



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CLÍNICA Y CIRUGÍA DE PEQUEÑAS ESPECIES

**IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus pseudintermedius* y Gen de resistencia *mecA*
POR MEDIO DE PCR DE 86 HISOPADOS CORNEALES OBTENIDOS DE
PERROS SANOS DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA**

SANTIAGO ALEJANDRO ASQUI AGUAYO, MvZ.

Modalidad de Titulación: Presencial

Tutora: MVZ. GABRIELA MEJÍA FREIRE MSc.

Cotutor: MVZ. ROBERT GUSTAVO SÁNCHEZ PRADO M.Sc.

MACHALA, 2024

PENSAMIENTO

“Ser mas, para servir mejor”

San Ignacio de Loyola

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a Dios.

Dedico a Dayana mi esposa, y mi hija Emma. Fuente de inspiración y motivación diaria

Dedico a mi padre Edgar Asqui (+), quien me enseñó a vivir sirviendo a los demás.

Dedico a mi Abuelita Inés Lupera, maestra de mis primeras lecciones de vida.

AGRADECIMIENTOS

- Agradecimientos a la Universidad Técnica de Machala, por la formación brindada en mi perfil profesional.
- Agradecimientos a la Dra. Gabriela Mejía, docente de la maestría de la Universidad Técnica de Machala, por las arduas horas de trabajo desinteresado y dedicación a fortalecer este proyecto.
- Agradecimiento a la Dra. María Inés Baquero, docente de la cátedra de MICROBIOLOGÍA de la UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, por la ayuda y predisposición brindada.
- Agradecimiento a LABIGEN laboratorio de Biología Molecular dirigido por el Dr. David de la Torre, por brindar las facilidades para realizar la identificación en su laboratorio.

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, Santiago Alejandro Asqui Aguayo con C.I.0604823211, declaro que el trabajo de **“IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus pseudintermedius* y Gen de resistencia *mecA* POR MEDIO DE PCR DE 86 HISOPADOS CORNEALES OBTENIDOS DE PERROS SANOS DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA”**, en opción al título de Magister en la Maestría en Clínica y Cirugía de Pequeñas Especies, es original y auténtico; cuyo contenido: conceptos, definiciones, datos empíricos, criterios, comentarios y resultados son de mi exclusiva responsabilidad.

SANTIAGO ALEJANDRO ASQUI AGUAYO

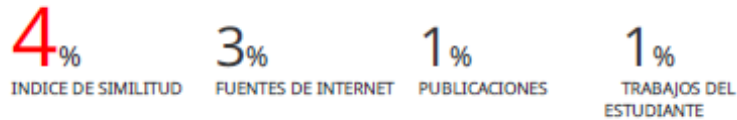
C.I.0604823211

Machala, 2024/mayo/12

REPORTE DE SIMILITUD

IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus pseudintermedius* y Gen de resistencia *mecA* POR MEDIO DE PCR DE 86 HISOPADOS CORNEALES OBTENIDOS DE PERROS SANOS DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Técnica de Machala Trabajo del estudiante	1 %
2	dspace.ucuenca.edu.ec Fuente de Internet	1 %
3	www.fecobiove.org Fuente de Internet	1 %
4	revistas.unlp.edu.ar Fuente de Internet	1 %

Excluir citas Activo Excluir coincidencias < 1%
Excluir bibliografía Activo

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Yo, María Gabriela Mejía Freire con C.I. 0104191168; tutor del trabajo de titulación **“IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus pseudintermedius* y Gen de resistencia *mecA* POR MEDIO DE PCR DE 86 HISOPADOS CORNEALES OBTENIDOS DE PERROS SANOS DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA”**, en opción al título de Magister en la Maestría en Clínica y Cirugía de Pequeñas Especies”, declaro que el trabajo ha sido revisado, y está enmarcado en los procedimientos científicos, técnicos, metodológicos y administrativos establecidos por la Dirección de Posgrado de la Universidad Técnica de Machala (UTMACH), razón por la cual doy fe de los méritos suficientes para que sea presentado a evaluación.

MVZ. MARÍA GABRIELA MEJÍA FREIRE MSc.
C.I. 0104191168

Machala, 2024

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTORÍA

Yo, Santiago Alejandro Asqui Aguayo con C.I.0604823211, autor del trabajo de titulación “**IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus pseudintermedius* y Gen de resistencia *mecA* POR MEDIO DE PCR DE 86 HISOPADOS CORNEALES OBTENIDOS DE PERROS SANOS DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA**”, en opción al título de Magister en la Maestría en Clínica y Cirugía de Pequeñas Especies, declaro bajo juramento que:

- El trabajo aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido presentado previamente para ningún grado o calificación profesional. En consecuencia, asumo la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.
- Cede a la Universidad Técnica de Machala de forma exclusiva con referencia a la obra en formato digital los derechos de:
 - a. Incorporar la mencionada obra en el repositorio institucional para su demostración a nivel mundial, respetando lo establecido por la Licencia *Creative Commons Attribution-NoCommercial* – Compartir Igual 4.0 Internacional (CC BY NCSA 4.0); la Ley de Propiedad Intelectual del Estado Ecuatoriano y el Reglamento Institucional.
 - b. Adecuarla a cualquier formato o tecnología de uso en INTERNET, así como correspondiéndome como Autor la responsabilidad de velar por dichas adaptaciones con la finalidad de que no se desnaturalice el contenido o sentido de la misma.

SANTIAGO ALEJANDRO ASQUI AGUAYO

C.I.0604823211

Machala, 2024/05/12

RESUMEN

El manejo terapéutico de patologías oculares se basa en el uso oportuno de antibióticos, para evitar efectos irreversibles que perjudique al globo ocular. Actualmente, se ha identificado a *S. pseudintermedius* como la bacteria oportunista más prevalente en el microbioma normal de la conjuntiva y córnea de perros sanos. Por lo que representa una amenaza para el tratamiento efectivo de infecciones oculares, debido a la capacidad evolutiva de sus cepas, que adquieren características genéticas de resistencia antimicrobiana.

La identificación del gen de resistencia *mecA* de *S. pseudintermedius* permite comprender la existencia de poblaciones resistentes a meticilina en caninos sanos y generar estrategias para el uso responsable de antibióticos. El objetivo de esta investigación fue identificar a estas bacterias mediante la secuenciación del gen *spsJ* para *S. pseudintermedius* y gen de resistencia *mecA* por técnica de PCR *Nested* en muestras obtenidas de 86 hisopados corneales de perros sanos de la ciudad de Riobamba.

Además, se investigó si existe relación entre la producción lacrimal y la conformación del cráneo, con presencia de la bacteria. Para el análisis de datos se describieron frecuencias y asociaciones mediante pruebas de Chi². Se determinó que el 33% de las muestras fueron *S. pseudintermedius*, y el 5% del total de muestras tiene el gen de resistencia *mecA*. No se determinó un efecto asociativo con la producción lagrimal, edad, sexo o estado reproductivo, aunque se hallaron indicios de una mayor probabilidad de hallazgo de esta bacteria en animales braquiocefálicos. Estos datos se tornan relevantes en la toma de decisiones médicas oportunas en patologías oculares y sirven para prevenir infecciones, aporta a la base de datos mundial y local sobre resistencia microbiana. Este trabajo corresponde a los primeros estudios realizados en el Ecuador y el primero en el microbioma ocular canino.

PALABRAS CLAVES: Microbioma corneal, Resistencia Bacteriana, Braquiocefálico, PCR *Nested*,

ABSTRACT

The therapeutic management of ocular pathologies is based on the timely use of antibiotics to prevent irreversible effects that harms the ocular globe. Currently, It has been identified to *S. pseudintermedius* as an opportunistic bacterium that prevails in the normal microbiome of healthy dogs' conjunctiva and cornea. As a result of which poses a threat to the effective treatment of eye infections due to the evolutionary capacity of its strains, which acquires genetic characteristics of antimicrobial resistance.

The identification of the *mecA* resistance gene in *S. pseudintermedius* allows understanding the existence of methicillin-resistant populations in healthy dogs, and developing strategies for the responsible use of antibiotics. The objective of this research was to identify these bacteria, through the sequencing of the *spsJ* gene in *S. pseudintermedius* and the *mecA* resistance gene, using the *Nested* PCR technique. Samples were obtained from 86 corneal swabs in healthy dogs from Riobamba city.

Moreover, the study focused on determining whether there is a relation between the lacrimal production and the skull shape with the presence of the bacterium. For the data analysis, frequencies and associations were described by using Chi-square test. Thirty-three percent of the samples were determined to be *S. pseudointermedius*, and five percent of the total samples have the *mecA* resistance gene. It did not determine an associative effect due to lacrimal production, age, sex or reproductive status, although there was some evidence that exists a greater likelihood of finding these bacteria in brachycephalic animals. These data become significant for timely medical decision-making in ocular pathologies and contribute to prevent infections as well as to enrich the global and local database on bacterial resistance. This is one of the first study took place in Ecuador and the first one done in canine ocular microbiome.

KEY WORDS: Corneal Microbiome, Bacterial Resistance, Brachiocephalic, PCR Nested, *S. pseudointermedius*.

ÍNDICE

PENSAMIENTO	1
DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA	4
REPORTE DE SIMILITUD	5
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR	6
CESIÓN DE DERECHOS DE AUTORÍA	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
ÍNDICE DE TABLAS	13
ÍNDICE DE FIGURAS	14
ÍNDICE DE GRÁFICOS	14
ÍNDICE DE ANEXOS	16
INTRODUCCIÓN	17
Objetivo General	19
Objetivos específicos	19
CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO	20
1.1 Anatomía Ocular	20
1.1.1 Párpados	21
1.1.2 Conjuntiva	22
1.1.3 Sistema lagrimal y nasolagrimal	22
1.1.4 Córnea y esclera	24
1.2 Microbioma Ocular	25
1.3 Resistencia al Antibiótico	27
1.3.1 Resistencia a Dicloxacilina y Oxacilina	29
1.3.2 Resistencia a Meticilinas	30
1.4 Farmacología ocular y terapéutica	30
1.4.1 Rutas de administración	31

1.4.2	Selección y administración de antibióticos	32
1.4.3	Selección de Antibióticos	33
1.4.6	Uso de las Meticilinas en Veterinaria.....	36
1.5	Enfermedades Oftalmológicas en perros	36
1.5.1	Signos de Enfermedades Oftalmológicas en Caninos	37
1.5.2	Enfermedades Oftalmológicas en perros causadas por <i>Staphylococcus</i>	37
1.6	<i>Staphylococcus spp.</i>	38
1.6.1	Identificación de <i>Staphylococcus pseudointermedius</i>	40
1.7	Gen <i>mecA</i>	41
1.7.1	Identificación del gen <i>mecA</i> mediante PCR.....	42
1.8	Diagnóstico de enfermedades oculares	42
1.8.1	Test de Schirmer tipo 1	43
1.9	Razas predisponentes a Enfermedades Oftalmológicas	44
1.9.1	Enfermedades Oculares en Animales Braquiocefálicos	44
1.9.2	Enfermedades Oculares en Animales no braquiocefálicos	44
CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS		46
2.1	Tipo de Estudio.....	46
2.2	Paradigma de la Investigación	46
2.3	Ubicación	46
2.4	Población de Estudio.....	48
2.5	Materiales.....	48
2.6	VARIABLES de Estudio	49
2.7	Procedimiento.....	52
2.8	Técnica de Secuenciación.....	52
2.9	Detección molecular para gen de resistencia <i>mecA</i>	55
2.10	Análisis estadístico.....	56
CAPITULO 3. RESULTADOS.....		57
3.1	Análisis de las frecuencias.....	57

3.2 Relación de la presencia de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> con la Variables de Estudio.....	59
3.3 Análisis de la relación de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> con la Conformación del Cráneo.	64
3.4 Análisis de la asociación de <i>S. pseudintermedius</i> con la producción lacrimal.....	65
3.5. Relación de la presencia de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistente (Gen <i>mecA</i>) con la producción lacrimal y la Conformación del Cráneo.	68
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	70
CONCLUSIONES	74
RECOMENDACIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXOS	86
Anexo 1. Algoritmo de identificación de <i>Staphylococcus</i> spp.....	86
Anexo 2. Datos para muestreo.....	88
Anexo 3. Ficha de examen oftalmológico	89
Anexo 4. Protocolo de PCR para detección del gen <i>mecA</i> en aislamientos de <i>Staphylococcus</i> spp.....	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales y Equipos	49
Tabla 2. Variables Independientes	49
Tabla 3 Variables Dependientes.....	50
Tabla 4 Variables Intervinientes	51
Tabla 5 Identificación fenotípica de las colonias	54
Tabla 6 Identificación bioquímica de Staphylococcus spp. Catalasa positivos	55
Tabla 7 Análisis de la producción Lagrimal en relación a la Posición Anatómica del Ojo. 66	
Tabla 8 Análisis de la producción Lacrimal en Relación al Sexo.....	67
Tabla 9 Análisis de la producción Lacrimal en Relación a la Esterilización.	67
Tabla 10 Análisis de la producción Lacrimal del Ojo en Relación a la Edad.....	67
Tabla 11 Análisis de la producción Lacrimal del Ojo en Relación a los casos de Staphylococcus	69
Tabla 12 Análisis de la producción Lacrimal del Ojo en Relación a la Conformación Craneal.	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Anatomía del globo ocular canino.....	20
Figura 2.	Anatomía Ocular-Estructuras anatómicas internas del ojo.....	21
Figura 3.	Película lagrimal	23
Figura 4.	Vías de administración de fármacos en Oftalmología.....	32
Figura 5.	Clasificación de antibióticos oftálmicos comunes	33
Figura 6.	Ubicación espacial de LABIGEN.....	47
Figura 7.	Ubicación espacial de Riobamba-Chimborazo.....	47
Figura 8.	Amplificación específica del gen mecA en muestras obtenidas de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> , previamente identificados en cada individuo, mediante electroforesis en gel agarosa.	58

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Presencia de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> en 86 muestras de caninos sanos.	57
-----------	---	----

Gráfico 2 Presencia del Gen <i>mecA</i> , dentro de las muestras totales en caninos sanos.....	58
Gráfico 3 Presencia del Gen <i>mecA</i> , dentro de muestras positivas para <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> en caninos	59
Gráfico 4 Presencia de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> en la población de caninos sanos.	¡Error! Marcador no definido.
Gráfico 5 Asociación de la Presencia de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> con la Ubicación de los Ojos del Canino.	60
Gráfico 6 Distribución de Casos Resistentes a Meticilina (Gen <i>mecA</i>) en base a la ubicación de los Ojos del Canino.	60
Gráfico 7 Asociación de la Prevalencia de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> con el sexo del Canino.	61
Gráfico 9 Asociación de la Prevalencia de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> con la esterilización del Canino.	62
Gráfico 10 Distribución de Casos Resistentes a Meticilina (Gen <i>mecA</i>) en relación la esterilización del canino.	¡Error! Marcador no definido.
Gráfico 11 Asociación de la Prevalencia de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> con la esterilización del Canino.	63
Gráfico 12 Distribución de Casos Resistentes a Meticilina (Gen <i>mecA</i>) en relación al Grupo Etario.	¡Error! Marcador no definido.
Gráfico 13 Asociación de la Prevalencia de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> con la Conformación del Cráneo.....	64
Gráfico 14 Distribución de Casos Resistentes a Meticilina (Gen <i>mecA</i>) en relación a la Conformación del Cráneo.....	65
Gráfico 15 Asociación de la Prevalencia de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> con la producción Lacrimal.	66
Gráfico 16 Distribución de Casos Resistentes a Meticilina (Gen <i>mecA</i>) en relación a la producción Lacrimal.	¡Error! Marcador no definido.
Gráfico 17 Distribución de la Correlación (r) entre Edad y producción Lacrimal.	68

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Algoritmo de identificación de *Staphylococcus* spp. **¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 2. Datos para muestreo.....**¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 3. Ficha de examen oftalmológico.....**¡Error! Marcador no definido.**

Anexo 4. Protocolo de PCR para detección del gen *mecA* en aislamientos de *Staphylococcus* spp.....**¡Error! Marcador no definido.**

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los Médicos Veterinarios enfrentamos casos clínicos oftalmológicos que se tornan cada vez más desafiantes y no ceden a tratamientos convencionales. En algunos casos requiere de exámenes complementarios como cultivos y antibiogramas e incluso identificación más precisa de sus genes por medio de técnicas moleculares como el PCR para tener éxito, sobre todo si los microorganismos que los afecta son bacterias multirresistentes.

El estudio del microbioma ocular es importante para comprender que las alteraciones de las mismas, pueden generar enfermedades como queratitis ulcerativas, conjuntivitis, blefaritis, meibomitis, entre otras (Verstappen, y otros, 2017). A manera general el microbioma consta de *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Firmicutes* que mantienen su equilibrio y coexisten de forma normal en el medio ocular. Estos microorganismos son responsables de algunos trastornos que provocan inflamación corneal y otras afecciones oculares inflamatorias como conjuntivitis y meibomitis (Ju Lee, et al., 2022; Gelatt, 2021).

Los *S. pseudintermedius* son bacterias que forman parte del microbioma normal de piel, tracto respiratorio, urogenital, digestivo en varias especies de mamíferos, aves y el hombre y también están presentes en el microbioma ocular, mismas que pueden actuar como patógenos oportunistas y provocar infecciones en los ojos (Cosmin et al. 2021; Diana, Ciuffo, and Musto 2019; Giacoboni and Gagetti 2020; Gordillo 2010)

Así mismo, se ha observado que las bacterias del género *Staphylococcus* son las más prevalentes, siendo *S. pseudintermedius* la especie más aislada en perros sanos (Furiani et al., 2011; Prado et al., 2005). Por otro lado, de las enfermedades oculares más comunes se ha identificado que entre las especies de *Staphylococcus spp.*, *S. pseudintermedius* es la más predominante, seguida de *Staphylococcus aureus* (Cosmin et al., 2021).

Por lo tanto, es importante estudiar estas bacterias (*Staphylococcus spp.*), en animales sanos dado el caso que aparezca un desequilibrio, estas son las principales oportunistas para causar afección, y sobre todo pueden tornarse resistentes a los antimicrobianos.

Los *S. pseudintermedius* son bacterias consideradas como zoonóticas, y pueden causar infecciones en humanos de manera esporádica (Giacoboni and Gagetti 2020). Se han

reportado aislamientos de cepas de *S. pseudintermedius* meticilino resistente (MRSP), por lo tanto los caninos, son considerados reservorios de genes de resistencia a antimicrobianos, atribuidos a la presencia del gen *mecA*, que está localizado en un elemento genético móvil llamado *SCCmec* y el cual codifica, la proteína PBP que tiene, baja afinidad por los β -lactámicos, proporcionando la capacidad de resistencia a antimicrobianos (Diana et al. 2019)

La población de *Staphylococcus* no ha sido estudiada en detalle, se conoce que *S. pseudintermedius* pertenece a otras especies como *S. intermedio* y *S. delphini*, del grupo SIG, de hecho antes se entendía que eran la misma especie. Cuando empezaron a identificar a los *Staphylococcus* coagulasa positivos en perros, se dieron cuenta que la identificación bioquímica no era suficiente para diferenciar entre *S. intermedio* y *S. aureus*, clasificándolos como *S. intermedius* según la especie huésped.

Desde entonces los enfoques para el análisis de identificación se concentraron en buscar la secuencia parcial de genes como *tuf* o *16s Rrna* y los genes *sodA*, *hsp60* y *spsJ* para identificarlos de manera confiable. Actualmente para su correcta identificación se realiza por medio de secuencia completas del geneoma de *S. pseudintermedius*, siendo un trabajo más arduo, costoso y complejo. Mediante este estudio se identificó la secuencia específica para *S. pseudintermedius* (300 y 500 nt) situadas en el gen *spsJ* (Verstappen et al. 2017). Mismos que fueron usados para su acertada identificación en esta investigación.

La microbiota y las enfermedades oculares, son poco estudiadas a nivel mundial y en el Ecuador son muy pocos los estudios que se encargan de identificarlas. El propósito de esta investigación fue identificar la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* y dentro de estas el Gen de resistencia *mecA* por medio de PCR procedentes de muestras obtenidas de 86 hisopados corneales de perros sanos de la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo, para comprender el estado de salud ocular de los animales sanos, aplicando el test de Schirmer tipo 1 y poder estudiar los efectos de la edad, sexo, estado reproductivo, tipo de cráneo, cantidad lacrimal y relacionarlos con la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* y su gen de resistencia. De esta manera, proporcionar datos relevantes para la toma de decisiones médicas oportunas, prevenir daños severos en los ojos, evitar el uso indiscriminado de antibióticos y reducir la incidencia de bacterias multirresistentes en nuestros pacientes.

Objetivo General

Identificar cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* y gen de resistencia *mecA* de hisopados corneales en perros sanos que acudieron a la clínica Veterinaria Vet-house de la ciudad de Riobamba.

Objetivos específicos

- Estudiar la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* de hisopados corneales en perros sanos.
- Establecer la presencia del Gen *mecA* de resistencia a la *Meticilina* de hisopados corneales en perros positivos a *Staphylococcus pseudintermedius*.
- Relacionar la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a *Meticilina* con la producción lagrimal de los ojos muestreados, mediante el Test de Schirmer tipo I
- Relacionar la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a *Meticilina* con la conformación del cráneo de los perros muestreados.

CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO

1.1 Anatomía Ocular

El conocimiento de la anatomía del globo ocular es fundamental para los Médicos Veterinarios y Oftalmólogos porque permite diferenciar durante el examen oftalmológico lo normal de las estructuras anatómicas anormales. (Gelatt, 2021)

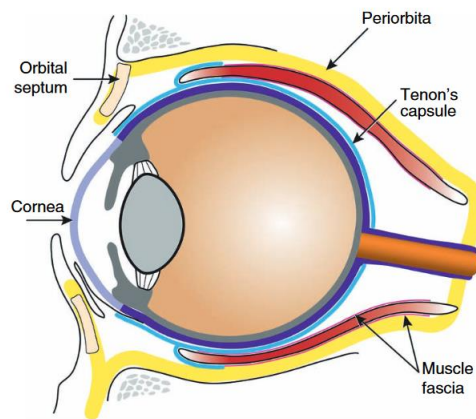


Figura 1. Anatomía del globo ocular canino

Fuente: Gelatt (2021)

También nos permite entender la visión como un fenómeno donde participan múltiples estructuras anatómicas que captan el haz de luz y enfocan por medio de fotorreceptores de la retina, para transmitir las señales eléctricas por todo el sistema nervioso central, y alcanzar la corteza visual donde se produce la sensación de la visión. (Slatter, 2008)

La visión está constituida por las siguientes partes: el globo ocular y los órganos oculares accesorios (nervio óptico, párpados, glándulas, los músculos y huesos) que dan soporte a estas estructuras. (Getty, 2001)

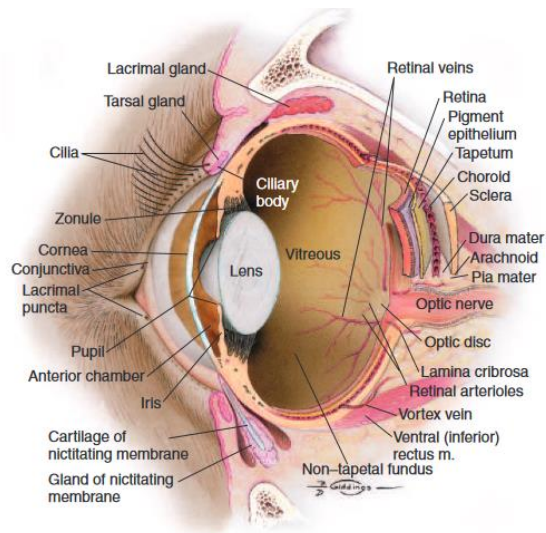


Figura 2. Anatomía Ocular-Estructuras anatómicas internas del ojo

Fuente: Slatter (2008)

1.1.1 Párpados

La función anatómica de los párpados es proteger al ojo, evitar la sequedad de la córnea permitiendo una distribución de las secreciones lagrimales de manera efectiva y además contiene a las glándulas que permiten la lubricación de la córnea y el borde de los párpados.

Los párpados permiten la canalización de las lágrimas hacia la parte nasal. Además, en el borde de los párpados se observan cilios o pestañas, las mismas que pueden estar ausentes en los párpados inferiores de los carnívoros. (Getty, 2001)

Los párpados están conformados por una conjuntiva palpebral que contiene células caliciformes, tiene una porción externa formada por piel delgada y flexible, con tejido conectivo laxo con presencia de glándulas sudoríparas y rodeada del músculo orbicular del ojo que esta inervada por el nervio facial, también presenta tejido conectivo fibroso, fibras del elevador palpebral superior que está inervado por el nervio oculomotor y de Müller que tiene inervación simpática del nervio trigémino (Mejía, 2020).

1.1.2 Conjuntiva

La conjuntiva es una membrana mucosa de capa delgada formada por tejido conectivo laxo. Esta membrana cubre la cara interna de los párpados (conjuntiva palpebral), el globo ocular (conjuntiva bulbar), fórnix, tercer párpado, epitelio corneal y limbal. La unión de la conjuntiva palpebral y bulbar se denomina saco conjuntival.

Presenta además múltiples células caliciformes distribuidas en mayor o menor número dependiendo de la zona que la recubre, siendo la mayor cantidad de células caliciformes en el fondo de saco nasal inferior y medio, así como también en la conjuntiva palpebral. (Mejía, 2020)

El tejido linfático asociado a la conjuntiva, es un conjunto de plexos: superficial y profundo, es difuso con nódulos intermitentes asociadas en la membrana nictitante, puede existir variaciones en su tamaño y distribución nodular y va a estar influenciado a la exposición de sustancias extrañas o microorganismos infecciosos. (Gelatt, 2021)

1.1.3 Sistema lagrimal y nasolagrimal

La integridad óptica depende de una adecuada película lagrimal precorneal, cuya función es mantener la superficie corneal ópticamente uniforme, eliminar material extraño, residuos de la córnea y saco conjuntival, suministro de oxígeno a la córnea avascular y de sustancias antimicrobianas (Gelatt, 2021).

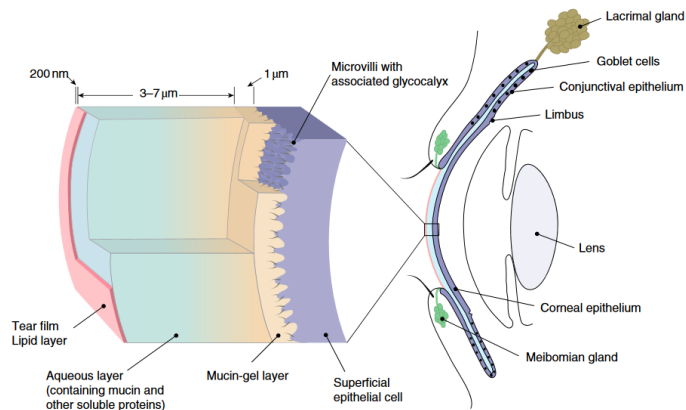


Figura 3. Película lagrimal

Fuente: Gelatt (2021)

La película lagrimal precorneal es trilaminar, está formada por:

Capa Externa: es delgada y aceitosa. Producida por las glándulas de Meibomio y las glándulas sebáceas de Zeiss. Su función es evitar la evaporación de la capa acuosa y forma una barrera a lo largo de los márgenes palpebrales para impedir su desbordamiento. (Gelatt, 2021)

Capa Intermedia: es la capa acuosa, secretada por la glándula lagrimal orbitaria en un 61,7%, las glándulas accesorias en un 3,1% y la glándula de la membrana nictitante en un 35,2%. Su función es suministrar oxígeno y nutrientes a la córnea avascular, además de permitir el lavado de la superficie ocular y eliminación de desechos. (Gelatt, 2021)

Capa interna: es la capa de mucina, producida por las células caliciformes conjuntivales, el glicocalix producida por las células epiteliales de la córnea, las glándulas lagrimales y accesorias tienen células secretoras de moco que aportan a la capa de mucina. Esta mucina se adhiere en la superficie corneal en contacto con el glicocalix y se distribuye de forma uniforme por acción del parpadeo. La mucina ofrece una superficie hidrófila para que el líquido lagrimal acuoso se distribuya uniformemente y lubrique las superficies corneal y conjuntival. (Gelatt, 2021)

El sistema excretor del lagrimal está compuesto por varias estructuras anatómicas como los puntos nasolagrimales, canalículos, saco lagrimal y conducto nasolagrimal cuya función es drenar el exceso de lágrimas. (Mejía, 2020)

Aproximadamente el 40% de los perros tiene una apertura accesoria en su paso por la raíz del canino superior. (Gelatt, 2021)

La glándula lagrimal tiene forma de diamante y se localiza en la cara dorsolateral de la órbita, debajo del ligamento orbitario. Tiene 15 a 20 conductillos que drenan en el saco conjuntival superior. Su función es proporcionar la porción acuosa de la película lagrimal preocular.

Aún no es clara la inervación de esta glándula, está inervada por rama lagrimal del quinto nervio craneal, nervios simpáticos y parasimpáticos. Clínicamente responden a fármacos colinérgicos que estimulan su secreción como la pilocarpina, y fármacos que disminuyen su secreción como los anticolinérgicos. (Gelatt, 2021)

1.1.4 Córnea y esclera

La córnea, presenta una anatomía característica compuesta por tres capas principales: el epitelio externo, el estroma y el endotelio. También presenta la membrana de Descemet ubicada entre el estroma y el endotelio (Turner, 2010).

Además, la superficie corneal está protegida y lubricada por la película lagrimal preocular, lo que garantiza su correcto funcionamiento y salud (Turner, 2010).

La innervación de la córnea es proporcionada por los nervios ciliares largos, derivados de la rama oftálmica del nervio trigémino, que se ramifican en la superficie corneal. Esta innervación superficial conlleva a la percepción de dolor en el epitelio y en el estroma anterior, lo que explica la intensa sensibilidad de las úlceras corneales superficiales (Turner, 2010).

Además de su función en la refracción y transmisión de la luz, la transparencia de la córnea se debe en gran parte a la ausencia de vasos sanguíneos y pigmentos. El endotelio contribuye significativamente a la transparencia corneal al eliminar el exceso de líquido de la córnea, manteniéndola deshidratada y ópticamente clara (Turner, 2010).

Por otro lado, la esclera se localiza en la parte posterior del globo ocular y desempeña un papel fundamental al brindar soporte estructural y protección a las estructuras internas. El limbo es la zona de transición entre estas dos estructuras. (Turner, 2010).

1.2 Microbioma Ocular

El microbioma, es definido como la comunidad microbiana que reside en una superficie corporal específica, es dinámico y altamente diverso, su composición y función pueden variar según el sitio anatómico en el que se encuentre (Shivaji et al., 2021).

En el contexto de la superficie ocular, esta comunidad microbiana comprende una variedad de bacterias que colonizan la superficie corneal, conjuntival y la película lagrimal, desempeñando roles fundamentales en la homeostasis y la salud ocular (Rogers et al., 2020).

El estudio de la dinámica y la composición del microbioma ocular no solo ofrece perspectivas sobre la fisiología ocular, sino que también abre nuevas vías para comprender y tratar una variedad de condiciones oculares, desde la sequedad ocular hasta infecciones bacterianas. (McDonald & Watson, 1976).

La microbiota ocular, al mantener una armoniosa diversidad microbiana, desempeña un papel esencial en la protección contra la colonización por agentes patógenos exógenos (Cosmin et al., 2021).

En este sentido, comprender la prevalencia y la composición del microbioma ocular normal adquiere una relevancia clínica, ya que los mismos microorganismos que coexisten pacíficamente pueden volverse oportunistas en condiciones de daño tisular o disminución de la resistencia del huésped a la infección (Cosmin et al., 2021).

Es de importancia reconocer que la naturaleza saprófita u oportunista no está bien documentada, ni declarada (Cosmin et al., 2021).

Existen varios mecanismos en donde una bacteria saprófita puede tornarse patógena y es de relevancia entender que el uso prolongado de antimicrobianos tópicos o sistémicos destruyen

al microbioma normal y favorece el crecimiento excesivo de bacterias resistentes, levaduras u hongos patógenos, colonizando con mayor facilidad el medio (Cosmin et al., 2021).

De igual forma, el uso prolongado de corticoides, altera el sistema inmunológico provocando desbalances en el equilibrio del microbioma ocular. Las anomalías conformacionales como el entropión, provoca irritación de la conjuntiva o incluso laceración corneal favoreciendo un proceso inflamatorio que puede tornarse crónico, sino es tratado de manera eficiente y oportuno (Cosmin et al., 2021).

Por lo cual, la caracterización precisa de la estructura del microbioma saprófito u oportunista presenta desafíos debido a su dinámica influenciada por una variedad de factores internos y externos (Cosmin et al., 2021).

Entre estos factores internos, se incluyen la edad, el sexo y raza. Mientras que los factores externos abarcan la estación del año, la geografía y el clima. La interacción compleja entre estos elementos contribuye a la variabilidad observada en la composición y abundancia de la microbiota saprófita u oportunista en diferentes individuos y poblaciones (Furiani et al., 2011).

Así mismo, se ha documentado que diversos factores tienen el potencial de alterar el microbioma ocular normal, predisponiendo al individuo a infecciones oportunistas secundarias (Cosmin et al., 2021).

Este conocimiento proporciona una base fundamental para el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas a mantener la homeostasis microbiana y prevenir la proliferación de microorganismos patógenos en el ambiente ocular. (Leis, 2023).

La literatura científica concuerda en que los microorganismos saprófitos más frecuentemente aislados en el microbioma ocular son bacterias gram positivas, tales como *Staphylococcus spp*, *Bacillus spp*, *Streptococcus spp* y *Trueperella spp* (Cosmin et al., 2021; Hewitt et al., 2020; Wang et al., 2008).

En contraste, las bacterias gram negativas son menos comunes en esta comunidad y abarcan especies como *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Neisseria spp.* y *Klebsiella spp.*

Así mismo, se ha observado que las bacterias del género *Staphylococcus* son las más prevalentes, siendo *S. pseudintermedius* la especie más frecuentemente aislada en perros sanos (Furiani et al., 2011; Prado et al., 2005). Por otro lado, en lo que respecta a las enfermedades oculares, se ha identificado que entre las especies de *Staphylococcus spp.*, *S. pseudintermedius* es la más predominante, seguida de *Staphylococcus aureus* (Cosmin et al., 2021).

1.3 Resistencia al Antibiótico

Desde su surgimiento en la década de 1940, la era de los antibióticos ha marcado un hito en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, representando una notable transición desde la era pre-antibiótica, que tiene sus raíces en China hace más de 2 500 años (Pérez, 2017). A pesar de los avances en la producción de agentes antimicrobianos, este progreso se ha visto obstaculizado por un preocupante aumento en la resistencia desarrollada por una variedad de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, parásitos y hasta virus, frente a una diversidad de clases de antimicrobianos (Pérez, 2017).

La resistencia antimicrobiana (RAM), identificada como uno de los principales desafíos de la salud global por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se ha convertido en una amenaza crucial para la salud pública en el siglo XXI (Pérez, 2017). Esta preocupación se basa en el reconocimiento de que la ineficacia de los tratamientos antimicrobianos tradicionales puede socavar los esfuerzos para controlar y tratar una amplia gama de enfermedades infecciosas, lo que resalta la necesidad urgente de abordar este problema a nivel mundial (Labarca & Araos, 2009).

Como indican numerosas organizaciones internacionales, la repercusión de la resistencia antimicrobiana (RAM) en el bienestar humano, animal y ambiental subraya la necesidad de adoptar un enfoque de Una Salud. En este contexto, los esfuerzos fragmentados no serían adecuados para abordar un desafío de tal magnitud. La rápida y preocupante propagación a nivel global de bacterias multirresistentes, junto con las graves implicaciones asociadas en términos de aumento de la estancia hospitalaria, elevación de los costos médicos y mayor mortalidad, así como su impacto en diversos ámbitos como la medicina veterinaria, la

seguridad alimentaria y el medio ambiente, subraya la urgencia de implementar acciones coordinadas y a múltiples niveles para contener esta problemática (Gatica & Rojas, 2018; Pérez, 2017).

Tanto en Medicina veterinaria como en Medicina humana, se ha identificado la presencia de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a Meticilina (MRSA), los cuales son responsables de infecciones nosocomiales en entornos hospitalarios. Esta resistencia ha surgido como resultado del uso indiscriminado y prolongado de antibióticos de amplio espectro, así como de su administración frecuente sin una evaluación previa mediante cultivos y pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en los últimos años (Fuda, Fisher, and Mobashery 2005, Cosmin et al., 2021; Robles, 2019; Tajima et al., 2013).

La resistencia a Meticilina en *Staphylococcus aureus* (MRSA) y *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) representa un desafío creciente en la práctica veterinaria. Las unidades de cuidados intensivos veterinarios podrían enfrentar un riesgo especialmente elevado de brotes periódicos debido a la colonización y la propagación de estas bacterias (Sánchez et al., 2015).

En los perros, *Staphylococcus pseudintermedius* es la especie predominante que se identifica, dado que forma parte del microbioma normal en la piel y mucosas. Este hallazgo se respalda en estudios realizados por Furiani et al. (2011), Hewitt et al. (2020) y Robles (2019). Además, un estudio llevado a cabo por Robles demostró que aproximadamente el 65% de las muestras de hisopados nasales y perianales de perros sanos en Quito presentaban *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a Meticilina (MRSP). Este último hallazgo también se documenta en los estudios de Hewitt et al. (2020) y Robles (2019).

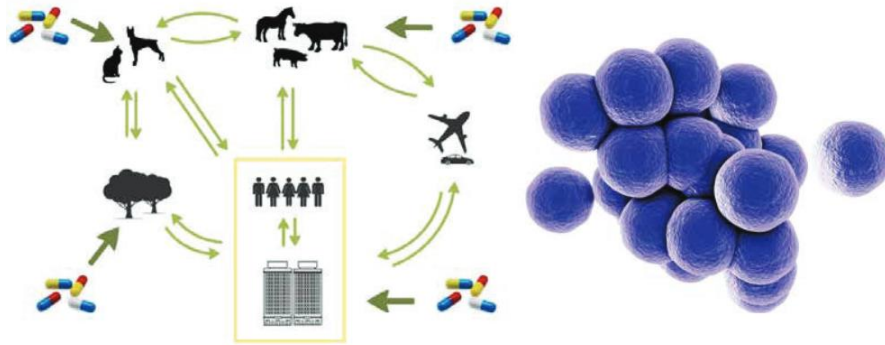


Figura 4. Rutas de diseminación de la resistencia antibiótica

Fuente: Matilla & Bravo (2016)

1.3.1 Resistencia a Dicloxacilina y Oxacilina

La resistencia a dicloxacilina y oxacilina es un fenómeno relacionado con la capacidad de los microorganismos, como las bacterias, para resistir los efectos de estos antibióticos, que pertenecen a la clase de las penicilinas. Estos medicamentos funcionan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, lo que resulta en la muerte de las bacterias susceptibles. Sin embargo, el uso generalizado e indiscriminado de estos antibióticos ha provocado el desarrollo de mecanismos de resistencia en algunas cepas bacterianas, permitiéndoles evadir los efectos letales de los medicamentos. Esta resistencia puede surgir debido a la producción de enzimas, como las betalactamasas, que degradan o inactivan los antibióticos, o mediante la modificación de las proteínas de unión a la penicilina en la membrana celular bacteriana, lo que impide que los antibióticos se unan y ejerzan su acción (Moreno, 2017).

Las penicilinas resistentes a la penicilinasasa o isoxazol-penicilinasasa, como Oxa, Cloxa y Dicloxacilina, derivan de la acetilación del núcleo 6-APA junto con la adición de cadenas laterales heterocíclicas (Moreno, 2017). Estas cadenas laterales confieren una mayor

estabilidad en ambientes ácidos y una actividad antibacteriana ampliada, especialmente contra *Staphylococcus*, así como una mejora en los parámetros farmacocinéticos, incluyendo una mayor absorción por vía oral.

1.3.2 Resistencia a Meticilinas

La resistencia microbiana de los *Staphylococcus* a la Meticilina se atribuye al gen *mecA*, que causa cambios en una proteína de unión a la penicilina (PBP2a), disminuyendo su sensibilidad a la penicilina (Russell, 2014). Estos antibióticos, como la penicilina y sus similares, típicamente detienen el crecimiento bacteriano al desactivar las transpeptidasas bacterianas, esenciales para la formación de la pared celular. Sin embargo, las bacterias que expresan PBP2a pueden continuar sintetizando la pared celular, incluso en presencia de estos antibióticos (Russell, 2014).

Durante las últimas décadas, los *Staphylococcus* han exhibido una mayor resistencia a los antimicrobianos, particularmente a la Meticilina, tanto en la medicina humana como en la veterinaria. La resistencia a Meticilinas se refiere específicamente a la capacidad de ciertas bacterias para resistir los efectos de los antibióticos de la clase de las penicilinas Meticilinas, como la Meticilina y la oxacilina. A pesar de que estos antibióticos son utilizados comúnmente para tratar infecciones bacterianas, el uso excesivo y a menudo inapropiado de estos medicamentos ha llevado al desarrollo de resistencia en algunas cepas bacterianas. Este fenómeno puede manifestarse a través de varios mecanismos, incluida la producción de la enzima betalactamasa, que degrada el antibiótico, o mediante la modificación de las proteínas de unión a la penicilina en la membrana celular bacteriana, lo que impide que el antibiótico se una y ejerza su efecto (Russell, 2014).

1.4 Farmacología ocular y terapéutica

En farmacología ocular es común usar soluciones tópicas, suspensiones y ungüentos que cumplen con características físicas que deben ser bien toleradas por el individuo como la

tonicidad y el pH. Además, los conservantes (cloruro de benzalconio) son usados para limitar la contaminación de los envases multidosis y agentes de diagnóstico oftálmicos pueden interferir en los aislamientos y cultivos de microorganismos de la superficie ocular, por lo que de preferencia debe ser de un solo uso y almacenados de forma estéril. (Slatter, 2008)

Existen dos barreras para la penetración de fármacos tópicos como: La barrera hematoocular (similar a la barrera hematoencefálica) que es impermeable a la mayoría de los fármacos, excepto si existe inflamación intraocular significativa y la córnea que se vuelve permeable si presenta úlceras (Slatter, 2008).

1.4.1 Rutas de administración

Para elegir una ruta de administración de fármaco es importante tener en cuenta las propiedades de la droga, el sitio donde ejercerá su efecto, frecuencia, concentración del fármaco y vascularidad del tejido diana. (Slatter, 2008)

Es relevante saber que existen fármacos que tienen propiedades restrictivas en cuanto a su administración como la Polimixina B, que tiene restricción por vía sistémicas por su nefrotoxicidad o subconjuntival por la irritación local que produce. (Slatter, 2008)

Cuando se requiere altas concentraciones en la córnea o la conjuntiva se recomienda la vía tópica frecuente o inyección subconjuntival. Si el objetivo terapéutico es alcanzar concentraciones en el tracto uveal anterior (iris o cuerpo ciliar), se usa la inyección subconjuntival, sistémica o aplicación tópica frecuente, para atravesar la córnea intacta (Slatter, 2008).

Los fármacos que no atraviesan la barrera hematoocular alcanzan concentraciones en la úvea anterior, cuando está altamente vascularizada, la úvea posterior (coroides) y la esclerótica. Cuando hay inflamación esta barrera se reduce y los fármacos que no podían entra a humor acuoso o vítreo pueden hacerlo. Si requiere concentraciones en tejidos orbitarios se utiliza la administración sistémica. (Slatter, 2008)

Fármacos liposolubles como el cloranfenicol penetran fácilmente y fármacos hidrosolubles como las penicilinas, neomicina y bacitracinas, penetra poco o nada cuando es administrado de manera tópica, dado que, la córnea es trilaminar en donde su epitelio y endotelio son lipófilos y su estroma es hidrófilo.

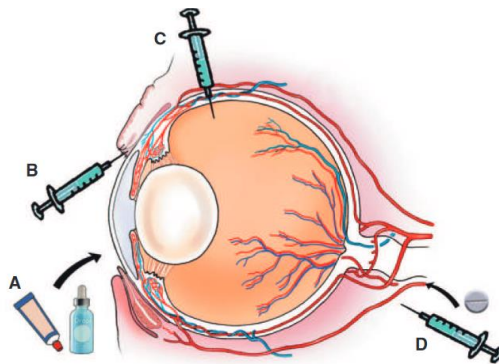


Figura 5. Vías de administración de fármacos en Oftalmología

Fuente: Gelatt (2021)

1.4.2 Selección y administración de antibióticos

La administración de antibióticos por vía sistémica, para una úlcera no vascularizada tiene poca importancia clínica, lo ideal es el uso de antibióticos tópicos. Pero si tiene efecto para el tratamiento de enfermedades de los párpados, conjuntiva, esclerótica, úvea (iris, cuerpo ciliar), retina, nervio óptico, músculos extraoculares y el contenido orbitario. (Slatter, 2008)

La penicilina se absorbe fácilmente por vía intramuscular, la penicilina G, tiene mala absorción por vía oral porque es destruida por el ácido gástrico y cuando alcanza concentraciones plasmáticas buenas, se dificulta la penetración de la barrera hematoocular, por el contrario, el cloranfenicol tiene excelente concentración en plasma y atraviesa bien la barrera hematoocular. (Slatter, 2008)

Los antibióticos pueden clasificarse como bactericidas y bacteriostáticos. En la mayoría de los colirios tienen la combinación de antibióticos bactericidas y otros la combinación de ambos, aún se debate su importancia clínica. Siempre se suele usar antibióticos que no se

usan en otras partes del cuerpo para reducir la posibilidad de resistencia a los medicamentos. Se usa muy a menudo la combinación de neomicina, Polimixina B y bacitracina, para infecciones resistentes. (Slatter, 2008)

1.4.3 Selección de Antibióticos

Se recomienda tomar en cuenta algunos factores para el uso de antibióticos como por ejemplo el tipo de organismo agresor y su sensibilidad, ubicación del organismo, capacidad de penetración del medicamento en el sitio, farmacocinética y espectro de actividad, toxicidad de los medicamentos y cumplimiento del tratamiento por parte del tutor. (Slatter, 2008)

Box 3-1 Classification of common ophthalmic antibiotics	
Bactericidal	Bacteriostatic
Aminoglycosides	Chloramphenicol
Bacitracin	Cephalosporins
Erythromycin*	Erythromycin*
Fluoroquinolones	Tetracyclines
Potentiated sulfonamides	
Neomycin	
Penicillins	
Polymyxins	
Vancomycin	

*Depending on concentration and organism.

Figura 6. Clasificación de antibióticos oftálmicos comunes

Fuente: Slatter (2008)

Lo ideal para la selección del antibiótico se basa en la identificación del microorganismo y su sensibilidad al antibiótico. Sin embargo, por la brevedad que en algunos casos clínicos requiere de la prescripción de un fármaco antimicrobiano, es importante conocer que microorganismo son frecuentes, su sensibilidad y que antibióticos son más eficaces. Aunque el médico debe tener en cuenta que el tratamiento de infecciones sobre una base empírica, práctica y a menudo inevitable, no siempre conduce a un resultado satisfactorio. (Slatter, 2008)

Por este motivo, se puede hacer elección racional del agente terapéutico mediante citología del tejido afectado previamente teñida con Diff-Quik. Si las infecciones son graves o no responden al primer tratamiento se debe identificar al organismo y considerar la combinación de vías de administración y fármacos con características sinérgicas. Si las infecciones oculares persisten o recurren a pesar de su tratamiento específico para la bacteria aislada, considerar que puede ser secundario a un trastorno o proceso patológico subyacente. (Slatter, 2008)

Hay que entender que el microbioma ocular tiene marcadas variaciones específicas, individuales, geográficas y estacionales que influyen en las bacterias. El dato de sensibilidad de un antibiótico in vitro no necesariamente tiene el mismo efecto inhibitorio in vivo porque está relacionado a la concentración que logra el fármaco en la superficie ocular o del órgano diana. (Slatter, 2008)

1.4.4 Uso de Oxacilina sódica

La oxacilina es resistente a la B-lactamasa, es estable a los ácidos se usa vía oral. Desafortunadamente gran parte de este antibiótico se encuentra unido a proteínas plasmáticas y no puede ingresar al humor acuoso, ni siquiera durante la inflamación. Es útil en oftalmología para infecciones orbitarias y de órganos anexos, cuando son administrados por vía oral. (Slatter, 2008)

1.4.5 Uso de Betalactámicos y Cefalosporinas

El uso de Betalactámicos y Cefalosporinas, que pertenecen a diferentes clases de antibióticos, pero comparten mecanismos de acción similares a las penicilinas al inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana, puede contribuir al desarrollo de resistencia antimicrobiana. Como ocurre con otras clases de antibióticos, su uso excesivo e inapropiado puede promover la resistencia bacteriana. Esto se debe a que las bacterias pueden desarrollar resistencia a estos

antibióticos mediante la producción de enzimas que los inactivan o mediante la modificación de las proteínas de unión a la penicilina en la membrana celular bacteriana, evitando así que los antibióticos se unan y ejerzan su acción (Marín et al., 1998; Suarez & Gudiol, 2009).

Los betalactámicos, por otro lado, son agentes bactericidas que actúan lentamente y cuya actividad depende de alcanzar una concentración en el plasma que supere la concentración inhibitoria mínima (CIM) del microorganismo causante. En la mayoría de los microorganismos sensibles, los betalactámicos se comportan como bactericidas, ya que la concentración bactericida mínima (CBM), es decir, la cantidad mínima de antimicrobiano que elimina el 99,9% de los microorganismos viables, es igual o ligeramente mayor que la CIM (Suarez & Gudiol, 2009).

La obtención de derivados semisintéticos de las cefalosporinas se logró mediante la adición de cadenas laterales al ácido 7-aminocefalosporánico, lo que resultó en compuestos con una actividad antibacteriana mucho más potente que la cefalosporina original. Estos compuestos, que contienen el ácido 7-aminocefalosporánico, son estables en ambientes ácidos diluidos y altamente resistentes a las penicilinasas, independientemente de las características de sus cadenas laterales. Las alteraciones en la posición 7 del anillo betalactámico afectan la actividad antibacteriana, mientras que las modificaciones en la posición 3 del anillo de dihidrotiazina están asociadas con cambios en el metabolismo y las propiedades farmacocinéticas de los medicamentos (Marín et al., 1998).

Son menos susceptibles a las B-lactamasas estafilocócicas. Tienen buenos resultados al administrar por vía subconjuntival o tópica sobre todo aquellos infectados por *Streptococcus spp.* Son útiles para blefaritis bacteriana. La cefazolina se usa como profiláctico perioperatorio. (Slatter, 2008)

Siendo así que, el uso de Betalactámicos y Cefalosporinas presenta desafíos significativos en el manejo de las infecciones bacterianas debido a la posible inducción de resistencia antimicrobiana. Además, la comprensión de los mecanismos de acción y las modificaciones estructurales de estos antibióticos es crucial para abordar eficazmente la resistencia bacteriana y garantizar su uso apropiado en el tratamiento clínico.

1.4.6 Uso de las Meticilinas en Veterinaria

Las Meticilinas en veterinaria se utilizan para el tratamiento de diversas enfermedades bacterianas en animales. Estos antibióticos, que pertenecen a la clase de las penicilinas, son especialmente eficaces contra bacterias que han desarrollado resistencia a las penicilinas naturales. Entre las enfermedades para las que se prescriben las Meticilinas en medicina veterinaria se incluyen infecciones de la piel y tejidos blandos, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario, infecciones del oído, infecciones del globo ocular, mastitis, entre otras. Sin embargo, es importante destacar que el uso de Meticilinas debe ser supervisado por un veterinario calificado y solo debe administrarse cuando sea necesario y bajo la orientación adecuada, para evitar el desarrollo de resistencia bacteriana y otros efectos adversos (Jang et al., 2014).

La meticilina es resistente a la B-lactamasa, se usa en infusión intravenosa para *Staphylococcus* resistentes y en Oftalmología se puede usar por vía tópica o inyección subconjuntival para afecciones corneales, al atravesar el humor acuoso en concentraciones terapéuticas cuando la barrera hematoocular se encuentra alterada por inflamación. Su excreción renal es rápida. El fármaco es inestable, por ende, hay que disolverlo antes de su uso. (Slatter, 2008)

1.5 Enfermedades Oftalmológicas en perros

El entendimiento de las afecciones del sistema ocular en perros domésticos resulta fundamental para los veterinarios especializados en el cuidado de estas especies, dado que reflejan tanto trastornos locales como sistémicos. Por consiguiente, el estudio de las enfermedades del sistema ocular en animales de compañía, que abarca desde las relacionadas con la órbita hasta las afectaciones en los párpados y anexos, así como en el globo ocular, se vuelve de gran relevancia e interés clínico (Hugues & Torres, 2022).

1.5.1 Signos de Enfermedades Oftalmológicas en Caninos

Los signos de enfermedades oftalmológicas en caninos pueden variar según la condición específica que afecte al animal, pero algunos síntomas comunes pueden indicar la presencia de problemas en los ojos de los perros. Estos signos incluyen enrojecimiento o inflamación de los ojos, secreción ocular anormal, como mucosidad o pus, cambios en la apariencia de los ojos, como opacidad o nubosidad en la córnea, parpadeo frecuente o anormal, cambios en el comportamiento visual, como frotarse los ojos o evitar la luz brillante (Gelatt, 2008).

Además, pueden presentarse problemas de visión, como dificultad para enfocar o movimientos oculares anormales. Es importante tener en cuenta que estos signos pueden indicar una variedad de afecciones oftalmológicas, que van desde infecciones simples hasta problemas más graves, como cataratas, glaucoma o uveítis. Por lo tanto, cualquier cambio en los ojos de un perro debe ser evaluado por un oftalmólogo veterinario para un diagnóstico preciso y un tratamiento adecuado (Gelatt, 2008).

1.5.2 Enfermedades Oftalmológicas en perros causadas por *Staphylococcus*

Las enfermedades oftalmológicas en perros causadas por *Staphylococcus* representan un desafío clínico significativo para los veterinarios. Los *Staphylococcus spp.* son microorganismos comúnmente asociados con infecciones oculares en perros, pudiendo causar desde conjuntivitis hasta queratitis ulcerativa. La identificación precisa de la especie de *Staphylococcus* involucrada en la infección, es crucial para determinar el tratamiento adecuado y prevenir complicaciones graves. La epidemiología, los mecanismos de patogenicidad y las estrategias de tratamiento de estas enfermedades oftalmológicas continúan siendo áreas de investigación activa en el campo de la medicina veterinaria (Murphy & Maggs, 2015).

Además, las laceraciones corneales, están asociados a procesos inflamatorios de las estructuras circundantes provocando blefaritis y conjuntivitis. Y pueden infectarse por presencia de microbioma normal presentes en las superficies corneales y conjuntivales.

(Hewitt et al. 2020). El manejo exitoso de las patologías oculares se basa en el uso específico de antibióticos de manera eficiente y eficaz. Para evitar complicaciones como la queratomalacia, perforación corneal, formación de cicatrices y pérdida completa de la visión (Hewitt et al. 2020).

1.6 *Staphylococcus spp.*

Los *Staphylococcus spp.* son cocos gram positivos, catalasa positivos anaerobios facultativos, que se dividen en coagulasa negativos o coagulasa positivos, con estos últimos, como *S. pseudintermedius*, *S. aureus*, *S. hyicus* y *S. schleiferi subsp. coagulans (SSCoP)*, de importancia clínica reconocida (Diana et al., 2019; Ríos et al., 2015).

La identificación y clasificación de *Staphylococcus spp.* es fundamental para comprender su distribución, comportamiento y potencial patogénico en diversas poblaciones. La sobresaliente capacidad de supervivencia de los *staphylococcus* en el medio ambiente, donde pueden permanecer viables en el polvo ambiental y diversas superficies por períodos que abarcan desde tres semanas hasta tres meses, subraya la importancia de comprender y abordar adecuadamente este grupo microbiano (Giacoboni and Gagetti, 2020).

La duración de su viabilidad está influenciada por una serie de factores, incluyendo la composición del polvo, la temperatura, la humedad y la naturaleza de la superficie de los materiales. Estos microorganismos pueden ingresar a los hogares a través de múltiples vías, como las secreciones de animales y personas, estornudos, descamación epitelial, fómites, alimentos, entre otros (Denamiel et al., 2009).

Esta comprensión de su dinámica, exposición y rutas de transmisión es crucial para abordar eficazmente la prevención y el control de la dispersión de estos patógenos (Giacoboni and Gagetti, 2020).

En 1976, Hajek realizó uno de los primeros estudios significativos que abordaron las diferencias entre *estafilococos* coagulasa positivos de origen animal, incluidos los aislados de palomas, perros, visones y caballos. A través de pruebas bioquímicas y análisis de

propiedades microbiológicas, Hajek identificó y describió una nueva especie denominada *Staphylococcus intermedius* (Giacoboni and Gagetti, 2020).

Este hito en la investigación microbiológica sentó las bases para la comprensión de la diversidad dentro del género *Staphylococcus* y su relevancia en diferentes contextos epidemiológicos y clínicos.

Finalmente, en 1982, Kawano et al. introdujeron nuevas características mediante la tipificación por fagos. Posteriormente, en 1995, Hesselbarth y Schwarz realizaron un análisis genético detallado utilizando el ribotipado y la secuenciación de la región intergénica de 16S y 23S. Antes se lo conocía como *S. intermedius* siendo un patógeno zoonótico emergente que ya se lo reportaba en humanos, antes de su reclasificación. (Nisa, y otros, 2019). En 2005, Devrise et al. propusieron la creación de un nuevo taxón, *S. pseudintermedius*, basándose en sus resultados de pruebas bioquímicas, características de crecimiento e hibridación de ADN. Finalmente, en 2007, la revisión elaborada por Sasaki et al. propuso la formación de un grupo denominado *Staphylococcus intermedius group (SIG)*, que incluye a *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. delphini* (Giacoboni and Gagetti, 2020).

1.6.1 Identificación de *Staphylococcus pseudintermedius*

El género *Staphylococcus* comprende una amplia variedad de bacterias, entre las cuales se encuentra *Staphylococcus pseudintermedius*, una especie de notable relevancia en el ámbito microbiológico. Esta afirmación, respaldada por Giacoboni y Gagetti en 2020, subraya la importancia taxonómica de esta especie dentro de la familia *Staphylococcaceae*. *Staphylococcus pseudintermedius*, al igual que otras especies del género, presenta características distintivas que la diferencian y la colocan en una posición de interés en la investigación microbiológica y clínica.

Los *Staphylococcus pseudintermedius* son cocos Gram (+), anaerobios facultativos, catalasa positivos, inmóviles, no esporulados, tienen metabolismo fermentativo, oxidasa negativos y son halo tolerante. Tienen resistencia a la sequedad y a la desinfección (Diana et al. 2019; Giacoboni and Gagetti 2020; Robles 2019; Ríos et al. 2015).

La identificación de *Staphylococcus pseudintermedius* es crucial en el estudio de la microbiota asociada a los caninos, ya que esta especie representa aproximadamente el 90% de los cocos gram positivos en esta población. En este contexto, es fundamental comprender su papel tanto en la salud como en la enfermedad ocular y cutánea de los animales.

Staphylococcus pseudintermedius es una especie prevalente de estafilococos coagulasa positivos (CoPS) que se encuentran comúnmente en la piel y el tracto respiratorio superior de humanos y animales. Las infecciones locales de la piel y los tejidos blandos, así como la intoxicación alimentaria, son manifestaciones clínicas habituales de la infección por *S. aureus* en humanos (Tabatabaei et al., 2019). Además, se ha observado que *S. pseudintermedius* está vinculado principalmente con individuos que comparten un entorno y mantienen estrechos lazos con perros y gatos (Tabatabaei et al., 2019).

Sin embargo, también se ha documentado su presencia en otras especies animales, lo que destaca su amplia distribución en el reino animal (Giacoboni and Gagetti, 2020).

Para su identificación fenotípica existen algoritmos estandarizados de procesamientos de muestras ver *Anexo I*, que inician con aislamiento de cocos gram positivos, luego la tinción, identificación fenotípica *Staphylococcus spp.* Y finalmente su identificación bioquímica de

Staphylococcus spp. catalasa positivos en las diferentes especies. Así, como también la prueba de susceptibilidad antimicrobiana recomendados por el Instituto de Normas clínicas y de laboratorio “CLS”. (Robles, 2019)

Los métodos estándar de diagnósticos para *S. pseudintermedius* requieren varias horas de incubación, usan pruebas bioquímicas de hialuronidasa y DNasa o prueba inicial de susceptibilidad a Polimixina B. Los miembros que pertenecen a SIG suelen ser hialuronidasa negativos, ADNasa positivos y susceptibles a Polimixina B, también se someten a pruebas de susceptibilidad a la Oxacilina y se reportan como SIG o SIG resistente a meticilina. (Nisa, et al, 2019)

Actualmente, también se está usando la espectrometría de masas de tiempo de vuelo MALDI-TOF, que obedece a las siglas *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*, siendo prometedor para la identificación de patógenos por su especificidad para los miembros SIG, es relativamente barato su procesamiento, resultados rápidos (2 horas) y amigables con el ambiente porque evita el uso de insumos desechables. Su desventaja está relacionada con el costo del equipo. (Nisa, y otros, 2019)

1.7 Gen *mecA*.

El gen *mecA*, está situado en un elemento genético móvil conocido como *SCCmec*, desempeña un papel fundamental en la resistencia a los antimicrobianos al codificar la proteína *PBP*. Esta proteína exhibe una baja afinidad por los β -lactámicos, lo que confiere a las bacterias la capacidad de resistir la acción de estos agentes antimicrobianos (Diana et al., 2019). La ubicación de este gen en el *SCCmec* resalta su movilidad y su capacidad para transferirse entre diferentes cepas bacterianas, facilitando así la propagación de la resistencia antimicrobiana en entornos clínicos y comunitarios. Además, la presencia de la proteína *PBP* con baja afinidad por los β -lactámicos resalta la importancia de comprender los mecanismos moleculares subyacentes a la resistencia antimicrobiana, lo que puede orientar estrategias más efectivas para combatir la propagación de cepas bacterianas resistentes en la práctica clínica y en la salud pública en general.

1.7.1 Identificación del gen *mecA* mediante PCR

La identificación del gen *mecA* mediante PCR es una técnica esencial en el diagnóstico de la resistencia a la Meticilina en bacterias, particularmente en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pseudintermedius*. Esta herramienta molecular permite identificar la presencia del gen *mecA*, uno de los genes responsables de la resistencia a la Meticilina, lo que proporciona información crucial para orientar el tratamiento antimicrobiano adecuado. La PCR de *mecA* se ha vuelto indispensable en laboratorios clínicos y de microbiología veterinaria, contribuyendo significativamente a la detección precisa y temprana de la resistencia antimicrobiana en estas bacterias patógenas (Rodríguez, 2009).

El proceso de PCR para la expresión del gen *mecA* comienza con la etapa inicial de aislamiento y caracterización del RNA, lo cual es fundamental para garantizar la integridad y la cantidad adecuada del material genético. Posteriormente, se lleva a cabo la PCR en tiempo real para adquirir los datos necesarios. Además, se menciona la normalización de los datos utilizando múltiples genes *housekeeping*, lo que permite una cuantificación relativa de la expresión génica. Este enfoque integral facilita una evaluación más precisa de la actividad del gen *mecA* y su relación con la resistencia a la Meticilina en las bacterias estudiadas (Rodríguez, 2009).

1.8 Diagnóstico de enfermedades oculares

El diagnóstico de enfermedades oculares requiere de un enfoque metódico que incluya una exhaustiva anamnesis y una completa historia clínica. Además, se realiza una observación directa utilizando instrumentos como el oftalmoscopio o la lámpara de hendidura para evaluar la integridad corneal y detectar posibles alteraciones. Se emplea el Test de Schirmer tipo 1 para evaluar la producción lagrimal y el test de fluoresceína para valorar la integridad corneal.

En caso de observarse secreción, se recomienda la toma de muestras para cultivo y antibiograma, así como la realización de citologías para un diagnóstico más preciso. El Test de Schirmer tipo 1, se lleva a cabo utilizando una tira de test estandarizada (JorVet), colocada

en el saco conjuntival ventral de cada ojo y se mide la humedad en mm/min. Por otro lado, la Prueba de Tiempo de Ruptura de la Película Lagrimal se realiza mediante la aplicación de una tira de colorante con fluoresceína (JorVet) y se registra el tiempo hasta que se detecta el primer signo de ruptura lagrimal, conocido como punto seco, utilizando lentes de aumento alumbrados con luz azul cobalto. Estos procedimientos, respaldados por investigaciones previas, son fundamentales para un diagnóstico certero y un tratamiento adecuado (Cullen et al., 2005; Turner, 2010).

1.8.1 Test de Schirmer tipo 1

La prueba lagrimal de Schirmer (STT), tipo 1 es un método semicuantitativo para medir producción lagrimal, específicamente de la porción acuosa de la película lagrimal precorneal. Se realiza antes de la aplicación tópica de soluciones, porque aumentaría de forma artificial su valor. (Slatter, 2008)

Por ejemplo, los anestésicos tópicos o fármacos parasimpaticolíticos utilizados para provocar midriasis, reducirá los valores de STT. Por el contrario, los raspados corneales, conjuntivales, lavado del aparato lagrimal, aplicación de luces brillantes darán resultados elevados. Por esto, el STT debe realizarse en primer lugar. (Slatter, 2008)

La prueba de STT tipo 1 se realiza con tiras de papel filtro estériles, absorben con una muesca de 5 mm en un extremo. Esta muesca se engancha en el tercio medio lateral del párpado inferior por 60 segundos. Evitar que se enganche en la zona medial del párpado, porque el tercer párpado puede proteger la córnea y alterar los resultados. Al retirar la tira del ojo, se mide inmediatamente la distancia desde la muesca hasta el final de la parte húmeda del papel (Slatter, 2008).

El valor normal en perros es de 15-25 mm en un minuto, los resultados entre 10 y 15 mm/min se consideran diagnósticos para queratoconjuntivitis seca en pacientes agudos, de 6-9 mm/min en pacientes hiperagudos y menos de 5 mm/min en pacientes crónicos (Mejía, 2020).

1.9 Razas predisponentes a Enfermedades Oftalmológicas

Las razas tienen sus características fenotípicas y cada una puede desarrollar diferentes enfermedades o anomalías sistémicas como problemas respiratorios (Puerta Carvajal y Arias, 2019) y reproductivos (Ávila Gonzales, 2022) o particularidades congénitas, que no han sido todavía detalladas como sensibilidad a cierto tipo de bacterias, debido a que anatómicamente el animal tiene características que permiten la aparición de la enfermedad (Ej. pliegues o fotosensibilidad) o porque el animal alcanza niveles de estrés que lo vuelven propenso a enfermarse (Ej. humedad o temperatura extrema). La falta de simetría perfecta en estos animales implica variaciones aleatorias desde un rasgo morfológico donde la magnitud de la asimetría aumenta los niveles de estrés en el animal, ya sea la causa ambiental o genética (Parés-Casanova, 2021).

1.9.1 Enfermedades Oculares en Animales Braquiocefálicos

Los animales braquiocefálicos tienen la conformación facial única que puede aumentar el riesgo de proptosis ocular (exoftalmos) en casos de lesiones o traumatismos, además presentan proptosis ocular donde la posición prominente de los ojos en estas razas puede hacer que los globos oculares sean más susceptibles a lesiones y luxaciones (Parés-Casanova, 2021).

Además, de enfermedades oculares congénitas como distiquiasis, ectropión, entropión, cilios ectópicos, queratoconjuntivitis seca, macroblefarón, queratitis pigmentaria, queratitis ulcerativa, prolapso de la glándula nictitante, entre otras. (Slatter, 2008)

1.9.2 Enfermedades Oculares en Animales no braquiocefálicos

Por otro lado, los animales mesaticefálicos y dolicocefálicos, son también propensos a enfermedades oculares inflamatorias como la queratoconjuntivitis y otras congénitas como cataratas, glaucomas, entre otras, sin que exista una relación directa con la conformación del

cráneo, aunque si de la raza (Pedraza Aguirre y Beltrán Cedeño, 2019), que a la larga pudieran ser afectadas también por bacterias resistentes.

CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo de Estudio

El presente estudio es de carácter prospectivo, transversal, descriptivo y observacional. Es prospectivo porque únicamente estudia la población desde el momento de inicio de la investigación, dado que no hay antecedentes que permitan determinar la incidencia de esta bacteria. Además, es un estudio transversal, porque estudia la prevalencia de una bacteria, en un espacio, determinado en una población específica y en un espacio de tiempo fijo. Es descriptivo porque se registra los resultados y se describe las características de los pacientes. Es observacional porque el investigador no manipula las variables (Cairampoma, 2015).

Es un estudio que parte de la observación y la descripción, y brinda información básica para posterior análisis. La información resultante es asociada con las variables descriptivas del estudio y finalmente, tiene un carácter relacional, ya que contrasta la información con otras investigaciones.

2.2 Paradigma de la Investigación

Un estudio de identificación y de prevalencia, se alinea con el paradigma positivista o cuantitativo. La prevalencia se refiere a la proporción de casos de una enfermedad, organismo o condición específica, en una población en un momento determinado. En este caso cantidad de individuos o muestras de hisopado corneal, positivas para *Staphylococcus pseudintermedius* y *Gen mecA*, durante el periodo de estudio, que abarca enero 2022 a mayo 2022. Este tipo de investigación cuantitativa busca medir y describir la frecuencia de la bacteria en la población (Ramos, 2015).

2.3 Ubicación

La investigación se realizó en el laboratorio de biología molecular LABIGEN, localizado en el Norte de la ciudad de Quito. LABIGEN es un “Laboratorio de biología y genética

molecular. Servicios de diagnóstico por serología, PCR, hematología, laboratorio clínico y genética”, (figura 6).



Figura 7. Ubicación espacial de LABIGEN

Fuente: Google Maps (2024)

Las muestras fueron recogidas entre enero de 2022 hasta mayo de 2022, de la clínica veterinaria Vet-House de la Ciudad de Riobamba, (figura 7).

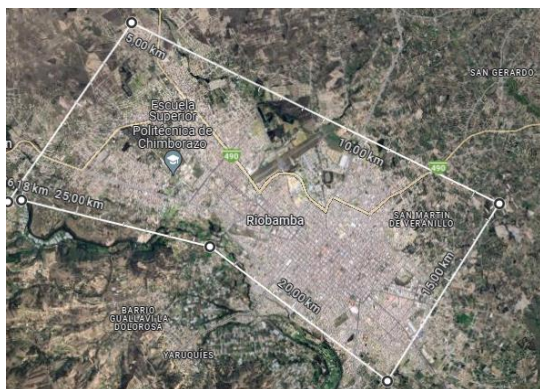


Figura 8. Ubicación espacial de Riobamba-Chimborazo

Fuente: Google Maps (2015)

2.4 Población de Estudio

La población de estudio consistió en muestreo de animales que llegaron a la clínica veterinaria Vet-house de la ciudad de Riobamba, sin signos clínicos de enfermedad ocular y con características de un paciente sano, entre los meses de enero y mayo del 2022.

Se procesó mediante técnicas de PCR Nested un total de 86 muestras, de hisopados corneales pertenecientes a 43 caninos sanos.

2.5 Materiales

En la *tabla 1*, se detalla los materiales usados en la investigación:

MATERIALES GENERALES
Tubos de ensayo
Hisopos
Guantes
Pipetas
Gradilla
Mandil
Hojas
Esferos
Marcadores
PRUEBAS
Tirillas para Test de Schirmer
REACTIVOS ESPECIALES
Kit de Aislamiento
PureLink™ Genomic DNA Mini Kit
EQUIPOS TECNOLÓGICOS
Secuenciador BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

Analizador 3500 Genetic Analyzer for Fragment Analysis
Cámara fotográfica de celular HUAHUEI P20 lite
Cámara de Flujo “BIOBASE”
Incubadora “INCUBIG-TFT” SELECTA NANBEI-96-well THERMAL CYCLER PCR MACHINE
PROGRAMAS INFOMÁTICOS
Microsoft Office (2015)
Infostat Estudiantil (2020)

Tabla 1. Materiales y Equipos

2.6 Variables de Estudio

Las tablas, 2, 3 y 4, presenta las variables de estudio de acuerdo a su Concepto y Tipo.

VARIABLE INDEPENDIENTE		
Variables	Categorías	Concepto
Canino	Nominal	Paciente sano que asiste a la clínica Veterinaria Vet-house en el tiempo determinado
Muestra de Hisopado	Nominal	Muestra obtenida de uno de los ojos del paciente que asiste a la clínica veterinaria de estudio en el tiempo determinado

Tabla 2. Variables Independientes

VARIABLE DEPENDIENTES		
Variables	Categorías	Concepto

Presencia de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Ordinal: 1= Negativo 2= Positivo	Ausencia de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> Presencia de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
Presencia del gen <i>mecA</i> en <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> aislados	Ordinal: 1= Negativo 2= Positivo	Ausencia del gen <i>mecA</i> de resistencia antimicrobiana Presencia del gen <i>mecA</i> de resistencia antimicrobiana
Producción lagrimal (test Schirmer tipo 1)	Cuantitativa Escalar	mm de lágrimas en un minuto
Patología Según la Producción lagrimal (test Schirmer tipo 1)	Ordinal: 1= Normal 2= Patológico	(15-25 mm/min) Tirilla (< 15 mm/min) Tirilla

Tabla 3 Variables Dependientes

VARIABLE INTERVINIENTE		
Variables	Categorías	Concepto
Lateralidad Anatómica del Ojo	Nominal: 1=Derecho 2=Izquierdo	Posición Anatómica del ojo del canino
	Ordinal: 1= Cachorro 2= Joven 3= Adultos 4= Geriátricos	0- 16 meses 16-60 meses 60- 120 meses > 120 meses
Conformación del cráneo	Nominal: 1= Braquiocefálico 2= Mesaticefálico	Cabeza corta y ancha (base del arco cigomático) Cabeza de forma intermedia

	3= Dolicocefálico	Cabeza estrecha y larga (cresta sagital externa destacada)
Sexo	Nominal: 1=Hembra 2=Macho	Sexo Biológico del Animal
Estado Reproductivo	Nominal: 1=Entero 2=Castrado	Animal sujeto a un proceso de Esterilización

Tabla 4. Variables Intervinientes

Además, para este estudio se consideraron factores de inclusión, que envuelven un perro clínicamente sano desde la perspectiva de la Oftalmología es aquel paciente cuyos ojos y estructuras relacionadas se encuentran en un estado de normalidad, sin la presencia de enfermedades, lesiones u otras condiciones oftalmológicas significativas: visión normal, conjuntivas sanas, superficies oculares claras, reacción pupilar a la luz y sobretodo sin descargas de fluidos. Variables que fueron tomadas en cuenta para la inclusión de los individuos en este estudio.

Los criterios de exclusión fueron animales con enfermedades sistémicas graves, o si al momento del muestreo tenían infección bacteriana conocida, estaban hospitalizados o con enfermedad dermatológica, también se excluyeron animales con antecedentes de anormalidades oftálmicas o de haber recibido medicación oftálmica, antibióticos orales, sistémicos o inmunosupresores en un lapso de 60 días. Los signos clínicos de exclusión fueron pacientes que al momento de consulta presentaron enrojecimiento o inflamación de los ojos, secreción ocular anormal, como mucosidad o pus, cambios en la apariencia de los ojos, como opacidad o nubosidad en la córnea, parpadeo frecuente o anormal, cambios en el comportamiento visual, como frotarse los ojos o evitar la luz brillante (Gelatt, 2008).

2.7 Procedimiento

Las muestras de córnea se obtuvieron de la clínica veterinaria Vet-house de la ciudad de Riobamba y se recopiló información necesaria para la investigación (Anexo 2), de acuerdo a las variables de estudio.

Las muestras recolectadas provienen de hisopados corneales de cada ojo de pacientes sanos, obteniendo 2 muestras por cada individuo. Para la toma de muestras, se utilizaron hisopos estériles y humedecidos previamente con solución salina al 0,9% (Robles 2019).

Todos los perros fueron sometidos a un examen oftalmológico minucioso, ordenado y completo. Que inicia con una anamnesis, examen físico de todos los órganos y sistemas, siguiendo las recomendaciones del ECOP (Examen Clínico Orientado a Problemas), para continuar con la evaluación de las estructuras oculares y perioculares, después se realizaron las pruebas de diagnóstico especializadas (test de Schirmer tipo 1) (Slatter, 2008), guiados por una ficha clínica oftalmológica (Anexo 3).

Nuestro protocolo inició con el ECOP, medición de la producción lagrimal con test de Schirmer tipo 1, no se usó anestésico tópico para evitar alteraciones en resultado de la producción lagrimal. Cada test se abrió con estrictas normas de bioseguridad (uso de guantes, cofia y mascarilla) y de manera estéril para evitar contaminación. (Slatter, 2008)

Después se irrigó 1 gota de solución salina 0,9% estéril con hisopos estériles. (Robles 2019) La muestra fue tomada de la córnea, saco conjuntival y fórnix, siendo muy bien tolerada por los individuos. Finalmente fueron colocados en tubos de ensayo con BHI (Brain Heart Infusión) hasta el laboratorio de Biología Molecular LABIGEN, donde fueron incubados por 24 horas a 37 °C (Rogers et al. 2020).

2.8 Técnica de Secuenciación

La extracción y secuenciación se llevaron a cabo en el laboratorio de Biología molecular LABIGEN. La secuencia de ácido nucleico a la que se dirige la PCR, se encuentra en el extremo 3' del gen *spsJ* y está conservada y es específica de *S. pseudintermedius*. (Verstappen, y otros, 2017)

Se extrajeron dos colonias de cultivo fresco en 500 µL de Tris-EDTA, pH 8,0 y se incubó a 95 °C durante 10 min, para posterior centrifugado a 20.000 x g durante 1 min. Por consiguiente, para su aislamiento se usó el kit de ADN PureLink™ Genomic DNA Mini Kit. Cat K1820-01, siguiendo las instrucciones del fabricante (Life Technologies, 2012). Por medio de q-PCR realizada con TaqPath™ q-PCR Master Mix, CG. Cat A15297. Para esto usaron cinco µL de sobrenadante para PCR convencional con la mezcla maestra GoTaq Green G2 y 500 nM de cada cebador, con concentraciones óptimas de oligonucleótidos de 300 nM de cada cebador y sonda de 75 nM. El programa de ciclado fue de 2 min de activación enzimática a 95°C, seguido de 45 ciclos de 30 s. desnaturalización a 95°C, 30 segundos de recocido a 58°C y 1 min de elongación a 72°C. Para la PCR se añadió un alargamiento de 10 minutos a 72°C antes de enfriar a 4°C. (Verstappen, y otros, 2017)

Para la secuenciación se usó la plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA). Como indica Verstappen, *et al.* 2017 en su estudio se usó la secuencia 4 (500 nt), dirigidos a una secuencia de 198 pb ubicadas en la posición 192532-192684 en el genoma de *S. pseudintermedius* cepa ED99 (acceso a GenBank NC_017568.1) en el extremo 3' del gen *spsJ*. Se usaron los siguientes primers: *stap*-Fw: 5'-ACC AAG GCC TGT AAG TAA AGC ACC-3'; *stap*-Rev: 5'-TCT CTT TCA ACA TCG GCA TCA ACG C-3', y *stap*-P: 5'-6FAM-ACT GTC GCT GAA TCG CTT GAT GAC G-BHQ1-3' como sonda. (Verstappen, y otros, 2017)

La amplificación de la región del gen *spsJ* se realizó mediante la aplicación de los cebadores de PCR 515/806 con códigos de barras en el cebador directo en una PCR de 35 ciclos. En este proceso se llevó a cabo utilizando el HotStarTaq Plus Master Mix Kit (QIAGEN, Inc., Germantown, MD).

Tras la amplificación, los productos de PCR fueron verificados en un gel de agarosa para confirmar el éxito de la amplificación y evaluar la intensidad relativa de las bandas.

Se procedió a agrupar las muestras en proporciones iguales (100), en base a su peso molecular y concentraciones de ADN. Estas muestras agrupadas fueron purificadas utilizando perlas

Ampure XP previamente calibradas. Posteriormente, el producto de PCR agrupado y purificado se utilizó para preparar la biblioteca de nano ADN de Illumina TruSeq (Rogers et al. 2020).

Además, para su control positivo, se tomó una bacteria de *Staphylococcus pseudintermedius* aislada por medio de baterías bioquímicas y maldi-tof. Misma muestra que fue donada por el laboratorio de microbiología de la Universidad Central del Ecuador y que fue sometida a pruebas de microdilución en caldo de oxacilina y de difusión en disco de Kirby-Bauer, para su respectiva identificación como meticilino resistente, como lo recomienda la CLSI 2008 (Robles 2019; Nisa et al. 2019; Schissler et al. 2009).

En base a la tabla 5, para la identificación del fenotipo de bacterias Cocos Gram (+) se identificó la presencia se *Staphylococcus* (Gary, et al 2017).

	Tamaño (Bacteria)	Colonia	Velocidad de crecimiento	Catalasa	Aero-tolerancia	Fermentación de glucosa
<i>Staphylococcus</i>	0,6-1,6 μm	Elevadas, poco convexas	Rápido a lento (18-36 hrs)	+ ^b	Anaerobio facultativo	+
<i>Micrococcus</i>	1-1,8 μm	convexas	Muy lento (72 Hrs)	+	Aerobio Estricto	-
<i>Macrococcus</i>	1,3-2,5 μm	Poco convexas	Lento (48 Hrs)	+	Anaerobio facultativo	-
					±	
<i>Streptococcus</i>	0,6-1 μm	Puntiformes (gotas de rocío)	Rápido a lento (24-72 Hrs)	-	Anaerobio Facultativo	+
<i>Enterococcus</i>	0,6-2,5 μm	Punta de alfiler	Lento (48 Hrs)	-	Anaerobio Facultativo	+

^b *S. aureus* subsp. *anaerobius* y *S. saccharolyticus* son catalasas negativas.

±, ≥90% especies o cepas débilmente positivas

Tabla 5 Identificación fenotípica de las colonias

Fuente: Gary, y otros, 2017

Finalmente, para determinar la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* se requiere de Coagulasa en Tubo, Producción Acetoína y Maltosa, además de Sensibilidad a la Polimixina B como se observa en la tabla 6. (Robles 2019)

<i>Staphylococcus</i> especies	Coagulasa		Producción Acetoína	Maltosa	Polimixina B
	Placa	Tubo			
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	R
<i>S. pseudintermedius</i>	-	+	+	+	S
<i>S. intermedius</i>	v	+	-	+/d	S
<i>S. hyicus</i>	-	v	-	-	R

+ Más del 90% de cepas positivas; - más del 90% de cepas negativas; d: débil; v: variable; S: sensible; R: resistente.

Tabla 6 Identificación bioquímica de *Staphylococcus spp.* Catalasa positivos

Fuente: Bannoehr y Guadabassi (2012); Devriese et al., (2005), Gary et al., (2017); Quinn, et al., (2011)

2.9 Detección molecular para gen de resistencia *mecA*

Para la detección del gen de resistencia *mecA* en aislamientos *Staphylococcus pseudintermedius*, se tomó las muestras de *Staphylococcus pseudintermedius* positivos, conservados por crioconservación.

Se realizó mediante el protocolo de PCR para la detección del gen *mecA* en aislamientos de *Staphylococcus spp.*, así como la técnica descrita por Castella y col. (Anexo 4)

Se prepara 25 µL de la mezcla de reacción para la amplificación, con las siguientes condiciones: 12,5 µL de mezcla Master MIX 2X (Promega®); 2,0 µL de los oligonucleótidos específicos en cada caso, para obtener una concentración final de 1 µLmol.l-1; 5 µL de ADN y 3,5 µL de agua ultra pura estéril. Los oligonucleótidos que se utilizaron, corresponden a una región altamente conservada del gen *mecA* de 310 bp, los primers usados fueron *mecA-Plus* y *mecA-Minus* de las siguientes características:

mecA-Plus: 5'-TGG CTA TCGTGT CAC AAT CG-3' (Eurogentec®) y *mecA-Minus*: 5'-CTG GAA CTT GTT GAG CAG AG-3' (Eurogentec®). (Pascal Vannuffel, Houda Ezzedine, Wauters, & Gala, 1995)

Luego se hizo una desnaturalización inicial 94°C por 5min; Ciclado =30-35 ciclos de:94°C 30seg, 52° 30seg, 72°C 30seg; y extensión final a 72°C por 5min. Los productos finales fueron amplificados por gel de agarosa al 1%. La corrida electroforética se realizó a 100 voltios por 30 min. (Vegas, y otros, 2017) (Pascal Vannuffel, Houda Ezzedine, Wauters, & Gala, 1995)

2.10 Análisis estadístico

La información recogida de las fichas clínicas se levantó en una base de datos en el programa Excel (Microsoft, 2015). La base de datos fue ordenada y procesada en el programa Infostat (Infostat, 2020).

El análisis descriptivo se lo realizó a través de tablas de frecuencia y tablas de contingencia. Además, se graficaron las variables mediante pasteles que permitieron representar la cantidad de casos y mediante gráficos de barras para determinar las frecuencias. Los datos fueron sometidos a una prueba asociativa de Chi-cuadrado de Pearson ($p < 0,05$).

Se estableció la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* y la presencia del gen de resistencia *mecA*, en las muestras positivas para *Staphylococcus pseudintermedius* y se determinó la asociación con la conformación del cráneo de los perros muestreados. También se estableció la asociación de las muestras positivas con las variables intervinientes.

Finalmente se evaluó la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente frente a la alteración en la producción lagrimal, mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola dirección.

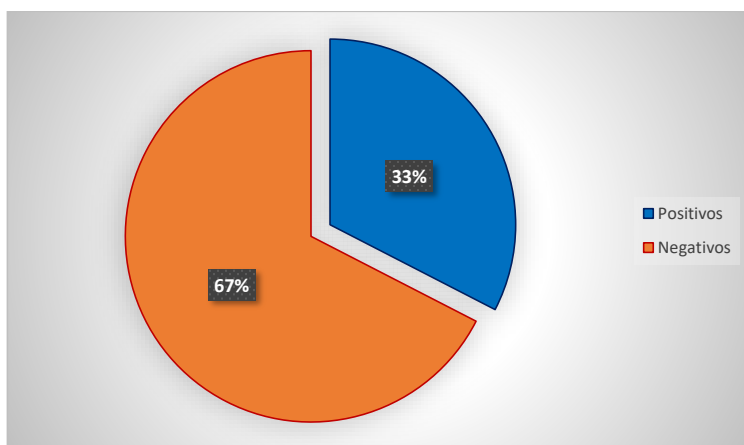
CAPITULO 3. RESULTADOS

3.1 Análisis de las frecuencias

El presente análisis estudia la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* de hisopados corneales en perros sanos e identifica al Gen *mecA* de resistencia a la *Meticilina* de hisopados corneales en perros positivos a *Staphylococcus pseudintermedius*.

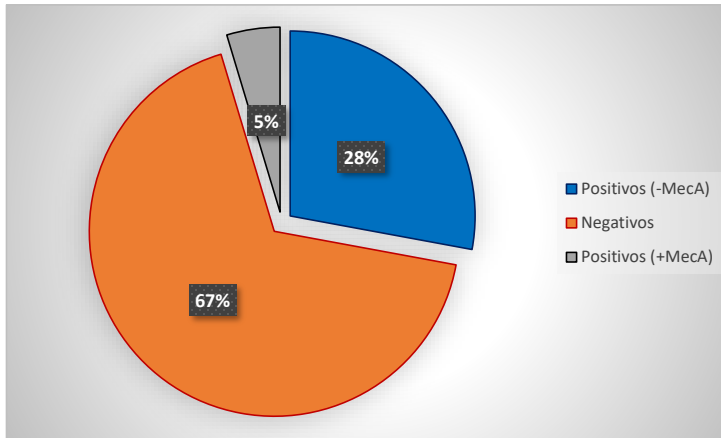
De un total de 86 muestras obtenidas de 43 caninos sanos, se determinó que un 33 % fueron positivos para *Staphylococcus pseudintermedius*, observar en el Gráfico 1.

Gráfico 1. Presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* en 86 muestras de caninos sanos.



El Gráfico 2. Identifica la presencia del Gen *mecA*, dentro del total de la población de muestras estudiadas. En esta población existe un 5% de muestras positivas a *Staphylococcus pseudintermedius* y presentan al Gen de resistencia *mecA* en su composición molecular, frente a esto existe también una población de 24 casos equivalentes al 28%, que siendo positivas a la bacteria *Staphylococcus pseudintermedius* son negativas al gen de resistencia *mecA* y la presencia de 67% de casos negativos.

Gráfico 2 Presencia del Gen *mecA*, dentro de las muestras totales en caninos sanos.



En la Figura 1. Se aprecia la reacción electroforética en gel agarosa del amplificado específico del gen *mecA* de los 3 individuos positivos al gen de resistencia.

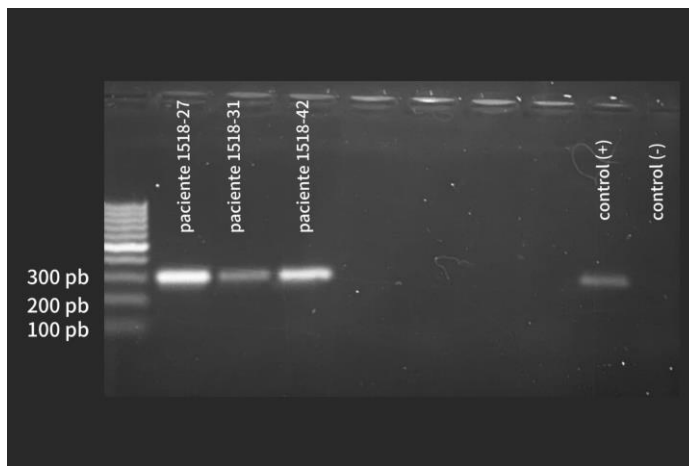
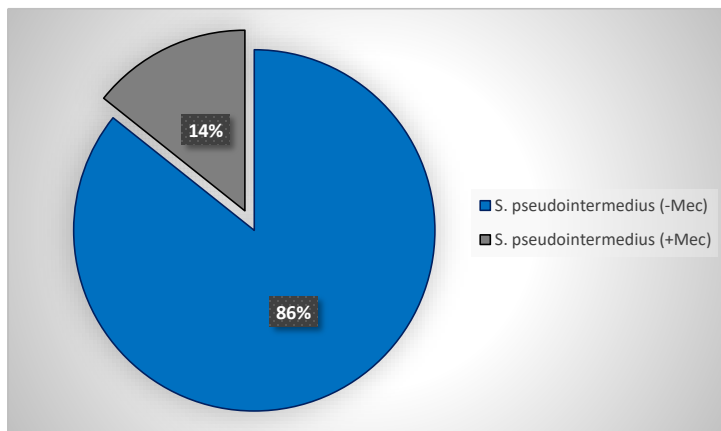


Figura 9. Amplificación específica del gen *mecA* en muestras obtenidas de *Staphylococcus pseudintermedius*, previamente identificados en cada individuo, mediante electroforesis en gel agarosa.

Fuente: Asqui (2024)

Gráfico 3 Presencia del Gen *mecA*, dentro de muestras positivas para *Staphylococcus pseudintermedius* en caninos sanos.

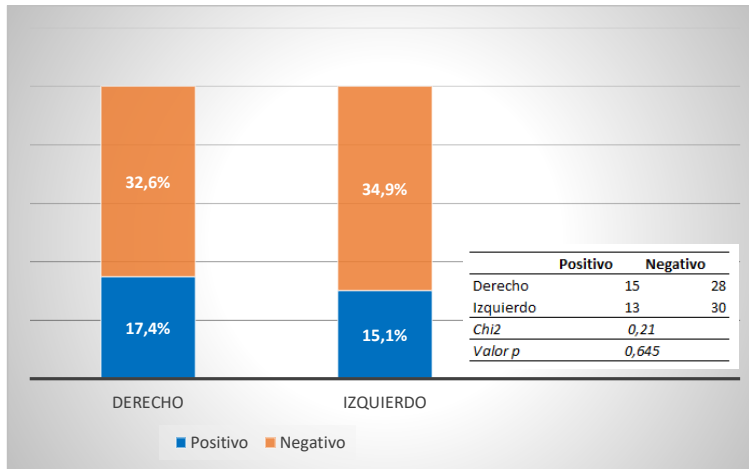


En el gráfico 3, representa la presencia específica del Gen *mecA* dentro del total de muestras positivas para *Staphylococcus pseudintermedius*, siendo el 14% positivas para el gen de resistencia *mecA*.

3.2 Relación de la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* con la Variables de Estudio

Una vez establecida la presencia de la bacteria dentro de las muestras de hisopado corneal, se estableció la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius*, en la población canina estudiada y se realizó un análisis de la relación existente entre los casos positivos para esta bacteria con el sexo del animal, su edad y si han sido sometidos a un proceso de esterilización. También se analizó si la ubicación anatómica del ojo derecho o izquierdo de donde procede la muestra y si existe alguna relación que conduzca a identificar la presencia del Gen *mecA*, en base a estas variables.

Gráfico 4 Asociación de la Presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* con la Ubicación de los Ojos del Canino.



El gráfico 4. Representa cuantitativamente cuántos casos fueron positivos para la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* en relación a la ubicación anatómica de los ojos del canino, en dónde ocurrió un mayor número de aislamientos en el ojo derecho con 17.4% de los casos frente a la izquierda con 15.1%, de los casos; estos valores fueron analizados mediante una prueba de Chi² de Pearson, y en donde el valor $p=0,645$ ($p \geq 0,05$), nos indica que no existe una asociación directa entre la ubicación del ojo y la presencia de la bacteria.

Gráfico 5 Distribución de Casos Resistentes a Meticilina (Gen *mecA*) en base a la ubicación de los Ojos del Canino.

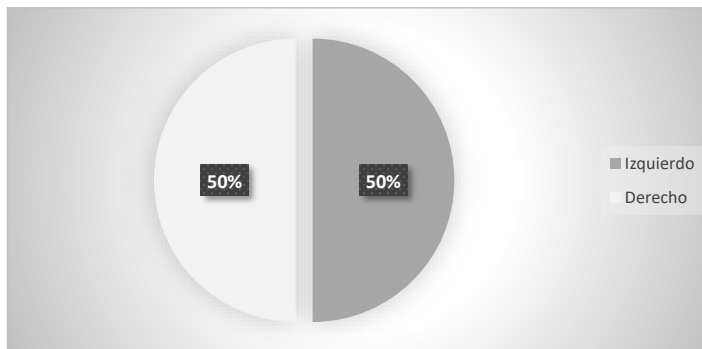


Gráfico 5. De los cuatro casos identificados resistentes a la Meticilina debido a la presencia del Gen *mecA*, dos fueron en el ojo izquierdo y dos fueron en el ojo derecho. Este análisis llega a ser únicamente descriptivo, debido a que reportamos 4 casos positivos al gen de resistencia, y no existe una tendencia hacia una posición del ojo.

Gráfico 6 Asociación de la Presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* con el sexo del Canino.

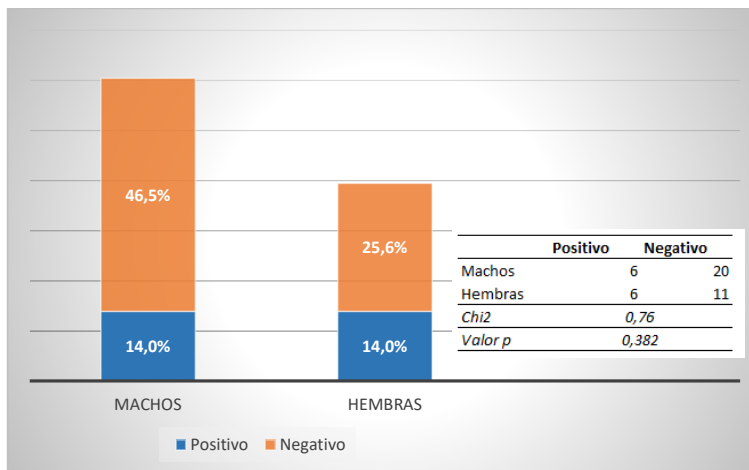
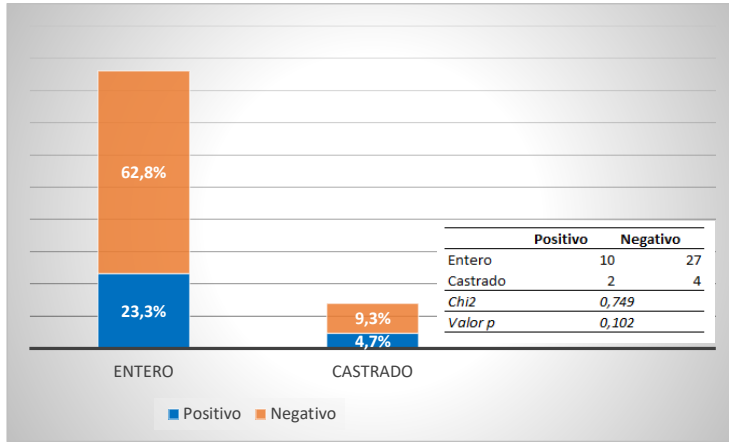


Gráfico 6. Representa cuantitativamente cuántos casos fueron positivos para la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* en relación al sexo del canino, en donde ocurrió el mismo número de aislamientos para los dos sexos (14% del total de casos reportados) aunque hubo más presencia de machos que hembras, por lo que numérica y proporcionalmente existen más casos de hembras positivas que de machos; estos valores fueron analizados mediante una prueba de Chi² de Pearson, y en donde el valor p=0,382 ($p \geq 0,05$), nos indica que no existe una asociación directa entre el sexo la presencia de la bacteria.

De los cuatro casos identificados resistentes a la Meticilina debido a la presencia del Gen *mecA*, uno fue macho y dos fueron hembras. Este análisis llega a ser únicamente descriptivo, debido a que solo hubo 3 individuos, y no existe una tendencia hacia un sexo en específico.

Gráfico 7 Asociación de la Presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* con la esterilización del Canino.



Como muestra el Gráfico 7. Existe mayoría de animales enteros (86%) en relación a los animales castrados (14%). De los animales enteros el 23,3% fueron positivos para *S. pseudintermedius*, y de los castrados un 4,7%. Por lo tanto, numéricamente existen mas animales enteros que castrados, sin embargo al ser analizados mediante una prueba de Chi² de Pearson, y el valor p=0,102 ($p \geq 0,05$), nos indica que no existe una asociación directa entre el estado reproductivo del animal y la presencia de la bacteria.

Por otro lado, los 3 animales que presentaron el gen de resistencia *MecA*, fueron enteros.

Gráfico 8 Asociación de la Presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* con la edad del Canino.

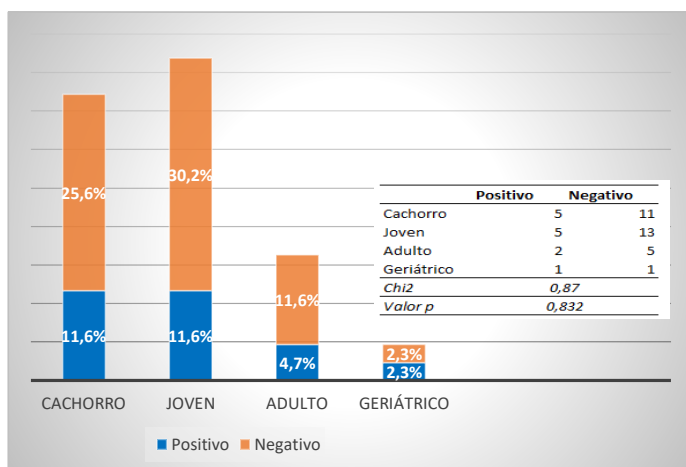


Gráfico 8. Muestra cuantitativamente los casos positivos de *S. pseudintermedius* en relación a la edad del animal. En este caso la mayoría de animales fueron cachorros y jóvenes existiendo mayor número de aislamientos en estos grupos. Proporcionalmente el mayor número de aislamientos se dio en animales geriátricos sin embargo al realizar el análisis de asociación entre positivos y negativos de acuerdo al grupo etario mediante la prueba de Chi² de Pearson, se puede observar que no existe un valor de significancia $p=0,83$ ($p \geq 0,05$), que determina una asociación entre la Edad y la presencia de la bacteria.

En este estudio únicamente se encontraron genes resistentes a la Meticilina en animales jóvenes.

3.3 Análisis de la relación de *Staphylococcus pseudintermedius* con la Conformación del Cráneo.

La variación de la conformación del cráneo en los animales está relacionada a cambios genéticos en el animal, en este caso a continuación se presenta la asociación entre la presencia del Gen *mecA* y de casos positivos a *S. pseudintermedius* con la forma del cráneo. En este estudio fueron positivas muestras de 2 ojos del mismo animal braquicefálico, 7 ojos de animales mesaticefálico y 34 ojos de animales dolicocefálicos.

Gráfico 9 Relación de la Presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* con la Conformación del Cráneo.

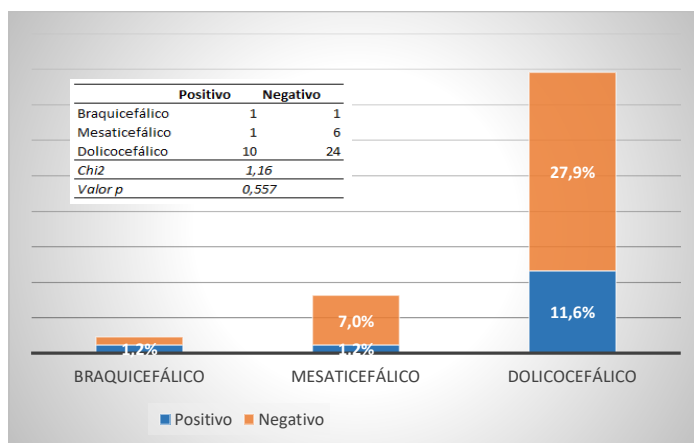
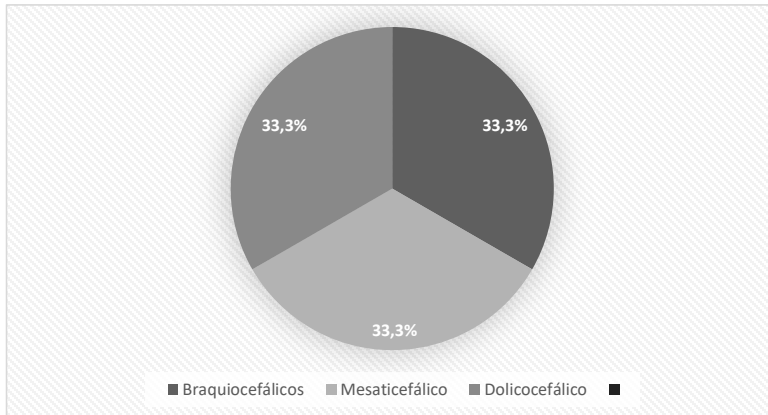


Gráfico 9. Observamos la mayor distribución de casos en animales dolicocefálicos. Al hacer un análisis de la proporción de estos casos de acuerdo al número de individuos mediante la prueba de Chi² de Pearson, se puede observar que no existe un valor de significancia $p=0,55$ ($p \geq 0,05$). A pesar de estos, resultados llama la atención que el 50% de los casos braquicefálicos sean positivos a la bacteria.

Gráfico 10 Distribución de Casos Resistentes a Meticilina (*Gen mecA*) en relación a la Conformación del Cráneo.

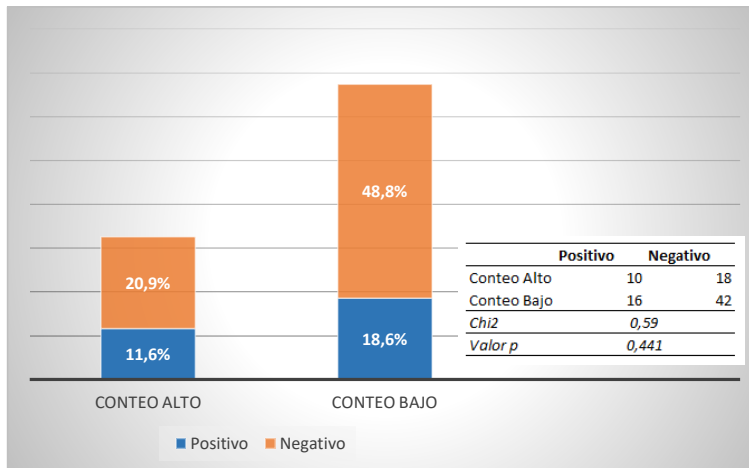


El gráfico 10 demuestra que existe un caso de animal braquiocefálico, un mesaticefálico y un dolicocefálico, esto representa un 33,3 % para cada tipo de forma de cráneo. Esta información es relevante ya que proporcionalmente la población braquiocefálica de estudio fue muy baja. Por lo tanto, no se puede determinar una asociación significativa ($p < 0,05$) pero si se puede destacar que, aunque hubo dos individuos braquiocefálicos uno salió positivo para *S. pseudintermedius* y con presencia del gen *MecA*.

3.4 Análisis de la asociación de *S. pseudintermedius* con la producción lagrimal.

De acuerdo a los resultados obtenidos al medir la producción lagrimal de cada individuo mediante el test de Schirmer tipo 1 se sometió a una prueba estadística paramétrica para evaluar y analizar si las variables estudiadas se relacionan con el aumento o deficiencia de la producción lagrimal de los ojos de cada individuo. En las siguientes tablas y figuras se representan este análisis.

Gráfico 11 Asociación de la Presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* con la producción Lacrimal.



El gráfico 11, resume la asociación de *S. pseudintermedius* en relación a la producción lagrimal determinado por el Test de Schirmer, en este caso no se pudo observar diferencias estadísticas mediante la prueba de asociación de Chi², sin embargo, se pudo establecer que la mayoría de animales tuvieron una baja producción lagrimal (57.4%), mientras existió un menor número de animales con producción lagrimal alta (32.6%). En esta investigación la presencia de estafilococos no se asocia con la producción lagrimal, $p=0,44$ ($p \geq 0,05$), pero el 100% de los casos resistentes a Meticilina (Gen *mecA*) tuvieron una producción lagrimal alta.

Tabla 7 Análisis de la producción Lagrimal en relación a la Posición Anatómica del Ojo.

Ojo	n	Media	D.E.	Valor p
Derecho	43	19,09	1,16	0,870
Izquierdo	43	19,33	1,16	

* $p < 0,05$ presenta diferencias significativas

Tras el análisis de la posición anatómica del ojo en relación a la producción lagrimal (ANOVA de una Vía), estableció que no existen diferencias entre las variables $p=0,87$ ($p > 0,05$), del total de muestras tomadas ($n=86$), por lo que la posición del ojo no afecta la producción lagrimal, según el test de Schirmer tipo 1, según se observa en la tabla 7.

Tabla 8 Análisis de la producción Lacrimal en Relación al Sexo.

Sexo	N	Media	D.E.	Valor p
Macho	26	19,50	6,09	0,613
Hembra	17	18,76	7,25	

* $p < 0,05$ presenta diferencias significativas

El análisis del Sexo en Relación a la producción Lacrimal (ANOVA de una Vía), estableció que no existen diferencias entre las variables $p = 0,61$ ($p > 0,05$), del total de individuos ($n = 43$), por lo que el sexo no afecta a la producción lacrimal, según el test de Schirmer, según se observa en la tabla 8.

Tabla 9 Análisis de la producción Lacrimal en Relación a la Esterilización.

Esterilizado	n	Media	D.E.	Valor p
Castrado	6	20,83	4,55	0,357
Entero	37	18,95	6,76	

* $p < 0,05$ presenta diferencias significativas

El análisis de los animales esterilizados en Relación a la producción Lacrimal (ANOVA de una Vía), estableció que no existen diferencias entre las variables, $p = 0,35$ ($p > 0,05$), del total de individuos ($n = 43$), por lo que el proceso no afecta la producción lacrimal, según el test de Schirmer, según se observa en la tabla 9.

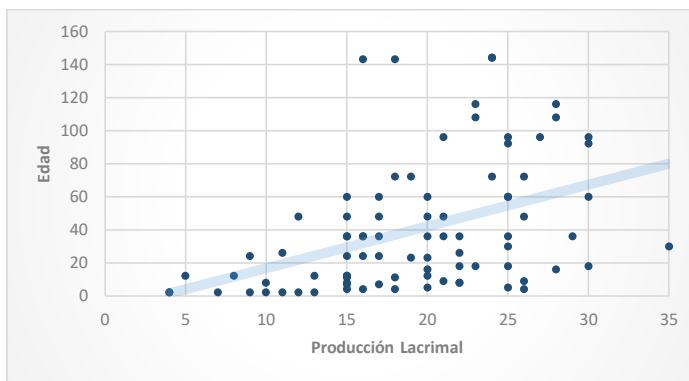
Tabla 10 Análisis de la producción Lacrimal del Ojo en Relación a la Edad

Edad	n	Media	D.E.	Valor p
Cachorro ^a	16	15,47	6,50	0,001
Joven ^{ab}	18	20,22	5,77	
Adulto ^b	7	24,79	3,75	
Geriátrico ^{ab}	2	20,5	4,12	

* literales diferentes ($p < 0,05$) presenta diferencias significativas

El análisis de los animales esterilizados en Relación a la producción Lacrimal (ANOVA de una Vía), estableció que si existen diferencias entre las variables ($p < 0,01$), del total de individuos ($n=43$), por lo que el test si se ve afectado el grupo etario, donde los cachorros tiene un menor flujo lagrimal ($15,47 \pm 6,50$), frente a animales adultos, según se observa en la tabla 10. En base a esto se realizó un análisis de correlación de Pearson ($p < 0,05$), entre las variables Edad medida en meses y producción lagrimal, determinándose un nivel moderado de relación ($r=0,46$) entre las mismas, según se observa en el gráfico 12, donde se puede observar que a mayor edad mayor producción lagrimal, aunque esa distribución se ve afectada conforme los animales se vuelven geriátricos, sin llegar a ser significativa ($p > 0,05$).

Gráfico 12 Distribución de la Correlación (r) entre Edad y producción Lacrimal.



3.5. Relación de la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente (Gen *mecA*) con la producción lagrimal y la Conformación del Cráneo.

El análisis final establece la relación de la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente (Gen *mecA*) con la producción lagrimal y la Conformación del Cráneo. La primera tabla reúne en el ANOVA, las medias de la producción lagrimal y determina si existen o no diferencias significativas y la segunda realiza en mismo análisis, pero en relación a la Conformación del Cráneo.

Tabla 11 Análisis de la producción Lacrimal del Ojo en Relación a los casos de *Staphylococcus*

<i>Staphylococcus</i>	n	Media	D.E.	Valor p
Negativo	58	19,21	6,14	
Positiva (Mec -)	24	18,58	7,78	0,462
Positiva (Mec +)	4	23,00	2,94	

* p<0,05 presenta diferencias significativas

Las medias de la producción lacrimal en relación a la identificación de casos positivos en hisopados de córnea de caninos, nos indica valores superiores en los casos Positivos de *mecA* (23,00±2,94) sobre el resto de la población: Positivos pero negativos a *mecA* (18,58±7,78), y Negativos (19,21±6,14), sin que existan diferencias significativas p=0,46 (p>0,05) entre los Casos.

Tabla 12 Análisis de la producción Lacrimal del Ojo en Relación a la Conformación Craneal.

<i>Staphylococcus</i>	n	Media	D.E.	Valor p
Braquicefálico	2	21,50	3,11	
Mesaticefálico	7	21,71	5,37	0,201
Dolicocefálico	34	18,56	6,76	

* p<0,05 presenta diferencias significativas

Las medias de la producción lacrimal en relación a la identificación de casos positivos en hisopados de córnea de caninos, nos indica valores inferiores en los casos Dolicocefálico (18,56±6,76) sobre el resto de la población: Braquicefálico (21,50±3,11), y Mesaticefálico (21,71±5,37), sin que existan diferencias significativas p=0,2 (p>0,05) entre los casos.

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Esta investigación se basa en el reporte de los fragmentos genómicos, asociados a la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius*, mismos que fueron aislados e identificados, para su reconocimiento.

Mediante el uso de *primers* específicos usados en publicaciones de investigación de alto impacto para *S. pseudintermedius* y su gen de resistencia *mecA*, se identificó a través, de la técnica de PCR tipo *Nested* a esta bacteria, dando severidad y certeza a los resultados obtenidos en este estudio (Yang, et al., 2017).

Este estudio identificó que el 33% de la población fueron positivas para *S. pseudintermedius*, casi similar al 21 % aislado en Yangzhou, China. (Wang *et al.*, 2022) Pueden existir variaciones relacionadas al número más alto de muestras recolectadas en el estudio de China (119 muestras), siendo relativamente mayor que en nuestro estudio. (Soimala, y otros, 2020) En otro estudio aislaron 39,6% de *S. pseudintermedius* de ojos enfermos, este valor es casi similar al hallado en nuestro estudio, por lo tanto, la presencia de esta bacteria es casi similar cuando hay alteraciones oftalmológicas, cuanto el ojo del individuo es sano, dándonos a entender que la bacteria es oportunista y su presencia en el microbioma ocular es de valor diagnóstico (Tanawana *et al.*, 2020).

Es relevante mencionar que, en la investigación realizada en Ecuador por Robles en el 2019, identificó a *S. pseudintermedius* en el 86% de muestras nasales y 76% en muestras perianales en perros sanos. En nuestro estudio se identificó 33% de *S. pseudintermedius* en hisopados oculares de perros sanos. Entendiéndose que en la nariz es más predisponente esta bacteria que en otras zonas, ya que esta estructura anatómica mantiene mayor contacto con superficies, mucosas de otros animales e incluso personas. A diferencia de los ojos, que son estructuras anatómicas menos expuestas y más protegidas. (Robles, 2019)

El 5% del total de muestras obtenidas en este estudio presentaron el gen de resistencia *mecA*, contrario al encontrado por Mouney *et al.* (2013) donde mencionan la presencia del 1.6% de *S. pseudintermedius* aislados en perros sanos en su estudio, siendo mayor la presencia de esta

bacteria en nuestro medio. También difiere con los establecidos en otras especies y otros órganos.

La presencia de este gen alcanza el 40% en infecciones de la piel y pioderma (Griffeth, et al., 2008) inclusive datos reportados en gatos sanos ascienden al 75% y en enfermedades dérmicas alcanza el 87% (Galarce, et al., 2016).

Se ha determinado que la mayoría de perros sanos están colonizados por *Staphylococcus pseudintermedius*, en piel o mucosas. Aproximadamente el 10% de *S. pseudintermedius* fueron resistentes para Meticilina (Diana et al. 2019). Cifra casi similar, ya que, en nuestro estudio se observa que el 14 % de *S. pseudintermedius* presentaron el gen de resistencia *MecA*, en ojos de perros sanos. Pero es diferente al 36% estudio reportado por Kang & Chae (2014) en Corea. Y el 7,9% encontrado en un estudio realizado en Berlín, Alemania (Soimala, y otros, 2020).

Esta diferencia podría estar relacionada a que los individuos estudiados en Corea tuvieron enfermedades oftalmológicas. Pero confirma que *S. pseudintermedius* es altamente específica del huésped y es posible la transmisión de piel al ojo. (Kang & Chae, 2014)

En Ecuador se concluyó que el 65,3% de *S. pseudintermedius* de las muestras tomadas de perros sanos fueron meticilino resistentes, diferente a lo analizado en nuestro estudio donde encontramos 14%. Puede diferir porque las muestras fueron tomadas de mucosa nasal y perianal, lugares donde la presencia de esta bacteria es mucho mayor. (Robles, 2019)

Comentado [D1]: En que especie?

Esto realza los datos obtenidos en esta investigación ya que permite comprender la importancia de cada especie y cada ambiente en la presencia de casos, donde se aprecia valores diferentes dependiendo la localización de toma de muestra y su geografía. Acercándonos a la realidad que encontramos en nuestro país.

En esta investigación no se pudo evidenciar un efecto de la posición del ojo, dentro de la población o los casos positivos hacia el gen, dada por un valor $p=0,645$. Siendo similar a los encontrados en estudios anteriores. (Faghihi y Rajaei, 2023)

Faghihi y Rajaei, (2023) realizaron un estudio utilizando el Test de Schirmer y evaluando su relación con los mismos factores de esta investigación. Dentro de sus resultados no encontraron mayor relación con la edad, ni con ninguna de las otras variables de clasificación

del canino como sexo, estado reproductivo o lateralidad ocular, exceptuando la conformación del cráneo donde se observó mayor número de problemas en caninos Braquiocefálicos.

Conforme el animal va creciendo la actividad lagrimal va variando, de forma ascendente y conforme el animal se vuelve geriátrico este produce menor cantidad de lágrimas. En esta investigación se pudo relacionar de forma moderada la edad con la cantidad en lágrimas producidas ($r=0,46$).

En relación a la edad, Broadwater, et al., (2010) determinaron una variación de la producción lagrimal en relación a las semanas de nacido del animal, lo que está asociado a los resultados de nuestra investigación donde los animales más jóvenes presentaban valores menores ($15,47 \pm 6,50$ mm/min) de producción lagrimal que al resto del grupo.

El Test de Schirmer tipo 1, permite evaluar la producción lagrimal de los caninos, y relacionarlos con una enfermedad oftalmológica. Valores inferiores a 15mm/min, estaba asociados a este tipo de enfermedades, sin embargo, al momento de aislar la bacteria de *Staphylococcus spp*, no se evidenció una asociación entre cantidad de lágrimas con la presencia de la bacteria. Es importante destacar que esta investigación se enfocó en identificar la presencia / ausencia de la bacteria, más no su carga, además la población de muestreo eran perros clínicamente sanos.

Con respecto a la conformación del cráneo de los individuos, los braquiocefálicos son propensos a presentar enfermedades oculares, y alteraciones en su microbioma ocular, debido a sus factores morfológicos predisponentes como la presencia de pliegues nasales que, en algunos casos tiene contacto con la córnea, también presentan un aumento del 10% en el ancho de su apertura palpebral dejando mayor tejido escleral expuesto (Suter, Voelter, Hartnack, Spiess, & Pot, 2017).

Si bien el resultado de este estudio no llega a ser concluyente estadísticamente, por los pocos casos de individuos braquiocefálicos, se identificó un caso de *S. pseudintermedius* y con el gen de resistencia *mecA*. Estos datos podrían generar futuras de investigaciones específicas en este tipo de animales que corroboren los datos de Faghihi y Rajaei, (2023), quienes indican que los braquiocefálicos son más predisponentes a padecer patologías oftalmológicas y

nosotros concluimos que probablemente es más propenso a contener esta bacteria por contacto de sus pliegues a la córnea y su cercanía con la mucosa nasal a los ojos.

Las investigaciones relacionadas a los factores ambientales con enfermedades microbiológicas o nosocomiales son escasas en el país y no establecen una asociación con los factores intrínsecos del animal. Tal es el caso que en humanos a nivel ocular no existe evidencia relevante sobre el efecto del sexo u otros factores generales sobre la presencia de bacterias resistentes (Ju Lee, et al., 2022). Es importante señalar este punto debido al potencial zoonótico de estas bacterias (Tabatabaei, et al., 2020), por lo que el comprender su presencia en cualquier especie, conduce a un mejor entendimiento de su impacto y riesgo de transmisión (Zhang, et al., 2011). Es por esto, que se debería descartar factores predisponentes como sexo o edad en la prevalencia de bacterias resistentes y enfocarse más en los factores ambientales de transmisión (Souza Silva, *et al.*, 2022).

CONCLUSIONES

La identificación de *Staphylococcus pseudintermedius* y de su Gen *mecA*, por medio de técnicas moleculares (PCR) o MALDI-TOF, cada vez está más disponible para los Médicos Veterinarios y es la mejor alternativa para el correcto uso de antibióticos en Medicina Veterinaria.

Se identificó que el 33 % de la población muestreada presentó *Staphylococcus pseudintermedius* y, de este grupo, el 14% de *Staphylococcus pseudintermedius* presentó el gen de resistencia *MecA*. Concluyendo que se encuentra presente de manera saprófita en la córnea de perros sanos. Es importante recordar que esta bacteria es oportunista, y cuando existen las condiciones puede generar enfermedades en la conjuntiva ocular e inclusive se ha reportado casos de queratitis bacteriana.

En el estudio realizado, no existe relación con la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a Metilina con la producción lagrimal medidos por el test de Schirmer tipo 1 de los ojos muestreados. Tampoco existe relación con la edad, sexo, lateralidad anatómica del ojo, conformación del cráneo y estado reproductivo del individuo.

En cuanto a la relación entre la conformación de cráneo de los perros muestreados y la presencia de *S. pseudintermedius* resistente a las Metilinas se reportó un caso de un animal braquiocefálico, sin embargo, no es concluyente, ya que en la investigación la población de animales con esta característica fenotípica fue escasa.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios más profundos del microbioma ocular y sus zonas geográficas en el Ecuador, para identificar prevalencias y fomentar programas de salud que prevenga el desarrollo de esta bacteria y salvaguardar la salud ocular.

Estudiar la prevalencia exclusivamente con animales braquicefálicos y determinar si esta condición conformacional del cráneo, el contacto que tiene sus pliegues nasales con la córnea y su cercanía con las fosas nasales influye en la tasa de presentación de *Staphylococcus pseudintermedius* y su gen de resistencia *mecA*.

Comentado [D2]: Considera que la información obtenida te permita recomendar medidas preventivas para controlar y/o disminuir la presencia del problema en nuestro entorno.

BIBLIOGRAFÍA

- Ávila Gonzales, C. R. (2022). Conocimiento del médico veterinario sobre la inseminación artificial en perros braquicéfalos en el Distrito de Ate, Lima-Perú (2021).
- Bannoehr, J., Franco, A., Iurescia, M., Battisti, A., & Fitzgerald, R. (2009). Molecular Diagnostis Identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(2), 469–471. <https://revistas.ufrj.br/index.php/rce/article/download/1659/1508%0Ahttp://hipatiapress.com/hpjourals/index.php/qre/article/view/1348%5Cnhttp://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09500799708666915%5Cnhttps://mckinseysociety.com/downloads/reports/Educati>
- Broadwater, J. J., Colitz, C., Carastro, S., & Saville, W. (2010). Tear production in normal juvenile dogs. *Veterinary ophthalmology*, 13(5), 321-325.
- Cairampoma, M. R. (2015). Tipos de Investigación científica: Una simplificación de la complicada incoherente nomenclatura y clasificación. *Redvet. Revista electrónica de veterinaria*, 16(1), 1-14.
- Carroll, K., Burnham, C.-A., & Westbalade, L. (2021). From canines to humans: Clinical importance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *PLOS PATHOGENS*, 1-9.
- Cosmin, George, CRISTIANA Novac, Ioana Matei, Cosmina Bouari, Zoltan Gal, Octavia Tamas-Krumpe, Adrian Macri, and Nicodim Iosif. 2021. “Prevalence of Antimicrobial Resistant Bacteria from Conjunctival Flora in an Eye Infection Prone Breed (Saint Bernard).” *Molecules* 26:1–9.
- Cullen, Cheryl L., Sherri L. Ihle, Aubrey A. Webb, and Carole McCarville. 2005. “Keratoconjunctival Effects of Diabetes Mellitus in Dogs.” *Veterinary Ophthalmology* 8(4):215–24.
- Davidson, Harriet J., and Vanessa J. Kuonen. 2004. “The Tear Film and Ocular Mucins.” *Veterinary Ophthalmology* 7(2):71–77.

Denamiel, G., Puigdevall, T., Más, J. ;, Albarellos, G., & Gentilini, E. (2009). Prevalencia y perfil de resistencia abetalactámicos en estafilococos de perros y gatos. *InVet*, 11(2), 117–122.

Devriese, Luc A., Katleen Hermans, Margo Baele, and Freddy Haesebrouck. 2009. “*Staphylococcus Pseudintermedius* versus *Staphylococcus Intermedius*.” *Veterinary Microbiology* 133(1–2):206–7.

Diana, Leticia, Camila Ciuffo, and Hector Musto. 2019. “Identificación y Caracterización de *Staphylococcus* Resistentes a Meticilina Aislados de Perros.” *Veterinaria (Montevideo)* 55(212):45–51.

Domínguez, M. G., Carvajal, H., Calle-Echeverri, D., & Cárdena, D. C. (2020). Molecular Detection and Characterization of the *mecA* and *nuc* Genes From *Staphylococcus* Species (*S. aureus*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi*) Isolated From Dogs Suffering Superficial Pyoderma and Their Antimicrobial Resistance Profiles. *Frontiers in Veterinary Science*, 1–11.

Faghihi, H., & Rajaei, S. M. (2023). Tear film breakup time and Schirmer tear test in normal dogs: effects of age, sex, reproductive status, skull type, and nasolacrimal duct patency. *Veterinary Ophthalmology*, 26, 72–80.

Fuda, C. C. S., J. F. Fisher, and S. Mobashery. 2005. “ β -Lactam Resistance in *Staphylococcus Aureus*: The Adaptive Resistance of a Plastic Genome.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 62(22):2617–33.

Furiani, Nicla, Fabia Scarpella, Piera Anna Martino, Ilaria Panzini, Elisabetta Fabbri, and Laura Ordeix. 2011. “Evaluation of the Bacterial Microflora of the Conjunctival Sac of Healthy Dogs and Dogs with Atopic Dermatitis.” *Veterinary Dermatology* 22(6):490–96.

Foti, M., Fisichella, V., & Giacobello, C. (2013). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the microbial flora from the conjunctiva of healthy donkeys from Sicily (Italy). *Veterinary Ophthalmology*, 16(2), 89–92.

<https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2012.01028.x>

Freire, M. G. (2020). Osmolaridad de la película lagrimal y test de Schirmer en el diagnóstico de queratoconjuntivitis seca en perros (*Canis lupus familiaris*) en relación a su condición sexual. Universidad de Cuenca, 1-73.

Galarce, N., Muñoz, L., & Jara, M. A. (2016). Detección del gen. *Rev. Chilena Infectol*, 33(4), 410–418.

Gatica, M., & Rojas, H. (2018). GESTIÓN SANITARIA Y RESISTENCIA EN ANIMALES DE PRODUCCIÓN. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 35(1), 118–125.
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3571.118>

Gelatt, K. (2021). *Veterinary Ophthalmology*. Pondicherry, India: John Wiley & Sons, Inc.

Getty, R. (2001). ANATOMÍA DE LOS ANIMALES DOMÉSTICOS. Barcelona: MASSON, S.A

Giacoboni, Gabriela Isabel, and Paula Gagettti. 2020. “*Staphylococcus Pseudintermedius* and the One Health Approach.” *ANALECTA VETERINARIA* 40(2).

Google Maps (2015) Riobamba Chimborazo. Recuperado de:
<https://www.google.com/maps/place/Riobamba,+Ecuador/@-1.6635454,-78.6572209,724m/data=!3m1!1e3!4m6!3m5!1s0x91d3a961953f4fb3:0x9e8d5fbb66bfc5ec!8m2!3d-1.6635508!4d-78.654646!16s%2Fg%2F11h04d1nld?entry=ttu>

Google Maps (2024) LABIGEN Recuperado de:
<https://www.google.com/maps/place/LABIGEN/@-0.1586671,-78.465469,724m/data=!3m2!1e3!4b1!4m6!3m5!1s0x91d59bca314bc8e9:0xcf3ea1461d4f26a2!8m2!3d-0.1586725!4d-78.4628941!16s%2Fg%2F11nckkf6xk?entry=ttu>

Griffeth, G., Morris, D., Abraham, J., Shofer, F., & Rankin, S. (2008). Screening for skin carriage of methicillin - resistant coagulase - positive *staphylococci* and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *ESVD and ACVD*, 19, 142–149.

Hugues, B., & Torres, M. (2022). Enfermedades del sistema ocular diagnosticadas en perros y. *Rev Inv Vet Paró*, 33(2), 1–10.

- Hewitt, Joshua S., Rachel A. Allbaugh, Danielle E. Kenne, and Lionel Sebbag. 2020. "Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Bacterial Isolates From Dogs With Ulcerative Keratitis in Midwestern United States." *Frontiers in Veterinary Science* 7(November):1–10.
- Hugues, B., & Torres, M. (2022). Enfermedades del sistema ocular diagnosticadas en perros y. *Rev Inv Vet Paró*, 33(2), 1–10.
- InfoStat Estudiantil (2020). InfoStat, versión 2008. Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina.
- Jang, Y., Bae, D., Cho, J., & Bahk, G. J. (2014). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus spp.* isolated from dogs in Korea. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 62(5), 163–170. <https://doi.org/10.14943/jjvr.62.4.163>
- Johnson, M. E., & Murphy, P. J. (2004). Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome. *Progress in retinal and eye research*, 23(4), 449-474.
- Kang, M.-H., & Chae, M.-J. (2014). Antibiotic resistance and molecular characterization of ophthalmic *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. *Journal of Veterinary Science*, 409-415.
- Labarca, J., & Araos, R. (2009). Resistencia antimicrobiana: Problema en aumento y soluciones escasas. 26(Supl 1), 8–9.
- Lee, H. J., Yoon, C. H., Kim, H. J., Ko, J. H., Ryu, J. S., Jo, D. H., Kim, J. H., Kim, D., & Oh, J. Y. (2022). Ocular microbiota promotes pathological angiogenesis and inflammation in sterile injury-driven corneal neovascularization. *Mucosal Immunology*, 15(6), 1350–1362. <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00555-2>
- Leis, M. (2023). An Update on the Ocular Surface Bacterial Microbiota un Small Animals. *Vet Clin Anim*, 53, 299–318.
- LoPinto, A. J., Mohammed, H. O., & Ledbetter, E. C. (2015). Prevalence and risk factors for isolation of *methicillin-resistant Staphylococcus* in dogs with keratitis. *Veterinary Ophthalmology*, 18(4), 297–303. <https://doi.org/10.1111/vop.12200>

- Marín, R. Z., Regateiro, A. A., & Gundián, J. (1998). Cefalosporinas. 8(1), 40–47.
- McDonald, P. J., & Watson, A. D. J. (1976). Microbial flora of normal canine conjunctivae. *Journal of Small Animal Practice*, 17(12), 809–812. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1976.tb06947.x>
- Matilla, M. T., & Bravo, M. (2016). Resistencia antibiótica: el caso de los estafilococos meticilino-resistentes. *DIALNET*, 9-11.
- Mejía, M. G. (2020). Osmolaridad de la película lagrimal y test de Schirmer en el diagnóstico de queratoconjuntivitis seca en perros (*Canis lupus familiaris*) en relación a su condición sexual. Universidad de Cuenca, 1-73.
- Microsoft. (2015). Microsoft Office Excel [Versión 2015]. Microsoft Corporation
- Moreno, F. D. J. (2017). Uso actual de las penicilinas clásicas. *Medicina General*, 264–269.
- Mouney, M. C., Stiles, J., Townsend, W. M., Guptill, L., & Weese, J. S. (2013). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. in the conjunctival sac of the healthy dogs. *Veterinary Ophthalmology*, 1-4.
- Murphy, C. J., & Maggs, D. J. (2015). Ocular microbiology. In *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology* (pp. 33–54).
- Nisa, Shahista, Clément Bercker, Anne C. Midwinter, Ian Bruce, Chris F. Graham, Pierre Venter, Allan Bell, Nigel P. French, Jackie Benschop, Karen M. Bailey, and David A. Wilkinson. 2019. "Combining MALDI-TOF and Genomics in the Study of Methicillin Resistant and Multidrug Resistant *Staphylococcus Pseudintermedius* in New Zealand." *Scientific Reports* 9(1):1–13.
- Parés-Casanova, P. M. (2021). Similares asimetrías fluctuantes en las tres tipologías craneales caninas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(1).
- Patiño-Rodríguez Ana, M. (2023). Factores antigenicos y consecuencias fisiopatologicas causadas por *staphylococcus pseudintermedius* y *malassezia pachydermatis* en dermatopatias canina. 1–39.

- Prado, Marilena R., Marcos F. G. Rocha, Érika H. S. Brito, Marília D. Girão, André J. Monteiro, Maria F. S. Teixeira, and José J. C. Sidrim. 2005. "Survey of Bacterial Microorganisms in the Conjunctival Sac of Clinically Normal Dogs and Dogs with Ulcerative Keratitis in Fortaleza, Ceará, Brazil." *Veterinary Ophthalmology* 8(1):33–37.
- Pascal Vannuffel, J. G., Houda Ezzedine, B. V., Wauters, G., & Gala, J.-L. (1995). Specific Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus* Species by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2864-2867.
- Pedraza Aguirre, G., & Beltrán Bareño, A. A. (2019). Queratoconjuntivitis seca y cataratas: algunas afecciones oftálmicas comunes en caninos.
- Pérez, D. Q. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque " Una salud " Antimicrobial resistance: evolution and current perspectives in the context of the " One health " approach. 69(3), 1–17.
- Phophi, L., Abouelkhair, M., Jones, R., Henton, M., Qekwana, D., & Kania, S. (2023). The molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* canine clinical isolates submitted to a veterinary diagnostic laboratory in South Africa. *Plos One*, 1-14.
- Puerta Carvajal, O. L., & Arias, J. F. (2019). Comparación de características cardíacas y hemodinámicas en perros braquicefalos y mesocefalos en estado de ejercicio y reposo.
- Ramos, C. (2015). Los paradigmas de la investigación científica Scientific research paradigms. *Revista científica psicológica*, 1-42.
- Ríos, A. M., M. R. Barquero, G. Ortiz, T. Ayllón, L. Smit, M. Rodríguez-Dominguez, and A. Sánchez-Días. 2015. " *Staphylococcus Multirresistentes* a Los Antibióticos y Su Importancia En Medicina Veterinaria." *A.V.E.P.A.* 35(3):149–61.
- Rogers, Callie M., Erin M. Scott, Benjamin Sarawichitr, Carolyn Arnold, and Jan S. Suchodolski. 2020. "Evaluation of the Bacterial Ocular Surface Microbiome in Ophthalmologically Normal Dogs Prior to and Following Treatment with Topical Neomycin-Polymyxin-Bacitracin." *PLoS ONE* 15(6):1–20.

Robles, Nathaly. 2019. "Determinación de *Staphylococcus* Coagulasa Positivo Meticilino Resistentes En Caninos Procedentes de La Clínica Veterinaria de La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de La UCE. Trabajo." Universidad Central del Ecuador.

Rodríguez, S. (2009). CONCORDANCIA ENTRE LA EXPRESIÓN DEL GEN mec A DETERMINADA POR PCR EN TIEMPO REAL EN AISLAMIENTOS CLINICOS DE *Staphylococcus* coagulasa negativa Y EL PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA. Universidad Nacional de Colombia.

Russell, N. P. (2014). Análisis de las indicaciones terapéuticas para el pioderma canino por *Staphylococcus pseudintermedius*. Avances En Ciencias Veterinarias, ág. 58-59.
<http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/132028/Análisis-de-las-indicaciones-terapeúticas-para-el-pioderma-canino-por-Staphylococcus-pseudintermedius.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Sánchez, M., Gutiérrez, N., Padilla, M., & Suárez, L. (2015). Resistencia antimicrobiana de bacterias aisladas de clínicas veterinarias de la ciudad de Ibagué, Colombia. Universidad y Salud, 17(1), 18–31.

Schissler, Jennifer R., Andrew Hillier, Joshua B. Daniels, Lynette K. Cole, and Wondwossen A. Gebreyes. 2009. "Evaluation of Clinical Laboratory Standards Institute Interpretive Criteria for Methicillin-Resistant *Staphylococcus Pseudintermedius* Isolated from Dogs." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 21(5):684–88.

Shivaji, Sisinthy, Rajagopalaboopathi Jayasudha, Sama Kalyana Chakravarthy, Chinthala Reddy SaiAbhilash, Gumpili Sai Prashanthi, Savitri Sharma, Prashant Garg, and Somasheila I. Murthy. 2021. "Alterations in the Conjunctival Surface Bacterial Microbiome in Bacterial Keratitis Patients." Experimental Eye Research 203(November 2020):108418.

Slatter, M. (2008). SLATTER'S FUNDAMENTALS OF VETERINARY OPHTHALMOLOGY. Edition 4. China: Elsevier Inc.

Soimala, T., Becker, A. L., Hanke, D., Eichhorn, I., Febler, A., Schwarz, S., & Eule, J. C. (2020). Molecular and pMolecular and phenotypic characterization of methicillin-resistant

Staphylococcus pseudintermedius from ocular surfaces of dogs and cats suffering from ophthalmological diseases. ELSEVIER, 1-7.

Souza-Silva, T., Rossi, C. C., Andrade-Oliveira, A. L., Vilar, L. C., Pereira, M. F., Penna, B. de A., & Giambiagi-deMarval, M. (2022). Interspecies transfer of plasmid-borne gentamicin resistance between *Staphylococcus* isolated from domestic dogs to *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 98. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105230>

Suárez Leidy Lorena, María del Pilar Sánchez & Norma Patricia Gutiérrez, M. Y. P, (2015). Resistencia antimicrobiana de bacterias aisladas de clínicas veterinarias de la ciudad de Ibagué , Colombia Resumen Introducción. 2015, 14. <http://www.scielo.org.co/pdf/reus/v17n1/v17n1a03.pdf>

Suter, A., Voelter, K., Hartnack, S., Spiess, B. M., & Pot, S. A. (2017). Septic keratitis in dogs, cats, and horses in Switzerland: associated bacteria and antibiotic susceptibility. *Veterinary Ophthalmology*, 66-75.

Tabatabaei, S., Najafifar, A., Askari Badouei, M., Zahraei Salehi, T., Ashrafi Tamai, I., Khaksar, E., Abbassi, M. S., & Ghazisaeedi, F. (2019). Genetic characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in pets and veterinary personnel in Iran: new insights into emerging *methicillin-resistant S. pseudintermedius* (MRSP). *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.08.022>

Tajima, Kazuki, Akiko Sinjyo, Toshio Ito, Yoshizumi Noda, Hiroshi Goto, and Norihiko Ito. 2013. “Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Keratitis in a Dog.” *Veterinary Ophthalmology* 16(3):240–43.

Tolar, Erica; Hendrix, Dia; Barton Rohrbach; Plummer Caryn; Brooks Dennis; Gelatt Kirk. 2006. “Evaluation of Clinical Characteristics and Bacterial Isolates in Dogs with Bacterial Keratitis: 97 Cases (1993–2003).” *AVMA* 228(1).

Turner, Sally M. 2010. *Oftalmología de Pequeños Animales*.

Vannuffe, Pascal, Jacques Gigi, Houda Ezzedine, Bernard Vandercam, Deknee Nucgek, Georges Wauters, and Jean-Luc Gala. 1996. "Specific Detection of *Methicillin-Resistant Staphylococcus* Species by Multiplex PCR [1]." *Journal of Clinical Microbiology* 34(6):1599.

Vengust, M., Anderson, M. E. C., Rousseau, J., & Weese, J. S. (2006). Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. 43, 602–606. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02018.x>

Ventrella, G., Moodley, A., Grandolfo, E., Parisi, A., Corrente, M., Buonavoglia, D., & Guardabassi, L. (2017). Frequency, antimicrobial susceptibility and clonal distribution of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in canine clinical samples submitted to a veterinary diagnostic laboratory in Italy: A 3-year retrospective investigation. *Veterinary Microbiology*, 211(September), 103–106. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.09.015>

Verstappen, K., Huijbregts, L., Spaninks, M., Wagenaar, J., Fluit, A., & Duim, B. (2017). Development of a real-time PCR for detection of *Staphylococcus pseudintermedius* using a novel automated comparison of whole-genome sequences. *PLOS ONE*, 1-10.

Yang, C., Wan, M. T., Lauderdale, T. L., Yeh, K. S., Chen, C., Hsiao, Y. H., & Chou, C. C. (2017). Molecular characteristics of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* harboring arginine catabolic mobile element (ACME) from dogs and cats. *Veterinary Journal*, 224, 46–49. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.06.002>

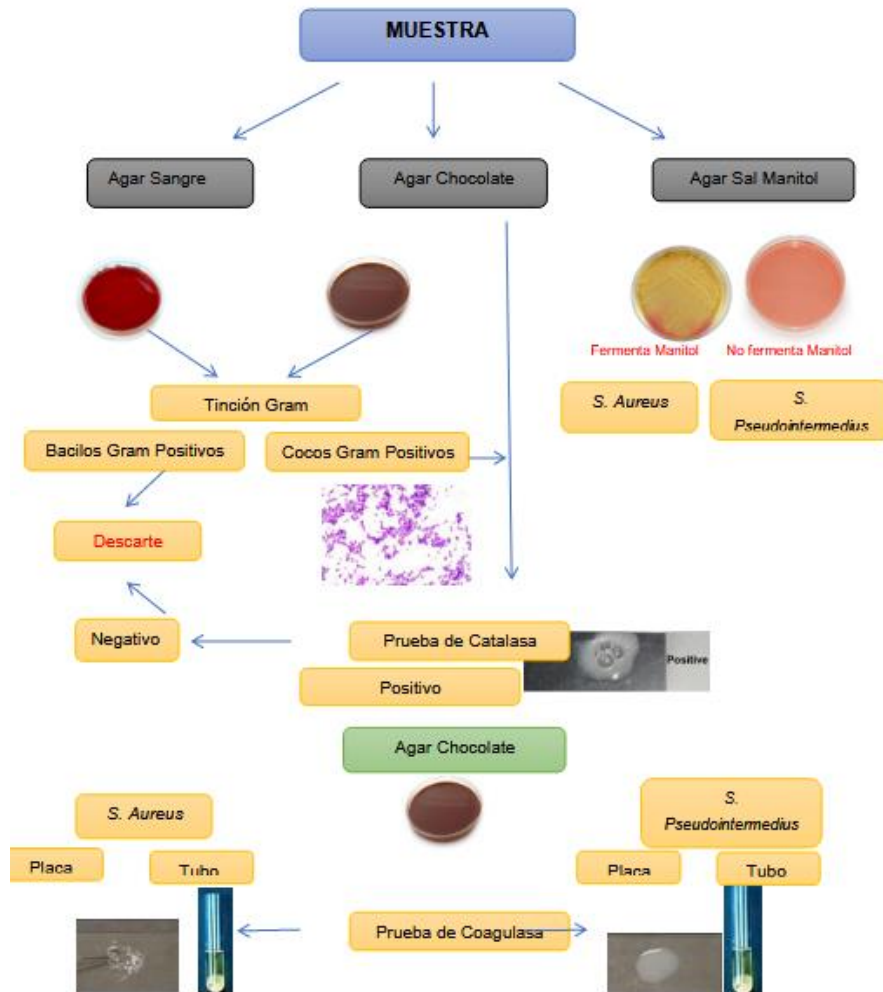
Wang, Li, Qingshan Pan, Libo Zhang, Qin Xue, Jun Cui, and Changming Qi. 2008. "Investigation of Bacterial Microorganisms in the Conjunctival Sac of Clinically Normal Dogs and Dogs with Ulcerative Keratitis in Beijing, China." *Veterinary Ophthalmology* 11(3):145–49.

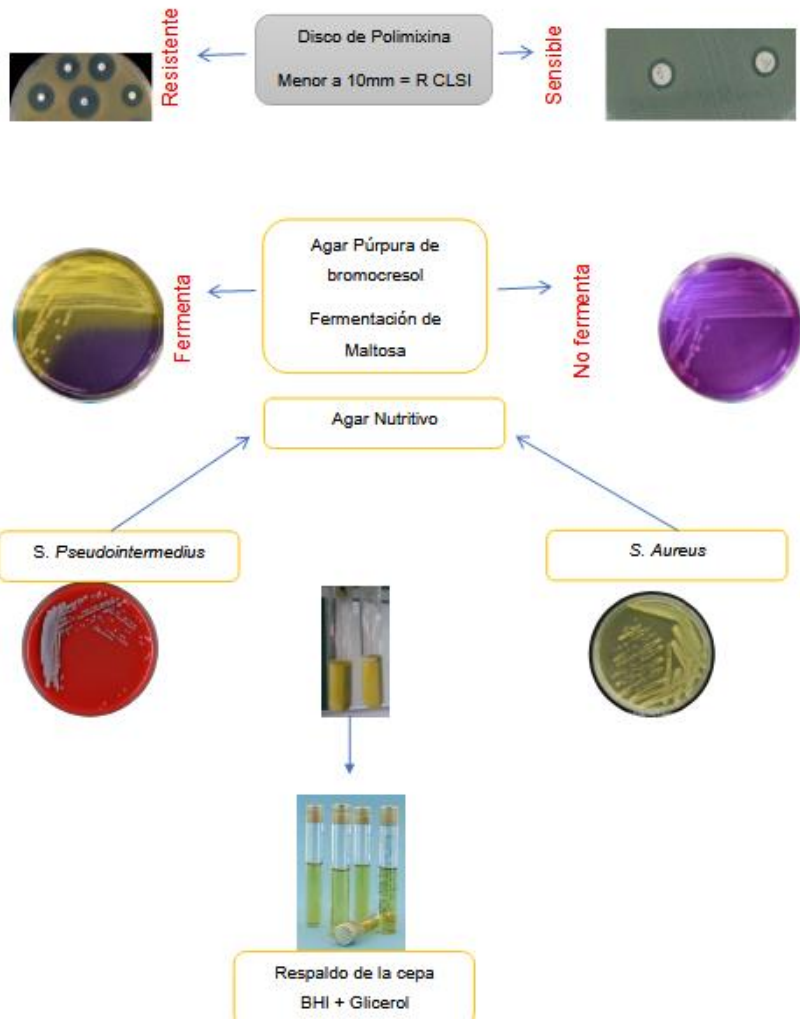
Wang, Z., Guo, L., Junio Li, Jianji, Li., Luying, Cui., Junsheng, Dong., Xiameng., Chen, Qian, Heng, Wang. (2022). Antibiotic resistance, biofilm formation, and virulence factors of isolates of *staphylococcus pseudintermedius* from healthy dogs and dogs with keratitis. *Frontiers*, 1-12.

Zhang, W., Hao, Z., Wang, Y., Cao, X., Logue, C. M., Wang, B., Yang, J., Shen, J., & Wu, C. (2011). Molecular characterization of *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* strains from pet animals and veterinary staff in China. *Veterinary Journal*, 190(2), e125–e129.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.02.006>

ANEXOS

Anexo 1. Algoritmo de identificación de *Staphylococcus* spp.





Fuente: Laboratorio de Bacteriología y Micología FMVZ-UCE
 Fuente: Modificado de Quinn Patrick et al., 2011; Bannoehr & Guardabassi, 2012

Anexo 2. Datos para muestreo

Código		Edad	
Paciente		Conf. Cráneo	
Test schimmer	OD	OI	

Código		Edad	
Paciente		Conf. Cráneo	
Test schimmer	OD	OI	

Código		Edad	
Paciente		Conf. Cráneo	
Test schimmer	OD	OI	

Código		Edad	
Paciente		Conf. Cráneo	
Test schimmer	OD	OI	

Código		Edad	
Paciente		Conf. Cráneo	
Test schimmer	OD	OI	

Código		Edad	
Paciente		Conf. Cráneo	
Test schimmer	OD	OI	

Código		Edad	
Paciente		Conf. Cráneo	
Test schimmer	OD	OI	

Código		Edad	
Paciente		Conf. Cráneo	
Test schimmer	OD	OI	

Código		Edad	
Paciente		Conf. Cráneo	
Test schimmer	OD	OI	

Código		Edad	
Paciente		Conf. Cráneo	
Test schimmer	OD	OI	

Anexo 3. Ficha de examen oftalmológico

MVZ. GABRIELA MEJIA FREIRE MSc.
 Registro SENESCYT: 1007-2020-2233525
 MAGISTER EN MEDICINA CANINA Y FELINA
 DIPLOMADO EN OFTALMOLOGÍA VETERINARIA
 CUENCA-ECUADOR

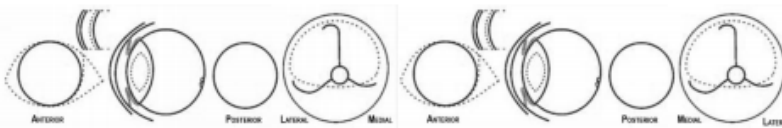
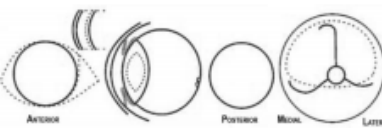


Informe de Examen Oftálmico

Paciente:
 Especie:
 Raza:
 Edad:
 Sexo:
 Fecha:
 Ficha #:

Propietario:
 Teléfono:
 Esterilizado:
 Vacunas:
 Enf. Previas:
 Motivo de consulta:

	Ojo Derecho	Ojo Izquierdo
Globo ocular	<input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> estrabismo <input type="checkbox"/> ptosis bulbi <input type="checkbox"/> Retropulsión <input type="checkbox"/> Exoftalmia <input type="checkbox"/> enoftalmia <input type="checkbox"/> microftalmia <input type="checkbox"/> buftalmia	<input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> estrabismo <input type="checkbox"/> ptosis bulbi <input type="checkbox"/> Retropulsión <input type="checkbox"/> Exoftalmia <input type="checkbox"/> enoftalmia <input type="checkbox"/> microftalmia <input type="checkbox"/> buftalmia
Reflejos	Pupilar Directo <input type="checkbox"/> <2 seg <input type="checkbox"/> lento <input type="checkbox"/> ausente Pupilar Consensual <input type="checkbox"/> <2 seg <input type="checkbox"/> lento <input type="checkbox"/> ausente Palpebral <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> parcial <input type="checkbox"/> ausente Deslumbramiento <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> disminuido <input type="checkbox"/> ausente Respuesta a la amenaza <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> ausente	Pupilar Directo <input type="checkbox"/> <2 seg <input type="checkbox"/> lento <input type="checkbox"/> ausente Pupilar Consensual <input type="checkbox"/> <2 seg <input type="checkbox"/> lento <input type="checkbox"/> ausente Palpebral <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> parcial <input type="checkbox"/> ausente Deslumbramiento <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> disminuido <input type="checkbox"/> ausente Respuesta a la amenaza <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> ausente
PIO	mmHg	mmHg
Ap. Lagrimal	<input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> epifora Test de Schirmer: mm/min BUT: seg T. Jones: min <input type="checkbox"/> Micro Puntos <input type="checkbox"/> _	<input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> epifora Test de Schirmer: mm/min BUT: seg T. Jones: min <input type="checkbox"/> Micro Puntos <input type="checkbox"/> _
Secreciones	<input type="checkbox"/> acuosa <input type="checkbox"/> mucicoide <input type="checkbox"/> purulenta <input type="checkbox"/> adheridas	<input type="checkbox"/> acuosa <input type="checkbox"/> mucicoide <input type="checkbox"/> purulenta <input type="checkbox"/> adheridas
Párpados	<input type="checkbox"/> normales <input type="checkbox"/> triquiasis <input type="checkbox"/> distiquiasis <input type="checkbox"/> blefaritis <input type="checkbox"/> alopecia <input type="checkbox"/> edema <input type="checkbox"/> blefarospasmo <input type="checkbox"/> Diamante <input type="checkbox"/> entropión <input type="checkbox"/> Triquiasis Carúncula <input type="checkbox"/> neoplasia <input type="checkbox"/> _	<input type="checkbox"/> normales <input type="checkbox"/> triquiasis <input type="checkbox"/> distiquiasis <input type="checkbox"/> blefaritis <input type="checkbox"/> alopecia <input type="checkbox"/> edema <input type="checkbox"/> blefarospasmo <input type="checkbox"/> Diamante <input type="checkbox"/> entropión <input type="checkbox"/> Triquiasis Carúncula <input type="checkbox"/> neoplasia <input type="checkbox"/> _
3º Párpado	<input type="checkbox"/> normales <input type="checkbox"/> prolapso Glándula <input type="checkbox"/> eversión <input type="checkbox"/> protrusión <input type="checkbox"/> despigmentado <input type="checkbox"/> C. Folicular <input type="checkbox"/> _	<input type="checkbox"/> normales <input type="checkbox"/> prolapso Glándula <input type="checkbox"/> eversión <input type="checkbox"/> protrusión <input type="checkbox"/> despigmentado <input type="checkbox"/> C. Folicular <input type="checkbox"/> _
Conjuntivas	<input type="checkbox"/> normales <input type="checkbox"/> vasos superficiales <input type="checkbox"/> vasos profundos <input type="checkbox"/> quemosis <input type="checkbox"/> folículos linfoides <input type="checkbox"/> _	<input type="checkbox"/> normales <input type="checkbox"/> vasos superficiales <input type="checkbox"/> vasos profundos <input type="checkbox"/> quemosis <input type="checkbox"/> folículos linfoides <input type="checkbox"/> _
Córnea esclerótica	<input type="checkbox"/> normales <input type="checkbox"/> edema <input type="checkbox"/> endotelitis <input type="checkbox"/> pigmentada <input type="checkbox"/> vascularización <input type="checkbox"/> superficial <input type="checkbox"/> profunda Fluoresceína _ Rosa de Bengala _ <input type="checkbox"/> Ulcera superficial <input type="checkbox"/> Ulcera profunda <input type="checkbox"/> Descemetocèle <input type="checkbox"/> DEEC <input type="checkbox"/> Erosión	<input type="checkbox"/> normales <input type="checkbox"/> edema <input type="checkbox"/> endotelitis <input type="checkbox"/> pigmentada <input type="checkbox"/> vascularización <input type="checkbox"/> superficial <input type="checkbox"/> profunda Fluoresceína _ Rosa de Bengala _ <input type="checkbox"/> Ulcera superficial <input type="checkbox"/> Ulcera profunda <input type="checkbox"/> Descemetocèle <input type="checkbox"/> DEEC <input type="checkbox"/> Erosión

	Ojo Derecho	Ojo Izquierdo
Iris	Color <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> ____	Color <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> ____
	Pupila <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> irregular <input type="checkbox"/> discordia <input type="checkbox"/> midriasis <input type="checkbox"/> miosis <input type="checkbox"/> bloqueo <input type="checkbox"/> m. pupilar <input type="checkbox"/> atrofia <input type="checkbox"/> iridonesis <input type="checkbox"/> bloqueo <input type="checkbox"/> rubeosis <input type="checkbox"/> sinequias	Pupila <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> irregular <input type="checkbox"/> discordia <input type="checkbox"/> midriasis <input type="checkbox"/> miosis <input type="checkbox"/> bloqueo <input type="checkbox"/> m. pupilar <input type="checkbox"/> atrofia <input type="checkbox"/> iridonesis <input type="checkbox"/> bloqueo <input type="checkbox"/> rubeosis <input type="checkbox"/> sinequias
Cámaras anterior y posterior	<input type="checkbox"/> normales <input type="checkbox"/> hipopión <input type="checkbox"/> hifema <input type="checkbox"/> fibrina <input type="checkbox"/> Tyndall ____ <input type="checkbox"/> no evaluable	<input type="checkbox"/> normales <input type="checkbox"/> hipopión <input type="checkbox"/> hifema <input type="checkbox"/> fibrina <input type="checkbox"/> Tyndall ____ <input type="checkbox"/> no evaluable
	Cristalino <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> esclerosis senil <input type="checkbox"/> subluxación Luxación <input type="checkbox"/> anterior <input type="checkbox"/> posterior <input type="checkbox"/> Catarata <input type="checkbox"/> no evaluable	<input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> esclerosis senil <input type="checkbox"/> subluxación Luxación <input type="checkbox"/> anterior <input type="checkbox"/> posterior <input type="checkbox"/> Catarata <input type="checkbox"/> no evaluable
Vitreo y Fondo de Ojo	<input type="checkbox"/> normal evaluado sin midriasis <input type="checkbox"/> no evaluable Humor Vitreo: Retina:	<input type="checkbox"/> normal evaluado sin midriasis <input type="checkbox"/> no evaluable Humor Vitreo: Retina:
		
Exámenes Complementarios	<input type="checkbox"/> Ecografía ocular <input type="checkbox"/> Electroretinograma <input type="checkbox"/> Examen de Sangre	
Diagnóstico	_____	
Tratamiento	_____	
Control	_____	
Pronóstico para la Visión	<input type="checkbox"/> Favorable <input type="checkbox"/> Reservado a favorable <input type="checkbox"/> Reservado a desfavorable <input type="checkbox"/> Desfavorable	

Fuente: Mejía, 2021.

Anexo 4. Protocolo de PCR para detección del gen *mecA* en aislamientos de *Staphylococcus* spp



mecA

Protocolo de PCR para la detección del gen *mecA* en aislamientos de *Staphylococcus* spp.

Nombre primer	Gen	Secuencia 5'--3'
MEC-A-Plus	mecA	TGG CTA TCG TGT CAC AAT CG
MEC-A-Minus		CTG GAA CTT GTT GAG CAG AG

Tamaño amplicon	Ciclado
310 pb	Desnaturalización inicial = 94°C por 5min; Ciclado =30-35 ciclos de:94°C 30seg -- 52° 30seg -- 72°C 30seg; Extensión final = 72°C por 5min

Reacción de PCR --> Vol. final = 25ul	
Reactivo	Volumen
ADN	2,5 ul
Buffer 10X	2,5 ul
MgCl2 (50 mM)	0,75 ul
dNTP's (10 mM)	0,5 ul
Taq pol (5U/ul)	0,15 ul
Primer Forward (10 µM)	0,5 ul
Primer Reverse (10 µM)	0,5 ul
H2O	17,6 ul
Vol. Final	25 ul

Referencia
Vannuffel et al. Journal of Clinical Microbiology. 1995 33:2864-2867