



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
MAGISTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS

**Portación nasal de cepas de *Staphylococcus* meticilino
resistentes en personal de la Red de Atención
Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y
Pecuarias de la Universidad de Chile.**

Tesis para optar al Título de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias
Departamento de Medicina Preventiva Animal
Laboratorio de Bacteriología Veterinaria

ROMAY CORAGEM DA COSTA

Profesora Guía:
Dra. Consuelo Borie P.

SANTIAGO, CHILE
2018

BIOGRAFÍA

Romay Coragem da Costa nació el 28 de Octubre de 1986 en la ciudad de Luanda, Angola, en donde estudió la enseñanza primaria, secundaria y terciaria en las escuelas Primeiro de Agosto, Ngola Kanini y Povo em Luta, respectivamente. Finalizó su escolaridad en el colegio “Santa Ana”. Debido a la ausencia de la carrera universitaria de Medicina Veterinaria en su provincia Luanda, migra a Huambo, centro del país, donde inicia su formación en Medicina Veterinaria y Zootecnia en la Universidad Agostinho Neto (UAN) finalizando sus estudios en el año 2010. Obtuvo la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia en el año 2011.

En el año 2009 comenzó a desarrollarse en la carrera docente y fue a trabajar como profesor en la escuela de enseñanza media “Instituto Médio Politécnico do Cachiungo/Huambo”. Paralelamente trabajó como clínico en la clínica veterinaria ALVET de Huambo, especializada en atención a mascotas.

En el año 2012, mediante concurso público, ingresó a la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad José Eduardo dos Santos (UJES), como docente en el ramo de Medicina Interna Veterinaria en el Departamento de Sanidad Animal, donde trabaja hasta el presente. En el año 2013 fue alumno del curso de pedagogía para docentes en el Instituto Superior de Ciências da Educação ISCED, Huambo.

En el año 2016 fue aceptado en el programa de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias de la Escuela de Postgrado y Postítulo de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

DEDICATORIA

A mí hijo Ramiro Nathaniel M. da Costa

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mis agradecimientos profundos y sinceros a todas las personas e instituciones que con su apoyo colaboraron en la realización del presente trabajo.

Agradezco a las entidades AGCID (Chilena) y INAGBE (Angoleña), financiadoras de mi Beca a través del programa de Becas Nelson Mandela, FAVET (donde recibí clases) y UJES (donde trabajo), también agradezco a la Red de Atención Veterinaria de la Facultad de Ciencia Veterinarias de la Universidad de Chile en la persona de su Directora, Doctora Alicia Valdés por todo su apoyo para la obtención de muestras.

Especialmente agradezco a la Dra. Consuelo Borie P., directora de esta investigación, por la orientación, seguimiento y la supervisión continua de la misma pero, sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo del trabajo.

Especial reconocimiento merece el interés mostrado a mi trabajo y las sugerencias recibidas del Dr. Nicolás Galarce. También me gustaría agradecer la ayuda recibida del Dr. Francisco Abusleme, Dr. Patricio Faúndez (Director del Hospital Veterinario de Bilbao), Dra. Daniela Bonifaz (Hospital Veterinario de Bilbao), y Dr. Rodrigo Häfelin (Director del Centro Veterinario El Roble). A la Dra. Daniela Iraguen por su orientación académica durante el magíster.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros del programa de magíster y del Departamento de Medicina Preventiva Animal, Laboratorio de Bacteriología Veterinaria y especialmente a la Dra. Andrea Nuñez por su amistad.

Un agradecimiento muy especial merece la paciencia, ánimo y comprensión recibido de mi familia y amigos.

A ustedes, muchas gracias.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 9 |
| ABSTRACT | 11 |
| INTRODUCCIÓN | 13 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 1. <i>Staphylococcus</i> : características microbiológicas generales | 15 |
| 2. <i>Staphylococcus</i> spp. que afectan al hombre | 16 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 16 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 16 |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 17 |
| 3. <i>Staphylococcus</i> en animales y su relación con personas | 17 |
| <i>S. pseudintermedius</i> | 17 |
| <i>S. aureus</i> | 18 |
| <i>S. schleiferi</i> | 19 |
| 4. Portación de cepas de <i>Staphylococcus</i> en personas y su importancia en la medicina veterinaria | 20 |
| 5. Resistencia a antimicrobianos en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> | 21 |
| 5.1. Resistencia a los antibióticos β -lactámicos | 21 |
| 5.1.1. Resistencia a penicilina | 23 |
| 5.1.2. Hiperproducción de β -lactamasas (resistencia “border-line” a oxacilina) | 24 |
| 5.1.3. Portación nasal de <i>Staphylococcus</i> spp. meticilino resistentes en el hombre | 24 |
| 5.1.4. Resistencia a meticilina: Mecanismo de acción | 26 |
| 6. Transmisión bidireccional | 27 |
| 7. Situación en Chile | 28 |

| | |
|--|----|
| Hipótesis | 31 |
| Objetivo general | 31 |
| Objetivos específicos | 31 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 32 |
| Criterios de Inclusión: | 32 |
| Obtención de muestras y transporte | 32 |
| Aislamiento e identificación de <i>Staphylococcus</i> spp. | 33 |
| Identificación de Género | 33 |
| Identificación de Coagulasa | 35 |
| Identificación de las especies del género <i>Staphylococcus</i> | 36 |
| Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos | 38 |
| Método Kirby-Bauer | 38 |
| Concentración mínima inhibitoria (CIM) mediante dilución en agar para cepas meticilino resistentes por Kirby-Bauer | 39 |
| Detección del gen <i>mecA</i> en cepas resistentes a la oxacilina por CIM | 40 |
| Medidas de bioseguridad | 41 |
| Análisis de datos | 41 |
| RESULTADOS | 43 |
| DISCUSIÓN | 55 |
| CONCLUSIONES | 59 |
| BIBLIOGRAFÍA | 60 |
| Anexo 1 | 69 |
| Anexo 2 | 74 |
| Anexo 3 | 74 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Inducción de la síntesis de β -lactamasa estafilocócica en presencia de penicilina (González y Mena, 2010)..... | 22 |
| Figura 2. Mecanismo de resistencia a meticilina (González y Mena, 2010)..... | 23 |
| Figura 3. Tinción Gram, cocáceas Gram positivas, agrupadas en racimos (Elaboración propia)..... | 34 |
| Figura 4. Placa de agar sal manitol con crecimiento de colonias de <i>Staphylococcus</i> spp. fermentadora (color amarillo del medio) y no fermentadora de manitol (color rosado del medio) (Elaboración propia)..... | 34 |
| Figura 5. Placa de agar sangre con crecimiento de colonias de <i>Staphylococcus</i> spp. hemólisis beta (flecha blanca) y hemólisis caliente-fría (flecha negra) (Elaboración propia)..... | 35 |
| Figura 6. Prueba de coagulasa luego de 24 horas de incubación donde se observa una prueba negativa (ausencia de coagulación) y una prueba positiva (presencia de coagulación) (Elaboración propia)..... | 36 |
| Figura 7. Visualización del gel de agarosa del gen <i>nuc</i> para <i>S. aureus</i> (359 bp) de origen nasal de personas que presentaron resistencia fenotípica a la meticilina. MTM= marcador de tamaño molecular. | 44 |
| Figura 8. Portación nasal en trabajadores de la RAV de cepas SCP y SCN detectadas en el total de personas analizadas (n=67)..... | 44 |
| Figura 9. Portación nasal de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. meticilino resistentes en personal de la RAV(n=67)..... | 45 |
| Figura 10. Cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. meticilino resistentes según su actividad de coagulasa (n=56)..... | 46 |
| Figura 11. Porcentajes de resistencia antimicrobiana de 236 cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. aisladas del personal de las distintas sedes de la Red de Atención Veterinaria... | 47 |
| Figura 12. Susceptibilidad antimicrobiana de las 236 cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. aisladas de la nariz del personal de la RAV. S: sensible; R: resistente; AM: antimicrobiano..... | 48 |
| Figura 13. Porcentaje de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. multirresistentes según sede (n=140)..... | 48 |

| | |
|---|----|
| Figura 14. Perfiles de resistencias antimicrobianos más frecuentes en el total de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. analizadas. | 49 |
| Figura 15. Perfiles de multirresistencia que incluyen a meticilina en el total de 56 perfiles de resistencias identificados..... | 50 |
| Figura 16. Visualización del gel de agarosa del gen <i>mecA</i> (519 bp) en las cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. meticilino resistentes según CIM. MTM= marcador de tamaño molecular | 52 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Partidores a utilizar en el protocolo de PCR para la identificación de especies de <i>Staphylococcus</i> | 37 |
| Tabla 2. Par de partidores a utilizar en el protocolo de PCR para el gen <i>mecA</i> | 40 |
| Tabla 3. Número de personas portadoras nasales de SCP según sede. | 45 |
| Tabla 4. Criterio de interpretación de la CIM para Oxacilina ($\mu\text{g}/\text{mL}$) CLSI (2015). | 51 |
| Tabla 5. CIM para la oxacilina en cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. según actividad de coagulasa. | 51 |
| Tabla 6. Cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. meticilino resistentes portadoras del gen <i>mecA</i> según su actividad de coagulasa (n=56). | 52 |
| Tabla 7. Resumen de las personas con sus cepas meticilino resistentes en las distintas sedes. | 53 |
| Tabla 8. Evaluación de la asociación estadística entre las variable Sedes, Sexo y Tenencia de mascotas con la portación de meticilino resistencia del personal de la RAV (n= 67) mediante Chi Cuadrado de Pearson. | 54 |

RESUMEN

Staphylococcus spp. son bacterias que forman parte de la microbiota de seres humanos, principalmente en la nariz, y también son reconocidos patógenos resistentes a múltiples antimicrobianos que producen diversas enfermedades. Se transmite entre humanos y mascotas, por lo que el personal médico y técnico veterinario pueden actuar como reservorios y diseminadores de cepas de *Staphylococcus* spp. multiresistentes, sin embargo su impacto para la salud pública aún no se ha esclarecido del todo. Por lo anterior, este estudio pretende establecer la presencia de cepas de *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes en la nariz del personal médico y técnico asociado a la atención en clínicas de pequeños animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Las muestras nasales fueron obtenidas mediante torulado de una fosa nasal, realizando cultivo tradicional en medio selectivo y definiendo las especies aisladas desde la nariz mediante PCR para el gen *nuc* para las especies *S. aureus* y *S. pseudintermedius*. A las cepas aisladas se les hizo antibiograma por Kirby-Bauer de acuerdo al CLSI (2015), incluyendo los siguientes antimicrobianos: amoxicilina (10µg), amoxicilina/ácido clavulánico (30µg), cefoxitin (30µg), cefadroxilo (30µg), ciprofloxacino (5µg), clindamicina (2µg), doxiciclina (30µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), mupirocina (30µg). Finalmente, a todas las cepas meticilino resistentes (cefoxitin) se les determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) por un método estándar (CLSI 2015) y la presencia del gen *mecA* mediante PCR. La portación nasal de *Staphylococcus* spp. en las 67 personas en estudio fue de 100% y del 51% para *Staphylococcus* spp. meticilino resistente. Del total de cepas (236) aisladas, 10 correspondieron a *Staphylococcus aureus*, todas ellas fueron meticilino resistente. El análisis de los antibiogramas del total de cepas de *Staphylococcus* spp. permitió la identificación de 56 perfiles de resistencia, donde todas las cepas meticilino resistentes fueron multiresistentes. Los mayores porcentajes de resistencias se presentaron frente a la amoxicilina, clindamicina y eritromicina (28,1%, 19,4% y 16,7% respectivamente). La CIM para la oxacilina varió entre 0,5 y 16 µg/mL en las 56

cepas resistentes, logrando identificar la presencia del gen *mecA* en 47 de las 56 (83,9%) cepas de *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes. Se discuten diferencias de prevalencia según origen de las muestras. Los resultados de este estudio permiten concluir que el personal de la RAV analizado es portador nasal de *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes portadores del gen *mecA*, situación que, indudablemente, constituye un problema de salud pública que debiera ser abordado de acuerdo a lo recomendado por la OMS, la OIE y FDA.

PALABRAS CLAVES: *Staphylococcus* spp., resistencia, meticilina, personal técnico, gen *mecA*.

ABSTRACT

Staphylococcus spp. they are bacteria that are part of the microbiota of humans, mainly in the nose, and are also recognized pathogens resistant to multiple antimicrobials that produce various diseases. It is transmitted between humans and pets, so that medical personnel and veterinary technicians can act as reservoirs and disseminators of strains of *Staphylococcus* spp. multiresistant, however its impact on public health has not yet been fully clarified. Therefore, this study aims to establish the presence of strains of *Staphylococcus* spp. resistant methicillin in the nose of medical and technical personnel associated with the care of small animal clinics of the Faculty of Veterinary and Animal Sciences of the University of Chile. The nasal samples were obtained by torulation of a nostril, performing traditional culture in a selective medium and defining the species isolated from the nose by PCR for the *nuc* gene for *S. aureus* and *S. pseudintermedius* species. Isolated strains were tested by Kirby-Bauer according to CLSI (2015), including the following antimicrobials: amoxicillin (10µg), amoxicillin / clavulanic acid (30µg), cefoxitin (30µg), cefadroxil (30µg), ciprofloxacin (5µg), clindamycin (2µg), doxycycline (30µg), erythromycin (15µg), gentamicin (10µg), mupirocin (30µg). Finally, all the methicillin-resistant strains (cefoxitin) were determined the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by a standard method (CLSI 2015) and the presence of the *mecA* gene by PCR. The nasal portability of *Staphylococcus* spp. in the 67 people in the study it was 100% and 51% for *Staphylococcus* spp. methicillin resistant. Of the total strains (236) isolated, 10 corresponded to *Staphylococcus aureus*, all of them were methicillin resistant. The analysis of the antibiograms of the total strains of *Staphylococcus* spp. allowed the identification of 56 resistance profiles, where all the methicillin-resistant strains were multiresistant. The highest percentages of resistance were presented against amoxicillin, clindamycin and erythromycin (28.1%, 19.4% and 16.7% respectively). The MIC for oxacillin varied between 0.5 and 16 µg / mL in the 56 resistant strains, achieving the presence of the *mecA* gene in 47 of the 56 (83.9%) strains of *Staphylococcus* spp. methicillin resistant. Differences in prevalence according to the origin of the samples are discussed. The results of

this study allow us to conclude that the personnel of the analyzed RAV is a nasal carrier of *Staphylococcus* spp. methicillin resistant carriers of the *mecA* gene, a situation that undoubtedly constitutes a public health problem that should be addressed according to the recommendations of WHO, OIE and FDA.

KEY WORDS: *Staphylococcus* spp., resistance, methicillin, technical personnel, *mecA* gene.

INTRODUCCIÓN

El género *Staphylococcus* está constituido por bacterias, cocáceas Gram positivas, que a menudo se encuentran como microbiota residente o transitoria en la piel, especialmente en las fosas nasales de personas y de animales, entre ellos el perro. Sin embargo, pueden causar enfermedades que van desde una simple infección de la piel a infecciones más graves como septicemia, lo que demuestra su potencial impacto clínico en medicina humana, en medicina veterinaria y en salud pública toda vez que las cepas pueden transmitirse bidireccionalmente. Por lo anterior, la portación nasal de *Staphylococcus* spp. en individuos sanos constituye una fuente potencial de infección. Este escenario se ve agravado por la emergencia de resistencia antimicrobiana, evento que se inició rápidamente después que en 1930 se descubrieran las primeras drogas con efecto antimicrobiano. Así, los niveles de resistencia de *Staphylococcus* frente a penicilinas y otros antimicrobianos alcanzan valores de hasta 90%.

Infecciones por cepas de *Staphylococcus* spp. multiresistentes a antimicrobianos (MDR) se pueden adquirir en la comunidad pero, también son importantes como infecciones nosocomiales, representando serios problemas, tanto en medicina humana como veterinaria. Particularmente importante es la emergencia actual de resistencia a meticilina en *Staphylococcus* spp., situación que fuera colocada de manifiesto por la OMS durante el año 2017, considerando a este patógeno como de prioridad elevada para la búsqueda de nuevos antimicrobianos.

Estudios realizados en un hospital veterinario académico, demostraron que los miembros del personal veterinario portadores de cepas de *S. aureus* resistente a meticilina pueden constituir una fuente de infección para los animales, quienes una vez infectados por las cepas humanas, pueden transmitir la infección a otros miembros del personal. Por lo tanto, la prevención y la reducción de la propagación de cepas de *Staphylococcus* spp. son elementos esenciales en salud pública y salud animal que debieran ser analizados desde el punto de vista de una salud.

Considerando entonces la emergencia de resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. junto a su potencial riesgo de transmisión entre animales y el hombre, este estudio plantea determinar la portación nasal de cepas de *Staphylococcus* spp. meticilino resistente en el personal asociado a clínica de pequeños animales que trabajan en la Red de Atención Veterinaria (RAV), Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET) de la Universidad de Chile.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. *Staphylococcus*: características microbiológicas generales

El género *Staphylococcus* spp. es un grupo de bacterias formado por cocáceas Gram positivas, cuyo diámetro oscila entre 0,5 y 1,5 micras. Se encuentran agrupadas como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas, de hecho el nombre de *Staphylococcus* tiene su origen del griego “staphyle” que significa racimo de uvas. Son bacterias inmóviles, no esporuladas, no poseen cápsula, son anaerobias facultativas, con una gran capacidad de adaptación y algunas son capaces de producir una enzima extracelular denominada coagulasa. La coagulasa es un factor de agregación y constituye una prueba diagnóstica muy sensible y específica para algunas especies del género. Esta proteína representa un importante factor de virulencia, y su detección en el laboratorio microbiológico se realiza para determinar y diferenciar especies. En este género se han reportado 35 especies y 17 subespecies, algunas de ellas forman parte de la microbiota de piel y mucosas en humanos, y otras se encuentran sólo en la microbiota de otros mamíferos y aves (Cervantes-García *et al.*, 2014; Zendejas-Manzo *et al.*, 2014).

La especie *S. aureus* es el patógeno más importante del género mientras que las especies como *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* son reconocidas como patógenos oportunistas capaces de actuar bajo determinadas circunstancias como es el caso de hospedadores inmunocomprometidos (Chans, 2007). Por su fácil propagación, pueden transmitirse de una especie animal a otra, siendo frecuentes los casos de transmisión humano-animal y viceversa. Por lo general, cada especie tiende a ocupar una localización anatómica específica en el hospedador, la cual a veces es indicada por su nombre como *S. epidermidis* que coloniza la piel (Cervantes-García *et al.*, 2014; Zendejas-Manzo *et al.*, 2014). Entre las especies que colonizan al hombre, las de mayor importancia clínica son: *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*; en tanto que en animales se encuentran además de *S. aureus*, *S. pseudintemedius*, *S. intermedius*, *S. saprophyticus* y *S. schleiferi*.

2. *Staphylococcus* spp. que afectan al hombre

Staphylococcus aureus

S. aureus, del grupo de los coagulasa positivos (SCP), es una causa importante de infecciones de la piel y tejidos blandos y coloniza aproximadamente al 30% de la población humana en todo el mundo, destacándose como un importante patógeno humano que produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. En la comunidad, las infecciones por *S. aureus* son a menudo agudas, piogénicas y superficiales, aunque también puede producir, con menor frecuencia, infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. A nivel nosocomial *S. aureus* es un importante agente de infecciones de herida quirúrgica y de prótesis, entre otros. También *S. aureus* es causa de una serie de infecciones producidas por toxinas como el síndrome del shock tóxico, la intoxicación alimentaria y el síndrome de piel escaldada. En modelos animales las cepas capsuladas de *S. aureus* demuestran mayor virulencia (Prieto y Gomez, 1996). Esta especie es reconocida hoy como un patógeno de prioridad elevada según a la OMS ya que se ha observado una emergencia de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM). El uso de diferentes tipos de antibióticos a lo largo de los años ha llevado a la aparición de cepas SARM multirresistentes, producto de mutaciones en genes que codifican para proteínas diana y también mediante la adquisición y acumulación de genes que confieren resistencia a antibióticos (Livermore, 2000).

Staphylococcus epidermidis

Es del grupo de *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN), siendo una de las especies que más frecuentemente se aísla. Comparte las características del género con respecto a la morfología y fisiología. Con respecto a la patogenicidad, *S. epidermidis* es capaz de producir macromoléculas de superficie y extracelulares, que inician y luego aumentan la adhesión bacteriana a la superficie de cuerpos extraños. En el caso de la colonización de catéteres intravenosos, puede aparecer flebitis y fiebre, y eventualmente una

bacteriemia y sepsis. La colonización de válvulas cardíacas protésicas puede producir endocarditis precoces y tardías (Prieto y Gomez, 1996).

Las cepas de *S. epidermidis* aisladas dentro del ámbito hospitalario frecuentemente son resistentes a meticilina. La mayoría de las veces que se aísla *S. epidermidis* de una muestra clínica en el laboratorio de microbiología, este constituye un contaminante. Esta especie, al ser parte de la microbiota normal de la piel en humanos, muchas veces contamina las muestras en el momento de la obtención, creando dificultades para interpretar los resultados de los cultivos. Es el contaminante más importante en muestras de hemocultivo, líquidos biológicos o exudados de herida, donde su aislamiento debe ser interpretado con precaución, teniendo en cuenta las condiciones de extracción de la muestra y la condición clínica del paciente (Rupp y Fey, 2014).

Staphylococcus saprophyticus

Staphylococcus saprophyticus es uno de los más reconocidos patógenos urogénicos. Pertenece al grupo SCN y con frecuencia causa infección urinaria no complicada en pacientes ambulatorias jóvenes y de mediana edad, lo que indica que *S. saprophyticus* tiene una capacidad potencial para adherirse y crecer persistentemente en el tracto urinario. La mayoría de las cepas de *S. saprophyticus* muestran una fuerte adherencia a las células uroepiteliales. Además, de la adherencia, también se ha informado que la ureasa desempeña un papel en el crecimiento persistente e invasión de las bacterias en la vejiga. *S. saprophyticus* no posee ningún factor de virulencia encontrado en *S. aureus*, como coagulasa, enterotoxinas, exoenzimas y proteínas de unión a la matriz extracelular (Kuroda *et al.*, 2005).

3. *Staphylococcus* en animales y su relación con personas

S. pseudintermedius

S. pseudintermedius es la causa más común de pioderma en perros y normalmente coloniza la piel y las mucosas. Esta especie se conocía anteriormente como *S. intermedius* pero, gracias a las nuevas tecnologías moleculares, actualmente se reconocen tres especies dentro del grupo *S.*

intermedius (SIG): *Staphylococcus intermedius*, *S. pseudintermedius*, y *Staphylococcus delphini* (Sasaki *et al.*, 2007). La prevalencia de infecciones por *S. pseudintermedius* resistentes a la meticilina (MRSP) en animales ha aumentado sustancialmente durante las décadas del 80 y 90. MRSP es un potencial patógeno de perros, gatos y caballos; se ha asociado con pioderma, otitis, infecciones de las vías urinarias, heridas, infecciones del sitio quirúrgico, y septicemia (Cain, 2013). La colonización de MRSP varía en los tejidos, pero lo más frecuente son las fosas nasales, aunque se incluyen también la mucosa oral, la piel y mucosa rectal (Cain, 2013).

Se han reportado hallazgos de infecciones por MRSP en los seres humanos; en la mayoría de los casos, se sospecha la transmisión desde el perro al hombre (Cain, 2013). En humanos se ha demostrado colonización nasal por *S. pseudintermedius* sensible a la meticilina (MSSP) y MRSP, en particular en personal veterinario y en personas que residen en hogares con perros que cursan con infecciones por *S. pseudintermedius*. Los estudios señalan que una de las causas más frecuentes de contaminación es no lavarse las manos después de la manipulación de animales de compañía infectados, siendo este un factor de riesgo para la portación nasal de MRSP (Walther *et al.*, 2012). La colonización humana con MRSP probablemente es transitoria y suele desaparecer una vez que ocurra la resolución clínica de la infección en mascotas. También se ha demostrado la contaminación ambiental de los hogares y hospitales veterinarios con MRSP, asociados a pacientes con lesiones activas infectadas por este patógeno (Cain, 2013).

S. aureus

Se ha informado colonización de perros sanos con cepas de *S. aureus* pero, con menor frecuencia que la colonización por *S. pseudintermedius*, cuya prevalencia de cepas meticilino resistentes es de 2,1% mientras que en *S. aureus* y *S. schleiferi* subsp. *coagulans* es de 0,5%. En gatos, las evidencias son contradictorias en cuanto a si *S. pseudintermedius* o *S. aureus* es la especie coagulasa positiva colonizadora primaria (Denamiel *et al.*, 2009; Cain, 2013).

Hay reportes de transmisión de SARM de humanos a animales, como de animales a humanos. Puntualmente, en hospitales veterinarios es posible compartir cepas entre el personal y los animales, donde la dirección de la transmisión se analiza en función de la evidencia circunstancial, como el tiempo de infección y/o el tipo de cepa asociada al hospital. Durante los brotes es posible que la transmisión pueda producirse en ambas direcciones. Se han observado infecciones en personas aún después de un período breve de contacto directo de apenas 4 horas con animales colonizados. También, se han informado cepas compartidas entre personas y mascotas en hogares o establecimientos de salud. SARM se propaga por animales o personas con heridas infectadas u otras enfermedades asociadas; sin embargo, también puede producirse la transmisión de manera inaparente desde personas o animales colonizados a personas o animales que se transforman en portadores asintomáticos. En prácticas veterinarias se ha informado contaminación ambiental, aún en ausencia de pacientes infectados por SARM (CFSPH, 2011).

S. schleiferi

S. schleiferi es la única especie en que se han descrito dos subespecies sobre la base de la producción de coagulasa: *S. schleiferi* subsp *schleiferi* (coagulasa negativa) y *S. schleiferi* subsp *coagulans* (coagulasa positiva). Las dos subespecies no son genotípicamente distintas ni tampoco difieren en su comportamiento clínico, y ambas han sido descritas como causantes de infecciones en perros, asociadas principalmente con pioderma y otitis en perros con dermatitis alérgica. *S. schleiferi* coagulasa positiva se ha aislado de perros y gatos portadores, y se pueden encontrar junto con *S. pseudintermedius*. En seres humanos, *S. schleiferi* coagulasa negativo está bien documentado como un componente normal de la microbiota preaxilar, aunque se ha asociado con infecciones nosocomiales, incluyendo infecciones del sitio de implantación quirúrgica y marcapasos (Cain, 2013).

S. schleiferi subsp. *coagulans* es una subespecie descrita en el meato auditivo externo de perros con otitis externa mientras que, en el hombre se asocia a infecciones nosocomiales de heridas quirúrgicas. También fue encontrado en

un paciente inmunosuprimido con trasplante hepático que tenía su mascota con otitis por *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* (Kumar *et al.*, 2007).

4. Portación de cepas de *Staphylococcus* en personas y su importancia en la medicina veterinaria

Staphylococcus spp. son colonizadores comunes y patógenos oportunistas de la piel y mucosas de seres humanos y animales, especialmente mamíferos. *S. aureus* (SA) es un *Staphylococcus* coagulasa positiva (SCP) frecuentemente aislado de seres humanos donde aproximadamente un 25% de las personas sanas se encuentran persistentemente colonizadas. *S. pseudintermedius* (SP) es el principal SCP que coloniza los perros y gatos sanos, aunque SA también puede ser aislado a partir de estos animales, con menos de un 20% de aislamiento en aquellos que cohabitan con sus propietarios. La presencia de estos microorganismos en los seres humanos y animales en contacto cercano no se debe subestimar, teniendo en cuenta que es un ambiente potencial para que se produzca la transmisión (Lozano *et al.*, 2010).

Los SARM han evolucionado como uno de los principales patógenos nosocomiales en los sistemas de salud humanos, provocando un aumento del riesgo de mortalidad para los pacientes y enormes costos para las compañías de seguros de salud en todo el mundo (Walther *et al.*, 2008). En el campo de la medicina veterinaria, los brotes nosocomiales causados por SARM han llamado recientemente la atención, principalmente en las clínicas equinas y de mascotas. Personal veterinario colonizado por vía nasal parecen tener un impacto en el aumento de las tasas de infección en pacientes animales, al igual que los trabajadores de salud en los hospitales (Weese *et al.*, 2006).

Las manos y las fosas nasales de los individuos colonizados son las principales fuentes de transmisión de SARM. Algunos estudios investigaron la contaminación ambiental de SARM fuera del entorno hospitalario; los informes incluyen la colonización continua de un personal médico que estaba relacionado con la contaminación del entorno doméstico. Lo anterior, es decir la contaminación de las viviendas de los animales, reveló la posibilidad de colonización humana y animal. Las fosa nasales de personas suelen presentar

un 80% de portación, y la adición de muestras de la garganta puede aumentar este valor a 92% (Grema *et al*, 2015).

Se ha descrito la asociación entre la colonización nasal por *Staphylococcus aureus* y la evolución de la infección por SARM; así, múltiples estudios han confirmado la colonización nasal como un factor de riesgo para la infección subsiguiente, donde la mayoría de las infecciones son causadas por la cepa colonizadora. La colonización nasal persistente se asocia con una mayor carga de colonización y/o con el estado persistente de colonización lo que a su vez se asocia a un mayor riesgo de infección. La alta carga de colonización nasal (> 80%) también se ha asociado con la colonización en otros sitios del cuerpo y mayores tasas de transmisión al entorno circundante (Stenehjem y Rimland, 2013).

5. Resistencia a antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus aureus*

Las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas mono-resistentes y multi-resistentes. El surgimiento de cepas de *S. aureus* multi-resistentes representa una respuesta secuencial a la presión selectiva impuesta por la terapia antimicrobiana. Sin embargo, se ha observado que la acumulación y la diseminación de resistencia en *S. aureus* es producto del intercambio de determinantes de resistencia pre-existentes portados por elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones (Tn) y secuencias de inserción (IS) (Velázquez-Meza, 2005). Aunque la frecuencia relativa de cada uno de los tipos de resistencia puede variar según el área geográfica y el tipo de paciente, se puede dar la posibilidad que en una misma cepa coexistan distintos mecanismos (Gil, 2000).

5.1. Resistencia a los antibióticos β -lactámicos

Staphylococcus aureus ha demostrado un gran poder de adaptación a los agentes antimicrobianos, adquiriendo paso a paso resistencia a todos los antibióticos disponibles para el tratamiento de las infecciones que ocasiona. Existen tres mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en *S. aureus*: resistencia mediada por enzimas (penicilinasas o β -lactamasas) (Figura 1) las cuales inactivan el antibiótico; resistencia intrínseca que se debe a la

incorporación en el ADN bacteriano del gen *mecA*. Este gen se encuentra a nivel cromosomal y asociado a un complejo que contiene dos elementos regulatorios (*mecR1* y *mecI*) (Figura 2) que controlan la transcripción del gen *mecA* y que en conjunto tienen un tamaño de 30 a 50 Kb. El último mecanismo de resistencia es la modificación de las proteínas de unión a penicilinas (PBPs). Además de lo anterior, *S. aureus* puede expresar el fenómeno de tolerancia, en el que ocurre una disociación de las acciones inhibitoria y bactericida de los antibióticos β -lactámicos (Gil, 2000; González y Mena, 2010).

Las bacterias del género *Staphylococcus* tienen cinco PBPs. Las PBPs son enzimas que catalizan la etapa terminal de la síntesis del peptidoglicano de la pared bacteriana y se localizan en la membrana celular de la bacteria. Las PBP 1, 2 y 3 son esenciales y tienen alta afinidad con los antibióticos β -lactámicos (sitios objetivo o sitios blanco), uniéndose a éstos por enlaces covalentes. La resistencia a la meticilina en estafilococos se debe a la producción de una PBP adicional, mutante, denominada PBP2a, que presenta baja afinidad con los antibióticos β -lactámicos. Esta proteína alterada es codificada por un gen cromosómico denominado *mecA*, que es responsable de la resistencia de los estafilococos a los β -lactámicos (Gil, 2000).

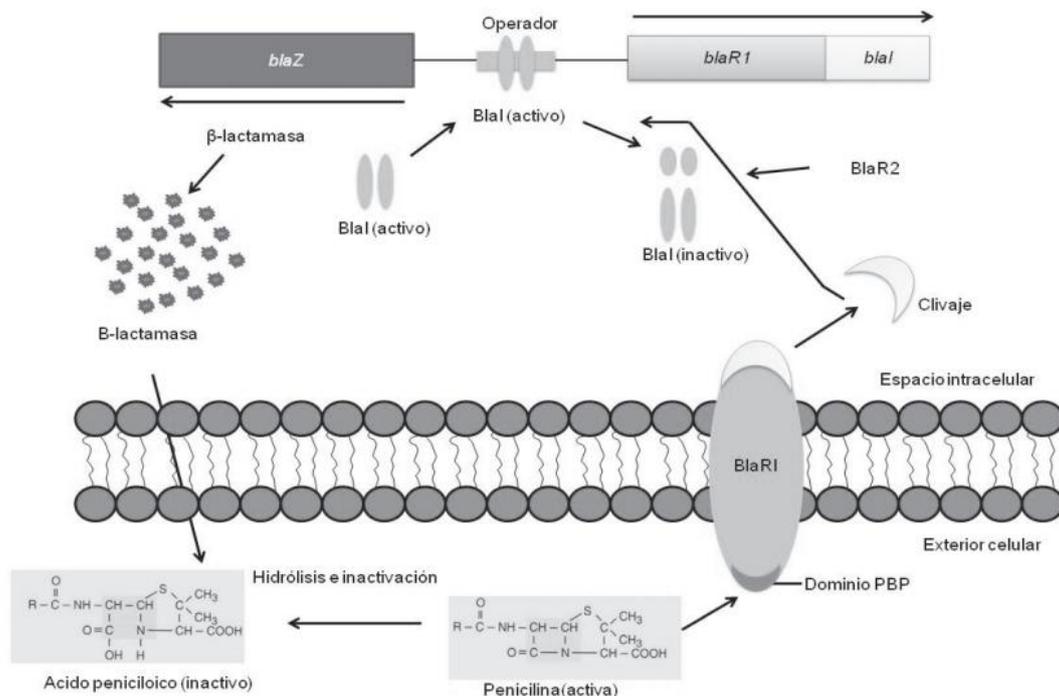


Figura 1. Inducción de la síntesis de β -lactamasa estafilocócica en presencia de penicilina (González y Mena, 2010).

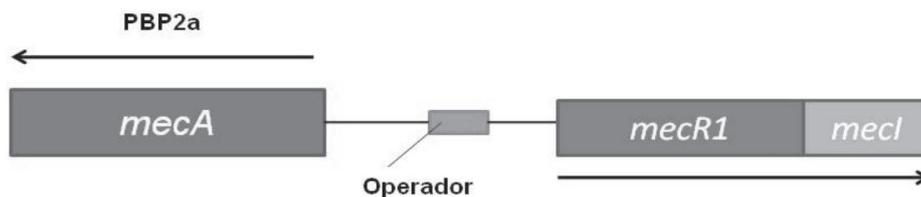


Figura 2. Mecanismo de resistencia a meticilina (González y Mena, 2010).

5.1.1. Resistencia a penicilina

La penicilina se comenzó a usar como tratamiento en las infecciones causadas por *S. aureus* a principio de los años 40 sin embargo, un año después de su utilización, ya existían cepas resistentes. La resistencia a penicilina puede deberse a la producción inducible de la enzima penicilinasas (β -lactamasas) y es conferida por una enzima cuyo gen se encuentra en un plásmido, que inactiva la penicilina G, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas, aunque las cefalosporinas no son hidrolizadas por ella (Lowy, 2003). El mecanismo de inducción consiste en que la penicilina y sus análogos favorecen la producción de una proteína antirepresora que inhibe a la proteína represora de la betalactamasas, y con ello aumenta la síntesis de penicilinasas. Esta enzima es inactivada por los inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam).

La presión ejercida por el amplio uso de la penicilina hizo que las cepas productoras de β -lactamasas se hicieran más prevalentes. El incremento de la resistencia a penicilina en *S. aureus*, producto del uso clínico de esta droga, no sólo se debió a la selección de unos pocos microorganismos mutantes que eran capaces de producir β -lactamasas. Evidencias genéticas indican que los genes que codifican su producción se encuentran en plásmidos y esta información puede ser transferida de un microorganismo a otro por conjugación, mecanismo desarrollado y demostrado por *S. aureus* en todo el mundo (Chambers, 1997). Más del 90% de las cepas de *S. aureus* han desarrollado resistencia a penicilina, sin embargo, cuando la cepa es sensible, este antibiótico constituye una droga de primera línea y de amplio uso, su toxicidad es baja debido a que actúa inhibiendo la síntesis del peptidoglucano,

principal constituyente de la pared celular bacteriana, el cual no está presente en las células eucariotas del hospedero (Lowy, 2003).

5.1.2. Hiperproducción de β -lactamasas (resistencia “border-line” a oxacilina)

La resistencia a oxacilina en *S. aureus* puede deberse a la producción excesiva de β -lactamasas, conociéndose a los microorganismos que expresan esta forma de resistencia, como cepas con resistencia “border_line” (Borderline resistant *Staphylococcus aureus*-BORSA) o resistencia de bajo nivel (Gil, 2000).

Su mecanismo es una hiperproducción de penicilinasas, mediada por plásmidos. Estas cepas producen altas cantidades de enzima, lo que hace que la degradación de oxacilina y meticilina, que fueron desarrolladas para resistir la acción hidrolítica de la penicilinasas, sea lenta, presentando una concentración mínima inhibitoria (CIM) frente a oxacilina de hasta 8 μ g/ml (Gil, 2000).

5.1.3. Portación nasal de *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes en el hombre

La colonización nasal de *Staphylococcus* spp. es frecuente en humanos. La tasa de colonización nasal varía en función a la población estudiada; se ha establecido que existen factores del hospedador que incluyen hospitalización, cirugía, residencia en centros de atención a largo plazo, diálisis o abuso de drogas por vía intravenosa, y de las cepas que son el genoma, pared celular, cápsula, y las proteínas de superficie que se asocian tanto a la colonización como a la infección (Graham *et al.*, 2006). Es posible distinguir tres tipos de portación de *Staphylococcus* spp. en adultos sanos asociada a dichos factores: alrededor del 20% de las personas son portadoras persistentes, el 60% son portadoras intermitentes y aproximadamente el 20% casi nunca lo son. Sin embargo, en estudios longitudinales se ha observado que las colonizaciones no son permanentes en un mismo individuo, sino transitorias y por lo tanto pueden mostrar cambios a través del tiempo (Vandenbergh *et al.*, 1999).

La prevalencia de portadores de SARM en la población general varía de menos de 1% hasta 5%, variación que puede deberse a la región geográfica

analizada. En los Países Bajos, menos de 1% de las cepas de *S. aureus* de muestras clínicas son resistentes a meticilina, y la portación nasal se produce en 0,03% de las personas que son internadas. En cambio, en Corea se ha informado que más de 50% de las cepas humanas de *S. aureus* eran resistentes a meticilina en aproximadamente 1,5% de la población portadora de SARM. En EE. UU. se informó que en general, 5,6% de la población de estudio estaba colonizada. Se espera que exista un aumento de riesgo de colonización entre los trabajadores de la salud humana y veterinaria, debido a la exposición ocupacional. India informó un índice de portadores de 11% en los trabajadores de la salud y 5% en los trabajadores no relacionados con la salud (CFSPH, 2011).

En los Países Bajos, SARM fue detectada en 1,7% de los enfermeros que tuvieron contacto con cerdos o terneros y 0,15% de los enfermeros que no tuvieron contacto con el ganado. Se ha informado que existe un nivel elevado de portación de SARM entre el personal veterinario, así, los valores de colonización en empleados de hospitales y clínicas de especialidades de Europa y América del Norte varían de 0% a 10%, y en ocasiones se ha informado que alcanzan 27%. Los estudios en médicos veterinarios resaltan que en los especialistas en medicina de pequeños se está observando un aumento de portadores. En 2005, en un foro universitario de medicina interna veterinaria, se informó colonización de SARM en 7% de los veterinarios, 12% de los técnicos y en ninguno de los participantes que no estuvo en contacto con animales. En ese estudio, 15,6% del personal que trabajaba con animales grandes y 4,4% de los que trabajaban con animales pequeños estaban colonizados (CFSPH, 2011).

Japoni *et al.* (2004) han reportado tasas de 42,4% para SARM y 23,5% para *Staphylococcus aureus* meticilino sensible (SAMS) en pacientes hospitalizados y que la prevalencia de la portación nasal en el personal hospitalario ha variado entre 28,2% y 44,5%. La tasa disminuyó progresivamente con el aumento de la edad, así, en los adultos jóvenes (18-39 años) se encontró una tasa de colonización significativamente más alta que los mayores de 59 años y alcanzó a un valor de 34,4% (Munckhof *et al.*, 2009).

En Chile, un estudio realizado con muestras obtenidas de la zona retrofaríngea mediante torulado de manipuladores de alimentos de 19 casinos de alimentación colectiva de 11 comunas de Santiago, determinó un 34% de colonización por *Staphylococcus aureus* (Figuroa *et al.*, 2002).

De acuerdo a los estudios señalados anteriormente, el promedio de la portación nasal de cepas de *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes sería de un 30% para personal hospitalario.

5.1.4. Resistencia a meticilina: Mecanismo de acción

Se han notificado cepas SARM en todo el mundo (Velázquez-Meza, 2005; Kanafani y Fowler, 2006). La resistencia a meticilina fue denominada “intrínseca” debido a que no se produce destrucción del antibiótico por acción de enzimas β -lactamasas (Chambers, 1997), y es conferida por la presencia de una proteína adicional de unión a penicilina (PBP), denominada PBP2' o PBP2a, la cual no está presente en las cepas sensibles a meticilina (Velázquez-Meza, 2005). Las PBPs son enzimas que catalizan las reacciones de transpeptidación del peptidoglucano durante la síntesis de la pared celular. *S. aureus* produce al menos cuatro PBPs (PBP1, PBP2, PBP3 y PBP4), que son inhibidas por los antibióticos β -lactámicos, incluyendo la meticilina. Las cepas SARM además de sintetizar estas PBPs, producen una PBP adicional conocida como PBP2a (Velázquez-Meza, 2005; Hanssen y Sollid, 2006).

Las cepas de *S. aureus* que son resistentes a meticilina por este mecanismo, lo son también a todos los β -lactámicos, incluyendo las penicilinas, cefalosporinas (a excepción de las nuevas cefalosporinas anti-SARM, ceftobiprol y ceftarolina) y carbapenemes (Velázquez-Meza, 2005).

Es muy importante detectar en forma eficiente a los microorganismos resistentes dentro de la población causante de una infección porque si el paciente es tratado con oxacilina, las cepas resistentes van a persistir en el sitio de la infección. La adquisición del gen *mecA*, que codifica para la proteína PBP2a de unión a la penicilina, confiere resistencia a todos los betalactámicos, incluso a las penicilinas semisintéticas. Este gen codifica la formación de la PBP2a, la que tiene una baja afinidad por meticilina y oxacilina y por lo tanto,

estas cepas son resistentes al tratamiento con estos agentes antimicrobianos (Fasola *et al.*, 1992).

Es necesario recordar que todas las cepas SARM y cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa resistente a meticilina (SCNRM) deben ser consideradas como resistentes a todos los β -lactámicos y a las combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas (Palavecino, 2002).

El método de difusión con sensidiscos (Kirby-Bauer) es considerado un método de screening que detecta la mayoría de los SAMR pero en algunos casos el resultado necesita ser confirmado mediante determinación de concentración mínima inhibitoria (CIM) que es un método cuantitativo oficial para detectar estas cepas (Palavecino, 2002).

Galarce *et al.* (2016) han reportado que 100% (8/8) de cepas aisladas de gatos que presentaron resistencia fenotípica a meticilina fueron poseedoras del gen *mecA* de un total de 72 cepas de SCP. Tres cepas fenotípicamente sensibles a meticilina también fueron poseedoras del gen *mecA*, lo cual se puede explicar por la ausencia de síntesis de la proteína.

6. Transmisión bidireccional.

Como ya fue señalado con anterioridad, la resistencia a la meticilina involucra a las distintas especies de *Staphylococcus*, siendo *S. aureus* la especie de mayor significado clínico en el hombre, mientras que en perros la especie de mayor significado clínico son los *Staphylococcus* del grupo *intermedius* (SIG). Pese a lo anterior, existe la posibilidad de transferencia de determinantes génicos de resistencia entre las poblaciones bacterianas de los animales y del hombre, aunque se presume que menos del 4% de la resistencia antibiótica en el humano puede estar asociada a las cepas animales. Existen evidencias fenotípicas y genotípicas basadas en la Caracterización por Secuencia de Multilocus (MLST), Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) e identificación del tipo de gen *spa*, que sugieren que los aislados de SARM de perros y gatos son similares a los de humanos (Denamiel *et al.*, 2009).

Un estudio molecular basado en tipificación multilocus de secuencias (MLST), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), presencia del gen accesorio

regulador (*agr*) y tipificación del gen *spa* demostró que la transmisibilidad de cepas *Staphylococcus* entre mascotas y el personal veterinario es factible en el caso de cepas de *S. aureus*. La similitud genética observada entre las cepas de origen humano y de animales de compañía que asisten a la clínica veterinaria, refuerza el aspecto de que la transmisión y evolución de *S. aureus* inter-especies es continua. Así, al encontrar en las mascotas tipos de gen *spa* que habían sido recuperados solo en cepas humanas se demuestra la evolución y movilidad de las poblaciones bacterianas entre hospederos (Drougka *et al.*, 2016).

Un estudio transversal realizado por Boost *et al.* (2008), determinó la portación nasal y la susceptibilidad a antibióticos de *S. aureus* en 830 perros y 736 propietarios. Se investigó la relación de los aislados usando antibiogramas y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). *S. aureus* se aisló en el 24% de los propietarios y el 8,8% de los perros. De los 17 dueños y sus perros colonizados, no se asoció la portación de esta bacteria en caninos con el contacto humano cercano, aunque sí se asoció fuertemente con la actividad de atención en salud (Boost *et al.*, 2008).

Otro estudio en que se exploró la prevalencia y las características moleculares de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) en las prácticas médicas veterinarias, se evaluó la portación de SARM entre 96 veterinarios, 70 técnicos veterinarios y 292 perros con los que tuvieron contacto en 71 clínicas privadas en Japón. Solo dos perros donantes de sangre y un perro con enfermedad hepática resultaron SARM positivos, donde las cepas identificadas por tipificación de secuencia multilocus, tipos de *spa* y tipos de *SCCmec* demostraron concordar con las cepas aisladas del personal veterinario en las mismas clínicas que los perros con SARM positivos. La mayoría de los aislamientos de SARM del personal veterinario eran del mismo genotipo (*SCCmec* tipo II y tipo de *spa*) que un clon principal de SARM adquirido en el hospital en Japón (Ishihara *et al.*, 2014).

7. Situación en Chile

El primer reporte de aislamiento de *S. schleiferi* subespecie *coagulans* en perros en Chile, permitió evidenciar 6,8% y 21,2% de positividad en perros con

pioderma y otitis, respectivamente. Todas las cepas presentaron sensibilidad a meticilina, aunque se encontró un 18,2% de resistencia a kanamicina y un 27,3% de resistencia a clindamicina en cepas aisladas desde otitis, y solo una cepa presentó resistencia a quinolonas (Muñoz *et al.*, 2012).

Galarce *et al.* (2016), describen por primera vez la presencia de cepas de *Staphylococcus* coagulasa positiva (SCP) poseedoras del gen *mecA* en gatos sanos (n = 66 gatos) y gatos con lesiones cutáneas (n = 68 gatos). Del total de cepas aisladas, un 66,7% correspondieron a *S. intermedius*, siendo la especie de SCP más frecuentemente aislada desde estos animales. La resistencia antimicrobiana más detectada en las cepas aisladas desde ambos grupos de animales fue frente a ampicilina. En este estudio se detectaron ocho (11,1%) cepas de SCP con resistencia fenotípica a meticilina, correspondiendo seis de ellas a *S. intermedius* y dos a *S. schleiferi* subespecie *coagulans*. El gen *mecA* se detectó en todas las cepas que demostraron resistencia fenotípica a meticilina, y también se detectó este gen en tres cepas sensibles a meticilina, aisladas desde gatos con dermatopatías (12,5%).

Núñez *et al.* (2017), estudiaron la resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* coagulasa positiva aisladas desde piel de perros sanos y con pioderma. Analizaron 51 muestras de perros con pioderma y 132 muestras de perros sanos (nariz, boca e ingule). La frecuencia de aislamiento de *Staphylococcus* coagulasa positiva (SCP) fue mayor en perros con pioderma (82%; n=42) que en perros sanos (30%; n=39) (p=0,000001), de la misma forma que la resistencia antimicrobiana fue mayor en las cepas aisladas de los perros enfermos (55%) que en los sanos (31%) (p=0,0064). Se observó multirresistencia solo en las cepas aisladas de perros con pioderma, detectando siete cepas resistentes a oxacilina, 5 (16%) de animales enfermos, y 2 (13%) de perros sanos. En animales sanos se describieron 9 perfiles de resistencia, y 16 en perros enfermos, donde la resistencia a clindamicina y amoxicilina fueron las más frecuentes, respectivamente.

Otro estudio realizado por nuestro grupo de investigación, sobre la resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas desde médicos veterinarios de un hospital veterinario docente, nos permitió aislar 35 cepas desde 10 profesionales a partir de nariz, manos y boca. De las 35 cepas

analizadas, el 94,3% (n=33) fueron coagulasa negativas, y el 71,4% (n=25) resultaron resistentes al menos a un antimicrobiano. Las mayores resistencias correspondieron a oxacilina (48,6%), clindamicina (45,7%) y a mupirocina (37,1%). Del total de cepas resistentes, el 72% de las cepas exhibió multirresistencia, detectando 14 perfiles, donde el más frecuente fue oxacilina-clindamicina-mupirocina. Llamó la atención que 9 de los 10 médicos veterinarios (90%) fueron portadores de *Staphylococcus* spp. oxacilina resistente (Da Costa *et al.*, 2017).

Según lo expuesto anteriormente, parece interesante determinar la portación nasal de cepas de *Staphylococcus* resistentes a antimicrobianos con especial énfasis en la meticilino resistencia en el personal de la Red de Atención Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Los resultados servirán para complementar y comparar la información existente en las mascotas, brindando con ello herramientas objetivas que aporten a la práctica clínica veterinaria y a la salud pública.

Hipótesis

Basado en que *Staphylococcus* spp. se transmiten entre humanos y mascotas, y a que un elevado porcentaje de perros y gatos presentan cepas meticilino resistentes, se espera detectar al menos un 30% de portación nasal de *Staphylococcus* resistente a meticilina en personal asociado a la atención clínica de pequeños animales.

Objetivo general

- Establecer la presencia de cepas de *Staphylococcus* meticilino resistentes en la nariz del personal médico y técnico asociado a la atención en clínicas de pequeños animales

Objetivos específicos

1. Definir las especies y determinar el nivel de portación nasal de *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes en el personal de la Red de Atención Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.
2. Identificar los perfiles de resistencia a antibióticos de uso en medicina Humana y Veterinaria en las cepas de *Staphylococcus* aisladas.
3. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) en las cepas meticilino resistentes.
4. Determinar la presencia del gen *mecA* en las cepas de *Staphylococcus* meticilino resistentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal con cepas de *Staphylococcus* spp. obtenidas desde muestras nasales del personal asociado a la atención clínica de especies menores de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Las muestras fueron obtenidas desde la Red de Atención Veterinaria (RAV) de la Universidad de Chile: Sede Bilbao, Sede Hospital Docente Favet y Sede El Roble. El muestreo fue por conveniencia, obteniendo las muestras durante el período comprendido entre Agosto y Noviembre de 2017. Este estudio contó con el apoyo de la Directora de la RAV, Doctora Alicia Valdés.

Criterios de Inclusión:

- Médico veterinario y enfermeros.
- Que trabaje en contacto con perros y gatos con antigüedad de tres meses.
- Estar sin tratamiento antimicrobiano tópico o sistémico por al menos dos semanas (14 días) antes de la obtención de muestra (Muñoz *et al.*, 2012).
- No presentar lesión nasal macroscópica que haga sospechar de una patología viral, bacteriana o micótica.

Obtención de muestras y transporte

Al personal en evaluación se les entregó una hoja de información sobre el estudio y se les pidió que firmaran el formulario de consentimiento informado (Anexo 1) y que llenasen una pequeña encuesta con datos personales (Anexo 2). Por consideraciones éticas, las muestras de torulado nasal fueron obtenidas por los mismos profesionales de acuerdo a un protocolo general utilizado anteriormente (Anexo 3). Este consistió en un hisopado nasal, mediante la introducción de una tórula estéril humedecida en solución salina fisiológica estéril al interior de una fosa nasal (aproximadamente dos centímetros). Para ello se debió girar la tórula lenta y suavemente contra la mucosa nasal en 360°, tres veces y luego se depositaron en el medio de transporte Stuart (Oxoid®)

(Carmona *et al.*, 2012; López *et al.*, 2014). Se obtuvieron muestras de todo el personal asociado a clínica menor de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, que cumplieron con los criterios de inclusión. Las muestras fueron transportadas en ambiente refrigerado hasta el laboratorio, en un tiempo máximo de 4 horas antes de su procesamiento. La identificación de la tórula con las iniciales del nombre completo y código de sede se mantuvo en forma confidencial durante todo el estudio.

Aislamiento e identificación de *Staphylococcus* spp.

Todos los análisis se realizaron en el Laboratorio de Bacteriología Clínica Veterinaria-Favet, Universidad de Chile. Las tórulas fueron sembradas en placas de agar sangre (5% de sangre ovina) y placas de agar Sal-Manitol (BD®) mediante la técnica del reloj, e incubadas a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas con el fin de conseguir colonias aisladas. Se seleccionaron 4 colonias sospechosas, dos en cada placa. En agar sangre: colonias circulares, con presencia de endopigmento (blanco, amarillo, cremoso) y en agar sal manitol: colonias tanto manitol negativo (rojo) como positivo (amarillo).

Identificación de Género

a) Tinción Gram

A todas las colonias sospechosas se les realizó tinción Gram, para confirmar la presencia de cocáceas Gram positivas, con morfología similar a racimos de uva o bien en pares, en cadenas cortas o individuales (Figura 3).

c) Caracterización de hemólisis

Se caracterizó la hemólisis en agar sangre como: hemólisis beta, hemólisis caliente fría y no hemolíticas (Figura 5).

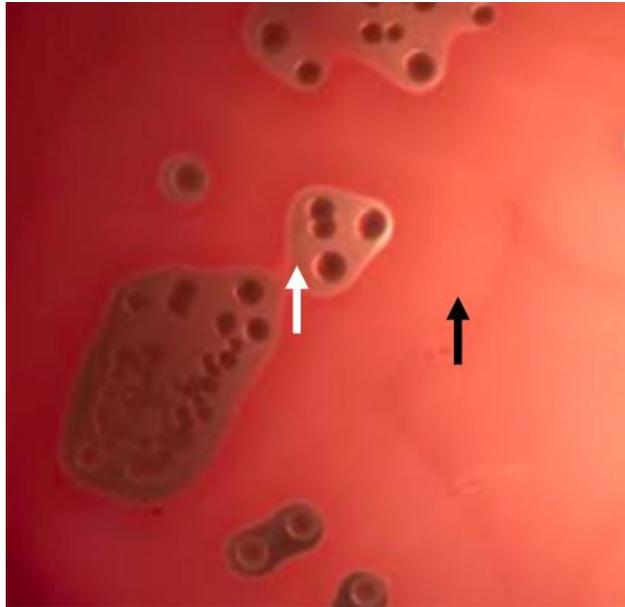


Figura 5. Placa de agar sangre con crecimiento de colonias de *Staphylococcus* spp. hemólisis beta (flecha blanca) y hemólisis caliente-fría (flecha negra) (Elaboración propia).

d) Prueba de Catalasa

Para determinar la presencia de catalasa, en un tubo estéril se agregó agua oxigenada (H_2O_2) de 10 volúmenes diluida en agua destilada en una proporción 1:2. Luego se tomó una colonia a partir de un medio de cultivo sin sangre y se sumergió en el tubo que contiene el agua oxigenada diluida. El desprendimiento de burbujas se consideró una prueba positiva, lo que indicó desprendimiento de oxígeno libre demostrando la producción de la enzima (Gerhardt *et al.*, 1981). Como control positivo se utilizó una cepa clínica aislada de un perro, donada gentilmente por el Dr. Nicolás Galarce y mantenida en el cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.

Identificación de Coagulasa

Se buscó determinar la presencia de coagulasa libre en todas las cepas de *Staphylococcus* identificadas. En un tubo estéril se agregó 0,3 ml de un cultivo

joven crecido en caldo Tripticasa de Soya (TSB) a 36°C durante 18-24 horas y se le adicionó 0,3 mL de plasma citratado de conejo diluido en agua destilada en una proporción 1:3. Se incubó en estufa a 37°C y se observaron cada 30 minutos hasta un máximo de 24 horas. La coagulación del plasma indicó la producción de la enzima coagulasa libre (Figura 6). Como control positivo se utilizó una cepa clínica aislada de un perro, donada gentilmente por el Dr. Nicolás Galarce y mantenida en cepario en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Como control negativo se utilizó un tubo que sólo contenía plasma diluido y medio de cultivo sin sembrar bacterias.

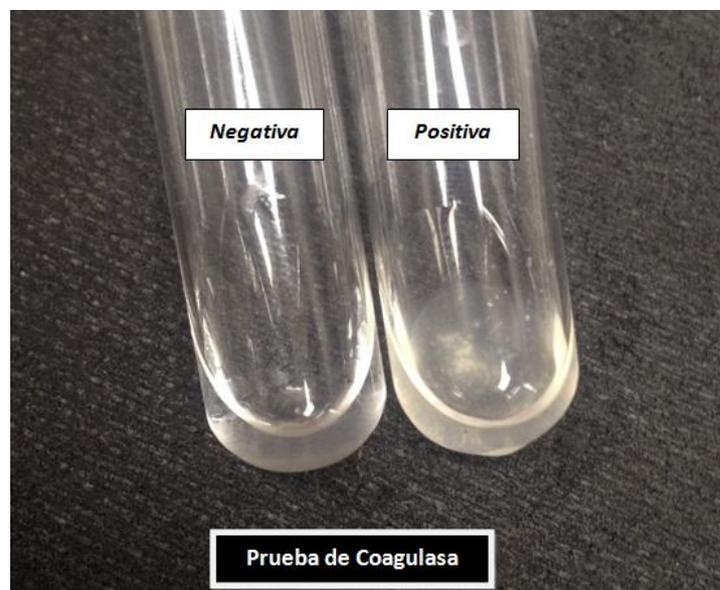


Figura 6. Prueba de coagulasa luego de 24 horas de incubación donde se observa una prueba negativa (ausencia de coagulación) y una prueba positiva (presencia de coagulación) (Elaboración propia).

Identificación de las especies del género *Staphylococcus*

Para ello se caracterizó la presencia del gen que codifica la enzima term nucleasa utilizando la amplificación especie específica del gen *nuc* mediante la técnica de PCR descrita por Sasaki *et al.* (2010), parcialmente modificada (Tabla 1).

La extracción de ADN bacteriano se hizo por calor. Para ello se utilizó un cultivo joven crecido durante la noche y diluido en 500 µL de agua libre de nucleasas. El cultivo se colocó a 100°C por 10 minutos en baño termostático

y luego se centrifugó durante cinco minutos a 15000 rpm. Se utilizó 5 µL del sobrenadante para la PCR (Dashti *et al.*, 2009).

Mezcla de reacción de PCR: Para la mezcla de amplificación del ADN purificado se utilizó un tubo Eppendorf de 0,2 mL en que se depositó 15 µL de Master Mix (GoTaq Green Master Mix, Promega), 5 µL de cada uno de los partidores a concentración de 1 µmol (IDT), y 5 µL de la muestra de ADN templado, obteniendo un volumen total de 30 µL.

Amplificación del ADN: Se utilizó un termociclador modelo Multigene Gradient (Labnet International Inc.) de 96 pocillos de 0,2 mL, y las mezclas de reacción se sometieron a ciclos térmicos, un ciclo a 95°C durante 2 minutos; 30 ciclos a 95°C durante 30s, 55°C durante 30 s, y 72°C durante 30s; y luego una vez a 72°C durante 2 minutos

Tabla 1. Partidores a utilizar en el protocolo de PCR para la identificación de especies de *Staphylococcus*.

| Primer | Partidor (5'-3') | Tamaño (pb) | Especies |
|------------------|--|-------------|----------------------------|
| au-F3 au-nucR | TCGCTTGCTATGATTGTGG GCCAATGTTCTACCATAGC | 359 | <i>S. aureus</i> |
| pse-F2 pse-R5 | TRGGCAGTAGGATTCGTTAA CTTTGTGCTYCMTTTTGG | 926 | <i>S. pseudintermedius</i> |

Visualización de los productos del PCR: Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer Tris acetato EDTA (TAE) 1X. Siete microlitros (7 µL) del producto de PCR se depositaron en el pocillo respectivo del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V por 60 minutos. Se utilizó como marcador de peso molecular el Accuruler 100bp Plus DNA, 500 µL (MAESTROGEN), que contiene fragmentos de ADN de entre 100 y 3000 pb. Luego, el gel se incubó en bromuro de etidio (0.5 µg/mL) por 30 minutos y las bandas obtenidas fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminador UVP®) y fotografiado digitalmente. Como controles positivos y

negativos se emplearon las cepas *S. aureus* ATCC 25923 y *S. pseudintermedius* ATCC 49444; mantenidas en cepario en el Laboratorio de Microbiología de FAVET de la Universidad de Chile. Como control de reactivos se utilizó una mezcla de 15 µL de Master Mix, 5 µL de cada uno de los partidores, y 5 µL de agua libre de nucleasas.

Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

Método Kirby-Bauer

Una vez identificadas las cepas, se analizó su susceptibilidad a antimicrobianos mediante el método de difusión en placa de Kirby-Bauer, de acuerdo al “Clinical and Laboratory Standard Institute” (CLSI, 2015). A partir de cinco colonias de la cepa pura se hizo una suspensión en caldo común a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por máximo 18 - 24 horas, y se ajustó su turbidez al estándar nº 0,5 del nefelómetro de McFarland (concentración aproximada de $1,5 \times 10^8$ bacterias/mL). Con un hisopo se transfirió el inóculo de cada cepa y se sembró en tres improntas toda la superficie de una placa petri con medio agar Müller-Hinton (Difco) de 4 mm de espesor, dejando secar la placa por 30 minutos en estufa a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. En seguida se colocaron los sensidiscos de antibióticos separados equidistantemente entre ellos, con una pinza estéril sobre el agar realizando una ligera presión. Se invirtieron las placas petri para evitar la acumulación excesiva de humedad y se incubaron en estufa a $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 horas. Los antimicrobianos analizados (Oxoid®) fueron aquellos de uso humano y/o veterinario: amoxicilina (10µg), amoxicilina/ácido clavulánico (30µg), cefoxitin en sustitución de la oxacilina/meticilina (30µg), cefadroxilo (30µg), ciprofloxacino (5µg), clindamicina (2µg), doxiciclina (30µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), mupirocina (30µg). La cepa de *S. aureus* ATCC 25923 fue utilizada como control de calidad de la prueba. Se utilizó cefoxitin (FOX) ya que es mejor marcador de resistencia a la meticilina que la oxacilina (Laspina *et al.*, 2008).

La determinación de resistencia se realizó mediante medición, en milímetros, de los halos de inhibición con un Vernier de precisión y sus valores fueron evaluados de acuerdo a los puntos de cortes establecidos por el CLSI para

cada droga. Los resultados fueron expresados como porcentaje de sensibilidad y resistencia, considerando la sensibilidad intermedia dentro del grupo de las cepas resistentes. Se consideró una cepa multirresistente, cuando presentó resistencia a 3 o más antimicrobianos (Magiorakos *et al.*, 2012). Además, se describieron los perfiles de resistencia fenotípica.

Del total de cepas aisladas por persona, se seleccionaron para el resto del estudio solo aquellas que mostraron diferencia en los siguientes fenotipos: fermentación de manitol, tipo de hemólisis, actividad de coagulasa y perfil de resistencia antimicrobiana.

Concentración mínima inhibitoria (CIM) mediante dilución en agar para cepas meticilino resistentes por Kirby-Bauer

Esta técnica se realizó según las recomendaciones del CLSI (2015) analizando diez concentraciones de la droga (256 a 0,125 µg/ml). Para ello, una mezcla de 18 ml de medio agar Müeller-Hinton (Difco) más 2 ml de la dilución de cada una de las concentraciones del antimicrobiano se colocaron en una placa petri. A partir de cinco colonias de la cepa pura se hizo una suspensión en caldo común a 35°C por máximo 16-20 horas, y se ajustó su turbidez al estándar nº 0,5 del nefelómetro de McFarland (concentración aproximada de $1,5 \times 10^8$ bacterias/ml). Se ocupó como droga pura la Oxacilina sal sódica (Ehrenstorfer), de 99% de pureza, y agua como solvente y diluyente para realizar las diluciones al doble de acuerdo a lo establecido por el CLSI (CLSI, 2015). Con un “Replicador de Steer” se imprimió el inóculo de cada cepa en la superficie de una placa petri con medio de agar Müeller-Hinton (Difco) con 2% de NaCl, dejando secar la placa por 30 minutos en estufa a 35°C. La impresión se inició en una placa control sin antimicrobiano y luego se imprimieron de la menor a mayor concentración. En seguida se incubaron en estufa a 35°C por 16-20 horas. Todas las cepas se analizaron por duplicado. La CIM se leyó directamente observando la mínima concentración de oxacilina que fue capaz de inhibir el crecimiento de la cepa y su interpretación se basó en los puntos de corte establecidos para oxacilina en el CLSI (2015) de acuerdo a la capacidad de producir coagulasa (SCP y SCN). La cepa de *S. aureus* ATCC 29213 fue utilizada como control de calidad de la prueba.

Detección del gen *mecA* en cepas resistentes a la oxacilina por CIM

Para ello se procedió a detectar la presencia del gen *mecA* mediante la técnica de PCR descrita por Ishihara *et al.* (2010), parcialmente modificada (Tabla 2).

La extracción de ADN bacteriano se hizo de la misma forma que lo descrito en el punto anterior.

Mezcla de reacción de PCR: Para la mezcla de amplificación del ADN purificado se utilizó un tubo Eppendorf de 0,2 mL en que se depositó 15 μ L de Master Mix (GoTaq Green Master Mix, Promega), 5 μ L de cada uno de los partidores a concentración de 1 μ mol (IDT), y 5 μ L de la muestra de ADN templado, obteniendo un volumen total de 30 μ L.

Amplificación del ADN: Se utilizó un termociclador modelo Multigene Gradient (Labnet International Inc.) de 96 pocillos de 0,2 mL, y las mezclas de reacción se sometieron a los siguientes ciclos: un ciclo a 95°C durante 2 minutos; 30 ciclos a 95°C durante 30s, 55°C durante 30 s, y 72°C durante 30s; y luego una vez a 72°C durante 2 minutos.

Tabla 2. Par de partidores a utilizar en el protocolo de PCR para el gen *mecA*.

| Primer | Partidor (5'-3') | Tamaño (bp) | Gen |
|---------------|----------------------------|--------------------|-------------|
| mecA1 | TGT CCG TAA CCT GAA TCA GC | 519 | <i>mecA</i> |
| mecA2 | TGC TAT CCA CCC TCA AAC AG | | |

Visualización de los productos del PCR: Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en buffer Tris acetato EDTA (TAE) 1X. Siete microlitros (7 μ L) del producto de PCR se depositaron en el pocillo respectivo del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V por 60 minutos. Se utilizó como marcador de peso molecular el Accuruler 100bp Plus DNA, 500ul (MAESTROGEN), que contiene fragmentos de ADN de entre 100 y 3000 pb. Luego, el gel se incubó en bromuro de etidio (0,5 μ g/mL) por 30 minutos. Posteriormente, las bandas obtenidas fueron visualizadas en un

transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminador UVP®) y fotografiado digitalmente. Como control positivo para el gen *mecA* se empleó una cepa *S. aureus* meticilino resistente SARM ATCC 43300, y como control negativo se utilizó una cepa *S. aureus* ATCC 25923 mantenida en cepario en el Laboratorio de Microbiología de la FAVET de la Universidad de Chile. Como control de reactivos se utilizó una mezcla de 15 µL de Master Mix, 5 µL de cada uno de los partidores, y 5 µL agua libre de nucleasas.

Medidas de bioseguridad

Las prácticas y los procedimientos básicos de contención del nivel de Bioseguridad 2 (BS-2) fueron el requisito mínimo para la manipulación de las muestras y de las cepas (OMS, 2006; Conicyt, 2008). Como medidas de bioseguridad en el trabajo práctico se utilizó delantal manga larga, guantes de látex, uso de desinfectantes y autoclavado del material contaminado.

Dado que el proceso de visualización del producto amplificado involucró el uso de bromuro de etidio (mutagénico) y un transiluminador de luz UV, al momento de visualizar el gel se utilizó gafas con filtro UV, con posterior eliminación del gel incubado en bromuro de etidio por incineración.

Análisis de datos

Los datos fueron introducidos y almacenados en una base de datos, utilizando una planilla electrónica, Microsoft Excel. La portación nasal, resistencia, sensibilidad y los perfiles de resistencia fenotípica a los antimicrobianos de uso habitual en medicina humana y/o veterinaria se expresaron como porcentajes. Se caracterizaron los portadores de SARM y de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina en cuanto a edad, sexo, enfermedades dérmicas y o alérgicas y, la tenencia de mascotas. Se analizó la asociación entre la portación de meticilino resistencia y las variables: 1) Sedes (referida al lugar de origen de la muestra), 2) Sexo (codificada como hombre o mujer) y 3) Tenencia de mascotas (codificada como Sí o No). Dichos análisis se realizaron mediante la prueba de Chi Cuadrado de Pearson, mediante la construcción de tablas de contingencia, considerando valores de p menores a 0,05 para establecer una asociación estadísticamente significativa. Esta prueba consiste en una

estadística de contraste de hipótesis para datos presentados en forma de número de observaciones por categoría, por tanto, es la prueba de mayor uso en la comparación de variables de tipo categóricas y para la comparación de proporciones (Martínez-González *et al.*, 2006).

RESULTADOS

Participaron en el estudio 67 profesionales de las tres sedes de la Red de Atención Veterinaria (RAV) de la Universidad de Chile, siendo 13 de la sede Favet, 16 de la sede El Roble y 38 de la sede Bilbao. De los 67, 60 eran médicos veterinarios y 7 enfermeros. De los participantes 18 (27%) son hombres, 49 (73%) mujeres, con una edad promedio de 32 años. El promedio de mascotas por persona fue de 4 y solo 7 personas tenían alergia en la piel. De las 67 personas, se aislaron 236 cepas de *Staphylococcus* spp. con un promedio de 3 cepas por personas.

1. Definir las especies y determinar el nivel de portación nasal de *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes en el personal de la Red de Atención Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

De las 236 aisladas, 56 de ellas fueron resistentes a meticilina y de ellas, 10 correspondieron a *S. aureus* (Figura 7) y el resto no amplificó con los partidores para el gen *nuc* de *S. pseudintermedius*.

El número de personas portadoras de SCP según sede se muestra en la Tabla 3.

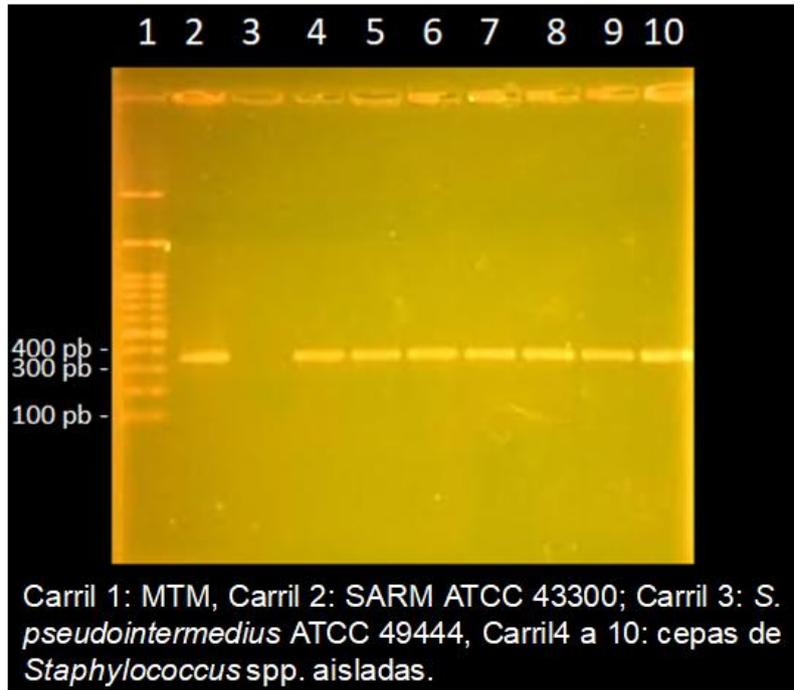


Figura 7. Visualización del gel de agarosa del gen *nuc* para *S. aureus* (359 bp) de origen nasal de personas que presentaron resistencia fenotípica a la meticilina. MTM: marcador de tamaño molecular.

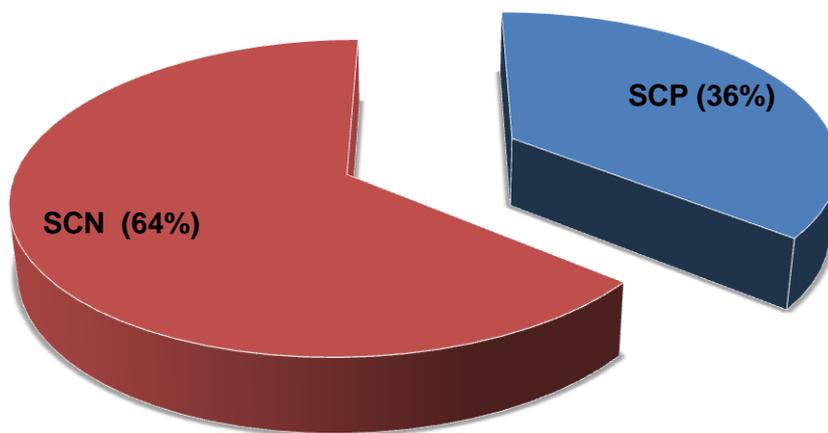


Figura 8. Portación nasal de cepas de *Staphylococcus* spp. en el total de trabajadores de la Red de Atención Veterinaria analizados según su actividad de coagulasa (n=67). SCN: *Staphylococcus* coagulasa negativa; SCP: *Staphylococcus* coagulasa positiva.

Tabla 3. Número de personas portadoras nasales de *Staphylococcus* coagulasa positiva según sede.

| Sedes | Personas portadoras de SCP (%) | Totales de personas (100%) |
|----------|--------------------------------|----------------------------|
| Favet | 4 (30,8%) | 13 |
| El Roble | 5 (31,3%) | 16 |
| Bilbao | 15 (39,5%) | 38 |

SCP: *Staphylococcus* coagulasa positiva.

De las 67 personas que participaron del estudio, 33 fueron portadoras de cepas de *Staphylococcus* spp. sensibles a la meticilina, mientras que, 34 fueron portadores de cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes a la meticilina (Figura 9), correspondiendo a 5 personas de la sede Favet; 7 personas en la sede El Roble y 22 personas en la sede Bilbao.

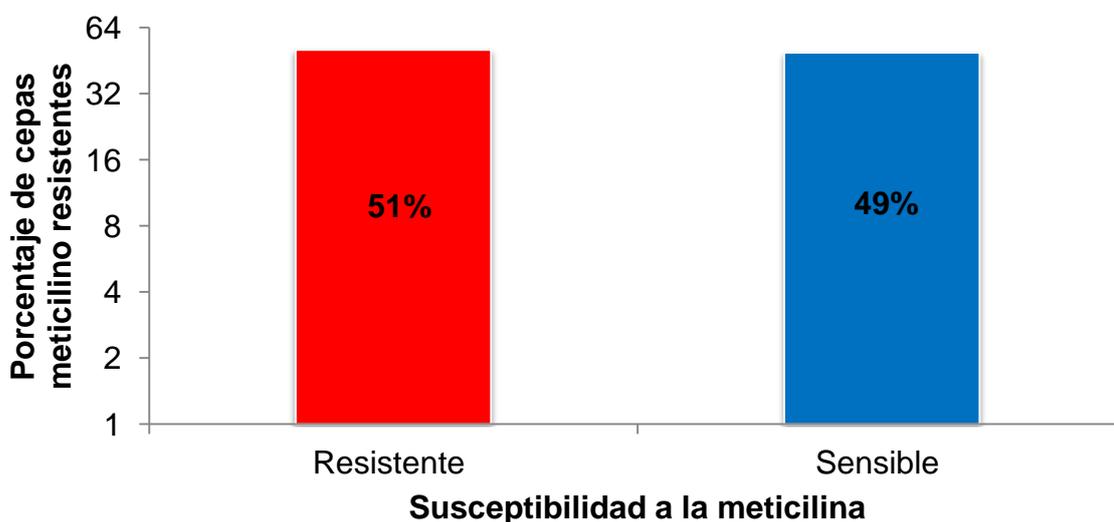


Figura 9. Portación nasal de cepas de *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes en personal de la Red de Atención Veterinaria (n=67).

De las 56 cepas de *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes (MR) 11 fueron coagulasa positiva y 45 negativas (Figura 10).

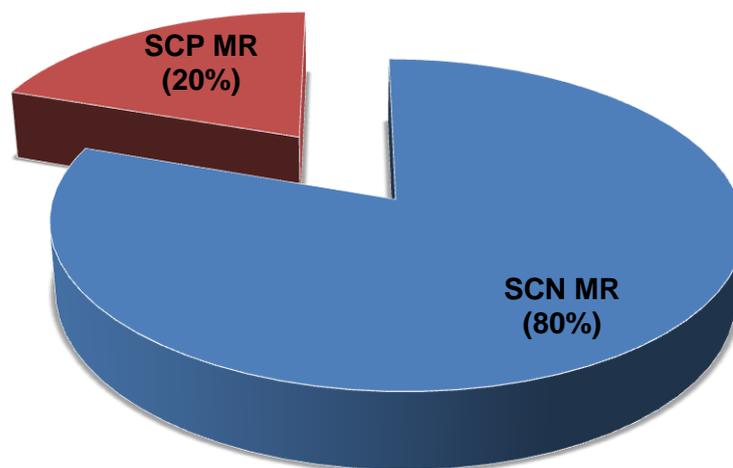


Figura 10. Cepas de *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes según su actividad de coagulasa (n=56). SCN MR: *Staphylococcus* coagulasa negativa meticilino resistentes; SCP MR: *Staphylococcus* coagulasa positiva meticilino resistentes.

2. Identificar los perfiles de resistencia a antibióticos de uso en medicina Humana y Veterinaria en las cepas de *Staphylococcus* aisladas.

En la Figura 11 se presentan las resistencias antimicrobianas de todas las cepas analizadas, observando la mayor frecuencia frente a amoxicilina, eritromicina y clindamicina.

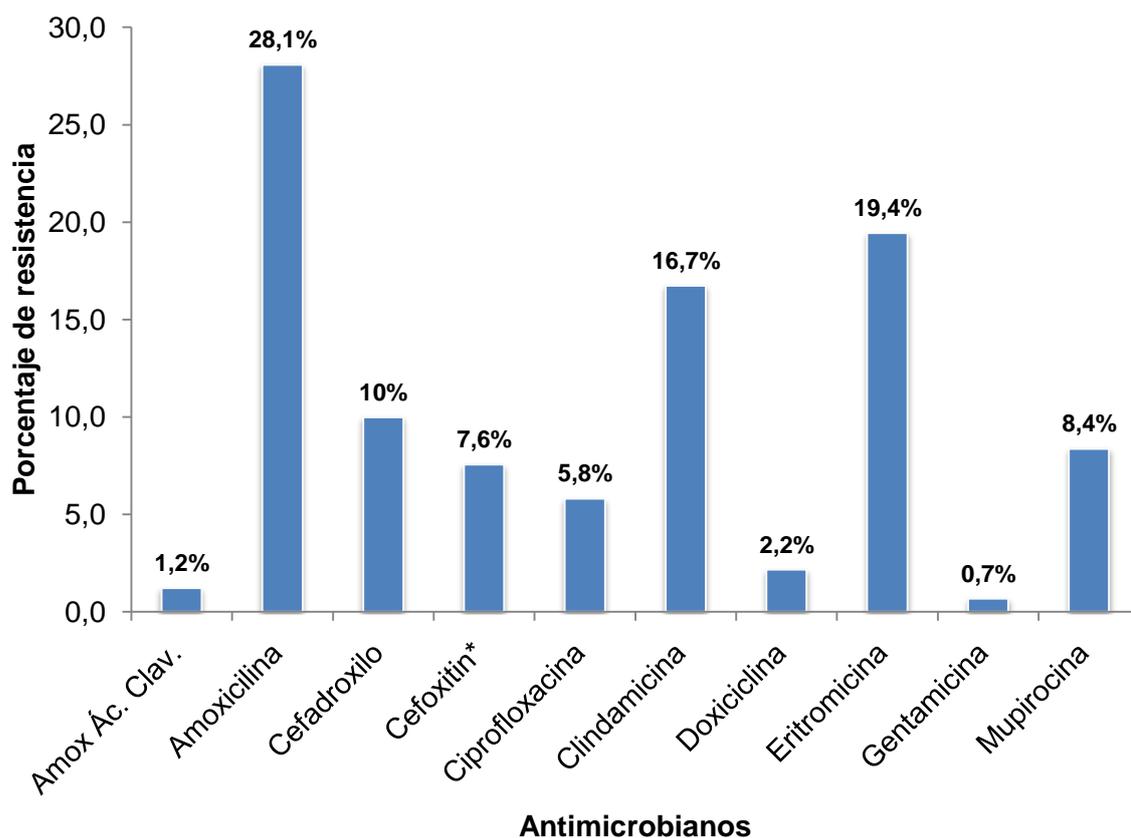


Figura 11. Porcentajes de resistencia antimicrobiana de 236 cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas del personal de las distintas sedes de la Red de Atención Veterinaria.

Solo 14 de las cepas aisladas fueron sensibles a todas las drogas analizadas; las 222 restantes fueron resistentes a uno o más antimicrobianos (Figura 12).

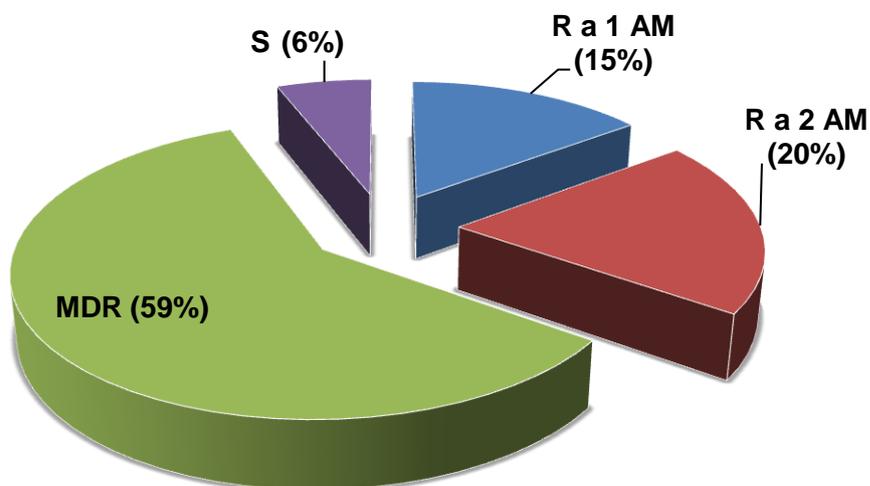


Figura 12. Susceptibilidad antimicrobiana de las 236 cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas de la nariz del personal de la Red de Atención Veterinaria. S: sensible; R: resistente; MDR: multiresistente; AM: antimicrobiano.

La mayoría de las cepas multiresistentes (MDR) (60%) se originaron desde la sede Bilbao (Figura 13).

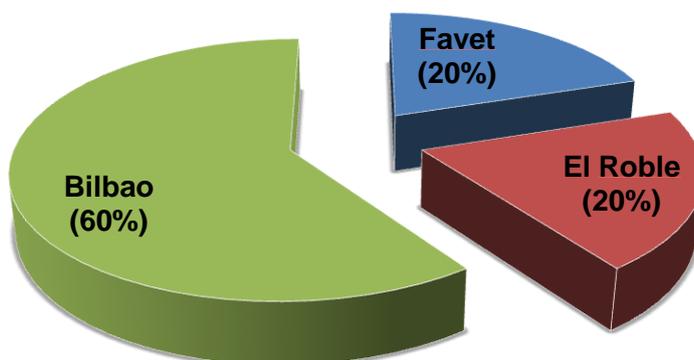


Figura 13. Porcentaje de cepas de *Staphylococcus* spp. multiresistentes según sede (n=140).

Se observaron 56 perfiles de resistencia antimicrobiana, donde los más frecuentes son los que se presentan en la Figura 14. Destaca el perfil de resistencia simple a amoxicilina, seguido por la resistencia triple a Amoxicilina + Clindamicina + Eritromicina + Mupirocina, y la resistencia doble a Amoxicilina + Eritromicina.

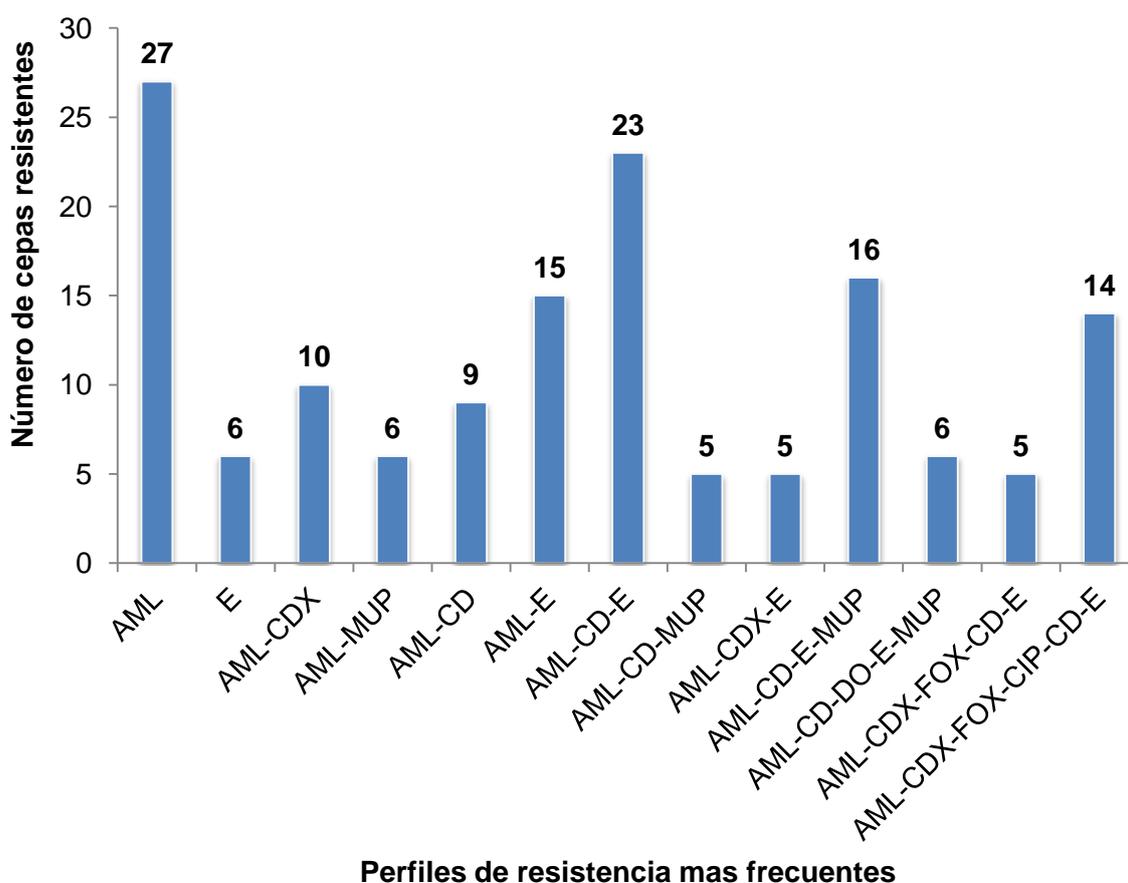


Figura 14. Perfiles de resistencias antimicrobianos más frecuentes en el total de cepas de *Staphylococcus* spp. analizadas. **AMC:** Amox Ác. Clav.; **AML:** Amoxicilina; **CDX:** Cefadroxilo; **FOX:** Cefoxitin; **CIP:** Ciprofloxacina; **CD:** Clindamicina; **DO:** Doxiciclina; **E:** Eritromicina; **CN:** Gentamicina; **MUP:** Mupirocina.

Al analizar los 56 perfiles, se encontró que 24 de ellos siempre contenían resistencia a meticilina (Figura 15), siendo el más frecuente Amoxicilina + Cefadroxilo + Cefoxitin + Ciprofloxacina + Clindamicina + Eritromicina, seguido por Amoxicilina + Cefadroxilo + Cefoxitin + Clindamicina + Eritromicina.

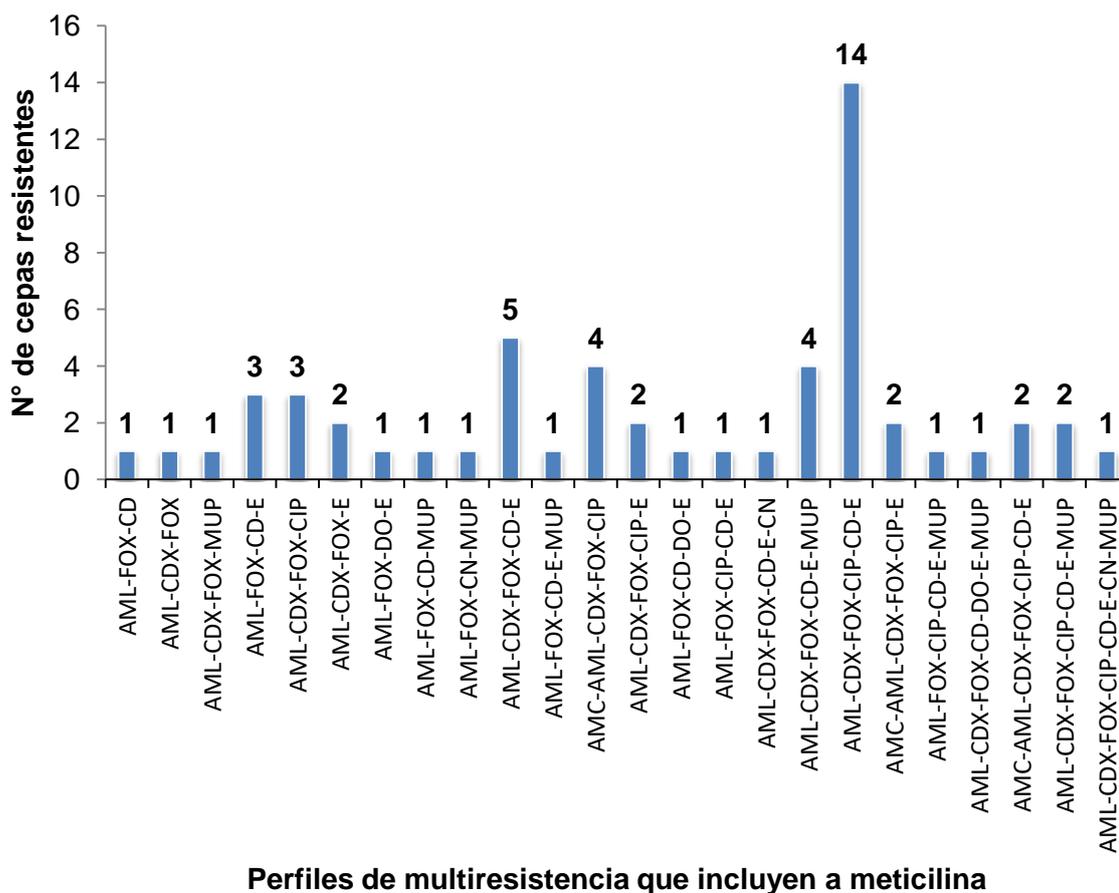


Figura 15. Perfiles de multiresistencia que incluyen a meticilina en el total de 56 perfiles de resistencias identificados. **AMC:** Amox Ác. Clav.; **AML:** Amoxicilina; **CDX:** Cefadroxilo; **FOX*:** Cefoxitin; **CIP:** Ciprofloxacina; **CD:** Clindamicina; **DO:** Doxiciclina; **E:** Eritromicina; **CN:** Gentamicina; **MUP:** Mupirocina.

3. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) en las cepas meticilino resistentes por Kirby-Bauer.

Todas las cepas analizadas (56) presentaron valores de CIM considerados como resistentes (Tabla 4) a la oxacilina (Tabla 5), donde 11 cepas presentaron valores “Border Line” (8µg/mL) y una sobrepasó este límite (16µg/mL).

Tabla 4. Criterio de interpretación de la CIM para Oxacilina (µg/mL) CLSI (2015).

| | S | R |
|------------|----------|----------|
| SCP | ≤ 2 | ≥ 4 |
| SCN | ≤ 0,25 | ≥ 0,5 |

Tabla 5. CIM para la oxacilina en cepas de *Staphylococcus* spp. según actividad de coagulasa.

| N° de cepas | Coagulasa | Valores de CIM (µg/mL) | Interpretación |
|--------------------|------------------|-------------------------------|-----------------------|
| 11 | SCP | 8 | R |
| 6 | SCN | 2 | R |
| 3 | SCN | 0,5 | R |
| 5 | SCN | 1 | R |
| 2 | SCN | 4 | R |
| 1 | SCN | 16 | R |
| 28 | SCN | 1 | R |

4. Determinar la presencia del gen *mecA* en las cepas de *Staphylococcus* meticilino resistentes.

El gen *mecA* (Figura 16) fue detectado en 83,9% (Tabla 6) de las cepas que presentaron resistencia fenotípica a meticilina.

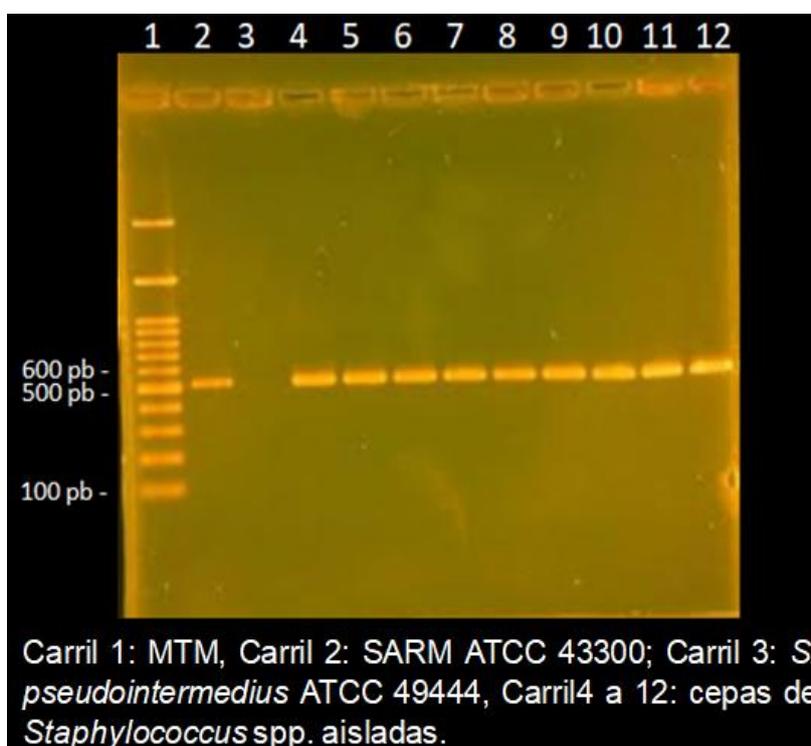


Figura 16. Visualización del gel de agarosa del gen *mecA* (519 bp) en las cepas de *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes según CIM. MTM: marcador de tamaño molecular

Tabla 6. Cepas de *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes portadoras del gen *mecA* según su actividad de coagulasa (n=56).

| Coagulasa | Número | <i>mecA</i> positiva |
|----------------|-----------|----------------------|
| SCP | 11 | 4 |
| SCN | 45 | 43 |
| Totales | 56 | 47 |

En la Tabla 7 se presenta un resumen de las características de las personas portadoras según sede de origen. Es importante destacar que SARM fue encontrado en 9 personas provenientes de la sede Bilbao.

Tabla 7. Resumen de las personas con sus cepas meticilino resistentes en las distintas sedes. MDR: multiresistente

| | Sedes | | | Totales |
|------------------------------|-------|----------|--------|---------|
| | FAVET | El Roble | Bilbao | |
| Nº de cepas de SMR | 8 | 14 | 34 | 56 |
| Nº personas con cepas de SMR | 5 | 7 | 22 | 34 |
| Perfil de Resistencia | MDR | MDR | MDR | MDR |
| Sexo masculino | 1 | 1 | 8 | 10 |
| Sexo femenino | 4 | 6 | 14 | 24 |
| Rango de edad | 25-50 | 26-35 | 26-57 | 25-57 |
| Personas con alergia dérmica | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Nº de mascotas | 6 | 40 | 80 | 126 |
| Cepas <i>mecA</i> positivas | 8 | 14 | 25 | 47 |

Para las variables analizadas (Sedes, Sexo y Tenencia de mascotas) no se encontró evidencia estadísticamente significativa para determinar una asociación con la portación de meticilino resistencia. Un resumen del análisis de estadístico se proporciona en la Tabla 8.

Tabla 8. Evaluación de la asociación estadística entre las variable Sedes, Sexo y Tenencia de mascotas con la portación de metililino resistencia del personal de la Red de Atención Veterinaria (n= 67) mediante Chi Cuadrado de Pearson.

| Variables | Portación de metililino resistencia |
|----------------------|--|
| | Valor de <i>p</i> |
| Sedes | 0,3916 |
| Sexo | 0,3037 |
| Tenencia de mascotas | 0,1450 |

DISCUSIÓN

Staphylococcus spp. son una causa muy frecuente de morbimortalidad asociada a bacteremias. El escenario actual se ha complicado con la emergencia de multiresistencia asociada a meticilina, particularmente para *S. aureus* en el hombre y, en menor cuantía, para *S. pseudointermedius* en mascotas. De hecho la resistencia a la meticilina es tomada como marcador de la resistencia a otros antibióticos.

El 27 de febrero de 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó su primer listado de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana que necesitan urgentemente nuevos antibióticos. La lista se divide en tres categorías según la urgencia: prioridad crítica, alta o media. *S. aureus*, resistente a la meticilina figura como “Prioridad 2: ELEVADA” (OMS, 2017). Este hecho, sumado a la evidencia de transmisión de estas bacterias entre personas y sus mascotas, hizo plantear el estudio de la portación nasal de *Staphylococcus* meticilino resistentes en profesionales que trabajan periódicamente con perros y gatos en un centro de atención universitaria, como lo es la RAV de la Universidad de Chile.

Del total del personal analizado, 13,43% (9 personas) resultaron portadoras de *S. aureus* meticilino resistente, sin pesquisar colonización por *S. pseudointermedius*. Estos resultados son similares a lo encontrado por Von Eiff *et al.* (2001) quienes estudiaron la colonización nasal de *S. aureus* como factor de bacteremia en unidades de cuidados generales e intensivos de 32 hospitales universitarios y comunitarios en Alemania. El estudio determinó que en el personal del hospital, un 13% fue portador de nasal de *S. aureus*. Pese a lo anterior, Drougka *et al.* (2016) encontraron que de los 18 miembros del personal veterinario, un 38,9% de ellos fueron portadores nasales de *S. aureus*. Este elevado valor es importante ya que la colonización de la mucosa nasal en humanos por *S. aureus* establece un estado de portador que predispone subsecuentemente a una infección (Boyce, 1996).

La frecuencia de colonización de cepas SCP (36%) en los profesionales de la RAV fue lo esperado según el trabajo de Castellano González *et al.* (2005) aunque muy elevada si es comparada con los estudios de Hanselman *et al.*

(2006) quienes informan una colonización de solo el 6,5% en personal veterinario. Los resultados de este estudio sugieren un mayor riesgo para los profesionales veterinarios, sin embargo las diferencias con otros estudios se podrían deber a la ubicación geográfica y los métodos de cultivo aunque se requiere más investigación para definir con mayor precisión el riesgo ocupacional.

Si bien el nivel de portación de *S. aureus* y de *Staphylococcus* coagulasa positiva en la nariz de personal de la RAV de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile no demostró ser tan alta, el nivel de portación de cepas de *Staphylococcus* spp. resistente a meticilina sí sobrepasó las expectativas de este estudio (al menos 30%) ya que se detectó un 51% de personas portadoras. Este valor se encuentra sobre los valores presentados por Morris *et al.* (2010), en que la portación de *Staphylococcus* resistentes a la meticilina por el personal de la práctica de dermatología veterinaria fue de solo 11,1%. De la misma manera ocurre con los datos señalados por Drougka *et al.* (2016), quienes aislaron siete cepas de *S. aureus* desde 18 personas asociadas a la salud veterinaria, donde la prevalencia de SARM fue de un 16,7% (3 personas), y también difiere de los presentados en Japón por Ishihara *et al.* (2014), en que la portación de SARM en el personal veterinario fue de 22,9% (22 veterinarios), de un total de 96 analizados.

La mayor frecuencia de portación nasal de cepas SCN que cepas SCP en las personas de la RAV (80%), está dentro de lo esperado ya que tanto *S. aureus* como SCN son parte de la microbiota residente de la piel junto a bacterias corineiformes (Evans *et al.*, 1950; González y Delgadillo, 2002). Su presencia no debe ser subvalorada ya que también causan infecciones de importancia clínica y además constituyen un factor condicionante para una mayor morbimortalidad (Laspina *et al.*, 2008).

En cuanto a los perfiles de resistencia a otros antimicrobianos, se observó una mayor frecuencia frente a amoxicilina, clindamicina y eritromicina, probablemente por ser éstos los de mayor uso en la práctica clínica. Esto también fue observado en la investigación de Otth *et al.* (2008). La mayor sensibilidad se presentó frente a amoxicilina con ácido clavulánico y doxiciclina, similar a lo observado por Brown *et al.* (1976). En el presente trabajo también

se encontró que las cepas meticilino resistentes fueron siempre multiresistentes a una gran diversidad de antimicrobianos y en perfiles diversos, como fue tempranamente señalado por Gill *et al.* (2005). El uso inadecuado y el abuso (Laxminarayan *et al.* 2013) asociado a la selección natural y co-selección probablemente son los factores que permiten explicar esta multiresistencia.

Llama la atención que la cuantificación de la resistencia a oxacilina (CIM) en la mayoría de las cepas fuera menor o igual a 8 µg/mL, valor que se asocia a resistencia de bajo nivel producido por hiperproducción de betalactamasas o a la producción de PBP modificada distintas a la PBP2 (Castellano González *et al.*, 2005). Todas estas cepas amplificaron con los partidores para el gen *mecA* por lo que es dable suponer que el mecanismo de resistencia debiera ser por la presencia de PBP2 y por lo tanto una resistencia de alto nivel (mayor o igual a 8 µg/mL). Si bien es cierto se han reportado cepas de SARM carentes del gen *mecA* y β-lactamasas negativas su frecuencia de aislamiento es menor al 1% (Zaher *et al.*, 1997). Se ha propuesto un mecanismo alternativo de resistencia que puede ser el responsable de la resistencia intrínseca de bajo nivel, además, de la producción de β-lactamasas y del gen *mecA* (De Lancastre *et al.*, 1994). En consecuencia, la determinación de la CIM y el gen *mecA* no deben ser utilizados como únicos criterios para la detección de resistencia a oxacilina.

La presencia del gen *mecA* es la principal evidencia en la detección de cepas meticilino resistentes, determinante génico que es adquirido por parte de *Staphylococcus* spp. (Elhassan *et al.*, 2015). De hecho en este estudio, de las cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina según Kirby-Bauer y CIM, un 83,9% de ellas presentaron el gen *mecA*. La ausencia del gen *mecA* en aislados *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes ha sido descrita (Aziz *et al.* 2014).

El fenotipo de resistencia a la meticilina es mucho más frecuente entre las diferentes especies de *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN), que en *S. aureus*. Esta resistencia se debe principalmente a la adquisición del gen *mecA* que codifica la proteína fijadora de penicilina (PBP) PBP2a, que posee baja afinidad por los betalactámicos. La resistencia a la meticilina implica resistencia a todos los betalactámicos, incluyendo penicilinas, combinaciones de

betalactámico con inhibidor de betalactamasa, cefalosporinas, monobactamas y carbapenémicos. La expresión fenotípica de la resistencia mediada por el gen *mecA* es compleja y se afecta por diferentes factores como la temperatura, el pH, la osmolaridad, la presencia de secuencias cromosómicas reguladoras y de otros genes cromosómicos no relacionados. Estos cambios en la expresión de la resistencia bajo diferentes condiciones de cultivo son transitorios y fenotípicos (Ardanuy *et al.*, 2011).

La expresión fenotípica de la meticilino resistencia suele ser heterogénea, lo que significa que, a pesar que todas las células de una población poseen el gen, sólo algunas lo manifiestan en su fenotipo, haciendo difícil su detección en el laboratorio por los métodos no genotípicos (Ardanuy *et al.*, 2011). La región que rodea a *mecA* en SARM es muy variable “hipervariable”, evento relacionados a la presencia de elementos móviles variables asociados con la región *mecA* (Huygens *et al.*, 2002).

El descubrimiento de SARM que lleva el gen *mecC* ha causado especulaciones sobre el origen, la epidemiología y el impacto de estos aislados. La mayoría de los aislados se encontraron en los últimos años y ha habido un aumento en el número y la frecuencia. La identificación del gen *mecC* no se ha practicado sistemáticamente para el SARM que sea negativo para *mecA*, lo que significa que la prevalencia real del SARM que porta *mecC* puede subestimarse. Registros indican que el SARM portador de *mecC* puede estar más ampliamente distribuido, pero aún no reconocido. La caracterización inicial de las cepas MRSA que transportan *mecC* mostró que, en general, eran susceptibles a la mayoría de las otras clases de antibióticos. Se observaron eventos de transmisión en el hogar en cinco casos, lo que indica que los SARM que transportan *mecC* están bien adaptados como colonizadores humanos, evidencia sugiere la transmisión y el desarrollo de bacteremia e infección de la piel en humanos. Los rumiantes (vacas lecheras y ovinos) son portadores sanos SARM *mecC* positivo (una nueva zoonosis). Las infecciones que podría causar por la portación de cepas *mecC* positivas serían las mismas que se presentan en las causadas por otros *S. aureus*, incluidas las enfermedades que amenazan la vida como la bacteremia (Petersen *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

1. Todo el personal analizado es portador nasal de *Staphylococcus* spp. coagulasa negativa y positiva, con escasa presencia de *S. aureus*.
2. El 51% del personal de la RAV se encuentra colonizado a nivel nasal con cepas de *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes.
3. Las cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas presentaron variados perfiles de resistencia y multiresistencia frente a los antibióticos de uso en medicina Humana y Veterinaria.
4. Las cepas de *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes analizadas presentan un nivel de resistencia bajo a la oxacilina.
5. La mayoría de las cepas de *Staphylococcus* spp. meticilino resistentes albergan el gen *mecA*.

BIBLIOGRAFÍA

1. ARDANUY, C.; CERCENADO, E.; MOROSI, M.; TORRES, C. 2011. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Madrid: La Sociedad. 39: 1-41.
2. AZIZ, H. W.; AL-DULAIMI, T. H.; AL-MARZOQI, A. H.; AHMED, N. K. 2014. Phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates: Detection of (*mecA* and *femA*) gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Natural Sciences Research*. 4(1): 112–118.
3. BOOST, M. V.; O'DONOGHUE, M. M.; JAMES, A. 2008. Prevalence of *Staphylococcus aureus* carriage among dogs and their owners. *Epidemiology & Infection*. 136(7): 953-964.
4. BOYCE, J. M. 1996. Preventing staphylococcal infections by eradicating nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: proceeding with caution. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 17(12). 775-779.
5. BROWN, A. G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J. D.; READING, C.; ROLINSON, G. N. 1976. Naturally-occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. *The Journal of Antibiotics*. 29(6): 668-669.
6. CAIN, C. L. 2013. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus* in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 43(1): 19-40.
7. CARMONA, E.; SANDOVAL, S.; GARCÍA, C. 2012. Frecuencia y susceptibilidad antibiótica del *Staphylococcus aureus* proveniente de hisopados nasales en una población urbano marginal de Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 29(2): 206-211.
8. CASTELLANO GONZÁLEZ, M. J.; BERMÚDEZ NAVARRO, E. J.; PEROZO MENA, A.; CAMACHO MOLINA, L. M.; HARRIS SOCORRO, B. C.; GINESTRE PÉREZ, M. M. 2005. *Staphylococcus aureus*: estado de portador en personal de enfermería y patrones de susceptibilidad

- antimicrobiana. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 25(2): 1-12.
9. CERVANTES-GARCÍA, E.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R.; SALAZAR-SCHETTINO, P. M. 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio. 61(1): 28-40.
 10. CFSPH. THE CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH. 2011. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). [en línea] <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/mrsa-es.pdf>> [Consultado: 14.01.2018]. 2006: 1-27.
 11. CHAMBERS, H. F. 1997. Methicillin resistance in *Staphylococcus*: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clinical Microbiology Reviews. 10(4): 781-791.
 12. CHANS, G. R. 2007. *Staphylococcus*. [en línea] <<http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2017.pdf>> [Consultado: 3.06.2017]. 17: 1-12
 13. CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI Documento m100-s25.
 14. CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA. 2008. Manual de Normas de Bioseguridad. 2ª ed. Gobierno de Chile. Santiago, Chile. 139pp.
 15. DA COSTA R.; VÁSQUEZ V.; NÚÑEZ A.; GALARCE N.; BORIE C. 2017. Resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas desde médicos veterinarios de un hospital veterinario docente. Poster presentado a las XIII Jornadas Científicas 2017-Instituto de Salud Pública de Chile, Santiago, Chile.
 16. DASHTI, A. A.; JADAON, M. M.; ABDULSAMAD, A. M.; DASHTI, H. M. 2009. Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. Kuwait Medical Journal. 41(2): 117-122.
 17. DE LENCASTRE, H.; DE JONGE, B. L.; MATTHEWS, P. R.; TOMASZ, A. 1994. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 33(1): 7-24.

18. DENAMIEL, G.; PUIGDEVALL, T.; MÁS, J.; ALBARELLOS, G.; GENTILINI, E. 2009. Prevalencia y perfil de resistencia a betalactámicos en estafilococos de perros y gatos. *Investigación Veterinaria*. 11(2): 117-122.
19. DROUGKA, E.; FOKA, A.; KOUTINAS, C. K.; JELASTOPULU, E.; GIORMEZIS, N.; FARMAKI, O.; SPILIOPOULOU, I. 2016. Interspecies spread of *Staphylococcus aureus* clones among companion animals and human close contacts in a veterinary teaching hospital. A cross-sectional study in Greece. *Preventive Veterinary Medicine*. 126(2016): 190-198.
20. ELHASSAN, M. M.; OZBAK, H. A.; HEMEG, H. A.; ELMEKKI, M. A.; AHMED, L. M. 2015. Absence of the *mecA* gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from different clinical specimens in shendi city, Sudan. *BioMed Research International*. 2015 (2015): 5p.
21. EVANS, C. A.; SMITH, W. M.; JOHNSTON, E. A.; GIBLETT, E. R. 1950. Bacterial flora of the normal human skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 15(4): 305-324.
22. FASOLA E. L.; PETERSON L. R.; WEINSTEIN R. S.; GRAHAM A. R. 1992. Laboratory detection and evaluation of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infections. *Advances in Pathology*. 5: 285-306.
23. FIGUEROA, G.; NAVARRETE, P.; CARO, M.; TRONCOSO, M.; FAÚNDEZ, G. 2002. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. *Revista Médica de Chile*. 130(8): 859-864.
24. GALARCE, N.; MUÑOZ, L.; JARA, M. A.; LUBÍ, P.; SEPÚLVEDA, A.; ANTICEVIC, S. 2016. Detección del gen *mecA* en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positiva aisladas desde gatos. *Revista Chilena de Infectología*. 33(4): 410-418.
25. GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; COSTILOW, R. N.; NESTER, E. W., WOOD, W. A.; KRIEG, N. R.; PHILLIPS, G. B. 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*. 1st ed. American Society for Microbiology. 524p.

26. GIL M. 2000. *Staphylococcus aureus*: microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a la meticilina. Revista Chilena de Infectología. 17(2): 145-152.
27. GILL, S. R.; FOUTS, D. E.; ARCHER, G. L.; MONGODIN, E. F.; DEBOY, R. T.; RAVEL, J.; DODSON, R. J. 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. Journal of Bacteriology. 187(7): 2426-2438.
28. GONZÁLEZ, M. C.; MENA, A. P. 2010. Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. Kasmera, 38(1): 18-35.
29. GONZÁLEZ, V. S.; DELGADILLO, A. A. 2002. Flora cutánea como protección y barrera de la piel normal. Revista del Centro Dermatológico Pascua. 11(1): 18-21.
30. GRAHAM, P. L.; LIN, S. X.; LARSON, E. L. 2006. A US Population-Based Survey of *Staphylococcus aureus* Colonization Epidemiology of *S. aureus*. Annals of Internal Medicine. 144(5): 318-325.
31. GREMA, H. A.; GEIDAM, Y. A.; GADZAMA, G. B.; AMEH, J. A.; SULEIMAN, A. 2015. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a review. Advances in Animal and Veterinary Sciences. 3(2): 79-98.
32. HANSELMAN, B. A.; KRUTH, S. A.; ROUSSEAU, J.; LOW, D. E.; WILLEY, B. M.; MCGEER, A.; WEESE, J. S. 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel. Emerging Infectious Diseases. 12(12): 1933.
33. HANSEN, A. M.; ERICSON SOLLID, J. U. 2006. SCCmec in *Staphylococcus*: genes on the move. Pathogens and Disease. 46(1): 8-20.
34. HUYGENS, F.; NIMMO, G. R.; SCHOONEVELDT, J.; MUNCKHOF, W. J.; GIFFARD, P. M. 2002. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by assaying for the presence of variable elements associated with *mecA*. Journal of Clinical Microbiology, 40(8): 3093-3097.

35. ISHIIHARA, K.; SAITO M.; SHIMOKUBO, N.; MURAMATSU, Y.; MAETANI, S.; TAMURA, Y. 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among veterinary staff and dogs in private veterinary clinics in Hokkaido, Japan. *Microbiology and Immunology*. 58(3): 149-154.
36. ISHIIHARA, K.; SHIMOKUBO, N.; SAKAGAMI, A.; UENO, H.; MURAMATSU, Y.; KADOSAWA, T.; TAMURA, Y. 2010. Occurrence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in an academic veterinary hospital. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(15): 5165-5174.
37. JAPONI, A.; ALBORZI, A.; ORAFA, F.; RASOULI, M.; FARSHAD, S. 2004. Distribution patterns of methicillin resistance genes (*mecA*) in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. *Iranian Biomedical Journal*. 8(4): 173-178.
38. KANAFANI, Z. A.; FOWLER, V. G. 2006. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 24(3): 182-193.
39. KUMAR, D.; CAWLEY, J. J.; IRIZARRY-ALVARADO, J. M.; ALVAREZ, A.; ALVAREZ, S. 2007. Case of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* endocarditis and metastatic infection in an immune compromised host. *Transplant Infectious Disease*. 9(4): 336-338.
40. KURODA, M.; YAMASHITA, A.; HIRAKAWA, H.; KUMANO, M.; MORIKAWA, K.; HIGASHIDE, M.; KUHARA, S. 2005. Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(37): 13272-13277.
41. LASPINA, F.; SAMUDIO, M.; SOSA, S. I. I. I.; CENTURIÓN, M. G.; APUD, E.; ESPINOLA, C.; RODRIGUEZ, H. 2008. Resistance profile of *Staphylococcus* spp. isolated from hemocultures in the Hospital Central of the Instituto de Prevision Social. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*. 6(2): 18-24.

42. LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAIDI, A. K.; WERTHEIM, H. F.; SUMPRADIT, N.; GREKO, C. 2013. Antibiotic resistance the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*. 13(12): 1057-1098.
43. LIVERMORE, D. M. 2000. Quinupristin/dalfopristin and linezolid: where, when, which and whether to use?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46(3): 347-350.
44. LÓPEZ, N.; PUIG, C. O.; NOTARIO, R.; GAMBANDÉ, T.; LUCIANO, M. I.; BORDA, N. 2014. Portación nasal de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes en poblaciones de la comunidad. *Revista Médica de Rosario*. 80: 59-62
45. LOWY, F. D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*. 111(9): 1265-1273.
46. LOZANO, D.; DÍAZ, L.; ECHEVERRY, M.; PINEDA, S.; MÁTTAR, S. 2010. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) positivos para PVL aislados en individuos sanos de Montería-Córdoba. *Universitas Scientiarum*. 15(2): 159-165.
47. MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; PATERSON, D. L. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 18(3): 268-281.
48. MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. A.; SÁNCHEZ-VILLEGAS, A.; FAULÍN-FAJARDO, F. 2006. *Bioestadística Amigable*. Segunda Edición. Ediciones Díaz de Santos, España. 919pp.
49. MORRIS, D. O.; BOSTON, R. C.; O'SHEA, K.; RANKIN, S. C. 2010. The prevalence of carriage of meticillin-resistant staphylococci by veterinary dermatology practice staff and their respective pets. *Veterinary Dermatology*. 21(4): 400-407.
50. MUNCKHOF, W. J.; NIMMO, G. R.; SCHOONEVELDT, J. M.; SCHLEBUSCH, S.; STEPHENS, A. J.; WILLIAMS, G.; GIFFARD, P.

2009. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*, including community-associated methicillin-resistant strains, in Queensland adults. *Clinical Microbiology and Infection*. 15(2): 149-155.
51. MUÑOZ, L.; MOLINA, M.; HERESMANN, M.; ABUSLEME, F.; ULLOA, M. T.; BORIE, C.; ANTICEVIC, S. 2012. Primer reporte de aislamiento de *Staphylococcus schleiferi* subespecie coagulans en perros con pioderma y otitis externa en Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 44(3): 261-265.
52. NÚÑEZ A.; DA COSTA R.; GALARCE N.; BORIE C.; ANTICEVIC, S. 2017. Resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus coagulasa* positiva aisladas desde piel de perros sanos y con pioderma. Poster presentado a las XIII Jornadas Científicas 2017-Instituto de Salud Pública de Chile, Santiago, Chile.
53. OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2006. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. 3ª ed. World Health Organization. 202p.
54. OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2017. Lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. [en línea] <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>> [Consultado: 14.01.2018]. p 1.
55. OTTH, L.; WILSON SCH, M.; BUSTAMANTE, N.; FERNÁNDEZ, H.; OTTH, C. 2008. Susceptibilidad antimicrobiana y patrones de resistencia de *Staphylococcus aureus* aislados de pacientes y portadores en la ciudad de Valdivia, Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 25(3): 175-178.
56. PALAVECINO, R. 2002. Métodos recomendados para el estudio de susceptibilidad en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa* negativa y *Staphylococcus saprophyticus*: Nuevos puntos de corte e interpretación de resultados. *Revista Chilena de Infectología*. 19:119-124.
57. PETERSEN, A.; STEGGER, M.; HELTBERG, O.; CHRISTENSEN, J.; ZEUTHEN, A.; KNUDSEN, LK; SKOV, R. 2013. La epidemiología del *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina que porta el nuevo gen

- mecC* en Dinamarca corrobora un reservorio zoonótico con transmisión a humanos. *Microbiología Clínica e Infección*. 19(1): 1-7.
58. PRIETO, J.; GOMEZ, M. 1996. Género *Staphylococcus*. *Microbiología Médica*. Ed Doyma. 179-191pp.
59. RUPP, M. E.; FEY, P. D. 2014. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Elsevier Inc. 2(5): 2272-2282.
60. SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K. 2007. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(9): 2770-2778.
61. SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; HIRAMATSU, K. 2010. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(3): 765-769.
62. STENEHJEM, E.; RIMLAND, D. 2013. MRSA nasal colonization burden and risk of MRSA infection. *American Journal of Infection Control*. 41(5): 405-410.
63. VANDENBERGH, M. F.; YZERMAN, E. P.; VAN BELKUM, A.; BOELENS, H. A.; SIJMONS, M.; VERBRUGH, H. A. 1999. Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(10): 3133-3140.
64. VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. *Salud Pública de México*. 47(5): 381-387.
65. VON EIFF, C.; BECKER, K.; MACHKA, K.; STAMMER, H.; PETERS, G. 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *New England Journal of Medicine*. 344(1): 11-16.
66. WALTHER, B.; HERMES, J.; CUNY, C.; WIELER, L. H.; VINCZE, S.; ELNAGA, Y. A.; JANSEN, A. 2012. Sharing more than friendship-nasal

- colonization with coagulase-positive staphylococci (CPS) and co-habitation aspects of dogs and their owners. *PloS One*. 7(4): e35197.
67. WALTHER, B.; WIELER, L. H.; FRIEDRICH, A. W.; HANSEN, A. M.; KOHN, B.; BRUNNBERG, L.; LÜBKE-BECKER, A. 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. *Veterinary Microbiology*. 127(1): 171-178.
68. WEESE, J. S.; ROUSSEAU, J.; WILLEY, B. M.; ARCHAMBAULT, M.; MCGEER, A.; LOW, D. E. 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses at a veterinary teaching hospital: frequency, characterization, and association with clinical disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 20(1): 182-186.
69. ZAHER, A.; AL-THAWADI, S.; CIMOLAI, N. 1997. Beta-lactamase negative, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lacking the *mecA* gene determinant. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 39(1): 108-109.
70. ZENDEJAS-MANZO, G. S.; AVALOS-FLORES, H.; SOTO-PADILLA, M. Y. 2014. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*. 25(3): 129-143.

Anexo 1



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

MAGISTER EN CIENCIAS ANIMALES Y

VETERINARIAS

Documento de Consentimiento Informado para Personal asociado a Clínica Menor de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias Universidad de Chile.

**Documento de Consentimiento Informado para Personal asociado a
Clínica Menor de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Universidad de Chile.**

Este formulario de consentimiento informado es para el personal que trabaja en la Red de Atención Veterinaria de FAVET Chile en las distintas sedes (Bilbao, Hospital Docente FAVET, El Roble) y a quienes les pediremos que participen en la investigación del **Proyecto de Tesis titulado** “Portación nasal de cepas de *Staphylococcus* meticilino resistentes en personal de la Red de Atención Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile” del candidato a magister, **Romay Coragem da Costa**, programa de Magister en Ciencias Animales y Veterinarias de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET) de la Universidad de Chile. Este documento tiene dos partes:

I. Información sobre el estudio

II. Formulario para obtener la firma.

PARTE I:

Estamos investigando la portación nasal de cepas de *Staphylococcus* meticilino resistentes en personas que trabajan en clínica menor de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile ya que el género *Staphylococcus* está constituido por bacterias que a menudo se encuentran como flora residente o transitoria en la piel, especialmente en las fosas nasales de personas y perros. Sin embargo, pueden causar enfermedades que van desde una simple infección a infecciones más graves como una septicemia, lo que demuestra su potencial impacto clínico en medicina humana y en medicina veterinaria mientras que, su transmisibilidad demuestra su potencial impacto en salud pública. En nuestros trabajos previos hemos observado cepas de *Staphylococcus* meticilino resistentes en gatos, perros y como hallazgo en algunos médicos veterinarios. Este proyecto tiene como **Objetivo general** “Establecer la presencia de cepas de *Staphylococcus* meticilino resistentes en la nariz del personal asociado a clínicas de pequeños animales”. Para ello, se realizará un estudio transversal con cepas de *Staphylococcus* spp obtenidas desde muestras nasales del personal que atiende en la Red de Atención Veterinaria (RAV) de la Universidad de Chile: Sede Bilbao, Sede Hospital Docente Favet y Sede El Roble. La obtención de las muestras se realizará durante el período comprendido entre Julio y Agosto de 2017. Este estudio cuenta con el apoyo de la Directora de la RAV, Doctora Alicia Valdés.

Criterios de Inclusión:

- Médico veterinario y enfermeros.
- Que trabaje en contacto con perros y gatos con antigüedad de tres meses.
- Estar sin tratamiento antimicrobiano tópico o sistémico por al menos dos semanas (14 días) antes de la obtención de muestra.
- No presentar lesión nasal macroscópica que haga sospechar de una patología viral, bacteriana o micótica.

Obtención de muestras

Por consideraciones éticas, las muestras de torulado nasal serán obtenidas por los mismos profesionales de acuerdo a un protocolo general utilizado anteriormente (Anexo 2). Consistirá en un hisopado de una fosa nasal, mediante la introducción de un hisopo estéril humedecido en solución salina fisiológica estéril al interior de una fosa nasal (aproximadamente dos centímetros). Para ello se deberá girar la tórula lenta y suavemente contra la mucosa nasal en 360°, tres veces y luego, se depositará en el medio de transporte Stuart (Oxoid®). Las muestras serán transportadas en refrigeración por el investigador, hasta el laboratorio para su procesamiento.

Selección de Participantes

Le estamos invitando a tomar parte de esta investigación porque es importante tener información sobre la portación nasal de cepas de *Staphylococcus* meticilino resistentes en personas asociadas al trabajo en clínica menor ya que están en contacto estrecho con los perros y gatos. El estudio se basó en: a) Elevada portación de cepas meticilino resistente en perros sanos y gatos, b) Que *Staphylococcus* spp se pueden transmitir bidireccionalmente entre humanos y animales.

Descripción del Proceso

Las muestras biológicas obtenidas durante este procedimiento de investigación se usarán sólo para este estudio, y serán destruidas después que la investigación se haya completado. El estudio dura 6 (seis) meses en total pero, la obtención de muestras se concentrará en dos meses. Durante ese tiempo, nos gustaría encontrarnos con usted para la obtención de sus muestras.

Confidencialidad

La información que recolectamos para este proyecto de investigación se mantendrá confidencial, y solo los investigadores podrán verla pero, sin

conocer la identidad de las personas a excepción del investigador Dr. Romay Coragem da Costa y mi profesora tutora, Dra. Consuelo Borie.

El conocimiento que obtendremos de este estudio se publicará en una revista científica con orientación a la salud pública.

Derecho a negarse a participar y a retirarse

Usted no tiene que aceptar participar de esta investigación si no desea hacerlo. Si usted tiene algunas preguntas puede hacerlas ahora e incluso después de que haya comenzado el estudio a las siguientes personas: [Romay Coragem da Costa / romaycoragem@gmail.com], [Consuelo Borie P. / cborie@uchile.cl / Fono: 229785626]

PARTE II:

Consentimiento Informado

He sido invitado para participar en una investigación sobre “Portación nasal de cepas de *Staphylococcus* meticilino resistentes en personal de la Red de Atención Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile”. Entiendo que ello significa que tendré que entregar una muestra de hisopado nasal. Soy consciente de que no hay beneficio personal para mí y que no seré compensado. Se me ha proporcionado el nombre de dos investigadores que pueden ser contactados fácilmente por mail o teléfono.

He leído o me ha sido leída la información respecto al proyecto. He tenido la oportunidad de preguntar dudas sobre ello y se me ha respondido satisfactoriamente. Consiento voluntariamente a participar en este estudio y entiendo que tengo el derecho de retirarme en cualquier momento.

Nombre del Participante:

Firma del Participante:

Fecha:/...../..... (Día/mes/año)

Anexo 2

Nombre:

Edad:

Sexo: F / M

Tiene alguna enfermedad dérmica: Sí / No

Tiene mascota: Sí / No Cuantas:

Perro / Gato / Otros

Anexo 3

Protocolo Obtención de Muestras para Aislamiento de Cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivo

- ✚ **Nariz:** Introducir el hisopo estéril humedecido en solución salina fisiológica al interior de la fosa nasal derecha (aproximadamente dos cm), girar lenta y suavemente contra la mucosa nasal en 360° tres veces (Fig. 1).



Fig.1 Toma de muestra de nariz