. Consentimiento informado para el proyecto de investigación.

Consentimiento informado para el proyecto de investigación "Revelando el rol de los perros como reservorios de bacterias resistentes a antimicrobianos críticos y sus factores de riesgo asociados: Un problema crítico para la salud animal"

Investigador Principal: Dra. Lissette Lapierre.

Investigadores Participantes: Nicolás Galarce G.; Gabriel Arriagada; Fernando Sánchez; Carlos Zelaya; Sofía Matus; Rocío Vilches; Mauricio Miranda; Camila Varela.

Fecha:

Este Formulario de Consentimiento Informado se dirige a tutores de animales de compañía los cuales se les invita a participar en el proyecto FONDECYT No1210692 "Revelando el rol de los perros como reservorios de bacterias resistentes a antimicrobianos críticos y sus factores de riesgo asociados: Un problema crítico para la salud animal".

Yo _____, con domicilio en la comuna de _____; propietario de: _____. Manifiesto que he sido informado e invitado a participar en el proyecto FONDECYT **No1210692** investigación denominada "Revelando el rol de los perros como reservorios de bacterias resistentes a antimicrobianos críticos y sus factores de riesgo asociados: Un problema crítico para la salud animal", el cual es un proyecto de investigación científica que cuenta con el respaldo y financiamiento de la agencia nacional de investigación y desarrollo, FONDECYT.

Entiendo que este estudio busca conocer datos epidemiológicos sobre mí y sobre mi mascota, abarcando aspectos del entorno, clínicos y demográficos; y consistirá en responder una encuesta que demora alrededor de 6 minutos y la toma de muestra de heces de mi mascota. Me han explicado que este proceso será estrictamente confidencial, es decir, mi nombre no será utilizado en ningún informe cuando los resultados de la investigación sean publicados. Asimismo, mi participación es voluntaria y sé que puedo negar mi participación, sin expresión de causa ni consecuencias negativas para mí. El estudio no conlleva ningún riesgo, ni recibe ningún beneficio y no recibiré ninguna compensación por participar.

Si tiene alguna pregunta sobre esta investigación, se puede comunicar con los investigadores participantes mediante los siguientes correos electrónicos, proyectodetituloramperros@gmail.com ; llapierre@uchile.cl y ngalarce@ug.uchile.cl. Por lo tanto, acepto voluntariamente participar en este estudio y declaro haber recibido una copia del presente documento.

Firma Tutor

ANEXO 2. Certificado de Bioética para el proyecto de investigación.



Santiago, 25 de marzo de 2021

Certificado N°: 21439 – VET – UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo 04 - 2021 del Proyecto de Investigación titulado *“Revealing the role of pet dogs as reservoirs of bacteria resistant to critical antimicrobials and its associated risk factors: A critical problem for animal health”* de la investigadora **Dra. Lisette Lapierre Acevedo**, Profesora Asistente, Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas bioéticas de manejo y cuidado de animales. Así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

La investigadora se ha comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de **600 perros**, especie *Canis lupus familiaris*, provenientes de la **Red de Atención Veterinaria de la Universidad de Chile en la Región Metropolitana**, desde **abril de 2021 a diciembre de 2021**, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **FONDECYT Regular proyecto N°1210692**.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.

Ronald Vargas Casanova
Director
CICUA – VID
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
<http://www.uchile.cl/portal/investigacion/152120/comite-institucional-de-cuidado-y-uso-de-animales-cicua>
email: coordinador.cicua@uchile.cl

ANEXO 3. Certificado Bioseguridad para el proyecto de investigación.



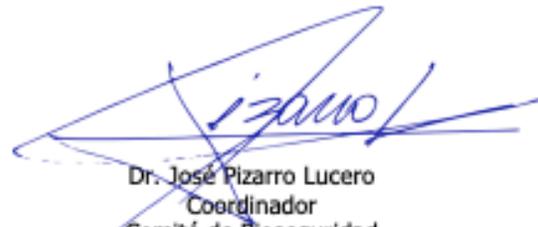
CERTIFICADO N° 169

Santiago, 25 de marzo 2021.-

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile ha revisado el proyecto Fondecyt 1210692 **"Revealing the role of pet dogs as reservoirs of bacteria resistant to critical antimicrobials and its associated risk factors: A critical problem for animal health"**, de la investigadora responsable Dra. Lisette Lapierre Acevedo, académica del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

La evaluación del citado proyecto permite acreditar que las normas de bioseguridad que se encuentran descritas en el mismo y en el formulario de solicitud de certificados de bioseguridad de FAVET, son las adecuadas según las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas Bioseguridad y Riesgos Asociados Fondecyt – CONICYT, versión 2018" y en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005)", que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.

Se otorga el presente certificado a solicitud de la interesada, para los fines que estime conveniente.



Dr. José Pizarro Lucero
Coordinador
Comité de Bioseguridad
FAVET – Universidad de Chile

ANEXO 4. Resultados cepas analizadas por sistema automatizado SENSITITRE.

Las 64 cepas analizadas por SENSITITRE presentaron resistencia a al menos un antibiótico de los analizados. En base a los antibióticos analizados en la placa, se observó que 38 (59%) de las cepas analizadas fueron resistentes a BPEN, 33 (52%) a ampicilina (AMP), 63 (98%) a ciprofloxacino (CIP), 51 (79%) a levofloxacino (LEV), 20 (31%) a moxifloxacino (MOX), 57 (89%) a ERI, 51 (80%) a TET, 8 (13%) a tigeciclina (TIG), 24 (37%) a NIT, 9 (14%) a CHL, 15 (23%) a daptomicina (DAP), 12 (19%) a linezolid (LIN), 19 (30%) a altas concentraciones de gentamicina (GEN), 25 (39%) a altas concentraciones de estreptomicina (EST), 57 (89%) a rifampicina (RIF).

Se analizaron 8 cepas de *E. faecalis* de las cuales 3 (38%) de las cepas fueron resistentes a BPEN, 2 (25%) a AMP, 7 (88%) a CIP, 4 (50%) a LEV, 6 (75%) a ERI, 8 (100%) a TET, 4 (50%) a CHL, 1 (13%) a GEN, 2 (25%) a EST y 4 (50%) a RIF. En cuanto a las 56 cepas de *E. faecium* analizadas, 35 (63%) presentaron resistencia a BPEN, 31 (55%) a AMP, 56 (100%) a CIP, 47 (84%) a LEV, 20 (36%) a MOX, 51 (91%) a ERI, 43 (77%) a TET, 8 (14%) a TIG, 24 (43%) a NIT, 5 (9%) a CHL, 12 (21%) a LIN, 15 (27%) a DAP, 18 (32%) a GEN, 23 (41%) a EST y 51 (91%) a RIF.

Se pudo observar la presencia de MDR en 7 cepas (11%) de *E. faecalis* y 11 cepas (89%) de *E. faecium*.

Tabla Nro. 5: Resistencia fenotípica de 8 cepas de *E. faecalis*, 56 cepas de *E. faecium* a 16 antimicrobianos evaluados por SENSITITRE.

	BPEN		AMP		CIP		LEV		MOX		ERI		TET		TIG		NIT		CHL		VAN		LIN		DAP		GEN		EST		RIF	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>E. faecalis</i>	3	37,5	2	25	7	87,5	4	50	0	0	6	75	8	100	0	0	0	0	4	50	0	0	0	0	0	0	1	12,5	2	25	4	50
<i>E. faecium</i>	35	63	31	55	56	100	47	84	20	36	51	91	43	77	8	14	24	43	5	9	0	0	12	21	15	27	18	32	23	41	51	91

BPEN, bencilpenicilina; AMP, ampicilina; CIP, ciprofloxacino; LEV, levofloxacino; MOX, moxifloxacino; ERI, eritromicina; TET, tetraciclina; TIG, tigeciclina; NIT, nitrofurantoina; CHL, cloranfenicol; VAN, vancomicina; LIN, linezolid; DAP, daptomicina; GEN, gentamicina en alta concentración; EST, estreptomicina en alta concentración; RIF, rifampicina.

Tabla Nro. 6: CMI₅₀ y CMI₉₀ de los antimicrobianos analizados por SENSITITRE contra *E. faecalis* (8) y *E. faecium* (56) aisladas de perros.

Clase Antimicrobiana	Antimicrobianos	<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>		Rango (µg/mL)	Punto de Corte (µg/mL)
		CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)		
β-lactámicos	BPEN	4	>8	>8	>8	1 - >8	S: ≤ 8 R: ≥ 16
	AMP	1	>8	>8	>8	0,25 - >8	S: ≤ 8 R: ≥ 16
Quinolonas	CIP	2	>2	>2	>2	≤1 - >2	S: ≤1 I: 2 R: ≥4
	LEV	2	>4	4	>4	1 - >4	S: ≤2 I: 4 R: ≥8
	MOX	1	2	4	>4	≤0,25 - >4	S: ≤4 R: ≥4
Macrólidos	ERI	>4	>4	4	>4	≤0,25 - >4	S: ≤0,5 I: 1 - 4 R: ≥8
Tetraciclinas	TET	>16	>16	>16	>16	≤2 - >16	S: ≤4 I: 8 R: ≥16
	TIG	0,12	0,12	0,12	0,5	0,06 - >0,5	S: ≤0,25 R: ≥0,5
Nitrofuranos	NIT	≤32	≤32	≤32	>64	≤32 - >64	S: ≤32 I: 64 R: ≥128
Fenicoles	CHL	≤2	>16	8	8	≤2 - >16	S: ≤8 I: 16 R: ≥32
Oxazolidinones	LIN	≤1	≤1	≤1	4	≤1 - 4	S: ≤2 I: 4 R: ≥8
Lipopéptidos cíclicos	DAP	2	2	4	>4	2 - >4	S: ≤2 I: 4 R: ≥8
Rifamicinas	RIF	2	4	4	>4	≤0,5 - >4	S: ≤1 I: 2 R: ≥4
Aminoglucósidos	GEN	≤500	≤500	≤500	>500	≤500 - >500	
	EST	≤1000	>1000	≤1000	>1000	≤1000-1000	

BPEN, bencilpenicilina; AMP, ampicilina; CIP, ciprofloxacino; LEV, levofloxacino; MOX, moxifloxacino; ERI, eritromicina; TET, tetraciclina; TIG, tigeciclina; NIT, nitrofurantoina; CHL, cloranfenicol; LIN, linezolid; DAP, daptomicina; RIF, rifampicina; GEN, gentamicina en alta concentración; EST, estreptomicina en alta concentración. Puntos de corte obtenidos del CLSI, 2020 y CLSI, 2022.

Tabla Nro. 7: Perfiles de resistencia de cepas analizadas por medio del sistema automatizado SENSITIRE con el plato GPALL1F, en base las cepas analizadas por este método.

	Nº cepas	%	Perfil de resistencia	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
64	1	2	BPEN + CIP + ERI + TET	1	0
	1	2	BPEN + CIP + ERI + TET + RIF	0	1
	1	2	BPEN + CIP + ERI + TET + RIF + GEN	1	0
	1	2	BPEN + CIP + LEV + ERI + TET + NIT + RIF	0	1
	1	2	BPEN + CIP + LEV + ERI + TET + NIT + EST + RIF	0	1
	1	2	BPEN + AMP + CIP + TET + RIF	0	1
	1	2	BPEN + AMP + CIP + ERI + CHL + EST	0	1
	1	2	BPEN + AMP + CIP + ERI + TET + RIF	0	1
	1	2	BPEN + AMP + CIP + TET + NIT + RIF	0	1
	2	3	BPEN + AMP + CIP + ERI + TET + GEN + EST	0	2
	2	3	BPEN + AMP + CIP + LEV + TET + NIT + RIF	0	2
	2	3	BPEN + AMP + CIP + ERI + TET + EST + RIF	1	1
	1	2	BPEN + AMP + CIP + LEV + ERI + TET + DAP + RIF	0	1
	1	2	BPEN + AMP + CIP + LEV + ERI + TET + EST + RIF	0	1
	1	2	BPEN + AMP + CIP + ERI + TET + DAP + EST + RIF	0	1
	2	3	BPEN + AMP + CIP + LEV + ERI + TET + CHL + EST + RIF	0	2
	3	5	BPEN + AMP + CIP + LEV + MOX + ERI + TET + GEN + RIF	0	3
	1	2	BPEN + AMP + CIP + LEV + ERI + TET + CHL + DAP + GEN + EST	0	1
	10	16	BPEN + AMP + CIP + LEV + MOX + ERI + TET + GEN + EST + RIF	0	10
	1	2	BPEN + AMP + CIP + LEV + MOX + ERI + TET + NIT + EST + RIF	0	1
	1	2	BPEN + AMP + CIP + LEV + ERI + TET + NIT + LIN + DAP + RIF	0	1
	1	2	BPEN + AMP + CIP + LEV + MOX + ERI + TET + NIT + GEN + EST + RIF	0	1
	1	2	BPEN + AMP + CIP + LEV + MOX + ERI + TIG + NIT + DAP + GEN + EST + RIF	0	1
	1	2	CIP + LEV + RIF	0	1
	2	3	CIP + LEV + ERI + RIF	0	2
	1	2	CIP + ERI + TET + RIF	0	1
	3	5	CIP + LEV + ERI + TET + RIF	0	3
	1	2	CIP + LEV + ERI + NIT + RIF	0	1
	1	2	CIP + LEV + ERI + TET + CHL	1	0
	1	2	CIP + LEV + ERI + TET + NIT + RIF	0	1
	1	2	CIP + LEV + ERI + NIT + DAP + RIF	0	1
	1	2	CIP + LEV + ERI + NIT + LIN + RIF	0	1
	2	3	CIP + LEV + ERI + TET + CHL + RIF	2	0
1	2	CIP + LEV + ERI + NIT + LIN + DAP + RIF	0	1	

1	2	CIP + LEV + ERI + TET + CHL + EST + RIF	1	0
1	2	CIP + LEV + MOX + TET + NIT + LIN + DAP + RIF	0	1
1	2	CIP + LEV + ERI + TET + NIT + LIN + DAP + RIF	0	1
1	2	CIP + LEV + ERI + TIG + NIT + LIN + DAP + RIF	0	1
1	2	CIP + LEV + ERI + TIG + NIT + CHL + LIN + RIF	0	1
2	3	CIP + LEV + MOX + ERI + TIG + NIT + LIN + DAP + RIF	0	2
2	3	CIP + LEV + ERI + TET + TIG + NIT + LIN + DAP + RIF	0	2
1	2	CIP + LEV + MOX + ERI + TET + TIG + NIT + LIN + DAP + RIF	0	1
1	2	TET	1	0

BPEN, bencilpenicilina; CIP, ciprofloxacino; ERI, eritromicina; TET, tetraciclina; RIF, rifampicina; GEN, gentamicina en alta concentración; LEV, levofloxacino; NIT, nitrofurantoina; EST, estreptomicina en alta concentración; AMP, ampicilina; CHL, cloranfenicol; DAP, daptomicina; MOX, moxifloxacino; LIN, linezolid; TIG, tigeciclina.