



**“Estudio preliminar sobre la presencia y
características fenotípicas de resistencia
a los antibióticos de las cepas de
Staphylococcus aureus aisladas en una
población de équidos y en las personas
relacionadas con ellos”**

Salvador Oliver Ferrando

Memoria Proyecto Fin de Máster

Directora: M^a Carmen Simón Valencia

Máster de Iniciación a la Investigación en Ciencias Veterinarias

Curso 2011-2012

Agradecimientos

A M^a Carmen Simón, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto tan interesante y por su gran ayuda en la elaboración de este trabajo. A Jesús, Carmelo y Marta por su inestimable colaboración en las tareas de laboratorio. Y por último, a mis compañeros del hospital, por su participación en la recogida de muestras de este experimento.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN	
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> . Características intrínsecas.....	6
2.1.1. Importancia Clínica.....	7
2.1.2. Factores de Virulencia de <i>S. aureus</i>	8
2.1.3. Resistencia a los antibióticos de <i>S. aureus</i>	10
2.1.4. Base bioquímica del desarrollo de la resistencia a los antibióticos.....	11
2.1.4.a. La resistencia a los antibióticos β -lactámicos	11
2.1.4.b. La resistencia a los Macrólidos, Lincosamidas, Streptogramina _B y Ketólidos.....	13
2.1.4.c. La resistencia a los Glicopéptidos.....	13
2.1.4.d. La resistencia a los Antibióticos Esteroidales: Ác. Fusídico	14
2.1.4.e. La resistencia a las Tetraciclinas.....	14
2.1.4.f. La resistencia a los Aminoglicósidos.....	15
2.1.4.g. La resistencia a las Fluoroquinolonas	15
2.2. Importancia de los SARM en la especie humana	16
2.3. Modos de adquisición de la infección por SARM: HA-MRSA/ HCA-MRSA/ CA-MRSA/ LA-MRSA	18
2.4. El estado de portador de <i>S. aureus</i>	19
2.5. Implicaciones zoonóticas.....	20
2.6. Infección/ colonización con SARM en caballos	22
2.6.1. Infección por <i>S. aureus</i> y SARM.	22
2.6.2. Los factores de riesgo para la colonización y la infección con SARM en caballos.....	25
2.6.3. Riesgo de transmisión de SARM por contacto entre personas y caballos.....	26

3. OBJETIVOS	28
4. MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1. Aislamiento e identificación de <i>S. aureus</i>	29
4.1.1. Individuos participantes en el estudio.....	29
4.1.1.a. Personas	29
4.1.1.b. Équidos	29
4.1.2. Recogida de muestras	29
4.1.3. Aislamiento de <i>S. aureus</i> a partir de las muestras recogidas.....	30
4.1.3.a. Aislamiento de <i>S. aureus</i> a partir de muestras de Lesión	30
4.1.3.b. Aislamiento de <i>S. aureus</i> a partir de muestras de Fosas nasales y Espacios interdigitales	30
4.1.4. Identificación de las cepas de <i>S. aureus</i>	31
4.1.5. Resumen de la Identificación de <i>S. aureus</i>	33
4.2. Fenotipo de resistencia a los antibióticos.	34
4.2.1. Detección de cepas Meticilin-Resistentes de <i>S. aureus</i> (SARM/MRSA)	34
4.2.2. Test de Sensibilidad a otros antibióticos de importancia clínica	34
4.2.3. Mínima Dosis Inhibitoria	35
4.3. Análisis observacional.....	37
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1. Cepas de <i>S. aureus</i> aisladas.....	38
5.2. Frecuencia de aislamientos de <i>S. aureus</i> en la población de équidos y personas del estudio	39
5.3. Razas de los équidos del estudio de los que se aisló <i>S. aureus</i>	42
5.4. Género de las personas y équidos del estudio en los que se aisló <i>S. aureus</i>	43
5.5. Edad de las personas y équidos del estudio y relación con las cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de ellos	44

5.6. Hipótesis sobre el posible origen de las cepas de <i>S. aureus</i> aisladas en este estudio	45
5.7. Fenotipo de resistencia de las cepas de <i>S. aureus</i> aisladas.....	48
5.7.1. Fenotipo de resistencia de la cepa C1	48
5.7.2. Resistencia a β-lactámicos del resto de cepas aisladas	51
5.7.3. Inducción de la resistencia a la Clindamicina por medio de la Eritromicina.....	51
5.7.4. Resistencia a Glicopéptidos	52
5.7.5. Resistencia al Ácido Fusídico.....	52
5.7.6. Resistencia a las Tetraciclinas.....	52
5.7.7. Resistencia a Aminoglicósidos.....	53
5.7.8. Resistencia a Fluoroquinolonas.....	53
5.7.9. Patrón fenotípico de resistencia a los antibióticos de las cepas aisladas	53
6. RECOMENDACIONES DERIVADAS DEL ESTUDIO	55
7. CONCLUSIONES	57
8. BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXO	73

1. RESUMEN

La infección por *Staphylococcus aureus*, y en particular si se trata de cepas resistentes a la Meticilina, puede ser un riesgo para la salud humana y para los animales domésticos, incluidos los équidos. Diversos estudios observan que la transmisión de estas cepas puede ocurrir en todos los sentidos entre estas especies, y se hace necesario determinar la presencia de cepas resistentes a Meticilina en ambientes animales y humanos, con la finalidad de aplicar medidas de control de su difusión.

En este estudio se ha pretendido detectar la presencia y las características fenotípicas de resistencia a los antibióticos de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en 35 équidos y 35 personas relacionadas con ellos. Paralelamente, se investigó la presencia de *Staphylococcus* del grupo *intermedius* que también han adquirido importancia en Salud Pública y Veterinaria.

Se recogieron datos de las características de las personas participantes en el estudio (edad, presencia de animales en el hogar, tratamiento antibiótico recibido, contacto con ambientes hospitalarios, etc.) y de los équidos con los que estaban relacionadas (edad, raza, tratamientos recibidos, alojamiento, contacto con otros animales, procedencia hospitalaria o comunitaria, etc.).

Mediante hisopos estériles se recogieron muestras, de fosas nasales y lesiones (en équidos enfermos) y de fosas nasales y espacios interdigitales en el caso de las personas.

Tras el cultivo de las muestras en el laboratorio, se aislaron e identificaron 12 cepas de *S. aureus* (7 en caballos y 5 en personas) y ninguna del grupo *S. intermedius*. La mayoría de las cepas estaban relacionadas con el ámbito hospitalario y se aislaron a partir de fosas nasales. La determinación de la resistencia a los antibióticos, se realizó mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer, frente a un grupo de antibióticos de importancia clínica en Medicina Humana y Animal. La resistencia a β-lactámicos y Glicopéptidos se ha corroborado mediante la prueba de la Mínima Dosis Inhibitoria. De este modo, se detectó la presencia de una cepa resistente a la Meticilina (SARM), a partir de la supuración de la incisión realizada en la cirugía (laringoplastia) de un caballo, de la que se sospecha un origen humano (“Humanosis”). En estudios posteriores se determinará el origen y el patrón genético de las cepas de *S. aureus* aisladas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. *Staphylococcus aureus*. Características intrínsecas

Staphylococcus aureus fue descubierto en 1880 por el cirujano Sir Alexander Ogston en Aberdeen (Escocia), que sistemáticamente observaba al microscopio las preparaciones de pus de la supuración y los abscesos de la herida postoperatoria y vió unos agrupamientos de bacterias en formas de racimo de uvas, que los llamó “*Staphylococcus*” por la expresión griega “*staphyle*” (racimo de uvas).

Rosenbach, en 1884, lo aisló a partir de abscesos y lo llamó “*aureus*” por el color amarillo-anaranjado o dorado de sus colonias. Posteriormente, *S. aureus* ha demostrado ser uno de los principales agentes patógenos humanos, capaz de producir una amplia gama de infecciones leves en la piel, así como graves procesos que pueden conducir a la muerte.

Es la especie más patógena de las más de 30 especies que forman parte del género *Staphylococcus*. Su patogenicidad se puede expresar a pesar de que el Sistema Inmune del individuo infectado funcione normalmente o sus defensas locales se encuentren intactas (van Belkum and Melles, 2005).

Los Estafilococos son bacterias Gram positivas de forma redondeada (“Cocos”) de aproximadamente 1,5 µm de diámetro. Crecen bien en medios sintéticos en aerobiosis a 35-37°C dando lugar a colonias de 1 a 3 mm de diámetro, generalmente blancas o ligeramente coloreadas.

Hay cierta discrepancia en cuanto al número de especies y subespecies que forman parte de este género, indicando de 30 a 44, según los autores. Las características morfológicas son similares entre *Staphylococcus* y *Micrococcus*, que se diferencian fenotípicamente por la pigmentación de las colonias, la oxidación de la glucosa, la producción de ácido a partir del glicerol y los test de sensibilidad a la lysostatina y lisozima. Además es posible diferenciarlos por el porcentaje de Guanina y Citosina de su ADN, que en los estafilococos es baja (30 al 39%) y en los micrococos es alta (68 al 74%). Las técnicas de biología molecular han demostrado las diferencias entre los ADNs y el ARN ribosomal 16S de estos dos géneros.

Los *Staphylococcus* desde el punto de vista genómico se han agrupado en cinco grupos: *S. intermedius*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. sciuri*, *S. hyicus*, que contienen especies típicas humanas y de los animales. Todavía sin agrupar quedan 8 especies, entre las que se encuentran *S. aureus*, y nuevas especies descubiertas recientemente y que no están bien definidas (van Belkum et al., 2009; Bes et al., 2002).

2.1.1. Importancia Clínica

Dentro de las especies de interés médico humano, *S. aureus* es la más importante, pero también se consideran *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* y *S. warneri*. Otras especies emergentes son *S. lugdunensis*, *S. scheiferi* y *S. caprae* o *S. intermedius*.

En las especies animales *S. aureus* también juega un papel importante en la patología, tanto en animales de abasto como en los de compañía. Sin embargo, hay numerosas especies que afectan a los animales y cabe destacar el papel de *S. pseudointermedius*, que forma parte de las subespecies del grupo *S. intermedius*.

S. intermedius se describió en 1976 basado en el contenido G+C y en test fenotípicos (Weese and van Duijkeren, 2010) y se ha encontrado en numerosas especies animales domésticas y salvajes. En el año 2005 se diferenciaron las especies e integrantes del grupo basándose en el análisis de la secuencia de rARN del 16S (Devriese et al., 2005). Actualmente, se agrupan como *S. intermedius*, *S. pseudointermedius* y *S. delphini* basados en el análisis de la secuencia nucleótida de los genes *sodA* y *hsp60* (Sasaki et al., 2007). El aislamiento de *S. pseudointermedius* en perros es tan frecuente que se recomienda que todos los *S. intermedius* sean considerados *S. (pseudo)intermedius*, aunque esto solo puede determinarse por sus características genéticas (Devriese et al., 2009) ya que las pruebas bioquímicas no se consideran fiables para diferenciarlos. Al igual que *S. aureus*, se considera agente oportunista, ya que reside habitualmente en la piel y mucosas de los animales y puede ocasionar cuadros dérmicos variados (pioderma, otitis externa, infección de heridas, abscesos, e infección de otras cavidades) (Morris et al., 2006). La prevalencia de esta infección es muy variable entre las especies y la localización geográfica. Se ha demostrado su carácter zoonósico (Hanselman et al., 2007), sobre todos en heridas infectadas, aunque también se ha asociado con bacteriemia, neumonía, infección ótica, úlceras varicosas en la pierna y abscesos cerebrales (Weese and van Duijkeren, 2010), además existen cepas resistentes a la Meticilina cuya prevalencia está aumentando (van Duijkeren et al., 2008). En équidos parece ser poco aislado, mientras que *S. aureus* si que es frecuente en ellos (Vengust et al., 2006; Weese and van Duijkeren, 2010).

Staphylococcus aureus produce una amplia gama de enfermedades graves y de importancia económica en medicina humana y veterinaria (Leonard and Markey, 2008; Safdar and Bradley, 2008). La bacteria coloniza la piel y las mucosas y a partir de ahí puede invadir múltiples órganos.

La sintomatología es muy variada. Las infecciones supurativas superficiales cutáneo-mucosas tales como las foliculitis, forúnculos, impétigo, sinusitis y otitis son las más frecuentes. Estas infecciones se pueden complicar por su difusión hemática o por la extensión regional de la infección siendo responsable de septicemia, pleuroneumonía, endocarditis aguda, afección osteo-articular (osteomielitis) o urinaria, que son las complicaciones nosocomiales más importantes en hospitales, tanto desde el punto de

vista sanitario como económico. Además, puede dar lugar a infecciones no supurativas, de origen toxínico (toxemia estafilocócica), debidas a la difusión de toxinas a partir del foco de infección o a la ingestión de un alimento contaminado que las contenga, estas son el síndrome cutáneo estafilocócico, el shock tóxico estafilocócico (SST) (Morgan, 2008) y las intoxicaciones alimentarias.

En ganadería *S.aureus* es una causa importante de mastitis e infección de tejidos blandos (SSTI) y en menor medida, de infecciones del aparato locomotor. En las infecciones del área de incisión quirúrgica (SSI) *S. aureus* se aísla cada vez más y se ha informado en animales de compañía y caballos (Hermans et al., 2008).

2.1.2. Factores de Virulencia de *S. aureus*

Existen varios factores que explican la frecuencia y gravedad de las infecciones por *S. aureus* como son su carácter ubicuitario, la multirresistencia de determinadas cepas a los antibióticos, sobretodo en el medio hospitalario, así como una disminución de las defensas inmunes de los pacientes afectados. La patogenicidad de *S. aureus* se debe, principalmente a los factores de virulencia, ya que tras la invasión, es capaz de secretar factores de adherencia, toxinas y enzimas (Vincenot et al., 2008).

Al igual que otras bacterias (*Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens* o *Bacillus cereus*), *S. aureus* secreta numerosas toxinas que tienen por objeto deteriorar o neutralizar la respuesta inmune del hospedador infectado. Por otro lado, la degeneración celular que provocan ciertas toxinas puede proporcionarle una base apropiada para su multiplicación. Los determinantes genéticos, ya sean localizados en cromosomas de los bacteriófagos estabilizados, en plásmidos o en secuencias de inserción, parece que se expresan de forma complementaria y organizada y están destinadas a disminuir las defensas del infectado, a menudo, ya debilitado previamente. La bacteria neutraliza la función y la génesis de la respuesta inmune humoral, la respuesta citotóxica y el quimiotactismo de las células polimorfonucleares y desvía la respuesta inflamatoria.

S. aureus es frecuentemente, una bacteria comensal, esto se debe a un sutil equilibrio entre las defensas del hospedador “inmunocompetente” y la capacidad de la bacteria de expresar sus factores de virulencia en función de las condiciones del entorno que determinarán el éxito o la erradicación de la infección (Krishna and Miller, 2011; McCaig et al., 2006).

La colonización por *S. aureus* sucede a partir del microrganismo que se encuentra como comensal en la superficie de la piel y/o mucosas, sin producir signos ni síntomas de infección.

La colonización requiere que *S. aureus* se adhiera a la superficie (Krishna and Miller, 2011) y esto lo puede hacer mediante la Proteína A de unión a la fibronectina (FnbpA),

Proteína B de unión a la fibronectina (FnbpB), las Proteínas de unión al fibrinógeno (ClfA y ClfB), el determinante regulador del hierro de la superficie (IsdA) y el Ácido Teicoico de la pared (WTA). La evasión inmune es también mediada por el IsdA.

Algunas bacterias son capaces de reducir la actividad ciliar en las **fosas nasales**, de modo que una adherencia aumentada y la disminución de la capacidad mucociliar de limpiar la mucosa podría explicar la retención de *S. aureus* en las fosas nasales, pero no su habilidad de crecer hasta densidades elevadas en un entorno que normalmente no sería permisivo. Se sabe que el fluido nasal y, en general, el fluido de las vías aéreas tiene propiedades antimicrobianas (Cole et al., 1999; Travis et al., 1999).

Se ha demostrado que *S. aureus* se encuentra en el área inmediatamente posterior a la epidermis anterior vellosa, sobre un epitelio escamoso húmedo carente de pelo, cilios o microcilios. La resistencia en esa zona depende de la capacidad antimicrobiana intrínseca del fluido nasal y se ha observado que en los portadores de *S. aureus* este fluido tiene alterada la capacidad de destruir a este microorganismo en comparación con un no portador. También se observa que el fluido nasal de los portadores contiene elevadas concentraciones de péptidos tipo 1 a 3 de los neutrófilos (defensinas), indicativo de inflamación mediada por neutrófilos como respuesta del hospedador a la colonización por *S. aureus*. La concentración de la defensina tipo 2 es también elevada.

La **colonización de la piel** (Krishna and Miller, 2011) se previene de forma natural por la baja temperatura y pH de la piel, así como por la baja expresión de los factores de unión como el ClfB y FnbpA por parte de *S. aureus*. Además la flora normal de la piel como *S. epidermidis*, *Propionobacterium acnés* y *Malassezia* spp., ocupan nichos microbianos que previenen la colonización por *S aureus*. Cada uno de estos agentes segregan sustancias que lo impiden. Además los queratinocitos de la capa córnea de la piel producen péptidos que tienen acción bactericida y bacteriostática frente a *S. aureus*.

Los factores de virulencia de *S. aureus* durante la infección cutánea son los que evaden las defensas innatas del hospedador. La α -hemolisina (o α -toxina), las modulinas solubles con fenol (PSMs) y la leucocidina de Panton-Valentine (PVL) tienen la capacidad de lisar células. Además segregan factores que inhiben la función de los neutrófilos tales como la proteína inhibidora de la quimiotaxis de Staphylococci (CHIPS) y la proteína de adherencia extracelular (Eap), además produce el pigmento carotenoide dorado y las enzimas dismutasa superóxido, que inhiben la capacidad de los neutrófilos para destruirlos.

Una vez producida la colonización, la capacidad de producir infección (Krishna and Miller, 2011) se debe a otros factores de virulencia que destruyen a las células inmunes del hospedador e inhiben la captación de neutrófilos y la función antimicrobiana. Son las toxinas formadoras de poros que lisán células, además de la α -toxina y componentes biotóxicos que incluyen la γ -hemolisina, la LPV, la leucocidina E/D y la leucocidina M/F-PV-like. Las infecciones con SARM y SASM tienen las mismas características y gravedad (Van Belkum et al., 2009).

Básicamente, cualquier *S. aureus* portado por una persona en la Comunidad, puede convertirse en un patógeno que amenazará la vida del que lo porta, pero se ha puesto en evidencia que existen unos clones más virulentos que otros. Esto se ha asociado a diferencias del genoma en dominios variable y *core-variable* de genes complementarios. Probablemente, esto define diferencias entre cepas con potencial epidémico y colonizador. Pero se debe definir también la afinidad del hospedador, ya que la habilidad para colonizar de forma persistente es demasiado importante como para dejarlo completamente dependiente de los genes variables. Todavía no hay una explicación biológica clara, pero algunos agrupamientos del gen *egc* se asocian a la “no-invasividad” y menor potencial de producir enfermedad (Ferry et al., 2005).

2.1.3. Resistencia a los antibióticos de *S. aureus*

El tratamiento de infecciones invasivas se basa en los agentes antimicrobianos β-lactámicos-penicilinasa estables, principalmente Isoxazolyl-penicilinas y Cefalosporinas, de suma importancia para la medicina humana.

La OMS reconoce la resistencia a antibióticos como el principal desafío de la sanidad global en el mundo, máxime cuando gran parte de esos microorganismos resistentes son zoonosis o microorganismos comensales que pueden ser compartidos entre personas y animales (EASAC, 2008). El problema empieza a considerarse una alerta global y el programa ARPAC de vigilancia de la resistencia a antimicrobianos de la Unión Europea en la especie humana señala una serie de bacterias resistentes a antibióticos que destacan por su capacidad para producir infecciones atípicas y por su extremada virulencia, entre las que se encuentra *Staphylococcus aureus*, que se considera uno de los “microorganismos de alerta en Medicina Humana”. Es un problema emergente a nivel mundial (Lencastre et al., 2007).

El abordaje del estudio de la resistencia a antimicrobianos se entiende que debe incluir a todos los participantes del desarrollo, mantenimiento y diseminación de la misma, razón por la cual se a promocionado un nuevo concepto global de salud “Un mundo, Una Salud” (“One Health for One World”) que contempla la Medicina Humana y la Salud Pública, la Sanidad Animal y la Salud Ambiental (EASAC, 2008).

Se considera que la principal causa de la resistencia a los antibióticos es el mal uso (ej.: en veterinaria hasta el año 2006 se usaban como promotores de crecimiento) y abuso de los mismos; por otro lado, también depende de la cantidad total de antibióticos administrados, y probablemente, de la falta de una adecuada higiene y saneamiento que favorecen la proliferación y diseminación de los microrganismos resistentes (American Academy of Microbiology, 2009).

En Europa diferentes estudios (EASAC, 2007; ECDC/EMEA, 2009; ECDC, EFSA and EMEA, 2009) concluyen que la resistencia a antibióticos es elevada, tanto en bacterias

Gram (+) como en Gram (-), y está aumentando en estas. Además, dichos estudios encuentran un desfase entre el avance de la Multirresistencia (MDR) y el desarrollo de nuevos antibacterianos. Por otro lado, se calcula que tiene un coste de alrededor de 1,5 millones de euros al año, por la alta morbilidad y mortalidad que produce (25.000 personas murieron por esta causa en el 2007) y costes extrahospitalarios (laborales), aunque se sospecha que estos valores están subestimados.

La infección por *S. aureus* resistente a Meticilina (SARM siglas en español / MRSA siglas en inglés) está considerada el principal problema emergente de tipo “nosocomial” en medicina humana. Pero también se destaca su importancia en poblaciones animales (EFSA, 2009; Weese et al., 2006b).

Además de la resistencia a los β -lactámicos del grupo de las Penicilinas, especialmente a Penicilinas semisintéticas como la Meticilina y la Oxacilina (SARM), en los últimos años se observan cepas multiresistentes (MDR) para grupos de antibióticos como Macrólidos, Aminoglicósidos, Fluoroquinolonas, Tetraciclinas y Lincosamidas que son una alternativa al tratamiento con Clindamicina, Mupirocina o Ácido Fusídico y sobre todo con Vancomicina (Appelbaum, 2007).

La emergencia de SARM resistente a Vancomicina es relativamente reciente y muy preocupante ya que la Vancomicina es el tratamiento alternativo de las cepas SARM en la especie humana. Desde 1996 (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1997) se ha ido informando de cepas con resistencia Intermedia a la Vancomicina (VISA) y resistentes (VRSA) en Europa, Asia y EEUU. Las cepas que muestran resistencia a Teicoplanina, aunque no muestren resistencia a la Vancomicina por el test de difusión en disco, podrían mostrar una resistencia heterogénea a los Glicopéptidos (hGISA), que en ocasiones se han asociado con fallos clínicos al tratamiento con Vancomicina. Estas cepas son difíciles de detectar en laboratorio y para ello se recomienda determinar la Mínima Dosis Inhibitoria (MIC), de la Vancomicina, ya que es una técnica, más precisa (Tenover, 2010).

2.1.4. Base bioquímica del desarrollo de la resistencia a los antibióticos

2.1.4.a. La resistencia a los antibióticos β -lactámicos

La resistencia a los antibióticos β -lactámicos se debe a 2 mecanismos. En 1944, dos años después de la introducción de la Penicilina, se informó del primer *S. aureus* resistente a este antibiótico. Se encontró que la resistencia era producida por una enzima penicilinasa (un tipo de β -lactamasa) que hidroliza el anillo β -lactámico de la Penicilina. En muchas regiones geográficas la resistencia a la Penicilina debida a la producción de β -lactamasa excede el 90%.

Posteriormente, se observó la resistencia frente a la Oxacilina y la Meticilina (Penicilinas semisintéticas), estables a la β -lactamasa estafilocócica. Estos antibióticos

fueron desarrollados específicamente para el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus* productores de β -lactamasa.

Sin embargo, no tardó en aparecer la resistencia a antibióticos del tipo Meticilina por la emergencia del gen *mecA*. Este gen codifica una proteína (PBP2a) que se une a la Penicilina. Esta proteína participa en la síntesis de la pared celular a pesar de la presencia de antibióticos tipo Meticilina. Inicialmente, estas cepas se denominaron *S. aureus* resistente a la Meticilina o SARM, aunque se considera más apropiada la denominación de *S. aureus* resistente a la Oxacilina u ORSA puesto que es la Oxacilina el antibiótico que se suele usar en las pruebas de laboratorio para demostrar la resistencia a las Penicilinas semisintéticas. La denominación SARM se ha hecho muy popular entre la población médica y es raro usar la denominación “ORSA”. Estas cepas se consideran resistentes a todas las Penicilinas penicilinasa-estables tales como Oxacilina, Meticilina, Nafcicina, Cloxacilina, y Dicloxacilina.

Además, todos los SARM son resistentes a todos los demás agentes β -lactámicos. Frecuentemente, también son resistentes a otras clases de antibióticos como los Macrólidos (Eritromicina...), Lincosamidas (Clindamicina...), y Tetraciclinas. También pueden ser resistentes a las Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina, Levofloxacina, Enrofloxacina, Marbofloxacina...) y Aminoglucósidos (Gentamicina, Tobramicina...).

Pueden demostrar resistencia homogénea o heterogénea a la Oxacilina. En las cepas resistentes homogéneas, todas las cepas hijas tienen gen *mecA* y son resistentes a la Oxacilina. En las cepas resistentes heterogéneas, toda la población tiene *mecA* pero muchas no expresan resistencia a la Oxacilina.

Con poca frecuencia el *S. aureus* tiene MICs de Oxacilina que se encuentran cerca del límite de interpretación de resistencia y se conocen como BORSA por sus siglas en inglés (*S. aureus* con resistencia “borderline” a la Oxacilina).

Al contrario de las SARM, estas cepas pueden ser tratadas mediante combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasa (como la Amoxicilina-clavulánico, Ampicilina-sulbactam, Piperacilina tazobactam y Ticarcilina-clavulánico). Estas cepas no portan el gen *mecA*, generalmente, y no tienen resistencia múltiple, ni tampoco crecen en Oxacilina-agar salino. La resistencia la pueden desarrollar por uno de varios mecanismos. Algunas cepas son hiperproductoras de β -lactamasa que inactiva parcialmente a la Oxacilina y otros β -lactámicos. En otras cepas, raras, hay una modificación de PBP 1, 2 y 4 que no ligan la Oxacilina de manera eficiente. Por último, algunas cepas con MICs cercanos al límite de susceptibilidad, en realidad son productoras de *mecA* heteroresistente y generalmente no se les denomina BORSA (Smith and Jarvis, 1999; MacCallum et al., 2010).

2.1.4.b. La resistencia a los Macrólidos, Lincosamidas, Streptogramina_B y Ketólidos.

Los Macrólidos (Eritromicina...), Lincosamidas (Clindamicina...), Streptogramina_B (Quinopristina-dalfopristina) y Ketólidos (Picromicina, Narbomicina...), llamados MLSBK, inhiben la síntesis de proteínas impidiendo el ensamblaje y unión de la partícula ribosomal 50S a la subunidad ribosomal 50S (MacCallum et al., 2010), todos ellos se superponen en el mismo punto de unión, asociado a bases específicas del ARN en el dominio V del 23S rRNA, bloqueando la formación de cadenas de péptidos y/o la traslación. Los Ketólidos, además se unen a una adenina en el dominio II del 23S rRNA, que lo hace más potente frente a Gram positivos.

La resistencia a los MLSB se debe a la metilación o dimetilación del rRNA ribosomal por medio de enzimas metiltransferasas. Esto confiere resistencia cruzada a Macrólidos, Lincosamidas y Streptogramina_B, y también puede extenderse a los Ketólidos. Los genes *erm* poseen el código para la producción de una enzima ARN metilasa que modifica la zona ribosómica de unión de los Macrólidos, Lincosamidas y Streptogramina_B. Las cepas que poseen el gen *ermA*, *ermB* o *ermC* típicamente son resistentes a la Eritromicina, pero aparecen inicialmente como sensibles a la Clindamicina (especialmente las cepas *ermC*). En estos aislamientos la resistencia a la Clindamicina aparece después de la inducción con Eritromicina (Matsuoka et al., 1998).

Un segundo mecanismo de resistencia a la Eritromicina es mediado por el gen *msrA*. Este gen codifica la producción de una bomba de eflujo que expulsa la Eritromicina fuera de la célula. Las cepas *msrA* son susceptibles a Clindamicina pero son resistentes a Eritromicina.

2.1.4.c. La resistencia a los Glicopéptidos

Recientemente se han descrito cepas con reducida sensibilidad a la Vancomicina (MIC 8-16 µg/mL) y completamente resistentes (MIC ≥32 µg/mL). Las primeras cepas se denominan *S. aureus* Vancomicina-intermedio (siglas en inglés, Vancomycin Intermedius *S. aureus* o VISA) o *S. aureus* Glycopéptido-intermedio (siglas en inglés, GISA). El mecanismo de reducida sensibilidad a la Vancomicina no está claro pero en parte se debe a un engrosamiento de la pared celular bacteriana que contiene precursores capaces de ligar la Vancomicina extracelularmente. La mayoría de VISAs son SARM que contienen *mecA*. La mayoría de VISAs se han detectado en pacientes con una historia de uso de Vancomicina e infección por SARM. En todo el mundo solo se ha informado de 50 casos de infección por cepas VISA. Sin embargo, se ha informado de docenas de cepas con MIC de 4 µg/mL que es el límite superior de susceptibilidad. Estas cepas deben ser consideradas potencialmente como VISA y se recomienda repetir la prueba. Las cepas *S. aureus* con resistencia completa a la Vancomicina (VRSA, siglas en inglés) son extremadamente raras (Smith and Jarvis, 1999; MacCallum et al., 2010).

2.1.4.d. La resistencia a los Antibióticos Esteroidales: Ácido Fusídico

En la especie humana, el Ácido Fusídico es un antibiótico que puede ser usado por las vías oral, intravenosa y tópica, y es de gran ayuda terapéutica en los casos de infecciones de la piel y tejidos blandos. Es muy usado en Europa, Australia, Canadá y algunos países de Asia, y resulta muy útil en los casos de osteomielitis aguda y crónica, infección cerebral, artritis séptica e infecciones de prótesis diversas, especialmente si se trata de una cepa SARM. Este antibiótico actúa inhibiendo la elongación de la cadena de polipéptidos uniéndose al factor de elongación ribosomal G del complejo (EF-G)-GDP, y ejerce un papel bacteriostático. La resistencia al Ác. Fusídico se considera asociada a mutaciones en el gen *fusA*, gen que codifica el EF-G, mientras que un bajo nivel de resistencia se considera asociado a los genes *fusB* y *fusC*. (Wang et al., 2012).

2.1.4.e. La resistencia a las Tetraciclinas

Las Tetraciclinas atraviesan la membrana externa de las bacterias a través de porinas por difusión pasiva, llegando al citoplasma gracias a un mecanismo dependiente de energía. En el interior del citoplasma se unen al ribosoma inhibiendo la síntesis de las proteínas. Este efecto se produce evitando la unión del sitio aminoacil del ácido ribonucleico (ARN) de transferencia (aminoacil ARN-transfer) a la subunidad 30S ribosomal. La asociación es reversible, lo cual explicaría su efecto bacteriostático.

La resistencia puede ser natural o adquirida y debida a diferentes mecanismos (Pérez et al., 1998; Rodríguez-Baño et al., 2006). La disminución en la acumulación intracelular de Tetraciclinas por bombeo activo asociado a la membrana (eflujo) puede conferir resistencia a las Tetraciclinas de forma natural o adquirida. Otro mecanismo frecuentemente involucrado en la resistencia adquirida se debe a proteínas de protección ribosomal que permiten activar al aminoacil ARN-transfer en presencia de concentraciones de antibiótico que normalmente inhibirían la síntesis de éstas.

Tanto el bombeo activo como la protección de la inhibición del ribosoma son mecanismos de resistencia que suelen estar relacionados con la adquisición de elementos móviles de resistencia. Existen muchos genes de resistencia a las Tetraciclinas y un gran número de ellos se asocia a los elementos móviles (plásmidos, trasposones o integrones). En los integrones, junto al gen que confiere la resistencia a Tetraciclinas, con frecuencia se encuentran otros genes (*gene cassettes*) que confieren resistencia a otros antibióticos, por lo que estas cepas multirresistentes pueden ser seleccionadas por las Tetraciclinas o por otros antimicrobianos.

Los determinantes genéticos implicados en la resistencia a Tetraciclinas son los genes *tet* y *otr*. En el mecanismo de bombeo activo los genes encontrados pueden ser: *tetA*, *tetB*..., *otrB*, etc. En aquellos con mecanismo de protección de la inhibición del ribosoma podemos encontrar: *tetM*, *tetO*..., *otrA*, etc. El principal mecanismo de

resistencia en *S. aureus*, es la protección ribosomal por las proteínas Tet(M) o Tet(O) “factor-like” de elongación, ésta confiere resistencia a la inhibición de la síntesis de proteínas, promoviendo la liberación del antibiótico desde su sitio inhibitorio en el ribosoma. El otro mecanismo proporciona dicha resistencia por eflujo activo a las proteínas TetK o TetL, codificadas por los genes móviles *Tet* (Levy et al., 1999). Ambos mecanismos pueden ser inducidos por bajas concentraciones de Tetraciclina (Trzcinski et al., 2000; Connell et al., 2003).

2.1.4.f. La resistencia a los Aminoglicósidos

Estos antibióticos de amplio espectro (McCallum et al., 2010), aumentan el ratio de error de la síntesis de proteínas en el ribosoma, provocando errores en la lectura y/o dificultando el paso de translocación. El resultado es la alteración de la pared de la bacteria por la incorporación de proteínas defectuosas. En una segunda fase, esto favorecerá el aumento de la entrada del antibiótico en la bacteria (Vakulenko and Mobashery, 2003). Todos los Aminoglicósidos se unen selectivamente a la subunidad ribosomal 30S, pero las interacciones de cada uno de ellos es diferente. La resistencia a estos antibióticos ocurre, principalmente, por modificación enzimática por O-fosforilación, N-acetilación u O-nucleotidilación, catalizadas por fosfotransferasas, acetiltransferasas o nucleotidiltransferasas, conocidas como Enzimas modificadoras de Aminoglicósidos (siglas en inglés AME). Están codificadas por diferentes genes localizados en transposones u otros elementos móviles, lo que favorece su amplia diseminación entre las bacterias Gram positivas y negativas.

2.1.4.g. La resistencia a las Fluoroquinolonas

Las Fluoroquinolonas tienen como “blanco”, en *S. aureus*, a la topoisomerasa IV (*grlA*, *grlB*) que es una enzima esencial necesaria para la decatenación o interunión de cromosomas. Además una girasa relacionada (*gyrA*, *gyrB*) altera el ADN dificultando la replicación (McCallun et al., 2010).

En bajas concentraciones las Fluoroquinolonas son mutagénicas y aumentan el ratio de mutación bacteriana que actúa en el sistema de reparación SOS del ADN. Es importante el hecho de que concentraciones subinhibidoras de Fluoroquinolonas aumentan la resistencia a β-lactámicos (Tattevin et al., 2009). El principal modo de resistencia a Fluoroquinolonas son las mutaciones del *grlAB* y *gyrB*. El segundo modo de resistencia es el aumento del eflujo del antibiótico por la familia Nor de bombas de eflujo de diferentes medicamentos. Algunos de estos, como el NorA no solo inducen resistencia a la Norfloxacina, sino que también la produce frente a β-lactámicos, Tetraciclinas, Cloranfenicol y otros compuestos químicos. Esto mismo puede ocurrir con otros miembros de la familia (Mesak et al., 2008).

2.2. Importancia de los SARM en la especie humana

En la especie humana, los *Staphylococcus aureus* resistentes a la Meticilina (SARM) son uno de los patógenos nosocomiales más importantes. Se trata de un patógeno virulento, capaz por sí solo de aumentar la incidencia global de infección estafilocócica (Coia et al., 2006).

Además, las infecciones invasoras por SARM se asocian con mayor mortalidad y coste económico que las causadas por *S. aureus* sensibles (Cosgrove et al., 2003; Cosgrove and Carmeli, 2003). Por todo ello, la vigilancia y el control de SARM debe ser una prioridad en todos los centros hospitalarios.

La vigilancia epidemiológica es un componente crítico de cualquier programa de control de SARM. Los pasos clave son la recogida sistemática de la información, su análisis e interpretación y la difusión a quienes están al cuidado de los pacientes. Los casos nuevos se detectan a partir del laboratorio de Microbiología. Además, el laboratorio debe, en la medida de sus posibilidades, establecer un sistema para congelar los aislados de SARM que se consideren representativos para la eventual realización de estudios moleculares (Rodríguez-Baño et al., 2006).

En España, los primeros brotes de SARM se comunicaron a finales de la década de 1980 (Pérez et al., 1998). Diversos estudios de prevalencia multicéntricos han mostrado aumentos en el porcentaje de resistencia a Meticilina en *S. aureus* a lo largo de la década de 1990 hasta alcanzar cifras superiores al 30% (Cuevas et al., 2004; Asensio et al., 2006). Los datos del European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) han mostrado cifras de entre el 23 y el 28% (Oteo et al., 2004). En las unidades de cuidados intensivos (UCI) el porcentaje de SARM entre 1997 y 2003 fue del 30,5% (Álvarez et al., 2006).

En una encuesta en varios centros hospitalarios españoles, se obtuvo una incidencia media de 0,88 casos de infección/colonización por SARM por cada 100 ingresos (mediana de 0,45) (Rodríguez-Baño et al., 2006), y se han encontrado cifras indicativas de elevada transmisión (Wenzel et al., 1998) en más del 50% de hospitales. En cualquier caso, la situación en los distintos hospitales es heterogénea. El aumento progresivo en la frecuencia de infecciones por SARM a la que asistimos durante los años finales del siglo XX podría estar dando paso a una situación de estabilización en meseta, probablemente asociada al desarrollo de programas de control y a la sustitución de determinados clones anteriormente predominantes (como el denominado clon ibérico (Domínguez et al., 1994) por otros (Vindel et al., 2006).

En el informe elaborado por el ECDC (European Centre for Diseases prevention and Control) en el 2010, que recoge la participación de la mayoría de países europeos que informan sobre la resistencia a los antimicrobianos de los SARM aislados de importancia en Salud Pública en centros hospitalarios, los países Nómadas muestran la menor prevalencia (<1% a <5%), Centro-Europa tiene países con valores desde el 5% a

<25%, y los países del Sur muestran del 25 a <50%, entre los que España se encuentra en el límite inferior con un 25.3%, y Portugal supera el 50%.

En Reino Unido se observó un importante aumento de infecciones por SARM que fueron del 2% a >40% entre 1990 y primeros años del 2000, con valores medios de bacteriemia entre 0,10 a 0,19 casos por cada 1000 camas ocupadas; y en Irlanda, la prevalencia de SARM por cada 100.000 habitantes, estaba comprendida entre el 11,4 a 14,0, según la zona geográfica (Norte, Sur), y las infecciones invasivas se encontraban entre el 5 al 10%. En otros países Europeos como los Escandinavos, Italia y España, también se ha observado el incremento de la bacteriemia por SARM entre 1999 y 2002 (Tiemersma et al., 2004; Coia et al., 2006). La bacteriemia con cepas SARM puede tener como consecuencia la endocarditis, y esto la diferencia de la infección con cepas SASM. Dentro de las neumonías de origen hospitalario y neumonías asociadas a ventilación, se ha encontrado que las cepas SARM son la causa en el 20-40% de ellas, principalmente en personas seniles y débiles sometidas a ventilación prolongada (Cosgrove et al., 2003; 14). En un estudio realizado en Detroit (USA) de evaluación de la morbilidad, mortalidad y costes atribuibles a bacteriemia por SARM, se encontraba que los casos de bacteriemia por cepas SARM aumentan la estancia en el hospital 1,5 veces (19,1 día vs. 14,2 días) y el coste de hospitalización 2 veces (21.577 \$ vs. 11.668\$), respecto a los producidos por cepas SASM. El retraso en acertar con el tratamiento adecuado que se atribuye a las cepas SARM, era un factor predictivo de la mortalidad. (Lodisea and McKinnon, 2005)

La epidemiología de SARM está cambiando. Además de las sustituciones clonales comentadas, un porcentaje importante de casos ocurren ahora en pacientes no hospitalizados que han tenido un estrecho contacto previo con el sistema sanitario (Rodríguez-Baño, et al., 2004), lo que los diferencia de las infecciones estrictamente comunitarias causadas por nuevos clones de SARM (Naimi et al., 2003). Éstas ya han sido descritas en España (Broseta et al., 2006), y aunque son aún muy poco frecuentes, sus implicaciones clínicas y epidemiológicas obligan a establecer sistemas de detección adecuados. La mayoría de las infecciones por SARM de la Comunidad suelen ser localizadas en piel y tejidos blandos, sin embargo, se ha detectado que la fascitis necrotizante y la neumonía necrotizante a consecuencia de SARM de la Comunidad, pueden llegar a valores del 20 y 75% de mortalidad, respectivamente (Li et al., 2011)

A pesar de que existen numerosas guías con recomendaciones para el control de SARM, una encuesta realizada en el año 2003 en 61 hospitales españoles mostró una importante heterogeneidad en la aplicación de medidas de control (Rodríguez-Baño et al., 2006).

Unas medidas de control básicas serían: el cumplimiento de las normas elementales de higiene de manos, uso racional de guantes y uso de mascarillas ante riesgo de salpicaduras de líquidos biológicos en el cuidado de todos los pacientes. La higiene de manos es uno de los pilares fundamentales del control de la infección nosocomial y de los patógenos multirresistentes. La recomendación unánime y evidenciada es el frotado

de manos con soluciones alcohólicas ya que ofrecen, con respecto al lavado con jabones antisépticos, mayor eficacia en la reducción de la flora bacteriana transitoria, mayor facilidad para su cumplimiento y mejor tolerancia. Debe recordarse que cuando las manos están visiblemente sucias debe realizarse lavado de manos con un jabón antiséptico (Rodríguez-Baño et al., 2006)

2.3. Modos de adquisición de la infección por SARM: HA-MRSA/ HCA-MRSA/ CA-MRSA/ LA-MRSA

Las infecciones hospitalarias de SARM (HA-MRSA, siglas en inglés) son de tipo nosocomial y se conocen desde hace décadas. Se considera como **HA-MRSA** cuando las infecciones causadas por estos microrganismos es probable que se adquirieran en el hospital y surgen por lo menos 48 horas después del ingreso de los pacientes, que además, tienen factores de riesgo particulares tales como la estancia prolongada en el hospital, la atención en unidades de cuidados intensivos (UCI), el tratamiento prolongado con antibióticos, las intervenciones quirúrgicas, y / o el estrecho contacto con personas SARM-positivas (EMEA, 2009; Stefani et al., 2012).

En otros casos, la adquisición de la infección está relacionada con los cuidados sanitarios (**HCA-MRSA**). La bacteria se aísla en un paciente no ingresado o durante las primeras 48 h de ingreso si se cumple alguna de las siguientes condiciones en el último año: ha estado ingresado más de 48 h en un hospital o centro sociosanitario (como residencias y hogares de ancianos, centros que asisten a diálisis y/o centros para control de la diabetes), ha recibido atención domiciliaria especializada, diálisis o tratamiento en hospital de día, ha sido intervenido quirúrgicamente o se le ha realizado algún procedimiento invasivo (Rodríguez-Baño et al., 2006; Bartels et al., 2008).

Otras infecciones por SARM se asocian a la Comunidad (**CA-MRSA**), se dan en pacientes no ingresados o en las primeras 48 h de ingreso, sin que se dé ninguna de las circunstancias anteriores. Los factores de riesgo de estas infecciones serían: contacto estrecho en la realización de deportes, escuelas, instalaciones militares, prisiones, etc. Hay una escasez de datos de calidad que investiguen la infección y/o tasas de portadores humanos en la Comunidad, pero esta parece variar considerablemente con la región geográfica (EFSA, 2009).

Desde hace algunos años, se ha asociado también a la ganadería (**LA-MRSA**), se trata de la transmisión de SARM y se refiere principalmente a la expansión clonal de ciertas cepas que colonizan las distintas especies animales, incluyendo los caballos, que pueden causar infecciones en las personas.

Además, los animales de compañía y los caballos pueden ser colonizados por mayor variedad de cepas, debido a su estrecho contacto con personas. Así, estas especies

pueden actuar como portadores de SARM procedentes de seres humanos (se le ha dado el nombre de "Humanosis") (Morgan, 2008).

Durante el período 1970-2000, el SARM se ha aislado de los animales de forma esporádica, en particular en vacas, animales de compañía y caballos. Con la excepción de algunos aislamientos equinos, la naturaleza de estos casos sugiere un origen humano y no se ha informado de epidemias (Leonard and Markey, 2008).

Hasta finales del siglo 20, tanto la comunidad científica como los responsables políticos pensaban que el SARM de la medicina humana no tenía nada que ver con la cría de animales, sino que se trataba de un problema basado únicamente en el uso de antimicrobianos en la medicina humana.

La situación ha cambiado, con un aumento del número de informes de LA-MRSA en animales. Se ha aislado en casi todas las especies domésticas, perros, gatos, ganado ovino, cerdos y pollos, además de los bóvidos, en los que *S. aureus* es causa frecuente de mamitis. También se ha descrito la transmisión entre humanos y animales (Leonard and Markey, 2008). Se ha detectado hasta un 14% de los pacientes caninos y equinos infectados con SARM en hospitales veterinarios universitarios. Si bien el aislamiento de *S. aureus* en perros y gatos es menos frecuente que en équidos. A veces son linajes genotípicos específicos que circulan entre las especies animales, (Cuny et al., 2006; Voss et al., 2005), pero en muchas ocasiones están asociados a linajes genotípicos de origen humano (Weese, 2008).

2.4. El estado de portador de *S. aureus*

Teóricamente, cualquier parte del cuerpo podría ser colonizada por *S. aureus*, sin embargo, la porción anterior de las fosas nasales suele ser el lugar más frecuente en el que se establece en un portador (Aly and Levitt, 1987; Cole et al., 2001). Los mecanismos que permiten esto son multifactoriales y están relacionados con las toxinas bacterianas y las proteínas de su pared (Weidenmaier et al., 2004), también con factores ambientales y factores de susceptibilidad del hospedador (inmunosupresión, enfermedades pre-existentes...) (Bogaert et al., 2004).

De todos modos, la importancia clínica del estado de portador en la faringe o en el periné no ha sido tan investigado. Los primeros datos de asociación entre el estado de portador nasal y la enfermedad se informó en 1931, en un estudio de factores predisponentes de la furunculosis. Además la administración de tratamiento anti-estafilococos en esas localizaciones previene el desarrollo de episodios infecciosos (Perl et al., 2002). También se ha demostrado que la mayoría de las infecciones nosocomiales por *S. aureus* son de origen endógeno (las cepas nasales y las de la infección son idénticas) (Von Eiff et al., 2001). El estado de portador nasal aumenta en 3 veces el riesgo de desarrollar autoinfección nosocomial (Wertheim et al., 2004a).

Frecuentemente, la piel es colonizada por *S. aureus* en los portadores en fosas nasales, y la transmisión suele ocurrir a través de las manos. Se ha demostrado que la eliminación del estado de portador nasal mediante Mupirocina elimina el estado de portador en las manos (Reagan et al., 1991). En el personal del hospital y en pacientes externos se ha valorado aproximadamente un 6% y un 2% portadores nasales de SARM, respectivamente (Cesur and Cokca, 2004).

El estado de portador de *S. aureus* en **fosas nasales** afecta a aproximadamente un 20% de la población y se ha identificado como factor de riesgo para el desarrollo de la patogénesis de las infecciones adquiridas en la Comunidad y nosocomiales (Kluytmans et al., 1997; Tiemersma et al., 2004; Travis et al., 1999; von Eiff et al., 2001). Los factores que determinan el ser portador o no son bien conocidos (apartado I.4 de la introducción). Wertheim et al. (2004b) estudiaban la importancia del estado de portador nasal de *S. aureus* y dedujeron que los portadores persistentes parecían estar protegidos de una evolución hacia la bacteriemia en el curso de la enfermedad.

La prevalencia de portadores de *S. aureus* es variable, Kluytmans et al. (1997) detectaron una prevalencia del 37,2%, y en personas sanas se encontraron tres patrones de portadores. Alrededor de un 20% eran portadores persistentes, un 60% eran intermitentes y otro 20% eran portadores ocasionales. Estos valores aumentaban considerablemente cuando se trataba de personas sometidas a tratamiento (hemodiálisis, drogadictos, etc.) o infectados por HIV (Kluytmans et al., 1997). Sin embargo en un estudio más reciente en EEUU (Graham et al., 2006), se halló un 31,6% de las personas colonizadas con *S. aureus* de los que un 0,88% eran SARM.

La prevalencia de SARM entre los infectados con *S. aureus* en un estudio en el que intervenían 26 países Europeos desde 1999 a 2002 (Tiemersma et al., 2004) variaba desde <1% en países del Norte de Europa a >40% en países del Sur y Oeste Europeo. En Dinamarca disminuyó de un 15% en 1971 a un 0,2% en 1984, y en Países Bajos, mediante un programa de control (“Buscar y destruir”), quedaron valores de <1%, y solo un 0,03% de los pacientes sin riesgo admitidos en el hospital eran portadores nasales de SARM (Wertheim et al., 2004b).

2.5. Implicaciones zoonóticas

Las personas en contacto directo con animales SARM-positivos tienen un mayor riesgo de llevar las mismas cepas de SARM que ellos. Esto se ha documentado en hospitales veterinarios de pequeños animales, y en hospitales y entornos de ganado equino (Morgan, 2008; Weese, 2008). Se han producido casos clínicos graves de LA-MRSA en los seres humanos, incluyendo un reciente brote en un hospital holandés (Declercq et al., 2008; Wulf et al., 2008a). Este fenómeno emergente representa un peligro que exige un enfoque de gestión bilateral, teniendo en cuenta a los animales y a los seres humanos como fuentes potenciales de SARM.

Los ganaderos de ganado porcino y bovino, son considerados un grupo de riesgo definido, que se detectan en la admisión en los hospitales. En un estudio (Wulf et al., 2008a) realizado con 1721 trabajadores de centros de salud en Holanda (4 Hospitales generales y un Hospital Universitario), un 4,4% manifestaban contacto directo o indirecto con cerdos y/o terneros y un 8,8% tenían contacto con otros animales de abasto, los que no tenían contacto con animales de abasto formaban el grupo control. SARM se encontró en fosas nasales y/o faringe en el 1,7% de los que contactaban con cerdos y/o terneros y un 0,17% en el grupo control, pero esas diferencias no eran estadísticamente significativas. No se encontraron portadores entre los que contactaban con otros animales de abasto.

En otro estudio (Wulf et al., 2008b) doscientos setenta y dos asistentes a una conferencia internacional sobre salud en ganado porcino fueron analizados en fosas nasales y faringe en Holanda. Treinta y cuatro participantes de 9 países, portaban SARM. El uso de máscaras, guantes y batas no eran medidas protectoras frente al estado de portador. La mayoría de las cepas pertenecían al MLST398, típico porcino en cerdos, granjeros porcinos y veterinarios en Holanda. Deducen que la transmisión de SARM a partir de cerdos es un problema internacional, y consideran al cerdo un reservorio para la transmisión en la Comunidad.

El riesgo ocupacional para la colonización por LA-MRSA a través del contacto con ganado porcino también se ha demostrado en Bélgica (Denis et al., 2008), Alemania (Meemken et al., 2008), Dinamarca (Wulf et al., 2008b) y España (Lozano et al., 2011). Cabe destacar que en dos de los estudios, y en contraste con las conclusiones extraídas de un estudio realizado en Canadá en las unidades de caballos (Anderson et al., 2008), las medidas de higiene actuales (por ejemplo, usar máscara en el manejo) no era suficiente protección para el portador de SARM (Denis et al., 2008; Wulf et al., 2008b). Los veterinarios parecen tener menor riesgo de SARM, como se ha demostrado en Dinamarca (Moodley et al., 2008).

En los Países Bajos y en Dinamarca se ha detectado un aumento de las infecciones humanas con LA-MRSA después de la primera descripción en el 2004 (Voss et al., 2005; van Rijen et al., 2008; Lewis et al., 2008).

Ha habido infecciones graves como una infección agresiva de tejidos blandos de una herida por mordedura de cerdo (Declercq et al., 2008) y endocarditis (Ekkelenkamp et al., 2006), y un brote en una sala quirúrgica de un hospital holandés (Wulf et al., 2008a).

2.6. Infección/ colonización con SARM en caballos

2.6.1. Infección por *S. aureus* y SARM

Es muy probable que *S. aureus* colonice las mucosas y la piel de los animales de un modo similar a lo que ocurre en la especie humana (Weese and van Duijkeren, 2010; Bitterman et al., 2010).

En un estudio (Van Eede et al., 2009) han detectado SARM en un 40% de los caballos sanos que residían en un hospital universitario un mínimo de 6 meses y que fueron separados entre ellos al menos durante 1 mes. La mayor proporción se encontró en fosas nasales, y en diferentes localizaciones de la piel en un 30%. Se analizaron diferentes localizaciones en la piel (lateral del cuello, cruz, grupa, periné, punto medio del cuerpo izquierdo, cara posterior del casco, flanco izquierdo y muslo izquierdo), en todas ellas se aisló SARM al menos una vez. Las fosas nasales fueron las muestras más frecuentemente infectadas, mientras que en la piel, el cuerpo fue el más frecuente (16,7%), seguido por la grupa (13,3%). La probabilidad de encontrar un resultado positivo en fosas nasales era de un 83,3%, pero si se combinaban fosas nasales y piel aumentaba a un 91,7%, aunque no ocurre si es la piel de la grupa, flanco o casco. En los caballos hospitalizados en salas de cirugía se aisló con mayor frecuencia (60%), seguido por los de las salas de medicina interna (55,6%).

Los informes iniciales de la infección por SARM en los caballos solían ser infecciones esporádicas o pequeños brotes, principalmente asociados con los hospitales veterinarios, y se pensaba que los caballos eran infectados o colonizados directamente a partir de las personas.

Posteriormente, ha habido informes sobre infecciones por SAMR a nivel internacional, tanto en relación con caballos en hospitales veterinarios como con su origen en la Comunidad.

Las infecciones clínicas por SARM pueden ser esporádicas o en brotes, y suelen presentar una amplia variedad de cuadros con carácter oportunista. En un estudio realizado con 115 caballos en Canadá y EEUU entre 2000 y 2006 (Anderson et al., 2008) en el que el rango de edad de los animales infectados con SARM iba de cero (nacidos en el hospital) a 31 años, las infecciones con HA-MRSA representaban el 50.9% y las CA-MRSA el 49.1%. En los resultados de dicho estudio, las incisiones quirúrgicas representaban el lugar más común de las infecciones con SARM.

La infección de la incisión quirúrgica se encontró asociada a HA-MRSA (58%), lo cual no era sorprendente ya que los animales hospitalizados es más probable que hayan sido sometidos a una cirugía que los caballos de la Comunidad; las infecciones del catéter i.v. también fueron frecuentes en caballos del hospital (16%).

Se detectó también alta frecuencia de infección de la incisión por CA-MRSA (17.9%), y se concluyó que esta infección debe ser considerada en la Comunidad tras procedimientos quirúrgicos de rutina.

En los caballos con infecciones de CA-MRSA, las infecciones mas frecuentes fueron las de la piel y tejidos blandos (29%), las infecciones de las articulaciones fueron tan frecuentes como las infecciones de la incisión (17.9%) y las infecciones de los huesos y tendones representaron el 14%. Más de 2/3 (73%) de todas las infecciones con SARM de las articulaciones ocurrieron en caballos de edad madura. La artritis séptica es una gran preocupación debido a la posibilidad de consecuencias graves o potencialmente mortales incluso con tratamiento intensivo.

Estas infecciones podrían haber sido de origen iatrogénico durante la realización de la artrocentesis o la inyección articular, pero en este estudio no se pudo concluir de forma objetiva.

Una tercera parte (3/9) de los caballos con infección en el lugar del catéter i.v. fueron sometidos a eutanasia, sin embargo sólo uno de esos caballos tenía SARM en sangre. Se consideró que estos resultados podían ser consecuencia de que en los caballos en estados más graves es más probable que se emplee la vía i.v., además son menos capaces de responder a las infecciones, y esta era la razón por la que se asociaba a menor supervivencia (Anderson et al., 2008).

También se ha informado de una variedad de infecciones que incluyen neumonía, metritis, onfaloflebitis, sinusitis, bacteriemia, infección por catéter intravenoso, osteomielitis, tenosinovitis, metritis y mastitis (Cuny et al., 2006; Middleton et al., 2005; Weese et al., 2005, Anderson et al., 2008). La gravedad de la infección puede ser muy variable, desde leves y superficiales a formas agresivas que ponen en riesgo la vida del animal. No hay evidencia de que las infecciones por SARM tengan una diferente presentación clínica que las infecciones por SASM (*S. aureus* Sensible a Meticilina), o de otro tipo oportunistas (Anderson et al., 2008).

Se ha investigado la prevalencia de colonización por SARM en diferentes poblaciones de caballos, dando tasas de 0 a 10,9% en los caballos de la Comunidad y tras la admisión en hospitales veterinarios, y es probable que sea endémico en la población de caballos de muchas regiones. En las explotaciones equinas se han observado brotes que podrían llegar a tasas de colonización del 43% en algunas de ellas (Weese and Rousseau, 2005). Los conductos nasales parecen ser el lugar primario de la colonización, aunque no se ha hecho ninguna comparación objetiva de las diferentes localizaciones corporales. Si bien la mayoría de los caballos colonizados no desarrollan infecciones clínicas, el estar colonizado en el momento de la admisión en el hospital, sí se ha considerado un factor de riesgo para el desarrollo de posterior infección clínica por SARM en los caballos hospitalizados (Weese et al., 2006c).

La comparación de los informes de diferentes áreas geográficas puede ser obstaculizada por el uso de sistemas de tipado y nomenclaturas diferentes, ya que no hay un sistema estándar para hacerlo, y las pruebas de las que se dispone tienen ventajas y limitaciones. El PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis), es el más usado por ser reproducible, estandarizado y altamente discriminatorio.

Sin embargo, el análisis puede ser subjetivo, algunas cepas no son tipificables por este método, y es exigente técnicamente con las limitaciones. El Spa-typing, que analiza la secuencia de la región X del gen de la proteína A, es un método estandarizado, rápido y objetivo, que es susceptible de mayor rendimiento y está siendo más usado. El test de tipado de la Secuencia de multilocus (MLST) analiza la secuencia de los siete genes más importantes. Es estandarizado y objetivo, sin embargo, es menos discriminatorio que la PFGE o spa-typing, y es mejor para comparaciones temporales o geográficas más amplias. La agrupación de las secuencias relacionadas de los tipos (STs) en complejos clonales (CCs) puede ser útil para un análisis más amplio. Además, otros métodos como el tipado de la cassette cromosómica estafilocócica (SCCmectyping) y la detección de los genes de la Leucocidina Panton-Valentine (LPV), también se utilizan algunas veces como pruebas complementarias.

Muchos de los informes iniciales de SARM en los caballos involucraban el clon ST8 clasificado por PFGE como Canadá SARM-5 o USA500 (Anderson and Weese, 2007; O'Mahony et al., 2005; Weese et al., 2005). Este es un clon negativo a la LPV, el cual posee SCCmecIV, que es un clon epidémico humano, sin embargo, sólo representa un pequeño porcentaje de infecciones humanas. El predominio de este clon en los caballos y el personal de caballos en algunas regiones, sugiere que este clon de origen humano se haya adaptado a caballos. Cepas relacionadas, incluyendo ST8 y ST254, también se han identificado en los caballos (Cuny et al., 2006; Moodley et al., 2008), lo que sugiere que las cepas relacionadas con el complejo clonal 8 podrían haberse adaptado al caballo.

Existen varios informes de la colonización e infección con secuencia de tipo ST398 en los caballos en Europa (Van den Eede et al., 2009; Witte et al., 2007; Lozano et al., 2011) y Canadá (Tokateloff et al., 2009), incluyendo un estudio que identificó la colonización con SARM ST398 en el 10,9% de los caballos admitidos en un Hospital universitario belga (Van den Eede et al., 2009).

Teniendo en cuenta la prevalencia de ST398 en animales de abasto, es razonable sospechar que el ST398 haya pasado al caballo de forma directa o indirecta de animales destinados al consumo. No se sabe si este es un problema emergente en caballos.

Al igual que en el perro y el gato, la colonización de caballos suele ser transitoria en la mayoría de los casos, con descolonización natural si se previene la reinfección (Weese and Rousseau, 2005).

El primer informe sobre el aislamiento de SARM en caballos fue publicado en 1996, pero ya en Japón se había aislado en 13 yeguas con mastitis entre 1989 y 1991. La

fuente se pensaba que era un caballo que se había cruzado con 10 de las yeguas. Mediante la técnica PFGE se demostró que los aislados tenían patrones indistinguibles (Anzai et al., 1996; Shimizu et al., 1997). Hasta la fecha, el SARM se ha aislado de los caballos en Europa, Asia y América del Norte (Baptiste et al., 2005; Hartmann et al., 1997; Middleton et al., 2005; Moodley et al., 2008; O'Mahony et al., 2005; Shimizu et al., 1997; Van den Eede et al., 2009; Weese et al., 2005; Witte et al., 2007). Las infecciones de la herida quirúrgica con SARM tienden a ser lo más frecuente (Leonard and Markey, 2008).

Weese et al. (2006c) hallaron que el 5,3% de los caballos de prácticas de un hospital universitario equino de Canadá y el 4,7% de los caballos de explotaciones en Canadá y los EE.UU. estaban colonizados con SARM. Otro estudio informó de 24 infecciones de SARM entre 768 muestras clínicas de los caballos en un Hospital Clínico Veterinario en Austria y una tasa de infección estimada de 4,8 casos por SARM 1.000 ingresos equinos (Cuny et al., 2006). En un reciente estudio de 110 caballos presentados en una clínica equina belga, el 10,9% de los caballos portaba SARM. Todos los aislados de este último estudio fueron LA-MRSA y pertenecían a los tipos de spa-typing T011 y t1451 (Van den Eede et al., 2009).

En Suecia, uno de 300 caballos ingresados en cuatro clínicas equinas llevaba SARM CC398 tipo spa T011 (SVARM-2007). En una clínica equina en Bélgica, el SARM CC398 tipo spa T011 se aisló de diversas infecciones de 13 caballos hospitalizados (Hermans et al., 2008). No se encontró ningún SARM entre 200 caballos sanos en los Países Bajos (Busscher et al., 2006), ni en muestras nasales de 300 caballos sanos procedentes de 14 explotaciones en Eslovenia (Vengust et al., 2006).

Estudios realizados en 200 caballos sanos de los Países Bajos en el 2004 (van Duijkeren et al., 2004), no encontraron la presencia de SARM, y se desconoce la razón por la que en el 2006 hubiera un aumento importante en la detección de SARM (van Duijkeren et al., 2010).

2.6.2. Los factores de riesgo para la colonización y la infección con SARM en caballos

La administración de antibióticos en los 30 días antes de la admisión a un hospital veterinario universitario se ha visto como factor de riesgo para la colonización de SARM en los caballos (Weese and Lefebvre, 2007).

La administración de Ceftiofur o Aminoglucósidos durante la hospitalización también era un factor de riesgo asociado con la colonización nosocomial por SARM de los caballos (Weese et al., 2006c).

También se ha encontrado asociación con (Weese and Lefebvre, 2007) haber sido colonizado en el pasado, la presencia de caballos colonizados en la explotación, la

admisión a la unidad de cuidados intensivos neonatales y la admisión a un servicio que no sea el servicio de cirugía. En un estudio se encontró que los caballos colonizados al ingreso en la clínica fueron más propensos a desarrollar infección clínica por SARM que los no colonizados al ingreso (Weese et al., 2006c).

La tasa de incidencia global de la colonización por SARM nosocomial fue de 23 por cada 1.000 admisiones, y la de infección nosocomial por SARM fue de 1,8 por cada 1.000 ingresos, con una densidad de incidencia de 0,88 por 1.000 días-paciente. La residencia en una finca que albergaba a más de 20 caballos fue un factor importante asociado con la colonización de SARM (Weese et al., 2005).

2.6.3. Riesgo de transmisión de SARM por contacto entre personas y caballos

La exposición ocupacional o recreativa a los caballos ha sido incriminado como un factor de riesgo de colonización por SARM (Weese et al., 2006a) en las personas.

En un estudio realizado en Dinamarca, el estado de portador nasal fue significativamente mayor entre los veterinarios profesionales (3,9%) que entre las personas no profesionalmente expuestas a los animales (0,7%) o entre personas sanas en la comunidad danesa (<1%). La exposición a los caballos se encontró que era un factor de riesgo (Moodley et al., 2008).

Se ha encontrado un 10,1% del personal veterinario colonizado con SARM entre los asistentes a una conferencia internacional de veterinaria equina. Se observó un aumento del riesgo de ser colonizado por haber tratado a un caballo diagnosticado con SARM, o haber diagnosticado personalmente la infección por SARM en el último año. El lavado de manos entre pacientes infectados y el lavado de manos entre las explotaciones equinas fue un factor de protección (Anderson et al., 2008).

Varios estudios informan de que las cepas SARM aisladas de los caballos y las personas que trabajan con caballos son indistinguibles y se diferencian de los aislados de SARM de los seres humanos en la población general (Cuny et al., 2008; O'Mahony et al., 2005; Seguin et al., 1999; Weese et al., 2005).

En Austria, predominaron en los caballos las cepas ST254 (tipo spa T036, SCCmecIV), seguidos por ST398 (T011, SCCmecIV) y ST1 (T127, SCCmecIV) (Cuny et al., 2008).

En los Países Bajos, la mayor parte de cepas equinas son ST398 (spa T011) o ST8 (spa type t064). Una alta frecuencia de la cepa ST398 en cerdos y terneros y el hecho de que los caballos sean guardados, en explotaciones en las que hay otros animales de abasto, o el ser tratados por veterinarios que también tratan a estas especies, podría ser una explicación a la presencia de ese tipo de cepas en caballos. Las cepas ST8 spa-type t064 se han encontrado también en caballos y personal veterinario en Irlanda (Moodley et al., 2006) y la ST398 spa-type t011 se ha encontrado también en caballos y personas del Hospital de la Facultad de Veterinaria de Viena (Cuny et al., 2008). También los viajes

internacionales y el comercio internacional pueden favorecer la diseminación de SARM. Si los cambios en el uso de ciertos antibióticos son responsables de este aumento, todavía no se conoce.

En Canadá, la mayoría de los aislamientos equinos son ST8 (T008, SCCmecIV). Un estudio canadiense con 79 caballos y 27 personas colonizados o infectados con SARM entre el año 2000 y 2002 mostró que un 96% de los équidos y un 93% de los aislados humanos eran subtipos de la cepa epidémica MRSA-5 spa-type 7 y poseía el SCCmec tipo IV (Weese et al., 2005). Esta cepa era poco frecuente en Canadá, pero era capaz de colonizar las fosas nasales de los caballos y diseminarse entre ellos y las personas que contactaban con ellos (Weese et al., 2006a), como se observó en un hospital veterinario universitario en el que tras la recepción de un potro infectado con CA-MRSA, parte del personal que entró en contacto con el potro (tanto veterinarios como estudiantes que cuidaban al potro) se infectó con esa cepa, provocando infección de la piel en tres de las personas que trabajan en el box del potro. Los SARM aislados de las personas y del potro no se distinguían por PFGE. Tras analizar las muestras de otros veterinarios de la clínica, se demostró la colonización nasal en 10 personas más (9,7%) entre los que voluntariamente participaron en el estudio. La transmisión tuvo lugar tras un corto periodo de contacto con el potro a pesar de utilizar guantes y otras medidas protectoras (Weese et al., 2006a).

Por otro lado, aunque las manos del personal veterinario al cuidado de los caballos, es, probablemente el modo más frecuente de transmisión de SARM, también se ha demostrado, en otro estudio canadiense, que la contaminación del medio ambiente puede ocurrir y que este es una importante fuente de infección por SARM (Weese et al., 2004).

3. OBJETIVOS

Este trabajo pretende alcanzar básicamente 3 objetivos:

1. Detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* en los équidos y en las personas con las que se relacionan, y comprobar si esas cepas pueden ser compartidas y se transmiten entre ambas especies.
2. Detectar si las cepas aisladas de ambas especies son resistentes a la Meticilina (cepas SARM, de gran importancia en la Salud Pública).
3. Comprobar si además de la presencia de *S. aureus* se detectan cepas del grupo *S. intermedius* que en otras especies animales son habituales y también suponen un riesgo para la Salud Humana.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Aislamiento e identificación de *S. aureus*

4.1.1. Individuos participantes en el estudio

4.1.1.a. Personas

Las personas que han participado en este estudio, estaban relacionadas con los caballos de los que se recogían las muestras. Todas ellas expresaron su consentimiento con la firma del documento *Versión 2* aceptado por el Comité Ético de Aragón, perteneciente al Proyecto C.I. PI11/057 (acta nº 14/2011 del 5 de Octubre del 2011, del dictamen favorable) cuya responsable es Dª Mª del Carmen Simón Valencia.

A todos los participantes se les explicó el motivo del estudio y se les pidió datos intrínsecos (género, rango de edad) relativos a su relación con animales, patologías y tratamientos antibióticos recibidos en los últimos 6 meses, relación con ámbitos médicos y/o veterinarios y similares datos del équido del que se tomaban las muestras simultáneamente.

4.1.1.b. Équidos

Los équidos que han participado en el estudio son:

- Pacientes del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Zaragoza (HCV-UZ) que presentaban diferentes patologías y a los que se le han aplicado sus tratamientos correspondientes (médicos o quirúrgicos).
- Animales sanos que se emplean para prácticas en el HCV-UZ.
- Animales que se encuentran en localizaciones externas al HCV-UZ (Yeguadas, Centros Hípicos, Picaderos o ubicaciones particulares).

En todos los casos, los dueños solicitaron la realización de los muestreos para detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* Meticilin-Resistentes en ellos, ya sea como agente infeccioso que puede provocar cuadros clínicos en los propios animales o por sus implicaciones en la Salud de las personas que se relacionan con ellos.

4.1.2. Recogida de muestras

Las muestras han sido recogidas con hisopo estéril y transportadas en Medio Amies (APTACA. Sterile transport swab):

- En **Équidos sanos**: a partir de Fosas Nasales (F), se eligió esta muestra debido a que ha sido demostrado que las probabilidades de detectar un caballo infectado es mayor a partir de fosas nasales (Van den Eede et al., 2009).
- En **Équidos enfermos**: a partir de fosas fasales (F) y Lesión compatible con una posible infección con *S. aureus* (L). (Middleton et al., 2005; Weese et al., 2005; Cuny et al., 2006; Anderson et al., 2008).
- De la **persona directamente relacionada con el équido** (ya sea sano o enfermo) se recogían muestras de fosas nasales (HF) y espacios interdigitales (Hi). (Cole et al., 2001; Reagan et al., 1991).

Se han recogido muestras de 35 équidos (34 Caballos y 1 Burro) y 35 personas que se relacionaban con esos équidos, siendo un total de **113 muestras** (équidos + personas):

- **43 muestras de équidos:** 35 F y 8 L [punto de implantación del catéter (3), exudado de drenaje tras cirugía laringo-traqueal (1), cordón umbilical (2), herida superficial en la cruz (1) y nódulo en pabellón auricular (1)].
- **70 muestras de personas:** 35 HF y 35 Hi, (todas las personas que participaron en el estudio eran sanas).

4.1.3. Aislamiento de *S. aureus* a partir de las muestras recogidas

4.1.3.a. Aislamiento de *S. aureus* a partir de muestras de Lesión

Las muestras de équidos que padecen algún tipo de infección sospechosa de ser producida por un *Staphylococcus*, son sembradas directamente en **Agar Sangre de Cordero** (Columbia + 5% Sangre de Cordero; Biomerieux Ref. 43 041). Posteriormente son incubadas a 35-37°C /18-24 h.

4.1.3.b. Aislamiento de *S. aureus* a partir de muestras de Fosas nasales y Espacios interdigitales

Las muestras obtenidas de fosas nasales de los animales o de las personas y las de espacios interdigitales de las personas, son sembradas en **Caldo BHI con un 10% de NaCl** (Brain Heart Infusion Broth; Scharlau, Rf: 02.599), (Rohra et al., 2009). A continuación son incubadas a 35 /37°C durante 18-24 horas.

Esta concentración de NaCl se ha elegido para hacer más selectivo el medio, debido a los altos niveles de flora bacteriana contaminante presente en este tipo de muestras, particularmente en las de fosas nasales de los équidos (Rohra et al., 2009).

4.1.4. Identificación de las cepas de *S. aureus*

Las colonias de las muestras crecidas en medio sólidos son identificadas por su morfología (Imagen 1) y por la presencia de hemólisis (Imagen 2), siguiendo las recomendaciones estándar de aislamiento (Bes and Brun, 2002; Pottumarthy et al., 2004; Durdik et al., 2010).



Imagen 1: colonias de *S. aureus* de 1-3 mm, brillantes, ligeramente convexas, aunque aún no han desarrollado la pigmentación amarilla, crecidas en Agar Sangre de Cordero



Imagen 2: β-hemólisis observada en las colonias de *S. aureus* crecidas en Agar Sangre de cordero

En el caso de las muestras crecidas en BHI, se comprueba con la tinción de Gram la presencia de cocos Gram positivos característicos.

Tanto las colonias típicas crecidas en Agar Sangre como los crecimientos en BHI-10% NaCl son subcultivados en **Medio Manitol Salino** (Manitol Salt Agar; OXOID, ref.: CM0085), en el cual se comprobará la fermentación del manitol típica de *S. aureus* por la coloración amarilla que adquiere el medio inicialmente rojizo (Imágenes 3 y 4).



Imagen 3: colonias de *S. aureus* crecidas en Agar Manitol Salino en el que se observa su brillo y pigmentación amarillenta



Imagen 4: comparación entre dos cepas de *Staphylococcus*, el de la izquierda es *S. aureus* con reacción positiva y el de la derecha un *Staphylococcus spp.*, con reacción negativa

A las colonias características crecidas en medio sólido (ya sea en Agar Sangre o en Manitol salino), se les realiza las pruebas de la **Catalasa** (debe ser positiva en estafilococos) y la **Citocromo-Oxidasa** (debe ser negativa en estafilococos). Las colonias que cumplen con estas condiciones son sometidas a la prueba de la **Coagulasa** (debe ser positiva en *S. aureus* y *S. intermedius*).

La prueba de la β -galactosidasa, es usada para diferenciar *S. aureus* (negativa), del grupo *S. intermedius* (positiva) (Bes and Brun, 2002; Pottumarthy et al., 2004; Durdik et al., 2010).

La aglutinación al látex (Imagen 5) para la detección factor aglutinante, la proteína A y polisacáridos capsulares de la superficie de *S. aureus*, permite confirmar esta bacteria. (Pastorex Staph-Plus; BIORAD. Rf: 56356).



Imagen 5: Kit Pastorex Staph-Plus para la detección de la aglutinación al látex

Cuando se encuentra discordancia en los resultados de estas pruebas, se pasa a realizar pruebas complementarias como la **producción de acetoína (Voges-Proskauer)**, **asimilación de carbohidratos en caldo y/o la tira API-Staph** (Imagen 6) (Biomerieux, Ref. 20500 API STAPH) (Bes and Brun, 2002; Chanchaithong and Prapasarakul, 2011; Ishii et al., 2006).



Imagen 6: Tira API-Staph utilizada para la identificación de una cepa de *S. aureus*

4.1.5. RESUMEN de la identificación de *S. aureus*

Muestra Lesión (animal):

- Agar Sangre:
 - Incubación 18-24 h a 35-37°C: colonias 1-3 mm, brillantes, ligeramente convexas, generalmente con desarrollo de pigmento amarillo en *S. aureus* y blanco en *S. intermedius*.
 - Tinción Gram (cocos G+).
 - Hemolisísis (β -hemolisísis en *S. aureus*, a veces no se observa).

Muestras de fosas nasales (animales y personas), y espacios interdigitales:

- BHI + 10%NaCl:
 - Incubación 18-24 h a 35°/37°C: turbidez del medio.
 - Tinción Gram (cocos G+).

Colonias en Agar Sangre/ Asa de BHI:

- Agar Manitol Salino:
 - Incubación 18-24 h/35-37°C: Coloración amarilla del medio (el 80% de los *S. aureus* presenta esta coloración).

Todas las colonias:

- Catalasa (+)
- Oxidasa (-)
- Coagulasa (+)
- Prueba de la β -galactosidasa: diferencia *S. intermedius* (+) de *S. aureus* (-)
- Pastorex Staph Plus: *S. aureus* (+)

Cepas dudosas: otras pruebas bioquímicas (producción de acetoina (Voges-Proskauer), asimilación de carbohidratos en caldo y/o API-Staph).

4.2. Fenotipo de resistencia a los antibióticos

4.2.1. Detección de cepas Meticilin-Resistentes de *S. aureus* (SARM/ MRSA)

Siguiendo las recomendaciones de la EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System; www.earss.rivm.nl), y el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institut) (CLSI, 2012), en algunos casos, la demostración de la resistencia a la Meticilina se puede demostrar al enfrentar la cepa con discos de Oxacilina y/o Cefoxitina por el método de difusión en disco (método de difusión de Kirby-Bauer). Se utiliza Agar Müller Hinton (Scharlau, Rf. 01.136) que es inoculado con una suspensión de la cepa ajustada al valor 0,5 en la escala de Mac-Farland.

Los discos de Cefoxitina de 30 µg. y Oxacilina de 1 µg, son depositados en la superficie del cultivo confluente. Los resultados son interpretados tras 18-24 h de cultivo a 33-35-37°C con los diámetros recomendados por el CLSI (2012):

Tabla 1: tamaño de los halos del antibiograma para diferenciar las cepas de *S. aureus* Resistentes (R), Intermedias (I) y Sensibles (S), a Oxacilina y Cefoxitina.

	Difusión en disco	S	I	R
Oxacilina	1µg	≥ 13	11-12	≤10
Cefoxitina	30µg	≥ 22	-	≤21

4.2.2. Test de sensibilidad a otros antibióticos de importancia Clínica

Además de la sensibilidad a la Meticilina, todas las cepas son evaluadas (método de difusión de Kirby-Bauer) frente a otros antibióticos de importancia clínica en Medicina Humana y Animal: Ácido Fusídico, Ciprofloxacina, Clindamicina, Cloranfenicol, Eritromicina, Estreptomicina, Gentamicina, Lincomicina, Mupirocina, Penicilina, Teicoplanina, Tetraciclina, Tobramicina, Trimethoprim-Sulfametoazol y Vancomicina; interpretados con los criterios propuestos por el CLSI y la Societé Française de Microbiology (Imagen 7).

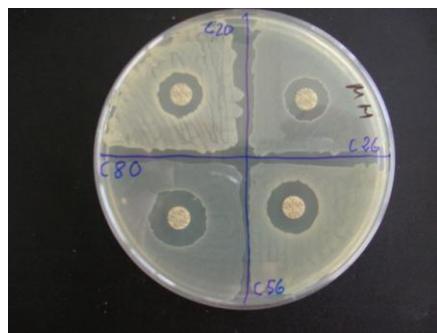


Imagen 7: Antibiograma realizado a 4 cepas de *S. aureus* por el método de difusión en disco frente a la Teicoplanina

4.2.3. Mínima Dosis Inhibitoria

Algunas de las resistencias a antibióticos observadas por el test de difusión en disco, es necesario corroborarlas con métodos complementarios (CLSI-2012). Este es el caso de la Penicilina, Oxacilina y Vancomicina, que hacen referencia a la detección de la resistencia a la Meticilina, y en consecuencia la demostración de existencia de cepas SARM o SASM (ORSA / OSSA), y a la Vancomicina, que hace referencia a cepas VISA o VRSA.

El método laboratorial más usado es el de la demostración de la Mínima Dosis Inhibitoria (minimum inhibitory concentration, MIC, siglas en inglés), que clásicamente se realizaba mediante diluciones seriadas de los antibióticos y que actualmente es sustituida por tiras que contienen las dosis diluidas de antibióticos impregnadas en pequeñas muescas de una tira de material plastificado.

La MIC de una bacteria se define como la mínima cantidad de un antibiótico que es capaz de inhibir su crecimiento en un determinado tiempo, dependiendo de la bacteria que se trate.

Los métodos de demostración de la MIC por medio de tiras, han sido convalidados por el método clásico de diluciones seriadas en tubo y el CLSI admite su uso en sustitución del método clásico.

En este trabajo se han utilizado las tiras “Oxoid M.I.C.EvaluatorTM (M.I.C.E.TM), que han sido evaluadas por diferentes laboratorios independientes y se han convalidado y admitido por la “British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC)” (Dr. David Livermore, Director Antibiotic Resistance Monitoring and Reference Laboratory, Colindale, UK).

Las tiras contienen el antibiótico estabilizado en un polímero y cubre 15 diluciones en base 2, con un rango entre 256 µg/ml – 0.015 µg/ml (hay otras diluciones para situaciones específicas).

La tira se coloca sobre el agar ya inoculado con la dosis bacteriana que conviene según la bacteria en estudio. En el caso de *S. aureus*, se utiliza el mismo método que en las pruebas de difusión en disco, es decir, un cultivo confluente a partir de una dilución de la bacteria equivalente a 0,5 en la escala de McFarland (CLSI). Posteriormente son incubadas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas (Imagen 8).

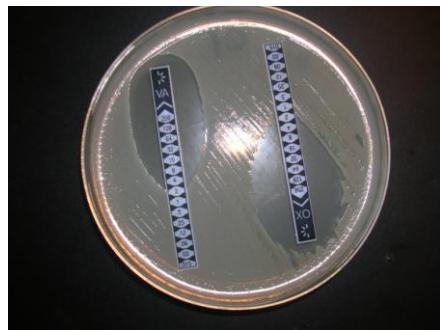


Imagen 8: MIC frente a Vancomicina y Oxacilina de una cepa de *S. aureus*

La interpretación (siguiendo las recomendaciones provistas por la empresa OXOID), se realiza a simple vista con un foco de luz indirecta sobre fondo negro (cuando se utiliza como base Agar Müller Hinton), en el caso de observar doble halo o crecimiento de colonias individuales en el espacio inhibido se aplican las directrices de la casa productora:

- Cuando se trata de un antibiótico bacteriostático, si el borde del halo de inhibición es irregular (no liso), se lee como el 80% de inhibición.
- Cuando se trata de un antibiótico bactericida, con el borde del halo de inhibición liso, lectura se hace en el punto en el que contacta con la tira.
- Cuando el halo es muy estrecho, se lee el punto más bajo en el que toca la tira.
- Cuando existe un punto de contacto en un lado de la tira, y otro diferente en el lado contrario, se lee el punto de valor más alto.

La tira tiene áreas blancas en las que se observa la dilución del antibiótico intercaladas con áreas negras de dimensiones similares. Si el inicio de la inhibición tiene lugar en la zona blanca, esa es la dilución que inhibe el crecimiento. En el caso de que el punto de inhibición coincida con la zona negra, se debe interpretar como una dilución intermedia entre el valor superior e inferior. La interpretación clínica (con el fin de poner en marcha un tratamiento antibiótico, que no es el objeto de este estudio), puede tener una lectura superior que la interpretación técnica. En la Tabla 2, se indican los valores que acepta el CLSI (2012), para interpretar la sensibilidad y resistencia de *S. aureus* frente a la Penicilina, Oxacilina y Vancomicina.

Tabla 2: Recomendaciones del CLSI (2012), en la interpretación de la MIC para *S. aureus*.

	MIC S	MIC I	MIC R
Penicilina	$\leq 0,12$	-	$\geq 0,25$
Oxacilina	≤ 2	-	≥ 4
Vancomicina	≤ 2	4-8	≥ 16

MIC: minimum inhibitory concentration;

I: Intermedio; **R:** Resistencia; **S:** Sensibilidad

4.3. Análisis observacional de los datos recopilados y los resultados obtenidos

Los datos que entran en el estudio han sido recogidos mediante una ficha expresamente elaborada para ello, tanto para los animales como para las personas muestreadas (Anexo).

Estos datos fueron introducidos en la base de datos del programa informático Excel®.

A partir de la información recopilada se ha realizado un análisis estadístico de tipo descriptivo en el que se determina la distribución de frecuencias para el caso de variables discontinuas (proporciones). Para la realización de estas determinaciones se utilizó el programa informático Epi Info 2000 (www.cdc.gov).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Cepas de *S. aureus* aisladas

En el total de individuos (équidos y personas) que han intervenido en el estudio (Tabla 3), se han aislado **12 cepas** de *S. aureus* y no se ha aislado **ninguna cepa del grupo *S. intermedius***.

El grupo *Staphylococcus intermedius*, se considera habitual en las especies animales y forma parte de la microflora normal de la piel y mucosas de perros, gatos, caballos, cabras, visones, zorros, mapaches, palomas, periquitos... (Weese and van Duijkeren, 2010). Sin embargo, los datos que se conocen parecen indicar que en los équidos y las personas es una especie bacteriana menos aislada, de modo que no resulta extraño que en los 35 caballos estudiados no se haya producido ningún aislamiento, al igual que se ha observado en estudios realizados por otros autores (Vengust et al., 2006; Rusher et al., 2009). Tampoco es extraño no encontrarlo en las personas, ya que en algunos estudios realizados, la prevalencia encontrada es inferior al 0,1%, y generalmente, la colonización o infección está relacionada con la convivencia estrecha con perros y gatos infectados principalmente (en este caso suele ser infección por *S. pseudointermedius*, aunque solo se diferencian tras el análisis genético) (Mahoudeau et al., 1997). También se han dado casos en los que el origen era desconocido, o bien eran personas infectadas en una clínica veterinaria. En cualquier caso, se considera que es potencialmente zoonótico y puede causar infecciones en piel y mucosas en la especie humana, (Weese and van Duijkeren, 2010).

Tabla 3: Número de individuos del estudio y muestras recogidas de ellos

	Équidos	Personas	Total
Individuos muestreados	35 (34 caballos+1 Burro)	35	70
Fosas nasales (F)	35	35	70
Lesión (L)	8	0	8
Espacios interdigitales (i)	0	35	35
TOTAL de muestras	43	70	113

Se han aislado **12 cepas** de *S. aureus* (Tabla 4): 7 cepas de 7 équidos diferentes (C1, C17, C20, C26, C29, C80 y C124); y 5 de 4 personas diferentes (C56, C97, C107, C108, C113).

De las **7 cepas de équidos**, **6 cepas** fueron aisladas de fosas nasales: C17, C20, C26, C29, C80 y C124; y **una cepa** del líquido supurado a través de la incisión tras 3 días de una intervención quirúrgica de la laringe (cepa **C1**). La cepas C80 y C124 proceden de équidos de la Comunidad, las cinco restantes están relacionadas con ámbitos Hospitalarios.

Se aislaron **5 cepas de *S. aureus*** de **4 Personas**: **2** fueron aisladas de **1 persona (C107)** de fosas nasales y **C108** de espacios interdigitales), las **3 restantes** son de fosas nasales de otras 3 personas (**C56, C97 y C113**) (Tabla 4). Las cepas C97 y C113, proceden de personas de la Comunidad y el resto son de personas relacionadas con el ámbito Hospitalario.

Tabla 4: Distribución de las cepas de *S. aureus* según el tipo de muestra y especie de la que se aislaron.

Origen muestra	Personas	Équidos
Fosas Nasales (F)	C56, C97, C113, C107	C17, C20, C26, C29, C80, C124
Lesión (L)		C1
Espacios interdigitales (i)	C108	
TOTAL	5 cepas de 4 personas	7 cepas de 7 équidos

5.2. Frecuencia de aislamientos de *S. aureus* en la población de équidos y personas del estudio

En ninguno de los casos analizados se han aislado paralelamente cepas de *S. aureus* en el équido y en la persona relacionada con ellos.

Del total de individuos estudiados (Tabla 5) se aislaron 12 cepas de *S. aureus* (17,14%). Se han aislado una mayor proporción de cepas en los équidos (20,00%) que en las personas relacionadas con estos animales (14,29%), la proporción respecto a las muestras de fosas nasales aisladas de ellos también es superior en équidos (17,14% frente a 11,43%). Solo de una de las muestras de espacios interdigitales humanas (2,86%) se aisló *S. aureus*.

Únicamente se aisló una cepa de *S. aureus* a partir de las 8 muestras de lesiones de équidos en las que se sospechaba la infección por este agente (12,50%).

Tabla 5: Frecuencias de las cepas de *S. aureus* aisladas en relación a los individuos y muestras realizadas

	Équidos	Personas	Total
Cepas <i>S. aureus</i>	7	5	12
Según nº de individuos	7/35 (20,00%)	5/35 (14,29%)* 4/35 (11,43%)	12/70 (17,14%)* 11/70 (15,71)
Individuos de la Comunidad	2/15 (13,33%)	2/15 (13,33%)	4/15 (26,66%)
Individuos de ámbito hospitalario	5/20 (25%)	3/20 (15,00%)* 2/20 (10,00%)	8/20 (40,00%) * 7/20 (35,00%)
Según nº de muestras	7/43 (16,28%)	5/70 (7,14%)	12/113 (10,61%)* 11/113 (9,73%)
Según tipo de muestra:			
Fosas nasales	6/35 (17,14%)	4/35 (11,43%)	10/70 (14,29%)
Lesión	1/8 (12,50%)	0/0	1/8 (12,50%)
Espacios interdigitales	0/0 (0,00%)	1/35 (2,86%)	1/35 (2,86%)

(*) dos de las cepas aisladas proceden de la misma persona y muy probablemente, son la misma cepa dado que fenotípicamente son idénticas, esa es la razón de la presentación de los dos valores de frecuencia

La prevalencia de *S. aureus* aislada en caballos en su conjunto (20,00%), sin considerar si tenían relación directa o no con el ámbito hospitalario, o si se trataba de cepas SARM o SASM es difícil de valorar, ya que la mayoría de los autores hacen referencia a la presencia de SARM (será comentada posteriormente). Sin embargo, en un reciente trabajo realizado en estudiantes de medicina en Taiwan (Chen et al., 2012), se encontró un 19,3% de portadores nasales de *S. aureus*, de los que 16,8% se consideraron procedentes de la Comunidad (no habían entrado en contacto con la clínica) y 21,9% eran de origen Hospitalario (contactaban con la clínica), de los que un 2,2% eran cepas SARM y estas eran cepas de origen en la Comunidad. Los valores encontrados por nosotros en personas de la Comunidad (13,33%) y relacionados con ambiente hospitalario (10 a 15%), son ligeramente inferiores. La baja proporción de SARM que encontraron Chen et al. (2012) respecto al total de cepas de *S. aureus* aisladas (2,2%), también podría ser la razón por la que en nuestro estudio ninguna de las 4 cepas de *S. aureus* aisladas de las personas fuera SARM.

En relación con ambientes veterinarios, Loeffler et al. (2010) hicieron una valoración de la colonización nasal de SARM y SASM en las personas relacionadas con perros y gatos. El grupo de Veterinarios de la clínica mostraba un 9% de SARM y un 16,5% de SASM, mientras que los dueños de perros y gatos, en general, mostraban 4,1% de SARM y 20,0% de SASM. Un 74,5% de veterinarios y un 75,9% de los dueños no portaban *S. aureus* en fosas nasales.

Desde un punto de vista clínico equino, la proporción encontrada en este estudio parece ser importante dado que se considera que las cepas de *S. aureus*, sean SARM o SASM, tienen la misma capacidad de inducir cuadros clínicos, si bien, la diferencia entre ellas estaría relacionada con el tratamiento y la posibilidad de que esos cuadros terminen siendo graves si se trata de cepas SARM (Weese et al., 2006c). Además hay que tener en cuenta que un 17,14% estaban colonizados en fosas nasales y estos mismos autores indican que el riesgo de desarrollar infecciones asociadas a *S. aureus* es más elevado en los caballos que ingresan en el Hospital ya colonizados en fosas nasales.

La prevalencia de aislados de *S. aureus* ha sido superior en los caballos del ámbito hospitalario (25%) con respecto a los caballos de la Comunidad (13,33%), y esto ha sido observado por diversos autores (van Belkum and Melles, 2005). *S. aureus*, que se considera habitual en infecciones humanas de piel y mucosas, ha sido aislado en este estudio en proporción similar en las personas de la Comunidad y las relacionadas con ámbito hospitalario (entre 10,00% al 15,00%). Actualmente, el análisis molecular de los aislados de *S. aureus* procedentes de personas y animales, parecen demostrar que las cepas animales y humanas suelen tener diferentes tipados desde el punto de vista genético, y esto también se ha observado entre diferentes especies animales (Cuny et al., 2012). A pesar de que las cepas de las especies animales y humanas se han transmitido de forma interespecífica, todo parece indicar que hay algunos aislados que son típicos de determinadas especies de modo que hay cepas humanas que no se han encontrado en animales y viceversa (Grundmann et al., 2002; Hata et al., 2008; Hsieh et al., 2008). Sin embargo, entre los aislados de origen equino se sabe que hay algunos que son típicos humanos como el ST1 y ST254 (Walther et al., 2009a; Cuny et al., 2012). También se ha encontrado un genotipo de SARM que se encuentra en varias especies, incluidos los humanos y los caballos (aislado SARM-ST22_IV), (Sung et al., 2008; Walther et al., 2009b). Estos estudios podrían explicar el hecho de que no se hayan aislado paralelamente las cepas de *S. aureus* en el équido y en la persona relacionada con ellos. Este análisis se realizará en posteriores estudios genéticos de las cepas aisladas.

En relación con las cepas humanas, las aisladas de fosas nasales representan un 11,43% del total de muestras analizadas, mientras que en espacios interdigitales se reduce a un 2,86%, y procede de una persona relacionada con ámbito hospitalario que a su vez está colonizado en fosas nasales. Esta es una situación típica según los diferentes estudios (Cesur and Cocka, 2004; Cole et al., 2001; Reagan et al., 1991; Weidenmaier et al., 2004), en los que las fosas nasales son el lugar más propicio para la colonización y las manos se convierten en vectores de la cepa que colonizan sus fosas nasales. La mayoría

de las medidas de control de diseminación de la infección por SARM en ámbitos hospitalarios humanos, incluso el control de la infección en la Comunidad (Rodriguez-Baño et al., 2008; WHO Guidelines, 2009; Gagne et al., 2010; Skov et al., 2012) además de contemplar la descolonización en fosas nasales, incluyen la higiene de las manos como vehículo frecuente de la transmisión.

5.3. Razas de los équidos del estudio de los que se aisló *S. aureus*

La variedad de las razas equinas de las que proceden las cepas de *S. aureus* aisladas (Tabla 6), sugiere que la raza no está relacionada con una mayor o menor predisposición a estar infectado o colonizado con esta bacteria. En un estudio realizado en Utrecht (Holanda) (Busscher et al., 2006), con diferentes razas de caballos, no encontraban una mayor predisposición de una u otra en relación con la infección por *Staphylococcus* coagulasa negativos resistentes a Meticilina. Algunos estudios epidemiológicos realizados en la especie humana, comparan la presencia de SARM y SASM en personas de diferentes razas. Skiest et al. (2007) encontraban que las personas de origen Afro-americano ingresadas en un hospital de Dallas (EEUU), con infección por *S. aureus* de origen en la Comunidad tenían una proporción de SARM significativamente superior a la de SASM, mientras que las diferencias no eran significativas entre las personas de raza Caucásica e Hispana. Aunque se desconoce la razón de esa predisposición a portar SARM. Sin embargo esto ya ha sido observado por otros autores (Lee et al., 2004; Fridkin et al., 2005).

Tabla 6: distribución de las cepas de *S. aureus* según la raza del équido

	Nº de équidos del estudio	Cepas de <i>S.aureus</i> aisladas
Burro Catalán	1	C29
Caballo Árabe	2	C17
Caballo de Deporte Español (CDE)	6	C124
Hispano-Bretón	1	
KWPN	3	C80
Lusitano	3	
Pura Raza Español (PRE)	9	C1
Silla-Francés	1	

Mestizo	9	C20, C26
TOTAL	35	7

5.4. Género de las personas y équidos del estudio de los que se aisló *S. aureus*

En la Tabla 7, se observa la alta proporción de cepas procedentes del género masculino (21,06%) y de machos equinos (31,25%), mientras que no se han aislado a partir de personas del género femenino y en solo 2 de las hembras equinas (10,52%). Es controvertido sugerir que el género haya tenido algún tipo de influencia o que pudiera predisponer a padecer una infección (C1), colonización (C17, C26, C29, C56, C97, C107, C113 y C124 aisladas de fosas nasales) o ser portadores (la cepa C108 de espacios interdigitales) de *S. aureus*, aunque también podría sugerir la influencia de hábitos o comportamientos relacionados con el género.

Tabla 7: relación de las cepas de *S. aureus* aisladas con el género de la especie de la que proceden

	Personas	Cepas <i>S. aureus</i> / Personas	(%)	Équidos	Cepas <i>S. aureus</i> / Équidos	(%)
Masculino / machos	19	4(*) C56, C97 C107, C108 C113,	21,06	16	5 C1, C17, C26, C29 y C124	31,25
Femenino / Hembras	16	0	0,00	19	2 C20 y C80	10,52
Total	35	5	14,29	35	7	20,00

(*): las cepas C107 y C108 proceden de la misma persona

Van Belkun et al. (2009) realizaron un estudio en personas sobre la colonización de fosas nasales por *S. aureus* y los determinantes asociados a la colonización, y encontraron valores diferentes entre hombres (20,5%) respecto mujeres (15,5%). En nuestro estudio el resultado ha sido mucho más llamativo ya que no se ha aislado *S. aureus* en las fosas nasales de las mujeres participantes en el estudio, siendo similar el número total de participantes de cada género (Tabla 7). Parece que este dato se repite en

diferentes estudios realizados en Hospitales humanos, en los que el género masculino se ve más afectado (Ellis et al., 2004; Werthein et al., 2005; Davis et al., 2004; Seybold et al., 2011; Chen et al., 2012).

En el caso de los équidos la diferencia entre los aislados en machos y hembras está, igualmente, inclinada hacia los machos, aunque no hemos encontrado estudios similares que incluyan datos sobre el género de los animales para contrastarlo. En general estos autores (van Belkum et al., 2009) relacionan más los resultados obtenidos con los clones de *S. aureus* infectantes, factores inmunosupresores, etc., y consideran necesario hacer mas estudios en este campo, tanto en animales como personas.

5.5. Edad de las personas y équidos del estudio y relación con las cepas de *S. aureus* aisladas de ellos

Los grupos de edad con los que se ha trabajado en el estudio son:

- En las Personas:
 - **Niñez, adolescencia:** nacimiento a 17 años, (no ha participado ninguno).
 - **Joven:** 18 a 31 años, (19 personas).
 - **Adulto:** 32 a 60 años, (16 personas).
 - **Sénior:** mayor de 60 años, (no ha participado ninguno).
- En los Équidos:
 - **Neonato:** hasta 10 días (2 animales).
 - **Potro:** 11 días a 4 años, (3 animales).
 - **Adulto:** 5 a12 años, (22 animales).
 - **Sénior:** >12 años, (8 animales).

Tres cepas humanas proceden de 2 personas jóvenes (C56, C107 y C108), que representa un 12,50 % (2/19) de las personas jóvenes que participaron en el estudio, y las otras 2 cepas proceden de adultos (C97 y C113), que representa un 10,53% (2/16) de las personas adultas participantes en el estudio.

Las 7 cepas de équidos son de animales adultos, esto representa un 31,82% (7/22) del total de équidos adultos.

En el conjunto de las personas que participaron en el estudio no había niños-adolescentes, ni sénior y parece que el aislamiento de cepas de *S. aureus* ha sido similar en los grupos de jóvenes y adultos que han participado. En todos ellos, el factor común

es que tienen un grado de relación con équidos elevado y aparentemente, la edad no ha influido en la infección, colonización o estado de portador de *S. aureus* en estas personas.

Sin embargo, Seybold et al. (2011), en un estudio realizado en personas que accedían al hospital, encontraban que había algo más de riesgo de portar SASM entre las personas de más de 40 años (ellos encontraron un 26%), si bien se conocía que tenían un historial de aislamiento de *S. aureus* en anteriores ocasiones, dato que desconocemos en este estudio. Y en un estudio realizado en estudiantes de medicina en Taiwan, los estudiantes de edad ≥ 23 años, estaban en mayor riesgo de estar colonizados (Chen y et al., 2012)

En équidos se ha observado una diferencia notable de los aislados en adultos respecto al resto de los grupos de edad, y era de esperar que en el grupo de équidos “sénior” hubiera habido algún aislamiento, sin embargo es posible que factores relacionados con el comportamiento, manejo, ubicación del animal, tiempo de contacto con otros équidos y/o personas, etc., así como la existencia de clones de *S. aureus* en determinados ambientes (van Belkum et al., 2009), puedan haber interactuado en estos resultados.

De acuerdo con lo encontrado por Seybold et al. (2011) comentado anteriormente, es posible que la edad tenga algún tipo de influencia en la colonización de fosas nasales, y que los animales en edad adulta puedan estar en mayor riesgo de colonización, si bien las razones intrínsecas de este hecho, se desconocen.

5.6. Hipótesis sobre el posible origen de las cepas de *S. aureus* aisladas en este estudio

Cinco de los équidos y 2 de las personas de los que se aislaron las cepas de *S. aureus* tenían relación con ambientes médicos y/o veterinarios (Facultad de Veterinaria, Veterinarios, Estudiantes de Veterinaria, Enfermeros, Médicos o ambientes hospitalarios humanos), esto dificulta la deducción del posible origen de las cepas de los *S. aureus* aislados. El medio ambiente es el tercer elemento que interviene en la transmisión de *S. aureus* entre los animales y las personas, y viceversa, esto ha sido demostrado en diferentes entornos animales y humanos, y se sabe que *S. aureus* es resistente en condiciones ambientales. Tanto ambientes hospitalarios humanos como granjas de animales, explotaciones equinas, hospitales u otros ambientes con animales, pueden estar infectados por *S. aureus* (SARM o SASM) (Hardy et al., 2006; Gaspard et al., 2009; Dwaele et al., 2011; Petti et al., 2012), si bien, el hecho de que todas las cepas aisladas de los équidos y personas relacionados con el hospital eran fenotípicamente diferentes, a excepción de la C107 y C108 que eran de una sola persona, permitiría concluir que no existe una cepa establecida en las instalaciones del Hospital de Grandes Animales de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

La cepa C1, que por sus características fenotípicas puede ser considerada cepa SARM, es de un caballo que estuvo en el HCV-UZ debido a una hemiplejia laríngea. Este caso se realizó en la parte práctica de un curso para cirujanos veterinarios que llegaron de diferentes zonas geográficas. En una primera fase se realizó una ventrículo-cordectomía del lado izquierdo mediante láser, momento en el que todos los profesionales veterinarios estuvieron próximos o tocaron al caballo. Dos días más tarde, bajo anestesia general, se realizó una segunda cirugía, en este caso una laringoplastia, en la que algunos de los participantes del curso estuvieron muy próximos al caballo, aunque portaban mascarilla protectora.

La cepa se aisló del líquido exudado por la herida de la incisión 8 días después de la laringoplastia. En el momento de la recogida del hisopo el caballo llevaba 13 días en el hospital y había recibido tratamiento antibiótico sistémico de amplio espectro (Penicilina y Gentamicina) durante 6 días y tópico (Spray con Nitrofurazona, vía nasal) durante 10 días, además del spray con Cloranfenicol que se aplicó a la incisión quirúrgica al final de la cirugía.

Esta secuencia de acontecimientos puede orientarnos hacia el momento en el que hubo mayor probabilidad de que ocurriera la transmisión. Ya que como en la primera fase no hubo incisión quirúrgica y no se ha aislado *S. aureus* de las fosas nasales del animal, debemos pensar que es poco probable que ocurriera entonces. Durante la laringoplastia, parece más probable porque, a pesar de llevar mascarilla, se sabe que estas medidas de protección no son siempre eficaces. Una vez cerrada la incisión es pulverizada con spray con Cloranfénicol, por lo que la probabilidad de infectarse en ese momento disminuye.

En consecuencia, aunque no se puede eliminar la posibilidad de que el caballo viniera colonizado en piel de su origen (un particular de Málaga), el hecho de no haberse aislado de sus fosas nasales y haber sido objeto de dos intervenciones quirúrgicas en la que un número importante de veterinarios estuvieron próximos o llegaron a tocar la zona de la lesión, hace sospechar que podría ser una cepa de origen humano, y no relacionada con el HCV-UZ, ya que el resto de las cepas aisladas de personas y animales del hospital no eran SARM. Por lo tanto, este podría ser un caso de lo que ha sido llamado “Humanosis” , tal como Morgan (2008) definió el hecho de que el estrecho contacto entre perros, gatos y caballos con las personas podía dar lugar a la transmisión de cepas humanas a estos animales.

Si bien, al ser la mayoría de los participantes veterinarios, es difícil saber si la cepa es de un genotipo típicamente humano, es una cepa interespecífica, o típicamente animal, en la que algún veterinario hubiera sido el vector. (Grundmann et al., 2002; Hata et al., 2008; Hsieh et al., 2008; Walther et al., 2009a; Sung et al., 2008; Walther et al., 2009b)

Además, se ha puesto de manifiesto que, frecuentemente, las cepas SARM que se aíslan a la par en caballos y personas que trabajan con ellos, suelen ser iguales, dato que no se ha podido conocer en este estudio debido a que no fueron muestreados los asistentes al

curso impartido en el Hospital. Los estudios genéticos que se lleven a cabo posteriormente, determinarán ante qué línea genética de SARM nos encontramos y permitirá confirmar esta sospecha. De todos modos, se sabe que hay líneas genéticas de SARM que pueden circular entre varias especies animales y humanos (Cuny et al., 2008; O'Mahony et al., 2005; Seguin et al., 1999; Weese et al., 2005).

Las cepas **C17**, **C20** y **C26**, proceden de caballos adquiridos para realización de prácticas con estudiantes de veterinaria. En el momento de la recolección de las muestras el tiempo de permanencia en el HCV-UZ era de un mes aproximadamente. Estos tres caballos se adquirieron a un tratante de caballos de Logroño, lugar en el que entran y salen continuamente caballos de muy diversa procedencia, situación que favorece el contagio entre los caballos.

Las 3 cepas son fenotípicamente diferentes, lo que podría indicar diferentes orígenes en cada una de ellas. Wesse and Lefebvre (2007), encontraban que los équidos que habían presentado colonización por SARM en épocas anteriores tenían más probabilidades de seguir colonizados o reinfectarse. Si se considera el tiempo transcurrido desde que fueron comprados e integrados en su lugar actual de residencia y salvando las diferencias, puesto que la mayoría de los artículos se refieren específicamente a cepas SARM (Wesse and Lefebvre, 2007), estas tres cepas podían proceder de su actual ubicación (las personas que contactan con ellos son los estudiantes de veterinaria, además del personal de mantenimiento y limpieza, visitantes y veterinarios), pero no se puede descartar la posibilidad de que ya vinieran colonizados por *S. aureus*.

La cepa **C29** se aisló de un burro a partir de fosas nasales. Procede del Centro de Cría Caballar de las Fuerzas Armadas de Zaragoza en donde residía desde hacía 2 años, y había entrado en el HCV-UZ para tratar un nódulo en el pabellón auricular con una secreción maloliente. Fue muestreado de fosas nasales y del fluido excretado cuando ya llevaba 12 días en el Hospital y tras haber sido tratado con Penicilina y Gentamicina, sin embargo *S. aureus* solo se aisló de fosas nasales. Con estos antecedentes, es muy probable que este burro ya viniera colonizado por *S. aureus* y que esta cepa podría estar en esa colectividad equina. Sin embargo, no es posible descartar que fuera colonizado por una cepa de las personas que manejan la colectividad, aunque la persona de la que se hizo el muestreo no estaba colonizada por ninguna cepa de *S. aureus*, o que se hubiera colonizado en el HCV-UZ.

Las cepas **C80** y **C124** no tienen relación directa con el ámbito del HCV-UZ dado que fueron recogidas *in situ*, en el lugar de residencia habitual de esos caballos. La **C80** es de una yegua que vive en paddock junto a otros caballos en una yeguada de Muel (Zaragoza), por lo que el origen de la cepa es muy probable que se encuentre en la propia yeguada, sin descartar la posibilidad de que el personal u otras personas que frecuenten la yeguada, hayan podido ser la fuente de esta cepa. Aunque su dueño no estaba colonizado por *S. aureus* en el momento del estudio a pesar de estar relacionado con ambientes médicos y veterinarios. La cepa **C124** procede de un caballo

perteneciente a una persona particular en Chimillas (Huesca) y vive en box individual. Como se relaciona con un perro y las personas de la casa, el origen de la cepa, podría ser humano, aunque no se puede descartar totalmente un origen animal. (Cuny et al., 2008; O'Mahony et al., 2005; Seguin et al., 1999; Weese et al., 2005; Morgan, 2008).

La cepa **C56** se aisló de fosas nasales de un veterinario interno del HCV-UZ, pero no del caballo relacionado con él. En su residencia hay otros animales de compañía (gato, rata y periquito), y el gato, sobre todo, también podría ser la fuente de *S. aureus*. Algunos estudios sobre la prevalencia de infección o colonización con SARM en gatos, dan valores de prevalencia entre el 0 y 4% (Weese and Duijkeren, 2010). Sin embargo, en un amplio estudio realizado por Loeffler et al. (2010) encontraban que un 12,3% de los veterinarios y un 7,5% de los dueños de animales infectados por SARM, también portaban este agente en fosas nasales, la mayoría de esas cepas, eran genéticamente, de origen HA-MRSA.

Las cepas **C107** y **C108** aisladas de origen **humano** proceden de 1 persona relacionadas con el Hospital Veterinario, y con ambientes hospitalarios humanos (laboratorio de diagnóstico humano), y siguiendo los criterios de diferentes autores y el EMEA, estas cepas, muy probablemente, tienen origen hospitalario humano, (Bartels et al., 20008; EMEA, 2009; Stefani et al., 2012).

La cepa **C97** es de una persona de Calamocha (Teruel), propietaria de un caballo que contacta diariamente con otros caballos. Sin embargo, el caballo que fue muestreado a la par que él, no portaba *S. aureus* en fosas nasales. La cepa **C113** procede de una persona que tiene su caballo en un club hípico de Zaragoza, y el contacto con otros caballos es diario, al igual que en el anterior, no se ha detectado *S. aureus* en su caballo, ni tiene relación con ambientes médicos o veterinarios ni ha padecido procesos relacionados con esta infección.

En consecuencia, las cepas C97 y C113, podrían tener su origen en la Comunidad, ya que no hay relación directa o indirecta con ambientes hospitalarios médicos o veterinarios, y ninguna de estas personas se relaciona con animales de abasto, que también es considerado una fuente importante de *S. aureus* o SARM. (Bartels et al., 2008; EMEA, 2009; Stefani et al., 2012).

5.7. Fenotipo de Resistencia de las cepas de *S. aureus* aisladas

5.7.1. Fenotipo de resistencia de la cepa C1

Únicamente la cepa **C1** aislada del líquido exudado de la herida postquirúrgica de un caballo de 6 años, de Pura Raza Española, muestra un fenotipo propio de una cepa **SARM** y además muestra un patrón de multirresistencia (**MDR**) respecto al resto de antibióticos, ya que la resistencia se ha observado frente a Penicilina, Oxacilina, Cefoxitina, Tetraciclina, Gentamicina, Estreptomicina, Tobramicina y Lincomicina,

pero no a la Vancomicina, Clindamicina, Cloranfenicol, Trimethoprim-Sulfamethoxazol, Mupirocina y Ciprofloxacina. Ha mostrado resistencia Intermedia al Ácido Fusídico, Eritromicina y Teicoplanina.

Esta multiresistencia es característica de las cepas SARM (Appelbaum, 2007). Esta cepa no es resistente a Vancomicina por el método de difusión en disco (dd), sin embargo muestra resistencia Intermedia a Teicoplanina. Al realizar la MIC de la Penicilina, Oxacilina y Vancomicina, se confirmó la resistencia a la Penicilina y Oxacilina (patrón establecido por el CLSI, 2012), y la sensibilidad a la Vancomicina. Según los criterios establecidos por el CLSI (2012), los *S. aureus* resistentes a la Oxacilina también lo son para el resto de los antimicrobianos β -lactámicos, con la excepción de las nuevas Cefalosporinas que tienen actividad anti-SARM. Además, por la resistencia mostrada a la Cefoxitina, se puede deducir que no solo produce la β -lactamasa, sino que además posee el gen *mecA*, característico de la resistencia a la Oxacilina (Hartman and Tomasz, 1984).

En consecuencia, la cepa C1 es, fenotípicamente, una cepa SARM, que según los criterios del CLSI, se debería referir como ORSA.

Todas las cepas de las personas y équidos de este estudio, de las que se aisló *S. aureus* en fosas nasales, eran SASM. Se ha comprobado, en personas ingresadas en hospitales, que la colonización de fosas nasales con cepas SASM tienen menos probabilidad de dar lugar a infecciones posteriores con esas cepas en otras localizaciones (Ellis et al., 2004; Werthein et al., 2005; Davis et al., 2004; Seybold et al., 2011), sin embargo Weese et al. (2006c) opinan que las cepas SARM y SASM equinas y humanas, tienen la misma capacidad de provocar infección.

La Vancomicina (Glicopéptido), es la alternativa para el tratamiento de los casos clínicos en los que actúa una cepa SARM. Actualmente, es muy raro que haya cepas resistentes a la Vancomicina, aunque ya se han descrito algunos aislados con esta característica, pero los casos de resistencia Intermedia son igualmente importantes y deben confirmarse en un segundo laboratorio (McCallum et al., 2010; Honda et al., 2011). La cepa C1, SARM, mostraba resistencia Intermedia a la Teicoplanina (Glicopéptido), siendo sensible a la Vancomicina, sin embargo, el CLSI, indica que los resultados del test de difusión en disco de la Teicoplanina no se pueden considerar seguros ya que no se han re-evaluado a la par que los de la Vancomicina, por lo que se desconoce la capacidad de este test para diferenciar bien las cepas Sensibles, Resistentes e Intermedias (CLSI, 2012).

Por otro lado, según Tenover (2010), las cepas que muestran resistencia a Teicoplanina, y no muestran resistencia a la Vancomicina por el test de difusión en disco, podrían tener resistencia heterogénea a los Glicopéptidos (hGISA), que en ocasiones se han asociado con fallos clínicos al tratamiento con Vancomicina, por eso recomiendan confirmar la resistencia a la Vancomicina realizando el MIC.

Otro antibiótico de interés en el control de la diseminación de las cepas SARM, en las poblaciones animales y humanas, es la Mupirocina (Ácido pseudomónico), que se viene usando para eliminar la colonización en fosas nasales (Reagan et al., 1991), y esta cepa es sensible a la Mupirocina.

Tabla 8: Fenotipo de resistencia expresado por las 12 cepas de *S. aureus* aisladas en los équidos y las personas que participaron en el estudio

Cepas	Resistencia	Intermedia	Sensible
Equinas			
C1	P, OX, FOX, TE, GM, TOB, S, LIN	E, TEI, FUS	CIP, VA, CLIN, C, SxT, MUP
C17	P, LIN, FUS	E, TEI	OX, FOX, VA, TE, CLIN, C, GM, TOB, S, CIP, SxT, MUP
C20	P	E, S, SxT, FUS, TEI	OX, FOX, VA, TE, CLIN, C, GM, TOB, LIN, CIP, MUP
C26	LIN	S, TEI	P, OX, FOX, VA, TE, E, CLIN, C, GM, TOB, CIP, SxT, FUS, MUP
C29	P, LIN	E, S, TEI	OX, FOX, VA, TE, CLIN, C, GM, TOB, CIP, SXT, FUS, MUP
C80	P, S, LIN		OX, FOX, VA, TE, E, CLIN, C, GM, TOB, CIP, SxT, FUS, MUP, TEI
C124	S, LIN	E, CLIN, CIP, SxT, TEI	P, OX, FOX, VA, TE, C, GM, TOB, FUS, MUP
Humana			
C56	P, TE, SxT	LIN	OX, FOX, VA, E, CLIN, C, GM, TOB, S, CIP, FUS, MUP, TEI
C97	P	TE, E, S, CIP	OX, FOX, VA, CLIN, C, GM, TOB, LIN, SxT, FUS, MUP, TEI
C107	S, LIN, FUS	E, TEI	P, OX, FOX, VA, TE, CLIN, C, GM, TOB, CIP, SxT, MUP,
C108	S, LIN, FUS	E, TEI	P, OX, FOX, VA, TE, CLIN, C, GM, TOB, CIP, SxT, MUP, TEI

C113	S, LIN	TE, E, CIP, TEI	OX, FOX, VA, CLIN, C, GM, TOB, SXT, MUP
------	--------	-----------------	--------------------------------------------

C: Cloranfenicol; **CIP**: Ciprofloxacina; **CLIN**: Clindamicina; **E**: Eritromicina; **FOX**: Cefoxitina; **FUS**: Ácido Fusídico; **GM**: Gentamicina; **LIN**: Lincomicina; **MUP**: Mupirocina; **OX**: Oxacilina; **P**: Penicilina; **S**: Estreptomicina; **SxT**: Trimethoprim-sulfametoazol; **TE**: Tetraciclina; **TEI**: Teicoplanina; **TOB**: Tobramicina; **VA**: Vancomicina

5.7.2. Resistencia a β -lactámicos del resto de cepas aisladas

Aparte de la cepa C1 ya comentada, 6 cepas más (C17, C20, C26 y C29, equinas, y C56 y C97 humanas) eran resistentes a la **Penicilina** por el test de difusión en disco y ninguna de ellas era resistente a Oxacilina y Cefoxitina. Según estos resultados, son productoras de β -lactamasa, pero deberían ser sensibles a las Penicilinas penicilinasa-estables, a las combinaciones con inhibidores de la β -lactamasa, a los Cefenos anti-estafilococos y a los Carbapenen (Smith and Jarvis, 1999; MacCallum et al., 2010; CLSI, 2012). La ausencia de resistencia a la Oxacilina y a la Cefoxitina indicaría que carecen del gen *mecA*, dato que se confirmará en posteriores análisis genéticos.

En el conjunto de las cepas de *S. aureus* aisladas, la frecuencia de cepas resistentes a la Penicilina, representa un 58,33% de los aislados. Teniendo en cuenta que se han detectado zonas geográficas con hasta un 90% de resistencia a Penicilina, podríamos decir que en la población estudiada la resistencia a este antibiótico no es muy elevada.

5.7.3. Inducción de la resistencia a la Clindamicina por medio de la Eritromicina

Un efecto interesante a detectar en *S. aureus*, es la inducción de resistencia a la Clindamicina por medio de la Eritromicina. Nueve de las 12 cepas de *S. aureus* aisladas (C1, C17, C20, C29, C124 de équidos y C97, C107, C108 y C113 de las personas), mostraban resistencia Intermedia a la Eritromicina y eran sensibles a la Clindamicina, excepto la cepa C124 que presentaba resistencia Intermedia, lo que sugiere que podrían portar los genes de resistencia *ermA*, *ermB* o *ermC* (MacCallum et al., 2010). En la cepa C124 es posible que se hubiera producido inducción, aunque la línea de crecimiento era tenue y se consideró “dudosa”, en el resto no hubo inducción de la resistencia a la Clindamicina. Con estas características, esas cepas también podrían portar el gen *msrA*, (Matsuoka et al., 1998), que codifica la producción de una bomba de flujo que expulsa la Eritromicina fuera de la célula. Estos datos se conocerán en un estudio genético posterior.

5.7.4. Resistencia a Glicopéptidos

Las cepas C17, C20, C26, C29 y C124 de origen equino, y las C107, C108 y C113, de origen humano, también mostraban resistencia Intermedia a la **Teicoplanina**, siendo sensibles a la Vancomicina, por lo que al igual que en la cepa C1, estos resultados deben ser considerados dudosos (CLSI, 2012).

5.7.5. Resistencia al Ácido Fusídico

Las cepas C17, (origen equino), C107 y C108 (de la misma persona) eran resistentes al **Ácido Fusídico** (antibiótico esteroidal), y las cepas C1 (cepa SARM), C20 (también de origen equino), mostraban resistencia Intermedia a este antibiótico. Este antibiótico es de gran utilidad para tratar *S. aureus* y en particular los SARM, en casos de infección de la piel y tejidos blandos en la especie humana. La detección de resistencia podría estar asociada a la presencia del gen *fusA*, y las cepas con resistencia Intermedia, podrían portar los genes *fusB* y *fusC* (Wang et al., 2012).

Las prevalencias de resistencia al Ac. Fusídico es variable aunque todavía bajo, en general, en EEUU se daban valores del 0,3% de los *S. aureus*, mientras que en Canadá y Australia eran más elevados (7%). En nuestro estudio, son 3 cepas las que muestran resistencia, aunque las C107 y C108 son, muy probablemente la misma, por lo que consideramos una posible prevalencia del 16,67%, que podríamos calificar de elevada. Además otras 2 cepas muestran resistencia Intermedia, lo que añade otro 16,67% más. En Europa se cree que la expansión de la resistencia al Ác. Fusídico se debe a una expansión clonal de la cepa epidémica “European FA-resistant impétigo” (Castanheira et al., 2010). En estudios posteriores se comprobará la existencia de estos genes en las cepas aisladas.

5.7.6. Resistencia a las Tetraciclinas

La Resistencia a la **Tetracilina** se ha observado en 2 cepas (C1 SARM de origen equino; y C56 de origen humano). Otras dos cepas han presentado resistencia Intermedia (C97 y C113, ambas de origen humano). Las Tetraciclinas son inhibidores de la fase de elongación de la síntesis de proteínas (McCallum et al., 2010). El principal mecanismo de resistencia en *S. aureus*, es la protección ribosomal por las proteínas Tet(M) o Tet(O) “factor-like” de elongación (Connell et al., 2003) y el eflujo activo por el TetK o TetL, codificados por los genes móviles *Tet* (Levy et al., 1999). Ambos mecanismos pueden haber sido inducidos por bajas concentraciones de Tetraciclina (Trzcinski et al., 2000).

5.7.7. Resistencia a Aminoglicósidos

La Resistencia a los **Aminoglicósidos** se ha evaluado con Gentamicina, Tobramicina y Estreptomicina, la única cepa que ha mostrado resistencia a los tres antibióticos (Tabla 8) ha sido la cepa C1, SARM, de origen equino. Sin embargo, el resto de las cepas eran sensibles a Gentamicina y Tobramicina, mientras que las cepas C80, C124 (origen equino) y las C107, C108 y C113 (origen humano), eran resistentes a Estreptomicina, y las cepas C20, C26, y C29 (de origen equino), y la cepa C97 (origen humano), mostraban resistencia Intermedia. Todos los Aminoglicósidos se unen a la subunidad ribosomal 30S, pero las interacciones de cada uno de ellos es diferente, lo que explicaría el hecho de haber encontrado sensibilidad a la Gentamicina y Tobramicina, pero no a la Estreptomicina en algunas de las cepas del estudio, además los genes que lo codifican se encuentran en transposones y elementos móviles que favorece la diseminación de estos genes entre las bacterias. El estudio genético podría detectar los genes que porta la cepa C1, SARM, en relación con las resistencias encontradas a la Estreptomicina en el resto de las cepas (Vakulenko and Mabasthery, 2003; McCallum et al. 2010).

5.7.8. Resistencia a Fluoroquinolonas

La resistencia a las **Fluoroquinolonas** la hemos valorado con la Ciprofloxacina, y se puede decir que, en general, la sensibilidad a este antibiótico ha sido elevada, ya que solo las cepa C124 (origen equino), C97 y C113 (origen humano) han mostrado resistencia Intermedia a este antibiótico. La resistencia puede deberse a la mutación de los genes *gyrA* y *gyrB*, que controlan la enzima topoisomerasa y la replicación del ADN bacteriano, pero también por el aumento del eflujo del antibiótico por la familia NOR de bombas de eflujo, que a su vez, se sabe que pueden favorecer la resistencia a β -lactámicos, Tetraciclinas, Cloranfenicol y otros compuestos químicos (Mesak et al., 2008; Tattevin et al. 2009; McCallun et al., 2010). La cepa C1, SARM, no ha mostrado resistencia a Ciprofloxacina, por lo que la resistencia a β -lactámicos y el resto de antibióticos, debería ser independiente de los sistemas de eflujo de antibióticos.

5.7.9. Patrón fenotípico de resistencia a los antibióticos de las cepas aisladas

Finalmente, vemos que entre las 12 cepas de *S. aureus* aisladas, 10 muestran un patrón fenotípico de resistencia diferente al de las demás, sin embargo, las cepas **C107 y C108** aisladas de fosas nasales y espacios interdigitales respectivamente, de la misma persona, muestran un fenotipo de resistencia idéntico. Ambas han mostrado resistencia a Estreptomicina, Lincomicina y Ácido Fusídico, y resistencia Intermedia a Eritromicina y Teicoplanina, sin embargo no muestran resistencia a ninguno de los β -lactámicos. Estas cepas pertenecen a un alumno en prácticas en el HCV-UZ que se relaciona habitualmente con los caballos de dicho hospital, también tiene contacto con perros y

además en su familia hay relación con ambientes médicos. Este alumno había recibido tratamiento antibiótico en los últimos 6 meses.

El hecho de encontrar estas cepas iguales en fosas nasales y espacios interdigitales, concuerda con lo ya constatado en numerosas ocasiones respecto al papel de las manos como vectores de una cepa que coloniza las fosas nasales (Cesur and Cocka, 2004; Cole et al., 2001; Reagan et al., 1991; Weidenmaier et al., 2004; Rodríguez-Baño et al., 2008; WHO Guidelines, 2009; Gagne et al., 2010; Skov et al., 2012). Es probable que la cepa sea procedente de la Comunidad, puesto que es una cepa poco resistente y se ha observado, en el caso de cepas CA-MRSA, que son menos resistentes que las cepas HA-MRSA. La relación con el ambiente veterinario de forma continuada, también hace pensar en su origen animal, si bien la posibilidad de que tenga relación con el HCV-UZ es poco probable puesto que no se ha aislado en los caballos del estudio ni en el resto del personal relacionado con estos caballos. No es posible saber con una sola muestra, si la presencia de *S. aureus* en las manos de esta persona es momentánea e intermitente, o bien ha colonizado los espacios interdigitales. Razón por la que en posteriores estudios de estas cepas, se le sugerirá la posibilidad de controlar la presencia de *S. aureus* en ambas localizaciones de forma periódica.

Como indican Krishna y Miller (2011), para que la piel sea colonizada se necesita que concurren una serie de factores que alteren el pH y la temperatura, que la flora normal de la piel esté ausente o alterada, y que los queratinocitos no excreten las sustancias bactericidas y bacteriostáticas que protegen la piel, entre otros. Estos autores también indican que esta capacidad de colonizar es igual en las cepas SARM y en las SASM.

En un importante estudio realizado en EEUU encontraron que las infecciones de la piel por *S. aureus* afectaban a 11,6 millones de pacientes externos y en las salas de visita de emergencias, y cerca de 500.000 en las admisiones anuales (McCaig et al., 2006). Esta infección representa una amenaza a la Salud Pública dado al gran número de infecciones que podría provocar y la amplia diseminación de cepas resistentes como las SARM. En EEUU se calcula que un 30% de la población está colonizado en piel y/o mucosas con *S. aureus*.

6. RECOMENDACIONES DERIVADAS DE ESTE ESTUDIO

La alta prevalencia de aislamientos de *S. aureus* en el Hospital Veterinario de caballos de la UZ, y la presencia de una cepa SARM en uno de ellos, pone de manifiesto la necesidad de mejorar las medidas preventivas. A pesar de que no hay medidas específicas que aseguren la desaparición completa de su presencia, se han hecho algunas adaptaciones de las medidas empleadas en Hospitales humanos que han sido recomendadas tanto para animales de compañía como para caballos.

Resumen de medidas recomendadas para controlar la infección y colonización con SARM en animales (Leonard y Markey, 2008)

I) Prevenir la introducción de la infección:

- Realizar cultivo a partir del foco de infección y/o fosas nasales en el momento de la admisión, y mantenerlos aislados hasta que se sepa que el resultado es negativo. Esto no siempre es posible en todas las clínicas, aunque puede ser una medida útil en hospitales de referencia.

II) Prevenir la transmisión Animal-Humano y Humano-Animal:

- Higiene de las manos (lavado correcto, desinfectantes de base alcohólica, cubrir heridas y lesiones de la piel, usar guantes desechables, máscaras, protección ocular, delantales desechables cuando se va a contactar con heridas, fluidos corporales u otros materiales contaminantes). Los detalles pueden encontrarse en diferentes artículos desarrollados para hospitales humanos (Rodríguez-Baño et al., 2006).
- Estricta asepsia en la cirugía.
- Sondear la presencia de SARM en el personal de la Clínica (si se han detectado agrupamientos de infección en los animales, y colaboración con la profesión médica).

III) Prevención de la transmisión Animal a Animal:

- Aislamiento de los casos sospechosos de estar infectados por SARM.
- Controlar la entrada a esa sala y siempre que sea posible, hospitalizarlos en áreas de aislamiento. Se puede intentar la eliminación del estado de portador, pero hay pocos datos de su eficacia.

IV) Prevenir la Transmisión Indirecta:

- Limpieza y Desinfección estándar:

- En todas las superficies que tocan las manos (manillas de las puertas, estetoscopios, pizarras, lápices...)
- En las salas de consulta/aislamiento o cualquier otro lugar en los que los animales infectados han estado.
- Especial cuidado con termómetros, collares u otros equipos de manejo, en casos de animales sospechosos o positivos.

7. CONCLUSIONES

1. No se ha observado que los équidos y personas de este estudio comparten cepas de *S. aureus*.
2. En el Hospital de Caballos de la Universidad de Zaragoza, no existe ninguna cepa de *S. aureus* en particular que circule entre las personas que trabajan en él o en los équidos ingresados.
3. La frecuencia de *S. aureus* en el ambiente hospitalario ha sido claramente superior a la detectada en los caballos de la Comunidad, mientras que en las personas las proporciones han sido similares en ambos ambientes.
4. El género masculino y los machos equinos del estudio parecen estar más predisuestos a la colonización/infección con *S. aureus*.
5. La única cepa SARM, aislada de la supuración de la incisión quirúrgica de un équido, parece tener origen humano y muestra multirresistencia a los antibióticos.
6. En la población estudiada (humana y equina), no se han aislado cepas de *S. intermedius*.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez F., Palomar M., Insausti J., Olaechea P., Cerdá E., Sánchez J., de la Torre M. V.** Infecciones nosocomiales por *Staphylococcus aureus* en pacientes críticos en unidades de cuidados intensivos. Medicina Clínica. 2006; 126: 641-6.
- Aly R., Levit S.** Adherence of *Staphylococcus aureus* to squamous epithelium: role of fibronectin and teichoic acid. Reviews of Infectious Diseases. 1987; 9: 341-350.
- American Academy of Microbiology.** Antibiotic Resistance: An Ecological Perspective on an Old Problem. American Academy of Microbiology. 2009. <http://www.asm.org>.
- Anderson M., Lefebvre S.L., Rankin S.C., Aceto H., Morley P.S., Caron J.P., Welsh R.D., Holbrook T.C., Moore B., Taylor D.R., Weese J.S.** A prospective study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in 115 horses. Equine Veterinary Journal. 2008.
- Anderson M., Weese J.** Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swabs in horses. Veterinary Microbiology. 2007; 122: 185-189.
- Anzai T., Kamada M., Kanemaru T., Sugita S., Shimizu A., Higuchi, T.** Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from mares with metritis and its zoonoepidemiology. Journal of Equine Science. 1996; 7: 7-11.
- Appelbaum P.C.** Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Review. International Journal of Antimicrobial Agents. 2007; 30: 398-408.
- Asensio A., Cantón R., Vaqué J., Roselló J., Calbo F., García-Caballero J., Domínguez V., Hernández A., Trilla A.** Nosocomial and community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in hospitalized patients (Spain, 1993-2003). Journal of Hospital Infection. 2006; 63: 465-71.
- Baptiste K. E., Williams K., Williams N. J., Wattret A., Clegg P. D., Dawson S., Corkill J. E., O'Neill T., Hart C. A.** Methicillin-resistant staphylococci in companion animals. Emerging Infectious Diseases. 2005; 11: 1942-1944.
- Bartels M.D., Kristoffersen K., Slotsbjerg T., Rohde S.M., Lundgren B., Westh H.** Environmental meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) disinfection using dry-mist-generated hydrogen peroxide. Journal of Hospital Infection. 2008; 70: 35-41.

Bes M., Brun Y. Staphylococcus: Actualités taxonomiques et identification. Revue Francaise des Laboratoires. 2002; 343: 23-30.

Bitterman Y., Laor A., Itzhaki S., Weber G. Characterization of the best anatomical sites in screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2010; 29: 391–397.

Bogaert D., van Belkum, A., Sluijter M., Luijendijk A., de Groot R., Rümke H.C., Verbrugh H.A., Hermans P.W.M. Colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. Lancet. 2004; 363: 1871-1872.

Broseta A., Chaves F., Rojo P., Otero J.R. Emergencia de un clon de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de origen comunitario en la población pediátrica del sur de Madrid. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2006; 24: 31-35.

Busscher J.F., van Duijkeren E., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan M.M. The prevalence of methicillin-resistant staphylococci in healthy horses in the Netherlands. Veterinary Microbiology. 2006; 113: 131–136.

Castanheira M., Watters A.A., Mendes R.E., Farrell D.J., Jones R.N. Occurrence and molecular characterization of fusidic acid resistance mechanisms among *Staphylococcus* spp. from European countries (2008). Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010; 65: 1353–8.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin. Morbidity and Mortality Weekly Report. 1997; 46: 624-626.

Cesur S., Cokca F. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among hospital staff and outpatients. Infection Control and Hospital Epidemiology. 2004; 25: 169-171.

Chanchaithong P., Prapasarakul N. Biochemical markers and protein patterns analysis for canine coagulase-positive staphylococci and their distribution on dog skin. Journal of Microbiological Methods. 2011; 86: 175–181.

Chen C.S., Chen C.Y., Huang Y.C. Nasal carriage rate and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among medical students at a Taiwanese university. International Journal of Infectious Diseases. 2012; 6.

CLSI. Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Information Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and laboratory Standards Institut. 2012.

- Coia J.E., Duckworth G.J., Edwards D.I., Farrington M., Fry C., Humphreys H., Mallaghan C., Tucker D.R., Joint Working Party of the British Society of Antimicrobial Chemotherapy, Hospital Infection Society, Infection Control Nurses Association.** Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *Journal of Hospital Infection*. 2006; 64: 97-8.
- Cole A. M., Dewan P., Ganz T.** Innate antimicrobial activity of nasal secretions. *Infection and Immunity*. 1999; 67: 3267–3275.
- Cole A.M., Thak S., Oen A., Yoshioka D., Kim Y-H., Park A., Ganz T.** Determinants of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2001; 8: 1064-1069.
- Connell S.R., Trieber C.A., Dinos G.P., Einfeldt, E., Taylor D.E., Nierhaus, K.H.** Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. *EMBO Journal*. 2003; 22: 945–953.
- Cosgrove S.E., Carmeli Y.** The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. *Clinical Infectious Diseases*. 2003; 36: 1433-7.
- Cosgrove S.E., Sakoulas G., Perencevich E.N., Schwaber M.J., Karchmer A.W., Carmeli Y.** Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a metaanalysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2003; 36:53-9.
- Cuevas O., Cercenado E., Vindel A., Guinea J., Sánchez-Conde M., Sánchez-Somolinos M., Bouza E.** Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:4240-5.
- Cuny C., Friedrich A., Kozytska K., Layer F., Nübel U., Ohlsen K., Strommenger B., Walther B., Wieler L., Witte W.** Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *International Journal of Medical Microbiology*. 2012; 300: 109–117.
- Cuny C., Kuemmerle J., Stanek C., Willey B., Strommenger B., Witte W.** Emergence of MRSA infections in horses in a veterinary hospital: strain characterisation and comparison with MRSA from humans. *Euro Surveill*. 2006; 11: 44–47.
- Cuny C., Strommenger B., Witte W., Stanek C.** Clusters of infections in horses with MRSA ST1, ST254, and ST398 in a veterinary hospital. *Microbial Drug Resistance*. 2008; 214: 307–310.

Davis K.A., Stewart J.J., Crouch H.K., Florez C.E., Hospenthal D.R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2004; 39: 776-782.

Declercq P., Petre D., Gordts B., Voss A. Complicated Community-Acquired Soft Tissue Infection by MRSA from Porcine Origin. *Infection*. 2008; 36: 590-592.

Denis O., Suetens C., Hallin M., Ramboer I., Catry B., Gordts B., Butaye P., Struelens M.J. High prevalence of "livestock-associated" methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in swine and pig farmers in Belgium. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMIC), Barcelona, Spain. 2008.

Dewaele I., Messens W., De Man I., Delputte P., Herman L., Patrick P., Heyndrickx M., Rasschaert G. Sampling, prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on two Belgian pig farms. *Veterinary Science Development*. 2011; 1.

Domínguez M.A., de Lencastre H., Liñares J., Tomasz A. Spread and maintenance of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone during an outbreak of MRSA disease in a Spanish hospital. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994; 32: 2081-7.

Durdik P., Fedor M., Jesenak M., Hamzikova J., Heena H., Banovcin P. *Staphylococcus intermedius*- rare pathogen of acute meningitis. *International Journal of Infectious Diseases*. 2010; 14: 236–238.

EASAC. Combating the threat of zoonotic infections. EASAC Policy report 2008; <http://www.easac.org>.

EASAC. Tackling antibacterial resistance in Europe. 2007. ISBN: 9780854036387.

ECDC, EFSA and EMEA. Joint Scientific Report Of Assesment of the Public Health significance of meticillin resistant *S. aureus* in animals and food. 2009. <http://www.emea.europa.eu/Homs/antimicrobial/antimicrobial.htm>.

ECDC, EMEA. Joint technical record. The bacterial challenge: time to react. A call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. 2009 <http://ecdc.europa.eu> . <http://emea.europa.eu>

ECDC. Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2010: 31-32. www.ecdc.europa.eu

EFSA. Assessment of the Public Health significance of meticillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in animals and foods. 2009; 993: 1-29. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/993.htm>

Ekkelenkamp M.B., Sekkat M., Carpaj N., Troelstra A., Bonten, M.J. Endocarditis due to meticillin-resistant Staphylococcus aureus originating from pigs. Nederlands tijdschrift voor geneeskunde. 2006; 44: 2442-2447.

Ellis M.W., Hospenthal D.R., Dooley D.P., Gray P.J., Murray C.K. Natural history of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization and infection in soldiers. Clinical Infectious Diseases. 2004; 39: 971-979.

EMEA. Reflection paper on MRSA in food producing and companion animals in the European Union: Epidemiology and control options for human and animal health. EMEA/CVMP/SAGAM/68290/2009.

Ferry T., Thomas D., Genestier A.L., Bes M., Lina G., Vandenesch F., Etienne J. Comparative prevalence of superantigen genes in Staphylococcus aureus isolates causing sepsis with and without septic shock. Clinical Infectious Diseases. 2005; 41: 771-777.

Fridkin S.K., Hageman J.C., Morrison M., Sanza L.T., Como-Sabetti K., Jernigan J.A., Harriman K., Harrison L.H., Lynfield R., Farley M.M. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus disease in three communities. New England Journal of Medicine. 2005; 352: 1436-44.

Gagne D., Bedard G., Maziade P.J. Systematic patients hand disinfection: impact on meticillin-resistant Staphylococcus aureus infection rates in a community hospital. Journal of Hospital Infection. 2010; 75: 269-72.

Gaspard P., Eschbach E., Gunther D., Gayet S., Bertrand X., Talon D. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus contamination of healthcare workers uniforms in long-term care facilities. Journal of Hospital Infection. 2009; 71: 170-175.

Graham P.L., Lin S.X., Larson E.L. A US population-based survey of Staphylococcus aureus colonization. Annals of Internal Medicine. 2006; 144: 318-325.

Grundmann H., Hori S., Enright M.C., Webster C., Tami A., Feil E.J., Pitt T. Determining the genetic structure of the natural population of Staphylococcus aureus: a comparison of multilocus sequence typing with pulsed-field gel electrophoresis, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and phage typing. Journal of Clinical Microbiology. 2002; 40: 4544-4546.

Hanselman B.A., Kruth S., Weese J.S. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. *Veterinary Microbiology*. 2007; 126: 277–281.

Hardy K.J., Oppenheim B.A., Gossain S., Gao F., Hawkey P.M. A study of the relationship between environmental contamination with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and patients acquisition of MRSA. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2006; 27: 127-32.

Hartman B.J., Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 1984; 158: 513–516.

Hartmann F., Trostle S.S., Klohnen A.A. Isolation of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a postoperative wound infection in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1997; 211: 590–592.

Hata E., Katsuda K., Kobayashi H., Nishimori K., Uchida I., Higashide M., Shikawa E., Sasaki T., Eguchi M. Bacteriological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from humans and bulk milk. *Journal of Dairy Science*. 2008; 91: 564–569.

Hermans K., Lipinska U., Denis O., Deplano A., Struelens M., Nemati M., Pasmans F., Butaye P., Martens A., Deprez P., Haesebrouck F. MRSA clone ST398-SCCmecIV as a cause of infections in an equine clinic. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. 2008; 77: 429-433.

Honda H., Doern C.D., Dunne W.M., Warren D.K. The impact of vancomycin susceptibility on treatment outcomes among patients with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infectious Diseases*. 2011; 11: 335.

Hsieh J.M., Chen R.S., Tsai T.Y., Pan T.M., Chou C.C. Phylogenetic analysis of livestock oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*. 2008; 126: 234–242.

Ishii Y., Alba J., Maehara C., Murakami H., Matsumoto T., Tateda K., Furuya N., Iwata M., Yamaguchi K. Identification of biochemically atypical *Staphylococcus aureus* clinical isolates with three automated identification systems. *Journal of Medical Microbiology*. 2006; 55: 387–392.

Kluytmans J., van Belkum A., Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997; 10: 505–520.

Krishna S., Miller L. Host-pathogen interactions between the skin and *Staphylococcus aureus*. *Current opinion on Microbiology*. 2011.

- Lee M.C., Rios A.M., Aten M.F., Mejias A., Cavuoti D., McCracken G.H., Hardy R.D.** Management and outcome of children with skin and soft tissue abscesses caused by community- acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pediatric Infectious Diseases Journal*. 2004; 23: 123-7.
- Lencastre H., Oliveira D., Tomasz A.** Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Current Opinion in Microbiology*. 2007; 10: 428-435.
- Leonard F.C., Markey B. K.** Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Veterinary Journal*. 2008; 175: 27-36.
- Levy S.B., McMurry L.M., Barbosa T.M., Burdett V., Courvalin P., Hillen W., Roberts M.C., Rood J.I., Taylor D.E.** 1999. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999; 43: 1523–1524.
- Lewis H.C., Molbak K., Reese C., Aarestrup F.M., Selchau M., Sorum M., Skov R.L.** Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*. 2008; 14: 1383-1389.
- Li H.T., Zhang T.T., Huang J., Zhou Y.Q., Zhu J.X., Wu B.Q.** Factors associated with the outcome of life-threatening necrotizing pneumonia due to community acquired *Staphylococcus aureus* in adult and adolescent patients. *Respiration*. 2011; 81: 448–60.
- Lodisea P., McKinnon P.S..** Clinical and economic impact of methicillin resistance in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2005; 52: 113– 122.
- Loeffler A., Pfeiffer D.U., Lloyd D.H., Smith H., Soares-Magalhaes R., Lindsay J.A.** Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in UK veterinary staff and owners of infected pets: new risk groups. *Journal of Hospital Infection*. 2010; 74: 282-288.
- Lozano C., Gómez-Sanza E., Benito D., Aspiroz C., Zarazaga M., Torres C.** *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011; 301: 500– 505.
- Mahoudeau I., Delabranche X., Prevost G., Monteil H., Piemont Y.** Frequency of isolation of *Staphylococcus intermedius* from humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997; 35: 2153–2154.

Matsuoka M., Endou K., Kobayashi H., Inoue M., Nakajima Y. A plasmid that encode three genes for resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiology Letters. 1998; 167: 221-227.

McCaig L.F., McDonald L.C., Mandal S., Jernigan D.B. *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. Emerging Infectious Diseases. 2006; 12: 1715-1723.

McCallum N., Berger-Bachi B., Senn M.M. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. International Journal of Medical Microbiology. 2010; 300: 118–129.

Meemken D., Cuny C., Witte W., Eichler U., Staudt R., Blaha T. Occurrence of MRSA in pigs and in humans involved in pig production, preliminary results of a study in the northwest of Germany. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 2008; 115: 132-139.

Mesak L.R., Miao V., Davies J. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on SOS and DNA repair gene expression in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2008; 52, 3394–3397.

Middleton J., Fales W., Luby C., Oaks J., Sanchez S., Kinyon J., Wu C., Maddox C., Welsh R., Hartmann F. Surveillance of *Staphylococcus aureus* in veterinary teaching hospitals. Journal of Clinical Microbiology. 2005; 43: 2916–2919.

Moodley A., Nightingale E.C., Stegger M., Nielsen S.S., Skov R.L., Guardabassi L. High risk for nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among Danish veterinary practitioners. Scandinavian Journal of Work, Environment and Health. 2008; 34: 151–157.

Morgan M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis?. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008; 62: 1181-1187.

Morris D., Rook K., Shofer F., Rankin S. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–04). Veterinary Dermatology. 2006; 17: 332–337.

Naimi T.S., LeDell K.H., Como-Sabetti K., Borchardt S.M., Boxrud D.J., Etienne J., Johnson S.K., Vandenesch F., Fridkin S., O'Boyle C., Danila R.N., Lynfield R. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Journal of the American Medical Association. 2003; 290: 2976-84.

- O'Mahony R., Abbott Y., Leonard F., Markey B., Quinn P., Pollock P., Fanning S., Rossney A.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. *Veterinary Microbiology*. 2005; 109: 285–296.
- Oteo J., Baquero F., Vindel A., Campos J., Spanish members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS).** Antibiotic resistance in 3113 blood isolates of *Staphylococcus aureus* in 40 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2000-2002). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004; 53: 1033-8.
- Pérez E., García J.M., Cilla G., Cisterna R.** Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital. *Reviews of infectious diseases*. 1998; 10: 627-8.
- Perl T.M., Cullen J.J., Wenzel R.P., Zimmerman M.B., Pfaller M.A., Sheppard D., Twombly J., French P.P., Herwaldt L.A., Mupirocin And The Risk Of Staphylococcus Aureus Study Team.** Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*. 2002; 346: 1871–1877.
- Petti S., De Giusti M., Moroni C., Antonella A.** Long-term survival curve of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on clinical contact surfaces in natural-like conditions. *American Journal of Infection Control*. 2012; 1-3.
- Pottumarthy S., Schapiro J.M., Prentice J.L., Houze Y.B., Swanzey S.R., Fang F.C., Cookson B.T.** Clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* masquerading as methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42: 5881–4.
- Reagan D.R., Doebebing B.N., Pfaller M.A., Sheetz C.T., Houston A.K., Hollis R.J., Wenzel R.P..** Elimination of coincident *S. aureus* nasal and hand carriage with intranasal application of mupirocin calcium ointment. *Annals of Internal Medicine*. 1991; 114: 101–106.
- Rodríguez-Baño J., Bischofberger C., Álvarez F., Asensio A., Delgado T., García D., García L., Hernández M.J., Molina J., Pérez C., Pujol M.** Vigilancia y control de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en hospitales españoles. Documento de consenso GEIH-SEIMC y SEMPSPH. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2008; 26: 285-298.
- Rodríguez-Baño J., Millán A., Domínguez M.A., Almirante B., Cercenado E., Padilla B., Pujol M.** *Staphylococcus aureus* en España: características clínicas y epidemiológicas. Proyecto SARM 2003 GEIH/GEMARA/REIPI. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2004; 1: 78.

Rodríguez-Baño J., Millán A., Domínguez M.A., Almirante B., Cercenado E., Padilla B., Pujol M. Medidas de control de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en hospitales españoles. Encuesta del proyecto SARM 2003 GEIH/GEMARA/REIPI. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2006; 24: 149-156.

Rohra U., Kaminskib A., Wilhelma M., Jurzika L., Gatermann S., Muhrb G. MRSA Colonization of patients and contamination of the patients environment by under conditions of single-room isolation. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 2009; 212: 209–215.

Ruscher C., Lübbe-Becker A., Wleklinski C.G., Soba A., Wieler L.H., Walther B. Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. Veterinary Microbiology. 2009; 136: 197–201.

Safdar N., Bradley E.A. The risk of infection after nasal colonization with *Staphylococcus aureus*. American Journal of Medicine. 2008; 121: 310-315.

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

Seguin J.C., Walker R.D., Caron J.P., Kloos W.E., George C.G., Hollis R.J., Jones R.N., Pfaller M.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. Journal of Clinical Microbiology. 1999; 37: 1459-1463.

Seybold U., Schubert S., Bogner J.R., Hogardt M. *Staphylococcus aureus* infection following nasal colonization: an approach to rapid risk stratification in a university healthcare system. Journal of Hospital Infection. 2011; 79: 297-301.

Shimizu A., Kawano J., Yamamoto C., Kakutani O., Anzai T., Kamada M. Genetic analysis of equine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis. Journal of Veterinary Medical Science. 1997; 59: 935–937.

Skiest D.J., Brown K., Cooper T.W., Hoffman-Roberts H., Mussa H.R., Alan C. Elliott A.C. Prospective comparison of methicillin-susceptible and methicillin-resistant community-associated *Staphylococcus aureus* infections in hospitalized patients. Journal of Infection. 2007; 54: 427-434.

Skov R., Christiansen K., Dancer S.J., Daum R.S., Drydene M., Huang Y.C., Lowy F.D. Update on the prevention and control of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). International Journal of Antimicrobial Agents. 2012; 39: 193– 200.

- Smith T.L., Jarvis W.R.** Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microbes and Infection*. 1999; 10: 795-805.
- Stefani S., Chung D.R., Lindsay J.A., Friedrich A.W., Kearns A.M., Westh H., MacKenzie F.M.** Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2012; 39: 273–282.
- Sung J.M., Lloyd D.H., Lindsay J.A.** *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. *Microbiology*. 2008; 154: 1949–1959.
- Tattevin P., Basuino L., Chambers H.F.** 2009. Subinhibitory fluoroquinolone exposure selects for reduced beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and alterations in the SOS mediated response. *Research in Microbiology*. 2009; 160: 187-192.
- Tenover F.C.** The quest to identify heterogeneously resistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010; 36: 303–306.
- Tiemersma E.W., Bornzwaer S.L., Lyytikäinen O., Degener J.E., Schrijnemarkers P., Bruinsma N., Momen J., Witte W., Grundman H.** European antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerging Infectious Diseases*. 2004; 9: 1627-34.
- Tokateloff N., Manning S. T., Weese J.S., Campbell J., Rothenburger J., Stephen C., Bastura V., Gow S.P., Reid-Smith R.** Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in horses in Saskatchewan, Alberta, and British Columbia. *Canadian Veterinary Journal*. 2009; 50: 1177–1180.
- Travis S. M., Conway B.A., Zabner J., Smith J.J., Anderson N.N., Singh P.K., Greenberg E.P., Welsh M.J..** 1999. Activity of abundant antimicrobials of the human airway. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1999; 20: 872–879.
- Trzcinski K., Cooper B.S., Hryniwicz W., Dowson C.G.** Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000; 45: 763–770.
- Vakulenko S.B., Mobashery S.** Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003; 16: 430–450.
- Van Belkum A., Melles D.C.** Not all *Staphylococcus aureus* strains are equally pathogenic. *Discovery Medicine*. 2005; 5(26): 148–15.

- Van Belkum A., Melles D.C., Nouwen J., van Leeuwen W.B., van Wamel W., Vos M.G., Wertheim H.F.L., Henri A., Verbrug H.A.** Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2009; 9: 32–47.
- Van den Eede A., Martens A., Lipinska U., Struelens M., Deplano A., Denis O., Haesebrouck F., Gasthuys F., Hermans K.** High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. *Veterinary Microbiology*. 2009; 133: 138–144.
- Van Duijkeren E., Houwers D.J., Schoormans A., Broekhuizen-Stins M.J., Ikawaty R., Fluit A.C., Wagenaar J.A.** Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedium* between humans and animals. *Veterinary Microbiology*. 2008; 128: 213–215.
- Van Duijkeren, E., Moleman M., van Oldruitenborgh-Oosterbaan M.M.S., Mulatem J., Troelstra A., Fluit A.C., van Wamel W.J.B., Houwers D.J., de Neeling A.J., Wagenaar J.A.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel: An investigation of several outbreaks. *Veterinary Microbiology* 2010; 141: 96–102.
- Van Rijen M.M., Van Keulen P.H., Kluytmans J.A.** Increase in a Dutch hospital of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to animal farming. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 46: 261–263.
- Vengust M., Anderson M., Rousseau J., Weese J.** Methicillinresistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. *Letters in Applied Microbiology*. 2006; 43: 602–606.
- Vincenot F., Saleh M., Prévos G.** Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2008; 407: 61–69.
- Vindel A., Trincado P., Gómez E., Cabrera R., Boquete T., Solá C., Valdezate S., Saez-Nieto J.A.** Prevalence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spanish hospitals between 1996 and 2002. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44: 266–70.
- Von Eiff C., Becker K., Machka K., Stammer H., Peters G.** Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *New England Journal of Medicine*. 2001; 344: 11–16.
- Voss A., Loeffen F., Bakker J., Klaassen C., Wulf M.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infectious Diseases*. 2005; 11: 1965–1966.

- Walther B., Monecke S., Ruscher C., Friedrich A.W., Ehricht R., Slickers P., Soba A., Wlekliński C.G., Wieler L.H., Lübke-Becker A.** Comparative molecular analysis substantiates zoonotic potential of equine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009b; 47: 704–710.
- Walther B., Wieler L.H., Friedrich A.W., Brunnberg L., Lübke-Becker A.** *Staphylococcus aureus* and MRSA colonization rates among personnel and dogs in a small animal hospital: effect on nosocomial infections. *Berl Münch Tierarztl Wochenschr*. 2009a; 122.
- Wang J.L., Tang H.J., Hsieh P.H., Chiu F.Y., Chen Y.H., Chang M.C., Huang C.T., Chang-Pan L., Lau Y.J., Hwang K.P., Ko W.C., Wang C.T., Liu C.Y., Liu C.L., Po-Ren Hsueh P.R.** Fusidic acid for the treatment of bone and joint infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2012; 40: 103–107.
- Weese J.S.** A review of multidrug resistant surgical site infections. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*. 2008; 21: 1-7.
- Weese J.S., Archambault M., Willey B.M., Dick H., Hearn P., Kreiswirth B.N., Said-Salim B., McGeer A., Likhoshvay Y., Prescott J.F., Low D.E.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000–2002. *Emerging Infectious Diseases*. 2005; 11: 430–435.
- Weese J.S., Caldwell F., Willey B.M., Kreiswirth B.N., McGeer A., Rousseau J., Low D.E.** An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital. *Veterinary Microbiology*. 2006a; 114: 160–164.
- Weese J.S., Da Costa T., Button L., Goth K., Ethier M., Boehnke K.** Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the environment in a veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2004; 18: 468–470.
- Weese J.S., Dick H., Willey B.M., McGeer A., Kreiswirth B.N., Innis B., Low D.E.** Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Veterinary Microbiology*. 2006b; 115: 148–155.
- Weese J.S., Lefebvre S.L.** Risk factors for community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization in horses presented to a veterinary teaching hospital. *Can. Vet. J.* 2007; 48: 921–926.
- Weese J.S., Rousseau J.** Attempted eradication of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* colonisation in horses on two farms. *Equine Veterinary Journal*. 2005; 37: 510–514.

- Weese J.S., Rousseau J., Willey B., Archambault M., McGeer A., Low D.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses at a veterinary teaching hospital: frequency, characterization, and association with clinical disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2006c; 20: 182–186.
- Weese J.S., van Duijkeren E.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. 2010; 140: 418–429.
- Weidenmaier C., Kokai-Kun J.F., Kristian S.A., Chanturiya T., Kalbacher H., Gross M., Nicholson G., Neumeister B., Mond J.J., Peschel A.** Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nature Medicine*. 2004; 10: 243–245.
- Wenzel R.P., Reagan D.R., Bertino J.S., Baron E.J., Arias K.A.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak: a consensus panel's definition and management guidelines. *American Journal of Infection Control*. 1998; 26: 102–10.
- Wertheim H.F., Melles D.C., Vos M.C., van Leeuwen W., van Belkum A., Verbrugh H.A., Nouwen J.L.** The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infectious Diseases*. 2005; 5: 751–762.
- Wertheim H.F., Vos M.C., Boelens H.A., Voss A., Vandenbroucke- Grauls C.M., Meester M.H., Kluytmans J.A., van Keulen P.H., Verbrugh H.A.** Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at hospital admission in the Netherlands: the value of search and destroy and restrictive antibiotic use. *Journal of Hospital Infection*. 2004b; 56: 321–325.
- Wertheim H.F., Vos M.C., Ott A., van Belkum A., Voss A., Kluytmans J.A., van Keulen P.H., Vandenbroucke-Grauls C.M., Meester M.H., Verbrugh H.A.** Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet*. 2004a; 364: 703–705.
- WHO** Guidelines on Hand Hygiene in Health Care. ISBN 978 92 4 159790 6 (NLM classification: WB 300). © World Health Organization 2009.
- Witte W., Stommenger B., Stanek C., Cuny C.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 2007; 13: 255–258.
- Wulf M.W., Sørum M., van Nes A., Skov R., Melchers W.J., Klaassen C.H., Voss A.** Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in veterinarians: an international view. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008b; 14: 29–34.

Wulf M.W., Tiemersma E., Kluytmans J., Bogaers D., Leenders A.C., Jansen M.W., Berkhout J., Ruijters E., Haverkate D., Isken M., Voss A. MRSA carriage in healthcare personnel in contact with farm animals. Journal of Hospital Infection. 2008a; 70: 186-190.